

STRESZCZENIE

Mimo wielu dziesięcioleci badań nad nowotworami wciąż trwają poszukiwania kluczowych regulatorów onkogenezy, które mogłyby stać się celami nowych terapii. Obiecującym kandydatem zdają się być białka z rodziny ID. Są to inhibitory wiązania do DNA czynników transkrypcyjnych bHLH, które regulują ekspresję genów związanych z różnicowaniem komórek. Zwykle geny *ID* ulegają ekspresji w komórkach macierzystych i progenitorowych, hamując różnicowanie. Czasem przeciwnie, ekspresja genów *ID* ukierunkowuje odpowiednio proces dojrzewania komórek. W nowotworach objawiają się zarówno właściwości onkogenne jak i supresorowe białek ID, zależnie od narządu dotkniętego chorobą. Na skutek rozregulowanych szlaków sygnalizacyjnych w nowotworach, geny *ID* ulegają nadekspresji bądź wyciszeniu. Nieprawidłowy poziom białek ID prowadzi do odróżnicowania komórek nowotworowych i nadania im cech komórek macierzystych, takich jak zdolność do samoodnowy, unikanie apoptozy i senescencji. Białka ID biorą też udział w przerzutowaniu i angiogenezie. Zaangażowanie białek ID w kluczowe procesy prowadzące do transformacji nowotworowej skłania do poznania mechanizmów ich działania i wykorzystania w projektowaniu nowych leków.

WPROWADZENIE

Nazwa białek należących do rodziny ID pochodzi od funkcji, jaką pełnią. Są inhibitorami wiązania do DNA (ang. *Inhibitors of DNA binding*) czynników transkrypcyjnych typu bHLH (ang. *basic helix-loop-helix*). Czasem również ich nazwę wywodzi się od roli, jaką pełnią w rozwoju komórek i tkanek. Białka ID utrzymują komórki w stanie niezróżnicowanym, pozytywnie wpływają na proliferację i utrzymanie cech typowych dla komórek macierzystych, zatem są inhibitorami różnicowania (ang. *Inhibitors of Differentiation*) [1,2]. Odkrycie tych białek oraz ich zdolności do zatrzymania różnicowania i pobudzenia proliferacji różnych typów komórek skłoniło do wysunięcia hipotezy, że mogą one być zaangażowane w proces nowotworzenia. Niski stopień zróżnicowania i nieograniczona proliferacja należą bowiem do podstawowych cech komórek nowotworowych, a nadekspresja genów *ID* pozwala te właśnie cechy uzyskać.

Celem niniejszej pracy jest podsumowanie aktualnego stanu badań nad rolą białek należących do rodziny ID w powstawaniu i rozwoju nowotworów. Ponieważ jest to temat stosunkowo mało znany, najpierw zostanie omówiona budowa białek ID i ich funkcja w prawidłowych komórkach. Następnie przedstawiona będzie rola, jaką odgrywają one w zapoczątkowaniu i progresji chorób nowotworowych. Na koniec przedyskutowana zostanie możliwość zastosowania białek ID jako nowych celów w terapii przeciwnowotworowej.

BIAŁKA ID JAKO INHIBITORY CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH

Geny kodujące czynniki transkrypcyjne posiadające domenę bHLH zidentyfikowano u wielu eukariontów, począwszy od drożdży, a skończywszy na człowieku, natomiast nie występują one u prokariotów. Oznacza to, że ukształtowały się one na wczesnym etapie ewolucji organizmów eukariotycznych [2]. Do tej samej grupy należą również geny z rodziny *ID*. Choć odkryto je u kilku gatunków zwierząt, to najlepiej zbadane zostały w muszce owocowej, *Drosophila melanogaster*, która posiada jeden gen *extramacrochaetae* (*emc*) kodujący białko typu ID. Genomy myszy i człowieka zawierają po cztery geny nazwane odpowiednio: *ID1*, *ID2*, *ID3* oraz *ID4* [3].

U człowieka każdy z genów *ID* jest zlokalizowany na innym chromosomie. Kodowane przez nie białka mają podobną masę molekularną ok. 13–20 kDa (od 119 do 161 aminokwasów), nie są znane żadne alternatywne izoformy [4]. Porównanie sekwencji aminokwasowych wskazuje, że ewolucyjnie najbliższe sobie są *ID1* i *ID3*, a najbardziej odmiennym białkiem jest *ID4* [5]. W przeci-

Magdalena Pruszk^{1,2,✉}

Alicja Żylicz¹

¹Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Warszawa

²Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa, Warszawa

✉Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, ul. Księcia Trojdena 4, 02-109 Warszawa; e-mail: mpruszko@iimcb.gov.pl, tel.: (22) 597 07 00 wew. 741

Artykuł otrzymano 23 lipca 2016 r.
Artykuł zaakceptowano 28 lipca 2016 r.

Słowa kluczowe: białka ID, czynniki transkrypcyjne bHLH, nowotworowe komórki macierzyste

Wykaz skrótów: bHLH – ang. *basic helix-loop-helix*; EMT – ang. *epithelial-mesenchymal transition*; ID – ang. *Inhibitor of DNA binding*; MET – ang. *mesenchymal-epithelial transition*; TNBC – ang. *triple negative breast cancer*

Podziękowania: Badania prowadzone przez autorów pracy finansowane były ze środków na naukę przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki na realizację projektu NCN, MA-ESTRO 2012/06/A/NZ1/00089.

białko RB1 w formie nieufosforylowanej ulega związaniu w kompleksie z ID2, uniemożliwiając jego oddziaływanie z czynnikami transkrypcyjnymi bHLH i ETS, co przyczynia się do różnicowania komórek (Ryc. 2) [15].

ROLA BIAŁEK ID W EMBRIOGENEZIE I RÓŻNICOWANIU KOMÓREK

Najwięcej informacji na ten temat dostarczają badania wykonane na modelu mysim. Białka ID są produkowane głównie podczas embriogenezy oraz w komórkach macierzystych, natomiast ich poziom zazwyczaj obniża się w zróżnicowanych komórkach [16]. Porównanie ekspresji genów *Id1-4* w różnych tkankach i na różnych etapach rozwoju embrionalnego myszy za pomocą hybrydyzacji *in situ* doprowadziło do ciekawych obserwacji. Ekspresja genów *Id1* i *Id3* została wykryta w wielu rodzajach tkanek i bardzo często sygnał dla tych dwóch genów nakładał się, co sugerowało, że powstające białka mogą pełnić zbliżone funkcje. Wzór ekspresji *Id2* w znacznym stopniu pokrywał się z *Id1* i *Id3*, choć w narządach pochodzenia endodermalnego mRNA *Id2* było obecne w komórkach śródbłonna, natomiast mRNA *Id1* i *Id3* w otaczających je komórkach mezenchymalnych. Zupełnie odmienne obserwacje poczyniono w stosunku do genu *Id4*. Ulegał on ekspresji w niewielkich tkankach, a pozytywny sygnał często pojawiał się w komórkach bardziej zróżnicowanych, w przeciwieństwie do pozostałych trzech członków rodziny, co wskazywało, że białko *Id4* może oddziaływać z innym zestawem czynników bHLH, na późniejszych etapach różnicowania [17].

Hipotezy wysnute na podstawie porównania ekspresji genów *Id* w mysich embrionach znalazły potwierdzenie w wynikach doświadczeń, w których wykorzystano myszy z delecją jednego bądź kilku genów *Id*. Okazuje się, że myszy *Id1^{-/-}* nie wykazują w zasadzie żadnych wad rozwojowych [18,19]. Również myszy z delecją *Id3^{-/-}* rozwijają się niemal normalnie. Jedyne nieprawidłowości dotyczą odporności humoralnej i proliferacji limfocytów B [20,21]. Brak wyraźnego fenotypu u myszy *Id1^{-/-}* oraz ograniczone zaburzenia u zwierząt *Id3^{-/-}* wspierają hipotezę, że białka *Id1* i *Id3* mają bardzo zbliżone funkcje i mogą się wzajemnie zastępować. Przypuszczenie to potwierdził ostatecznie model z podwójną delecją *Id1^{-/-}Id3^{-/-}*. Myszy te umierały na wczesnym etapie rozwoju embrionalnego, ponadto u embrionów stwierdzono zaburzenia angiogenezy i krwotoki w mózgu oraz przedwczesne dojrzewanie neuronów [22]. Wydaje się, że prawidłowe unaczynienie pozostałych tkanek było możliwe dzięki *Id2*, ponieważ u embrionów z potrójną delecją (*Id1^{-/-}Id2^{-/-}Id3^{-/-}*) nieciągłość naczyń i krwawienie obserwowano już w całym organizmie [23].

