

НЕГАТИВНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ОНКОСУПРЕССОРА p53 В КОНТЕКСТЕ НАПРАВЛЕННОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

© *О. Ю. Шувалов,¹ О. А. Федорова,¹ А. В. Петухов,^{1,2} А. А. Дакс,¹
Е. А. Васильева,¹ Т. А. Григорьева,³ Г. С. Иванов,¹ Н. А. Барлев^{1,*}*

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,

²Институт гематологии Северо-Западного федерального медицинского исследовательского центра
им. В. А. Алмазова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 197341,

и ³С.-Петербургский технологический университет, Санкт-Петербург, 190013;

* электронный адрес: nick.a.barlev@gmail.com

Белок p53 по праву считается главным онкосупрессором человека. Жизнедеятельность раковых клеток несовместима с функционированием p53-опосредуемых сигнальных путей. При этом около половины всех злокачественных опухолей экспрессируют p53 дикого типа. Основной причиной этого является повышенная экспрессия в таких опухолях p53-специфичных E3-лигаз — негативных регуляторов белка p53: Mdm2, MdmX, Pirh2 и Cop1. Фармакологическое ингибирование белком p53 белок-белковых взаимодействий с этими негативными регуляторами представляется перспективным терапевтическим направлением для опухолей, сохраняющих p53 дикого типа. В настоящее время уже разработан целый ряд химических ингибиторов для подавления взаимодействия p53 с E3-лигазами Mdm2 и MdmX. Часть из них уже находится на начальных стадиях клинических испытаний. Несмотря на то что в различных исследованиях *in vitro* и *in vivo* показана хорошая эффективность этих ингибиторов для подавления злокачественного роста, их клиническое применение может быть затруднено или ограничено за счет различных молекулярных механизмов. Эти биохимические механизмы, основанные на биологии p53 и его негативных регуляторов, являются предметом рассмотрения настоящего обзора.

Ключевые слова: p53, E3-убиквитинлигазы, убиквитинзависимая деградация, ингибиторы белок-белковых взаимодействий.

За последние 30 лет достигнут существенный прогресс в понимании механизмов развития опухолевых заболеваний. Однако, несмотря на большие достижения в создании новых химиопрепаратов, онкологические заболевания по сей день занимают лидирующее положение по показателям смертности среди населения в экономически развитых странах. Бесконтрольное деление клеток, которое приводит к злокачественным новообразованиям, часто связано с потерей функций белков-онкосупрессоров. Важнейшим онкосупрессором человека является белок p53, который функционирует как фактор транскрипции (Marocso et al., 2013). Число работ, посвященных p53, с каждым годом неуклонно растет.

Нормальное функционирование p53 летально для раковых клеток. Тем не менее около половины всех раковых опухолей экспрессируют p53 дикого типа. Это становится возможным благодаря повышенной экспрессии негативных регуляторов p53, ингибирующих его транскрипционную активность, а также вызывающих его протеасомную деградацию (Levav-Cohen et al., 2014). Транскрипционный фактор p53 является короткоживущим белком, который постоянно расщепляется с помощью протеасом. Деградация p53 протекает в основном по убиквитинзависимому механизму, хотя описаны и убиквитиннезависимые механизмы его разрушения (Tsvetkov et al., 2010; Fedorova et al., 2011). По этой причине изуче-

ние механизмов регуляции стабильности белка p53 за счет специфических убиквитинлигаз является одним из актуальных направлений фундаментальной медицины. В настоящее время известен ряд различных E3-убиквитинлигаз, специфичных для белка p53, основными из которых являются Mdm2, MdmX, Pirh2 и Cop1 (Дакс и др., 2013).

За последние несколько лет интенсивного изучения этих E3-убиквитинлигаз накопились данные о том, что они характеризуются действием на многие мишени, т. е. помимо p53 их мишенями является также большое количество других белков, среди которых есть как онкогены, так и онкосупрессоры. Таким образом, при определенных условиях p53-специфичные E3-лигазы могут обладать как онкогенными, так и онкосупрессорными свойствами. Ситуация еще более осложняется частым присутствием в раковых клетках сплайс-изоформ всех основных негативных регуляторов p53. При этом до сих пор у исследователей нет четкого понимания роли различных изоформ в регуляции клеточных процессов. Поскольку конкретный результат деятельности p53 может зависеть от клеточного контекста, имеющиеся в литературе данные, полученные на опухолях разной этиологии, являются весьма противоречивыми.

Среди различных терапевтических стратегий (Васильева и др., 2015; Shuvalov et al., 2015; Vasileva et al.,

2015) разработка путей использования низкомолекулярных ингибиторов взаимодействия p53 со своими основными негативными регуляторами занимает важное место в современной противораковой терапии и представляется весьма перспективной с фармакологической точки зрения. В настоящее время уже семь молекул-кандидатов, потенциальных ингибиторов взаимодействия Mdm2 с p53, проходят клинические испытания (Zhao et al., 2014). Однако, несмотря на то что первый ингибитор этого взаимодействия был создан еще в 2004 г., ни один из имеющихся пока не прошел далее первой стадии клинических испытаний. Одними из потенциальных причин являются сложность и недостаточная изученность клеточных процессов, протекающих с участием p53 и его основных негативных регуляторов.

В настоящем обзоре кратко обсуждаются система регуляции онкосупрессора p53, а также участие специфичных для него E3-убиквитинлигаз в протекании различных клеточных процессов. Рассматриваются также возможные биохимические причины, ограничивающие эффективность применения существующих в настоящее время низкомолекулярных ингибиторов взаимодействия p53 с E3-убиквитинлигазами Mdm2 и MdmX.

p53 — основной онкосупрессор человека

Исследования, проводимые в течение более 30 лет, наглядно демонстрируют, что p53 является основным онкосупрессором человека. Белок p53, являясь транскрипционным фактором, предохраняет организм от развития раковых клеток за счет активации экспрессии различных генов, продукты которых участвуют в регуляции клеточного цикла, репарации ДНК, инициации старения и апоптоза (Чумаков, 2007).

