

УДК 616-091.8

ИЗОФОРМЫ БЕЛКА p53: РОЛЬ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ, ОСОБЕННОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Асатурова А.В.

ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им В.И. Кулакова»
Минздрава России, Москва, e-mail: a.asaturova@gmail.com

К настоящему времени опубликовано около 70 000 статей и обзоров, посвященных белку p53, однако до сих пор в отношении него остается множество нерешенных вопросов. В частности, остается неясным, от чего зависит ответ p53 на поступающую через сигнальные пути информацию и соответствующая регуляция им пролиферации клеток или апоптоза. Еще большие перспективы появились с открытием изоформ p53, каждая из которых играет свою роль в регуляции жизнедеятельности клетки. Кроме того, профилирование экспрессии изоформ p53 может быть связан с ответом на лечение и прогнозом заболевания. Таким образом, понимание процессов регуляции экспрессии изоформ p53 и их биологическая активность представляет собой важный шаг для улучшения диагностической и прогностической ценности p53. В данном обзоре мной сделана попытка обобщить роль изоформ p53 в норме и патологии, особенности их выявления с помощью различных антител и их потенциал в качестве диагностического и прогностического инструмента.

Ключевые слова: p53, изоформы, p63, p73, рак, прогноз, антитело

p53 ISOFORMS: THEIR ROLE IN HEALTH AND IN DISEASE, THEIR DETECTION AND CLINICAL RELEVANCE

Asaturova A.V.

Federal State Budget Institution «Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology»
Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, e-mail: a.asaturova@gmail.com

Approximately 70 000 articles and reviews involving p53 have been published so far, although many unresolved issues still exist in relation to the tumor suppressor. In particular, it is unclear what determines the p53 response to incoming information through signaling pathways and regulation of cell proliferation or apoptosis mediated through p53. Even more prospects were revealed with p53 isoforms discovery. All of them play a particular role in the regulation of cell viability in response to various signals in normal and pathological conditions. Moreover, p53 isoforms profiling can be associated with response to treatment and prognosis. Thus, the understanding of the p53 isoforms expression regulation and their biological activity is an important step to improve the diagnostic and prognostic value of p53. In this review, I made an attempt to summarize the role of p53 isoforms in normal and pathological conditions, specificity of p53 isoforms detection with different antibodies and their potential role as a diagnostic and prognostic tool.

Keywords: p53, isoforms, p63, p73, cancer, prognosis, antibody

Строение p53, его гомологи и изоформы

Супрессор опухолевого роста p53 играет решающую роль в поддержании генетической стабильности клетки и предотвращении развития злокачественных опухолей. Для осуществления этой функции p53 участвует со множестве клеточных реакций, модулируя репарацию и выживаемость клеток, а также апоптоз. В конце девяностых годов были открыты два родственных белка p53: p63 и p73, которые являются структурными, биологическими и биохимическими гомологами p53. Также были выделены двенадцать изоформ p53, шесть изоформ p63 и четырнадцать изоформ p73.

Белок p53 кодируется геном TP53, расположенным на 17p13.1 хромосоме человека. Канонический белок p53 (p53 α) представляет собой наиболее распространенную изоформу, кодируемую TP53. Другие изоформы p53 являются результатом альтернативного сплайсинга, действия альтернативных промоторов и альтернативной

инициации трансляции. TP53 содержит проксимальный промотор, который контролирует экспрессию p53 (p53 α , $-\beta$, и $-\gamma$) и $\Delta 40p53$ (α , β , γ) и внутренний промотор, регулирующий экспрессию $\Delta 133p53$ (α , β , γ) и $\Delta 160p53$ (α , β , γ).

p53 α , $-\beta$, $-\gamma$

Изоформы p53 p53 α , $-\beta$, $-\gamma$ могут быть получены в результате классического или альтернативного сплайсинга гена TP 53. p53 α сохраняет олигомеризационный домен, способный связываться с лигазой MDM2 и, таким образом, регулировать стабилизацию p53. p53 β может влиять на транскрипционную активность p53 в отношении промоторов p21 и BAX, в то время как p53 γ – только в отношении BAX. p53 γ , кроме того, обладает цитотоксической активностью [14].

