

[文章编号] 1000-4718(2000)01-0088-04

p73 基因研究进展

刘咏仪, 钟雪云

(暨南大学医学院病理学教研室, 广东 广州 510632)

Studying progression in gene p73

LIU Yong-yi, ZHONG Xue-yun

(Department of Pathology, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

【A Review】 p73, a first p53 relative, has recently been identified as a new structural and functional homologue of the transcription factor p53. However, it is unclear whether this protein functions as a tumor suppressor. p73L, a second human p53-related gene, which shows strong amino-acid similarity to p73. In this article, we shall discuss the cloning, location, expression and functions of these two new candidate tumor suppressor genes and look forward to the future study.

[主题词] 基因; 基因结构; 基因抑制; 肿瘤

[MeSH] Genes; Genes, structural; Genes, suppressor, tumor

[中图分类号] Q 786

[文献标识码] A

随着对肿瘤基因的深入研究,越来越多的抑癌基因被发现,人们对抑癌基因 p53 在肿瘤发生中的作用已进行了较为深入的研究。p53 基因的突变、失活及缺失与 50 % 的人类肿瘤发生有关。最近,又报告发现两个新的“p53 样”抑癌基因 - p73 与 p73L。p73 和 p73L 所克隆的基因编码的蛋白质,无论在结构上,还是在功能上均与 p53 蛋白相似,本文对此方面的研究进展做一综述。

一、p73:

(一) p73 基因的克隆、定位及表达: Kaghad 等^[1]在 1997 年利用对应于胰岛素信号中介体 (IRS-1) 结合区的简并寡聚核苷酸探针筛选 COS 细胞 cDNA 文库时,偶然发现一个假阳性克隆,其编码序列为 IRS-1 结合结构域无任何同源性,而与 p53 基因的结构具有同源性,将其命名为 p73 基因,用荧光原位杂交技术发现 p73 基因定位于 1p36.2-1p36.3。p73 基因由 13 个外显子及 12 个内含子组成。p73 基因表达产物 p73 蛋白在结构上与 p53 蛋白具同源性。p53 蛋白有 4 个主要的功能单元,即转录激活结构域 (N-terminal acidic transactivation domain, TAD)、DNA 结合结构域 (DNA-binding domain, DBD)、寡聚结构域 (C-terminal homooligomerization domain, OD) 及羧基端。p73 蛋

白与 p53 蛋白在 TAD 有 29 % 的氨基酸残基相同,在 DBD 有 63 % 的氨基酸残基相同,在 OD 有 38 % 的氨基酸残基相同。同时, Kaghad 等^[1]从人大肠癌组织 cDNA 文库中筛选出两种 cDNA,分别编码 p73 及 p73 蛋白。后来, De Laurenzi 等^[2]和 Ueda 等^[11]又分离出 p73、p73 以及 p73。它们都是 p73 基因的转录剪切变体。以全长形式表达的 p73 为,则是较短的 mRNA 变体,其外显子 13 被剪切掉,而则是外显子 11 被剪切掉。的外显子 11、12、13 均被剪切掉。p73 蛋白由 636 个氨基酸组成, p73 蛋白由 494 个氨基酸组成。通过 RT-PCR 方法,在脑、肾、胎盘、结肠、心、肝、脾及骨骼肌均可检测到 p73 及 p73 mRNA,说明 p73 及 p73 蛋白低水平表达的广泛性。而 p73 及 p73 在有外周血淋巴细胞、原始的角质细胞以及不同的肿瘤细胞株中检测到,包括:成神经细胞瘤、成胶质细胞瘤、黑色素瘤、肝细胞瘤和白血病。5 种 p73 基因转录剪切变体在同一种肿瘤的不同株的原始细胞及重建的细胞株中表达形式均不同。De Laurenzi 等^[2]双重杂交测定法 (two-hybrid assay) 检测 p73 变体间的同源二聚体及异源二聚体间的相互作用时发现 p73 及 p73 均不与 p53 作用,而 p73 与所有 p73 变体强烈反应。同时, p73 与 p73 和 p73 能有效地结合但与 p73 结合则较弱。

