

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ
РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА

УДК 577.21; 579.23

КООРДИНИРОВАННОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ
МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЧЛЕНОВ СЕМЕЙСТВА p53 ВЛИЯЕТ
НА ВАЖНЕЙШИЕ ПРОЦЕССЫ В МНОГОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМАХ

© 2011 г. А. Э. Вильгельм^{1,2}, А. И. Заика², В. С. Прасолов^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

²Department of Surgery, Vanderbilt University Medical Center and Vanderbilt-Ingram Cancer Center,
Nashville, Tennessee, USA

Поступила в редакцию и принята к печати 01.09.2010 г.

Впервые p53 был обнаружен в комплексе с вирусным большим Т-антигеном в клетках, трансформированных небольшим ДНК-содержащим вирусом обезьян SV40. Успешное клонирование кДНК p53 осуществлено в начале 80-х годов, а вскоре после этого клонировали и полный ген p53. Семейство p53 составляют три гена, TP53, TP63 и TP73, каждый из которых экспрессируется в виде набора различающихся по строению и активности изоформ. Все они интенсивно взаимодействуют между собой, образуя единую функциональную белковую сеть. В представленном обзоре обсуждается эволюция семейства p53, значение всех его членов в эмбриональном развитии, размножении, регенерации, регуляции старения и продолжительности жизни, а также их способность защищать организм от развития злокачественных опухолей. С особым вниманием рассмотрена роль менее изученных представителей семейства p53 – p63 и p73, в онкогенезе и опухолевой прогрессии. Показано, что различные изоформы этих белков могут оказывать противоположный эффект на эти процессы.

Ключевые слова: опухолевые супрессоры, p53, p63, p73, генетическая стабильность, апоптоз, канцерогенез, старение, регуляция пролиферации.

THE COORDINATED INTERACTION OF MULTIFUNCTIONAL MEMBERS OF p53 FAMILY DETERMINES MANY KEY PROCESSES IN MULTICELLULAR ORGANISMS, by A. E. Vilgelm^{1,2}, A. I. Zaika², V. S. Prassolov¹, * (¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia, *e-mail: prassolov@eimb.ru; ²Department of Surgery, Vanderbilt University Medical Center and Vanderbilt-Ingram Cancer Center, Nashville, Tennessee, USA). First time p53 was found in the complex with viral large T-antigene in the cells transformed by small DNA virus SV40. The cloning of p53 cDNA was done in the beginning of eighties and soon after that the whole p53 gene was cloned. The p53 family is comprised of three genes: TP53, TP63 and TP73, each of which is expressed as a set of structurally and functionally different isoforms. All of them intensively interact with each other forming a united functional network of proteins. In this review we discuss evolution of the p53 family and significance of all its members in embryonic development, reproduction, regeneration, regulation of aging and life span, as well as in the body's defense against cancer. With special attention we review the role of less studied members of the p53 family: p63 and p73, in oncogenesis and tumor progression and show that different isoforms of these proteins might exert a contrary effect on these processes.

Keywords: tumor suppressors, p53, p63, p73, genetic stability, apoptosis, carcinogenesis, aging, cell growth regulation.

ВВЕДЕНИЕ

Спустя 30 после обнаружения в вирусной системе [1, 2], p53 остается одним из наиболее интенсивно изучаемых в биологии белков. Первоначально повышенный интерес к p53 вызывался его исклю-

чительной способностью защищать организм от развития новообразований. К настоящему времени выявлено множество функций p53, среди которых – регуляция продолжительности жизни, развития, размножения, метаболизма и многие другие. Более того, перечень функций p53 неуклонно возрастает.

Принятые сокращения: Ser1 – гомологичный p53/p73 белок *C. elegans*; p53-RE – (p53 Response Element) чувствительный к p53 элемент; ДСД – ДНК-связывающий белок; ОД – олигомеризационный домен; САМ – стерильный α -мотив; ТАД – транс-активационный домен; ТА – транскрипционно-активные изоформы; Δ ТА или Δ N – изоформы с делецией ТАД на N-конце; ТИД – домен, ингибирующий транскрипцию; ФЭМ – фибробласты эмбриона мыши.

* Эл. почта: prassolov@eimb.ru

Важнейшая роль p53 заключается в обеспечении генетического гомеостаза многоклеточного организма, благодаря чему его называют “стражем генома” (the guardian of the genome) [3]. Будучи фактором транскрипции, p53 действует за счет активации или подавления транскрипции как минимум 129 генов-мишеней [4]. Продукты этих генов регулируют самые различные внутриклеточные процессы, включая деление и запрограммированную клеточную смерть, репарацию генома, дифференцировку, метаболизм и межклеточные взаимодействия [5]. Неудивительно, что для контроля таких разнообразных свойств p53 необходимо большое число регуляторов. Согласно общедоступной базе данных белок-белковых взаимодействий APID (Agile Protein Interaction DataAnalyzer, ловкий анализатор данных белковых взаимодействий) уже охарактеризовано более 350 взаимодействий p53 с другими белками. Несмотря на это, с высокой частотой появляются сведения о все новых регуляторах, мишенях и функциях p53. В последнее время рассматривается возможность использования p53 в терапии злокачественных заболеваний человека [6].

В связи с огромным количеством данных, сложностью и широтой области исследований p53 нетрудно упустить из виду значимость других представителей семейства p53 – p63 и p73. В представленном обзоре мы попытались показать, что p63 и p73, наряду с p53, играют важную роль в функционировании животных организмов, принимают участие в защите от развития новообразований, а также влияют на активность самого p53.

ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОВ И БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА P53

У человека семейство p53 образовано тремя генами, *TP53*, *TP63* и *TP73*, расположенными в хромосомных локусах 17p13.1, 1p36.32 и 3q28 соответственно. Белковые продукты этих генов, p53, p63 и p73, имеют сходное строение (рис. 1). Они содержат три основных эволюционно консервативных домена: Транс-Активационный Домен (ТАД), ДНК-Связывающий Домен (ДСД) и Олигомеризационный Домен (ОД), необходимых для функционирования в качестве факторов транскрипции. Центральные ДСД обеспечивают распознавание и связывание ДНК. Именно ДСД p53, p63 и p73 обладают наибольшим сходством аминокислотной последовательности (60% идентичности у p53 и p63/p73 и 87% – у p63 и p73) [7, 8]. Более того, аминокислотные остатки этого домена, обеспечивающие непосредственный контакт с ДНК, сходны у всех белков семейства p53. Поэтому неудивительно, что ДСД p63 и p73 способны распознавать и связы-

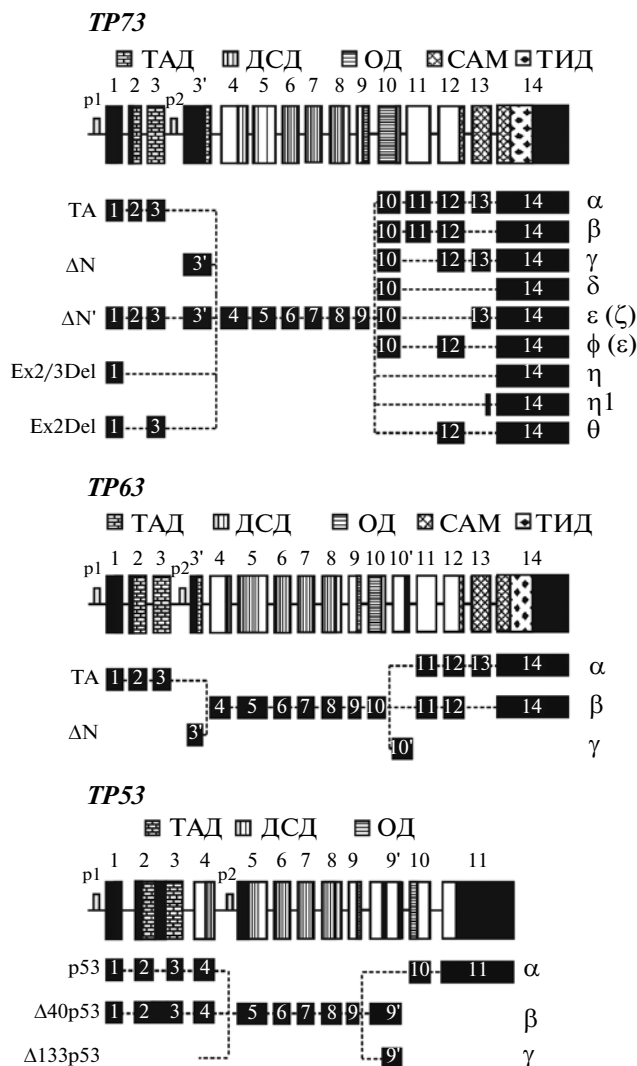


Рис. 1. Строение генов *TP73*, *TP63* и *TP53* человека и многообразие образующихся при их экспрессии изоформ мРНК. Арабскими цифрами обозначены порядковые номера экзонов.

вать и те же специфические участки ДНК, что и p53, так называемые p53-чувствительные элементы (p53-Response Element, или p53-RE) [9]. Канонический p53-RE состоит из двух повторов 5'-RRRCW-WGYYY-3' (где R = А или G; Y = С или Т; W = А или Т), разделенных 0–13 п.н. [10, 11]. Заметим, что p63 и p73 несколько отличаются от p53 предпочтением тех или иных нуклеотидных последовательностей. В соответствии с этим предприняты попытки уточнить формулы канонических RE, специфичных для p63 и p73 (p63-RE и p73-RE) [12, 13]. Описаны также p53-RE, отличные от канонического (так называемые неканонические p53-RE).

При связывании ДНК все члены семейства p53 образуют тетрамер (димер димеров). За димеризацию и последующую тетрамеризацию отвечает ОД.

ОД р63 и р73 содержат примерно 70% идентичных аминокислотных остатков, в то время как в ОД р53 таких остатков только около 30%. В соответствии с этой особенностью р63 и р73 способны образовывать гетеротетрамеры между собой (р63–р73), но не с р53 [14].

ТАД, расположенный на N-концевых участках белков семейства р53, участвует в активации транскрипции. Этот домен отвечает за взаимодействие с компонентами аппарата транскрипции и белками, модулирующими хроматин, а также за связывание дополнительных кофакторов транскрипции. Многие аминокислотные остатки этого домена служат мишенями для посттрансляционных модификаций.

Помимо трех перечисленных доменов, на C-конце р63 и р73 содержится дополнительный участок, включающий Стерильный α -Мотив (САМ) и Домен, Ингибирующий Транскрипцию (ТИД). Показано, что этот участок подавляет транскрипционную активность р63 и р73 за счет внутримолекулярных взаимодействий с ТАД и нарушения связывания с коактиваторами транскрипции [15, 16]. Помимо взаимодействий с различными белками, САМ обеспечивает связывание липидов, однако биологический смысл этого непонятен [17].

Интересно, что белки семейства р53 не всегда содержат САМ, ТИД и ТАД. Объясняется это тем, что гены этих белков дают начало множеству мРНК и белковых продуктов (изоформ). Изоформы р63 и р73 отличаются строением обоих концов полипептидной цепи (рис. 1). N-концевые различия изоформ р63 и р73 обусловлены альтернативным сплайсингом 5'-концевой области пре-мРНК, двумя промоторами в генах *TP73* и *TP63* и альтернативной инициацией трансляции, направляемой участком внутренней посадки рибосом (IRES). В соответствии с наличием или отсутствием ТАД на N-конце изоформы р63 и р73 подразделяют на Транскрипционно-Активные (ТА) изоформы и изоформы с делецией ТАД на N-конце (Δ ТА или Δ N). В результате альтернативного сплайсинга 3'-конца пре-мРНК *TP73* и *TP63* образуются изоформы, различающиеся строением C-концевой области. В настоящее время охарактеризованы девять ТА-изоформ р73 (ТАр73 α , β , γ , δ , ϵ , θ , ϕ , η и η 1) и три изоформы р63 (ТАр63 α , β и γ) [18–24]. Известно также шесть Δ N-изоформ р73 (Δ Nр73 α , Δ Nр73 β , Δ N'р73 α , Δ N'р73 β , Ex2Delp73 и Ex2/3Delp73) и три изоформы р63 (Δ Nр63 α , Δ Nр63 β и Δ Nр63 γ) [21, 25–27].

