

## ОНКОСУПРЕССОР p63 РЕГУЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ УБИКВИТИНЛИГАЗЫ Pirh2

© А. А. Дакс,<sup>1</sup> А. В. Петухов,<sup>1,2</sup> О. Ю. Шувалов,<sup>1</sup> Е. А. Васильева,<sup>1</sup>  
Д. Мелино,<sup>3</sup> Н. А. Барлев,<sup>1,\*</sup> О. А. Федорова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,

<sup>2</sup> Институт гематологии Северо-Западного федерального медицинского  
исследовательского центра им. В. А. Алмазова Министерства здравоохранения РФ,  
Санкт-Петербург, 197341, и <sup>3</sup> Университет Лейстера, Лейстер, Великобритания;

\* электронный адрес: [nick.a.barlev@gmail.com](mailto:nick.a.barlev@gmail.com)

Онкосупрессор p63 является транскрипционным фактором, относящимся к семейству белков p53. Известно, что белки данного семейства, а именно p53, p63 и p73, помимо специфических функций в развитии тканей и органов выполняют ряд общих онкосупрессорных функций, связанных с регуляцией клеточного цикла, апоптоза и опухолевой трансформации клеток. Все белки семейства p53 регулируются на посттрансляционном уровне за счет убиквитинирования с помощью E3-лигаз и последующей протеасомной деградации. Экспрессия большинства E3-убиквитинлигаз, модифицирующих белки семейства p53, регулируется теми же белками, тем самым формируя с ними обратную отрицательную связь. В настоящей работе мы впервые показали, что экспрессия гена *PIRH2* (*RCHY1*), продукт которого убиквитинирует все три члена семейства p53, также регулируется p63. Регуляция экспрессии *PIRH2* происходит на уровне транскрипции исключительно полноразмерной изоформой TAp63, но не изоформой с отсутствующим транскрипционным доменом —  $\Delta Np63$ .

Ключевые слова: p63, p53, протеасомная деградация, E3-убиквитинлигаза Pirh2.

Белок p63 кодируется геном *TP63* и относится к семейству белков p53, включающему в себя транскрипционные факторы p53, p63 и p73. Эти белки являются структурными гомологами и включают в себя аминоконцевой транскрипционный домен (TA), центральный ДНК-связывающий домен (DBD) и карбокси-концевой олигомеризационный домен (OD). Благодаря высокой степени гомологии эти белки способны образовывать гетеродимеры, связываться с общими генами-мишенями и участвовать в регуляции таких ключевых клеточных процессов, как апоптоз, остановка клеточного цикла и ответ на генотоксический стресс. Для трех белков этого семейства известны такие общие мишени, как проапоптотические гены *PUMA* и *NOXA* (Kerr et al., 2012), а также *p21WAF-1* и *GADD45*, ответственные за остановку клеточного цикла и репарацию ДНК (Lee, La Thangue, 1999). Все три белка семейства имеют множество изоформ, образующихся за счет альтернативного сплайсинга, альтернативной инициации трансляции и наличия нескольких промоторов.

Белок p63 имеет две N-концевые изоформы: полноразмерную изоформу TAp63 и изоформу с отсутствующим транскрипционным доменом —  $\Delta Np63$ . Показано, что изоформа TAp63 выполняет в клетках типичные для семейства p53 функции проапоптотического транскрипционного фактора, а именно индуцирует апоптоз (Gresner et al., 2005; Suh et al., 2006) и препятствует продвижению клетки по клеточному циклу (Gallegos et al., 2008).

Изначально считалось, что  $\Delta Np63$  является транскрипционно неактивной по причине отсутствия аминоконцевого транскрипционного домена (Yang et al.,

1998), однако позже было показано, что именно эта изоформа способна активировать экспрессию генов-мишеней в кератиноцитах и является ключевым регулятором развития и дифференцировки эпителиальных тканей (Mills et al., 1999; Yang et al., 1999).

