

Napraw albo zgiń – rola białka p53 w życiu komórki

Magdalena Kulesza¹, Agnieszka Dansonka-Mieszkowska², Barbara Pieńkowska-Grela¹

¹Samodzielna Pracownia Cytogenetyki, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa

²Pracownia Diagnostyki Genetycznej i Molekularnej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa

Białko p53 jest jednym z najważniejszych supresorów transformacji nowotworowej. Reguluje transkrypcję wielu genów oraz wchodzi w bezpośrednią interakcję z innymi białkami. Odgrywa znaczącą rolę w najistotniejszych procesach, które zachodzą w komórce, w tym: w naprawie DNA, cyklu komórkowym oraz programowanej śmierci komórki – apoptozie. Utrata jego prawidłowej funkcji prowadzi do zaburzenia mechanizmów kontrolujących proliferację i przeżycie komórki, co przyczynia się do rozwoju nowotworów.

Gen *TP53* nazywany jest strażnikiem genomu. Jego mutacje występują w dużym odsetku guzów nowotworowych. Dotyczą najczęściej sekwencji, które kodują domenę wiążącą DNA (eksony 5–8). Gen *TP53*, wraz z genami *TP63* oraz *TP73*, należy do najstarszej ewolucyjnie rodziny supresorów transformacji nowotworowej. Jego produkt, pełnej długości białko p53, składa się z pięciu domen oraz elastycznego regionu konsolidatora i funkcjonuje jako homotetramer. Za regulację aktywności p53 odpowiada między innymi białko MDM2, które przyczynia się do proteasomalnej degradacji supresora. Niniejsza praca przeglądowa porusza najważniejsze aspekty regulacji aktywności komórki przez białko p53. Opisuje strukturę białka p53, a także związane z nim możliwości terapeutyczne.

Biuletyn PTO NOWOTWORY 2019; 4, 5–6: 220–231

Słowa kluczowe: geny supresorowe, struktura białka p53, p53 a regulacja aktywności komórki

Wprowadzenie

Zgodnie z obecną wiedzą główną przyczyną zgonów w populacji globalnej są choroby krążenia i choroby nowotworowe. W ostatnich dekadach to jednak nowotwory zajmują pierwsze miejsce w hierarchii najczęstszych przyczyn zgonów w krajach rozwiniętych. W Europie odnotowuje się 23,4% światowych przypadków zachorowań i 20,3% zgonów spowodowanych chorobami nowotworowymi, podczas gdy ludność krajów europejskich stanowi jedynie 9% światowej populacji. Według GLOBOCAN w 2018 roku z powodu chorób nowotworowych zmarło 9,6 milionów osób na całym świecie, a rozpoznano ponad 18 milionów nowych przypadków nowotworów [1, 2]. To stale rosnące zagrożenie stało się siłą napędową badań nad mechanizmami procesu nowotworzenia. Badania genetyczne

pozwoliły wyodrębnić kilka klas genów, które są zaangażowane w proces karcynogenezy. Jedną z tych klas tworzą geny odpowiedzialne za supresję nieprawidłowej proliferacji komórek. Do najważniejszych genów supresorowych należy gen *TP53*, który nie bez powodu nazwany jest strażnikiem genomu.

Białko p53 – nadrzędny strażnik genomu

Historia badań nad p53 sięga blisko czterdziestu lat, a samo białko zostało odkryte w 1979 roku niezależnie przez kilka grup naukowców. Zidentyfikowali oni białko o masie około 53 kDa, obecne w komórkach człowieka i myszy, która łączyła się z dużym antygenem T wirusa SV40. Badania wykazały istnienie wysokiego poziomu białka p53 w komórkach nowotworowo zmienionych, przy jednocześnie niskim poziomie p53 w komórkach prawidłowych.

How to cite:

Kulesza M, Dansonka-Mieszkowska A, Pieńkowska-Grela B. *Repair or perish – the role of p53 protein in a cell's life*. NOWOTWORY J Oncol 2019; 69: 168–178.

Z kolei nadekspresja nowoodkrytego genu *TP53* powodowała przekształcenie komórki zdrowej w nowotworową. Dlatego też początkowo *TP53* został mylnie uznany za onkogen. Dopiero 10 lat później sklasyfikowano go jako supresor transformacji nowotworowej. Stało się wówczas jasne, że pierwotnie analizowany gen *TP53* był zmutowany. Dało to początek wzmożonym badaniom nad jego rolą w procesie karcynogenezy [3, 4].

Rola prawidłowego białka p53 w supresji rozwoju guza jest dość dobrze poznana. Supresor reguluje transkrypcję licznych genów docelowych, które uczestniczą między innymi w monitorowaniu cyklu komórkowego, apoptozie i naprawie DNA. Większość mutacji tego genu to zmiany typu *missense*, prowadzące do ekspresji pełnej długości, lecz nieprawidłowego białka p53. Zmienione białko nie tylko traci swoją funkcję supresyjną, ale może uzyskiwać także nowe właściwości, które sprzyjają karcynogenezie [5–7].

W komórkach prawidłowych aktywacja transkrypcji *TP53* jest odpowiedzią na czynniki stresowe, w tym znaczące uszkodzenia DNA, oraz sygnały hiperprolifracji komórek. Prawidłowy supresor wchodzi w interakcję z białkami oraz reguluje transkrypcję wielu genów wpływających na najistotniejsze procesy komórkowe. W zależności od stopnia uszkodzenia DNA, białko p53 zatrzymuje bądź zwalnia cykl komórkowy, co daje komórce czas na naprawę materiału genetycznego i zapobiega powieleniu błędu. Gdy uszkodzenie jest zbyt poważne, białko p53 kieruje komórkę na ścieżkę programowanej śmierci (apoptozy) [8]. Ze względu na istotną rolę w determinowaniu losu komórki, p53 jest ściśle kontrolowane przez szereg białek regulatorowych: MDM2, MDM4, MDMX, p300/CBP oraz niektóre kinazy. Niski poziom białka p53 spowodowany jest interakcją z MDM2, która przyczynia się do proteasomalnej degradacji białka. Podobnie działa MDMX, które również negatywnie reguluje poziom p53. W warunkach stresowych dochodzi do aktywacji kinaz fosforylujących domenę N-końcową p53, co pozwala na uwolnienie MDM2 i wzmacnia wiązanie z koaktywatorami transkrypcji, w tym p300/CBP, prowadząc do aktywacji supresora [9].

Mutacje, czyli warianty patogenne genu, związane z nowotworami to zwykle zmiany somatyczne, które powstają i gromadzą się w komórkach w trakcie procesu karcynogenezy. Mutacje takie nie są przekazywane do komórek rozrodczych, a jedynie do komórek potomnych klonu nowotworowego. Natomiast wariant patogeny genu, który występuje we wszystkich komórkach organizmu (dziedziczony lub powstały *de novo*), nazywany jest mutacją germinálną. Taka zmiana może zwiększać ryzyko rozwoju nowotworu u obciążonych nią osób (nowotwory dziedziczne lub germinálne).

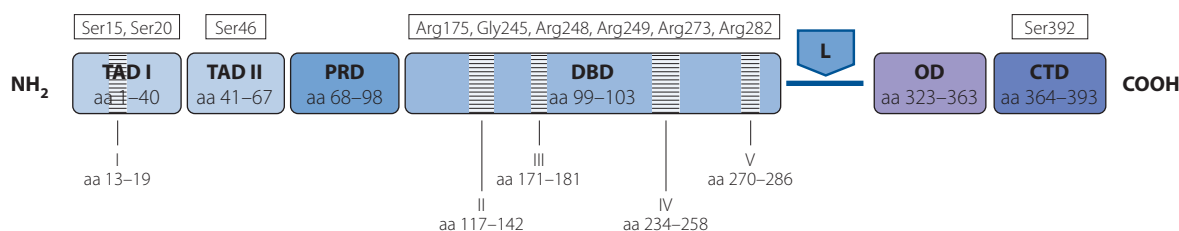
Obecność germinálnego patogenego wariantu genu *TP53* związana jest z zespołem Li i Fraumeniego (LFS – *Li Fraumeni Syndrome*). W bazie ClinVar, gromadzącej informacje o wariantach genów o znaczeniu klinicznym, opisano dotychczas ponad 750 zmian w sekwencji *TP53*, które wykryto u chorych z LFS. Zespół Li i Fraumeniego jest dziedziczony w sposób autosomalny dominujący. Charakteryzuje się predyspozycją chorych do powstawania rzadkich typów nowotworów, szczególnie w młodszym wieku. U połowy osób z LFS dochodzi do rozwoju nowotworu przed 30. rokiem życia, podczas gdy w nieobciążonej populacji ryzyko zachorowania wynosi około 1% [10, 11].

Struktura genu *TP53*

Gen *TP53* zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 17 (17p13.1). Składa się z 19 198 nukleotydów obejmujących 11 eksonów, z których pierwszy jest niekodujący [12–14]. W promotorze genu *TP53* nie ma charakterystycznych sekwencji CAAT ani TATA, które rozpoznaje polimeraza II RNA. Natomiast (podobnie jak inne rejony regulujące transkrypcję pozbawione sekwencji TATA-box), promotor *TP53* zawiera wiele powtórzeń GC i miejsca wiązania dla czynnika transkrypcyjnego SP1. Posiada również motywy specyficzne dla wielu innych czynników transkrypcyjnych, między innymi: dla kompleksu cMyc/Max, ETF, NF-κB [15, 16].