Ген *TP53* также дает начало нескольким альтернативным белковым продуктам. Как и у р63 и р73, изоформы р53 могут различаться строением и C-концевых (р53 α , или классический р53, р53 β и р53 γ), и N-концевых участков полипептидной цепи

(р53, Δ 40р53 и Δ 133р53). При этом у Δ -изоформ р53 отсутствует ТАД или его часть [28].

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА Р53

Несмотря на то, что у белков семейства р53 обнаружены биологические активности, не связанные с транскрипцией [29, 30], способность регулировать транскрипцию, прямо связываясь с расположенными в промоторах генов-мишеней р53-RE, вероятнее всего, исключительно важна для осуществления ими своих функций. Об этом свидетельствует тот факт, что именно ДСД, отвечающий за связывание с ДНК, а не какой-либо другой домен претерпел наименьшие изменения в ходе эволюции [31]. Более того, мутации, изменяющие аминокислотную последовательность именно этого домена р53, наиболее часто обнаруживают в опухолях человека [32, 33]. На сегодняшний день выявлены сотни генов-мишеней р53, и список мишеней постоянно возрастает [34]. К ним относятся гены, белковые продукты которых регулируют множество внутриклеточных процессов, а также гены микроРНК.

Строгая специфичность связывания ДСД р53, р63 и р73 с р53-RE и результаты полногеномного анализа р53-RE *in silico* говорят о том, что теоретически наборы генов-мишеней всех трех членов семейства р53 значительно перекрываются [9]. Экспериментальные данные, в целом, подтверждают эту идею. В частности показано, что ТА-изоформы р73 (ТАр73) увеличивают транскрипцию таких р53-зависимых генов, как *p21/Waf1*, *GADD45*, *14-3-3 σ* , *Bax*, *PUMA*, *NOXA*, *CD95/FAS*, *PIG3* и *p53AIP1* [35]. ТАр63 способен активировать промоторы генов *p21/Waf1*, *14-3-3 σ* , *Bax*, *PUMA*, *NOXA*, *CD95/FAS*, *PERP* и *APAF-1* [36]. Поэтому неудивительно, что ТАр73 и ТАр63 схожи с р53 по функциональной активности, они также способны запускать апоптоз, задерживать клеточный цикл или процесс клеточного старения (рис. 2). Заметим, что выявлены не только общие с р53, но и некоторые уникальные для р63 и р73 гены-мишени [12, 37, 38].

Изоформы ТАр73 и ТАр63 различаются способностью активировать транскрипцию и проапоптотическими свойствами. Считается, что они слабее по сравнению с р53, при этом ТАр73 β , ТАр73 γ и ТАр63 обладают наибольшей активностью. У ТАр73 α и ТАр63 α , напротив, самый низкий трансактивационный потенциал, поскольку они содержат ингибиторные C-концевые САМ и ТИД. Необходимо, однако, отметить, что в большинстве опубликованных на сегодняшний день работ изучали лишь некоторые изоформы р63 и р73, в основном α ,

β и γ. О функциях и активности других изоформ известно значительно меньше.

Показано, что ΔN-изоформы p63 и p73 действуют как доминантно-негативные ингибиторы TA-изоформ и p53 (рис. 2) [39]. Описаны два механизма ингибиторного действия ΔN-изоформ: соревнование за связывание p53-RE и образование гетероолигомеров [40–42]. Согласно механизму конкуренции за участки связывания, ΔN-изоформы вытесняют TA-изоформы и p53 с промоторов их генов-мишеней. Механизм образования гетерокомплексов предполагает, что ΔN-изоформы связываются с TA-изоформами за счет своих ОД, формируя транскрипционно неактивные гетероолигомерные комплексы. В то же время, новые данные позволяют предположить, что функции ΔN-изоформ не сводятся только к регуляции TA-изоформ и p53. ΔNp73 и ΔNp63 обладают собственной транскрипционной программой, связанной с присутствием в их молекуле уникального ТАД, отличного от домена в молекулах TA-изоформ [43–48]. Этот домен образован несколькими уникальными для ΔN-изоформ аминокислотными остатками на N-концевом участке полипептидной цепи.

Альтернативные формы p53 обнаружили сравнительно недавно, поэтому относительно мало известно об их функциях. По-видимому, Δ40p53, подобно ΔNp63 и ΔNp73, подавляет активность p53 [49, 50], однако, учитывая недостаточное количество данных, мы не рассматриваем альтернативные формы p53 в нашем обзоре. Подробнее с ними можно ознакомиться в статье [28].

ЭВОЛЮЦИЯ И ИСХОДНЫЕ ФУНКЦИИ СЕМЕЙСТВА p53

Эволюционная история семейства p53 насчитывает более миллиарда лет. Согласно данным сравнительной геномики, семейство p53 произошло от единого гена, возникшего у общего предшественника Protozoa и Zoa, который подвергся нескольким независимым дупликациям в ходе эволюции [51]. Трудно сказать, был ли первый ген семейства p53 более похож на TP53, TP63 или TP73 человека. В связи со значительной эволюционной дивергенцией простого сравнения нуклеотидной последовательности, кодирующей консервативный ДСД различных видов, не всегда достаточно для определения гомологии с генами человека. Поэтому часто учитывают дополнительные признаки, такие как присутствие (p63, p73) или отсутствие (p53) САМ-домена, а также наличие (p53) или отсутствие гомолога гена MDM2 – основного регулятора p53.

Наиболее древние организмы, у которых обнаружены гены, гомологичные TP53, TP63 и TP73 че-

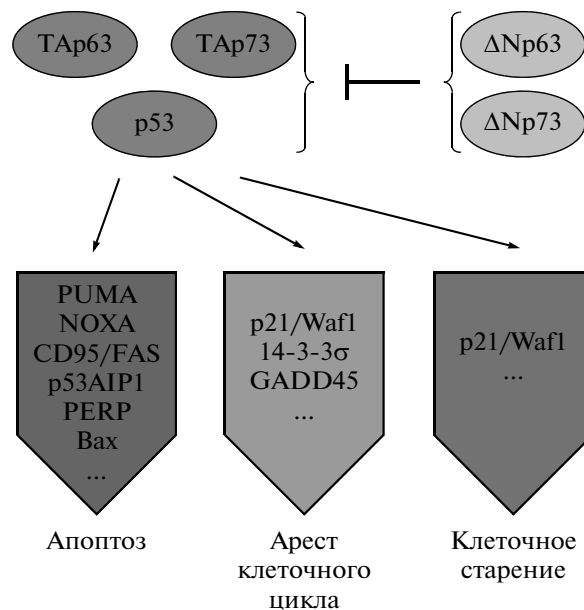


Рис. 2. Транскрипционная активность семейства p53. Наряду с p53, TA-p63 и TA-p73 активируют транскрипцию генов, регулирующих апоптоз, арест клеточного цикла и клеточное старение. Доминантно-негативные ΔN-изоформы p63 и p73 блокируют активность p53, TA-p63 и TA-p73.

ловека, – протисты, воротничковые жгутиковые хоанофлагелляты (*Monosiga brevicollis*) [51]. У этих одноклеточных найдены два гена, один из которых соответствует TP53 (не кодирует САМ), а другой – TP63 и TP73 (кодирует САМ). Однако значительное сходство этих генов между собой и гораздо меньшее сходство с p53-подобными генами представителей царства животных предполагает, что они образовались в результате дупликации общего гена-предшественника в ходе поздней эволюции хоанофлагеллят. При этом один из генов потерял или приобрел САМ-домен.

Следующий по филогенетической древности организм, у которого обнаружили гены семейства p53, – трихопласт (*Trichoplax adhaerens*), относящийся к роду пластинчатых (*Placozoa*) [52]. Это, имеющее вид тонкой пластинки, существо считается эволюционно наиболее ранним представителем подцарства настоящих многоклеточных Eumetazoa (все животные за исключением губок) [53]. Исследуя его геном, Lane и соавт. [52] обнаружили гены, гомологичные p53 и MDM2. Кодируемые этими генами белки обладают удивительным сходством с p53 и MDM2 человека (38 и 22% идентичных аминокислотных остатков соответственно). В геноме черноногого оленьего клеща (*Ixodes scapularis*), эктопаразита, участвующего в распространении возбудителя болезни Лайма, они обнаружили также два гомолога p53 и гомолог MDM2. Белковые про-

дукты этих генов на 28–34% (p53) и 23% (MDM2) идентичны соответствующим белкам человека [54].

Интересно, что у других беспозвоночных, включая такие хорошо изученные виды, как *Caenorhabditis elegans* и *Drosophila melanogaster*, гены, родственные MDM2, на сегодняшний день не описаны. При этом обнаруженные у них p53-подобные гены: по одному у моллюсков [55], *C. elegans* [56, 57] и *D. melanogaster* [58, 59], два или три у комаров [51] и три у актиний [60], ближе к генам p63/p73 позвоночных и человека, чем к p53 [61–63]. В частности, у актиний сходство p53-подобных белков и p63 человека достигает 46% [60]. В пользу эволюционной древности p63/p73 свидетельствует и САМ-домен, найденный в p53-подобных белках многих беспозвоночных [61, 62].

Эти данные говорят о возможности существования двух независимых путей в эволюции семейства p53 у беспозвоночных: p53/MDM2 и p63/p73. Тем не менее, большинство специалистов полагают, что лишь один из них дал начало p53, p63 и p73 современных позвоночных [63]. На это указывает значительное сходство белков p53, p63 и p73 позвоночных между собой (59–86% идентичных аминокислотных остатков в белках человека), подразумевающее их эволюционно позднее разделение. Предполагают, что первая дупликация единственного гена-предшественника произошла в период возникновения хрящевых рыб, в геноме которых обнаруживают два гена семейства, p53 и гомолог p63/p73. Вторую дупликацию в семействе, разделившую гены p63 и p73, связывают с появлением костных рыб. У них, а также у эволюционно более молодых видов позвоночных, находят все три гена семейства: p53, p63 и p73 [63]. Правда, существуют некоторые исключения. Например, в геноме кролика обнаружены только p53 и p63, и не найден p73. У слонов не найден ген p63, а у альпаки p53 и p73 [63]. Заметим, однако, что одно из наиболее простых объяснений этих феноменов может состоять в неполных данных анализа геномов перечисленных животных.

Присутствие белков семейства p53 у организмов, находящихся как в основании, так и на вершине филогенетического древа, и исключительно низкий темп их эволюционных преобразований, несомненно, свидетельствуют об исключительной важности этих молекул. К сожалению, на данный момент не известно, в чем заключается эта роль у одноклеточных хоанофлагеллят или у примитивного многоклеточного трихопласта. Наиболее простой организм с известной функцией гомологов семейства p53 — актиния *Nematostella vectensis*. У этого кишечнополостного с радиальной симметрией (родственника гидры) p63-подобный белок pvr63 синтезируется в гаметах, где он индуцирует апоптоз в ответ

на повреждающее действие УФ-излучения, предохраняя тем самым потомство от мутаций [60]. Вероятно, сохранение генетического постоянства вида — самая древняя функция белков этого семейства.

Эта функция сохраняется и у других беспозвоночных. В половых клетках нематоды *C. elegans* p63/p73-гомологичный белок Cer1 активирует апоптоз в ответ на повреждение ДНК, он необходим также для сегрегации хромосом в мейозе. Более того, Cer1 запускает процесс программируемой смерти гамет в ответ на гипоксию и голодание, координируя тем самым размножение в соответствии с доступностью пищевых ресурсов в среде обитания [56]. Единственный представитель семейства p53 у дрозофилы, белок Dmp53, активируясь в ответ на повреждение ДНК, запускает апоптоз в половых клетках [64, 65]. Дрозофилы с нокаутом гена *Dmp53* отличаются низкой плодовитостью [66].

Вероятно, семейство p53 принимает участие также в контроле развития беспозвоночных. Показано, что *Cer1* экспрессируется во всех клетках в эмбриогенезе нематод [56]. У дрозофилы инактивация *Dmp53* не нарушает развития в нормальных условиях, однако облучение личинок с мутантным *Dmp53* вызывает генетическую нестабильность и сопровождается высокой летальностью [65].