$\Delta 40p53\alpha$, $\Delta 40p53\beta$, $\Delta 40p53\gamma$

Изоформы $\Delta 40p53$ (p47) образуются в результате альтернативного сплайсинга 2-го интрона и/или альтернативной инициации трансляции. Известно, что $\Delta 40p53\alpha$

обладает доминантно-негативным влиянием в отношении p53, ингибируя его транскрипционную активность, а также ослабляет p53-опосредованное подавление роста клеток. Также $\Delta 40p53\alpha$ влияет на убиквитацию и внутриклеточную локализацию p53 [8].

$\Delta 133p53$ и $\Delta 160p53$

Изоформы $\Delta 133p53$ и $\Delta 160p53$ образуются путем альтернативной инициации трансляции с помощью внутреннего промотора TP53. $\Delta 133p53\alpha$ препятствует регулируемому p53 репликативному старению, остановке клеточного цикла клетки в фазе G1 и апоптозу, а также вызывает миграцию эндотелиоцитов, формирование кровеносных сосудов и образование метастазов путем регуляции ангиогенеза независимо от p53, таким образом, принимая активную роль в развитии и прогрессии опухоли [3]. Роль $\Delta 133p53\beta$ и $\Delta 133p53\gamma$, экспрессирующихся в неизменных тканях человека в настоящее время до конца не известна.

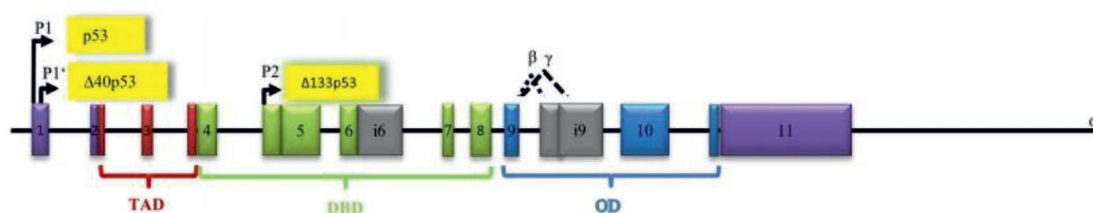
В целом, изоформы p53 участвуют в ответе клетки на стресс как опосредованно путем регуляции транскрипционной активности белков семейства p53, так и напрямую путем связывания с генными промоторами, участвующими в апоптозе (BAX) и остановке клеточного цикла (p21 и miR34a). Таким образом, они могут ингибировать или усиливать опухоль-супрессорную активность p53. Кроме того, полагают, что изоформы p53 имеют также и многочисленные p53-независимые функции [12].

Выявление изоформ p53 с помощью различных антител

В настоящее время существует большое количество антител к p53, которые ранее можно было разделить по их специфичности на три большие группы – предназначенные для выявления только дикого, типа p53 (пример: клон PAb1620), для выявления как дикого так и мутантного типов p53 (пример: клоны DO-1, DO-7), и для выявления только мутантного p53 (пример: клон PAb240). Од-

нако в последнее десятилетие были выявлены 12 изоформ p53 и, как оказалось, не все антитела, даже принадлежащие к одной из трех перечисленных групп обладают одинаковой способностью выявлять экспрессию тех или иных изоформ. В таблице представлены данные в отношении клонов p53 из наиболее распространенной группы антител, предназначенных для выявления как дикого, так и мутантного типов p53.