В нормальных условиях p53 является короткоживущим белком, который претерпевает убиквитинзависимый протеолиз в протеасомах (Mittenberg et al., 2007). При различных формах стресса, когда повреждается ДНК, активируются онкогены, возникает гипоксия и т. д., белок p53 претерпевает ряд ковалентных модификаций, включая метилирование и ацетилирование (Morgunkova, Barlev, 2006; Ivanov et al., 2007), что ведет к стабилизации и накоплению p53 в ядре клетки за счет потери взаимодействия p53 со своими негативными регуляторами. Интересно, что, например, в ответ на генотоксический стресс сами протеасомы подвергаются убиквитинированию, что снижает их протеолитическую активность (Moiseeva et al., 2013). Недавно было показано, что при генотоксическом стрессе p53 регулирует клеточный ответ не только за счет активации экспрессии кодирующих генов-мишеней (p21, PUMA, BAX и др.), но и за счет некодирующих малых РНК (Barlev et al., 2010; Lezina et al., 2013).

Основные негативные регуляторы p53

Белок Mdm2. Продукт гена *MDM2* (murine double minute) был впервые обнаружен как белок, амплифицированный в спонтанно трансформированной мышечной клеточной линии BALB/c (3T3-DM) (Fakharzadeh et al., 1991). Вскоре после идентификации *MDM2* в качестве протоонкогена его трансформирующую способность связали с негативным влиянием на онкосупрессор p53. Так, мыши, нокаутные по *mdm2*, погибали в эмбриогенезе еще

до стадии имплантации. Однако эффект полностью нивелировался при создании двойных нокаутов (*mdm2*–/*p53*–), что свидетельствовало в пользу активации p53 в качестве причины эмбриональной летальности нокаутных по *mdm2* мышей (Jones et al., 1995).

В настоящее время известно, что белок Mdm2 является основной p53-специфичной E3-лигазой и осуществляет негативную регуляцию p53 за счет нескольких механизмов. Во-первых, Mdm2 является E3-убиквитинлигазой, специфически модифицирующей p53, что способствует его деградации за счет 26S протеасомного комплекса (Honda, Yasuda, 2000). Во-вторых, Mdm2 связывается с аминоконцевым участком p53 и блокирует его транскрипционную активность (Bond et al., 2005). Кроме того, связываясь с p53, Mdm2 блокирует сайты взаимодействия p53 с его различными транскрипционными коактиваторами (Wadgaonkar, Collins, 1999).

Mdm2 и p53 контролируют экспрессию друг друга посредством авторегуляторной петли обратной связи. При различных типах стресса активированный p53, являясь транскрипционным фактором, связывается с промоторной областью гена *MDM2* и инициирует его экспрессию (Saucedo et al., 1998). В свою очередь Mdm2 взаимодействует с p53, что приводит к его протеасомной деградации.

Нарушение функционирования данной петли ведет к злокачественной трансформации клеток. Так, например, эксперименты на мышах показали, что сверхэкспрессия Mdm2, вызываемая амплификацией соответствующего гена (Momand et al., 1998), однонуклеотидным полиморфизмом в промоторной области (Lind et al., 2006) либо повышенным уровнем транскрипции или трансляции (Trotta et al., 2003), ведет к нейтрализации онкосупрессорных свойств p53 и как следствие — к опухолеобразованию. Амплификация *MDM2* встречается с частотой 7 % в различных опухолях (Momand et al., 1998) и, как правило, ассоциирована с неблагоприятным прогнозом для пациентов (Onel, Cordon-Cardo, 2004).

Кроме того, Mdm2 обладает и другими p53-независимыми онкогенными свойствами. Например, известно, что Mdm2 взаимодействует с рядом белков с онкосупрессорной функцией, такими как Rb (регинобластома) (Uchida et al., 2005), Mtbp (Boyd et al., 2000), Pml (Wei et al., 2003) и p73 (гомолог онкосупрессора p53; Zeng et al., 1999), и способствует их негативной регуляции, но в то же время активирует пролиферативные эффекты, опосредованные, например, транскрипционными факторами-протоонкогенами E2f1/Dp1 (Zhang et al., 2005) и p65 (Gu et al., 2002). Кроме того, Mdm2 отчасти вовлечен в негативный контроль репарации ДНК (Bouska et al., 2008; Lezina et al., 2015).

Белок MdmX. Белок Mdm4 (mouse double minute 4), известный также как MdmX (гомолог белка человека — HdmX (Hdm4)), является партнером и гомологом белка Mdm2 и тоже принимает участие в негативной регуляции p53 (Schvarts et al., 1996). Его роль в регуляции стабильности белка p53 была изначально недооценена. Считалось, что для регуляции уровня белка p53 достаточно одной E3-убиквитинлигазы Mdm2. Однако спустя некоторое время было показано, что мыши, нокаутные по Mdm4, погибают в эмбриогенезе из-за высокого уровня экспрессии p53. Эти данные указывают на важную роль Mdm4 в регуляции активности p53 (Wade et al., 2010).

Структура белков Mdm2 и MdmX во многом является схожей. Как и Mdm2, MdmX связывается своим ами-

ноконцевым участком с гидрофобным аминоконцевым участком p53 (Bottger et al., 1999). Помимо этого, высокая степень гомологии наблюдается в карбоксиконцевом RING-домене и домене типа «цинковый палец». Показано, что Mdm2 и Mdm4 могут образовывать как гомо-, так и гетеродимеры (Tanimura et al., 1999). Но тогда как Mdm2 является E3-убиквитинлигазой, которая убиквитинирует p53 за счет своего карбоксиконцевого RING-домена, MdmX не может выполнять эту функцию, поскольку его RING-домен не обладает каталитической активностью (Kawai et al., 2007). Однако показано, что сам по себе Mdm2 осуществляет только мультимоноубиквитинирование p53, поскольку является моноубиквитинлигазой. Однако при гетеродимеризации с Mdm4 Mdm2 приобретает способность к полиубиквитинированию p53, что является сигналом к его деградации.