Контроль продолжительности жизни — еще одна из древнейших функций семейства p53. Нокаут *Cer1* увеличивает продолжительность жизни взрослых особей *C. elegans* за счет активации аутофагии [67, 68]. Нокаут *Dmp53* у дрозофилы, напротив, сопровождается преждевременной гибелью [69]. Однако при выборочной инактивации *Dmp53* в нейронах продолжительность жизни дрозофил увеличивается за счет снижения активности инсулинового сигнального пути [70].

ФУНКЦИИ СЕМЕЙСТВА p53 У ПОЗВОНОЧНЫХ

У позвоночных семейство p53 не только сохраняет все вышеперечисленные функции, но приобретает и многие новые, в частности, функцию контроля генетического гомеостаза соматических клеток взрослого организма. В отличие от дрозофилы и нематод, взрослые особи которых постмитотичны, для позвоночных характерна пролиферация соматических клеток. Это обусловлено значительным увеличением продолжительности жизни, а значит, и необходимостью прижизненного обновления тканей. Контроль генетического гомеостаза пролиферирующих соматических клеток лежит в основе новых функций семейства, среди которых регуляция регенерации, старения и защита организма от развития новообразований.

Контроль качества гамет и размножения

Все три члена семейства *p53* стоят на страже генома гамет, обеспечивая генетическую целостность потомства. При помощи специфического нокаута проапоптотических изоформ *p63* показано, что *TAp63*, но не *p53*, запускает программу апоптоза в ооцитах мышей с поврежденной ДНК [71]. *TAp73* принимает участие и в контроле качества женских гамет. Ооциты мышей со специфическим нокаутом *TAp73* характеризуются увеличением числа аномалий веретена деления в мейозе, а развивающиеся из них эмбрионы дефектны и погибают на ранней доимплантационной стадии [72]. *p53*, в свою очередь, контролирует генетическую целостность мужских гамет, вызывая апоптоз сперматогоний в ответ на повреждение ДНК [73].

Белки семейства *p53* регулируют также репродукцию в отсутствие генотоксического стресса. Инактивация *p53*, *p63* или *p73* у самок мышей приводит к значительному снижению плодовитости [74]. Показано, что *p53* контролирует имплантацию бластоцисты за счет регуляции лейкоз-ингибирующего фактора (LIF) [75]. *p73* может определять половое поведение позвоночных. Так, у самцов мышей с нокаутом *p73* отсутствует интерес к размножению вследствие нарушения чувствительности к феромонам самок [26].

Контроль эмбрионального развития и репарации

Семейство *p53* играет важную роль в развитии позвоночных. *p63* необходим для нормального развития тканей и органов эктодермального происхождения [76, 77]. Гетерозиготные мутации гена *TP63* лежат в основе развития многих врожденных синдромов человека, характеризующихся патологиями развития кожи и ее производных – волос и зубов, дефектами конечностей, а также расщелинами губы и неба [76, 78]. У мышей с нокаутом гена *p63* нарушено развитие многослойного эпителия. При этом наиболее разительное фенотипическое проявление нокаута *p63* – отсутствие стратификации (слоистого строения) эпидермиса, вследствие чего такие мыши погибают от обезвоживания вскоре после рождения. У них наблюдается недоразвитие конечностей, хвоста и наружных половых органов, черепно-лицевые и другие дефекты [79, 80]. Хотя ключевая роль *p63* в самообновлении и поддержании гомеостаза многослойного эпителия на сегодняшний день не вызывает сомнения, точный механизм действия *p63* остается предметом дискуссии. Изучая фрагменты недоразвитого эпидермиса у мышей *p63*^{-/-}, Roop и соавт. [80] не обнаружили маркеров дифференцировки кожи и предположи-

ли, что *p63* необходим для дифференцировки эктодермы в многослойный эпителий. Однако эти маркеры обнаружили в лаборатории McKeon [79, 81], и на основе этих и других экспериментальных данных заключили, что *p63* не влияет на дифференцировку, но необходим для пополнения и сохранения запаса стволовых клеток многослойного эпителия. Другой предмет споров – относительная важность *TA*- или ΔN -изоформ *p63*. Roop и соавт. показали, что *TAp63* первым синтезируется в эмбриогенезе, отвечает за стратификацию эпителия и блокирует терминальную дифференцировку клеток. При этом $\Delta Np63$ необходим для терминальной дифференцировки эпидермальных кератиноцитов [82, 83]. Группы ученых, руководимые Melino и Khavary, напротив, обнаружили, что $\Delta Np63$ играет основную роль в стратификации эпидермиса, обеспечивая пролиферацию клеток базального слоя. *TAp63*, в свою очередь, функционирует гораздо позднее, участвуя в процессе дифференцировки зрелых кератиноцитов [84, 85]. Вероятно, для нормального развития важны как *TA*-изоформы, так и ингибиторные ΔN -изоформы *p63*.

p73 также играет важную роль в эмбриогенезе, он необходим для нормального развития нервной системы. У новорожденных мышат с нокаутом гена *p73* наблюдается дисгенезия гиппокампа и гидроцефалия. Они значительно меньше по размеру, слабее и более склонны к хроническим инфекциям, чем мыши дикого типа. Большая часть таких мышей погибает в течение первых двух месяцев жизни [26]. Интересно, что выборочный нокаут *TA*- или ΔN -изоформ вызывает значительно менее существенные изменения фенотипа [72, 86]. Вероятно, как и в случае *p63*, присутствие как про- так и антиапоптотических изоформ *p73* важно в процессе эмбрионального развития.

Роль *p53* в развитии, в отличие от *p63* и *p73*, не столь очевидна. У лягушки инактивация гена *p53* летальна для эмбриона [87]. В то же время, рыбы (*Brachydanio rerio*) и мыши с нокаутом *p53* нормально развиваются в обычных условиях, а у человека наследственные гетерозиготные мутации в гене *p53* (синдром Ли-Фраумени) не приводят к формированию врожденных пороков развития. Важная роль *p53* в эмбриогенезе проявляется в условиях генотоксического стресса. В частности, при воздействии ионизирующего излучения или мутагенов *p53* индуцирует апоптоз эмбрионов мыши, предотвращая тем самым появление на свет мутантного потомства [88, 89].

Эмбриональное развитие – сбалансированная совокупность запускаемых в строго определенных клетках в строго определенное время процессов пролиферации и апоптоза. Семейство *p53* играет решающую роль в регуляции апоптоза, обеспечивая

смерть (p53, TAp63 и TAp73) или выживание (ΔN -изоформы p63 и p73) клеток эмбриона. Скоординированная работа про- и антиапоптотических белков необходима для нормального развития. Нерегулируемое повышение уровня как проапоптотических (p53), так и ингибиторных ($\Delta Np73$) белков семейства, нарушает процесс эмбрионального развития, причем зачастую фатально [90–92]. Логично предположить существование антагонистических взаимоотношений между этими белками. Один из примеров таких взаимоотношений найден в эмбриональных предшественниках нейронов коры, где $\Delta Np63$ противостоит p53-зависимому апоптозу [93]. Подобно $\Delta Np63$, $\Delta Np73$ противодействует апоптотической активности p53 в ходе развития симпатических нейронов [94, 95].

Координация про- и антиапоптотической стимуляции важна и для нормальной регенерации тканей. Показано, что при повышенной активности p53 нарушается процесс самообновления стволовых клеток и физиологической регенерации, приводя к ранней атрофии тканей [96]. Доминантно-негативные изоформы p63, напротив, защищают стволовые клетки от апоптоза на протяжении всей жизни человека, обеспечивая регенерацию митотически активного эпителия кожи, предстательной и молочной железы, пищевода и других [76]. Интересно, что доминантно-негативные изоформы p73 играют важную роль в защите от преждевременной атрофии немитотических тканей организма. В частности, $\Delta Np73$ блокирует апоптоз в нейронах *in vitro* и *in vivo* [97, 98].

Контроль старения и продолжительности жизни

Согласно современным представлениям, процесс старения связан с истощением запаса стволовых клеток организма [99]. Поэтому не удивительно, что p63, контролирующей целостность пула стволовых клеток эпителия, играет важную роль в регуляции этого процесса. Эмбриональная потеря одного аллеля гена *p63* (p63+/-) приводит к преждевременному старению мышей и укорочению продолжительности их жизни на 21.5%. Полная инактивация гена *p63* у взрослых особей приводит к появлению выраженных признаков старения, в частности, облысения, различных дефектов кожи и искривления позвоночника. При этом в кератиноцитах, полученных от этих животных, наблюдается p53-зависимое клеточное старение [100]. Сходный фенотип имеют и трансгенные мыши со специфической инактивацией TAp63 [101]. Таким образом, возможно, что именно TAp63, а не доминантно-не-

гативному $\Delta Np63$ принадлежит основная роль в сохранении “молодого” фенотипа.

Роль p53 в регуляции старения и продолжительности жизни двойственна. С одной стороны, способность p53 активировать апоптоз в ответ на повреждение ДНК, обусловленное, в частности, укорочением теломер, может служить причиной возрастного истощения клеточных ресурсов организма [102]. Известно также, что p53 отвечает за сокращение пула стволовых клеток крови [96]. С другой стороны, p53 может продлевать жизнь клеток и всего организма за счет увеличения синтеза антиоксидантов или подавления активности сигнального пути mTOR [103, 104]. Неоднозначные результаты получены и при использовании мышей, у которых активирован p53. Проанализировав эти модели, Matheu и соавт. [105] заключили, что продолжительность жизни мышей зависит от уровня активности у них трансгенного p53. При этом нерегулируемая постоянная активация p53 способствует укорочению жизни, в то время как введение в геном мышей дополнительной копии p53 с сохранением его физиологической регуляции не изменяет или даже несколько увеличивает продолжительность их жизни. В связи с этим предложена гипотеза двойственного действия p53. В соответствии с ней умеренная (базальная) активность p53 благотворно действует на организм и способствует долголетию, в то время как значительный и/или продолжительный генотоксический стресс вызывает максимальную активацию p53, массивный апоптоз, истощение ресурса стволовых клеток, преждевременное старение и смерть [5, 99, 106]. Интересно, что проапоптотическую активность p53 связывают также со многими распространенными и часто летальными заболеваниями человека, среди которых инфаркт миокарда, инсульт, болезни Альцгеймера и Паркинсона [107–109].

БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА p53 В ОНКОГЕНЕЗЕ И ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ

Важнейшая роль p53 в защите организма от рака не вызывает сомнения. Инактивация p53 в опухолях человека, а также высокая частота развития новообразований у мышей с нокаутом гена *p53* — наиболее веские доказательства противоопухолевой функции этого гена [110, 111]. p53 активируется в ответ на различные стрессовые сигналы, которые свидетельствуют об уже произошедшем или возможном злокачественном перерождении клетки. Повреждение ДНК, гипоксия, активация онкогенов и репликативный стресс, потеря нормальных клеточных контактов — лишь некоторые из них. В соответствии с популярной теорией p53 “решает”

судьбу клетки в зависимости от типа, величины и продолжительности стрессового сигнала. При незначительной стимуляции *p53* временно останавливает клеточный цикл, увеличивает выработку антиоксидантов и запускает процесс репарации, давая клетке возможность восстановить ДНК и продолжить свою физиологическую программу, иными словами, осуществляет “профилактику” опухолей. В случае сильной и/или продолжительной стрессовой стимуляции, нерепарируемых повреждений ДНК или активации онкогенов *p53* действует радикально, удаляя такую клетку путем апоптоза или навсегда останавливая ее жизненный цикл в процессе клеточного старения [106].

В отличие от *p53*, роль *p63* и *p73* в онкогенезе не столь очевидна и вызывает множество споров. С одной стороны, *p63* и *p73* обладают значительным функциональным сходством с *p53*. Многие из известных регуляторов *p63* и *p73* также влияют на активность *p53* [112, 113]. Спектры генов-мишеней *p53*, *p63* и *p73* значительно перекрываются [9]. Более того, *p63* и *p73* способны вызывать апоптоз, старение клетки и задержку клеточного цикла. Именно эти функции *p53* связывают с его противоопухолевым действием. Принимая во внимание эти факты, логично предположить, что *p63* и *p73*, по аналогии с *p53*, могут играть роль опухолевых супрессоров. Однако данные анализа *in vivo* первичных опухолей человека и мышинных моделей показали, что роль *p63* и *p73* в онкогенезе неоднозначна.