Struktura białka p53

Gen *TP53* koduje 393-aminokwasowe białko, funkcjonujące jako czynnik transkrypcyjny i biologicznie aktywne jako homo-



Ser15, Ser20, Ser46, Ser392 – najczęstsze miejsca fosforylacji,
Arg175, Gly245, Arg248, Arg249, Arg273, Arg282 – najczęściej zmutowane kodony,
TAD – domena transaktywacyjna,
PRD – domena bogata w proliny,

DBD – domena wiążąca DNA,
L – konsolidator,
OD – domena oligomeryzacyjna,
CTD – domena regulatorowa,
I–V – regiony o wysokim stopniu zachowania ewolucyjnego

Rycina 1. Struktura białka p53

tetramer. Pełnej długości białka składa się z pięciu głównych domen oraz elastycznego regionu konsolidatora (*linker* – L), który łączy domenę wiążącą DNA z domeną tetrameryzacyjną (ryc. 1) [12–14].

Domena transaktywacyjna – TAD (*N-terminal transactivation domain*)

Domena transaktywacyjna (N-końcowa), z uwagi na swoją funkcję, nazywana jest też domeną aktywującą transkrypcję. Składa się z dwóch samodzielnych subdomen: TAD I (aminokwasy 1–40) i TAD II (aminokwasy 41–67), które zawierają zachowane ewolucyjnie sekwencje ϕ -X-X- ϕ - ϕ (gdzie ϕ oznacza aminokwas hydrofobowy, X – dowolny aminokwas). Każda z subdomen funkcjonuje autonomicznie i jest niezbędna w regulacji różnych procesów komórkowych [13, 17–20]. Badania na modelach mysich wykazały, że inaktywacja TAD II upośledza transaktywację niektórych genów, natomiast pozostałe funkcje p53 są zachowane. Z kolei inaktywacja TAD I prowadzi do znacznie poważniejszych defektów funkcjonowania komórki. Powoduje brak transaktywacji genów docelowych oraz zaburza hamowanie cyklu komórkowego i inicjację apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenie DNA. Nie wpływa natomiast na regulację starzenia się komórki i hamowanie procesu karcynogenezy. Jednoczesna eliminacja obu subdomen daje efekt podobny do całkowitego usunięcia z komórki białka p53. Dochodzi wtedy do zaburzeń transkrypcji genów zależnych od supresora, braku aktywacji procesów starzenia się i apoptozy, dysfunkcji punktów kontrolnych cyklu komórkowego, a także do utraty zdolności do hamowania transformacji nowotworowej.

Domena transaktywacyjna, poza dwoma rejonami – Phe19 do Leu25 oraz Pro47 do Trp53, tworzącymi parę helis (Pa1 i Pa2) – ma nieuporządkowaną strukturę. Pa1 i Pa2 pełnią kluczową rolę w łączeniu się TAD z innymi białkami oraz z domeną wiążącą DNA – DBD (*binding domain*). Interakcja z DBD wpływa na selektywność wiązania się p53 ze specyficznymi dla niego sekwencjami, które są obecne w promotorach genów docelowych [17]. Może także przeciwdziałać przedwczesnemu łączeniu się TAD z koaktywatorami transkrypcji i innymi kofaktorami poprzez maskowanie miejsc ich wiązania [9, 21]. Białka, z którymi domena transaktywacyjna tworzy kompleks, to między innymi: MDM2, acetylotransferaza p300/CBP, podjednostka czynnika transkrypcyjnego TFIIH oraz BCL-XL. Powstanie kompleksu z MDM2 oraz p300/CBP wpływa na aktywację i stabilność p53. Białko p300/CBP z kolei pełni istotną rolę zarówno w aktywacji transkrypcji z udziałem p53, jak i w regulacji stabilności kompleksu p53-DNA poprzez acetylowanie lizyn w domenie regulatorowej obecnej na końcu karboksylowym [9]. Domena transaktywacyjna, w wyniku interakcji z BCL-XL (antyapoptotyczne białko mitochondrialne), odpowiada również za wprowadzenie komórki na ścieżkę apoptozy bez konieczności aktywacji transkrypcji genów [4].

Domena transaktywacyjna zawiera jedną z dwóch sekwencji sygnałowych – NES (*nuclear export signal*), które odpowiadają za transport białka p53 z jądra komórkowego do cytoplazmy. WTAD znajduje się również pierwszy z pięciu regionów zachowanych ewolucyjnie – HCD (*highly conserved domain*) [20, 22].

Domena bogata w prolinę – PRD (*proline-rich domain*)

Rejon bogaty w proliny jest w dużym stopniu zachowany ewolucyjnie i obejmuje aminokwasy 68–98. Składa się z wielokrotnych powtórzeń motywu PXXP, gdzie P oznacza prolinę, zaś X odpowiada dowolnemu aminokwasowi [8, 23]. Powtórzenia te są swoistym ligandem dla białek zawierających domeny SH3 i ułatwiają ich bezpośrednią interakcję z p53 [12]. Badania na modelach komórkowych wykazały, że domena PRD jest istotna dla aktywacji apoptozy z udziałem p53 [24, 25]. Ponadto PRD może wpływać na kinetykę fałdowania się białka i ułatwiać jego składanie [12]. Pełni również istotną rolę w stabilizacji białka p53 za pośrednictwem interakcji z izomerazą prolinową Pin1. Dzięki analizom *in vitro* udowodniono, że fosforylacja p53 w odpowiedzi na sygnały stresowe, skutkuje zwiększonym oddziaływaniem z Pin1. Wpływa to na zmianę konformacji białka i zmniejsza jego dostępność dla MDM2 [25].

Domena wiążąca DNA – DBD (*DNA-binding domain*)

Domena wiążąca DNA położona jest centralnie, obejmuje aminokwasy 99–303 [8]. Jej rdzeń tworzy, podobna do obecnych w immunoglobulinach, struktura β -kanapki, która składa się z dwóch antyrównoległych β -kartek oraz helisy [26]. Znajdują się tu cztery spośród pięciu miejsc zachowanych ewolucyjnie (HCD II–V). Są one obszarami, w których najczęściej wykrywa się mutacje [27, 28]. Domena DBD jest rejonem niezbędnym do specyficznego wiązania DNA.

W bezpośredni kontakt z podwójną helisą wchodzi kompleks składający się z trzech elementów. Należy do niego: struktura β -spinki do włosów utworzona przez dwie antyrównoległe nici (S2 i S2'), pęta L3 obejmująca krótką α -helisę (H1) oraz jon cynku koordynowany tetradrycznie przez His-179 i trzy łańcuchy boczne cystein: Cys-176, Cys-238 i Cys-242. Ostatnią składową jest zachowana ewolucyjnie α -helisa (H2) znajdująca się na C-końcu domeny. Jest to ważna funkcjonalnie część domeny i ma kluczowe znaczenie dla aktywności biologicznej p53 [12, 29, 30].

Domena, która wiąże DNA, łączy się ze specyficzną sekwencją RE (*response elements*) obecną w rejonie promotora genu docelowego [28]. RE składa się z dwóch dekamerycznych sekwencji palindromowych – 5'-RRRCWWGYYY-3' (gdzie R oznacza purynę, Y pirymidynę, a W – alaninę lub treoninę). Pojedyncze sekwencje mogą być rozdzielone krótką, liczącą 0–13 par zasad wstawką. Promotory genów zależnych od p53 zawierają różną liczbę sekwencji RE, co może być związane z różnicami w sile aktywacji ich transkrypcji przez supresor.

Wyniki badań krystalograficznych sugerują, że homotetramer p53 jest zdolny do utworzenia kompleksu z pojedynczą dekameryczną sekwencją, przy czym w interakcję zaangażowane są dwie z czterech domen wiążących DNA. Jest także możliwe, że jeden homotetramer p53 wiąże się z dwiema sekwencjami RE [28].

Selektywność wiązania się DBD ze specyficznymi sekwencjami genów docelowych związana jest z interakcją z domeną transaktywacyjną. TAD konkuruje z cząsteczką DNA o wiązanie się z DBD. Sekwencje RE specyficzne dla p53 wiążą się z większym powinowactwem i wypierają TAD z interakcji z domeną centralną. Wewnątrzcząsteczkowa interakcja pomiędzy TAD i powierzchnią DBD w homotetramerze p53 zmniejsza ponad pięciokrotnie zdolność DBD do niespecyficznego łączenia się z DNA, nie wpływa jednak na interakcję z sekwencją specyficzną dla supresora [21].

Domena oligomeryzacyjna – OD (oligomerization domain)

W części C-końcowej białka p53 znajduje się domena oligomeryzacyjna, która odpowiada za tetrameryzację cząsteczki i powstanie funkcjonalnego homotetrameru. Obejmuje ona aminokwasy 323–363 i zawiera drugą sekwencję sygnałową NES [31, 32]. Strukturalnie OD wpisuje się w schemat szpilki do włosów. Składa się z β -harmonijki (aminokwasy Glu326–Arg333) oraz α -helisy (aminokwasy Arg335–Gly356), które łączy glicyna (Gly-334) [31–33].

Domena regulatorowa – CTD (C-terminal domain)

C-końcowy rejon p53 obejmuje aminokwasy 364–393. CTD charakteryzuje się wewnętrznym nieuporządkowaniem, a jej istotną cechą jest obecność lizyn, które współuczestniczą w niespecyficznym wiązaniu p53 z DNA. Domena ta reguluje także zdolność domeny DBD do wiązania DNA, ułatwiając wzajemne dopasowanie i sprzyjając utrzymaniu kompleksu p53-DNA. Niezmodyfikowana forma domeny CTD hamuje wiązanie DNA, podczas gdy fosforylacja Ser392 wpływa pozytywnie na interakcję z kwasem nukleinowym [18, 20, 27].