Помимо этой функции Mdm4 может связываться с аминоконцевым доменом p53 при такой же аффинности, что и Mdm2, и, таким образом, подавлять его транскрипционную активность (Shvarts et al., 1996). Кроме этого, MdmX препятствует взаимодействию p53 с активатором гистонацетилтрансферазой p300 (Sabbatini, McCormick, 2002). Как и Mdm2, MdmX часто сверхэкспрессирован в ряде опухолей, особенно в ретинобластомах, острых лимфобластных лейкозах и меланом (Berberich, 2014).

Белки Pirh2 и Cop1. Важными p53-специфическими E3-убиквитинлигазами являются также белки Pirh2 (p53-induced RING-H2 domain protein, также известный как Rchy1) (Leng et al., 2003) и Cop1 (constitutively photomorphogenic protein) (Dornan et al., 2004). Как и в случае Mdm2, p53 связывается с промоторными областями генов *PIRH2* и *COP1*, чем способствует экспрессии этих белков (Dornan et al., 2004; Sheng et al., 2008). При этом обе E3-убиквитинлигазы (Pirh2 и Cop1) негативно контролируют p53 за счет его полиубиквитинирования с последующей протеасомной деградацией. Таким образом, формируется петля положительной обратной связи. В отличие от Mdm2, который индуцирует деградацию немодифицированного p53 в отсутствие стресса, Pirh2 преимущественно убиквитинирует ковалентно-модифицированный p53, т. е. негативно контролирует уровень p53 при стрессе (Banin et al., 1998).

Важно отметить физическое взаимодействие убиквитинлигаз Pirh2, Cop1 и Mdm2, что приводит к их синергичному (т. е. взаимоусиливающему) негативному влиянию на экспрессию p53 (Wang et al., 2009). Кроме того, показано, что сверхэкспрессия Pirh2 и Cop1, часто встречающаяся при раке молочной железы, яичников, простаты и легких, ассоциирована с неблагоприятным прогнозом для пациентов (Dornan et al., 2004; Logan et al., 2006).

Ингибиторы взаимодействия p53 с Mdm2 и Mdm4 как потенциальные противоопухолевые препараты

Поскольку полноценное функционирование p53-опосредованных сигнальных путей несовместимо с жизнедеятельностью раковых клеток, белок p53 мутирован примерно в половине злокачественных новообразований. В другой половине опухолей, экспрессирующих p53 дикого типа, этот онкосупрессор инактивирован за счет сверхэкспрессии E3-убиквитинлигаз, главным образом Mdm2 и MdmX, которые активируют процессы деградации p53. Таким образом, реактивация p53 за счет ингиби-

рования специфичных к нему E3-лигаз является перспективной противораковой терапевтической стратегией в случае опухолей, несущих p53 дикого типа (Davidovich et al., 2015). Поскольку Mdm2 является основным негативным регулятором p53, интерес исследователей сосредоточен главным образом на ингибировании Mdm2-p53 белок-белкового взаимодействия. Данный подход продемонстрировал свою эффективность как *in vitro*, так и на последующих этапах, включая модели животных и начальные стадии клинических испытаний (Zhao et al., 2013).

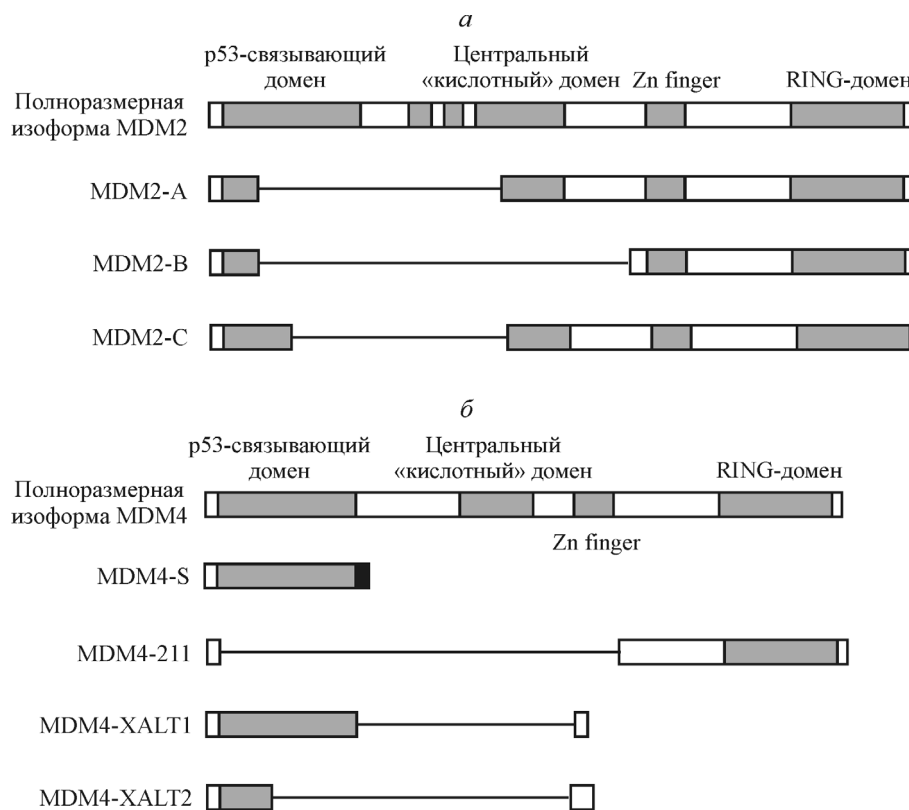
В соответствии с кристаллической структурой высокого разрешения и экспериментальными данными, физический контакт p53 и Mdm2 определяется гидрофобным взаимодействием нескольких аминокислот белка p53 (Phe19, Trp23 и Leu26), входящих в состав жесткой альфа-спирали, с гидрофобной полостью, образованной аминоконцевым доменом Mdm2 (Kussie et al., 1996).