Delecja samego genu *Id2* wiąże się z licznymi zaburzeniami rozwoju układu odpornościowego. Przede wszystkim u tych myszy nie rozwijają się węzły chłonne i kępki Peyera oraz zredukowana jest liczba komórek Langerhansa i komórek NK (ang. *natural killers*) [24]. Warto zauważyć, że delecja genu *Id2* znosi letalne skutki delecji *RB1*, co jest potwierdzeniem ich współzależności [25]. Białko *Id2* pełni ważną rolę w różnicowaniu komórek gruczołu piersiowego w czasie ciąży. U młodych myszy z delecją *Id2^{-/-}* gruczoły piersiowe wydają się normalne, jednak w czasie ciąży ko-

mórki gruczołów nie różnicują się prawidłowo i nie dochodzi do laktacji po urodzeniu młodych [26]. Obserwacje te wskazują, że w przeciwieństwie do *Id1* i *Id3*, białko *Id2* może pełnić nie tylko rolę inhibitora, ale też induktora różnicowania w określonych typach komórek.

Gen *Id4* na wczesnym etapie embriogenezy ulega ekspresji głównie w centralnym układzie nerwowym. W związku z tym jego delecja objawia się przede wszystkim zaburzeniami w rozwoju mózgu i nieprawidłowym różnicowaniem komórek nerwowych myszy [27,28]. Warto jednak zauważyć, że *Id4* w niektórych typach komórek pełni rolę inhibitora różnicowania, w innych zaś przeciwnie wspomaga różnicowanie. *Id4* hamuje różnicowanie komórek progenitorowych oligodendrocytów oraz wspomaga samoodnowę spermatogoniów. Z drugiej strony, to samo białko bierze udział w różnicowaniu osteoblastów, adipocytów, neuronów i komórek Sertolego. Ponadto ekspresja *Id4* w odpowiednich komórkach gruczołu piersiowego jest potrzebna do prawidłowego wydłużania i rozgałęziania kanalików [6]. Ta dwoistość w działaniu *Id4* znajduje odzwierciedlenie w komórkach nowotworowych, co zostanie omówione w dalszych podrozdziałach.

DEREGULACJA BIAŁEK ID W NOWOTWORACH

Liczne badania, których wyniki zostały już opublikowane, wykazały zmiany w ekspresji genów *ID* na poziomie mRNA i białka w wielu typach ludzkich nowotworów. Białka *ID* są niewykrywalne w większości tkanek dojrzałego organizmu, natomiast w nowotworach zazwyczaj obserwuje się nadekspresję genów skorelowaną ze złymi rokowaniami (Tab. 1) [4]. To nasuwa pytanie, czy możemy uznać, że są one onkogenami? Onkogeny definiowane są jako geny wspomagające transformację nowotworową. Ich odpowiedniki w normalnych komórkach (protoonkogeny) podlegają aktywacji na skutek: mutacji, zmiany regulacji ekspresji, amplifikacji lub fuzji z innymi genami.

W literaturze w zasadzie nie odnotowuje się przypadków mutacji w genach *ID*, poza pojedynczymi wyjątkami [29]. Jednakże wykazano w wielu badaniach, że geny te są kontrolowane przez szereg dobrze poznanych onkogenów. HRAS (ang. *Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*) pobudza ekspresję *ID1* i *ID3* poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego EGR1 (ang. *early growth response 1*) [30,31]. Białko N-MYC bezpośrednio wiąże się do promotora *ID2* wywołując jego nadekspresję. W następstwie tego dochodzi do związania supresora nowotworów RB1 przez *ID2* i pobudzenia proliferacji komórek [15]. MYC aktywuje również promotory *ID1* [32] oraz *ID3* [33]. Co ciekawe, *ID1* może pośrednio doprowadzić do wzrostu puli wolnego *ID2*. Otóż *ID1* poprzez oddziaływanie z czynnikiem transkrypcyjnym ETS1 hamuje ekspresję *CDKN2A*, co umożliwia fosforylację RB1 przez cyklinę D-CDK4 (ang. *cyclin-dependent kinase 4 partnered with D-type cyclins*) i samo w sobie stymuluje proliferację [9,34]. *ID2* zostaje wówczas uwolnione z kompleksu z ufosforylowanym RB1, więc może oddziaływać z innymi białkami, tym bardziej wzmagając transformację nowotworową. W licznych nowotworach dochodzi do mutacji w genie *TP53*, które mogą doprowadzić do utraty funkcji lub zyskania nowych właściwości onkogennych. Wykazano, że

Tabela 1. Zmiany w ekspresji genów *ID* w powszechnych typach nowotworów u ludzi.

	Nowotwór	Poziom ekspresji	Rokowania	Piśmiennictwo
ID1	Białaczka	↑	Złe	[89]
	Głowy i szyi	↑	Złe	[43]
	Jajnika	↑	Złe	[48]
	Jelita grubego	↑	Złe	[41]
	Mózgu	↑	Złe	[83]
	Nosogardzieli	↑	Złe	[90]
	Pęcherza	↑	Złe	[91]
	Piersi	↑	Złe	[45]
	Pluc	↑	Złe	[92]
	Prostaty	↑	Złe	[93]
	Przelyku	↑	Złe	[94]
	Trzustki	↑	Złe	[46]
	Wątroby	↑	Złe	[34]
	Żołądka	↑	Złe	[47]
ID2	Chłoniak Hodgkina	↑	ND	[54]
	Jelita grubego	↑	Złe	[55]
	Mózgu	↑	Złe	[60]
	Pęcherza	↑	ND	[95]
	Piersi	↑/↓	Dobre	[61]/[63]
	Pluc	↑	Złe	[59]
	Prostaty	↑	Złe	[58]
ID3	Chłoniak Burkitta	M	ND	[29]
	Jelita grubego	↑	Złe	[41]
	Mózgu	↑	Złe	[40]
	Prostaty	↑	Złe	[93]
	Trzustki	↑	ND	[96]
	Żołądka	↑	Złe	[97]
ID4	Białaczka	↑	Złe	[69]
	Jajnika	↑	Złe	[80]
	Jelita grubego	↑	Złe	[67]
	Mózgu	↑	Złe	[73,77]
	Piersi bazalny	↑	Złe	[74,76]
	Piersi luminalny	↓	Złe	[65,71]
	Prostaty	↓	Złe	[68]

Oznaczenia: ↑ zwiększona ekspresja; ↓ obniżona ekspresja; ND – nie dotyczy; M – mutacja

w raku jelita delecja lub inaktywująca mutacja genu *TP53* prowadzi do nadekspresji *ID1*, *ID2* i *ID3* [35]. Zmienione formy *TP53*, które na drodze mutacji w genie zyskały nowe funkcje stymulują ekspresję *EGR1*. Białko *EGR1* aktywuje promotory genów *ID* [36].

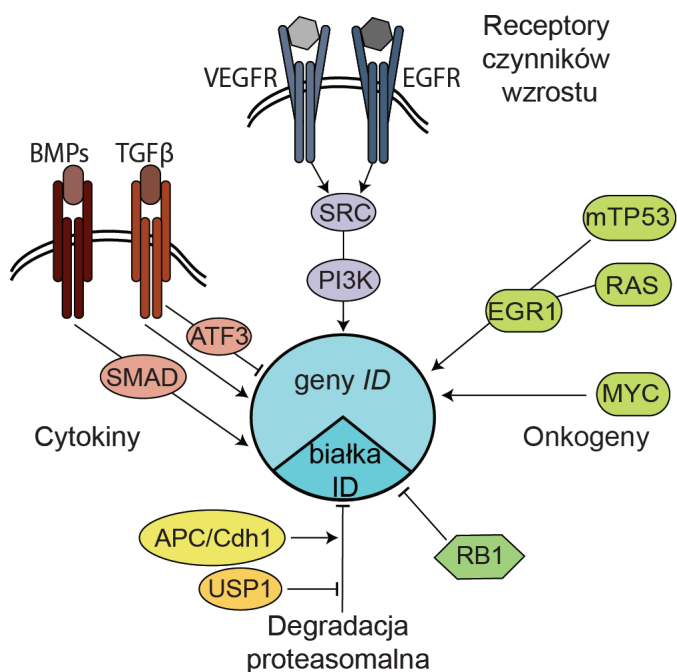
Poza opisanymi powyżej, istnieje jeszcze wiele szlaków sygnalizacyjnych, których deregulacja w nowotworach może prowadzić do nieprawidłowej ekspresji genów i akumulacji białek *ID* (Ryc. 3). Są to, między innymi, szlaki aktywowane przez *TGFβ1* (ang. *transforming growth factor-β1*), cytokiny BMP (ang. *bone morphogenic factors*) czy receptory VEGFR (ang. *vascular endothelial growth factor receptor*) i EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*). Zagadnienia te zostały szerzej omówione w kilku pracach przeglądowych [4,7,16]. Poza zwiększoną syntezą, możliwa jest też akumulacja białek *ID* poprzez zahamowanie ich degradacji. Białka *ID* mają krótki okres półtrwania, ponieważ są ubikwitylowane przez kompleks E3 ligazy ubikwityny, APC/

Cdh1(ang. *anaphase promoting complex/cadherin 1*) [37]. W pewnych warunkach fizjologicznych lub w komórkach nowotworowych aktywowana jest peptydaza USP1 (ang. *ubiquitin specific peptidase 1*), która odcina reszty ubikwityny od białek *ID* zapobiegając ich degradacji w proteasomie [38].

