

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.03.007

Polo 样激酶 3 针对 P73 蛋白的磷酸化位点分析

桑梅香¹, 刘丽华², 丁春艳², 孟君², 单保恩^{1,2} (1. 河北医科大学第四医院肿瘤研究所免疫室, 河北石家庄 050011; 2. 河北医科大学第四医院科研中心, 河北石家庄 050011)

[摘要] 目的: 探讨 P73 蛋白上存在的能够被 polo 样激酶 3 (polo-like kinases 3, Plk3) 磷酸化的结构域或位点, 并分析 Plk3 对 P73 介导肿瘤细胞凋亡的影响。方法: 免疫共沉淀法检测 COS-7 细胞中 Plk3 与 P73 蛋白之间的相互作用, 荧光免疫染色法检测 Plk3 与 P73 蛋白在细胞中的定位。制备不同的 P73 缺失突变体 GST 融合蛋白, 体外点突变法构建 GST-P73(1~130) 点突变的 P73(T86A) (第 86 位苏氨酸点突变为丙氨酸) 质粒, 体外磷酸化实验分析 P73 中被 Plk3 磷酸化的结构域或位点。通过检测 PARP 蛋白的裂解分析 Plk3 对 P73 介导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的影响。结果: Plk3 与 P73 蛋白之间存在相互作用, Plk3 与 P73 蛋白共定位于 COS-7 细胞核中。制备获得不同的 P73 缺失突变体 GST 融合蛋白, Plk3 在 P73 蛋白 N 端第 63~113 位氨基酸残基之间磷酸化 P73 蛋白。GST-P73(1~130) 融合蛋白第 86 位苏氨酸点突变为丙氨酸(T86A) 之后, 不影响 GST-P73(1~130) 蛋白的磷酸化状态。Plk3 可抑制 P73 介导的 HeLa 细胞凋亡。结论: Plk3 通过与 P73 蛋白结合, 诱导 P73 蛋白 N 端第 63~113 位氨基酸磷酸化, 但第 86 位苏氨酸并非 Plk3 的特异作用位点; 此外 Plk3 抑制 P73 介导的 HeLa 细胞凋亡。

[关键词] polo 样激酶 3 (Plk3); P73; 磷酸化; 位点; 凋亡; 宫颈癌细胞

[中图分类号] R730.2; Q573

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)03-0280-05

Analysis of phosphorylated sites of P73 protein by polo-like kinases 3

SANG Mei-xiang¹, LIU Li-hua², DING Chun-yan², MENG Jun², SHAN Bao-en^{1,2} (1. Department of Immunology, Tumor Research Institute, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Research Center, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the structural domains and sites of P73 which can be phosphorylated by polo-like kinases 3 (Plk3), and to analyze the effect of Plk3 on P73-mediated apoptosis. **Methods:** Co-immunoprecipitation experiment was used to examine the interaction between Plk3 and P73. Immunofluorescence was used to examine the localization of Plk3 and P73 in cells. Different deletion mutants of GST-P73 fusion protein were prepared. A site-mutation plasmid of GST-P73 (1-130) was constructed by converting threonine86 to alanine86 (T86A) and was named GST-P73 (1-130) (T86A). The phosphorylated domains and sites of P73 by Plk3 were determined by *in vitro* phosphorylation assay. The effect of Plk3 on P73-mediated apoptosis of HeLa cells was examined by cleaved PARP detection. **Results:** Plk3 could interact with P73; Plk3 and P73 co-located in the cell nuclei. Different deletion mutants of GST-P73 fusion protein were successfully prepared, and Plk3 phosphorylated P73 at N-terminal 63-113 amino residues. Point mutation (T86A) of GST-P73 (1-130) fusion protein could not influence the phosphorylation status of P73 by Plk3. Furthermore, Plk3 inhibited P73-mediated apoptosis in HeLa cells. **Conclusion:** Plk3 can interact with and phosphorylate P73 at N-terminal 63-113 amino residues (but not at the 86 threonine), thereby inhibiting P73-mediated apoptosis of HeLa cells.