Таким образом, большинство ингибиторов Mdm2-p53 действует в рамках одной фармакофорной гипотезы и различается по типу базового «скелета» — производные цисимидазолинов (нутлины), пирролидинов (RG7388), спирооксоиндолов (SAR405838), пиперидинов (AMG 232) и т. д. За счет модификаций начальных соединений путем введения различных функциональных групп исследователям удалось значительно повысить их сродство к Mdm2, растворимость, биодоступность, а также снизить их токсичность. Из всего разнообразия синтезированных ингибиторов взаимодействия Mdm2 с p53 несколько представителей уже проходят начальные фазы клинических испытаний (Zhao et al., 2014). Все они имеют высокое сродство к Mdm2 и демонстрируют высокую избирательность по отношению к раковым клеткам, несущим p53 дикого типа по сравнению с мутантным p53. Например, было показано, что применение ингибиторов взаимодействия Mdm2 с p53 эффективно подавляло рост клеток сарком и меланом, а также повышало их восприимчивость к химиотерапии (Ohnstad et al., 2011; Gembraska et al., 2012).

Потенциальные препятствия на пути применения ингибиторов Mdm2 и Mdm4 в клинической практике

Онкосупрессорные свойства p53-специфичных E3-лигаз. 1. Mdm2. Несмотря на общепризнанные онкогенные свойства Mdm2, эта E3-лигаза может играть также роль онкосупрессора, о чем свидетельствует ряд экспериментальных данных. Соответственно ингибирование Mdm2 может оказывать плейотропный эффект на эффективность противораковой терапии. Показано, что Mdm2 является E3-лигазой для транскрипционных факторов Snail (Snai1) (Lim et al., 2010) и Slug (Snai2) (Wang et al., 2009). Эти транскрипционные факторы за счет репрессии гена E-кадгерина активируют процесс эпителиально-мезенхимного перехода (ЭМП), лежащего в основе инициации метастазирования. Взаимодействие Mdm2 со Snail и Slug приводит к их убиквитинированию с последующей протеасомной деградацией. Таким образом, Mdm2 может способствовать сохранению межклеточных контактов за счет негативной регуляции репрессоров E-кадгерина, что потенциально препятствует процессу открепления клеток и метастазированию.

Кроме того, Mdm2 негативно контролирует экспрессию каталитической субъединицы фермента теломеразы (hTert) (Oh et al., 2010). Теломераза поддерживает струк-



Схематическое изображение структуры белков основных p53-специфичных E3-лигаз Mdm2 (*a*) и Mdm4 (MDMX) (*b*), а также их изоформ.

Сверху указаны названия основных белковых доменов. Пояснения см. в тексте.

туру теломер, что необходимо активно пролиферирующим раковым клеткам для предотвращения процесса репликативного старения. Mdm2 вызывает убиквитинирование и протеасомную деградацию hTert, что приводит к снижению активности теломеразы в раковых клетках и препятствует их активному делению. Mdm2 также является E3-лигазой для транскрипционного фактора Foxo3A (Yang et al., 2008), выполняющего функции онкосупрессора. Активация сигнального пути Ras/Raf/Mek/Erk приводит к фосфорилированию Foxo3A, что далее ведет к его Mdm2-опосредуемому фосфорилированию и протеасомной деградации. Таким образом, нужно учитывать возможные отрицательные эффекты терапевтического применения ингибиторов Mdm2 как в отношении ЭМП, так и в отношении пролиферационного потенциала раковых клеток.

2. MdmX. Как и Mdm2, Mdm4 тоже может обладать онкосупрессорными свойствами. Например, на мышинных моделях было показано, что делеция гена *MDM4* усиливает Mdm2-опосредованный онкогенез (Matijasevic et al., 2008). Это свидетельствует о том, что Mdm4 может обладать онкосупрессорными свойствами при сверхэкспрессии Mdm2. Кроме того, показано, что нокдаун MdmX в p53-дефицитных клетках и мышах способствует трансформации клеток за счет индукции числа мультиполярных митозов с последующей утратой хромосом (Matijasevic et al., 2008). Таким образом, снижение экспрессии Mdm4 может способствовать хромосомной нестабильности в клетках с p53-негативным статусом. Помимо этого, показано, что нокдаун гена *Mdm4* повышает устойчивость клеток рака шейки матки к генотоксическому агенту цисплатину (Matijasevic et al., 2008).

Сплайс-изоформы основных негативных регуляторов p53 Mdm2 и MdmX

Помимо амплификации гена *MDM2*, выявленной в 19 различных типах опухолей, в раковых клетках часто детектируют сплайс-изоформы Mdm2. В то время как средняя частота амплификации составляет 7% (Momand et al., 1998), частота встречаемости сплайс-изоформ Mdm2 составляет от 30 до 90% в зависимости от типа опухоли (Rosso et al., 2014). При этом их присутствие, как правило, не коррелирует с присутствием (отсутствием) или мутациями p53. В целом охарактеризовано более 40 различных изоформ Mdm2, однако большинство из них выявлено только при определенных типах рака и в рамках конкретного исследования (Bartel et al., 2002). Основными же являются три изоформы, возникающие в результате канонического сплайсинга: Mdm2-A, Mdm2-B и Mdm2-C, регулярно детектируемые в самых различных опухолях (Rosso et al., 2014) (см. рисунок, *a*). Их общей характеристикой является отсутствие участка белка, кодирующего большую часть p53-связывающего домена, а также центрального «кислотного» домена, который осуществляет большинство межбелковых взаимодействий (Rosso et al., 2014).