Как видно из таблицы, некоторые из антител к p53 являются тропными сразу к нескольким изоформам p53, в то время как другие – лишь в отношении одной из изоформ. Антитела DO-1 и DO-7, которые имеют одинаковый эпитоп, специфичны только в отношении P53 α , P53 β и P53 γ . Антитела 1801 позволяют выявить экспрессию всех изоформ кроме $\Delta 133$ P53 (α , β и γ), в то время как антитела DO-12 являются пантропными в связи с эпитопом, локализованным на ДНК-связывающем домене, и позволяют выявлять все изоформы p53. Антитела BP53.10, 421 и ICA-9 специфичны в отношении изоформ P53 α , $\Delta 40$ P53 α и $\Delta 133$ P53 α из-за эпитопа, локализованного на С-концевом домене белка p53. Антитела CM-1 и SAPU (оба клона были синтезированы против изоформы P53 α) также могут выявлять все изоформы p53, однако CM-1 плохо реагирует в отношении $\Delta 133$ P53 β и $\Delta 133$ P53 γ . Антитела SAPU имеют дополнительный эпитоп на ДНК-связывающем домене, что позволяет им эффективно выявлять все изоформы p53. Однако, поскольку изоформы p53 не содержат всех эпитопов антител CM-1 и SAPU, выявление относительной экспрессии изоформ p53 с использованием данных клонов представляется затруднительным и данная оценка могла бы быть произведена только с помощью клона DO-12. Также с целью научного изучения экспрессии изоформ p53 были синтезированы антитела к β изоформам p53, $\Delta 40$ P53 и $\Delta 133$ P53, так как не одно из доступных коммерческих антител не позволяет выявлять каждую из изоформ p53 по отдельности [20].



Строение p53. Обозначены проксимальные промоторы P и P' (ответственны за экспрессию, внутренний промотор P2, домен, активирующий транскрипцию TAD, ДНК-связывающий домен DBD, домен, отвечающий за олигомеризацию OD (адаптировано по Pflaum J. и соавт. [15])

Выявление изоформ p53 с помощью различных клонов антител к p53

	Моноклональные антитела							Поликлональные антитела к			
	DO-1	DO-7	PAb 1801	DO-12	BP 53.10	PAb 421	ICA-9	KJC8	MAP4.9	CM-1	SAPU
P53 α	++	++	+	+	+	+	+	-	-	++	++
P53 β	++	++	+	+	-	-	-	+	-	++	++
P53 γ	++	++	+	+	-	-	-	-	-	++	++
Δ 40 P53 α	-	-	+	+	+	+	+	-	-	++	++
Δ 40 P53 β	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	++
Δ 40 P53 γ	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	++
Δ 133 P53 α	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Δ 133 P53 β	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+/-	+
Δ 133 P53 γ	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+/-	+

Пр и м е ч а н и е. ++ : выраженная экспрессия, +: умеренная экспрессия, +/- :слабая экспрессия, -: нет экспрессии (оценка методом Western Blot) (адаптировано по Khoury M.P. и соавт. [12]).

Изоформы p53 в злокачественных опухолях

Несмотря на то, не во всех разновидностях рака мутация гена TP 53 является часто встречающейся, известно, что инактивация сигнального пути p53 может происходить в разных опухолях различными путями. В последние годы, учитывая тот факт, что экспрессия изоформ p53 в опухолях отличается от неизменных клеток, изучение роли в канцерогенезе является определяющей.

Накоплены определенные данные, касающиеся экспрессии изоформ p53 в различных опухолях. Так, в молочной железе отмечено, что в то время как в нормальной ткани молочной железы экспрессируются p53 α , p53 β , и p53 γ , в 60% опухолей молочной железы отмечается потеря экспрессии p53 β и p53 γ , а в 40% из них – гиперэкспрессия изоформы [4]. В отношении меланомы было показано, что изоформы p53 β и Δ 40p53 экспрессируются в опухолевых клетках, но не в меланоцитах или фибробластах [2]. В почечно-клеточной карциноме отмечается гиперэкспрессия изоформ p53 β и Δ 133p53 по сравнению с нормальными клетками [19]. Также показано, что отличная от неизменных клеток экспрессия изоформ p53 отмечается в холангиокарциномах, глиобластомах, опухолях головы и шеи, раке толстой кишки, яичников и легких [10, 21]. Было показано, что изоформы p53 обладают способностью переключать активность p53 между действием, направленным на выживаемость клетки и направленным на запрограммированную гибель клетки. Таким образом, в условиях их изменённой экспрессии они могут выступать фактором, способствующим развитию

и прогрессии опухоли, а также препятствовать развитию чувствительности опухоли к химиотерапии.