В регуляции активности всех трех белков семейства p53 важнейшую роль играют убиквитинлигазы (Marouso et al., 2013). Основным негативным регулятором p53 и, как было показано позднее, p73 является убиквитинлигаза MDM2 (Ongkeko et al., 1999; Kadakia et al., 2001; Дакс и др., 2013).

К настоящему времени также известно, что E3-убиквитинлигаза Pirh2, содержащая RING-домен, продукт гена *RCHY1* человека, способна модифицировать не только p53, но также p63 (Jung et al., 2013; Yan et al., 2013) и p73 (Jung et al., 2011) и тем самым способствовать их протеасомной деградации. Важно отметить, что транскрипция *PIRH2* активируется белком p53, что приводит к убиквитинзависимой деградации последнего. Таким образом, формируется петля обратной регуляции между p53 и Pirh2 (см обзор: Дакс и др., 2013). Важно отметить, что многие типы раковых опухолей, например рак легкого, рак предстательной железы и гепатоклеточная карцинома, характеризуются повышенным уровнем экспрессии Pirh2 (Logan et al., 2006; Shimada et al., 2009). При этом механизмы его регуляции в настоящее время изучены недостаточно.

Целью данной работы являлось определить зависимость экспрессии онкосупрессора p63 и убиквитинлигазы Pirh2.

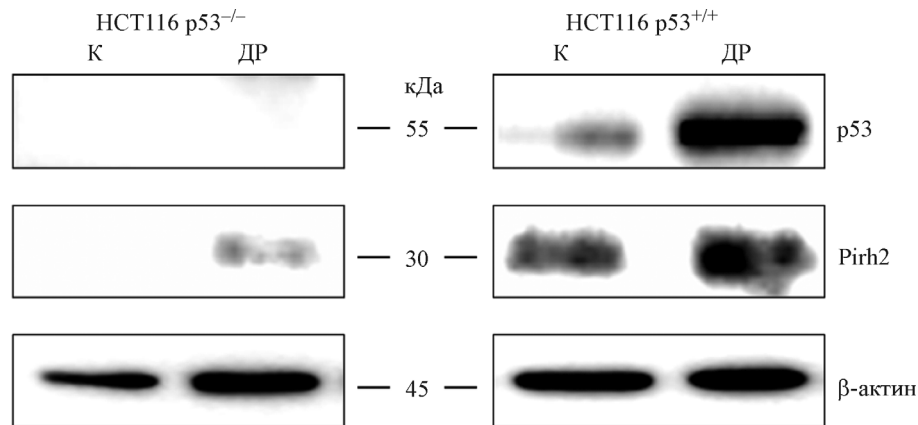


Рис. 1. Влияние стабилизации белка p53 на уровень белка Pirh2 в клетках линий НСТ116 с разным статусом p53 (клетки линий НСТ116 p53<sup>-/-</sup> и НСТ116 p53<sup>+/+</sup>) после обработки доксорубицином (ДР, мкМ в течение 9 ч). Вестерн-блот-анализ.

К — контроль, β-актин — контроль нагрузки.

В ходе настоящей работы мы установили, что экспрессия белка Pirh2 активируется транскрипционно-активной полноразмерной изоформой белка p63.

