

ОБЗОРЫ

©Нарыжный, Легина

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ МНОГООБРАЗИЕ ПРОТЕОФОРМ БЕЛКА p53

С.Н. Нарыжный*, О.К. Легина

Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова
Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”,
188300, Ленинградская область, Гатчина, Орлова роща, 1; *эл. почта: snaryzhny@mail.ru

Белок p53 является одним из самых изучаемых белков. По-видимому, такое повышенное внимание к нему вызвано, прежде всего, его ключевой ролью в клеточных механизмах, связанных с канцерогенезом. Белок p53 является транскрипционным фактором, участвующим в самых разнообразных процессах: регуляции клеточного цикла и апоптоза, проведения сигналов внутри клетки, репарации ДНК, координации метаболических процессов, взаимодействий между клетками и т.д. Эта многофункциональность, скорее всего, определяется тем, что p53 может быть представлен в виде протеоформ, несущих совершенно разную функциональную нагрузку. Путём альтернативного сплайсинга, использования различных промоторов и сайтов инициации трансляции ген *TP53* даёт начало не менее 12 изоформам, которые дополнительно могут подвергаться многочисленным (>200) посттрансляционным модификациям. В эту сложную картину добавляются ещё и протеоформы, которые образуются за счёт точечных мутаций в гене *TP53*. Полученные в результате протеоформы участвуют в различных процессах, таких, например, как регуляция транскрипционной активности p53 в ответ на разнообразные факторы. Данный обзор и посвящен описанию известных на сегодняшний день протеоформ p53, а также их возможной функциональной роли.

Ключевые слова: ген; протеоформы; p53

DOI: 10.18097/PBMC20196504263

ВВЕДЕНИЕ

Известная догма “один ген – один белок” уже давно перестала быть догмой, а представляет собой только один из этапов в научном познании [1]. На данный момент считается, что до 90% продуктов мультиэкзонных человеческих генов подвергаются альтернативному сплайсингу. При этом образуются белковые изоформы, которые могут иметь близкие, отличающиеся и даже противоположные функции [2, 3]. Кроме того, p53 подвергается многочисленным изменениям, вызванным посттрансляционными модификациями (ПТМ) и мутациями [4]. В частности, потеря онкосупрессорной функции p53 – один из общих этапов в канцерогенезе – связана с такими изменениями.

Для каждого аминокислотного остатка, который потенциально может быть модифицирован, существует равновесие между разными состояниями модификации, которое может быстро меняться под действием ферментов (киназы, ацетилтрансферазы, метилтрансферазы и т.д., присоединяют химические группы; фосфатазы, деацетилазы и т.д., удаляют химические группы). Известно, что ПТМ могут происходить в молекуле белка индивидуально и в разных сочетаниях. Таким образом, белок может одновременно присутствовать в нескольких вариантах, и регуляция с помощью ПТМ – это функция занятости сайтов [5]. Наличие изоформ белка p53, многочисленных ПТМ, мутаций свидетельствует о том, что белок p53 может функционировать в клетке в виде множества протеоформ, имеющих различные фундаментальные физико-химические характеристики: изоэлектрическую точку (pI) и

молекулярную массу (м.м.). Термин “протеоформа” обозначает все молекулярные формы, в виде которых может быть представлен белковый продукт одного гена, включая изменения за счёт альтернативного сплайсинга РНК-транскриптов, использования альтернативных промоторов, инициации трансляции на альтернативных кодонах, ПТМ и генетических вариаций (мутации, полиморфизм) [4]. Кроме того, белок p53 функционирует как гомотетрамер, но может также собираться из разных изоформ в виде гетеротетрамера. Наличие в белке p53 внутренне неструктурированных областей в N-концевом и C-концевом доменах ещё более повышает уровень многообразия форм этого белка [6]. Белок p53 не обладает уникальной 3D структурой в нативном состоянии при физиологических условиях. Сложность и вариабельность структуры p53 определяют его богатый функциональный спектр. Для понимания многофункциональности и роли в канцерогенезе интересно и важно исследование белка p53 на базе протеомных технологий, позволяющих оценивать многообразие его протеоформ.