[收稿日期] 1999-08-25

[修回日期] 1999-10-29

但 Ueda 等^[11]对 p73 和 p73 测序后发现该两个 p73 变异体编码的 p73 蛋白具有远距离羧基端结构,其与 p73 和 p73 变异体不同,但所有 p73 变异体都能激活一致的 p53 结合序列上的启动子,仅程度不一而已,故他们认为 p73 分子的转录激活和调控功能受 p73 羧基端的选择性剪接影响。Kaghad 等^[1]亦指出:虽然 p73 与 p53 蛋白在 C-末端区域(364~393)没有发现明显的同源性,但人 p73 的 C-末端结构域与最近在无脊椎动物中发现的 p53 类似分子存在同源性,说明 p53 基因可能是从更原始的“p73 样(p73-like)”基因进化而来。酵母双杂交系统研究结果表明,与 p53 一样,p73 分子具有较强的同型相互作用,且 p73 与 p53 分子间也存在明显的异型相互作用。上述结果显示 p73 变异体之间以及与 p53 之间的反应能力不同水平的调节,具体机制尚待进一步研究证实。

Kaghad 等^[1]利用 RT-PCR 及 Northern 印迹技术观察 p73 基因在肿瘤细胞株的转录表达情况时,发现成神经细胞瘤细胞株 IMR-32、SK-N-BE(2)、SK-N-MC、SK-N-SH 及结肠癌细胞株 HT-29 的 p73mRNA 转录水平较高,而成神经细胞瘤细胞株 CHP-212、SMS-BC、SMS-KAN 及 SK-N-AS 的 p73 mRNA 转录水平极低;Western 印迹技术显示在蛋白表达水平上,仅 IMR-32、SH-N-SH 及 HT-29 细胞株 p73 蛋白表达水平较高。有趣的是虽然 SK-N-BE(2)及 SK-N-MC 细胞株的 p73mRNA 转录水平较高,但几乎检测不出 p73 蛋白的表达,通过对 RT-PCR 产物进行测序也未能发现在 p73 基因编码区存在任何突变,因此,Kaghad 推测 p73 基因的表达过程中可能存在后成调节(epigenetic regulation),如遗传印迹(imprinting)和/或翻译抑制现象。序列分析发现,成神经细胞瘤 p73 基因在外显子 2 的第 4 及 14 位存在等位多态性(G/A 及 C/T 取代)现象,取代位置恰好在 AUG(启动密码子)上游。理论上,这区域可形成茎环结构,在 p73 基因转录过程中起调控作用。在 8 株成神经细胞瘤细胞株中,仅 IMR-32、CHP-212 及 SK-N-SH 存在 A/T 等位基因拷贝。尤其值得注意的是 SH-N-SH 细胞株,其 p73 基因并不存在杂合性缺失(LOH),且同时具有 G/C 及 A/T 等位基因拷贝,但在转录水平仅发现 A/T 等位基因拷贝的表达。通过分析健康献血者外周血细胞 p73 基因的表达情况时,也发现 G/C、A/T 等位基因拷贝

不会同时表达。上述结果表明 p73 基因的表达是单等位基因的(monoallelic),这与传统的抑癌基因不同,因传统的抑癌基因需受 2 次打击后才会失活,而 p73 基因也许经遗传印迹早已使其中的一个等位基因拷贝沉寂,剩下的另一基因拷贝发生缺失则会导致 p73 蛋白的缺乏。正如实验结果所示,对于成神经细胞瘤而言,G/C 等位基因拷贝也许经遗传印迹早已失活,若 A/T 基因拷贝发生缺失的话,则无法表达 p73 蛋白。但 Mai 等^[3]研究肺癌 p73 基因的表达情况时,取正常肺组织与肿瘤组织作对照,p73 在肿瘤组织中有较高表达,在 21 例肺肿瘤及配对的正常肺组织间对外显子 2 的 C/T 等位多态性作等位基因特异性表达分析(allelic-specific expression analysis)发现 5 个杂合样本在肿瘤组织中的表达是双等位基因(biallelic),而在配对的正常肺组织中的表达则是单等位基因。再作单核苷酸引物扩增分析(single-nucleotide primer extension analysis)时也证实了上述结果。