Podobnie jak domena N-końcowa rejon C-końcowy odpowiada za interakcje p53 z innymi białkami. Jest miejscem, do którego przyłączają się czynniki transkrypcyjne (TFs) [43, 45]. Ponadto CTD jest niezbędna do interakcji z MDM2, przez co wpływa na stabilność p53 i jego jądrową lokalizację. Zawiera miejsca, które są celem modyfikacji potranslacyjnych regulujących aktywność p53 (np. acetylacja domeny moduluje powinowactwo do DNA) [18, 20, 27, 34].

CTD może przyjmować różne konformacje w zależności od interakcji z innymi białkami: α -helisę podczas kontaktu z niskocząsteczkowym białkiem wiążącym wapń S100 (*calcium-binding protein B*), β -kartkę w przypadku oddziaływania z Sir2 (deacetylaza NAD⁺-zależna), β -skręt w kompleksie z p300/CBP (białko koaktywatorowe o aktywności acetylotransferazy histonowej) oraz niezdefiniowaną strukturę drugorzędową w połączeniu z kompleksem A/CDK2. Stąd w zależności

od przyjętej konformacji przez domenę C-terminalną funkcjonalność białka p53 regulowana jest zarówno negatywnie, jak i pozytywnie [20, 34].

Regulacja aktywności p53

Aktywność białka p53 jest regulowana poprzez szereg mechanizmów. Należą do nich modyfikacje potranslacyjne, regulacja procesu degradacji oraz oligomeryzacji. Zahamowanie degradacji przyczynia się do aktywacji białka p53 poprzez jego stabilizację i akumulację w komórce. Poziom supresora w komórkach, które nie są wystawione na działanie czynnika stresowego, jest niski. Sprzyja temu krótki okres półtrwania cząsteczki. Odpowiadają za to białka z rodziny MDM (*murine double minute*) – MDM2 i MDM4, które przyłączają się do p53 w obrębie domeny TAD.

MDM2 ma zdolność do degradacji p53 za pośrednictwem proteasomu, dzięki temu, że ma aktywność ligazy ubikwityny E3. MDM4 nie wykazuje aktywności ligazy, natomiast poprzez heterodimeryzację reguluje aktywność enzymatyczną MDM2, zwiększając wydajność z jaką MDM2 degraduje p53 [35]. Synteza MDM2 jest pozytywnie regulowana przez p53, co prowadzi do zwiększenia poziomu MDM2 przy wyższym stężeniu p53. W nieaktywowanych komórkach, białko p53 wiąże się z MDM2, który promuje jego ubikwitynację. Natomiast w warunkach stresowych, takich jak pojawienie się uszkodzeń DNA, dochodzi do zachwiania równowagi pomiędzy białkami. W wyniku modyfikacji potranslacyjnych blokujących interakcję z MDM2, p53 ulega stabilizacji, zwiększa się jego ilość w komórce i zostaje ono aktywowane [8, 18, 36].

Do aktywacji p53 przyczyniają się także modyfikacje potranslacyjne, w tym: fosforylacja, acetylacja, metylacja, ubikwitynacja, neddylacja, sumoilacja, oraz dodanie na końcu łańcucha aminokwasów N-acetyloglukozaminy. Fosforylacja zachodzi w głównej mierze w obrębie domen N- oraz C-końcowych, a także w rejonie linkera. Lizyny, które znajdują się w tych regionach, mogą zostać poddane również metylacji bądź neddytacji [36]. Neddylacja polega na przyłączeniu cząsteczki Nedd8 do białka docelowego. Nedd8 to białko podobne do ubikwityny, które poprzez aktywację ligaz ubikwitynowo-białkowych – E3, sprzyja degradacji białek [37].

Liczba i typ uszkodzeń DNA decydują o modyfikacjach potranslacyjnych białka p53, co bezpośrednio wpływa na odpowiedź komórki. Do indukcji ścieżki apoptozy niezbędna jest fosforylacja reszty aminokwasowej Ser46 przez białka p38, DYRK2 lub HIPK2. Acetylacja reszty Liz120 przez PCAF (*p300/CBP-associated factor*) powoduje aktywację transkrypcji genów odpowiedzialnych za zatrzymanie cyklu komórkowego. Z kolei acetylacja przez Tip60 (*60-kDa target-interactive protein*) lub hMof (*human males absent on the first*) wprowadza komórkę na zależną od p53 ścieżkę apoptozy. Acetylacja Liz164 za pośrednictwem CEP i p300/CBP jest niezbędna zarówno do zatrzymania cyklu komórkowego jak i apoptozy [36].

Białko p53 jest fosforylowane przez kinazy białkowe ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) i ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad3-related*). W odpowiedzi na uszkodzenia DNA oddziałują one odpowiednio z kinazami Chk2 i Chk1, które stabilizują p53, dzięki przyłączeniu reszty fosforanowej do Ser20. Ponadto białko ATM fosforyluje MDM2, uniemożliwiając mu interakcję z p53. Skutkuje to zahamowaniem degradacji i akumulacją supresora [8, 18, 36]. Kinazy ATM lub ATR fosforylują również bezpośrednio Ser15 p53. Sekwencyjna fosforylacja reszt aminokwasowych ułatwia acetylację na C-końcu łańcucha, umożliwiając oligomeryzację białka i jego transport jądrowy. Wpływa to pozytywnie na aktywność transkrypcyjną p53 i jednocześnie wzmacnia wiązanie z DNA [7].

Kolejnym procesem, który wpływa na aktywność p53, jest jego oligomeryzacja. Ten dynamiczny proces regulują interakcje białko-białko i zależy on od poziomu p53 w komórce. Liczne proteiny łączące się bezpośrednio z domeną OD mogą modyfikować oligomeryzację cząsteczki i zmieniać jej stabilność. Interakcje pomiędzy białkami wzmacniają, bądź hamują proces powstawania oligomeru, promując tym samym monomeryczne formy p53 [31].

Homotetramer białka p53 strukturalnie jest dimerem dwóch dimerów, a proces oligomeryzacji przebiega etapami. Dimer pierwotny powstaje poprzez interakcję pomiędzy β -harmonijkami dwóch monomerów p53, które w sposób antyrównoległy łączą się ze sobą przy współudziale hydrofobowych oddziaływań pomiędzy α -helisami. Kolejno dwa pierwotne dimery scalają się ze sobą i tworzą homotetramer białka p53 [31, 38, 39]. W przypadku pozostałych białek z rodziny p53: p63 oraz p73, obserwujemy dodatkową helisę, która stabilizuje powstały tetrametr [38]. W prawidłowych warunkach większość cząsteczek p53 występuje w postaci dimerów – blisko 60% puli komórkowej. Wykazano, że struktura tetrameru zwiększa powinowactwo i zdolność p53 do wiązania się z DNA w stosunku do formy dimerycznej. Dlatego podczas stresu komórkowego obserwuje się powstawanie homotetrameru z równoczesnym zmniejszeniem degradacji p53. Prawidłowa oligomeryzacja cząsteczki wpływa na funkcjonalność supresora, jest niezbędna do pokierowania komórki na drogę apoptozy, zahamowania jej wzrostu, bądź pozwolenia na proliferację. Wady podczas procesu oligomeryzacji zmniejszają aktywność transkrypcyjną białka i przyczyniają się do powstawania szeregu nowotworów [31, 39].

Białko p53 jako główny sternik procesów zachodzących w komórce

Białko p53 odgrywa kluczową rolę w kontroli wielu najważniejszych procesów zachodzących w komórce.

Bierze udział w regulacji proliferacji, programowanej śmierci oraz naprawy materiału genetycznego. Jest także zaangażowane w kontrolę procesów związanych z metabolizmem komórkowym, autofagią i starzeniem się komórek [8]. Supresor

działa poprzez bezpośrednią interakcję z innymi białkami oraz regulację transkrypcji genów. Tworzy na przykład kompleksy z białkami, które biorą udział w naprawie DNA (w tym RAD51, RecA, BRCA2). Oddziałuje także z poszczególnymi członkami rodziny BCL-2 regulującymi mitochondrialną ścieżkę apoptozy. Ponadto p53 wpływa w zróżnicowany sposób na kontrolę transkrypcji genów docelowych:

- bezpośrednio aktywuje ekspresję genów w ramach rozbudowanego mechanizmu obejmującego interakcję p53 z RE w promotorze,
- bezpośrednio hamuje ekspresję genów docelowych, co następuje po interakcji p53 z RE lub poprzez wiązanie p53 za pośrednictwem adaptera, w szczególności czynnika NF-Y (*nuclear transcription factor Y*),
- pośrednio hamuje ekspresję genów docelowych dzięki:
 - aktywacji p21, DREAM (*p53-DREAM pathway*; *DP, RB-like, E2F4 and MuvB*) lub tworzeniu kompleksów białek kieszeniowych (RB/E2F),
 - współdziałaniu z aktywatorami transkrypcji, w szczególności z NF-Y, Sp1 (*specificity protein 1*) i TBP (*TATA-box binding protein*),
 - aktywacji transkrypcji niekodującego RNA (ncRNAs), w tym: *mir34a* (*MicroRNA 34a*), *lincRNA-p21* (*long intergenic non-coding RNA p21*) oraz *PANDA* (*p21 associated ncRNA DNA damage activated*) [27, 40–44].

Rola p53 w naprawie DNA

DNA w komórkach organizmów żywych jest narażone na liczne uszkodzenia związane zarówno z czynnikami endogennymi (reaktywne formy tlenu, błędy podczas replikacji), jak i działaniem czynników egzogennych, do których należą między innymi: promieniowanie jonizujące oraz UV, a także związki oddziałujące genotoksycznie. W reakcji na nieprawidłowości w obrębie materiału genetycznego w komórce zostaje uruchomiony szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA – DDR (*DNA damage response*). Jego ważnym elementem jest białko p53 [36, 45].