Основными методами исследования для идентификации и визуализации изоформ и протеоформ являются одномерный (SDS-PAGE) и двумерный (2DE) электрофорез в сочетании с Вестерн-блоттингом с использованием специфических антител, а также масс-спектрометрия. Эти исследования важны для получения новой информации о белках, а также и в клинических целях – для поиска биомаркеров онкозаболеваний. Однако использование p53 в качестве прогностического маркера или терапевтической мишени затруднено из-за наличия у него многочисленных функций,

сложной палитры протеоформ, а также возможности функционального взаимодействия с белками-гомологами p63 и p73 [7]. Опубликовано множество блестящих обзоров по p53 [6, 8-13]. Цель настоящего обзора – оценить картину биологической вариабельности, динамической сложности и многофункциональности белка p53 с позиции протеомной методологии.

1. СТРУКТУРА p53

Полипептидная цепь p53 человека состоит из 393 аминокислотных остатков (а.о.), образующих несколько различных по размеру и функциям доменов [14-16] (рис. 1). На N-конце расположены два гомологичных транскрипционных домена TAD1 и TAD2, важных для взаимодействия с транскрипционными коактиваторами и корепрессорами; TAD2 перекрывается с так называемой богатой пролином областью (proline-rich domain; PRD), важной для супрессорной активности; далее расположены консервативный

короткий ДНК-связывающий домен (DBD), обеспечивающий непосредственное узнавание и связывание с элементами отклика двухцепочечной ДНК регулируемых генов-мишеней (специфические последовательности, имеющие два декамерных мотива). Далее расположен сигнал ядерной локализации (NLS) и тетрамеризационный домен (TD). На C-конце расположен неструктурированный регуляторный домен (REG), содержащий последовательности, участвующие в регуляции связывания с ДНК, РНК и с многочисленными белками-партнерами, то есть играет важную роль в регуляции активности p53 [10, 17, 18].

2. ИЗОФОРМЫ p53

Белок p53 был открыт в 1979 году и своё название получил по м.м. в 53 кДа, которая была определена по его миграции при гель-электрофорезе в денатурирующих условиях (SDS-PAGE) [19-22]. На самом деле, реальная м.м. полноразмерной (канонической) формы белка составляет 43653 Да.