[Key words] polo-like kinases 3 (Plk3); P73; phosphorylation; site; apoptosis; cervical cancer cell

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(3): 280-284]

Polo 样激酶 (polo-like kinases, Plks) 家族首先在酵母中被发现^[1], 后来在果蝇^[2]、线虫^[3]、蟾蜍^[4]、鼠^[5-6]及人类^[7-10]中也陆续被发现, 属于丝/苏氨酸蛋白激酶家族。目前人类和其他哺乳动物的 Plks 包括 4 个成员, 即 Plk1、Plk2、Plk3 和 Plk4。这些家族成员在结构和功能上呈高度保守性, 其 C 端存在

[基金项目] 河北省卫生厅科研基金资助项目 (No. 20090155)。Project supported by the Scientific Research Foundation of Health Department of Hebei Province (No. 20090155)

[作者简介] 桑梅香 (1979 -), 女, 河北省衡水市人, 博士, 助理研究员, 主要从事肿瘤基础研究。E-mail: mxsang@hotmail.com

[通信作者] 单保恩 (SHAN Bao-en, corresponding author), E-mail: baoshan@yahoo.com.cn

两个单独的丝/苏氨酸蛋白结合结构域(polo-box domain, PBD), N端存在1个能够使底物磷酸化的丝/苏氨酸激酶催化结构域。因此, Plks能够与多种蛋白直接结合并使这些蛋白发生磷酸化, 从而进一步发挥相关的生物学效应。在Plks家族中, Plk1和Plk3与肿瘤的关系非常密切^[11]。Xie等^[12]研究表明, DNA损伤之后活化的Plk3可以磷酸化P53蛋白的第20位丝氨酸残基, 正向调节P53的功能。P73是P53家族中的一个新成员, 具有与P53蛋白相似的功能。在P53依赖性的细胞凋亡途径中, 至少需要一个P53家族中的其他成员—P63或P73, 来协助完成其凋亡诱导功能。本课题研究蛋白激酶Plk3针对P73蛋白的磷酸化结构域或位点, 并分析了Plk3对P73蛋白介导肿瘤细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Lipofectamine 2000转染试剂购自Invitrogen公司, GST琼脂糖珠、ECL显影液购自Amersham Biosciences公司。鼠抗人P73单抗购自Neomarker公司, 鼠抗人Plk3单抗购自BD公司, 兔抗人 β -actin单抗、鼠抗人FLAG(M2)单克隆抗体购自Sigma公司, Plk3激酶、HRP标记的抗鼠和抗兔二抗、兔抗人PARP多抗、兔抗人HA单抗以及FITC标记的抗鼠二抗和罗丹明标记的抗兔二抗购自Cell Signaling公司。体外点突变试剂盒购自Stratagene公司, TUNEL染色试剂盒购自Roche公司。本研究中所用pcDNA3、HA-pcDNA3-p73、FLAG-pcDNA3-Plk3质粒以及P73结构域缺失突变体质粒GST-P73 α (1~62)、GST-P73 α (1~130)、GST-P73 α (114~328)、GST-P73 α (311~483)和GST-P73 α (469~636)均由日本千叶县癌症中心中川原教授惠赠。

1.2 细胞培养和基因转染

非洲绿猴肾细胞系COS-7(由日本千叶县癌症中心中川原教授惠赠)和人宫颈癌HeLa细胞系用含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素和8% NaHCO₃的DMEM培养基, 置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养。细胞用0.05%胰蛋白酶消化传代。取对数生长期的细胞, 利用lipofectamine 2000转染试剂, 按照试剂盒提供的实验方法进行转染, 细胞转染48 h后进行后续实验。

1.3 免疫共沉淀检测P73与Plk3的结合

当COS-7细胞生长至60%融合时, 共转染1 μ g HA-pcDNA3-p73和1 μ g FLAG-pcDNA3-Plk3载体, 48 h后细胞用PBS洗2次。离心后加入细胞