В различных исследованиях показано, что присутствие сплайс-изоформ, как правило, ассоциировано с метастазирующими, малодифференцированными опухолями и коррелирует с неблагоприятным прогнозом для пациентов (Harris, 2005). В ряде экспериментов показана позитивная регуляция p53 при экспрессии сплайс-изоформ Mdm2 (Fridman et al., 2003; Rosso et al., 2014). Это объяс-

няется тем, что сплайс-изоформы благодаря делеции своего аминоконцевого p53-связывающего участка теряют способность взаимодействовать с p53. При этом они сохраняют связывание с основной изоформой Mdm2 через свои карбоксильные RING-домены, что приводит к деградации полноразмерной формы за счет ее убиквитинирования.

Отсутствие домена взаимодействия с p53 у изоформ Mdm2 делает их нечувствительными к обработке ингибиторами взаимодействия p53 с Mdm2, что вносит дополнительные неясности в возможность аккуратного предсказания терапевтического эффекта этих соединений (Bozzi et al., 2013).

Для белка MdmX тоже известны изоформы. Описано шесть его структурных изоформ. Из них наиболее интересны две — Mdmx-S, у которой отсутствуют центральный и карбоксильный RING-домены (Bartel et al., 2005), но при этом сохраняется домен связывания с p53, и Mdmx211, у которой, наоборот, отсутствует домен связывания с p53, но сохраняется остальная часть белка. Эксперименты показали, что экспрессия Mdmx-S ингибирует транскрипционную активность p53, так как сродство Mdmx-S к p53 в 10 раз выше, чем у полноразмерного MdmX (Rallapalli et al., 2003). Высокая экспрессия Mdmx-S выявлена в различных типах рака и, как правило, является показателем неблагоприятного прогноза для пациентов (Berberich, 2014).

К такому же результату, но по другому механизму приводит сверхэкспрессия MdmX211. Эта изоформа физически взаимодействует с Mdm2, препятствуя деградации p53 (Giglio et al., 2005). При этом p53 становится транскрипционно неактивным, так как физически ассоциируется с Mdm2 в комплексе с MdmX. Соответственно было экспериментально показано, что нутлин-3 (ингибитор взаимодействия p53 с Mdm2) неэффективен в клетках, сверхэкспрессирующих MdmX (Hu et al., 2006; Patton et al., 2006). Несмотря на высокое сродство к Mdm2, нутлин-3 неспособен ингибировать образование комплексов MdmX—p53 и, таким образом, при повышенной экспрессии MdmX p53 прочно ассоциирован с этим белком (Hu et al., 2006; Patton et al., 2006).

Использование малых шпилечных РНК, направленных против HDMX211 (Giglio et al., 2005), значительно снижало выживаемость клеток ARO рака щитовидной железы и повышало их чувствительность к химиотерапии. О клинической важности онкогенных свойств HdmX211 свидетельствуют также результаты биопсии легочных карцином, в которых выявлено совместное присутствие этой изоформы в образцах, сверхэкспрессирующих Mdm2 (Giglio et al., 2005).

Известны две другие изоформы MdmX — MdmX-Alt1 и MdmX-Alt2 (Chandler et al., 2006), которые образуются в результате альтернативного сплайсинга в ответ на ультрафиолетовое облучение (см. рисунок, б). Биологическая значимость этих двух изоформ пока остается гипотетической.

Таким образом, эффективность терапевтических препаратов, направленных на разрушение взаимодействия p53 с Mdm2, будет определяться не только содержанием Mdm2, но и присутствием изоформ MdmX.

Заключение

Все вышеописанные данные могут ограничивать терапевтическую эффективность ингибиторов взаимодействия p53 с Mdm2 и MdmX. Во-первых, как для Mdm2, так и для MdmX характерны как онкогенные, так и онкосупрессорные свойства, что, по-видимому, зависит от биохимического клеточного контекста. Поэтому ингибирование этих E3-лигаз теоретически не всегда обязательно должно вызывать антипролиферативные эффекты. Кроме того, ингибиторы взаимодействия p53 с Mdm2 не только разрушают эту межбелковую связь, но и препятствуют целому ряду белок-белковых взаимодействий Mdm2 с другими важными регуляторами клеточного цикла, пролиферации и апоптоза (Nicholson et al., 2012). Нарушение этих белок-белковых взаимодействий может вызывать в клетках самые различные эффекты и требует отдельного изучения. Поскольку для всех p53-специфичных E3-лигаз характерно наличие многих мишеней, целостное понимание функций негативных регуляторов p53 в различных типах опухолей является актуальной современной задачей.

Во-вторых, как уже рассматривалось выше, раковые клетки характеризуются разнообразием изоформ основных негативных регуляторов p53. При этом присутствие изоформ основных p53-специфических E3-лигаз, как правило, коррелирует с неблагоприятным прогнозом выживания пациентов. Например, выдвигается гипотеза о том, что гетерогенный ответ липосарком человека на обработку нутлином-3 может зависеть от соотношения уровней экспрессии изоформ Mdm2 и MdmX, поскольку нутлин-3 не оказывает значимого воздействия ни на сплайс-изоформы Mdm2, ни на MdmX и MdmX-S (Bozzi et al., 2013). При этом соотношение изоформ в изученных образцах липосарком колеблется от 0.1 до 5.6 (Bozzi et al., 2013), что косвенно свидетельствует в пользу этой гипотезы.