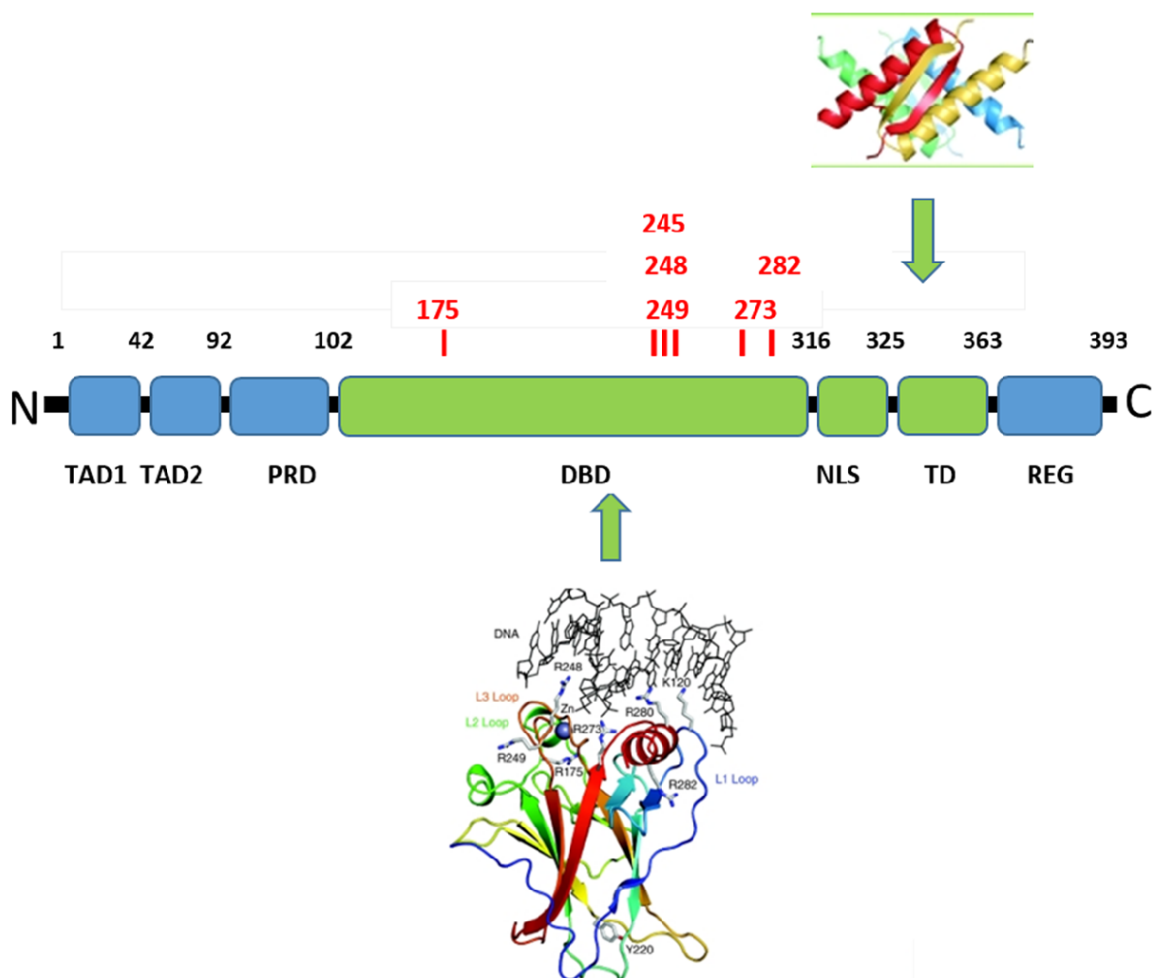


Рисунок 1. Доменная структура p53 человека. Белок p53 содержит развёрнутый неструктурированный N-концевой домен транскрипции, имеющий субдомены TAD1 и TAD2, за которыми следует область богатая пролином (PRD). Структурированные ДНК-связывающий (DBD), сигнал ядерной локализации (NLS) и тетрамеризационный (TD) домены связаны через гибкий линкерный участок. Подобно областям TAD1, TAD2 и PRD регуляторный домен на C-конце (REG) также является внутренне неупорядоченным. Вертикальными штрихами указаны “горячие точки” распределения мутаций по аминокислотам. Показаны трёхмерная структурная модель ДНК-связывающего домена (DBD) и тетрамеризационного домена (TD) [15].

Считается, что погрешность при определении м.м. белка вызвана наличием множества остатков пролина, которые искривляют палочкообразную форму денатурированного SDS полипептида и тем самым замедляют его движение в геле [23]. Начиная с 1984 года стали идентифицировать и другие изоформы p53 [24]. Человеческий ген *TP53* экспрессируется в виде не одной, а 12 изоформ: мажорной полноразмерной (канонической) и имеющих меньшую м.м. (от 53 кДа до 26 кДа – согласно данным SDS-PAGE), в которых отсутствуют некоторые домены полноразмерного белка [25-27] (рис. 2). Такие изоформы, различающиеся по доменной структуре, по-разному экспрессируются в клетках нормальных и опухолевых тканей человека. Они отличаются по транскрипционной активности и способны ингибировать и кардинально менять функцию p53 – от онкосупрессора до онкогена [28-32]. Изоформы p53 продуцируются посредством разных механизмов, включая альтернативные промоторы, альтернативные места сплайсинга и альтернативную инициацию трансляции. При альтернативном сплайсинге интрона 9 генерируются две укороченные с С-конца изоформы, p53 β и p53 γ . Они идентичны p53 дикого типа до 331 аминокислотного остатка, но вместо REG и TD (у большинства) имеют уникальные укороченные С-концевые последовательности длиной в 10 а.о. и 15 а.о. соответственно (рис. 2) [33].

