

Odkrycie białka p53 wyznaczyło nowy kierunek w poszukiwaniu terapii przeciwnowotworowych. Mutacje genu *TP53* oraz oddziaływania z inhibitorami komórkowymi powodują, że białko p53 pozostaje nieaktywne w większości ludzkich nowotworów. Z tego względu na uwagę zasługuje inny członek rodziny p53 – białko p73, które jest jego strukturalnym i funkcjonalnym homologiem. W odpowiedzi na czynniki stresowe aktywne transkrypcyjnie izoformy białka p73 (TAp73) aktywują apoptozę komórek prowadząc do eliminacji zmienionych chorobowo komórek.

Rośliny stanowią bogate źródło substancji o działaniu terapeutycznym. Indyjska medycyna ludowa, Ayurveda, posługuje się ekstraktami pozyskiwanymi z rośliny – witanii ospałej (łac. *Withania somnifera*). Badania naukowe pozwoliły zidentyfikować szereg związków biologicznie czynnych pozyskiwanych z witanii ospałej. Wśród nich znajduje się lakton steroidowy – witaferyna A (WA). Zaobserwowano, że WA wykazuje działanie przeciwnowotworowe, które prowadzi do zahamowania wzrostu oraz śmierci komórek nowotworowych *in vitro* i *in vivo*. Wykazano, że WA powoduje akumulację reaktywnych form tlenu (RFT), hamuje sygnalizację zależną od czynnika NF- κ B, kinazy Akt, prowadzi do modyfikacji białek cytoszkieletu oraz hamuje aktywność proteasomów.

W niniejszej pracy zbadano mechanizm aktywacji białka TAp73 przez WA w komórkach nowotworowych pozbawionych funkcjonalnego białka p53. Analiza formowania kolonii oraz test proliferacyjny WST-1 potwierdziły, że WA hamuje wzrost komórek nowotworowych. Zaobserwowano, że WA promuje aktywację kaspaz, analiza ekspresji genów wykazała wzrost poziomu transkryptów genów *PUMA* oraz *NOXA*, natomiast analiza Western blot potwierdziła akumulację pro-apoptotycznego białka PUMA, białka TAp73 oraz cięcie białka PARP. Jednocześnie zaobserwowano aktywację czynników II fazy odpowiedzi antyoksydacyjnej w odpowiedzi na stres oksydacyjny generowany przez WA w badanych liniach komórek. Zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji genów oksygenazy hemowej 1 (*HMOX-1*) oraz reduktazy NAD(P)H: chinon 1 (*NQO1*). Białko NQO1 w warunkach stresu oksydacyjnego generowanego przez WA tworzy kompleks z białkiem TAp73, co prowadzi do jego stabilizacji i chroni przed proteolizą. Sygnalizacja związana z akumulacją RFT aktywuje kinazę JNK, co skutkuje fosforylacją i stabilizacją białka TAp73. Zastosowanie inhibitora kinazy JNK (SP600125), jak również neutralizacja stresu oksydacyjnego przez N-acetylocysteinę (NAC)

hamuje aktywność WA w badanych liniach komórek. Ponadto wykazano, że stabilne wyciszenie ekspresji genu kodującego izoformy TAp73 skutkuje zmniejszoną wrażliwością komórek na działanie WA.

Przeprowadzone doświadczenia objaśniają mechanizm aktywacji białka TAp73 przez sygnalizację indukowaną stresem oksydacyjnym generowanym przez WA. Podwyższony poziom RFT stymuluje kinazę JNK, która fosforyluje i stabilizuje białko TAp73. Stres oksydacyjny promuje akumulację białka NQO1, które tworzy kompleks z TAp73 i chroni je przed degradacją w proteasomach. Dodatkowo, WA wiąże się do podjednostki 20S β proteasomu hamując jego aktywność. Przyczynia się to do stabilizacji białka TAp73 i efektywnej apoptozy. Przedstawione wyniki sugerują wielopoziomowy model stabilizacji białka TAp73, która skutkuje śmiercią komórek nowotworowych niezależnie od statusu białka p53.