Badania mechanizmów regulacji poziomu białek *ID* pozwoliły również zgromadzić dowody na kluczową i złożoną rolę, jaką pełnią one w wielu nowotworach. Baczna uwagę zwrócono szczególnie na ich udział w utrzymaniu populacji nowotworowych komórek macierzystych. Wiele prac poświęcono również zaangażowaniu białek *ID* w inwazyjność, przerzutowanie i angiogenezę.

WŁAŚCIWOŚCI ONKOGENNE *ID1* I *ID3*

Najlepiej poznanym spośród rodziny genów *ID* jest ten, który został odkryty jako pierwszy, *ID1*. W prawidłowych komórkach często obserwuje się jednoczesną ekspresję *ID1* i *ID3*, a ich produkty białkowe pełnią te same funkcje. Podobnie dzieje się w komórkach nowotworowych. Dlatego rola tych dwóch genów w onkogenezie zostanie omówiona wspólnie. Pierwszym i chyba najważniejszym skutkiem nadekspresji *ID1* i *ID3* w komórkach nowotworowych jest nadanie im cech komórek macierzystych. Nowotworowe komórki macierzyste (NKM) to subpopulacja komórek nowotworu, która ma zdolność do samoodnowy. Uważa się, że to właśnie te komórki odpowiadają za tworzenie przerzutów oraz wznowę choroby po zakończonym leczeniu. Szczególnie dobrze zbadano mechanizm działania *ID1* i *ID3* na komórki macierzyste glejaka wielopostaciowego i raka jelita. Ekspresja *ID1* i *ID3* w glejaku jest aktywowana przez *TGFβ1* [39]. Podwyższony poziom tych białek prowadzi z kolei do wyciszenia genu *RAP1GAP*(ang. *RAP1 GTPase activating protein*). Powoduje to akumulację białka *RAP1* (ang. *Ras-related protein 1*) w formie związanej z GTP. Podwyższony poziom *RAP1*-GTP w komórkach macierzystych glejaka odpowiada za ich adhezję do niszy, w której żyją [40]. NKM są wyjątkowo odporne na chemioterapię, ponieważ ten rodzaj leczenia jest wymierzony w komórki szybko dzielące się, natomiast komórki macierzyste dzielą się rzadko. Na przykład, w komórkach macierzystych raka jelita *ID1* i *ID3* przyczyniają się do wyższej ekspresji *CDK-N1A* (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*, alternatywna nazwa *p21*) – inhibitora cyklu komórkowego, dzięki czemu komórki zyskują chemiooporność. Co więcej, nabywają zdolność do asymetrycznego podziału, charakterystyczną dla komórek macierzystych oraz mogą odtworzyć guz po ksenotransplantacji [41]. Chemiooporność nowotworów z nadekspresją *ID1* i *ID3* związana jest również ze zwiększeniem poziomu białek antyapoptotycznych takich jak *BCL-2* (ang. *B cell lymphoma 2*), *BCL-X_L* oraz aktywacją pro-przeżyciowych szlaków sygnalizacyjnych zależnych od *PI3K/AKT* (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase/AKT serine/threonine kinase*) czy *NF-κB* (ang. *nuclear factor kappa-B*) [42,43]. Ponadto *ID1* może chronić komórki nowotworowe przed senescencją. Wykazano, że komórki epitelialne gruczołu piersiowego, do których wprowadzono jednocześnie plazmidy zawierające onkogenny *Hras^{A12V}* i *Id1* tworzyły guzy po transplantacji ich do myszy. Wyłączenie ekspresji *Id1* w już utworzonych guzach prowadziło do wejścia komórek w stan senescencji, zapewne pod wpływem *TP53* i *p21* [44].



Rycina 3. Regulacja genów i białek z rodziny ID w komórkach nowotworowych. Poziom białek ID w komórkach nowotworowych jest regulowany przez onkogeny i szlaki sygnalizacyjne aktywowane w nowotworach. Aktywność genów ID jest kontrolowana przez różne cytokiny, np. TGFβ1 (ang. *tumour growth factor β1*) może wpływać hamująco lub stymulująco, zależnie od obecności białka ATF3 (ang. *activating transcription factor 3*). Cytokiny BMP (ang. *bone morphogenic protein*) stymulują promotory genów ID za pośrednictwem białek SMAD. Receptory czynników wzrostu VEGFR (ang. *vascular endothelial growth factor receptor*) i EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*) aktywują ekspresję genów ID za pośrednictwem SRC i PI3K/AKT (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase/ AKT serine/threonine kinase 1*). Ekspresja genów ID jest indukowana bezpośrednio przez onkogen MYC lub pośrednio przez RAS i zmutowane TP53 (mTP53) poprzez czynnik transkrypcyjny EGR1 (ang. *early growth response protein 1*). Białko RB1 (ang. *retinoblastoma protein*) wiąże ID2 i hamuje jego działanie. Poziom białek ID jest regulowany poprzez degradację proteasomalną. E3 ligaza ubikwityny – APC/Cdh1 (ang. *anaphase promoting complex/cadherin1*) powoduje skierowanie białek ID do degradacji. Peptydaza USP1 (ang. *ubiquitin specific peptidase 1*) odcinając reszty ubikwityny chroni białka ID przed degradacją [4].

Nieodłącznym elementem progresji agresywnych nowotworów jest tworzenie przerzutów w odległych narządach. Jest to złożony proces obejmujący, między innymi, transformację epitelialno-mezenchymalną, EMT (ang. *epithelial-mesenchymal transition*) w guzie pierwotnym i odwrotny proces, tzw. MET (ang. *mesenchymal-epithelial transition*) w miejscu przerzutu. Okazuje się, że białka ID1 i ID3 biorą udział w obu przeciwnastawnych procesach. Wykazano, że nadekspresja ID1 i ID3 jest konieczna do reinicjacji wzrostu w miejscu przerzutu nowotworów piersi, trzustki czy żołądka [45-47]. W komórkach raka jajnika ID1 pośredniczy w transformacji epitelialno-mezenchymalnej indukowanej przez TGFβ1 [48]. ID1 bierze również udział w przełączaniu ekspresji genów *E-kadheryny* i *N-kadheryny*, których białkowe produkty są odpowiednio markerami komórek nabłonka i mezenchymalnych [49]. Natomiast badania prowadzone na modelu raka piersi dowiodły udziału ID1 w MET w przerzutach do płuc. Autorzy wykazali, że w guzie pierwotnym TGFβ1 prowadzi do nadprodukcji ID1 i SNAIL (ang. *SNAI1 Drosophila homolog 1*), czynnika transkrypcyjnego wywołującego EMT. Po dotarciu do płuc, gdzie poziom SNAIL ulega obniżeniu, ID1 hamuje działanie TWIST1 (ang. *TWIST family bHLH transcription factor 1*), białka z rodziny bHLH

związanego z EMT, tym samym powodując transformację mezenchymalno-epitelialną [50].

Angiogeneza, czyli wzrost nowych naczyń krwionośnych w guzie jest ważnym procesem z kilku względów. Nie tylko umożliwia dostarczenie do komórek nowotworowych tlenu i substancji odżywczych, naczynia krwionośne stanowią też drogę dla przerzutujących komórek, a ich okolica tworzy niszę dla komórek macierzystych nowotworu. Gdy komórki nowotworowe wprowadzono do myszy posiadających częściową podwójną delecję genów *Id1^{-/-}Id3^{-/-}* większość guzów obumarła, a te które przetrwały były bardzo słabo unaczynione, co wskazywało na udział białek Id1 i Id3 w angiogenezie i było zbieżne z fenotypem myszy z całkowitą podwójną delecją *Id1^{-/-}Id3^{-/-}* [22]. Dalsze badania wykazały, że czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) wydzielany przez komórki nowotworu dociera do szpiku powodując wzrost poziomu białek ID1 i ID3 w komórkach prekursorowych śródbłonka. To powoduje ich aktywację, opuszczenie szpiku i włączenie do nowopowstających naczyń krwionośnych w guzie [51]. Nadekspresja ID3 w glejaku wywołana przez pobudzenie szlaków sygnalizacyjnych zależnych od EGFR prowadzi natomiast do syntezy pro-angiogennych cytokin CXCL1 (ang. *C-X-C motif chemokine ligand 1*), IL6 i IL8 (*interleukin 6, 8*) [52].