Наличие альтернативного промотора в интроне 4 в сочетании с альтернативным сплайсингом приводит к образованию изоформы $\Delta 133$ p53 ($\alpha/\beta/\gamma$)

с отсутствующими трансактивационным доменом и частью ДНК-связывающего домена. Инициация трансляции на альтернативных AUG кодонах (40 или 160) в сочетании с альтернативным сплайсингом приводит к изоформам $\Delta 40$ p53 ($\alpha/\beta/\gamma$) и $\Delta 160$ p53 ($\alpha/\beta/\gamma$) [32, 34]. У них частично или полностью сохранён центральный DBD домен, но в разной степени укорочена N-концевая последовательность (рис. 2). Консервативная, самая маленькая (м.м. 26 кДа) изоформа $\Delta 160$ p53 обнаружена при исследовании *in vitro* в нескольких клеточных линиях (U2OS – остеосаркома, T47D – рак молочной железы, K562 – миелогенный лейкоз). На клеточной линии H1299 (рак лёгкого) $\Delta 160$ p53 наблюдали исключительно при экспрессии мутантного p53 (R273H), p53(R175H), (R248Q) и других мутантов p53, наиболее часто встречающихся при разных формах злокачественных новообразований. Характерно, что эти клеточные линии проявляли усиленную инвазию, большую выживаемость и пролиферацию [35]. Все изоформы p53 обнаружены в клетках опухолевых и нормальных тканей.

Традиционно считалось, что частые мутации гена *TP53* являются причиной злокачественной трансформации. Однако исследования показывают, что рак может возникнуть и при низкой скорости мутаций этого гена. При этом во многих таких случаях наблюдались значительные изменения в уровнях экспрессии изоформ p53 [35, 36]. Предложена модель, в которой фенотипы с получением новых функций, индуцированные мутациями p53, зависят от укороченных изоформ p53 [37]. В клетках разных