Таким образом, на примере нутлина понятно, что терапевтическое влияние ингибиторов Mdm2 и MdmX на раковые клетки может быть потенциально ограничено как наличием у данных E3-лигаз онкосупрессорных свойств, так и количественным соотношением их изоформ, отражающим сложность системы регуляции с участием этих убиквитинлигаз. Помимо этих факторов необходимо также учитывать присутствие в клетках других p53-направленных E3-убиквитинлигаз (Pirh2 и Cop1), которые могут модулировать активность Mdm2 и MdmX и соответственно влиять на терапевтическую эффективность их ингибиторов.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда на развитие организаций (проект 14-50-00068, О. Ю. Шувалов, А. В. Петухов, А. А. Дакс, Е. А. Васильева, Н. А. Барлев) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-32242, О. А. Федорова).

Список литературы

Васильева Е. А., Мелино Д., Барлев Н. А. 2015. Применение системы направленного геномного редактирования CRISPR/Cas к плюрипотентным стволовым клеткам. Цитология. 57 (1) : 19—30. (Vasilieva E. A., Melino G., Barlev N. A. 2015. CRISPR/Cas system for genome editing in pluripotent stem cells. Tsitologiya. 57 (1) : 19—30.)

- 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.)
- Чумаков П. М. 2007. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. Успехи биол. химии. 47 (1) : 3—52. (Chumakov P. M. 2007. P53 protein and its universal functions in the multicellular organism. Advances in Biol. Chem. 47 (1) : 3—52.)
- Banin S., Moyal L., Shieh S. Y., Taya Y., Anderson C. W., Chessa L., Ziv Y. 1998. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. Science. 281 (5383) : 1674—1677.
- Barlev N. A., Sayan B. S., Candi E., Okorokov A. L. 2010. The microRNA and p53 families join forces against cancer. Cell Death Differentiation. 17 : 373—375.
- Bartel F., Schulz J., Böhne A., Blümke K., Kappler M., Bache M., Schmidt H., Würfl P., Taubert H., Hauptmann S. 2005. Significance of HDMX[?]S (or MDM4) mRNA splice variant overexpression and HDMX gene amplification on primary soft tissue sarcoma prognosis. Int. J. Cancer. 117 : 469—475.
- Bartel F., Taubert H., Harris L. C. 2002. Alternative and aberrant splicing of MDM2 mRNA in human cancer. Cancer Cell. 2 : 9—15.
- Berberich S. J. 2014. Mdm2 and MdmX involvement in human cancer. Subcellular Biochem. 85 : 263—280.
- Boettger V., Boettger A., Garcia-Echeverria C., Ramos Y. F., van der Eb A. J., Jochemsen A. G., Lane D. P. 1999. Comparative study of the p53-mdm2 and p53-MDMX interfaces. Oncogene. 18 : 189—199.
- Bond G. L., Hu W., Levine A. J. 2005. MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting. Curr. Cancer Drug Targets. 5 : 3—8.
- Bouska A., Lushnikova T., Plaza S., Eischen C. M. 2008. Mdm2 promotes genetic instability and transformation independent of p53. Mol. Cell. Biol. 28 : 4862—4874.
- Boyd M. T., Vlatkovic N., Haines D. S. 2000. A novel cellular protein (MTBP) binds to MDM2 and induces a G1 arrest that is suppressed by Mdm2. J. Biol. Chem. 275 : 31 883—31 890.
- Bozzi F., Conca E., Laurini E., Posocco P., Sardo A. L., Jocolle G., Pilotti S. 2013. *In vitro* and *in silico* studies of Mdm2/MdmX isoforms predict Nutlin-3A sensitivity in well/differentiated liposarcomas. Lab. Invest. 93 : 1232—1240.
- Chandler D. S., Singh R. K., Caldwell L. C., Bitler J. L., Lozano G. 2006. Genotoxic stress induces coordinately regulated alternative splicing of the p53 modulators Mdm2 and Mdm4. Cancer Res. 66 : 9502—9508.
- Davidovich P., Aksenova V., Petrova V., Tentler D., Orlova D., Smirnov S., Tribulovich V. 2015. Discovery of novel isatin-based p53 inducers. ACS Med. Chem. Lett. 6 : 856—860.
- Dornan D., Wertz I., Shimizu H., Arnott D., Frantz G. D., Dowd P., Dixit V. M. 2004. The ubiquitin ligase Cop1 is a critical negative regulator of p53. Nature. 429 : 86—92.
- Fakharzadeh S. S., Trusko S. P., George D. L. 1991. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. EMBO J. 10 : 1565—1569.
- Fedorova O. A., Moiseeva T. N., Nikiforov A. A., Tsimokha A. S., Livinskaya V. A., Hodson M., Barlev N. A. 2011. Proteomic analysis of the 20S proteasome (PSMA3)-interacting proteins reveals a functional link between the proteasome and mRNA metabolism. Biochem. Biophys. Res. Commun. 416 : 258—265.
- Fridman J. S., Hernando E., Hemann M. T., de Stanchina E., Cordon-Cardo C., Lowe S. W. 2003. Tumor promotion by Mdm2 splice variants unable to bind p53. Cancer Res. 63 : 5703—5706.
- Gembarska A., Luciani F., Fedele C., Russell E. A., Dewaele M., Villar S., Marine J. C. 2012. MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. Nature Med. 18 : 1239—1247.
- Giglio S., Mancini F., Gentiletti F., Sparaco G., Felicioni L., Barassi F., Moretti F. 2005. Identification of an aberrantly spliced form of HDMX in human tumors: a new mechanism for HDM2 stabilization. Cancer Res. 65 : 9687—9694.
- Gu L., Findley H. W., Zhou M. 2002. MDM2 induces NF- κ B/p65 expression transcriptionally through Sp1-binding sites: a novel, p53-independent role of MDM2 in doxorubicin resistance in acute lymphoblastic leukemia. Blood. 99 : 3367—3375.
- Harris L. C. 2005. MDM2 splice variants and their therapeutic implications. Curr. Cancer Drug Targets. 5 : 21—26.
- Honda R., Yasuda H. 2000. Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. Oncogene. 19 : 1473—1476.
- Hu B., Gilkes D. M., Farooqi B., Sebt S. M., Chen J. 2006. MDMX overexpression prevents p53 activation by the MDM2 inhibitor Nutlin. J. Biol. Chem. 281 : 33 030—33 035.
- Ivanov G., Ivanova T., Kurash J., Ivanov A., Chuikov S., Gizatullin F., Barlev N. A. 2007. Methylation-acetylation interplay activates p53 in response to DNA damage. Mol. Cell. Biol. 27 : 6756—6769.
- Jones S. N., Roe A. E., Donehower L. A., Bradley A. 1995. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. Nature. 378 : 206—208.
- Kawai H., Lopez-Pajares V., Kim M. M., Wiederschain D., Yuan Z. M. 2007. RING domain-mediated interaction is a requirement for MDM2's E3 ligase activity. Cancer Res. 67 : 6026—6030.
- Kussie P. H., Gorina S., Marechal V., Elenbaas B., Moreau J., Levine A. J., Pavletich N. P. 1996. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. Science. 274 : 948—953.
- Leng R. P., Lin Y., Ma W., Wu H., Lemmers B., Chung S., Benchimol S. 2003. Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. Cell. 112 : 779—791.
- Levav-Cohen Y., Goldberg Z., Alsheich-Bartok O., Zuckerman V., Haupt S., Haupt Y. 2010. The p53-Mdm2 loop: a critical juncture of stress response. In: Mutant p53 and MDM2 in cancer. Netherlands: Springer. 161—186.
- Lezina L., Aksenova V., Fedorova O., Malikova D., Shuvalov O., Antonov A. V., Barlev N. A. 2015. KMT Set7/9 affects genotoxic stress response via the Mdm2 axis. Oncotarget. 6 : 25 843—25 855.
- Lezina L., Purmessur N., Antonov A. V., Ivanova T., Karpova E., Krishan K., Barlev N. A. 2013. miR-16 and miR-26a target checkpoint kinases Wee1 and Chk1 in response to p53 activation by genotoxic stress. Cell Death Disease. 4 : e953.
- Lim S. O., Kim H., Jung G. 2010. p53 inhibits tumor cell invasion via the degradation of snail protein in hepatocellular carcinoma. FEBS Lett. 584 : 2231—2236.
- Lind H., Zienoldiny S., Ekstrom P. O., Skaug V., Haugen A. 2006. Association of a functional polymorphism in the promoter of the MDM2 gene with risk of nonsmall cell lung cancer. Int. J. Cancer. 119 : 718—721.
- 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.
- Matijasevic Z., Steinman H. A., Hoover K., Jones S. N. 2008. MdmX promotes bipolar mitosis to suppress transformation and tumorigenesis in p53-deficient cells and mice. Mol. Cell. Biol. 28 : 1265—1273.
- Mittenberg A. G., Moiseeva T. N., Barlev N. A. 2007. Role of proteasomes in transcription and their regulation by covalent modifications. Frontiers in Biosci.: J. Virtual Library. 13 : 7184—7192.
- Moiseeva T., Bottrill A., Melino G., Barlev N. A. 2013. DNA damage-induced ubiquitylation of proteasome controls its proteolytic activity. Oncotarget. 4 : 1338—1348.
- Momand J., Jung D., Wilczynski S., Niland J. 1998. The MDM2 gene amplification database. Nucl. Acids Res. 26 : 3453—3459.