Первичные опухоли

Один из характерных признаков опухолевых супрессоров — высокая частота их инактивации в опухолях. Так, инактивирующие мутации *p53* обнаруживают примерно в 50% новообразований у человека. В отличие от *p53*, мутации в генах *p63* и *p73* — редкое событие в онкогенезе, они встречаются менее чем в 1% случаев [114]. Более того, экспрессия этих генов часто увеличена в опухолях. Сверхэкспрессия *p73* зарегистрирована во многих злокачественных опухолях человека, включая нейробластомы, глиомы, рак молочной железы, легкого, желудка, кишечника, печени и др. [115]. Однако в некоторых гематологических опухолях, в частности в неходжкинских лимфомах и при остром лимфобластном лейкозе, экспрессия гена *p73* снижена за счет потери гетерозиготности (ЛОН) или гиперметилирования [116]. Более того, гиперметилирование *p73* при остром лимфобластном лейкозе ассоциируется с плохим прогнозом [117]. Увеличение экспрессии гена *p63* характерно для плоскоклеточного рака головы и шеи, легкого, пищевода и шейки матки [118]. Однако инактивация гена *p63* присуша

поздним стадиям прогрессии инвазивного уротелиального рака и рака эндометрия и ассоциирована с плохим прогнозом [119–121]. Более того, полная потеря *p63* наблюдается в большинстве сарком человека (в 375 из 385 проанализированных опухолей) [122].

У носителей герминативных мутаций генов-супрессоров часто повышен риск возникновения новообразований. Наследуемые аутосомно-доминантные мутации в гене *TP53* приводят к развитию синдрома Ли-Фраумени, для которого характерна высокая предрасположенность к возникновению опухолей [123]. В то же время при синдромах, обусловленных мутациями в гене *TP63*, не наблюдается повышения частоты онкологических заболеваний [124]. Герминативных мутаций, характеризующихся проопухолевым фенотипом, в *TP73* также не выявлено [125, 126].

Мышиные модели

Более чем у 70% мышей с нокаутом гена *p53* в течение первых 6 месяцев жизни возникают опухоли в различных тканях [110], при этом средний возраст животных к моменту появления новообразований составляет 20 нед. Внешне эти мыши не отличаются от мышей дикого типа и развиваются без серьезных отклонений. Оценить риск возникновения опухолей у мышей с нокаутом гена *p63* невозможно, поскольку вследствие серьезных дефектов развития они нежизнеспособны и погибают в первые часы после рождения [80]. У мышей с нокаутом *p73* также наблюдаются существенные отклонения от нормы. Большинство из них погибает до достижения половой зрелости [26]. По этой причине сравнивать противоопухолевые свойства *p63* и *p73* с *p53*, используя эти модели, не совсем правомерно. Тем не менее, согласно [127], аденокарциномы легкого возникли у большинства (6 из 10) мышей с полной инактивацией гена *p73*, выживших в течение полугодового периода наблюдения. Однако в другой работе [128] опухоли у таких мышей не обнаружили.

Интересные данные получены с использованием мышей с гетерозиготной инактивацией генов семейства *p53*. Оказалось, что у значительной части мышей с инактивацией одного аллеля *p63* (*p63+/-*) или *p73* (*p73+/-*) в течение первого года жизни развивались злокачественные опухоли различного происхождения. При этом в большинстве опухолей выявлена делеция аллеля дикого типа за счет потери гетерозиготности. Более того, мыши, у которых инактивировали одновременно два гена семейства *p53* (генотипы *p53+/-*, *p63+/-*; *p53+/-*, *p73+/-*; *p63+/-*, *p73+/-*), были более склонны к развитию опухолей, чем мыши с гетерозиготной мутацией

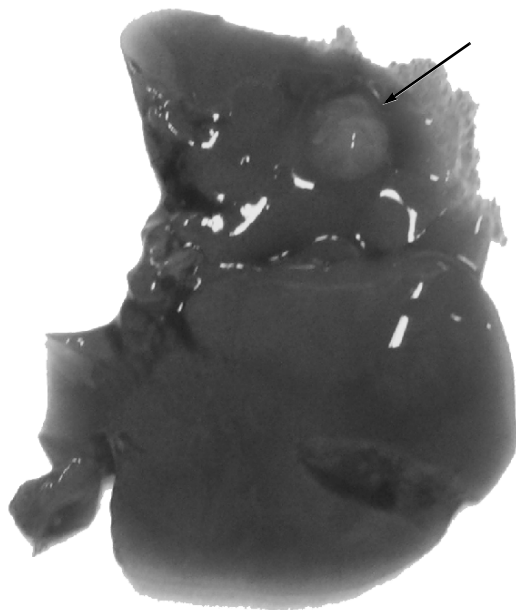


Рис. 3. Печень мыши, гетерозиготной по гену *p73* (*p73+/-*), в возрасте 3 лет. Раковая опухоль отмечена стрелкой.

лишь в одном из этих генов [127]. Иными словами, на основе этих данных можно предположить, что *p63* и *p73* не только принимают участие в супрессии опухолей, но и действуют кооперативно с *p53*.

Противоположные результаты получены в аналогичных работах других научных групп. Так, Keyes и соавт. опубликовали данные [100, 129], согласно которым у мышей с гетерозиготной инактивацией *p63* не повышается частота развития опухолей. Позднее показали, что риск возникновения новообразований у мышей с одновременным нокаутом генов *p53* и *p73* не выше, чем при нокауте одного *p53*, хотя характеристики опухолей несколько изменяются. В частности, повышается вероятность развития Т-клеточных лимфом [128]. При этом, если для медиастинальных (тимических) В-крупноклеточных лимфом, развивающихся у мышей с нокаутом *p53*, не характерно распространение в другие органы, то при совместном нокауте *p53* и *p73* эти лимфомы инфильтрируют окружающие ткани и распространяются в периферические органы. Заметим, что у мышей, гетерозиготных по *p73*, не повышается частота возникновения спонтанных опухолей (Keyes, личное сообщение). Однако, наблюдая этих же мышей на протяжении трех лет в нашей лаборатории, мы заметили появление спонтанных опухолей в различных органах примерно у половины животных *p73+/-*. Наиболее часто встречались аденомы и рак печени и легкого (рис. 3, неопубликованные данные), а также гиперплазия эпителия

желудка. Возможно, различия в полученных данных объясняются условиями содержания мышей в вивариях разных институтов. Действительно, фенотипическое проявление генов часто зависит от условий окружающей среды. В связи с этим можно предположить, что развитие опухолей определяется не только снижением функциональной активности *p73* или других членов семейства, но и факторами внешней среды, например содержанием канцерогенов, микрофлорой и др.

Как и в случае *p73*, дополнительная инактивация *p63* у мышей с нокаутом по гену *p53* также приводит к изменению характеристик опухолей. У мышей с генотипом *p53-/-*; *p63+/-* вероятность развития сарком значительно выше, чем у мышей *p53-/-*; *p63+/+*. В этих саркомах полностью отсутствует экспрессия *p63* [130]. Возможно, *p73* и *p63* особенно важны для защиты организма от лимфом и сарком соответственно. Характер их экспрессии в этих новообразованиях свидетельствует в пользу такого предположения.

В целом, анализ экспрессии гена в новообразованиях и последствий его нокаута у лабораторных животных — эффективный метод изучения роли генов, потенциально связанных с онкогенезом. Однако такой ген-специфичный подход дает противоречивые результаты в случае *p63* и *p73*. Как уже отмечалось ранее, эти гены обладают уникальной способностью давать начало белкам с противоположными свойствами (изоформы TA и ΔN).

TA-изоформы *p63* и *p73* и опухолевая супрессия

Экспериментальные данные свидетельствуют, что функционально сходные с *p53* TA-изоформы *p73* обладают противоопухолевой активностью. Мыши со специфическим нокаутом TAp73 предрасположены к развитию опухолей и более чувствительны к канцерогенам, чем мыши дикого типа [72]. При этом частота развития опухолей у этих мышей сравнима с частотой у мышей с нокаутом *p53*. У 73% мышей с генотипом TAp73 $-/-$ развиваются спонтанные опухоли, среди которых наиболее часто встречаются аденокарциномы легкого. *In vitro* показано, что потеря TAp73 запускает процесс неопластической трансформации в кератиноцитах [131]. Генетическая нестабильность — один из важнейших критериев опухолевой трансформации [132], к развитию которой может приводить потеря TAp73 [72]. Показано, что *p73*, в частности TAp73, подавляет развитие полиплоидии и анеуплоидии и участвует в регуляции контрольной точки сборки веретена деления [133, 134]. Таким образом, опухолевый супрессор TAp73, наряду с *p53*, обеспечивает генетический гомеостаз клетки.

К сожалению, о роли ТАр63 в противоопухолевой защите известно меньше. Не обнаружено увеличения частоты возникновения новообразований у мышей с инактивацией изоформ ТАр63 [101]. Тем не менее, показано, что нокаут ТАр63 у мышей приводит к накоплению повреждений ДНК и хромосомной нестабильности в клетках эпидермиса. Известно также, что ТАр63 способен вызывать необратимую остановку клеточного цикла. В частности, в фибробластах эмбриона мыши (ФЭМ), полученных от мышей с нокаутом *TAr63*, нарушен процесс индуцированного онкогеном клеточного старения. У мышей с иммунодефицитом опухоли, индуцированные подкожным введением р53-негативных RAS-активированных ФЭМ с нокаутом *TAr63*, развиваются быстрее и достигают большего размера, чем при введении контрольных *TAr63*-экспрессирующих ФЭМ. Восстановление экспрессии *TAr63* в этих опухолях блокирует их рост за счет активации процессов клеточного старения [130]. Кроме того, транскрипционная активность ТАр63 играет ключевую роль в ограничении инвазии и метастазирования новообразований эпителиального происхождения [135].

Онкоген с делецией N-конца (ΔN)

К настоящему времени накопилось множество данных, свидетельствующих, что доминантно-негативные ΔN -изоформы р73 и р63 способствуют опухолевой прогрессии. Более того, некоторые из них, в частности $\Delta Np73\alpha$, обладают онкогенными свойствами. Показано, что повышенное внутриклеточное содержание $\Delta Np73\alpha$ иммортализирует (отменяет ограничение на число возможных делений) ФЭМ, а также участвует в их трансформации, действуя при этом кооперативно с другими онкогенами. Инъекция таких трансформированных $\Delta Np73\alpha$ ФЭМ бестимусным мышам приводит к развитию опухолей [136] (рис. 4). Интересные *in vivo* данные получены с использованием трансгенных мышей, в печени которых синтезируется $\Delta Np73$. В возрасте 3–4 месяцев в печени этих животных отмечали гистологические нарушения, усиленную пролиферацию гепатоцитов и развитие предраковых патологий (аденомы), а к 12–20 месяцам у 83% из них аденомы прогрессировали в рак печени. В продуцирующих $\Delta Np73$ гепатоцитах, полученных от этих мышей, снижался уровень р21 [137].

Мыши со специфическим нокаутом $\Delta Np73$ чувствительны к действию ДНК-повреждающих агентов. У них значительно более выражен р53-зависимый апоптоз, развивающийся в ответ на генотоксический стресс, чем у мышей дикого типа [86]. Трансформированные ФЭМ, полученные от мы-



Рис. 4. Опухоли у мышей с иммунодефицитом, зарегистрированные через 7 нед после инъекции $\Delta Np73$ + H-Ras^{V12}-трансформированных ФЭМ [134].