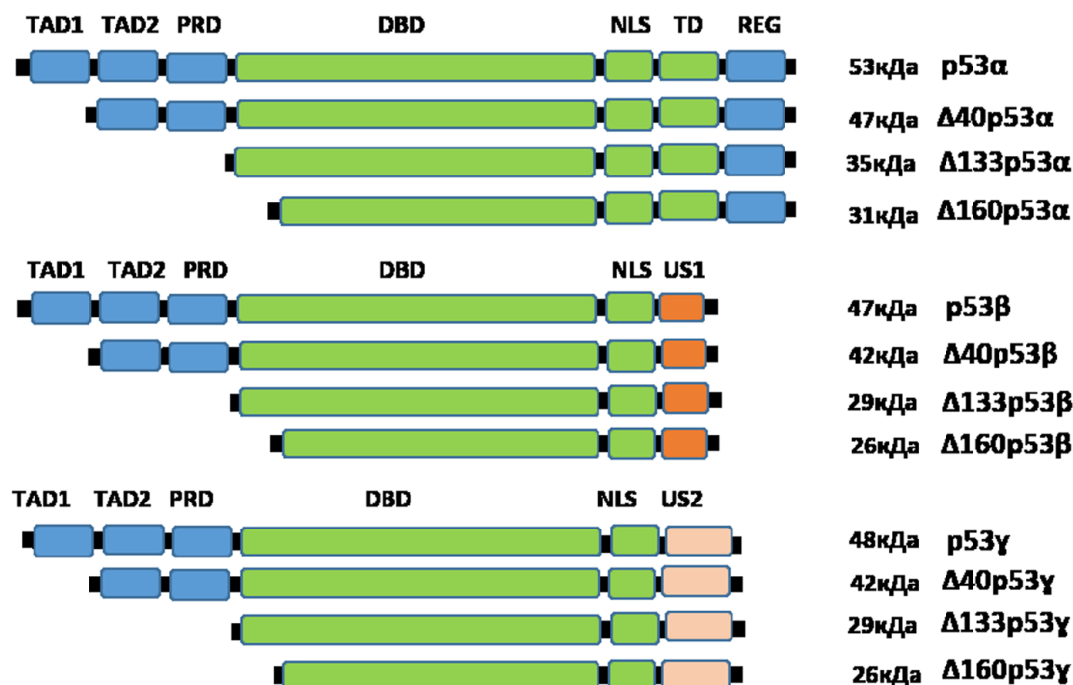


Рисунок 2. Схема доменной структуры изоформ белка p53. Канонический p53 имеет два трансактивационных домена (TAD1 и TAD2, AA1-63); богатый пролином домен (PRD, AA64-92); ДНК-связывающий домен (DBD, AA102-306); домен ядерной локализации (NLS, AA316-325); олигомеризационный домен (TD, AA327-355); основной регуляторный домен (REG, AA364-393). US1 (unique sequence 1), замена в области AA332-341: IRGRERFEMF → DQTSFQKENC и US2 (unique sequence 2), замена в области AA332-346: IRGRERFEMFRELNE → MLLDLRWCYFLINSS.

типов тканей приматов и человека на уровне мРНК и на белковом уровне идентифицирована изоформа p53 с делецией в 66 а.о. (AA257-322), в том числе 39 а.о. корового домена и части линкера, связывающего коровый домен с тетрамеризационным доменом. Эта изоформа генерируется при альтернативном необычном сплайсинге экзонов 7/8 гена *TP53*. Она проявляет транскрипционную активность независимо от полноразмерного p53 только в повреждённых S-фазных клетках и, по-видимому, важна для сверочной точки S-фазы [38, 39]. Обнаружен также уникальный эволюционно консервативный сплайс-вариант p53 ψ – транскрипционно неактивная изоформа (м.м. 27 кДа). В ней отсутствуют большие участки ДНК-связывающего домена, области ядерной локализации и тетрамеризационного домена; следовательно, она не способна специфически связываться с ДНК и активировать канонические для p53 гены-мишени. Изоформа p53 ψ локализуется в митохондриальном матриксе и регулирует проницаемость митохондриальных пор. Экспрессия этой изоформы p53 ослабляет экспрессию Е-кадгерина (супрессор инвазии эпителиальной опухоли), при этом усиливается инвазивная способность клеток, что способствует их репрограммированию в метастатическое состояние. Экспрессия p53 ψ обнаружена на мышцах в повреждённых (обработка нафталином или CCl₄) тимусе, слонной железе, тонкой кишке, мозге, сердце, почке, скелетных мышцах, селезёнке, желудке, печени и лёгком, а также в опухолевых клетках человека [40]. В одном из недавно вышедших обзоров систематизированы данные о наличии разных изоформ p53 и наблюдаемых клеточных эффектах в разных типах опухолей [41]. Очевидно, что понимание механизмов действия изоформ p53, обнаружение корреляций между экспрессией изоформ p53 и развитием опухолевых процессов в комбинации со знаниями о мутациях p53 исключительно важны в исследованиях в области биологии злокачественных преобразований [42].