Główną funkcję w aktywacji szlaku DDR odgrywają kinazy ATR oraz ATM, które należą do rodziny PIKK (*phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase*). Pierwsza z nich zaangażowana jest w odpowiedź na uszkodzenia jednoniciowych odcinków DNA – SSB (*single-strand break*) – powstałych np. w wyniku zatrzymania widełek replikacyjnych. Do jej aktywacji dochodzi głównie podczas fazy S cyklu komórkowego. Natomiast kinaza ATM jest aktywna podczas wszystkich faz cyklu. Pośredniczy w odpowiedzi na dwuniciowe uszkodzenia DNA – DSB (*double strand breaks*). Następnym etapem kaskady sygnałowej uruchomionej przez powyższe kinazy jest aktywacja białek efektorowych, do których należy między innymi p53. W zależności od zakresu uszkodzeń dochodzi do różnych modyfikacji potranslacyjnych supresora. Wpływa to na odpowiedź komórki: próbę naprawy DNA, bądź – w przypadku nieodwracalnych zmian – uruchomienie ścieżki apoptozy [36, 46, 47].

Istnieje wiele mechanizmów naprawy DNA. Jednym z nich jest naprawa bezpośrednia odbywająca się bez przerwania ciągłości nici DNA. Jest ona związana z działaniem metylotransferazy O⁶-metyloguaniny (MGMT), której transkrypcję aktywuje białko p53. MGMT redukuje działanie czynników alkilujących poprzez usunięcie grupy alkilowej z atomu O⁶ guaniny, przenosząc ją na własną resztę cysteiny (Cys145) znajdującą się w centrum aktywnym [36, 48, 49]. Wysoka aktywność metylotransferazy w komórkach nowotworowych wpływa na oporność na leczenie preparatami alkilującymi, takimi jak pochodne nitrozomocznika lub dakarbazyna, a tym samym na niepowodzenie terapii i chemiooporność u chorych [50].

Kolejnym mechanizmem naprawy DNA jest naprawa przez wycinanie nukleotydów – NER (*nucleotide excision repair*). Białko p53 w zależności od rodzaju uszkodzenia stymuluje tę ścieżkę w sposób zależny lub niezależny od aktywacji transkrypcji. Ułatwia dostępność do chromatyny białkom naprawczym bądź pośredniczy w aktywacji ekspresji genów odpowiedzialnych za rozpoznawanie uszkodzeń i inicjujących naprawę DNA [51]. Pierwszy mechanizm związany jest z interakcją p53 z białkami p300/CBP, które ma aktywność acetylotransferazy. Białko p53 po związaniu z p300/CBP modyfikuje jego konformację, dzięki czemu dochodzi do aktywacji enzymu, co umożliwia rozluźnienie heterochromatyny i ułatwia dostęp białek naprawczych do DNA [52, 53]. Podobny mechanizm można zaobserwować w przypadku interakcji p53 z białkami p33ING1 (*inhibitor of growth 1*) oraz p33ING2, które to poprzez zwiększenie poziomu acetylacji histonu H4 aktywują rozluźnienie struktury chromatyny i odsłaniają białkom naprawczym miejsca uszkodzenia DNA [54].

Z kolei mechanizm naprawy NER zależny od aktywacji transkrypcji przez p53, obejmuje między innymi geny: *XPC* (*xeroderma pigmentosum*) oraz *Gadd45* (*growth arrest and DNA-damage-inducible*) [51, 55]. Białko DDB2 (*damage specific DNA binding protein 2*) kodowane przez *XPC* jest niezbędne do naprawy DNA w odpowiedzi na uszkodzenia spowodowane promieniami UV. Wchodzi w skład kompleksu, który acetyluje histony [56]. Produkt genu *Gadd45* poprzez interakcję z antygenem jądrowym proliferacji komórkowej PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) zwiększa dostęp białek naprawczych do uszkodzonego DNA. Przez to odgrywa kluczową rolę w zapobieganiu transformacji nowotworowej [54, 57].

Rola p53 w regulacji cyklu komórkowego

Cykl komórkowy to kaskada następujących po sobie zdarzeń, które prowadzą do podziału komórki na dwie komórki potomne. Jego poprawny przebieg jest monitorowany w punktach kontrolnych, których pozytywne przejście warunkuje rozpoczęcie kolejnej fazy cyklu. Kluczowym białkiem uczestniczącym w tym procesie jest p53.

Rola p53 w punkcie kontrolnym G1/S

Pierwszym etapem cyklu komórkowego jest faza G1, w której komórka podejmuje ostateczną decyzję o podziale. Jeśli

jednak zostaną wykryte uszkodzenia materiału genetycznego, uruchomiony zostaje ciąg procesów prowadzący do zatrzymania cyklu na przełomie faz G1/S. Uszkodzenia DNA są wykrywane przez kinazy ATM/ATR, które bezpośrednio oraz pośrednio – poprzez białka Chk1/Chk2 – fosforylują p53 i stymulują jego aktywację [58]. Aktywny supresor transportowany jest do jądra komórkowego. Tam działa jako czynnik transkrypcyjny i wpływa na ekspresję genów docelowych, w szczególności inhibitorów kinaz cyklicznych z rodziny Kip/Cip: *CDKN1A* (p21) oraz *CDKN1B* (p27) [58–60]. Białka p21 oraz p27 wiążą się z kompleksem kinazy CDK2 i cykliny E hamując jego aktywność. Białko p21 jest także inhibitorem kompleksu cykliny D z CDK4/6 [61]. Ograniczona aktywność CDK2 oraz CDK4 blokuje fosforylację RB. Sprzyja to wiązaniu się białka RB z czynnikiem transkrypcyjnym E2F1 i uniemożliwia mu działanie. Prowadzi to do wyciszenia transkrypcji genów niezbędnych do przeprowadzenia komórki do kolejnych etapów podziału, co daje czas na naprawę DNA. Usunięcie uszkodzeń umożliwia kontynuowanie podziału. W przypadku znacznych zmian, niemożliwych do naprawienia, p53 uruchamia programowaną śmierć komórki [62].

Rola p53 w punkcie kontrolnym w fazie S

Warunkiem prawidłowego podziału komórki jest całkowita i bezbłędna replikacja materiału genetycznego, która zachodzi podczas fazy S. Wystąpienie błędów powoduje fosforylację p53 przez kinazy ATR i Chk1. Aktywowany supresor p53 indukuje ekspresję białka p21, które poprzez interakcję z PCNA i CDK2 hamuje replikację DNA [58, 61]. Związanie p21 z PCNA zakłóca aktywność zależnej od niego polimerazy DNA, jednak nie wpływa negatywnie na funkcje naprawcze PCNA [63].

Rola p53 w punkcie kontrolnym G2/M

Punkt kontrolny G2 zabezpiecza komórkę przed przejściem w ostatni etap podziału z niezreplikowanym DNA. Przez co zapobiega niewłaściwej segregacji chromosomów do komórek potomnych. Warunkiem wejścia komórki w fazę M jest aktywacja kompleksu Cdk1 z cykliną B. Białko p53 stymulując ekspresję genów *Gadd45*, *SFN* (14-3-3 σ) oraz wspomnianego wcześniej *CDKN1A* (p21), przyczynia się do zahamowania cyklu komórkowego w fazie G2 [5]. Cząsteczka p21 łączy się z kinazą cykliczną Cdk1, blokując jej centrum aktywne. Skutkiem tego jest inaktywacja kompleksu Cdk1/cyklina B [62]. Z kolei, negatywny regulator cyklu komórkowego *Gadd45* przyczynia się do rozpadu kompleksu cykliny B i Cdk1. Cyklina B odryso-cjowuje i zmieniając lokalizację z jądrowej na cytoplazmatyczną, zmniejsza swoją dostępność dla kinazy cyklicznej. Powoduje to zahamowanie dalszych etapów podziału [64]. Następnym białkiem kontrolującym punkt G2/M jest 14-3-3 σ . Białko to łączy się z Cdk1 uniemożliwiając powstanie kompleksu z cykliną B. Ponadto przyczynia się do aktywacji kinazy Chk1, która poprzez fosforylację inaktywuje Cdc25 i hamuje interakcję pomiędzy Cdk1 i cykliną B [65, 66].

Kolejnym mechanizmem kontroli podziału komórki przez p53 jest represja promotora topoizomazy II. Jest to enzym, który reguluje prawidłową kondensację chromatyny w procesie formowania chromosomów mitotycznych. Obniżenie poziomu jej stężenia podczas fazy G2 skutkuje zatrzymaniem cyklu komórkowego [67].

Proces samozniszczenia komórki – rola p53

Zatrzymanie cyklu komórkowego oraz programowana śmierć komórki są jednymi z najbardziej zauważalnych efektów działalności p53 w odpowiedzi na uszkodzenie DNA, pojawienie się czynników stresowych bądź aktywację onkogenu. Wprowadzenie komórki zmienionej nowotworowo na ścieżkę apoptozy jest zdarzeniem pożądanym [62].

Wyróżnia się dwa główne szlaki inicjacji procesu apoptozy: wewnątrzkomórkowy – mitochondrialny oraz zewnątrzkomórkowy – związany z receptorami śmierci [35]. Białko p53 bierze czynny udział w obydwu. Jest ono ściśle związane z aktywowaniem transkrypcji genów proapoptotycznych oraz bezpośrednim oddziaływaniem z białkami antyapoptotycznymi. Innym mechanizmem ukierunkowanym na inicjację apoptozy przez supresor jest stymulacja ekspresji mikroRNA, które ma za zadanie wyciszenie genów związanych z cyklem komórkowym oraz naprawą DNA [36, 68].