裂解液A充分裂解, 4 $^{\circ}$ C、3 500 \times g离心10 min, 收集上清液。蛋白定量后, 取含1 mg蛋白的裂解液加入30 μ l 50% GST琼脂糖珠, 4 $^{\circ}$ C缓慢转动1 h, 离心取上清; 加入2 μ g鼠抗人P73单抗, 4 $^{\circ}$ C缓慢转动2 h, 再加入GST琼脂糖珠30 μ l, 4 $^{\circ}$ C缓慢转动1 h, 离心弃上清。GST琼脂糖珠结合蛋白用裂解液A洗3次, 加入30 μ l 2 \times SDS上样液, 行10% SDS-PAGE, 然后将蛋白转移至PVDF膜上, 5%脱脂牛奶4 $^{\circ}$ C封闭过夜, 加入鼠抗人Plk3单抗室温孵育1 h, 洗膜3次后加入1:3 000 HRP标记的抗鼠二抗, 室温孵育1 h, 洗膜3次。ECL系统显影检测Plk3蛋白条带。同样方法检测P73蛋白条带。

1.4 免疫荧光染色检测Plk3与P73蛋白的定位

COS-7细胞接种在底部铺有盖玻片的6孔板中, 生长至60%融合时共转染0.5 μ g HA-pcDNA3-p73和0.5 μ g FLAG-pcDNA3-Plk3, 48 h后细胞用甲醛溶液室温下固定30 min。0.2% Triton X-100室温下孵育5 min后, 3%牛血清白蛋白室温下封闭30 min, 然后加入抗兔抗人HA单抗和鼠抗人FLAG单抗, 孵育1 h。加入FITC标记的抗鼠二抗和罗丹明标记的抗兔二抗, 室温下孵育1 h, 1 \times PBS洗2次, 加入DAPI染液对细胞核进行染色。激光共聚焦显微镜下观察Plk3与P73蛋白在细胞中的定位。

1.5 P73缺失突变体GST融合蛋白的制备

将P73结构域缺失突变体GST-P73 α (1~62)、GST-P73 α (1~130)、GST-P73 α (114~328)、GST-P73 α (311~483)和GST-P73 α (469~636)转化入感受态大肠杆菌DH5 α 中, LB琼脂培养板上37 $^{\circ}$ C孵育过夜。挑选单克隆扩大培养, 然后加入20 μ l IPTG(1 mol/L), 37 $^{\circ}$ C继续培养3 h。250 \times g离心10 min, 弃上清, 细菌沉淀中加入1 ml裂解液, 超声波裂解30 s, 150 \times g、4 $^{\circ}$ C离心10 min。取上清液, 加入GST琼脂糖珠30 μ l, 4 $^{\circ}$ C缓慢转动1 h, 150 \times g 4 $^{\circ}$ C离心10 min, 洗涤3次。加入2 \times SDS上样液30 μ l, 然后行10% SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色15 min, 脱色干胶后, 观察蛋白条带。

1.6 P73体外磷酸化的检测

将1.5中制备的GST琼脂糖珠结合蛋白用1 ml 1 \times 激酶缓冲液洗3次, 取10 μ l, 加入1 μ l纯化的活化Plk3激酶和1 \times 激酶缓冲液稀释的ATP(50 μ mol/L)90 μ l, 于96孔板中30 $^{\circ}$ C孵育30 min, 1 ml 1 \times 激酶缓冲液洗5次, 加入100 μ l抗磷酸化苏氨酸多抗, 室温孵育30 min, 1 ml 1 \times 激酶缓冲液洗5次, 加入100 μ l HRP标记二抗, 室温孵育30 min, 用

1 ml 1 × 激酶缓冲液洗 5 次, 加入 100 μl 底物反应液, 室温孵育 5 min, 加入 100 μl 终止液, 450 nm 处测量光密度值。

1.7 GST-P73(1-130)点突变体 T86A 的构建

以 GST-P73(1~130)为模板, 使用高保真酶进行 PCR 扩增, 引物序列如下: P73(T86A)F 为 5'-TCGGCCAGCCCCTACGCCCCAGAGCACGCCGCC-3', P73(T86A)R 为 5'-GGCGGCGTGTCTCTGGGGCG-TAGGGGCTGGCCGA-3'。将 PCR 产物转化入试剂盒提供的 XL1-Blue 超感受态细胞中, LB 琼脂培养板上 37 °C 培养过夜, 挑选单克隆细菌培养并提取质粒, 酶切鉴定及测序。