ID2 W NOWOTWORACH

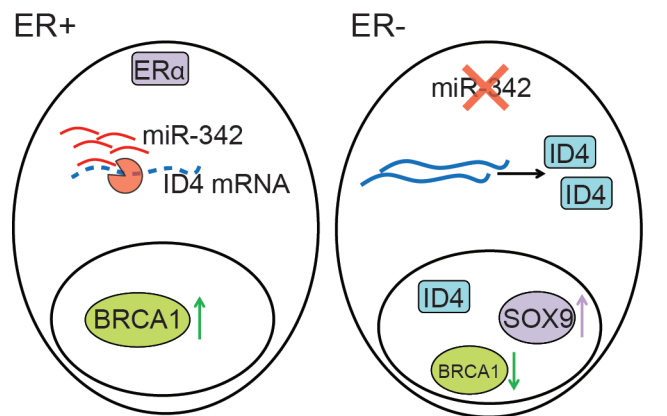
Rola białka ID2 w różnych nowotworach nie jest już tak jednoznaczna jak ID1 i ID3. Większość prac prezentuje jego onkogenne właściwości, jednak są też takie nowotwory, w których ID2 pełni rolę supresorową [53]. W wielu przypadkach ID2 sprzyja transformacji nowotworowej za sprawą opisanego już wyżej oddziaływania z supresorem nowotworów, białkiem RB1, czego skutkiem jest wzmożona proliferacja komórek nowotworowych (Ryc. 2) [13,14]. ID2 jest zaangażowane w dojrzewanie komórek układu odpornościowego i jego deregulacja prowadzi do powstania nowotworów w tym układzie. Nadekspresja ID2 w białacze Hodgkina powoduje zahamowanie ekspresji genów zależnych od czynników transkrypcyjnych E2A i PAX5, koniecznych do różnicowania limfocytów B [54]. Indukcja ID2 w raku jelita grubego poprzez szlak sygnalizacyjny Wnt/β-katenina również przyczynia się do odróżnicowania i utrzymania macierzystości komórek tego nowotworu [55]. Poza zatrzymaniem różnicowania i zwiększoną proliferacją, ID2 wpływa również na migrację i inwazyjność komórek nowotworowych, np. poprzez obniżenie ekspresji *SEMA3F* (ang. *semaphorin 3F*) [56], bądź interakcję z białkiem SNAIL, będącym mediatorem EMT [57]. Nadekspresja ID2 jest jednoznacznie związana ze zwiększoną proliferacją, chemioopornością i inwazyjnością również w nowotworach płuc, prostaty czy glejaku wielopostaciowym (ang. *glioblastoma*) [58-60]. Tymczasem badania nad rolą ID2 w raku piersi przynoszą sprzeczne wyniki. Istnieją doniesienia literaturowe wykazujące, że nadekspresja ID2 wiąże się ze złymi rokowaniami i zwiększoną inwazyjnością tego nowotworu [61,62]. Autorzy innych prac postulują, że ID2 pełni w raku piersi rolę supresora. Twierdzą, że wysoka ekspresja ID2 jest charakterystyczna dla łagodnych nowotworów, a dopiero jej obniżenie zwiększa stopień odróżnicowania i inwa-

zyjności komórek [63,64]. Tę rozbieżność można tłumaczyć wykorzystaniem, w doświadczeniach *in vitro*, linii komórkowych różniących się posiadaniem receptorów estrogenowych i HER2 (ang. *human epidermal growth factor receptor 2*). Także w materiale pobranym od pacjentów nie rozróżniano molekularnego typu raka piersi. Należałoby więc wysunąć hipotezę, że *ID2* pełni zarówno rolę promotora jak i inhibitora onkogenezy, zależnie od podtypu molekularnego tego nowotworu. Wymaga ona jednak weryfikacji w dalszych badaniach.

ID4 JAKO SUPRESOR I PROMOTOR NOWOTWORZENIA

Jak wykazano, zdolność białka ID4 w niektórych typach komórek do hamowania, a w innych do promowania różnicowania się komórek jest analogiczna do jego roli w transformacji nowotworowej. Według bazy danych Oncomine (www.oncomine.org) w większości nowotworów poziom ekspresji *ID4* jest obniżony w stosunku do zdrowych tkanek. Wskazuje to na działanie *ID4* w roli supresora onkogenezy. Najczęstszym mechanizmem wyciszenia genu *ID4* jest hipermetylacja promotora, która została opisana w licznych badaniach przeprowadzonych z użyciem linii komórkowych i materiału pobranego od pacjentów [65-69]. Wykazano, między innymi, że w linii komórkowej raka prostaty DU145 do promotora *ID4* rekrutowane jest białko EZH2 (ang. *enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*). Jest ono odpowiedzialne za tri-metylację lizyny 27 w histonie 3 (H3K27me3), która to modyfikacja jest charakterystyczna dla inaktywowanych genów. EZH2 rekrutuje również metylotransferazy DNA, które modyfikują wyspy CpG w obrębie promotora *ID4* [70]. Wiele badań klinicznych potwierdziło istnienie korelacji pomiędzy niskim poziomem białka ID4 a wysokim stopniem zaawansowania, inwazyjnością oraz złymi prognozami w różnych typach nowotworów, np. w białaczkach, raku piersi czy jelita grubego [65,69,71]. Porównanie dwóch linii komórkowych raka prostaty: łagodnej LNCaP oraz bardziej agresywnej DU145 pokazało, że ta pierwsza charakteryzuje się relatywnie wysokim poziomem białka ID4. W agresywnych komórkach DU145 ekspresja *ID4* nie zachodzi. Co więcej, wyciszenie *ID4* w komórkach LNCaP powoduje ich przyspieszoną proliferację, zwiększoną inwazyjność oraz uniezależnienie od androgenów, które jest typowe w zaawansowanych nowotworach gruczołu krokowego [66]. Niedawne badania wykazały, że ID4 może działać jako inhibitor pozostałych białek ID, w szczególności ID1. Ponadto jego powinowactwo do ID1 jest trzykrotnie większe niż do E47 [5]. Tak więc ID4 może pełnić rolę supresora onkogenezy poprzez uwolnienie białek E z kompleksu z ID1.

Z drugiej strony, podobne doświadczenia przeprowadzone z użyciem linii komórkowych czerniaka 1205Lu przyniosły przeciwne wyniki. Porównano zdolność komórek do wzrostu na płaskim podłożu (2D) lub w postaci sferoidów (3D) typowych dla nowotworowych komórek macierzystych. Wyciszenie *ID4* w badanych komórkach spowodowało, że rosły one w pojedynczej warstwie mimo zastosowania pożywki sprzyjającej formowaniu sferoidów. Co więcej, komórki 1205Lu pozbawione ID4 zaczęły się różnicować. Te obserwacje wskazują, że w



Rycina 4. Supresorowa i onkogenna rola ID4 w nowotworach piersi. Zależnie od typu molekularnego nowotworu piersi ekspresja *ID4* jest podwyższona lub obniżona. W nowotworach typu luminalnego posiadających receptor estrogenu ERα (ang. *estrogen receptor α*) obserwuje się wysoki poziom miR-342, co prowadzi do degradacji mRNA *ID4*. Niski poziom białka ID4 koreluje z wysoką ekspresją supresora nowotworów *BRCA1*. W nowotworach typu bazalnego, a szczególnie w TNBC (ang. *triple negative breast cancer*), które nie posiadają ERα i miR-342, poziom białka ID4 rośnie. Jest ono wówczas inhibitorem ekspresji *BRCA1* oraz aktywatorem wielu pro-onkogenów genów, między innymi *SOX9* [76,78].

czerniaku ID4 ma właściwości onkogenne i pełni rolę inhibitora różnicowania [72]. Podobnie w przypadku glejaka wielopostaciowego metylacja promotora *ID4* korelowała z lepszymi prognozami dla pacjenta, natomiast wysoka ekspresja *ID4* była związana z gorszymi rokowaniami i wzmożoną angiogenezą [73]. Szczególnie interesująca wydaje się rola ID4 w nowotworach gruczołu piersiowego. Białko to może pełnić zarówno funkcję onkogeną jak i supresorową, zależnie od podtypu nowotworu, a w szczególności od obecności receptorów estrogenowych (Ryc. 4).

W nowotworach typu luminalnego A i B, które posiadają receptory estrogenu, ekspresja *ID4* jest obniżona. Inaczej jest w tzw. potrójnie negatywnym raku piersi (TNBC, ang. *triple negative breast cancer*), który charakteryzuje się brakiem receptorów estrogenu, progesteronu i HER2. W jednym z badań nadekspresja *ID4* została stwierdzona u 76% pacjentek z TNBC i tylko u 5% spośród tych z innym typem raka piersi [74]. Potrójnie negatywny rak piersi jest związany z mutacją lub wyciszeniem ekspresji genu *BRCA1* (ang. *breast cancer 1*). Wykorzystując bibliotekę rybozymów, zidentyfikowano ID4 jako negatywny regulator tego supresora nowotworów [75]. Dążąc do wyjaśnienia zależności między typem molekularnym raka piersi a ekspresją *ID4* stwierdzono, że aktywacja receptorów estrogenowych pozytywnie koreluje z poziomem miR-342, które z kolei kieruje do degradacji mRNA *ID4*, co przekłada się na wysoką ekspresję *BRCA1* (Ryc. 4). W nowotworach TNBC poziom miR-342 jest niski, co umożliwia ekspresję *ID4* i jednocześnie prowadzi do obniżenia ekspresji *BRCA1* [76]. W tych nowotworach, w których poziom ID4 jest wysoki, jest ono zaangażowane w utrzymanie macierzystości komórek np. przez podniesienie ekspresji *SOX9* (ang. *SRY-box 9*) i *SOX2* (ang. *SRY-box 2*) [77,78] (Ryc. 4) oraz w angiogenezę poprzez indukcję ekspresji genów proangiogennych cytokin [79].