Udział p53 w wewnątrzkomórkowej ścieżce apoptozy

Wewnątrzkomórkowy szlak śmierci komórki jest związany z interakcją p53 z jedną z dwóch grup białek, które należą do rodziny BCL-2 (*B-cell leukemia/lymphoma 2*). Cechą wspólną tych białek jest obecność jednej lub kilku domen BH (*Bcl-2 homology*): BH1, BH2, BH3 i BH4. Białka z pierwszej grupy, w tym BAX i BAK, zawierają domeny BH od 1 do 3 i tworzą kanały w błonie mitochondrialnej. Umożliwia to przedostanie się do cytoplazmy czynników proapoptotycznych. W nieaktywowanej komórce białka te są związane z antyapoptotycznymi białkami, takimi jak: BCL-2, BCL-XL, MCL-1. Białka z drugiej grupy mają tylko jeden typ domeny – BH3. Należą do nich:

- PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*),
- NOXA (*phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*),
- BID (*BH3 interacting domain death agonist*),
- BIM (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*).

Pod wpływem działania czynników stresowych powodują one uwolnienie i aktywację białek proapoptotycznych. Skutkiem tego jest permabilizacja błony mitochondrialnej MOMP (*mitochondrial outer membrane permeabilization*) [36, 68, 69].

Liczne badania wskazują, że białko p53 pozytywnie reguluje transkrypcję genów kodujących białka z drugiej grupy (które mają tylko domenę BH3). Ponadto może również bezpośrednio wchodzić w interakcję z antyapoptotycznymi białkami BCL-2, BCL-XL lub MCL-1 hamując ich działanie, co prowadzi do aktywacji białek proapoptotycznych BAX i BAK [36, 68, 70]. Wskutek permabilizacji błony mitochondrialnej uwolniony zostaje do cytoplazmy cytochrom C, który wraz

z białkiem APAF1 (*apoptotic protease activating factor 1*) i kaspazą-9 (kaspaza inicjatorowa) formuje apoptosom. Kompleks ten zapoczątkowuje aktywację pozostałych kaspaz efektorowych i degradację poszczególnych elementów komórki. Dochodzi również do uwolnienia białek, które blokują inhibitory kaspaz efektorowych: -3, -7 i -9 (IAPs – *inhibitors of apoptosis*): SMAC/*/DIABLO* (*second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pl*) oraz OMI/HTRA2 [36, 69, 71]. Badania nad rolą p53 w procesie śmierci komórki wykazały, że białko to aktywuje apoptosom poprzez regulację ekspresji APAF1, jak również hamuje transkrypcję inhibitorów kaspaz, które odpowiadają za blokowanie apoptozy (IAPs) [71, 72].

Marchenko i Moll dowiedli, że p53 może również sprawować niezależną od transkrypcji, bezpośrednią funkcję proapoptotyczną [68]. Jest to ściśle związane ze specyficznymi modyfikacjami potranslacyjnymi tego białka. W warunkach stresowych dochodzi do translokacji cząsteczek p53 i ich lokalizacji w mitochondriach, gdzie supresor zachowuje się jak czynnik proapoptotyczny o domenie BH3 i inicjujący MOMP.

Rola p53 w zewnątrzkomórkowej ścieżce apoptozy

Zewnątrzkomórkową ścieżkę apoptozy aktywują sygnały spoza komórki. Bodźce odbierane są przez zlokalizowane na powierzchni błony komórkowej receptory śmierci DR (*death receptor*), które należą do rodziny TNFR (*tumor necrosis factor receptor*). Składają się one z domeny zewnątrzkomórkowej, części transbłonowej oraz zanurzonej w cytoplazmie domeny śmierci DD (*death domain*), która bezpośrednio oddziałuje z kompleksem białek adaptorowych. Pobudzenie receptora śmierci zachodzi poprzez przyłączenie specyficznego ligandu, co prowadzi do zmian konformacyjnych domeny wewnętrznej i formowania kompleksu DISC (*death-inducing-signaling-complex*). Kompleks ten zainicjowany jest poprzez połączenie domeny śmierci z białkiem adaptorowym FADD (*Fas associated death domain protein*) oraz z prokaspazą inicjatorową 8 lub 10. Autoproteoliza kaspazy 8 prowadzi do bezpośredniej aktywacji kaspazy efektorowej 3. To z kolei pociąga za sobą nieodwracalne zmiany – rozpoczęcie cięcia cytoszkieletu komórki i w efekcie jej śmierć [36].

W odpowiedzi na promieniowanie gamma oraz uszkodzenie DNA białko p53 reguluje transkrypcję genów, które kodują receptory śmierci oraz ich ligandy, odpowiednio *CD95/FAS/Apo-1* i *DR5/KILLER* [70, 71, 73]. Liczne badania wskazują również na istotną rolę p53 w indukcji apoptozy za pośrednictwem TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor 1*) [71, 74]. Ponadto p53 uwrażliwia komórkę na sygnały pochodzące ze środowiska zewnętrznego oraz może bezpośrednio odpowiadać za aktywację kaspazy 8, która zapoczątkowuje kaskadę kaspaz efektorowych [72].

Białko p53 jako nadrzędny regulator białek apoptotycznych

Poza podstawowymi szlakami śmierci komórki białko p53 reguluje bezpośrednio ekspresję innych genów związanych

z apoptozą. Należy do nich między innymi *PERP* (*p53 apoptosis effector related to PMP-22*), którego produkt jest odpowiedzią na hiperproliferyzację komórek indukowaną przez E2F1 oraz uszkodzenia DNA, a jego nadekspresja zapoczątkowuje apoptozę [75, 76]. Kolejnym celem dla p53 jest *AEN* (*apoptosis-enhancing nuclease*) – gen aktywowany stresem genotoksycznym, kodujący nukleazę, która podczas apoptozy trawi dwuniciowy DNA [77].

Białko p53 wpływa również na transkrypcję genów:

- *PIDD* (*p53-induced protein with a death domain*) [78],
- *p53DINP1* (*p53-dependent damage-inducible nuclear protein 1*),
- *p53AIP1* (*tumor protein p53 regulated apoptosis inducing protein 1*) [79].

Ekspresja *PIDD* następuje w odpowiedzi na uszkodzenie materiału genetycznego. Produkt genu *PIDD* tworzy wraz z białkiem adaptorowym *RAIDD* (*RIP-associated protein with a death domain*) zależny od p53 kompleks zwany *PIDDosome*, który współpracuje z kaspazą 2. Kaspaza 2 aktywuje zaś białko *BID*, które uruchamia mitochondrialny szlak apoptozy [36, 75, 80].

Ekspresja genu *p53DINP1* zostaje zainicjowana w wyniku wykrycia poważnych uszkodzeń w DNA. Jego produkt reguluje fosforylację Ser46 w p53. Jest to konieczne do transaktywacji proapoptotycznego genu *p53AIP1*, który jest zaangażowany w mitochondrialną ścieżkę apoptozy zależną od p53 [4, 79]. Produkt *p53AIP1* oddziałuje bezpośrednio z *BCL-2*, hamując jego aktywność i zwiększając przepuszczalność błony mitochondrium. Powoduje to uwolnienie cytochromu C i rozpoczyna śmierć komórki [81].

Mutacje genu *TP53*

Utrata prawidłowej funkcji białka p53 powoduje zaburzenie mechanizmów kontrolujących proliferację i odgrywa kluczową rolę w rozwoju dużej grupy nowotworów. *TP53* jest genem, którego mutacje w komórkach nowotworów człowieka są opisywane najczęściej i dotyczą ponad połowy wszystkich przypadków guzów złośliwych [23]. Wykrywa się je między innymi w:

- 43% przypadków raka jelita grubego,
- 42% nowotworów głowy i szyi,
- 41% nowotworów przełyku,
- blisko 39% nabłonkowych raków jajnika

(baza danych Międzynarodowej Agencji ds. Badań nad Rakiem (IARC), wydanie R19) [82].

Utrata (delecja) jednej z kopii genu *TP53* w komórkach jest częstym zaburzeniem w różnego typu białaczkach. Na przykład w przewlekłej białaczce limfocytowej – CLL (*chronic lymphocytic leukemia*) zarówno delecja *TP53* jak i somatyczne mutacje punktowe tego genu powodują niestabilność genetyczną komórek nowotworowych, co skutkuje pogorszeniem rokowania. Delecja *TP53* występuje u około 10% pacjentów z CLL w momencie rozpoznania choroby, ale u chorych w trak-

cie wznowy po nieskutecznym leczeniu fludarabiną wynosi aż 40%. Delecja jest związana z utratą jednego allelu genu i jest istotnym czynnikiem, który warunkuje klasyfikację nowotworów hematologicznych. Wiąże się z gorszą odpowiedzią na leczenie, krótszym czasem wolnym od choroby oraz krótszym czasem całkowitego przeżycia [83]. Mutacje *TP53* powodują różnego typu zaburzenia aktywności samego białka p53, a także szereg dysfunkcji w interakcjach p53 z innymi białkami, co w sposób znaczący wpływa na prawdopodobieństwo wystąpienia lub progresję nowotworu [84].

Znaczenie prognostyczne mutacji w genie *TP53* w guzach litych nie jest do końca jednoznaczne. W większości publikacji dotyczących nowotworów takich jak raki jajnika, prostaty, piersi, pęcherza, płuc i przewodu pokarmowego sugeruje się, że obecność zaburzeń w p53 wiąże się z gorszym rokowaniem. Jednak, z drugiej strony, inne analizy dotyczące tych samych nowotworów nie wskazują takiego powiązania [85].