шей $\Delta Np73$ -/-, характеризуются сниженной способностью к развитию опухолей в бестимусных мышцах. $\Delta Np73$ -негативные опухоли развиваются медленнее, они значительно меньше по размеру. В них повышено содержание маркеров клеточного старения. Эти данные позволяют предположить, что эндогенный $\Delta Np73$ необходим для развития опухолей *in vivo*. Он подавляет активацию р53 в ответ на генотоксический стресс и защищает трансформированные клетки от прекращения роста и элиминации за счет клеточного старения. Более того, $\Delta Np73$ может нарушать работу не только р53, но и других опухолевых супрессоров. В частности, в культуре клеток рака щитовидной железы $\Delta Np73\alpha$ блокирует синтез важного опухолевого супрессора РТЕН, связываясь непосредственно с промотором его гена [138].

Повышенный уровень $\Delta Np73$ ассоциирован с плохим прогнозом при аденокарциноме желудка, нейробластоме, раке легкого и печени [139–142]: в плоскоклеточных карциномах шейки матки он ассоциирован с устойчивостью к лучевой терапии, повышенной вероятностью рецидива и неблагоприятным исходом. Интересно, что высокий уровень ТАр73 α , напротив, считается благоприятным прогностическим признаком и позволяет надеяться на благоприятный эффект лучевой терапии [143]. Помимо этого, высокий уровень $\Delta Np73$ обуславливает развитие лекарственной устойчивости у больных раком яичников и острым лимфобластным лейкозом [144, 145]. Вероятно, $\Delta Np73$ вызывает лекарственную устойчивость, блокируя р53- и ТАр73/р63-зависимый клеточный ответ. Более того, мы показали, что $\Delta Np73\alpha$ повышает уровень трансмембранного Р-гликопротеина, выводящего лекарственные средства из клетки. Иными словами, при повышен-

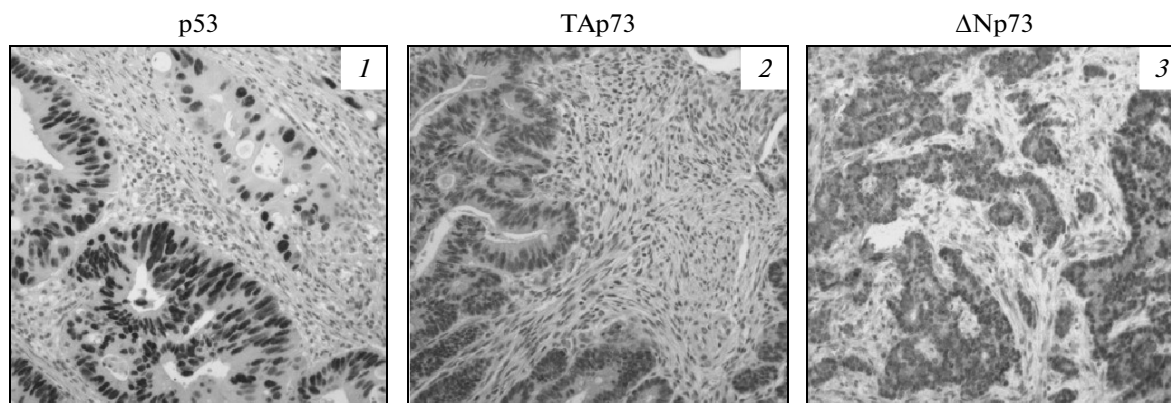


Рис. 5. Иммуногистохимический анализ экспрессии мутантного p53 (1), TAp73 (2) и ΔNp73 (3) в аденокарциноме толстого кишечника человека [165]. Для иммунного окрашивания использовали антитела, специфичные к p53 (DO-1, “Calbiochem”), TAp73 (“Bethyl Laboratories”) и ΔNp73 (“Imgenex”). Иммунное окрашивание выявляли с использованием набора EnVision + HRP (DakoCytomation, Ely, UK). Готовые срезы докрашивали гематоксилином для визуализации клеточных ядер. Коричневое окрашивание является специфическим. Сильное окрашивание ядер антителами, специфичными к p53 (1), указывает на мутацию гена *TP53* в данном образце.

ном содержании ΔNp73α может нарушаться доставка химиотерапевтических средств в опухолевые клетки [39].

Стоит, однако, заметить, что уровень не только ингибиторных (ΔNp73 и ΔNp63), но и проапоптотических (TAp73 и TAp63) изоформ повышен в опухолевых клетках (рис. 5) [146].

Баланс TA/ΔN

Предполагается, что баланс изоформ p73 и p63 присущ различным тканям [21, 22, 24, 40], но часто нарушается в опухолях. В опухолевых клетках наблюдается тенденция к усложнению профиля изоформ p63 и p73 [22, 147]. В частности, кодирующая ΔNp73 мРНК обнаруживается исключительно в опухолях, но не в нормальных тканях [147]. Более того, в некоторых новообразованиях человека содержание проопухолевых ΔN-изоформ p63 и p73 увеличено более значительно, нежели TA-изоформ, т.е. снижается соотношение TA/ΔN. Так, при раке легкого повышается уровень ΔNp73-изоформ и снижается отношение TA/ΔN [72]. В клетках острого миелоидного лейкоза снижение отношения TAp73/ΔNp73 сопровождается развитием устойчивости к действию цитарабина [148]. Увеличение содержания как ΔN-, так и TA-изоформ p63 обнаружено в злокачественных опухолях пищевода, причем преобладали ΔNp63-изоформы. При плоскоклеточном раке головы и шеи уровень ΔNp63 как минимум в 100 раз превышает уровень TAp63 [149, 150]. Эти данные объясняют, почему гены *p63* и *p73* так редко мутируют в опухолях. В отличие от p53, инактивируемого в раковых клетках путем мутаций, активность опухолевых супрессоров TAp63 и

TAp73, вероятно, эффективно подавляется за счет доминантно-негативных ΔN-изоформ.

К сожалению, о механизмах, обеспечивающих избирательное увеличение синтеза ΔN-изоформ p63 и p73 в опухолях, известно чрезвычайно мало. Недавно мы показали, что опухолевой супрессор *HIC1* (гиперметилированный при раке 1) связывается с альтернативным промотором P2 гена *TP73* и блокирует транскрипцию ΔNp73 [139]. Таким образом, снижение экспрессии *HIC1* путем гиперметилирования в опухолях может увеличить продукцию ΔNp73 и снизить отношение TA/ΔN.

СЕМЕЙСТВО p53 – ИНТЕРАКТИВНАЯ СИСТЕМА

В научной литературе все чаще можно встретить термин “сеть семейства p53” (p53 family network), который отражает существование регуляторных взаимоотношений между членами этого семейства. Опубликовано множество примеров различных взаимодействий в семействе p53.

Белки семейства p53 образуют контакты друг с другом, модифицирующие их активность. К ним относится упомянутое выше формирование малоактивных комплексов между p53 и ΔNp73, а также между TA- и ΔN-изоформами p63 и p73. Эти взаимодействия могут быть критичными для опухолевой прогрессии. В частности показано, что клетки плоскоклеточного рака головы и шеи исключительно чувствительны к TAp73-зависимому апоптозу. Необходимая для прогрессии этих новообразований инактивация TAp73 достигается путем его прямого взаимодействия с ΔNp63. Под действием противоопухолевого препарата цисплатина TAp73 фос-

форилируется киназой с-Abl, высвобождается из комплекса с $\Delta Np63$ и запускает апоптоз в раковых клетках [149, 151]. Посредством белок-белковых контактов мутантный p53 может влиять и на активность TAp73 и Arp63. Некоторые специфичные для опухолей варианты мутантного p53 (R175H, R248W, Y220C, R249S, R283H и D281G) могут взаимодействовать непосредственно с TAp73 и Arp63, подавляя их активность [152–154]. Со способностью мутантного p53 блокировать активность TA-изоформ p63 и p73 связывают вновь приобретенные им проопухольевые свойства (gain of function) [155–157].

Члены семейства p53 также регулируют экспрессию друг друга на уровне транскрипции. Гены *TP53* и *TP73* содержат p53-RE. p53 и TAp73 связываются с этими элементами, увеличивая тем самым транскрипцию собственных генов [158–160]. Интересно, что p53 и TAp73 также активируют транскрипцию гена своего ингибитора $\Delta Np73$, промоторная область которого содержит p53-RE [41, 161, 162]. Более того, доминантно-негативные белки семейства p53 способны усиливать транскрипцию собственного гена. Так, под действием доксорубина мутантный p53 и $\Delta Np73$ взаимодействуют с промотором $\Delta Np63$ и усиливают его транскрипцию за счет активации ССААТ-блока¹ [163]. Таким образом, члены семейства p53 могут регулировать транскрипцию собственных генов по принципу как отрицательной, так и положительной обратной связи.

Показано, что p73 также влияет на ДНК-связывающую способность p63. Снижение экспрессии p73 за счет siРНК нарушает связывание TAp63 γ и $\Delta Np63\gamma$ с ДНК-пробой, содержащей регуляторную последовательность промотора p21 в кератиноцитах мышцы [164]. p73 также регулирует внутриклеточную локализацию p53. Доставка TAp73 в клетки нейробластомы с помощью аденовирусных векторов приводит к транслокации неактивного цитоплазматического p53 в ядро клетки, восстанавливая тем самым его функцию [165].

Белки семейства p53 взаимодействуют друг с другом в промоторных областях генов-мишеней. Недавно мы показали, что эндогенные p53 и p73, а также p63 и p73 связываются с промоторами генов p21 и PUMA в ответ на воздействие 5-фторурацила [166]. Связываясь одновременно с промотором гена α -фетопротеина, TAp73 и p53 обеспечивают модификацию хроматина и подавляют его активность

[167]. С использованием полногеномного анализа показано, что p63 и p73 также взаимодействуют одновременно с регуляторными участками генов-мишеней [168]. Это свидетельствует о самом широком распространении промоторных взаимодействий, характерном для множества генов-мишеней семейства p53, однако механизм и значение таких взаимодействий на сегодняшний день не совсем понятны.

Общий набор генов-мишеней p53, p63 и p73, а также множественные взаимодействия между ними предполагают, что реакция клетки на стресс определяется активностью всех белков семейства p53, а не какого-то одного из них. Эту идею подтверждают результаты недавно проведенной нами работы, показавшие, что общая транскрипционная активность всего семейства p53 в клетках рака желудочно-кишечного тракта гораздо лучше отражает чувствительность этих клеток к химиотерапии, нежели мутационный статус p53 [166].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Семейство p53 функционирует на протяжении всей жизни человека. Гены *TP53*, *TP63* и *TP73* кодируют белки, контролирующие качество гамет, эмбриональное развитие, размножение, регенерацию, здоровье и старение организма. Исключительную важность этого контроля подчеркивает эволюционная консервативность генов семейства, гомологи которых обнаружены у организмов, существовавших более миллиарда лет назад. У человека три гена семейства p53 образуют как минимум 26 белковых продуктов с различным строением и активностью. Более того, эти продукты интенсивно взаимодействуют между собой, регулируя транскрипцию генов, содержащих p53-RE, как единая функциональная белковая сеть. Биологический смысл такой чрезвычайной сложности семейства p53 на сегодняшний день не до конца понятен. Возможно, она обеспечивает точное скоординированное осуществление апоптотических процессов в эмбриогенезе или адекватную регуляцию клеток с различным онкогенным потенциалом, или сопоставимость клеточной реакции с уровнем или типом стресса. Остается надеяться, что ответы на эти вопросы будут получены в ближайшем будущем.

Авторы выражают благодарность М.М. Прокофьевой за помощь в оформлении статьи.

Работа выполнена при поддержке программ Президиума Российской академии наук “Молекулярная и клеточная биология”, “Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов” и Российского фонда фундаментальных исследований (08-04-0054723, В.С.П.).