### Материал и методика

В работе использовали клеточные линии рака толстой кишки человека: НСТ116 p53<sup>+/+</sup> (экспрессируют ген *TP53* дикого типа) и НСТ116 p53<sup>-/-</sup> (делеция по гену *TP53*), а также клеточные линии остеосаркомы человека Saos2 со встроенной Tet-on-системой, регулирующей экспрессию белков TArp63 (клетки Saos2-TArp63) или ΔNp63 (клетки Saos2-ΔNp63), при добавлении доксицилина (4 мкг/мл) (Gressner et al., 2005). Клеточные линии культивировали при 37 °С в среде DMEM (Invitrogen, США), содержащей 10 % сыворотки (HyClone, США), в присутствии смеси пенициллина и стрептомицина (Биолот, Россия). Для проведения иммуноблотинга белки разделяли с помощью 13%-ного ПААГ в денатурирующих условиях. Белки переносили на PVDF-мембрану, которую затем инкубировали с соответствующими первичными антителами. В работе использовали следующие первичные антитела: против Pirh2 (Abcam, Великобритания, разведение 1 : 1000), против НА-эпитопа (Covance, США, разведение 1 : 1000), против p53 (Millipore, Германия, разведение 1 : 1000) и против β-актина (Sigma Aldrich, США, разведение 1 : 5000). Для оценки уровня экспрессии Pirh2 использовали метод количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Для этого тотальную РНК экстрагировали из клеток Saos2-TArp63 и Saos2-ΔNp63 после обработки доксицилином (4 мкг/мл) с использованием реагента Trizol (ThermoFisher, Латвия) согласно инструкции фирмы-производителя. Синтез кДНК осуществляли с помощью набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (ThermoFisher, Латвия) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Амплификацию проводили на приборе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Для анализа экспрессии генов *PIRH2* и *GAPDH* использовали следующие праймеры: к *PIRH2* прямой TATCCTGGGGGAAGGATCGG и обратный ACAGCAAGGTGCCTTTAGGA, к *GAPDH* прямой GAGGTCAATGAAGGGGTCAT и обратный AGTCAACG-GATTTGGTCGTA.

### Результаты и обсуждение

Белок p53 активирует экспрессию Pirh2 в клетках линии рака толстой кишки человека НСТ116. Ранее было показано, что уровень мРНК и белка Pirh2 в клетках увеличивается в результате стабилизации транскрипционного фактора p53 (Leng et al., 2003). Для подтверждения этих данных мы использовали клетки изогенных линий рака толстой кишки человека НСТ116, различающиеся по статусу p53: клетки НСТ116 p53<sup>+/+</sup> и НСТ116 p53<sup>-/-</sup>. После обработки клеток обеих линий ДНК-повреждающим агентом доксорубицином в концентрации 0.5 мкМ в течение 9 ч мы наблюдали в клетках НСТ116 p53<sup>+/+</sup> стабилизацию белка p53 (рис. 1). Как видно из представленных данных, более высокий изначальный уровень и значительное накопление Pirh2 в результате генотоксического стресса наблюдались преимущественно в линии p53<sup>+/+</sup> по сравнению с линией p53<sup>-/-</sup>, что подтверждает данные о p53-зависимой активации экспрессии белка Pirh2.

TArp63 стабилизирует Pirh2 на уровне белка. Так как белки семейства p53 имеют высокую структурную гомологию и способны связываться с одинаковыми промоторными областями генов-мишеней, мы предположили, что транскрипционный фактор p63 может активировать и экспрессию гена *PIRH2*. Для проверки этого предположения мы использовали клетки линий остеосаркомы человека Saos2 с индуцируемой тетрациклином экспрессией двух изоформ белка p63 (с Tet-on-системой): Saos2-TArp63, экспрессирующие полноразмерную транскрипционно активную изоформу белка p63, и Saos2-ΔNp63, экспрессирующие изоформу белка p63 с отсутствующим трансактивационным доменом.

После индукции доксициклином экспрессии белка p63 в клетках обеих линий в течение 9, 16 и 24 ч стабилизацию белка Pirh2 наблюдали только в клетках, экспрессирующих полноразмерную изоформу TArp63 (рис. 2, a). Полученные нами данные согласуются с ранее опубликованными сообщениями о том, что только изоформа TArp63, имеющая трансактивационный домен, способна активировать гены-мишени p53 и, таким образом, компенсировать его функции (Cam et al., 2014).