Mutacje somatyczne *TP53* są w większości zmianami typu *missense* (zmiany sensu), w wyniku których dochodzi do powstania białka pełnej długości, ze zmianą pojedynczego aminokwasu. W większości przypadków fizjologicznym efektem takiej mutacji jest znaczne wydłużony okres półtrwania p53, manifestujący się akumulacją białka w komórce. Mutacje mogą przyczynić się do nabycia przez nieprawidłowe białko nowych funkcji, których nie miała forma prawidłowa – *GOF* (*gain-of-function*) [8, 86–88]. Drugim typem zmian są mutacje prowadzące do powstania przedwczesnego kodonu terminującego translację. Należą do nich mutacje typu *nonsense*, czyli substytucje prowadzące do powstania kodonu STOP oraz mutacje typu *frameshift* (delecje i insercje), które powodują przesunięcie ramki odczytu. Stanowią one około 10% wszystkich zmian [82].

Mutacje w genie *TP53* wykrywane są w całej długości sekwencji kodującej, natomiast ich częstość występowania w poszczególnych rejonach jest zróżnicowana. Najwięcej zaburzeń obserwuje się w sekwencjach, które kodują domenę wiążącą DNA – eksony 5–8. Mniejszy odsetek mutacji odnotowuje się w eksonach 2–4 oraz 9–11, które kodują domeny transaktywacyjną, bogatą w prolinę oraz oligomeryzacyjną [89, 90]. Przeważającą część mutacji w obrębie domeny wiążącej DNA stanowią mutacje zmiany sensu, natomiast poza tym rejonem proporcja zmienia się na korzyść zmian powodujących skrócenie ramki odczytu [91]. Do kodonów, w których wykrywa się największy odsetek substytucji należą: Arg175, Gly245, Arg248, Arg249, Arg273 oraz Arg282 [30, 86, 92, 93].

Mutacje genu *TP53* można podzielić na dwie grupy w zależności od rodzaju zmian, jakie powodują w białku. Pierwsza z nich obejmuje modyfikacje w rejonie uczestniczącym w bezpośredniej interakcji z DNA (klasa I), druga zaś odnosi się do zmian konformacyjnych cząsteczki (klasa II). Do pierwszej klasy zaliczamy substytucje przekształcające kodony Arg248 i Arg273 (pętla L3 i motyw pętla-kartka-helisa), które są zaangażowane w interakcję z DNA [12, 30, 93]. Tego typu mutacje nie prowadzą

do defektów w obrębie struktury przestrzennej białka. Zmutowane cząsteczki zdolne są do przyjęcia poprawnej konformacji, natomiast upośledzony zostaje kontakt z sekwencją DNA, którą rozpoznaje białko p53.

Drugą klasę stanowią mutacje w obrębie kodonów Arg175, Gly245, Arg249 i Arg282. Zmiany dotyczą aminokwasów odpowiadających za stabilizację natywnej struktury domeny wiążącej DNA (pętla L2 w rejonie atomu cynku) i bezpośrednio wpływają na układ struktury trzeciorzędowej p53. Przyjęcie przez białko nieprawidłowej konformacji powoduje częściowe bądź całkowite rozwinięcie DBD. Wpływa to na stabilność cząsteczki oraz zakłóca oddziaływanie z białkami docelowymi [12, 30, 82, 91, 93–95]. Mutacje, które prowadzą do zmiany konformacji, wydają się mieć większe znaczenie w procesie karcynogenezy niż modyfikacje w obrębie części wchodzącej w bezpośredni kontakt z DNA [96].

Analiza spektrum mutacji genu *TP53* pokazała, że najczęstszą substytucją jest tranzycja G:C w A:T, przy czym największy odsetek takich zmian odnotowuje się w dinukleotydach CpG. Jest to związane z podatnością cytozyny na metylację przez metylotransferazy DNA i jej spontaniczną deaminację prowadzącą do powstania tyminy [82, 91]. Istotnym jest również, że wiele spośród ważnych funkcjonalnie reszt domeny wiążącej DNA to argininy. Kodowane są one przez trójki nukleotydów szczególnie podatnych na uszkodzenia ze względu na obecność dinukleotydów GC, które naprawiane są z mniejszą wiernością [12].

Rodzina supresorów transformacji nowotworowej

Długo uważano, że p53 jest supresorem jedynym w swoim rodzaju. Jednak pod koniec lat 90. odkryto dwa podobne do niego białka. Pozwoliło to na wyodrębnienie nowej, będącej jedną z najstarszych ewolucyjnie, rodziny białek, do której należą p53, p63 oraz p73. Badania nad określeniem różnic i podobieństw pomiędzy poszczególnymi członkami grupy, dotyczące szczególnie regulacji i możliwości wzajemnego oddziaływania, trwają do chwili obecnej [97].

Wykazano, że członkowie rodziny p53 charakteryzują się znaczącym podobieństwem budowy łańcucha białkowego. W obrębie domeny wiążącej DNA homologia pomiędzy p53 i p73 wynosi około 63%, a pomiędzy p53 i p63 około 60% [97]. Dzięki temu p63 i p73 mogą bezpośrednio oddziaływać z promotorami genów regulowanych przez p53, takimi jak: *CDKN1A* (*p21*), *PUMA*, *NOXA*, *BAX* oraz *MDM2* [98]. Strukturalnie także pozostałe domeny białek z rodziny p53 – bogata w prolinę, C-końcowa domena oligomeryzacyjna oraz domena transaktywacyjna – charakteryzują się znaczącym podobieństwem pomiędzy członkami grupy. Natomiast w niektórych izoformach p63 i p73 opisano dodatkową domenę hamującą transaktywację – TID (*transactivation inhibitory domain*), której nie obserwuje się w p53 [99, 100]. Uważa się, że reaguje ona z domeną TAD drugiej cząsteczki, generując w ten sposób

zamkniętą i nieaktywną konformację dimeryczną, która hamuje właściwości transaktywacyjne izoform [101]. Drugą dodatkową domeną, znajdującą się na C-końcu, jest domena motywu α , która odpowiada za interakcję białko–białko – SAM (*sterile alpha motif*). Jest ona niezbędna do procesu tetrameryzacji – tworzenia i stabilizacji aktywnej cząsteczki. Na poziomie sekwencji aminokwasowych białka p63 oraz p73 wykazują względem siebie wyższą homologię niż wobec p53 [99, 100]. W odróżnieniu od genu *TP53* geny kodujące p63 i p73 rzadko ulegają mutacji w komórkach nowotworowych [97].

Pomimo współdzielenia niektórych aktywności z p53, białka homologiczne odznaczają się wysokim poziomem swoistości funkcjonalnej. Badania dowodzą, że białko p73 odgrywa istotną rolę podczas rozwoju i różnicowania się komórek układu nerwowego, reguluje również nieswoistą (wrodzoną) odpowiedź immunologiczną. Białko p63 jest z kolei znaczące dla rozwoju embrionalnego oraz funkcjonowania naskórka i innych nabłonków płaskich. Odpowiada ono za regulację rozwoju komórek sutka, prostaty, szyjki macicy i wewnętrznego układu rozrodczego zarówno podczas rozwoju zarodkowego człowieka, jak i w życiu dojrzałym. Jako białko, które należy do rodziny antyjonkogennych czynników transkrypcyjnych, odgrywa także istotną rolę w procesie nowotworzenia. Wykazano, że p63 bierze udział między innymi w hamowaniu przerzutów nowotworowych [97–101].

Wadliwe białko p53 jako cel terapeutyczny

Powszechność występowania mutacji w genie *TP53* w nowotworach człowieka czyni zaburzenia w p53 ważnym celem terapeutycznym. Główne kierunki badań skupiają się na przywróceniu wadliwemu białku prawidłowej funkcji, degradacji nieprawidłowego p53 lub oddziaływaniu na ścieżki związane z supresorem [102].

Badania wykazały, że przywrócenie funkcji p53 w guzach z mutacją kodującego go genu, hamuje rozwój nowotworu. Jednak opracowanie leku, który przywracałby prawidłową funkcję supresora, wydaje się wyzwaniem trudniejszym, niż opracowanie terapii blokujących nadaktywne białko, tak jak ma to miejsce w przypadku powszechnie już stosowanych inhibitorów kinaz tyrozynowych. Dotychczas udało się stworzyć szereg drobnocząsteczkowych reaktuatorów, które – łącząc się z powstałym w wyniku mutacji białkiem p53 – są w stanie przywrócić całkowicie lub częściowo jego funkcję [102]. Większość z nich jest jeszcze w fazie testów przedklinicznych, jednak niektóre weszły już w fazę badań z udziałem pacjentów. Jednym z nich jest cząsteczka APR-246, która powoduje, że wadliwe białko p53 przyjmuje prawidłową konformację i aktywuje transkrypcję genów docelowych oraz zatrzymuje wzrost nowotworu [102, 103]. Badania tego leku są obecnie na etapie badań klinicznych obejmujących między innymi białaczki, chłoniaki, czerniaki, raki jajnika i przelyku. Inną cząsteczką testowaną w ramach badań klinicznych pierwszej fazy – w nowotworach ginekologicznych oraz rakach głowy i szyi – jest COTI-2, która funkcjonuje jako che-

lator dla jonów cynku [104]. Lek ten, podobnie jak APR-246, łączy się z nieprawidłowo zwinionym p53 i zmienia jego konformację oraz przywraca prawidłową funkcję. Dzięki temu dochodzi do aktywacji apoptozy w komórkach nowotworowych [102–104].