¹ Последовательность ССААТ, или ССААТ-блок – cis-регуляторная последовательность, характерная для промоторов многих белкокодирующих генов эукариот. Эта последовательность участвует в регуляции транскрипции, осуществляемой при участии фактора транскрипции NF-Y (Mantovani R. 1999. The molecular biology of the ССААТ-binding factor NF-Y. *Gene*. 239, 15–27).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чумаков П.М., Йоцева В.С., Георгиев Г.П. 1982. Выделение плазмидного клона, содержащего последовательности мРНК для невирусного Т-антигена мыши. *ДАН*. **267**, 1272–1275.
2. Oren M., Levine A.J. 1983. Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **80**, 56–59.
3. Lane D. P. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. **358**, 15–16.
4. Riley T., Sontag E., Chen P., Levine A. 2008. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 402–412.
5. Чумаков П.М. 2007. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. *Ученые биол. химии*. **47**, 3–52.
6. Алмазов В.П., Кочетков Д.В., Чумаков П.М. 2007. p53 – инструмент для терапии злокачественных заболеваний человека. *Молекуляр. биология*. **41**, 947–965.
7. Melino G., Lu X., Gasco M., Crook T., Knight R.A. 2003. Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 663–670.
8. Belyi V.A., Levine A.J. 2009. One billion years of p53/p63/p73 evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 17609–17610.
9. Brandt T., Petrovich M., Joerger A.C., Veprintsev D.B. 2009. Conservation of DNA-binding specificity and oligomerisation properties within the p53 family. *BMC Genomics*. **10**, 628.
10. el-Deiry W.S., Kern S.E., Pietenpol J.A., Kinzler K.W., Vogelstein B. 1992. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.* **1**, 45–49.
11. Funk W.D., Pak D.T., Karas R.H., Wright W.E., Shay J.W. 1992. A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol. Cell Biol.* **12**, 2866–2871.
12. Perez C.A., Ott J., Mays D.J., Pietenpol J.A. 2007. p63 consensus DNA-binding site: identification, analysis and application into a p63MH algorithm. *Oncogene*. **26**, 7363–7370.
13. Lokshin M., Li Y., Gaiddon C., Prives C. 2007. p53 and p73 display common and distinct requirements for sequence specific binding to DNA. *Nucl. Acids Res.* **35**, 340–352.
14. Davison T.S., Vagner C., Kaghad M., Ayed A., Caput D., Arrowsmith C.H. 1999. p73 and p63 are homotetramers capable of weak heterotypic interactions with each other but not with p53. *J. Biol. Chem.* **274**, 18709–18714.
15. Serber Z., Lai H.C., Yang A., Ou H.D., Sigal M.S., Kelly A.E., Darimont B.D., Duijff P.H., van Bokhoven H., McKeon F., Dotsch V. 2002. A C-terminal inhibitory domain controls the activity of p63 by an intramolecular mechanism. *Mol. Cell Biol.* **22**, 8601–8611.
16. Liu G., Chen X. 2005. The C-terminal sterile alpha motif and the extreme C-terminus regulate the transcriptional activity of the alpha isoform of p73. *J. Biol. Chem.* **278**, 46878–46885.
17. Barrera F.N., Poveda J.A., Gonzalez-Ros J.M., Neira J.L. 2003. Binding of the C-terminal sterile alpha motif (SAM) domain of human p73 to lipid membranes. *J. Biol. Chem.* **278**, 46878–46885.
18. Scaruffi P., Casciano I., Masiero L., Basso G., Romani M., Tonini G.P. 2000. Lack of p73 expression in mature B-ALL and identification of three new splicing variants restricted to pre B and C-ALL indicate a role of p73 in B cell ALL differentiation. *Leukemia*. **14**, 518–519.
19. De Laurenzi V., Costanzo A., Barcaroli D., Terrinoni A., Falco M., Annicchiarico-Petruzzelli M., Levrero M., Melino G. 1998. Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *J. Exp. Med.* **188**, 1763–1768.
20. Kaghad M., Bonnet H., Yang A., Creancier L., Biscan J.C., Valent A., Minty A., Chalon P., Lelias J.M., Dumont X., Ferrara P., McKeon F., Caput D. 1997. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*. **90**, 809–819.
21. Yang A., Kaghad M., Wang Y., Gillett E., Fleming M.D., Dotsch V., Andrews N.C., Caput D., McKeon F. 1998. p63, a p53 homolog at 3q27–29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell*. **2**, 305–316.
22. Zaika A.I., Kovalev S., Marchenko N.D., Moll U.M. 1999. Overexpression of the wild type p73 gene in breast cancer tissues and cell lines. *Cancer Res.* **59**, 3257–3263.
23. Ueda Y., Hijikata M., Takagi S., Chiba T., Shimotohno K. 1999. New p73 variants with altered C-terminal structures have varied transcriptional activities. *Oncogene*. **18**, 4993–4998.
24. Ishimoto O., Kawahara C., Enjo K., Obinata M., Nukiwa T., Ikawa S. 2002. Possible oncogenic potential of DeltaNp73: a newly identified isoform of human p73. *Cancer Res.* **62**, 636–641.
25. Stiewe T., Zimmermann S., Frilling A., Esche H., Putzer B.M. 2002. Transactivation-deficient DeltaTA-p73 acts as an oncogene. *Cancer Res.* **62**, 3598–3602.
26. Yang A., Walker N., Bronson R., Kaghad M., Oosterwegel M., Bonnin J., Vagner C., Bonnet H., Dikkes P., Sharpe A., McKeon F., Caput D. 2000. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*. **404**, 99–103.
27. Sayan A.E., Roperch J.P., Sayan B.S., Rossi M., Pinkoski M.J., Knight R.A., Willis A.E., Melino G. 2007. Generation of DeltaTAp73 proteins by translation from a putative internal ribosome entry site. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1095**, 315–324.
28. Khoury M.P., Bourdon J. C. 2010. The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2**, a000927.
29. Sayan A.E., Sayan B.S., Gogvadze V., Dinsdale D., Nyman U., Hansen T.M., Zhivotovsky B., Cohen G.M., Knight R.A., Melino G. 2008. P73 and caspase-cleaved p73 fragments localize to mitochondria and augment TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene*. **27**, 4363–4372.
30. Speidel D. 2010. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol.* **20**, 14–24.

31. Fernandes A.D., Atchley W.R. 2008. Biochemical and functional evidence of p53 homology is inconsistent with molecular phylogenetics for distant sequences. *J. Mol. Evol.* **67**, 51–67.
32. Joerger A.C., Fersht A.R. 2007. Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene*. **26**, 2226–2242.
33. Petitjean A., Mathe E., Kato S., Ishioka C., Tavtigian S.V., Hainaut P., Olivier M. 2007. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat.* **28**, 622–629.
34. Menendez D., Inga A., Resnick M.A. 2009. The expanding universe of p53 targets. *Nat. Rev. Cancer*. **9**, 724–737.
35. Harms K., Nozell S., Chen X. 2004. The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 822–842.
36. Perez C.A., Pietenpol J.A. 2007. Transcriptional programs regulated by p63 in normal epithelium and tumors. *Cell Cycle*. **6**, 246–254.
37. Fontemaggi G., Kela I., Amariglio N., Rechavi G., Krishnamurthy J., Strano S., Sacchi A., Givol D., Blandino G. 2002. Identification of direct p73 target genes combining DNA microarray and chromatin immunoprecipitation analyses. *J. Biol. Chem.* **277**, 43359–43368.
38. Lin Y.L., Sengupta S., Gurdziel K., Bell G.W., Jacks T., Flores E.R. 2009. p63 and p73 transcriptionally regulate genes involved in DNA repair. *PLoS Genet.* **5**, e1000680.
39. Vilgelm A., Wei J.X., Piazuolo M.B., Washington M.K., Prassolov V., El-Rifai W., Zaika A. 2008. DeltaNp73alpha regulates MDR1 expression by inhibiting p53 function. *Oncogene*. **27**, 2170–2176.
40. Stiewe T., Theseling C.C., Putzer B.M. 2002. Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 14177–14185.
41. Nakagawa T., Takahashi M., Ozaki T., Watanabe Ki K., Todo S., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawara A. 2002. Autoinhibitory regulation of p73 by Delta Np73 to modulate cell survival and death through a p73-specific target element within the Delta Np73 promoter. *Mol. Cell Biol.* **22**, 2575–2585.
42. Zaika A.I., Slade N., Erster S.H., Sansome C., Joseph T.W., Pearl M., Chalas E., Moll U.M. 2002. DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J. Exp. Med.* **196**, 765–780.
43. Dohn M., Zhang S., Chen X. 2001. p63alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene*. **20**, 3193–3205.
44. Kartasheva N.N., Lenz-Bauer C., Hartmann O., Schafer H., Eilers M., Dobbstein M. 2003. DeltaNp73 can modulate the expression of various genes in a p53-independent fashion. *Oncogene*. **22**, 8246–8254.
45. Liu G., Nozell S., Xiao H., Chen X. 2004. DeltaNp73beta is active in transactivation and growth suppression. *Mol. Cell Biol.* **24**, 487–501.
46. Tanaka Y., Kameoka M., Itaya A., Ota K., Yoshihara K. 2004. Regulation of HSF1-responsive gene expression by N-terminal truncated form of p73alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 865–872.
47. Wu G., Nomoto S., Hoque M.O., Dracheva T., Osada M., Lee C.C., Dong S.M., Guo Z., Benoit N., Cohen Y., Rechthand P., Califano J., Moon C.S., Ratovitski E., Jen J., Sidransky D., Trink B. 2003. DeltaNp63alpha and TAp63alpha regulate transcription of genes with distinct biological functions in cancer and development. *Cancer Res.* **63**, 2351–2357.
48. Wu G., Osada M., Guo Z., Fomenkov A., Begum S., Zhao M., Upadhyay S., Xing M., Wu F., Moon C., Westra W.H., Koch W.M., Mantovani R., Califano J.A., Ratovitski E., Sidransky D., Trink B. 2005. DeltaNp63alpha up-regulates the *Hsp70* gene in human cancer. *Cancer Res.* **65**, 758–766.
49. Ghosh A., Stewart D., Matlashewski G. 2004. Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Mol. Cell Biol.* **24**, 7987–7997.
50. Courtois S., Verhaegh G., North S., Luciani M.G., Lassus P., Hibner U., Oren M., Hainaut P. 2002. DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. *Oncogene*. **21**, 6722–6728.
51. Nedelcu A.M., Tan C. 2007. Early diversification and complex evolutionary history of the p53 tumor suppressor gene family. *Dev. Genes Evol.* **217**, 801–806.
52. Lane D.P., Cheok C.F., Brown C., Madhumalar A., Ghadessy F.J., Verma C. 2010. Mdm2 and p53 are highly conserved from placozoans to man. *Cell Cycle*. **9**, 540–547.
53. Srivastava M., Begovic E., Chapman J., Putnam N.H., Hellsten U., Kawashima T., Kuo A., Mitros T., Salamov A., Carpenter M.L., Signorovitch A.Y., Moreno M.A., Kamm K., Grimwood J., Schmutz J., Shapiro H., Grigoriev I.V., Buss L.W., Schierwater B., Dellaporta S.L., Rokhsar D.S. 2008. The *Trichoplax genome* and the nature of placozoans. *Nature*. **454**, 955–960.
54. Lane D.P., Cheok C.F., Brown C.J., Madhumalar A., Ghadessy F.J., Verma C. 2010. The *Mdm2* and *p53* genes are conserved in the Arachnids. *Cell Cycle*. **9**, 748–754.
55. Kelley M.L., Winge P., Heaney J.D., Stephens R.E., Farrell J.H., van Beneden R.J., Reinisch C.L., Lesser M.P., Walker C.W. 2001. Expression of homologues for p53 and p73 in the softshell clam (*Mya arenaria*), a naturally-occurring model for human cancer. *Oncogene*. **20**, 748–758.
56. Derry W.B., Putzke A.P., Rothman J.H. 2001. *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science*. **294**, 591–595.
57. Schumacher B., Hofmann K., Boulton S., Gartner A. 2001. The *C. elegans* homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis. *Curr. Biol.* **11**, 1722–1727.
58. Jin S., Martinek S., Joo W.S., Wortman J.R., Mirkovic N., Sali A., Yandell M.D., Pavletich N.P., Young M.W., Levine A.J. 2000. Identification and characterization of a p53 homologue in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 7301–7306.