TArp63 активирует экспрессию гена, кодирующего Pirh2, на уровне мРНК. Наблюдае-

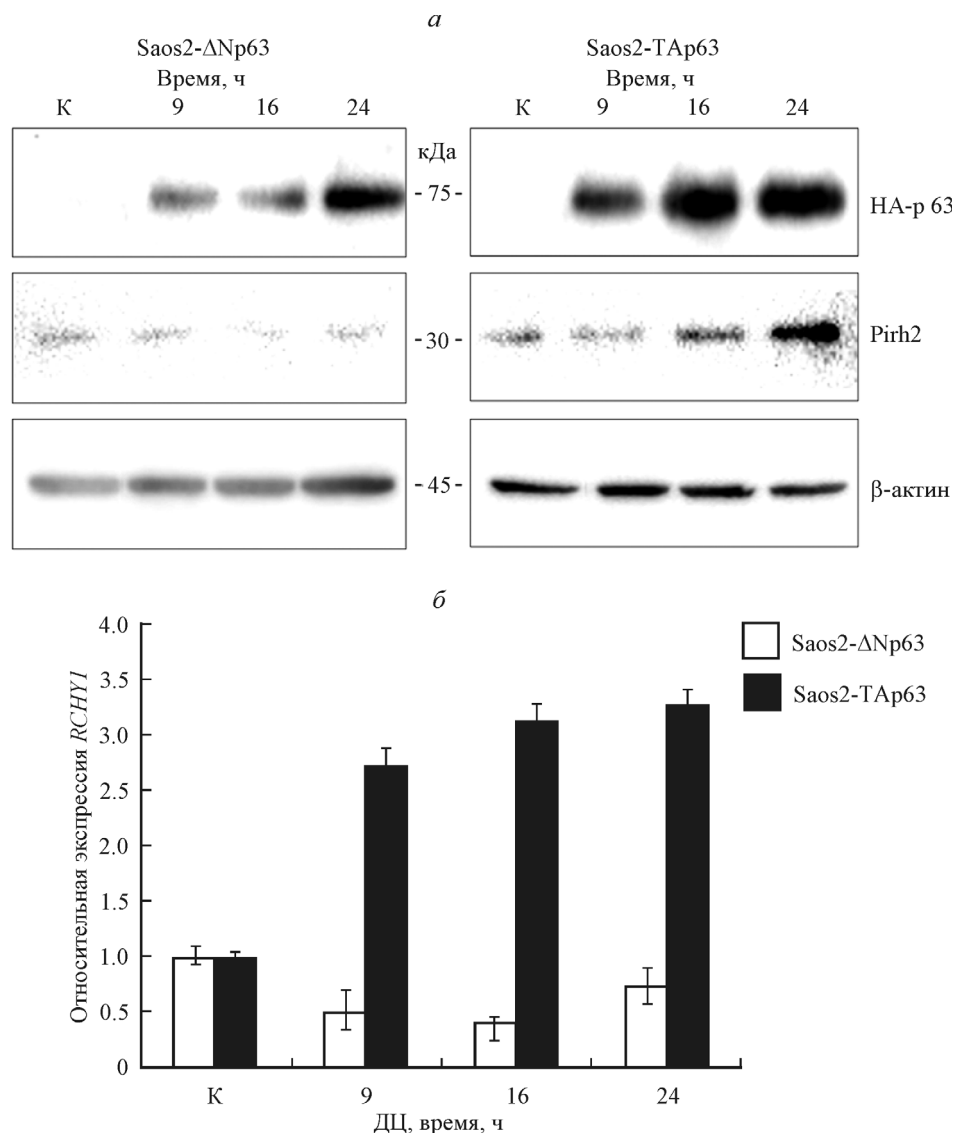


Рис. 2. Активация экспрессии белка Pirh2 под влиянием транскрипционного фактора p53.