Важным аспектом является выявление связи между профайлингом экспрессии изоформ p53 и прогрессией опухоли, а также между клиническим ответом на терапию и прогнозом заболевания. В отличие от p53 β , который способствует репликативному старению, Δ 133p53 α вызывает пролиферацию клеток и препятствует их старению. В результате Fujita и соавт. описали так называемую инверсию соотношения p53 β / Δ 133p53 (снижение экспрессии p53 β и сопутствующее увлечению экспрессии Δ 133p53 α), которая участвует в прогрессии колоректальной аденомы в карциному [7]. В почечноклеточной карциноме гиперэкспрессия p53 β в опухоли связана со стадией опухоли и является хорошим методом предиктором опухолевой прогрессии [19]. Было показано, что патологическая экспрессия p53 β и Δ 133p53 имеет место в муцинозных карциномах яичника. Кроме того, экспрессия Δ 40p53 α в карциномах яичника с диким типом p53 связана с более высоким процентом безрецидивной выживаемости пациенток [9].

Важно отметить, что в серозных карциномах яичника при III-IV стадии заболевания и наличии мутации в гене TP53 экспрессия Δ 133p53 α связана с более высоким уровнем выживаемости без признаков заболевания и общей выживаемости, в то время как при III-IV стадиях заболевания без мутации TP53 (дикий тип) отмечается лишь более высокая выживаемость без признаков заболевания [11]. Таким образом, можно предположить, что мутации

в гене TP53 могут влиять на прогностическую ценность изоформ p53. Кроме того, экспрессия p53 δ связана с низким ответом на лечение и плохим прогнозом заболевания [10]. Поскольку изоформы p53 влияют на опухоль-супрессорную активность p53, предполагают, что их гиперэкспрессия или потеря экспрессии играет определённую роль в канцерогенезе. Однако в некоторых случаях они могут играть и ингибирующую функцию при таких мутациях TP53 с приобретением новой функции (gain of function mutation). Примером такого механизма может служить гиперэкспрессия $\Delta 133p53$ при карциномах яичника с мутациями в гене TP53 или гиперэкспрессия p53 γ в карциномах молочной железы с мутацией TP53, что приводит к ослаблению негативного влияния мутации TP 53 [4, 11].

Клиническое значение активности изоформ p53 при злокачественных опухолях

В настоящее время в разработке находится новая терапевтическая стратегия, направленная на реактивацию p53 в раковых клетках путем активизации мутантного белка p53 или путем ингибирования супрессоров p53, таких как MDM2 [17]. Кроме того, учитывая, что изменение экспрессии изоформ p53 связано с развитием и прогрессией злокачественных опухолей, можно предположить, что профайлинг экспрессии этих изоформ может стать эффективным опухолевым маркером и мишенью таргетной терапии рака. В настоящее время хорошо известны, различные стрессовые воздействия на клетку, так как повреждения ДНК приводят к изменению процесса мРНК-сплайсинга [6]. В некоторых исследованиях было показано, что экспрессию изоформ p53 можно модулировать *In vivo* с помощью химиотерапии [1, 2]. Некоторые регуляторы экспрессии p53 изоформ уже известны, например дискерин и аннексин A2 [13, 18]. Схемы лечения, направленные на модуляцию этих факторов и, следовательно, на экспрессию изоформ p53, могут снизить негативное влияние повышенного соотношения $\Delta 133p53\alpha/p53\beta$ для того, чтобы остановить распространение и прогрессирование рака. Кроме того, экспрессию изоформ p53 можно регулировать путем влияния на деградацию соответствующих белков. Вся схема убиквитации изоформ p53 в настоящее время не известна, однако уже было показано, что изоформы p53 по-разному реагируют с основной E3-

лигазой p53, MDM2 [5]. Так, антагонист MDM2 нутлин-3а (nutlin-3a) стабилизирует p53 α и сенсibiliзирует клетки к химиотерапии [16].