59. Ollmann M., Young L.M., Di Como C.J., Karim F., Belvin M., Robertson S., Whittaker K., Demsky M., Fisher W.W., Buchman A., Duyk G., Friedman L., Prives C., Kopczynski C. 2000. *Drosophila* p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53. *Cell*. **101**, 91–101.
60. Pankow S., Bamberger C. 2007. The p53 tumor suppressor-like protein nvp63 mediates selective germ cell death in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *PLoS One*. **2**, e782.
61. Ou H.D., Lohr F., Vogel V., Mantele W., Dotsch V. 2007. Structural evolution of C-terminal domains in the p53 family. *EMBO J*. **26**, 3463–3473.
62. Rutkowski R., Hofmann K., Gartner A. 2010. Phylogeny and function of the invertebrate p53 superfamily. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2**, a001131.
63. Belyi V.A., Ak P., Markert E., Wang H., Hu W., Puzio-Kuter A., Levine A.J. 2010. The origins and evolution of the p53 family of genes. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2**, a001198.
64. Brodsky M.H., Nordstrom W., Tsang G., Kwan E., Rubin G.M., Abrams J.M. 2000. *Drosophila* p53 binds a damage response element at the reaper locus. *Cell*. **101**, 103–113.
65. Sogame N., Kim M., Abrams J.M. 2003. *Drosophila* p53 preserves genomic stability by regulating cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 4696–4701.
66. Lee J.H., Lee E., Park J., Kim E., Kim J., Chung J. 2003. *In vivo* p53 function is indispensable for DNA damage-induced apoptotic signaling in *Drosophila*. *FEBS Lett*. **550**, 5–10.
67. Arum O., Johnson T.E. 2007. Reduced expression of the *Caenorhabditis elegans* p53 ortholog cep-1 results in increased longevity. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **62**, 951–959.
68. Tavernarakis N., Pasparaki A., Tasdemir E., Maiuri M.C., Kroemer G. 2008. The effects of p53 on whole organism longevity are mediated by autophagy. *Autophagy*. **4**, 870–873.
69. Bauer J.H., Poon P.C., Glatt-Deeley H., Abrams J.M., Helfand S.L. 2005. Neuronal expression of p53 dominant-negative proteins in adult *Drosophila* melanogaster extends life span. *Curr. Biol*. **15**, 2063–2068.
70. Bauer J.H., Chang C., Morris S.N., Hozier S., Andersen S., Waitzman J.S., Helfand S.L. 2007. Expression of dominant-negative Dmp53 in the adult fly brain inhibits insulin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 13355–13360.
71. Suh E.K., Yang A., Kettenbach A., Bamberger C., Michaelis A.H., Zhu Z., Elvin J.A., Bronson R.T., Crum C.P., McKeon F. 2006. p63 protects the female germ line during meiotic arrest. *Nature*. **444**, 624–628.
72. Tomasini R., Tsuchihara K., Wilhelm M., Fujitani M., Rufini A., Cheung C.C., Khan F., Itie-Youten A., Wakeham A., Tsao M.S., Iovanna J.L., Squire J., Jurisica I., Kaplan D., Melino G., Jurisicova A., Mak T.W. 2008. TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev*. **22**, 2677–2691.
73. Hasegawa M., Zhang Y., Niibe H., Terry N.H., Meistrich M.L. 1998. Resistance of differentiating spermatogonia to radiation-induced apoptosis and loss in p53-deficient mice. *Radiat. Res*. **149**, 263–270.
74. Hu W. 2009. The role of p53 gene family in reproduction. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **1**, a001073.
75. Hu W., Feng Z., Teresky A.K., Levine A.J. 2007. p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature*. **450**, 721–724.
76. Crum C.P., McKeon F.D. 2010. p63 in epithelial survival, germ cell surveillance, and neoplasia. *Annu. Rev. Pathol.* **5**, 349–371.
77. Laurikkala J., Mikkola M.L., James M., Tummers M., Mills A.A., Thesleff I. 2006. p63 regulates multiple signalling pathways required for ectodermal organogenesis and differentiation. *Development*. **133**, 1553–1563.
78. Rinne T., Brunner H.G., van Bokhoven H. 2007. p63-associated disorders. *Cell Cycle*. **6**, 262–268.
79. Yang A., Schweitzer R., Sun D., Kaghad M., Walker N., Bronson R.T., Tabin C., Sharpe A., Caput D., Crum C., McKeon F. 1999. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*. **398**, 714–718.
80. Mills A.A., Zheng B., Wang X.J., Vogel H., Roop D.R., Bradley A. 1999. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*. **398**, 708–713.
81. Senoo M., Pinto F., Crum C.P., McKeon F. 2007. p63 is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell*. **129**, 523–536.
82. Koster M.I., Kim S., Mills A.A., DeMayo F.J., Roop D.R. 2004. p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev*. **18**, 126–131.
83. Koster M.I., Dai D., Marinari B., Sano Y., Costanzo A., Karin M., Roop D.R. 2007. p63 induces key target genes required for epidermal morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 3255–3260.
84. Candi E., Rufini A., Terrinoni A., Dinsdale D., Ranalli M., Paradisi A., De Laurenzi V., Spagnoli L.G., Cattani M.V., Ramadan S., Knight R.A., Melino G. 2006. Differential roles of p63 isoforms in epidermal development: selective genetic complementation in p63 null mice. *Cell Death Differ*. **13**, 1037–1047.
85. Truong A.B., Kretz M., Ridky T.W., Kimmel R., Khavari P.A. 2006. p63 regulates proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes. *Genes Dev*. **20**, 3185–3197.
86. Wilhelm M.T., Rufini A., Wetzel M.K., Tsuchihara K., Inoue S., Tomasini R., Itie-Youten A., Wakeham A., Arsenian-Henriksson M., Melino G., Kaplan D.R., Miller F.D., Mak T.W. 2010. Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev*. **24**, 549–560.
87. Hoever M., Clement J.H., Wedlich D., Montenarh M., Knochel W. 1994. Overexpression of wild-type p53 interferes with normal development in *Xenopus laevis* embryos. *Oncogene*. **9**, 109–120.
88. Nicol C.J., Harrison M.L., Laposa R.R., Gimelshtein I.L., Wells P.G. 1995. A teratologic suppressor role for p53 in benzo[a]pyrene-treated transgenic p53-deficient mice. *Nat. Genet.* **10**, 181–187.

89. Norimura T., Nomoto S., Katsuki M., Gondo Y., Kondo S. 1996. p53-dependent apoptosis suppresses radiation-induced teratogenesis. *Nat. Med.* **2**, 577–580.
90. Jones S.N., Roe A.E., Donehower L.A., Bradley A. 1995. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature*. **378**, 206–208.
91. Erster S., Palacios G., Rosenquist T., Chang C., Moll U.M. 2006. Deregulated expression of DeltaNp73alpha causes early embryonic lethality. *Cell Death Differ.* **13**, 170–173.
92. Huttinger-Kirchhof N., Cam H., Griesmann H., Hofmann L., Beitzinger M., Stiewe T. 2006. The p53 family inhibitor DeltaNp73 interferes with multiple developmental programs. *Cell Death Differ.* **13**, 174–177.
93. Dugani C.B., Paquin A., Fujitani M., Kaplan D.R., Miller F.D. 2009. p63 antagonizes p53 to promote the survival of embryonic neural precursor cells. *J. Neurosci.* **29**, 6710–6721.
94. Lee A.F., Ho D.K., Zanassi P., Walsh G.S., Kaplan D.R., Miller F.D. 2004. Evidence that DeltaNp73 promotes neuronal survival by p53-dependent and p53-independent mechanisms. *J. Neurosci.* **24**, 9174–9184.
95. Pozniak C.D., Radinovic S., Yang A., McKeon F., Kaplan D.R., Miller F.D. 2000. An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science*. **289**, 304–306.
96. Dumble M., Moore L., Chambers S.M., Geiger H., van Zant G., Goodell M.A., Donehower L.A. 2007. The impact of altered p53 dosage on hematopoietic stem cell dynamics during aging. *Blood*. **109**, 1736–1742.
97. Tissir F., Ravni A., Achouri Y., Riethmacher D., Meyer G., Goffinet A.M. 2009. DeltaNp73 regulates neuronal survival *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 16871–16876.
98. Pozniak C.D., Barnabe-Heider F., Rymar V.V., Lee A.F., Sadikot A.F., Miller F.D. 2002. p73 is required for survival and maintenance of CNS neurons. *J. Neurosci.* **22**, 9800–9809.
99. Sahin E., Depinho R.A. 2010. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature*. **464**, 520–528.
100. Keyes W.M., Wu Y., Vogel H., Guo X., Lowe S.W., Mills A.A. 2005. p63 deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging. *Genes Dev.* **19**, 1986–1999.
101. Su X., Paris M., Gi Y.J., Tsai K.Y., Cho M.S., Lin Y.L., Biernaskie J.A., Sinha S., Prives C., Pevny L.H., Miller F.D., Flores E.R. 2009. TAp63 prevents premature aging by promoting adult stem cell maintenance. *Cell Stem Cell*. **5**, 64–75.
102. Chin L., Artandi S.E., Shen Q., Tam A., Lee S.L., Gottlieb G.J., Greider C.W., DePinho R.A. 1999. p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell*. **97**, 527–538.
103. Sablina A.A., Budanov A.V., Ilyinskaya G.V., Agapova L.S., Kravchenko J.E., Chumakov P.M. 2005. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat. Med.* **11**, 1306–1313.
104. Feng Z., Zhang H., Levine A.J., Jin S. 2005. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 8204–8209.
105. Matheu A., Maraver A., Klatt P., Flores I., Garcia-Cao I., Borras C., Flores J.M., Vina J., Blasco M.A., Serrano M. 2007. Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature*. **448**, 375–379.
106. Vousden K.H., Prives C. 2009. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell*. **137**, 413–431.
107. Hong L.Z., Zhao X.Y., Zhang H.L. 2010. p53-mediated neuronal cell death in ischemic brain injury. *Neurosci. Bull.* **26**, 232–240.
108. Naito A.T., Okada S., Minamino T., Iwanaga K., Liu M.L., Sumida T., Nomura S., Sahara N., Mizoroki T., Takashima A., Akazawa H., Nagai T., Shiojima I., Komuro I. 2010. Promotion of CHIP-mediated p53 degradation protects the heart from ischemic injury. *Circ. Res.* **106**, 1692–1702.
109. Culmsee C., Mattson M. P. 2005. p53 in neuronal apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 761–777.
110. Donehower L.A., Harvey M., Slagle B.L., McArthur M.J., Montgomery C.A., Jr., Butel J.S., Bradley A. 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. **356**, 215–221.
111. Vogelstein B. 1990. Cancer. A deadly inheritance. *Nature*. **348**, 681–682.
112. Vilgelm A., El-Rifai W., Zaika A. 2008. Therapeutic prospects for p73 and p63: rising from the shadow of p53. *Drug Resist. Updat.* **11**, 152–163.
113. Collavin L., Lunardi A., Del Sal G. 2010. p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression. *Cell Death Differ.* **17**, 901–911.
114. Melino G., De Laurenzi V., Vousden K.H. 2002. p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer*. **2**, 605–615.
115. Moll U.M., Slade N. 2004. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol. Cancer Res.* **2**, 371–386.
116. Pluta A., Nyman U., Joseph B., Robak T., Zhivotovsky B., Smolewski P. 2006. The role of p73 in hematological malignancies. *Leukemia*. **20**, 757–766.
117. Garcia-Manero G., Daniel J., Smith T.L., Kornblau S.M., Lee M.S., Kantarjian H.M., Issa J.P. 2002. DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.* **8**, 2217–2224.
118. Deyoung M.P., Ellisen L.W. 2007. p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene*. **26**, 5169–5183.
119. Koga F., Kawakami S., Fujii Y., Saito K., Ohtsuka Y., Iwai A., Ando N., Takizawa T., Kageyama Y., Kihara K. 2003. Impaired p63 expression associates with poor prognosis and uroplakin III expression in invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Clin. Cancer Res.* **9**, 5501–5507.
120. Stefansson I.M., Salvesen H.B., Akslen L.A. 2006. Loss of p63 and cytokeratin 5/6 expression is associated with more aggressive tumors in endometrial carcinoma patients. *Int. J. Cancer*. **118**, 1227–1233.