1.8 Western blotting 检测 PARP 蛋白的裂解

宫颈癌 HeLa 细胞接种在 6 cm 培养皿中, 细胞生长融汇至 60% 时进行转染: 第 1 组转染 0.5 μg pcDNA3, 第 2 组转染 0.5 μg HA-pcDNA3-p73, 第 3 组转染 0.5 μg HA-pcDNA3-p73 和 0.5 μg FLAG-pcDNA3-Plk3。转染 28 h 后, 用 10 μmol/L 顺铂处理细胞 24 h, 然后用 PBS 洗涤 2 次, 500 × g 离心 3 min, 弃上清, 收集细胞, 加入上样缓冲液 300 μl, 冰上放置 30 min, 超声裂解并蛋白定量。然后行 15% SDS-PAGE, 转移蛋白质到 PVDF 膜上后, 5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜, 加入 1:1 000 稀释的兔抗人 PARP 一抗, 室温孵育 1 h, 洗膜 3 次, 加入 1:3 000 稀释的 HRP 标记的抗兔二抗, 室温孵育 1 h, 洗膜 3 次, ECL 系统显影。

1.9 统计学处理

所有实验均重复 3 次。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS11.5 软件进行统计学分析, 均数之间的比较用两样本的 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Plk3 与 P73 蛋白之间存在相互作用

免疫共沉淀结果(图 1)显示, 在 COS-7 细胞中共转染 HA-pcDNA3-p73 和 FLAG-pcDNA3-Plk3 之后, Plk3 的免疫复合物中包含了 P73 蛋白, P73 的免疫复合物中也包含了 Plk3, 提示 Plk3 和 P73 蛋白之间存在相互作用。

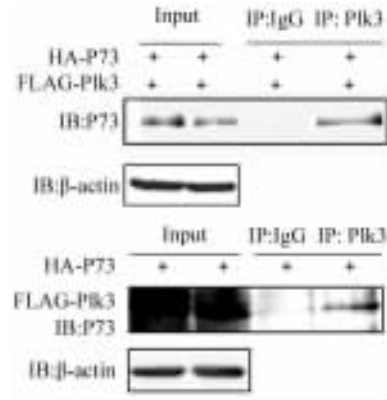


图 1 Plk3 与 P73 蛋白之间的相互作用

Fig. 1 Interaction between Plk3 and P73 protein

IP: Immunoprecipitation; IB: Immunoblotting

2.2 Plk3 与 P73 蛋白共定位在细胞核中

免疫荧光染色结果(图 2)显示, 在 COS-7 细胞中共转染 HA-pcDNA3-p73 和 FLAG-pcDNA3-Plk3, P73 蛋白主要表达于细胞核; Plk3 部分表达于细胞质, 部分则表达于细胞核; P73 和 Plk3 在细胞核中有共定位。因此, Plk3 可以在细胞核中与 P73 发生蛋白相互作用。

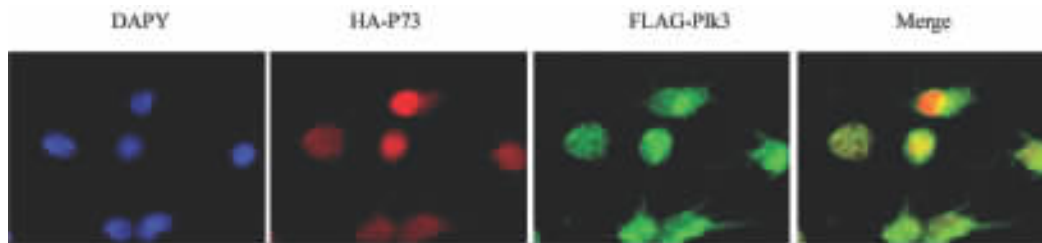


图 2 Plk3 与 P73 蛋白在 COS-7 细胞中的定位(×400)