- Morgunkova A., Barlev N. A. 2006. Lysine methylation goes global. *Cell Cycle*. 5 : 1308—1312.
- Nicholson J., Neelagandan K., Huart A. S., Ball K., Mollon M. P., Hupp T. 2012. An iTRAQ proteomics screen reveals the effects of the MDM2 binding ligand Nutlin-3 on cellular proteostasis. *J. Proteome Res.* 11 : 5464—5478.
- Oh W., Lee E. W., Lee D., Yang M. R., Ko A., Yoon C. H., Song J. 2010. Hdm2 negatively regulates telomerase activity by functioning as an E3 ligase of hTERT. *Oncogene*. 29 : 4101—4112.
- Ohnstad H. O., Paulsen E. B., Noordhuis P., Berg M., Lothe R. A., Vassilev L. T., Myklebost O. 2011. MDM2 antagonist Nutlin-3a potentiates antitumour activity of cytotoxic drugs in sarcoma cell lines. *BMC Cancer*. 11 : 211—222.
- Onel K., Cordon-Cardo C. 2004. MDM2 and prognosis. *Mol. Cancer Res.* 2 : 1—8.
- Patton J. T., Mayo L. D., Singhi A. D., Gudkov A. V., Stark G. R., Jackson M. W. 2006. Levels of HdmX expression dictate the sensitivity of normal and transformed cells to Nutlin-3. *Cancer Res.* 66 : 3169—3176.
- Rallapalli R., Strachan G., Tuan R. S., Hall D. J. 2003. Identification of a domain within MDMX-S that is responsible for its high affinity interaction with p53 and high-level expression in mammalian cells. *J. Cell. Biochem.* 89 : 563—575.
- Rosso M., Okoro D. E., Bargonetti J. 2014. Splice variants of MDM2 in oncogenesis. In: *Mutant p53 and MDM2 in cancer*. Netherlands. Springer: 247—261.
- Sabbatini P., McCormick F. 2002. MDMX inhibits the p300/CBP-mediated acetylation of p53. *DNA Cell Biol.* 21 : 519—525.
- Saucedo L. J., Carstens B. P., Seavey S. E., Albee L. D., 2nd, Perry M. E. 1998. Regulation of transcriptional activation of mdm2 gene by p53 in response to UV radiation. *Cell Growth Diff.: Mol. Biol. J. Amer. Assoc. Cancer Res.* 9 : 119—130.
- Sheng Y., Laister R. C., Lemak A., Wu B., Tai E., Duan S., Arrowsmith C. H. 2008. Molecular basis of Pirh2-mediated p53 ubiquitylation. *Nature Struct. Mol. Biol.* 15 : 1334—1342.
- Shuvalov O., Petukhov A., Daks A., Fedorova O., Ermakov A., Melino G., Barlev N. A. 2015. Current genome editing tools in gene therapy: new approaches to treat cancer. *CGT*. 15:511—529.
- Shvarts A., Steegenga W. T., Riteco N., Van Laar T., Dekker P., Bazuine M., Jochemsen A. G. 1996. MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *EMBO J.* 15 : 5349.
- Tanimura S., Ohtsuka S., Mitsui K., Shirouzu K., Yoshimura A., Ohtsubo M. 1999. MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains. *FEBS Lett.* 447 : 5—9.
- Trotta R., Vignudelli T., Candini O., Intine R. V., Pecorari L., Guerzoni C., Calabretta B. 2003. BCR/ABL activates mdm2 mRNA translation via the La antigen. *Cancer Cell*. 3 : 145—160.
- Tsvetkov P., Reuven N., Shaul Y. 2010. Ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation. *Cell Death Differentiation*. 17 : 103—108.
- Uchida C., Miwa S., Kitagawa K., Hattori T., Isobe T., Otani S., Kitagawa M. 2005. Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation. *EMBO J.* 24 : 160—169.
- Vasileva E. A., Shuvalov O. U., Garabadgiu A. V., Melino G., Barlev N. A. 2015. Genome-editing tools for stem cell biology. *Cell Death Disease*. 6 : e1831.
- Wade M., Wang Y. V., Wahl G. M. 2010. The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends Cell Biol.* 20 : 299—309.
- Wadgaonkar R., Collins T. 1999. Murine double minute (MDM2) blocks p53-coactivator interaction, a new mechanism for inhibition of p53-dependent gene expression. *J. Biol. Chem.* 274 : 13 760—13 767.
- Wang L., He G., Zhang P., Wang X., Jiang M., Yu L. 2011. Interplay between MDM2, MDMX, Pirh2 and COP1 : the negative regulators of p53. *Mol. Biol. Reports*. 38 : 229—236.
- Wang S. P., Wang W. L., Chang Y. L., Wu C. T., Chao Y. C., Kao S. H., Yang P. C. 2009. p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nature Cell Biol.* 11 : 694—704.
- Wei X., Yu Z. K., Ramalingam A., Grossman S. R., Jiang H. Y., Bloch D. B., Maki C. G. 2003. Physical and functional interactions between PML and MDM2. *J. Biol. Chem.* 278 : 29 288—29 297.
- Yang J. Y., Zong C. S., Xia W., Yamaguchi H., Ding Q., Xie X., Hung M. C. 2008. ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nature Cell Biol.* 10 : 138—148.
- Zeng X., Chen L., Jost C. A., Maya R., Keller D., Wang X., Lu H. 1999. MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Mol. Cell. Biol.* 19 : 3257—3266.
- Zhang Z., Wang H., Li M., Rayburn E. R., Agrawal S., Zhang R. 2005. Stabilization of E2F1 protein by MDM2 through the E2F1 ubiquitination pathway. *Oncogene*. 24 : 7238—7247.
- Zhao Y., Aguilar A., Bernard D., Wang S. 2014. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction (MDM2 inhibitors) in clinical trials for cancer treatment: miniperspective. *J. Med. Chem.* 58 : 1038—1052.
- Zhao Y., Bernard D., Wang S. 2013. Small molecule inhibitors of MDM2-p53 and MDMX-p53 interactions as new cancer therapeutics. *BioDiscovery*. 8 : 1—15.