BIĄŁKA ID JAKO CELE W TERAPII NOWOTWORÓW

Jak przedstawiono powyżej, białka ID zaangażowane są w proliferację, migrację i inwazyjność oraz angiogenezę w nowotworach. Ponadto odpowiadają za utrzymanie w stanie nieodróżnionym nowotworowych komórek macierzystych (NKM), które są wyjątkowo odporne na chemio- i radioterapię. Leczenie ukierunkowane na NKM stwarza nadzieję na uniknięcie remisji następującej po zastosowaniu klasycznych metod terapii. Wydaje się, że białka ID stanowią w tej sytuacji doskonały cel terapeutyczny. Ponadto białka ID nie występują w większości zdrowych tkanek, co pozwala zakładać, że ukierunkowana na nie terapia nie będzie obciążona poważnymi skutkami ubocznymi.

Istnieją dwa podstawowe kierunki, w których podążają badania dotyczące projektowania leków celowanych przeciwko białkom ID. Pierwsze podejście to wyciszenie ekspresji genów. Stworzono między innymi nanokompleksy dostarczające odpowiednie siRNA w sposób specyficzny do komórek nowotworowych. Za ich pomocą wyciszono *Id4* *in vivo* u myszy poddanych ksenotransplantacji komórek raka jajnika. Zaobserwowano długotrwałą remisję nowotworu u 80% gryzoni [80]. Podjęto też próbę dostarczania siRNA za pomocą liposomów podawanych dootrzewnowo. Podawane w ten sposób siRNA przeciwko *Id2* skutecznie ograniczyło u myszy wzrost podskórnych ksenotransplantatów raka jelita grubego i tworzenie przerzutów do wątroby [81]. Zaprojektowano peptydy połączone z siRNA skierowanym przeciwko mysiemu *Id1* (*Id1*-PCAO, ang. *Id1-peptide conjugated antisense oligonucleotide*). Peptydy te w sposób specyficzny rozpoznawały komórki naczyń krwionośnych w guzach nowotworowych. Badania przeprowadzono na mysich modelach spontanicznie rozwijających raka piersi i raka płuca, które charakteryzują się nadekspresją *Id1* w komórkach endotelialnych w nowotworze. W obu przypadkach systemowe dostarczenie *Id1*-PCAO przyniosło pozytywne skutki w postaci zmniejszenia guza pierwotnego i liczby przerzutów [82]. Co bardzo ważne z klinicznego punktu widzenia, w żadnym z tych badań nie zaobserwowano toksycznego wpływu terapii na zdrowe organy. Ekspresję genów *ID* można również obniżyć celując w szlaki sygnalizacyjne prowadzące do ich nadekspresji. W glejaku wielopostaciowym uzyskano ten efekt poprzez zastosowanie inhibitora receptora TGFβR1 (ang. *transforming growth factor beta receptor 1*). Zablokowanie tego szlaku wpłynęło przede wszystkim na obniżenie ekspresji *ID1* i *ID3* w komórkach macierzystych glejaka charakteryzujących się podwyższoną ekspresją *CD44* i *ID1* oraz obniżyła się ich zdolność do odtworzenia nowotworu po zastosowanej chemioterapii [39]. Skutecznym inhibitorem ekspresji *ID1* okazał się również kanabidiol - nietoksyczny kanabinoid, który obniżając poziom białka *ID1* skutecznie ograniczył zdolność komórek glejaka do proliferacji i inwazji zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [83]. Poziom *ID1* udało się też obniżyć poprzez zastosowanie drobnocząsteczkowych inhibitorów peptydazy USP1, która odcinając reszty ubikwityny chroni białka ID przed degradacją w proteasomie. Zablokowanie USP1 spowodowało degradację *ID1* oraz apoptozę komórek ostrej białaczki szpikowej *in vitro* [84].

Zupełnie innym sposobem zwalczania skutków nadprodukcji białek ID jest zablokowanie ich oddziaływania z innymi

białkami. Wykorzystując bibliotekę fagową zidentyfikowano peptyd nazwany 13I, który specyficznie wiąże się do białek ID uniemożliwiając im tworzenie kompleksów z czynnikami transkrypcyjnymi. W doświadczeniach *in vitro* peptyd 13I przyczynił się do zatrzymania proliferacji, zmniejszenia inwazyjności i zdolności do formowania kolonii w miękkim agarze przez komórki nerwiaka zarodkowego (ang. *neuroblastoma*) [85]. Zaprojektowano także peptyd wzorowany na domenie bHLH białka MYOD1. Peptyd ten specyficznie wiązał się do *ID1* znosząc oddziaływanie z MYOD1 i innymi białkami E, powodując zatrzymanie proliferacji komórek nowotworowych [86]. Wykorzystując drożdżowy system dwuhybrydowy znaleziono aptamer *ID1/3*-PAZ, który wiązał się specyficznie do białek *ID1* i *ID3*, powodując tym samym ekspresję genów zależnych od czynników transkrypcyjnych bHLH. Wywołał również zahamowanie wzrostu i apoptozę komórek raka piersi i jajnika [87,88]. Niestety te doświadczenia prowadzone były *in vitro* i chociaż ich wyniki są bardzo obiecujące, wymaga to dalszych badań, by takie peptydy efektywnie dostarczyć do nowotworu rozwijającego się *in vivo* w organizmie modelowym, a docelowo w organizmie ludzkim.

PODSUMOWANIE

Białka ID pełnią ważną rolę w procesie inicjacji i rozwoju choroby nowotworowej. Po pierwsze, ekspresja genów *ID* jest regulowana przez wiele dobrze poznanych onkogenów i szlaków sygnalizacyjnych aktywnych w nowotworach. Po drugie, białka te odpowiadają za utrzymanie niezmiernie istotnej populacji nowotworowych komórek macierzystych i niszy, w jakiej te komórki funkcjonują. Z tej przyczyny białka ID jawią się jako doskonały cel nowoprojektowanych leków przeciwnowotworowych. Na ogół białka ID są niewykrywalne w zróżnicowanych komórkach dojrzałego organizmu, a ich poziom jest podwyższony w nowotworach. Dzięki temu jest szansa, że taka terapia nie miałaby poważnych skutków ubocznych. Trzeba jednak brać pod uwagę wzajemne przejmowanie swoich funkcji, szczególnie przez białka *ID1* i *ID3*, oraz wynikającą z tego konieczność projektowania leków, które celują w oba białka jednocześnie. Należy też pamiętać, że nadekspresja któregoś z genów *ID* może wywołać odmienne efekty zależnie od rodzaju nowotworu, co szczególnie uwidacznia się w różnych typach molekularnych raka piersi. Z pewnością konieczne są dalsze szczegółowe badania uwzględniające współzależności między białkami ID, stopień zaawansowania czy podtyp molekularny nowotworu. Nie ulega jednak wątpliwości, że białka ID są kluczowymi regulatorami procesu nowotworzenia i w przyszłości mogą stać się nowymi celami terapeutycznymi.