Заключение

С момента открытия p53 необходимость расширения знаний об этом белке постоянно увеличивалась, учитывая, прежде всего, его важную роль в процессе карциногенеза. Белок p53 участвует во многих физиологических процессах, однако наиболее изученным является его опухоль-супрессорная функция. Кроме того, p53 объединяет множество клеточных сигналов от поврежденных субклеточных органелл, а также межклеточных контактов, внеклеточного матрикса, гормонов и цитокинов. На основании этих сигналов p53 регулирует такие процессы в клетке, как выживаемость, старение, дифференцировку, миграцию клеток и запрограммированную гибель клеток. На основании многочисленных исследований было выявлено, что ген TP53 кодирует несколько изоформ p53, которые взаимодействуют с p53 и модулируют его активность в отношении стимуляции выживаемости или гибели клеток. Учитывая тот факт, что изоформы p53 играют фундаментальную роль в регулировании сигнального пути p53, их экспрессия часто нарушена в злокачественных клетках. В связи с этим была выдвинута гипотеза о том, что дикий тип p53 может выступать в качестве супрессора опухолевого роста или протоонкогена в зависимости от профайлинга экспрессии изоформ p53. В некоторых видах рака измененная экспрессия изоформ p53 коррелирует с клиническими проявлениями, рецидивированием рака и/или общей выживаемостью. Кроме того, некоторые изоформы p53, как полагают, могут выступать в качестве потенциальных маркеров для терапии рака. Тем не менее, изоформы p53 нельзя разделить на онкогенные или опухоль-супрессорные классы, так как их биологическая активность и, следовательно, их прогностическое значение связаны с типом тканей. В то же время было высказано предположение, что некоторые изоформы p53 могут стать успешными объектами таргетной терапии рака, как, например, при тройном негативном раке молочной железы. Чтобы достичь успехов в разработке такой терапии, необходимо более глубокое понимание процессов регуляции экспрессии и реализации эффектов изоформ p53, а также их действия в зави-

СИМОСТИ ОТ ТИПА ТКАНИ И ДИКОГО ИЛИ МУТАНТНОГО ТИПА p53 В ТЕХ ИЛИ ИНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ.

Список литературы

1. Anensen N., Oyan A.M., Bourdon J.C. et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12(13). – P. 3985–3992.
2. Avery-Kiejda K.A., Zhang X.D., Adams L.J., et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14(6). – P. 1659–1668.
3. Bernard H., Garmy-Susini B., Ainaoui N., et al. // *Oncogene* – 2013. – Vol. 32(17). – P. 2150–2160.
4. Bourdon J.C., Khoury M.P., Diot A., et al. // *Breast. Cancer Res.* – 2011. – Vol. 13(1). – P. R7.
5. Camus S., Ménendez S., Fernandes K., et al. // *Cell Cycle* – 2012. – Vol. 11(8). – P. 1646–1655.
6. Dutertre M., Sanchez G., Barbier J., et al. // *RNA Biol.* – 2011. – Vol. 8(5). – P. 740–747.
7. Fujita K., Mondal A.M., Horikawa I., et al. // *Nat. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 11(9). – P. 1135–1142.
8. Ghosh A., Stewart D., Matlashewski G. // *Mol. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 24(18). – P. 7987–7997.
9. Hofstetter G., Berger A., Berger R., et al. // *Int. J. Gynecol. Cancer* – 2012. – Vol. 22(3). – P. 372–379.
10. Hofstetter G., Berger A., Fiegl H., et al. // *Oncogene* – 2010. – Vol. 29(13). – P. 1997–2004.
11. Hofstetter G., Berger A., Schuster E., et al. // *Br. J. Cancer* – 2011. – Vol. 105(10). – P. 1593–1599.
12. Khoury M.P., Bourdon J.C. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2010. – Vol. 2(3). – a000927.
13. Liu B., Zhang J., Huang C., et al. // *PLoS One* – 2012. – Vol. 7(8). – e43147.
14. Marcel V., Petit I., Murray-Zmijewski F., et al. // *Cell Death Differ.* – 2012. – Vol. 19(5). – P. 816–826.
15. Pflaum J., Schlosser S., Müller M. // *Front. Oncol.* – 2014. – Vol. 4 – P. 285.
16. Secchiero P., Bosco R., Celeghini C., et al. // *Curr. Pharm. Des.* – 2011. – Vol. 17(6). – P. 569–577.
17. Selivanova G., Wiman K.G. // *Oncogene* – 2007. – Vol. 26(15). – P. 2243–2254.
18. Sharathchandra A., Lal R., Khan D., et al. // *RNA Biol.* – 2012. – Vol. 9(12). – P. 1429–1439.
19. Song W., Huo S.W., Lu J.J., et al. *Chin Med J (Engl.)* – 2009. – Vol. 122(8). – P. 921–926.
20. Soussi T., Leroy B., Taschner P.E. // *Hum. Mutat.* – 2014. – Vol. 35(6). – P. 76678.