Fig. 2 Localization of Plk3 and P73 protein in COS-7 cells (×400)

2.3 Plk3 磷酸化 P73 蛋白 N 端第 63-113 之间的丝/苏氨酸残基

由 5 个带 GST 标签的 P73 结构域缺失突变体质粒 GST-P73α(1~62)、GST-P73α(1~130)、GST-P73α(114~328)、GST-P73α(311~483)和 GST-

P73α(469~636)制备了 GST-P73 突变体融合蛋白(图 3)。体外磷酸化实验(表 1)发现, 在 GST-P73 突变体融合蛋白中加入纯化的活化 Plk3 蛋白激酶, GST-P73α(1~130)组的光密度值明显大于其他组的光密度值(均 *P* < 0.05), 提示 Plk3 在第 63 至 113

位氨基酸残基的位置上磷酸化 P73 蛋白。

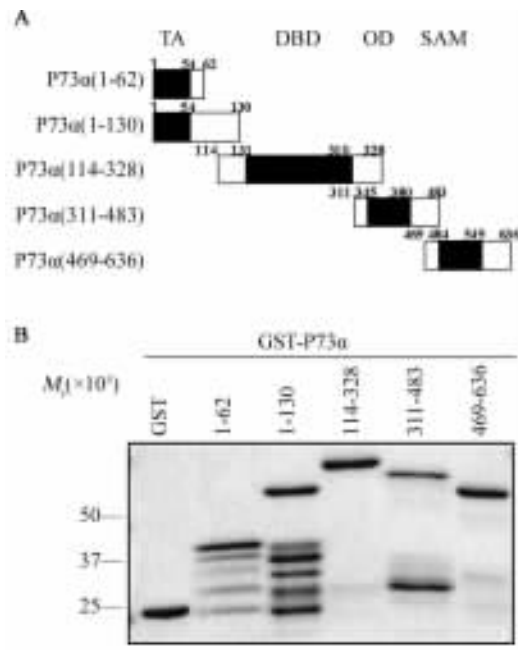


图 3 Plk3 在第 63 至 113 位氨基酸残基的位置上磷酸化 P73 蛋白

Fig. 3 Plk3 phosphoralated P73 at 63-113 amino residues

A: P73 deletion mutants; B: P73 fusion proteins. TA: Transactivation domain, DBD: DNA-binding domain; OD: Oligomerization domain, SAM: Sterile alpha motif domain

表 1 Plk3 在第 63 至 113 位氨基酸残基的位置上磷酸化 P73 蛋白

Tab. 1 Plk3 phosphoralated P73 at 63-113 amino residues

Group	Phosphoralated P73 (D ₅₇₀)
Control	0.010 ± 0.000
GST	0.023 ± 0.002
GST-P73α(1-62)	0.019 ± 0.001
GST-P73α(1-130)	0.320 ± 0.002*
GST-P73α(114-328)	0.018 ± 0.001
GST-P73α(311-483)	0.022 ± 0.002
GST-P73α(469-636)	0.020 ± 0.001

* P < 0.05 vs other groups

2.4 Plk3 对 86 位苏氨酸突变后 P73 蛋白的磷酸化

将 GST-P73α(1 ~ 130) 表达质粒第 86 位苏氨酸点突变为丙氨酸(T86A), 然后用体外磷酸化实验检测 Plk3 对 P73 (T86A) 的磷酸化。结果如表 2 所示, GST-P73α(1 ~ 130) 组的光密度值仍明显大于其他组的光密度值(均 P < 0.05), 提示第 86 位苏氨酸点突变为丙氨酸并没有改变

P73 的磷酸化状态, 说明 P73 第 86 位苏氨酸残基不是 Plk3 的磷酸化位点。

表 2 Plk3 磷酸化 P73α(T86A)

Tab. 2 Plk3 phosphoralated P73α(T86A)

Group	Phosphoralated P73 (D ₄₅₀)
Control	0.010 ± 0.000
GST	0.013 ± 0.001
GST-P73α(1-62)	0.010 ± 0.001
GST-P73α(1-130) (T86A)	0.222 ± 0.002*
GST-P73α(114-328)	0.020 ± 0.001
GST-P73α(311-483)	0.021 ± 0.001
GST-P73α(469-636)	0.020 ± 0.001