(二)p73 蛋白的功能:在结构上,p73 蛋白与 p53 蛋白具有同源性,其功能是否也相似?已知 p53 蛋白通过激活 p21^{Waf}而抑制细胞分裂,p73 是否也具有此功能?Kaghad 等^[1]将 p73 cDNA 转入 SH-N-AS 细胞(此细胞不表达 p73 蛋白)后,在那些成功地表达野生型 p73 蛋白的细胞中,p21^{Waf}蛋白的表达水平显著增高;集落形成试验也发现成功地表达野生型 p73 蛋白的细胞未能形成集落。由此可以认为结合及转录激活一些 p53 靶基因是 p73 分子的保守特性,同时也说明 p73 蛋白通过 p53 同样的途径抑制细胞生长。根据 De Laurenzi 等^[2]的研究显示:p73 在激活 p21^{Waf}启动子的转录作用比 p53 或 p73 显著低,而 p73 和 p73 的作用则处于 p73 与 p73 之间。p73 变异体在不表达 p53 的骨肉瘤 SAOS-2 细胞株中抑制细胞生长的能力与其对 p21^{Waf}启动子的转录激活能力相应。即 p73 阻止集落形成的能力最强,而 p73 最弱。Jost 等^[4]将 p73 基因转入 SAOS-2 细胞(p53 基因位点存在纯合性缺失),可诱导 SAOS-2 细胞凋亡,说明 p73 蛋白至少在过度表达的情况下可诱导细胞凋亡。以上均说明 p73 与 p53 蛋白具有一些相似的功能。尽管诱导 p73 蛋白的因素及信号仍不清楚,但肯定有别于诱导 p53 蛋白表达的因素。Kessis 等^[5]和 Caelles 等^[6]将 IMR-32 细胞用 1 nmol/L 的放线菌素 D 处理 24 h,p52 和 p21^{Waf}蛋白水平显著提高,而

p73 蛋白浓度无显著变化。为了评估 DNA 损害对 p73 水平的进一步影响,将 IMR - 32 细胞暴露于 254 nm 紫外线中 15 小时,p53 和 p21 蛋白浓度上升,p73 蛋白水平却没有变化,表明 p73 与 p53 虽然结构相似,并均可激活 p21^{Waf},但在信号激活途径方面存在明显差异。p73 与 p53 分子在细胞中可能还有着其它不同的功能。此外,是否像 c - myc 家族一样能形成 p53 - p73 异源二聚体或者与其它“p53 样”分子形成异源二聚体而产生新的功能? De Laurenzi 等^[2]的研究就显示 p73 的四种变异体之间可能通过影响异源二聚体的形成来调节 p73 的转录和生长抑制活动。根据目前的研究发现大多数成神经细胞瘤中的 p53 蛋白常是野生型的,但未能起到抑癌的作用,故对细胞内 p53 与 p73 蛋白或 p73 变异体之间以及 p73 与其它“p53 样”蛋白之间的相互作用的认识将对研究成神经细胞瘤很有帮助。正如 Kaghad 等^[1]指出,染色体 1p36 是成神经细胞瘤和其它肿瘤经常检测到缺失的区域,故认为该区可能还包括更多的未知的抑癌基因。但他们在做成神经细胞瘤株 1 号染色体短臂和 p73 杂合性缺失 (LOH) 的分析时,在 p73 等位基因的其余区域找不到编码序列的缺失。然而,这就可能证明 p73 是单等位基因表达的,同时支持 p73 为神经母细胞瘤的候选基因的观点。由于 p53 具有激活 p53 靶基因以及跟 p53 反应的潜能,故 Kaghad 推测 p73 的失调可有与肿瘤形成有关,也可能是“p53 样”蛋白操控着肿瘤发生发展以及细胞周期调控的整个网络。

二、p73L:

p73L 是最近发现的第二个“p53 样”蛋白与 p73 和 p53 具高度同源性。Senoo 等^[7]于 1998 年成功地将其克隆并用原位杂交技术将其定位于 3q27 - 28。p73L 编码一个由 586 个氨基酸组成的蛋白质,其 DNA 结合区 (DBD) 与 p53 (60.6%) 和 p73 (87.8%) 有高度的相似性。Northern 印迹分析显示 p73L 的表达型 (expression profiles) 和 p73 mRNAs 在一些组织中是不同的,提示 p73 和 p73L 可能在不同的组织中有各自不同的作用。虽然 p73L 有高度的 p73 氨基酸相似性,但其具体的功能至今尚未阐明,Senoo 等^[7]认为 p73L 与成神经细胞瘤的分子发病机理有关,但是否跟 p53 一样能调控细胞分裂和凋亡就不能确定,尚有待进一步研究。

三、展望:

综上所述,p53 与 p73 以及 p73L 无论在结构上,还是功能上均具有相似性。p73 分子也能抑制细胞分裂与促进凋亡。目前的研究均将 p73 与 p53 联系在一起,以了解 p73 与 p53 之间的相互作用,例如:p53 与 p73 之间是否形成异源二聚体而参与整个“p53 样”家族的各个操控肿瘤发生发展的环节?但同时我们应清楚地认识到 p73 可能具有其他别于 p53 的功能。正常组织 p73 蛋白的表达水平均较低,而大多数非成神经细胞瘤的癌细胞株的 p73 蛋白表达水平较高,究竟是为补偿 p53 蛋白的功能,还是 p73 突变后具有促进细胞增殖的活性?但至今,尚未有发现 p73 突变的确切报道。Paul 等^[12]分离了包含 p73 1 号外显子和 5' 区域的人细菌人工染色体克隆来研究 p73 5' CpG 岛的甲基化情况。发现在正常组织中无 p73 1 号外显子甲基化的证据。相反,在近 30% 的原发急性成淋巴细胞性白血病 (ALLs) 和 Burkitt's 淋巴瘤中却异常地出现甲基化,但在其它类型的恶性造血肿瘤或实体瘤中则没有检测到甲基化现象,而白血病细胞株和原发性 ALLs 中的甲基化经 RT - PCR 证实与 p73 转录缺失有关。再用单链构象多态性检测技术 (single - strand conformational polymorphisms) 检测一系列原发性 ALLs 的点突变时,就没有发现可致蛋白质结构改变的突变。上述结果显示 p73 的甲基化在一些特定类型的恶性造血肿瘤中经常出现,故他们认为 p73 后承表达的沉寂 (epigenetic silencing) 在细胞周期调控中起着重要的作用。此外,在生理条件下 p73 蛋白的功能也不十分清楚。Martin 等^[8]研究病毒肿瘤蛋白在 p53 与 p73 之间的区别时指出这两种蛋白在生理条件下的功能是不同的,并且他们还认为转化可能不需要 p73 的灭活。

虽然 p73L 是否有 p53 或 p73 同样的功能尚不能确定,但其结构与 p73 与 p53 有高度的相似性,故 Senoo 等^[7]将之列于“p53 样”蛋白。p73L 在各种组织以及肿瘤细胞株中的表达情况,诱导因素和信号以及功能的研究可能成为日后研究的热点。根据最近的研究,Yang 等^[9]与 Osada 等^[10]分别宣布克隆出新的“p53 样”分子 p63 与 p51,而有关的研究仍在进行中。通过以上研究,也许会对肿瘤生物学有新的认识,并对肿瘤基因治疗提供新的思路。

(下转第 93 页)

(上接第 90 页)

参 考 文 献

- [1] Kaghad M, Bonnet H, Yang A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers [J]. *Cell*, 1997, 90(4):809 ~ 819.
- [2] De Laurenzi V, Costanzo A, Barcaroli D, et al. Two New p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity [J]. *J Exp Med*, 1998, 188(9): 1763 ~ 1768.
- [3] Mai M, Yokomizo A, Qian C, et al. Activation of p73 silent allele in lung cancer [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(11):2347 ~ 2349.
- [4] Jost CA, Martin MC, Kaelin WG, et al. p73 is a human p53 - related protein that can induce apoptosis [J]. *Nature*, 1997, 389(6447):191 ~ 194.
- [5] Kessis TD, Slebos RJ, Nelson WG, et al. Human papilloma virus 16E6 expression disrupts the p53 - mediated cellular response to DNA damage [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90:3988 ~ 3992.
- [6] Caelles C, Helmlberg A, Karin M. p - 53 dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53 - target genes[J]. *Nature*, 1994, 370:220 ~ 223.
- [7] Senoo M, Seki N, Ohire M, et al. A second p53 - related protein p73L, with high homology to p73[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 248(3):603 ~ 607.
- [8] Martin MC, Jost CA, Irwin MS, et al. Viral oncoproteins discriminate between p53 and the p53 homolog p73[J]. *Mol Cell Biol*, 1998, 18(11):6316 ~ 6324.
- [9] Yang A, Kaghad M, Wang Y, et al. p63, a p53 homolog at 3q27 - 29 encodes multiple products with transactivating, death - inducing and dominant - negative activities[J]. *Mol Cell*, 1998, 2(3):305 ~ 316.
- [10] Osada M, Ohba M, Kawahara C, et al. Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53[J]. *Nat Med*, 1998, 4(7):839.
- [11] Ueda Y, Hijikata M, Takagi S, et al. New p73 variants with altered C - terminal structures have varied transcriptional activities[J]. *Oncogene*, 1999, 18(35):4993.
- [12] Paul G, Corn, Steven J, et al. Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation [J]. *Cancer Res*, 1999(59):3352.