Поступила 25 IX 2015

NEGATIVE REGULATORS OF TUMOR SUPPRESSOR P53 IN THE CONTEXT OF ANTICANCER THERAPY

O. Yu. Shuvalov,¹ O. A. Fedorova,¹ A. V. Petukhov,^{1,2} A. A. Daks,¹ E. A. Vasilieva,¹
T. A. Grigorieva,³ G. S. Ivanov,¹ N. A. Barlev¹. *

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064,

² Institute of Hematology of Federal North-West Medical Research Centre, St. Petersburg, 197341,
and ³ St. Petersburg State Technological Institute, St. Petersburg, 190013;

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

P53 protein is considered to be the major tumor suppressor in human cells. Cancer cells do not survive if the p53-mediated signaling pathways function properly. However, about half of all malignancies still express wild type p53. One of the explanations to this is that p53 is suppressed by overexpression of p53-specific E3-ubiquitin ligases: Mdm2, MdmX, Pirh2 and Cop1. Pharmacological inhibition of protein-protein interactions between p53 and these negative regulators is a promising therapeutic approach to treat cancers retaining wild type p53. To date, a series of chemical inhibitors of p53 interactions with Mdm2 and MdmX E3-ubiquitin

ligases have been discovered and characterized. Several of them are in the early stages of clinical trials. Despite this fact, their clinical efficacy may be hampered by a number of reasons, including tumor-specific expression of multiple isoforms of the target E3-ligases, which become inert to treatment with small molecules. This and other biochemical mechanisms of possible resistance of tumor cells with wild type p53 to small molecules against its negative regulators will be discussed in this review.

Key words: p53, E3-ubiquitin ligases, ubiquitin-dependent degradation, inhibitors of protein-protein interactions.