PIŚMIENNICTWO

1. Ruzinova MB, Benezra R (2003) Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol* 13: 410-418
2. Norton JD (2000) ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci* 113: 3897-3905
3. Lasorella A, Benezra R, Iavarone A (2014) The ID proteins: master regulators of cancer stem cells and tumour aggressiveness. *Nat Rev Cancer* 14: 77-91
4. Nair R, Teo WS, Mittal V, Swarbrick A (2014) ID proteins regulate diverse aspects of cancer progression and provide novel therapeutic opportunities. *Mol Ther* 22: 1407-1415
5. Sharma P, Chinaranagari S, Chaudhary J (2015) Inhibitor of differentiation 4 (*ID4*) acts as an inhibitor of *ID-1*, *-2* and *-3* and promotes basic

- helix loop helix (bHLH) E47 DNA binding and transcriptional activity. *Biochimie* 112: 139-150
6. Patel D, Morton DJ, Carey J, Havrda MC, Chaudhary J (2015) Inhibitor of differentiation 4 (ID4): From development to cancer. *Biochim Biophys Acta* 1855: 92-103
7. Perk J, Iavarone A, Benezra R (2005) Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 5: 603-614
8. Yates PR, Atherton GT, Deed RW, Norton JD, Sharrocks AD (1999) Id helix-loop-helix proteins inhibit nucleoprotein complex formation by the TCF ETS-domain transcription factors. *EMBO J* 18: 968-976
9. Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJ, Stinson JA, Sugimoto M, Ohashi Y, Sharrocks AD, Peters G, Hara E (2001) Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* 409: 1067-1070
10. Roberts EC, Deed RW, Inoue T, Norton JD, Sharrocks AD (2001) Id helix-loop-helix proteins antagonize pax transcription factor activity by inhibiting DNA binding. *Mol Cell Biol* 21: 524-533
11. Inoue T, Shoji W, Obinata M (1999) MIDA1, an Id-associating protein, has two distinct DNA binding activities that are converted by the association with Id1: a novel function of Id protein. *Biochem Biophys Res Commun* 266: 147-151
12. Moldes M, Boizard M, Liepvre XL, Feve B, Dugail I, Pairault J (1999) Functional antagonism between inhibitor of DNA binding (Id) and adipocyte determination and differentiation factor 1/sterol regulatory element-binding protein-1c (ADD1/SREBP-1c) trans-factors for the regulation of fatty acid synthase promoter in adipocytes. *Biochem J* 344 Pt 3: 873-880
13. Iavarone A, Garg P, Lasorella A, Hsu J, Israel MA (1994) The helix-loop-helix protein Id-2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein. *Genes Dev* 8: 1270-1284
14. Lasorella A, Iavarone A, Israel MA (1996) Id2 specifically alters regulation of the cell cycle by tumor suppressor proteins. *Mol Cell Biol* 16: 2570-2578
15. Lasorella A, Nosedà M, Beyna M, Yokota Y, Iavarone A (2000) Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. *Nature* 407: 592-598
16. Ling F, Kang B, Sun XH (2014) Id proteins: small molecules, mighty regulators. *Curr Top Dev Biol* 110: 189-216
17. Jen Y, Manova K, Benezra R (1996) Expression patterns of Id1, Id2, and Id3 are highly related but distinct from that of Id4 during mouse embryogenesis. *Dev Dyn* 207: 235-252
18. Yan W, Young AZ, Soares VC, Kelley R, Benezra R, Zhuang Y (1997) High incidence of T-cell tumors in E2A-null mice and E2A/Id1 double-knockout mice. *Mol Cell Biol* 17: 7317-7327
19. Sikder H, Huso DL, Zhang H, Wang B, Ryu B, Hwang ST, Powell JD, Alani RM (2003) Disruption of Id1 reveals major differences in angiogenesis between transplanted and autochthonous tumors. *Cancer Cell* 4: 291-299
20. Pan L, Sato S, Frederick JP, Sun XH, Zhuang Y (1999) Impaired immune responses and B-cell proliferation in mice lacking the Id3 gene. *Mol Cell Biol* 19: 5969-5980
21. Rivera RR, Johns CP, Quan J, Johnson RS, Murre C (2000) Thymocyte selection is regulated by the helix-loop-helix inhibitor protein, Id3. *Immunity* 12: 17-26
22. Lyden D, Young AZ, Zagzag D, Yan W, Gerald W, O'Reilly R, Bader BL, Hynes RO, Zhuang Y, Manova K, Benezra R (1999) Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumor xenografts. *Nature* 401: 670-677
23. Fraidenraich D, Stillwell E, Romero E, Wilkes D, Manova K, Basson CT, Benezra R (2004) Rescue of cardiac defects in id knockout embryos by injection of embryonic stem cells. *Science* 306: 247-252
24. Yokota Y, Mansouri A, Mori S, Sugawara S, Adachi S, Nishikawa S, Gruss P (1999) Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature* 397: 702-706
25. Lasorella A, Rothschild G, Yokota Y, Russell RG, Iavarone A (2005) Id2 mediates tumor initiation, proliferation, and angiogenesis in Rb mutant mice. *Mol Cell Biol* 25: 3563-3574
26. Mori S, Nishikawa SI, Yokota Y (2000) Lactation defect in mice lacking the helix-loop-helix inhibitor Id2. *EMBO J* 19: 5772-5781
27. Yun K, Mantani A, Garel S, Rubenstein J, Israel MA (2004) Id4 regulates neural progenitor proliferation and differentiation in vivo. *Development* 131: 5441-5448
28. Bedford L, Walker R, Kondo T, van Cruchten I, King ER, Sablitzky F (2005) Id4 is required for the correct timing of neural differentiation. *Dev Biol* 280: 386-395
29. Richter J, Schlesner M, Hoffmann S, Kreuz M, Leich E, Burkhardt B, Rosolowski M, Ammerpohl O, Wagener R, Bernhart SH, Lenze D, Szczepanowski M, Paulsen M, Lipinski S, Russell RB, Adam-Klages S, Apic G, Claviez A, Hasenclever D, Hovestadt V, Hornig N, Korbel JO, Kube D, Langenberger D, Lawrenz C, Lisfeld J, Meyer K, Picelli S, Pischmarov J, Radlwimmer B, Rausch T, Rohde M, Schilhabel M, Scholtysik R, Spang R, Trautmann H, Zenz T, Borkhardt A, Drexler HG, Moller P, MacLeod RA, Pott C, Schreiber S, Trumper L, Loeffler M, Stadler PF, Lichter P, Eils R, Kuppers R, Hummel M, Klapper W, Rosenstiel P, Rosenwald A, Brors B, Siebert R, Project IM-S (2012) Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. *Nat Genet* 44: 1316-1320
30. Tournay O, Benezra R (1996) Transcription of the dominant-negative helix-loop-helix protein Id1 is regulated by a protein complex containing the immediate-early response gene Egr-1. *Mol Cell Biol* 16: 2418-2430
31. Bain G, Cravatt CB, Loomans C, Alberola-Ila J, Hedrick SM, Murre C (2001) Regulation of the helix-loop-helix proteins, E2A and Id3, by the Ras-ERK MAPK cascade. *Nat Immunol* 2: 165-171
32. Swarbrick A, Akerfeldt MC, Lee CS, Sergio CM, Caldon CE, Hunter LJ, Sutherland RL, Musgrove EA (2005) Regulation of cyclin expression and cell cycle progression in breast epithelial cells by the helix-loop-helix protein Id1. *Oncogene* 24: 381-389
33. Light W, Vernon AE, Lasorella A, Iavarone A, LaBonne C (2005) Xenopus Id3 is required downstream of Myc for the formation of multipotent neural crest progenitor cells. *Development* 132: 1831-1841
34. Lee TK, Man K, Ling MT, Wang XH, Wong YC, Lo CM, Poon RT, Ng IO, Fan ST (2003) Over-expression of Id-1 induces cell proliferation in hepatocellular carcinoma through inactivation of p16INK4a/RB pathway. *Carcinogenesis* 24: 1729-1736
35. Wilson JW, Deed RW, Inoue T, Balzi M, Becciolini A, Faraoni P, Potten CS, Norton JD (2001) Expression of Id helix-loop-helix proteins in colorectal adenocarcinoma correlates with p53 expression and mitotic index. *Cancer Res* 61: 8803-8810
36. Weisz L, Zalcenstein A, Stambolsky P, Cohen Y, Goldfinger N, Oren M, Rotter V (2004) Transactivation of the EGR1 gene contributes to mutant p53 gain of function. *Cancer Res* 64: 8318-8327
37. Lasorella A, Stegmüller J, Guardavaccaro D, Liu G, Carro MS, Rothschild G, de la Torre-Ubieta L, Pagano M, Bonni A, Iavarone A (2006) Degradation of Id2 by the anaphase-promoting complex couples cell cycle exit and axonal growth. *Nature* 442: 471-474
38. Williams SA, Maecker HL, French DM, Liu J, Gregg A, Silverstein LB, Cao TC, Carano RA, Dixit VM (2011) USP1 deubiquitinates ID proteins to preserve a mesenchymal stem cell program in osteosarcoma. *Cell* 146: 918-930
39. Anido J, Saez-Borderias A, Gonzalez-Junca A, Rodon L, Folch G, Carmona MA, Prieto-Sanchez RM, Barba I, Martinez-Saez E, Prudkin L, Cuatras I, Raventos C, Martinez-Ricarte F, Poca MA, Garcia-Dorado D, Lahn MM, Yingling JM, Rodon J, Sahuquillo J, Baselga J, Seoane J (2010) TGF-beta Receptor Inhibitors Target the CD44(high)/Id1(high) Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma. *Cancer Cell* 18: 655-668
40. Niola F, Zhao X, Singh D, Sullivan R, Castano A, Verrico A, Zoppoli P, Friedmann-Morvinski D, Sulman E, Barrett L, Zhuang Y, Verma I, Benezra R, Aldape K, Iavarone A, Lasorella A (2013) Mesenchymal high-grade glioma is maintained by the ID-RAP1 axis. *J Clin Invest* 123: 405-417