21. Takahashi R., Giannini C., Sarkaria J.N., et al. // *Oncogene* – 2013. – Vol. 32(26). – P. 3165–3174.

References

1. Anensen N., Oyan A.M., Bourdon J.C. et al. // *Clin. Cancer Res.* 2006. Vol. 12(13). pp. 3985–3992.
2. Avery-Kiejda K.A., Zhang X.D., Adams L.J., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2008. Vol. 14(6). pp. 1659–1668.
3. Bernard H., Garmy-Susini B., Ainaoui N., et al. // *Oncogene* 2013. Vol. 32(17). pp. 2150–2160.
4. Bourdon J.C., Khoury M.P., Diot A., et al. // *Breast. Cancer Res.* 2011. Vol. 13(1). p. R7.
5. Camus S., Ménendez S., Fernandes K., et al. // *Cell Cycle* 2012. Vol. 11(8). pp. 1646–1655.
6. Dutertre M., Sanchez G., Barbier J., et al. // *RNA Biol.* 2011. Vol. 8(5). pp. 740–747.
7. Fujita K., Mondal A.M., Horikawa I., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2009. Vol. 11(9). pp. 1135–1142.
8. Ghosh A., Stewart D., Matlashewski G. // *Mol. Cell Biol.* 2004. Vol. 24(18). –pp. 7987–7997.
9. Hofstetter G., Berger A., Berger R., et al. // *Int. J. Gynecol. Cancer* 2012. Vol. 22(3). pp. 372–379.
10. Hofstetter G., Berger A., Fiegl H., et al. // *Oncogene* 2010. Vol. 29(13). pp. 1997–2004.
11. Hofstetter G., Berger A., Schuster E., et al. // *Br. J. Cancer* 2011. Vol. 105(10). pp. 1593–1599.
12. Khoury M.P., Bourdon J.C. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010. Vol. 2(3) a000927.
13. Liu B., Zhang J., Huang C., et al. // *PLoS One* 2012 Vol. 7(8). e43147.
14. Marcel V., Petit I., Murray-Zmijewski F., et al. // *Cell Death Differ.* 2012. Vol. 19(5). pp. 816–826.
15. Pflaum J., Schlosser S., Müller M. // *Front. Oncol.* 2014. Vol. 4. pp. 285.
16. Secchiero P., Bosco R., Celeghini C., et al. // *Curr. Pharm. Des.* 2011. Vol. 17(6). pp. 569–577.
17. Selivanova G., Wiman K.G. // *Oncogene* 2007. Vol. 26(15). pp. 2243–2254.
18. Sharathchandra A., Lal R., Khan D., et al. // *RNA Biol.* 2012. Vol. 9(12). pp. 1429–1439.
19. Song W., Huo S.W., Lu J.J., et al. *Chin Med J (Engl.)* 2009. Vol. 122(8). pp. 921–926.
20. Soussi T., Leroy B., Taschner P.E. // *Hum. Mutat.* 2014. Vol. 35(6). pp. 76678.
21. Takahashi R., Giannini C., Sarkaria J.N., et al. // *Oncogene* 2013. Vol. 32(26). pp. 3165–3174.