* P < 0.05 vs other groups

2.5 Plk3 抑制 P73 蛋白诱导的 PARP 蛋白裂解

如图 4 所示, 转染 P73 表达质粒并用顺铂处理 HeLa 细胞之后, PARP 蛋白的裂解明显高于对照组。而共转染 P73 与 Plk3 表达质粒之后, PARP 蛋白的裂解与单独转染 P73 质粒组相比明显下降, 提示 Plk3 抑制了 P73 介导的 HeLa 细胞凋亡。

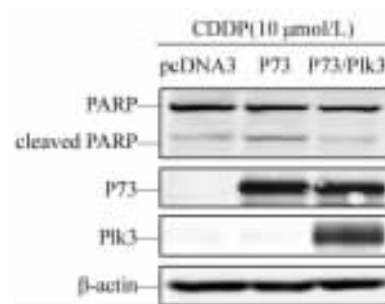


图 4 Plk3 抑制 P73 介导的 PARP 蛋白裂解

Fig. 4 Plk3 inhibited P73-mediated cleavage of PARP

3 讨论

野生型 P53 蛋白在维持细胞生长及抑制肿瘤细胞增殖中起着重要作用^[13]。P53 基因监控着细胞 DNA 的完整性, 一旦细胞 DNA 遭到损伤, P53 蛋白即与 DNA 相应部位结合, 发挥转录因子的作用, 活化 P21 基因的转录, 使细胞停滞于 G₁ 期^[14]。若 DNA 修复失败, P53 蛋白即启动程序性细胞死亡, 防止细胞恶变。

P73 基因是 Kaghad 等^[15]在 1997 年发现的 P53 家族中的一个新基因, 其存在着一些与 P53 基因相似的功能。研究^[16]表明, 在 P53 依赖的细胞凋亡途

径中,至少需要一个 P53 家族中的其他成员—P63 或 P73,来协助完成其诱导细胞凋亡的功能。

Koida 等^[17]的研究表明,Plk1 可以直接结合 P53 和 P73,并磷酸化 P53 和 P73,从而负向调节 p53 和 P73 的功能。Xie 等^[12]研究表明,DNA 损伤之后活化的 Plk3 可以磷酸化 P53 蛋白的第 20 位丝氨酸残基,从而正向调节 P53 的功能,引起细胞周期阻滞和细胞凋亡;而激酶活性缺失的 Plk3(K52R)不能磷酸化 P53 及调节 P53 功能。

蛋白激酶 Plk3 针对 P73 蛋白的磷酸化位点以及对 P73 的调节作用还不清楚。本研究发现,Plk3 与 P73 共定位于细胞核中,且 Plk3 与 P73 之间存在蛋白相互作用。Plk3 可磷酸化 GST-P73 α (1 ~ 130),但不磷酸化其他的 GST-P73 α 突变体,提示 P73 蛋白的第 63 位至第 113 位氨基酸残基之间的丝/苏氨酸残基可以被 Plk3 磷酸化。在 P73 蛋白的第 63 位至第 113 位氨基酸残基之间存在着 11 个丝氨酸残基和 5 个苏氨酸残基。本研究中将 P73 蛋白的第 86 位苏氨酸点突变为丙氨酸(T86A)之后,发现其仍能被 Plk3 磷酸化,表明 P73 蛋白的第 86 位氨基酸残基不是被 Plk3 磷酸化的特异性位点。因此 P73 蛋白中被 Plk3 磷酸化的特异性氨基酸残基还需要通过进一步的实验来确定。