41. O'Brien CA, Kreso A, Ryan P, Hermans KG, Gibson L, Wang Y, Tsatsanis A, Gallinger S, Dick JE (2012) ID1 and ID3 regulate the self-renewal capacity of human colon cancer-initiating cells through p21. *Cancer Cell* 21: 777-792
42. Kim H, Chung H, Kim HJ, Lee JY, Oh MY, Kim Y, Kong G (2008) Id-1 regulates Bcl-2 and Bax expression through p53 and NF-kappaB in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 112: 287-296
43. Lin J, Guan Z, Wang C, Feng L, Zheng Y, Caicedo E, Bearth E, Peng JR, Gaffney P, Ondrey FG (2010) Inhibitor of differentiation 1 contributes to head and neck squamous cell carcinoma survival via the NF-kappaB/survivin and phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathways. *Clin Cancer Res* 16: 77-87
44. Swarbrick A, Roy E, Allen T, Bishop JM (2008) Id1 cooperates with oncogenic Ras to induce metastatic mammary carcinoma by subversion of the cellular senescence response. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 5402-5407
45. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, Massague J (2005) Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436: 518-524
46. Shuno Y, Tsuno NH, Okaji Y, Tsuchiya T, Sakurai D, Nishikawa T, Yoshikawa N, Sasaki K, Hongo K, Tsurita G, Sunami E, Kitayama J, Tokunaga K, Takahashi K, Nagawa H (2010) Id1/Id3 knockdown inhibits metastatic potential of pancreatic cancer. *J Surg Res* 161: 76-82
47. Tsuchiya T, Okaji Y, Tsuno NH, Sakurai D, Tsuchiya N, Kawai K, Yazawa K, Asakage M, Yamada J, Yoneyama S, Kitayama J, Osada T, Watanabe T, Tokunaga K, Takahashi K, Nagawa H (2005) Targeting Id1 and Id3 inhibits peritoneal metastasis of gastric cancer. *Cancer Sci* 96: 784-790
48. Teng Y, Zhao L, Zhang Y, Chen W, Li X (2014) Id-1, a protein repressed by miR-29b, facilitates the TGFbeta1-induced epithelial-mesenchymal transition in human ovarian cancer cells. *Cell Physiol Biochem* 33: 717-730
49. Cheung PY, Yip YL, Tsao SW, Ching YP, Cheung AL (2011) Id-1 induces cell invasiveness in immortalized epithelial cells by regulating cadherin switching and Rho GTPases. *J Cell Biochem* 112: 157-168
50. Stankic M, Pavlovic S, Chin Y, Brogi E, Padua D, Norton L, Massague J, Benezra R (2013) TGF-beta-Id1 signaling opposes Twist1 and promotes metastatic colonization via a mesenchymal-to-epithelial transition. *Cell Rep* 5: 1228-1242
51. Benezra R, Rafii S, Lyden D (2001) The Id proteins and angiogenesis. *Oncogene* 20: 8334-8341
52. Jin X, Yin J, Kim SH, Sohn YW, Beck S, Lim YC, Nam DH, Choi YJ, Kim H (2011) EGFR-AKT-Smad signaling promotes formation of glioma stem-like cells and tumor angiogenesis by ID3-driven cytokine induction. *Cancer Res* 71: 7125-7134
53. Russell RG, Lasorella A, Dettin LE, Iavarone A (2004) Id2 drives differentiation and suppresses tumor formation in the intestinal epithelium. *Cancer Res* 64: 7220-7225
54. Renne C, Martin-Subero JI, Eickernjager M, Hansmann ML, Kuppers R, Siebert R, Brauner A (2006) Aberrant expression of ID2, a suppressor of B-cell-specific gene expression, in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 169: 655-664
55. Dong HJ, Jang GB, Lee HY, Park SR, Kim JY, Nam JS, Hong IS (2016) The Wnt/beta-catenin signaling/Id2 cascade mediates the effects of hypoxia on the hierarchy of colorectal-cancer stem cells. *Sci Rep* 6: 22966
56. Coma S, Amin DN, Shimizu A, Lasorella A, Iavarone A, Klagsbrun M (2010) Id2 promotes tumor cell migration and invasion through transcriptional repression of semaphorin 3F. *Cancer Res* 70: 3823-3832
57. Zhou JP, Gao ZL, Zhou ML, He MY, Xu XH, Tao DT, Yang CC, Liu LK (2015) Snail interacts with Id2 in the regulation of TNF-alpha-induced cancer cell invasion and migration in OSCC. *Am J Cancer Res* 5: 1680-1691
58. Coppe JP, Itahana Y, Moore DH, Bennington JL, Desprez PY (2004) Id-1 and Id-2 proteins as molecular markers for human prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 10: 2044-2051
59. Rollin J, Blechet C, Regina S, Tenenhaus A, Guyetant S, Gidrol X (2009) The intracellular localization of ID2 expression has a predictive value in non small cell lung cancer. *PLoS One* 4: e4158
60. Zhao Z, He H, Wang C, Tao B, Zhou H, Dong Y, Xiang J, Wang L, Luo C, Lu Y, Yu X (2015) Downregulation of Id2 increases chemosensitivity of glioma. *Tumour Biol* 36: 4189-4196
61. Li K, Yao L, Chen L, Cao ZG, Yu SJ, Kuang XY, Hu X, Shao ZM (2014) ID2 predicts poor prognosis in breast cancer, especially in triple-negative breast cancer, and inhibits E-cadherin expression. *Oncotargets Ther* 7: 1083-1094
62. Meng Y, Gu C, Wu Z, Zhao Y, Si Y, Fu X, Han W (2009) Id2 promotes the invasive growth of MCF-7 and SKOV-3 cells by a novel mechanism independent of dimerization to basic helix-loop-helix factors. *BMC Cancer* 9: 75
63. Itahana Y, Singh J, Sumida T, Coppe JP, Parrinello S, Bennington JL, Desprez PY (2003) Role of Id-2 in the maintenance of a differentiated and noninvasive phenotype in breast cancer cells. *Cancer Res* 63: 7098-7105
64. Stighall M, Manetopoulos C, Axelson H, Landberg G (2005) High ID2 protein expression correlates with a favourable prognosis in patients with primary breast cancer and reduces cellular invasiveness of breast cancer cells. *Int J Cancer* 115: 403-411
65. Noetzel E, Veeck J, Niederacher D, Galm O, Horn F, Hartmann A, Knuchel R, Dahl E (2008) Promoter methylation-associated loss of ID4 expression is a marker of tumour recurrence in human breast cancer. *BMC Cancer* 8: 154
66. Patel D, Knowell AE, Korang-Yeboah M, Sharma P, Joshi J, Glymph S, Chinaranagari S, Nagappan P, Palaniappan R, Bowen NJ, Chaudhary J (2014) Inhibitor of differentiation 4 (ID4) inactivation promotes de novo steroidogenesis and castration-resistant prostate cancer. *Mol Endocrinol* 28: 1239-1253
67. Umetani N, Takeuchi H, Fujimoto A, Shinozaki M, Bilchik AJ, Hoon DS (2004) Epigenetic inactivation of ID4 in colorectal carcinomas correlates with poor differentiation and unfavorable prognosis. *Clin Cancer Res* 10: 7475-7483
68. Vinarskaja A, Goering W, Ingenwerth M, Schulz WA (2012) ID4 is frequently downregulated and partially hypermethylated in prostate cancer. *World J Urol* 30: 319-325
69. Yu L, Liu C, Vandeusen J, Becknell B, Dai Z, Wu YZ, Raval A, Liu TH, Ding W, Mao C, Liu S, Smith LT, Lee S, Rassenti L, Marcucci G, Byrd J, Caligiuri MA, Plass C (2005) Global assessment of promoter methylation in a mouse model of cancer identifies ID4 as a putative tumor-suppressor gene in human leukemia. *Nat Genet* 37: 265-274
70. Chinaranagari S, Sharma P, Chaudhary J (2014) EZH2 dependent H3K27me3 is involved in epigenetic silencing of ID4 in prostate cancer. *Oncotarget* 5: 7172-7182
71. Umetani N, Mori T, Koyanagi K, Shinozaki M, Kim J, Giuliano AE, Hoon DS (2005) Aberrant hypermethylation of ID4 gene promoter region increases risk of lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Oncogene* 24: 4721-4727
72. Peretz Y, Wu H, Patel S, Bellacosa A, Katz RA (2015) Inhibitor of DNA Binding 4 (ID4) Is Highly Expressed in Human Melanoma Tissues and May Function to Restrict Normal Differentiation of Melanoma Cells. *PLoS One* 10: e0116839
73. Martini M, Cenci T, D'Alessandris GQ, Cesarini V, Cocomazzi A, Ricci-Vitiani L, De Maria R, Pallini R, Larocca LM (2013) Epigenetic silencing of Id4 identifies a glioblastoma subgroup with a better prognosis as a consequence of an inhibition of angiogenesis. *Cancer* 119: 1004-1012
74. Wen YH, Ho A, Patil S, Akram M, Catalano J, Eaton A, Norton L, Benezra R, Brogi E (2012) Id4 protein is highly expressed in triple-negative breast carcinomas: possible implications for BRCA1 downregulation. *Breast Cancer Res Treat* 135: 93-102
75. Beger C, Pierce LN, Kruger M, Marcusson EG, Robbins JM, Welch P, Welch PJ, Welte K, King MC, Barber JR, Wong-Staal F (2001) Identification of Id4 as a regulator of BRCA1 expression by using a ribozyme-library-based inverse genomics approach. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 130-135