*а* — вестерн-блот-анализ изоформ ΔТр63, ТАр63 и Pirh2 в клетках линий Saos Tet on (клетки Saos2-ТАр63 и Saos2-ΔТр63) после индукции экспрессии изоформ с помощью обработки клеток 4 мкг/мл доксицилина (ДВ) в течение 9, 16 и 24 ч. К — контроль, β-актин — контроль нагрузки. *б* — сравнение уровня экспрессии гена *RCHY1*, кодирующего белок Pirh2, на уровне мРНК (количественная ОТ-ПЦР в реальном времени) в этих же клетках и после индукции экспрессии изоформ обработкой 4 мкг/мл ДЦ в течение 9, 16 и 24 ч. Вертикальными отрезками обозначены величины стандартного отклонения.

мый эффект повышенной экспрессии Pirh2 за счет ТАр63 может быть опосредован как повышенной транскрипцией, так и посттрансляционными механизмами. В связи с этим мы провели ОТ-ПЦР в реальном времени для определения количества мРНК *PIRH2* в клетках линий Saos2-ТАр63 и Saos2-ΔNp63 после индукции доксицилином. Как видно на рис. 2, *б*, относительное количество мРНК *PIRH2* повышается только в ответ на активацию ТАр63, но не ΔNp63. Эти данные свидетельствуют о том, что ген, кодирующий белок Pirh2, является транскрипционной мишенью активной изоформы ТАр63.

Таким образом, нам удалось установить альтернативный p53-независимый механизм регуляции экспрессии белка Pirh2 за счет p63, что является примером пересечения функций белков семейства p53.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследо-

ваний (проект 14-04-32242) и Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

#### Список литературы

- Дакс А. А., Мелино Д., Барлев Н. А. 2013. Роль различных E3-убиквитинлигаз в регуляции активности онкосупрессора p53. Цитология. 55 (10) : 673—687. (Daks A. A., Melino D., Barlev N. A. 2013. The role of different E3 ubiquitin ligases in regulation of the P53 tumor suppressor protein. Tsitologiya. 55 (10) : 673—687.)
- Cam M., Bid H. K., Xiao L., Zambetti G. P., Houghton P. J., Cam H. 2014. p53/TAp63 and AKT regulate mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling through two independent parallel pathways in the presence of DNA damage. J. Biol. Chem. 289 : 4083—4094.
- Gallegos J. R., Litersky J., Lee H., Sun Y., Nakayama K., Nakayama K., Lu H. 2008. SCFβTrCP1 activates and ubiquitylates TAp63γ. J. Biol. Chem. 283 : 66—75.