此外,本研究还检测了 Plk3 对 P73 介导的人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的影响,研究结果显示,Plk3 抑制了 P73 介导的细胞凋亡。那么,为何 Plk3 正向调节 P53 的功能,但却抑制与 P53 功能相似的 P73 介导凋亡的能力,其具体的分子机制尚不清楚。Toh 等^[18]发现,c-Jun 对 P53 和 P73 的调节效应不同,抑制 P53 却激活 P73,这一点与本研究中 Plk3 的作用相似。因此,Plk3 抑制 P73 介导细胞凋亡的分子机制还需进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Kitada K, Johnson AL, Johnston LH, Sugino A. A multicopy suppressor gene of the saccharomyces cerevisiae G₁ cell cycle mutant gene DBF4 encodes a protein kinase and is identified as CDC5 [J]. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(7): 4445-4457.
- [2] Ouyang B, Wang Y, Dai W. Caenorhabditis elegans contains structural homologs of human Prk and Plk [J]. *DNA Sequence*, 1999, 10(2): 109-113.
- [3] Fenton B, Glover DM. A conserved mitotic kinase active at late anaphase-telophase in syncytial drosophila embryos [J]. *Nature*, 1993, 363(6430): 637-640.
- [4] Kumagai A, Dunphy WG. Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from xenopus egg extracts [J]. *Science*, 1996, 273(5280): 1377-1380.
- [5] Donohue PJ, Alberts GF, Guo Y, Winkles JA. Identification by targeted differential display of an immediate early gene encoding a putative serine/threonine kinase [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(17): 10351-10357.
- [6] Simmons DL, Neel BG, Stevens R, Evett G, Erikson RL. Identification of an early-growth-response gene encoding a novel putative protein kinase [J]. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(9): 4164-4169.
- [7] Wang L, Dai W, Lu L. Stress-induced c-Jun activation mediated by polo-like kinase 3 in corneal epithelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(44): 32121-32127.
- [8] Yang Y, Bai J, Shen R, Brown SA, Komissarova E, Huang Y, et al. Polo-like kinase 3 functions as a tumor suppressor and is a negative regulator of hypoxia-inducible factor-1 alpha under hypoxic conditions [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(11): 4077-4085.
- [9] Iida M, Sasaki T, Komatani H. Overexpression of Plk3 causes morphological change and cell growth suppression in Ras pathway-activated cells [J]. *J Biol Chem*, 2009, 146(4): 501-507.
- [10] Pellegrino R, Calvisi DF, Ladu S, Ehemann V, Staniscia T, Evert M, et al. Oncogenic and tumor suppressive roles of polo-like kinases in human hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2010, 51(3): 857-868.
- [11] Takai N, Hamanaka R, Yoshimatsu J, Miyakawa I. Polo-like kinases (Plks) and cancer [J]. *Oncogene*, 2005, 24(2): 287-291.
- [12] Xie S, Wu H, Wang Q, Cogswell JP, Husain I, Conn C, et al. Plk3 functionally links DNA damage to cell cycle arrest and apoptosis at least in part via the p53 pathway [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(46): 43305-43312.
- [13] Nakanishi M, Ozaki T, Yamamoto H, Hanamoto T, Kikuchi H, Furuya K, et al. NFB1/MDC1 associates with p53 and regulates its function at the crossroad between cell survival and death in response to DNA damage [J]. *J Boil Chem*, 2007, 282(31): 22993-23004.
- [14] Irwin MS, Kaelin WG. P53 family update: P73 and P63 develop their own identities [J]. *Cell Growth Differ*, 2001, 12(7): 337-349.
- [15] Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers [J]. *Cell*, 1997, 90(4): 809-819.
- [16] Zawacka-Pankau J, Kostecka A, Sznarkowska A, Hedström E, Kawiak A. P73 tumor suppressor protein: A close relative of p53 not only in structure but also in anti-cancer approach [J]? *Cell Cycle*, 2010, 9(4): 720-728.
- [17] Koida N, Ozaki T, Yamamoto H, Ono S, Koda T, Ando K, et al. Inhibitory role of Plk1 in the regulation of P73-dependent apoptosis through physical interaction and phosphorylation [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(13): 8555-8563.
- [18] Toh WH, Siddique MM, Boominathan L, Lin KW, Sabapathy K. c-Jun regulates the stability and activity of the p53 homologue, P73 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(43): 44713-44722.

[收稿日期] 2010-02-28

[修回日期] 2010-03-25

[本文编辑] 徐红梅