76. Crippa E, Lusa L, De Cecco L, Marchesi E, Calin GA, Radice P, Manoukian S, Peissel B, Daidone MG, Gariboldi M, Pierotti MA (2014) miR-342 regulates BRCA1 expression through modulation of ID4 in breast cancer. *PLoS One* 9: e87039
77. Jeon HM, Sohn YW, Oh SY, Kim SH, Beck S, Kim S, Kim H (2011) ID4 imparts chemoresistance and cancer stemness to glioma cells by derepressing miR-9*-mediated suppression of SOX2. *Cancer Res* 71: 3410-3421
78. Junankar S, Baker LA, Roden DL, Nair R, Elsworth B, Gallego-Ortega D, Lacaze P, Cazet A, Nikolic I, Teo WS, Yang J, McFarland A, Harvey K, Naylor MJ, Lakhani SR, Simpson PT, Raghavendra A, Saunus J, Madore J, Kaplan W, Ormandy C, Millar EK, O'Toole S, Yun K, Swarbrick A (2015) ID4 controls mammary stem cells and marks breast cancers with a stem cell-like phenotype. *Nat Commun* 6: 6548
79. Fontemaggi G, Dell'Orso S, Trisciuglio D, Shay T, Melucci E, Fazi F, Terrenato I, Mottolise M, Muti P, Domany E, Del Bufalo D, Strano S, Blandino G (2009) The execution of the transcriptional axis mutant p53, E2F1 and ID4 promotes tumor neo-angiogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 16: 1086-1093
80. Ren Y, Cheung HW, von Maltzhan G, Agrawal A, Cowley GS, Weir BA, Boehm JS, Tamayo P, Karst AM, Liu JF, Hirsch MS, Mesirov JP, Drapkin R, Root DE, Lo J, Fogal V, Ruoslahti E, Hahn WC, Bhatia SN (2012) Targeted tumor-penetrating siRNA nanocomplexes for credentialing the ovarian cancer oncogene ID4. *Sci Transl Med* 4: 147ra112
81. Gray MJ, Dallas NA, Van Buren G, Xia L, Yang AD, Somcio RJ, Gaur P, Mangala LS, Vivas-Mejia PE, Fan F, Sanguino AM, Gallick GE, Lopez-Berestein G, Sood AK, Ellis LM (2008) Therapeutic targeting of Id2 reduces growth of human colorectal carcinoma in the murine liver. *Oncogene* 27: 7192-7200
82. Henke E, Perk J, Vider J, de Candia P, Chin Y, Solit DB, Ponomarev V, Cartegni L, Manova K, Rosen N, Benezra R (2008) Peptide-conjugated antisense oligonucleotides for targeted inhibition of a transcriptional regulator in vivo. *Nat Biotechnol* 26: 91-100
83. Soroceanu L, Murase R, Limbad C, Singer E, Allison J, Adrados I, Kawamura R, Pakdel A, Fukuyo Y, Nguyen D, Khan S, Arauz R, Yount GL, Moore DH, Desprez PY, McAllister SD (2013) Id-1 is a key transcriptional regulator of glioblastoma aggressiveness and a novel therapeutic target. *Cancer Res* 73: 1559-1569
84. Mistry H, Hsieh G, Buhrlage SJ, Huang M, Park E, Cuny GD, Galinsky I, Stone RM, Gray NS, D'Andrea AD, Parmar K (2013) Small-molecule inhibitors of USP1 target ID1 degradation in leukemic cells. *Mol Cancer Ther* 12: 2651-2662
85. Ciarapica R, Annibali D, Raimondi L, Savino M, Nasi S, Rota R (2009) Targeting Id protein interactions by an engineered HLH domain induces human neuroblastoma cell differentiation. *Oncogene* 28: 1881-1891
86. Chen CH, Kuo SC, Huang LJ, Hsu MH, Lung FD (2010) Affinity of synthetic peptide fragments of MyoD for Id1 protein and their biological effects in several cancer cells. *J Pept Sci* 16: 231-241
87. Mern DS, Hasskarl J, Burwinkel B (2010) Inhibition of Id proteins by a peptide aptamer induces cell-cycle arrest and apoptosis in ovarian cancer cells. *Br J Cancer* 103: 1237-1244
88. Mern DS, Hoppe-Seyler K, Hoppe-Seyler F, Hasskarl J, Burwinkel B (2010) Targeting Id1 and Id3 by a specific peptide aptamer induces E-box promoter activity, cell cycle arrest, and apoptosis in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 124: 623-633
89. Tang R, Hirsch P, Fava F, Lapusan S, Marzac C, Teyssandier I, Pardo J, Marie JP, Legrand O (2009) High Id1 expression is associated with poor prognosis in 237 patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 114: 2993-3000
90. Sun W, Guo MM, Han P, Lin JZ, Liang FY, Tan GM, Li HB, Zeng M, Huang XM (2012) Id-1 and the p65 subunit of NF- κ B promote migration of nasopharyngeal carcinoma cells and are correlated with poor prognosis. *Carcinogenesis* 33: 810-817
91. Ding Y, Wang G, Ling MT, Wong YC, Li X, Na Y, Zhang X, Chua CW, Wang X, Xin D (2006) Significance of Id-1 up-regulation and its association with EGFR in bladder cancer cell invasion. *Int J Oncol* 28: 847-854
92. Chen D, Forootan SS, Gosney JR, Forootan FS, Ke Y (2014) Increased expression of Id1 and Id3 promotes tumorigenicity by enhancing angiogenesis and suppressing apoptosis in small cell lung cancer. *Genes Cancer* 5: 212-225
93. Sharma P, Patel D, Chaudhary J (2012) Id1 and Id3 expression is associated with increasing grade of prostate cancer: Id3 preferentially regulates CDKN1B. *Cancer Med* 1: 187-197
94. Luo KJ, Wen J, Xie X, Fu JH, Luo RZ, Wu QL, Hu Y (2012) Prognostic relevance of Id-1 expression in patients with resectable esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg* 93: 1682-1688
95. Luo M, Li Z, Wang W, Zeng Y, Liu Z, Qiu J (2013) Upregulated H19 contributes to bladder cancer cell proliferation by regulating ID2 expression. *FEBS J* 280: 1709-1716
96. Lee SH, Hao E, Kiselyuk A, Shapiro J, Shields DJ, Lowy A, Levine F, Itkin-Ansari P (2011) The Id3/E47 axis mediates cell-cycle control in human pancreatic ducts and adenocarcinoma. *Mol Cancer Res* 9: 782-790
97. Yang HY, Liu HL, Liu GY, Zhu H, Meng QW, Qu LD, Liu LX, Jiang HC (2011) Expression and prognostic values of Id-1 and Id-3 in gastric adenocarcinoma. *J Surg Res* 167: 258-266

ID proteins in tumour initiation and progression

Magdalena Pruszek^{1,2,✉}, Alicja Żylicz¹

¹International Institute of Molecular and Cell Biology in Warsaw, 4 Ksiecia Trojdena St., 02-109 Warsaw, Poland

²Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, 5a Pawlinskiego St., 02-106 Warszawa, Poland

✉e-mail: mpruszek@iimcb.gov.pl

Key words: ID proteins, bHLH transcription factors, cancer stem cells

ABSTRACT

Despite decades of cancer research, the search for key oncogenesis regulators as potential targets for novel therapies continues. Proteins, belonging to ID family, may be such promising candidates. They are DNA binding inhibitors, mainly of the bHLH transcription factor subfamily, which regulate genes related to cell differentiation. ID genes are normally expressed in progenitor and stem cells inhibiting their differentiation. Nevertheless, in some cases the expression of ID genes was observed to direct cell maturation process. In tumors ID proteins manifest hallmarks of both oncogenes and tumor suppressors, depending on the affected organ. As a consequence of deregulated signaling pathways occurring in cancers, ID genes may be overexpressed or silenced. In effect, abnormal levels of ID proteins invariably lead to de-differentiation of cancer cells and give them the characteristics of stem cells, such as the ability for self-renewal, avoidance of apoptosis and senescence. Moreover, ID proteins take part in metastasis and angiogenesis. The involvement of ID proteins in carcinogenesis encourages to further investigate their mechanisms of action and implement this knowledge in the design of new drugs.