Do reaktywacji prawidłowego p53 służą także terapie genowe, których celem jest dostarczenie prawidłowej kopii genu *TP53* do komórek guza. Wykorzystywane są w tym celu wirusy onkolityczne, które mają selektywną zdolność do replikacji w komórkach nowotworowych [105]. Pierwszym komercyjnym lekiem do terapii genowej opartej na *TP53* jest preparat Gendicine, który dotychczas został dopuszczony do stosowania jedynie w Chinach. Lek ten jest genetycznie zmodyfikowanym ludzkim adenowirusem, który posłużył jako wektor dostarczający do komórek nowotworowych prawidłową sekwencję genu *TP53* [106].

Inną strategią terapeutyczną jest eliminacja nieprawidłowego białka p53, które akumuluje się w komórce i dzięki nabyciu nowych funkcji przyczynia się do wzrostu nowotworu. Można to osiągnąć poprzez aktywację jego proteasomalnej degradacji. W tym celu stosuje się między innymi inhibitory białek opiekuńczych, które łącząc się ze zmutowanym p53, stabilizują go i chronią przed proteolizą [102, 103]. Jednym z przykładów takiego leku jest Ganetespib, drobnocząsteczkowy inhibitor Hsp90 (*heat shock protein 90*), który – jak wykazano w badaniach na modelach mysich – przyczynia się do wzmożonej degradacji wadliwego p53 [103].

Niektóre terapie nie są skierowane bezpośrednio na uszkodzone p53, ale na powiązane z nim ścieżki aktywne w komórkach nowotworowych. Taka strategia wykorzystywana jest między innymi w przypadku atorwastatyny i AZD1775, których badania z udziałem chorych onkologicznie weszły już do fazy klinicznej [102, 107]. Atorwastatyna jest powszechnie stosowanym lekiem z grupy statyn, który blokuje produkcję cholesterolu i stosuje się go w chorobach sercowo-naczyniowych. Zastosowanie jej w komórkach nowotworowych z mutacją *TP53* powoduje zmniejszenie ilości nieprawidłowego białka oraz zmianę morfologii komórek nowotworowych, co skutkuje zatrzymaniem wzrostu guza. Z kolei AZD1775 jest inhibitorem kinazy WEE1, która inicjuje zatrzymanie cyklu w punkcie G2/M. W komórkach z mutacją *TP53*, inaktywacja punktu kontrolnego G2/M prowadzi do eliminacji komórki na skutek katastrofy mitotycznej i zwiększa wrażliwość nowotworu na działanie leków uszkadzających DNA i radioterapię [102, 107].

Podsumowanie

Zaprezentowany przegląd literatury zestawia dane, które wskazują, że białko p53 należy do najważniejszych supresorów transformacji nowotworowej. W wyniku działania szerokiego spektrum czynników stresowych, takich jak uszkodzenia DNA, hipoksja czy pobudzenie onkogenów, p53 zostaje aktywowane i poprzez regulację najważniejszych procesów w komórce decyduje o jej losie. Dlatego też zaburzenia jego funkcjonowania są kluczowym elementem procesu przekształcania się komórki

prawidłowej w komórkę nowotworową. Powszechność występowania mutacji genu *TP53* w wielu typach nowotworów czyni go atrakcyjnym celem potencjalnych terapii, które skupiają się głównie na wyeliminowaniu wadliwego białka lub przywróceniu jego prawidłowej funkcji.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Magdalena Kulesza

Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie

Samodzielna Pracownia Cytogenetyki

ul. Wawelska 15B

02-034 Warszawa

e-mail: mydzia@gmail.com

Received: 27 Mar 2019

Accepted: 22 Oct 2019

Piśmiennictwo

1. Latest global cancer data, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. 2018.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R i wsp. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*. 2014; 136: E359–E386.
3. Soussi T. The history of p53. *EMBO Rep*. 2010; 11: 822–826.
4. Sznarkowska A, Olszewski R, Zawacka-Pankau J. Farmakologiczna aktywacja supresora nowotworu, natywnego białka p53 jako obiecująca strategia zwalczania nowotworów. *Postepy Hig Med Dosw*. 2010; 64: 396–407.
5. Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9: 701–713.
6. Meek DW. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochem J*. 2015; 469: 325–346.
7. Szybińska A, Leśniak W. Dysfunction in neurodegenerative diseases – the cause or effect of pathological changes? *Aging Dis*. 2017; 8: 506–518.
8. Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53 mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14: 359–370.
9. Lee CW, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ i wsp. Structure of the p53 transactivation domain in complex with the nuclear coactivator binding domain of CBP. *Biochemistry*. 2010; 49: 9964–9971.
10. Kamihara J, Rana HQ, Garber JE. Germline TP53 mutations and the changing landscape of Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat*. 2014; 35: 654–662.
11. Sorrell AD, Espenschied CR, Culver JO i wsp. TP53 testing and li-fraumeni syndrome: current status of clinical applications and future directions. *Mol Diagn Ther*. 2013; 17: 31–47.
12. Stavridi ES, Huyen Y, Sheston EA i wsp. The three-dimensional structure of p53. zambetti gp. the p53 tumor suppressor pathway and cancer. Springer: Boston; 2005; 25–52.
13. Kim S, An SS. Role of p53 isoforms and aggregations in cancer. *Medicine*. 2016; 95: e3993.
14. Paskulin Dd, Paixão-Côrtes VR, Hainaut P i wsp. The TP53 fertility network. *Genet Mol Biol*. 2012; 35: 939–946.
15. Reisman D, Polson-Zeigler A. The bi-directional nature of the promoter of the p53 tumor suppressor gene. *J Leuk*. 2015; 3: 187.
16. Reisman D, Takahashi P, Polson A i wsp. Transcriptional regulation of the p53 tumor suppressor gene in s-phase of the cell-cycle and the cellular response to DNA damage. *Biochem Res Int*. 2012; 2012: ID 808934.
17. Brady CA, Jiang D, Mello SS i wsp. Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. *Cell*. 2011; 145: 571–583.
18. Jenkins LM, Durell SR, Mazur SJ i wsp. p53 N-terminal phosphorylation: a defining layer of complex regulation. *Carcinogenesis*. 2012; 33: 1441–1449.
19. Natan E, Baloglu C, Pagel K i wsp. Interaction of the p53 DNA-binding domain with its N-terminal extension modulates the stability of the p53 tetramer. *J Mol Biol*. 2011; 409: 358–368.
20. Sullivan KD, Galbraith MD, Andrysiak Z i wsp. Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death Differ*. 2018; 25: 133–143.
21. Krois AS, Dyson HJ, Wright PE. Long-range regulation of p53 DNA binding by its intrinsically disordered N-terminal transactivation domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018; 115: E11302–E11310.