- Gressner O., Schilling T., Lorenz K., Schleithoff E. S., Koch A., Schulze-Bergkamen H., Muller M. 2005. TAp63 $\alpha$  induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *EMBO J.* 24 : 2458—2471.
- Jung Y. S., Qian Y., Chen X. 2011. The p73 tumor suppressor is targeted by Pirh2 RING finger E3 ubiquitin ligase for the proteasome-dependent degradation. *J. Biol. Chem.* 286 : 35 388—35 395.
- Jung Y. S., Qian Y., Yan W., Chen X. 2013. Pirh2 E3 ubiquitin ligase modulates keratinocyte differentiation through p63. *J. Invest. Dermatol.* 133 : 1178—1187.
- Kadakia M., Slader C., Berberich S. J. 2001. Regulation of p63 function by Mdm2 and MdmX. *DNA Cell Biol.* 20 : 321—330.
- Kerr J. B., Hutt K. J., Michalak E. M., Cook M., Vandenberg C. J., Liew S. H., Strasser A. 2012. DNA damage-induced primordial follicle oocyte apoptosis and loss of fertility require TAp63-mediated induction of Puma and Noxa. *Mol. Cell.* 48 : 343—352.
- Lee C.-W., La Thangue N. B. 1999. Promoter specificity and stability control of the p53-related protein p73. *Oncogene.* 18 : 4171—4181.
- Leng R. P., Lin Y., Ma W., Wu H., Lemmers B., Chung S., Parrant J. M., Lozano G., Hakem R., Benchimol S. 2003. Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell.* 112 : 779—791.
- Logan I. R., Gaughan L., McCracken S. R., Sapountzi V., Leung H. Y., Robson C. N. 2006. Human PIRH2 enhances androgen receptor signaling through inhibition of histone deacetylase 1 and is overexpressed in prostate cancer. *Mol. Cell. Biol.* 26 : 6502—6510.
- Marouco D., Garabadgiu A. V., Melino G., Barlev N. A. 2013. Lysine-specific modifications of p53 : a matter of life and death? *Oncotarget.* 4 : 1556—1571.
- Mills A. A., Zheng B., Wang X.-J., Vogel H., Roop D. R., Bradley A. 1999. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature.* 398 : 708—713.
- Ongkeko W. M., Wang X. Q., Siu W. Y., Lau A. W., Yamashita K., Harris A. L., Cox L. S., Poon R. Y. 1999. MDM2 and MDMX bind and stabilize the p53-related protein p73. *Curr. Biol.* 9 : 829—832.
- Shimada M., Kitagawa K., Dobashi Y., Isobe T., Hattori T., Uchida C., Abe K., Kotake Y., Oda T., Suzuki H., Hashimoto K., Kitagawa M. 2009. High expression of Pirh2, an E3 ligase for p27, is associated with low expression of p27 and poor prognosis in head and neck cancers. *Cancer Sci.* 100 : 866—872.
- Suh E. K., Yang A., Kettenbach A., Bamberger C., Michaelis A. H., Zhu Z., Elvin J. A., Bronson R. T., Crum C. P., McKeon F. 2006. p63 protects the female germ line during meiotic arrest. *Nature.* 444 : 624—628.
- Yang W., Chen X., Zhang Y., Zhang J., Jung Y. S., Chen X. 2013. Arsenic suppresses cell survival via Pirh2-mediated proteasomal degradation of  $\Delta$ Np63 protein. *J. Biol. Chem.* 288 : 2907—2913.
- Yang A., Kaghad M., Wang Y., Gillett E., Fleming M. D., Dötsch V., Andrews N. C., Caput D., McKeon F. 1998. p63, a p53 homolog at 3q27—29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell.* 2 : 305—316.
- Yang A., Schweitzer R., Sun D., Kaghad M., Walker N., Bronson R. T., Tabin C., Sharpe A., Caput D., Crum C. 1999. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature.* 398 : 714—718.

Поступила 24 IX 2015

## TUMOR SUPPRESSOR p63 REGULATES EXPRESSION OF UBIQUITIN LIGASE Pirh2

A. A. Daks,<sup>1</sup> A. V. Petukhov,<sup>1,2</sup> O. Yu. Shuvalov,<sup>1</sup> E. A. Vasilieva,<sup>1</sup> G. Melino,<sup>3</sup>  
N. A. Barlev,<sup>1,\*</sup> O. A. Fedorova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg, 194064,

<sup>2</sup> Institute of Hematology, V. A. Almazov Federal North-Western Medical Research Centre, St. Petersburg, 197341,  
and <sup>3</sup> Leicester University, Leicester, Great Britain;

\* e-mail: nick.a.barlev@gmail.com

Transcription factor p63 is a member of the p53 protein family. Due to the high degree of structural similarity p53, p63, and p73 are known to have overlapping functions relating to cell cycle regulation, apoptosis and tumor transformation. Furthermore, p63 plays crucial role in epidermal tissue development and differentiation. Pirh2 (product of *RCHY1* gene) is an E3 ubiquitin ligase modifying all three members of the p53 family resulting in their subsequent proteasomal degradation. Our results demonstrate that p63, similar to p53, is able to regulate expression levels of Pirh2. Importantly, Pirh2 expression is activated only by transcriptionally active isoform of p63 — TAp63, but not the N-terminally truncated  $\Delta$ Np63.

Key words: p63, p53, proteasome degradation, E3 ubiquitin ligase.