121. Urist M.J., Di Como C.J., Lu M.L., Charytonowicz E., Verbel D., Crum C.P., Ince T.A., McKeon F.D., Cordon-Cardo C. 2002. Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer. *Am. J. Pathol.* **161**, 1199–1206.
122. Lee C.H., Espinosa I., Jensen K.C., Subramanian S., Zhu S.X., Varma S., Montgomery K.D., Nielsen T.O., van de Rijn M., West R.B. 2008. Gene expression profiling identifies p63 as a diagnostic marker for giant cell tumor of the bone. *Mol. Pathol.* **21**, 531–539.
123. Frebourg T., Malkin D., Friend S. 1991. Cancer risks from germ line tumor suppressor gene mutations. *Princess Takamatsu Symp.* **22**, 61–70.
124. Celli J., Duijf P., Hamel B.C., Bamshad M., Kramer B., Smits A.P., Newbury-Ecob R., Hennekam R.C., van Buggenhout G., van Haeringen A., Woods C.G., van Essen A.J., de Waal R., Vriend G., Haber D.A., Yang A., McKeon F., Brunner H.G., van Bokhoven H. 1999. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell.* **99**, 143–153.
125. Schwartz D.I., Lindor N.M., Walsh-Vockley C., Roche P.C., Mai M., Smith D.I., Liu W., Couch F.J. 1999. p73 mutations are not detected in sporadic and hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **58**, 25–29.
126. Peters M.A., Janer M., Kolb S., Jarvik G.P., Ostrander E.A., Stanford J.L. 2001. Germline mutations in the p73 gene do not predispose to familial prostate-brain cancer. *Prostate.* **48**, 292–296.
127. Flores E.R., Sengupta S., Miller J.B., Newman J.J., Bronson R., Crowley D., Yang A., McKeon F., Jacks T. 2005. Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell.* **7**, 363–373.
128. Nemajerova A., Palacios G., Nowak N.J., Matsui S., Petrenko O. 2009. Targeted deletion of p73 in mice reveals its role in T cell development and lymphomagenesis. *PLoS One.* **4**, e7784.
129. Keyes W.M., Vogel H., Koster M.I., Guo X., Qi Y., Petherbridge K.M., Roop D.R., Bradley A., Mills A.A. 2006. p63 heterozygous mutant mice are not prone to spontaneous or chemically induced tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 8435–8440.
130. Guo X., Keyes W.M., Papazoglu C., Zuber J., Li W., Lowe S.W., Vogel H., Mills A.A. 2009. TAp63 induces senescence and suppresses tumorigenesis *in vivo*. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1451–1457.
131. Johnson J., Lagowski J., Sundberg A., Lawson S., Liu Y., Kulesz-Martin M. 2007. p73 loss triggers conversion to squamous cell carcinoma reversible upon reconstitution with TAp73alpha. *Cancer Res.* **67**, 7723–7730.
132. Negrini S., Gorgoulis V.G., Halazonetis T.D. 2010. Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 220–228.
133. Talos F., Nemajerova A., Flores E.R., Petrenko O., Moll U.M. 2007. p73 suppresses polyploidy and aneuploidy in the absence of functional p53. *Mol. Cell.* **27**, 647–659.
134. Tomasini R., Tsuchihara K., Tsuda C., Lau S.K., Wilhelm M., Ruffini A., Tsao M.S., Iovanna J.L., Jurisicova A., Melino G., Mak T.W. 2009. TAp73 regulates the spindle assembly checkpoint by modulating BubR1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 797–802.
135. Adorno M., Cordenonsi M., Montagner M., Dupont S., Wong C., Hann B., Solari A., Bobisse S., Rondina M.B., Guzzardo V., Parenti A.R., Rosato A., Biciato S., Balmain A., Piccolo S. 2009. A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis. *Cell.* **137**, 87–98.
136. Petrenko O., Zaika A., Moll U.M. 2003. DeltaNp73 facilitates cell immortalization and cooperates with oncogenic Ras in cellular transformation *in vivo*. *Mol. Cell Biol.* **23**, 5540–5555.
137. Tannapfel A., John K., Mise N., Schmidt A., Buhlmann S., Ibrahim S.M., Putzer B.M. 2008. Autonomous growth and hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing the p53 family inhibitor DNp73. *Carcinogenesis.* **29**, 211–218.
138. Vella V., Puppini C., Damante G., Vigneri R., Sanfilippo M., Vigneri P., Tell G., Frasca F. 2009. DeltaNp73alpha inhibits PTEN expression in thyroid cancer cells. *Int. J. Cancer.* **124**, 2539–2548.
139. Vilgelm A.E., Hong S.M., Washington M.K., Wei J., Chen H., El-Rifai W., Zaika A. 2010. Characterization of DeltaNp73 expression and regulation in gastric and esophageal tumors. *Oncogene.* **29**, 00–00.
140. Casciano I., Mazzocco K., Boni L., Pagnan G., Banelli B., Allemanni G., Ponzoni M., Tonini G.P., Romani M. 2002. Expression of DeltaNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. *Cell Death Differ.* **9**, 246–251.
141. Uramoto H., Sugio K., Oyama T., Nakata S., Ono K., Morita M., Funa K., Yasumoto K. 2004. Expression of deltaNp73 predicts poor prognosis in lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 6905–6911.
142. Muller M., Schilling T., Sayan A.E., Kairat A., Lorenz K., Schulze-Bergkamen H., Oren M., Koch A., Tannapfel A., Stremmel W., Melino G., Krammer P.H. 2005. TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ.* **12**, 1564–1577.
143. Liu S.S., Chan K.Y., Cheung A.N., Liao X.Y., Leung T.W., Ngan H.Y. 2006. Expression of deltaNp73 and TAp73alpha independently associated with radiosensitivities and prognoses in cervical squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **12**, 3922–3927.
144. Concin N., Hofstetter G., Berger A., Gehmacher A., Reimer D., Watrowski R., Tong D., Schuster E., Hefler L., Heim K., Mueller-Holzner E., Marth C., Moll U.M., Zeimet A.G., Zeillinger R. 2005. Clinical relevance of dominant-negative p73 isoforms for responsiveness to chemotherapy and survival in ovarian cancer: evidence for a crucial p53-p73 cross-talk *in vivo*. *Clin. Cancer Res.* **11**, 8372–8383.
145. Meier M., den Boer M.L., Meijerink J.P., Broekhuis M.J., Passier M.M., van Wering E.R., Janka-Schaub G.E., Pieters R. 2006. Differential expression of p73 isoforms in relation to drug resistance in childhood T-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia.* **20**, 1377–1384.

146. Zaika A.I., El-Rifai W. 2006. The role of p53 protein family in gastrointestinal malignancies. *Cell Death Differ.* **13**, 935–940.
147. Stiewe T., Tuve S., Peter M., Tannapfel A., Elmaagacli A.H., Putzer B.M. 2004. Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas. *Clin. Cancer Res.* **10**, 626–633.
148. Lucena-Araujo A.R., Panepucci R.A., dos Santos G.A., Giacomo R.H., Santana-Lemos B.A., Lima A.S., Garcia A.B., Araujo A.G., Falcao R.P., Rego E.M. 2008. The expression of DeltaNTP73, TATP73 and TP53 genes in acute myeloid leukaemia is associated with recurrent cytogenetic abnormalities and *in vitro* susceptibility to cytarabine cytotoxicity. *Br. J. Haematol.* **142**, 74–78.
149. Rocco J.W., Leong C.O., Kuperwasser N., DeYoung M.P., Ellisen L.W. 2006. p63 mediates survival in squamous cell carcinoma by suppression of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell.* **9**, 45–56.
150. DeYoung M.P., Johannessen C.M., Leong C.O., Faquin W., Rocco J.W., Ellisen L.W. 2006. Tumor-specific p73 up-regulation mediates p63 dependence in squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **66**, 9362–9368.
151. Leong C.O., Vidnovic N., DeYoung M.P., Sgroi D., Ellisen L.W. 2007. The p63/p73 network mediates chemosensitivity to cisplatin in a biologically defined subset of primary breast cancers. *J. Clin. Invest.* **117**, 1370–1380.
152. Strano S., Fontemaggi G., Costanzo A., Rizzo M.G., Monti O., Baccarini A., Del Sal G., Levrero M., Sacchi A., Oren M., Blandino G. 2002. Physical interaction with human tumor-derived p53 mutants inhibits p63 activities. *J. Biol. Chem.* **277**, 18817–18826.
153. Di Como C.J., Gaiddon C., Prives C. 1999. p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **19**, 1438–1449.
154. Gaiddon C., Lokshin M., Ahn J., Zhang T., Prives C. 2001. 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.* **21**, 1874–1887.
155. Schilling T., Kairat A., Melino G., Krammer P.H., Stremmel W., Oren M., Muller M. 2010. Interference with the p53 family network contributes to the gain of oncogenic function of mutant p53 in hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**, 817–823.
156. Lang G.A., Iwakuma T., Suh Y.A., Liu G., Rao V.A., Parant J.M., Valentin-Vega Y.A., Terzian T., Caldwell L.C., Strong L.C., El-Naggar A.K., Lozano G. 2004. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell.* **119**, 861–872.
157. Li Y., Prives C. 2007. Are interactions with p63 and p73 involved in mutant p53 gain of oncogenic function? *Oncogene.* **26**, 2220–2225.
158. Wang S., El-Deiry W.S. 2006. p73 or p53 directly regulates human p53 transcription to maintain cell cycle checkpoints. *Cancer Res.* **66**, 6982–6989.
159. Chen X., Zheng Y., Zhu J., Jiang J., Wang J. 2001. p73 is transcriptionally regulated by DNA damage, p53, and p73. *Oncogene.* **20**, 769–774.
160. Wang J., Liu Y.X., Hande M.P., Wong A.C., Jin Y.J., Yin Y. 2007. TAp73 is a downstream target of p53 in controlling the cellular defense against stress. *J. Biol. Chem.* **282**, 29152–29162.
161. Grob T.J., Novak U., Maise C., Barcaroli D., Luthi A.U., Pirnia F., Hugli B., Graber H.U., De Laurenzi V., Fey M.F., Melino G., Tobler A. 2001. Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ.* **8**, 1213–1223.
162. Kartasheva N.N., Contente A., Lenz-Stoppler C., Roth J., Dobbelstein M. 2002. p53 induces the expression of its antagonist p73 Delta N, establishing an autoregulatory feedback loop. *Oncogene.* **21**, 4715–4727.
163. Lanza M., Marinari B., Papoutsaki M., Giustizieri M.L., D'Alessandra Y., Chimenti S., Guerrini L., Costanzo A. 2006. Cross-talks in the p53 family: deltaNp63 is an anti-apoptotic target for deltaNp73alpha and p53 gain-of-function mutants. *Cell Cycle.* **5**, 1996–2004.
164. Johnson J., Lagowski J., Lawson S., Liu Y., Kulesz-Martin M. 2007. p73 expression modulates p63 and Mdm2 protein presence in complex with p53 family-specific DNA target sequence in squamous cell carcinogenesis. *Oncogene.* **27**, 2780–2787.
165. Goldschneider D., Blanc E., Raguenez G., Barrois M., Legrand A., Le Roux G., Haddada H., Benard J., Douc-Rasy S. 2004. Differential response of p53 target genes to p73 overexpression in SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *J. Cell. Sci.* **117**, 293–301.
166. Vilgelm A.E., Washington M.K., Wei J., Chen H., Prassolov V.S., Zaika A.I. 2010. Interactions of the p53 protein family in cellular stress response in gastrointestinal tumors. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 693–705.
167. Cui R., Nguyen T.T., Taube J.H., Stratton S.A., Feuerman M.H., Barton M.C. 2005. Family members p53 and p73 act together in chromatin modification and direct repression of alpha-fetoprotein transcription. *J. Biol. Chem.* **280**, 39152–39160.
168. Yang A., Zhu Z., Kettenbach A., Kapranov P., McKenon F., Gingeras T.R., Struhl K. 2010. Genome-wide mapping indicates that p73 and p63 co-occupy target sites and have similar dna-binding profiles *in vivo*. *PLoS One.* **5**, e11572.