22. Varna M, Bousquet G, Plassa LF i wsp. TP53 status and response to treatment in breast cancers. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011: ID 284584.
23. Kumari R, Sen N, Das S. Tumour suppressor p53: understanding the molecular mechanisms inherent to cancer. *Current Science*. 2014; 107: 786–794.
24. Campbell HG, Mehta R, Neumann AA i wsp. Activation of p53 following ionizing radiation, but not other stressors, is dependent on the proline-rich domain (PRD). *Oncogene*. 2013; 32: 827–836.
25. Garcia PB, Attardi LD. Illuminating p53 function in cancer with genetically engineered mouse models. *Semin Cell Dev Biol*. 2014; 27: 74–85.
26. Lukman S, Lane DP, Verma CS. Mapping the structural and dynamical features of multiple p53 DNA binding domains: insights into loop 1 intrinsic dynamics. *PLoS One*. 2013; 8: e80221.
27. Laptenko O, Shiff I, Freed-Pastor W i wsp. The p53 C terminus controls site-specific DNA binding and promotes structural changes within the central DNA binding domain. *Mol Cell*. 2015; 57: 1034–1046.
28. Kearns S, Lurz R, Orlova EV i wsp. Two p53 tetramers bind one consensus DNA response element. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44: 6185–6199.
29. Joerger AC, Fersht AR. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem*. 2008; 77: 557–782.
30. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD i wsp. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*. 1994; 265: 346–355.
31. Fischer NW, Prodeus A, Malkin D i wsp. p53 oligomerization status modulates cell fate decisions between growth, arrest and apoptosis. *Cell Cycle*. 2016; 15: 3210–3219.
32. Itahana Y, Ke H, Zhang Y. p53 Oligomerization is essential for its C-terminal lysine acetylation. *J Biol Chem*. 2009; 284: 5158–5164.
33. Chillemi G, Kehrloesser S, Bernassola F i wsp. Structural evolution and dynamics of the p53 proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017; 7: a028308.
34. Iida S, Mashimo T, Kurosawa T i wsp. Variation of free-energy landscape of the p53 C-terminal domain induced by acetylation: Enhanced conformational sampling. *J Comput Chem*. 2016; 37: 2687–2700.
35. Haupt S, Vijayakumaran R, Miranda PJ i wsp. The role of MDM2 and MDM4 in breast cancer development and prevention. *J Mol Cell Biol*. 2017; 9: 53–61.
36. Korwek Z, Alster O. Rola szlaku indukowanego uszkodzeniami DNA w apoptozie i starzeniu komórkowym. *Postępy Biochemii*. 2014; 60: 248–262.
37. Enchev RI, Schulman BA, Peter M. Protein neddylation: beyond cullin-RING ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015; 16: 30–44.
38. Heering J, Jonker HR, Löhr F. Structural investigations of the p53/p73 homologs from the tunicate species *Ciona intestinalis* reveal the sequence requirements for the formation of a tetramerization domain. *Protein Sci*. 2016; 25: 410–422.
39. Lui K, Sheikh MS, Huang Y. Regulation of p53 oligomerization by Ras superfamily protein RBEL1A. *Genes Cancer*. 2015; 6: 307–316.
40. Marmorstein LY, Ouchi T, Aaronson SA. The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 13869–13874.
41. Fischer M, Steiner L, Engeland K. The transcription factor p53: not a repressor, solely an activator. *Cell Cycle*. 2014; 13: 3037–3058.
42. Beckerman R, Prives C. Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010; 2: a000935.
43. Engeland K. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. *Cell Death Differ*. 2018; 25: 114–132.
44. Baldassarre A, Masotti A. Long Non-Coding RNAs and p53 Regulation. *Int J Mol Sci*. 2012; 13: 16708–16717.
45. Franklin DA, He Y, Leslie PL i wsp. p53 coordinates DNA repair with nucleotide synthesis by suppressing PFKFB3 expression and promoting the pentose phosphate pathway. *Sci Rep*. 2016; 6: 38067.
46. Sun B, Ross SM, Rowley S i wsp. Contribution of ATM and ATR kinase pathways to p53-mediated response in etoposide and methyl methane-sulfonate induced DNA damage. *Environ Mol Mutagen*. 2017; 58: 72–83.
47. Awasthi P, Foiani M, Kumar A. ATM and ATR signaling at a glance. *J Cell Sci*. 2015; 128: 4255–4262.
48. Baran K, Yang M, Dillon CP i wsp. The proline rich domain of p53 is dispensable for MGMT-dependent DNA repair and cell survival following alkylation damage. *Cell Death Differ*. 2017; 24: 1925–1936.
49. Shamsara J, Sharif S, Afsharnejad S i wsp. Association Between MGMT Promoter Hypermethylation and p53 Mutation in Glioblastoma. *Cancer Invest*. 2009; 27: 825–829.
50. Blough MD, Zlatescu MC, Cairncross JG. O6-methylguanine-DNA methyltransferase regulation by p53 in astrocytic cells. *Cancer Res*. 2007; 67: 580–584.
51. Adimoolam S, Ford JM. p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)*. 2003; 2: 947–954.
52. Wang QE, Han C, Zhao R i wsp. p38 MAPK- and Akt-mediated p300 phosphorylation regulates its degradation to facilitate nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41: 1722–1733.
53. Rubbi CP, Milner J. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *EMBO J*. 2003; 22: 975–986.
54. Vélez-Cruz R, Johnson DG. E2F1 and p53 Transcription Factors as Accessory Factors for Nucleotide Excision Repair. *Int J Mol Sci*. 2012; 13: 13554–13568.
55. Adimoolam S, Ford JM. p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 12985–12990.
56. Luijsterburg MS, Lindh M, Acs K i wsp. DDB2 promotes chromatin decondensation at UV-induced DNA damage. *J Cell Biol*. 2012; 197: 267–281.
57. Tamura RE, de Vasconcellos JF, Sarkar D i wsp. GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Curr Mol Med*. 2012; 12: 634–651.
58. Hyun SY, Jang YJ. p53 activates G1 checkpoint following DNA damage by doxorubicin during transient mitotic arrest. *Oncotarget*. 2015; 6: 4804–4815.
59. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res*. 1995; 55: 5187–5190.
60. Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol*. 2003; 13: 65–70.
61. Abukhdeir AM, Park BH. p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med*. 2008; 10: e19.
62. Chen J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016; 6: a026104.
63. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9: 400–414.
64. Gao H, Jin S, Song Y i wsp. B23 regulates GADD45a nuclear translocation and contributes to GADD45a-induced cell cycle G2-M arrest. *J Biol Chem*. 2005; 280: 10988–10996.
65. Dobrzańska-Kaczanowska J, Piwońska D, Kaczanowski A. Rola polokinazy (y) w regulacji cyklu komórkowego – mechanizm translokacji i tworzenia kompleksów białkowych przez polokinazy. *Postępy Biochemii*. 2006; 52: 24–34.
66. Li Z, Liu JY, Zhang JT. 14-3-3 σ , the double-edged sword of human cancers. *Am J Transl Res*. 2009; 1: 326–340.
67. Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*. 2001; 20: 1803–1815.
68. Marchenko ND, Moll UM. Mitochondrial death functions of p53. *Mol Cell Oncol*. 2014; 1: e955995.
69. Lopez J, Tait SW. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer*. 2015; 112: 957–962.
70. Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ i wsp. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med*. 2010; 9: 145–152.
71. Sharp AN, Heazell AE, Crocker IP i wsp. Placental apoptosis in health and disease. *Am J Reprod Immunol*. 2010; 64: 159–169.
72. Maximov GK, Maximov KG. The role of p53 tumor-suppressor protein in apoptosis and cancerogenesis. *Biotechnol & Biotechnol Eq*. 2008; 22: 664–668.
73. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: a target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci*. 2018; 19: E448.
74. Goretsky T, Dirisina R, Sinh P i wsp. p53 Mediates TNF-induced epithelial cell apoptosis in IBD. *Am J Pathol*. 2012; 181: 1306–1315.
75. Attardi LD, Reczek EE, Cosmas C i wsp. PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes Dev*. 2000; 14: 704–718.
76. Ihrie RA, Reczek E, Horner JS i wsp. Perp is a mediator of p53-dependent apoptosis in diverse cell types. *Curr Biol*. 2003; 13: 1985–1990.
77. Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*. 2017; 36: 3943–3956.
78. Lin Y, Ma W, Benchimol S. Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nat Genet*. 2000; 26: 122–127.
79. Okamura S, Arakawa H, Tanaka T i wsp. p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis. *Mol Cell*. 2001; 8: 85–94.
80. Baptiste-Okoh N, Barsotti AM, Prives C. A role for caspase 2 and PIDD in the process of p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 1937–1942.
81. Ozaki T, Nakagawara A. p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011: 603925. <http://p53.iarc.fr/TP53SomaticMutations.aspx>
82. Yu L, Kim HT, Kasar S i wsp. Survival of Del17p CLL depends on genomic complexity and somatic mutation. *Clin Cancer Res*. 2017; 23: 735–745.

84. Stracquadanio G, Wang X, Wallace MD i wsp. The importance of p53 pathway genetics in inherited and somatic cancer genomes. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16: 251–265.
85. Robles AI, Harris CC. Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010; 2: a001016.
86. Giorgi C, Bonora M, Missiroli S. Alterations in Mitochondrial and endoplasmic reticulum signaling by p53 mutants. *Front Oncol*. 2016; 6: 42.
87. Muller PA, Vousden KH. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol*. 2013; 15: 2–8.
88. Kamada R, Toguchi Y, Nomura T. Tetramer formation of tumor suppressor protein p53: structure, function, and applications. *Biopolymers*. 2016; 106: 598–612.
89. http://p53.free.fr/p53_info/p53_Protein.html
90. Leroy B, Anderson M, Soussi T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Hum Mutat*. 2014; 35: 672–688.
91. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010; 2: a001008.
92. Kremenetskaya OS, Logacheva NP, Baryshnikov AY i wsp. Distinct effects of various p53 mutants on differentiation and viability of human K562 leukemia cells. *Oncol Res*. 1997; 9: 155–166.
93. Eldar A, Rozenberg H, Diskin-Posner Y i wsp. Structural studies of p53 inactivation by DNA-contact mutations and its rescue by suppressor mutations via alternative protein-DNA interactions. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41: 8748–8759.
94. Makarov EM, Shtam TA, Kovalev RA. The rare nonsense mutation in p53 triggers alternative splicing to produce a protein capable of inducing apoptosis. *PLoS One*. 2017; 12: e0185126.
95. Shajani-Yi Z, de Abreu FB, Peterson JD i wsp. Frequency of somatic TP53 mutations in combination with known pathogenic mutations in colon adenocarcinoma, non-small cell lung carcinoma, and gliomas as identified by next-generation sequencing. *Neoplasia*. 2018; 20: 256–262.
96. Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res*. 2000; 60: 6788–6793.
97. Wysocka-Dubielecka KM, Majewski S, Łoza K. Rola białek p63 w kancerogenezie oraz znaczenie ich ekspresji w diagnostyce nowotworów skóry i żeńskiego układu rozrodczego. *Przegl Dermatol*. 2015; 102: 550–557.
98. Costanzo A, Pediconi N, Narcisi A i wsp. TP63 and TP73 in cancer, an unresolved “family” puzzle of complexity, redundancy and hierarchy. *FEBS Lett*. 2014; 588: 2590–2599.
99. Kunst C, Haderer M, Heckel S i wsp. The p53 family in hepatocellular carcinoma. *Transl Cancer Res*. 2016; 5: 632–638.
100. Manzella L, Stella S, Pennisi MS i wsp. New insights in thyroid cancer and p53 family proteins. *Int J Mol Sci*. 2017; 18: E1325.
101. Candi E, Agostini M, Melino G i wsp. How the TP53 family proteins TP63 and TP73 contribute to tumorigenesis: regulators and effectors. *Hum Mutat*. 2014; 6: 702–714.
102. Muller PA, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell*. 2014; 25: 304–317.
103. Parrales A, Iwakuma T. Targeting Oncogenic mutant p53 for cancer therapy. *Front Oncol*. 2015; 5: 288.
104. Bykov VJN, Eriksson SE, Bianchi J i wsp. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2018; 18: 89–102.
105. Bressy C, Hastie E, Grzelishvili VZ. Combining oncolytic virotherapy with p53 tumor suppressor gene therapy. *Mol Ther Oncolytics*. 2017; 5: 20–40.
106. Zhang WW, Li L, Li D i wsp. The first approved gene therapy product for cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 years in the clinic. *Hum Gene Ther*. 2018; 29: 160–179.
107. Blandino G, Di Agostino S. New therapeutic strategies to treat human cancers expressing mutant p53 proteins. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018; 37: 30.