3. МУТАЦИИ TP53

Известно, что ген *TP53* очень часто мутирован в опухолевых клетках (до 50% случаев). По сравнению с другими факторами, способствующими образованию протеоформ, мутации генерируют их наибольшее число, изменяя большинство а.о. p53 [43]. Особенностью мутаций гена *TP53* является то, что они часто гетерозиготны, то есть поражают только один из двух аллелей гена. Многие мутации могут вызывать доминантно-негативный эффект (DNE), то есть ингибирующий эффект по отношению к белку p53 дикого типа, приводя к злокачественной трансформации клеток. Одним из возможных путей проявления доминантно-негативного эффекта считается гетероолигомеризация, то есть образование гетеротетрамеров p53, которые потенциально могут связываться с ДНК слабее, чем гомотетрамеры p53 [44]. В противоположность другим онкосупрессорам, для которых характерны мутации, прекращающие синтез белка, в случае p53 – это чаще всего миссенс-мутации, которые возникают в ДНК-связывающем

домене (более 80%). Эти мутации влияют главным образом на ДНК-связывающую способность p53, действуя на структуру, фолдинг и стабильность ДНК-связывающего домена. Они называются конформационными мутантами. Другие мутации p53 не изменяют структуру ДНК-связывающего домена p53, но затрудняют связывание с ДНК частично или полностью. Они называются мутациями сайта контакта, так как а.о. в этих сайтах контактируют непосредственно с ДНК генов-мишеней так же, как в случае p53 дикого типа. В ДНК-связывающем домене с той или иной частотой могут возникать мутации почти каждого а.о., что приводит к накоплению мутантного белка с нарушенной функцией и потенциальной способностью инициировать опухоль [45]. Известно о ~1200 индивидуальных мутациях в ДНК-связывающем домене p53 при разных типах нозологических форм злокачественных новообразований [46]. То есть, в зависимости от мутационного статуса p53 может действовать как онкосупрессор или как проонкоген. Всего лишь одна нуклеотидная замена способна привести к такой метаморфозе [47]. Многие миссенс-мутации приводят к изменению белковой функции. Они называются gain-of-function или GOF-мутациями. GOF-мутанты p53 связываются с областями генома, отличными от областей связывания нормального белка p53, то есть меняют паттерны генной экспрессии, например, образуя комплексы с ДНК в зонах локализации регуляторных генов метилтрансферазы, ацетилтрансферазы, что приводит к повышенному уровню метилирования и ацетилирования гистонов и перестройке хроматина [48]. Большинство мутантных p53 может модифицироваться по тем же сайтам, что и p53 дикого типа. Оказалось, что кодоны для сайтов, подвергающихся модификациям, редко имеют мутации в человеческих опухолях [49]. Это предполагает, что ПТМ не существенны для онкосупрессорной активности. С другой стороны, о важности ПТМ в биологии продуктов гена *TP53* говорит тот факт, что несколько а.о., подвергающихся модификации, включая шесть остатков DBD (Lys132, Thr155, Ser215, Glu258, Asp259, Cys277), высоко консервативны [49]. Кодоны для этих шести аминокислот имеют ~90 опухоль-ассоциированных мутаций на кодон по сравнению с ~70 в DBD *TP53*. Но ни один из 20 ПТМ-сайтов, описанных для DBD, не попадает в “горячие точки” для опухоль-ассоциированных мутаций [49]. Согласно базе данных Международного агентства по изучению рака, “горячими точками” распределения мутаций по кодонам p53 во всех исследованных опухолях человека являются: Val157, Arg158, Arg175, Gly245, Arg248, Arg249, Arg273, Arg282 [49, 50] (рис. 1). Частота этих миссенс-мутаций при разных формах опухолей составляет 5-35% от общего количества случаев. Однако шесть остатков аргинина (158, 175, 248, 249, 273, 282), часто мутированных в ряде злокачественных опухолей, входящих в список “горячих точек”, также подвергаются моно-, ди- и триметилированию, в частности, в клетках нормальных фибробластов человека (HFF) [51].

Функциональную картину ещё более усложняет способность белка p53 образовывать фибриллярные агрегаты [52]. Есть предположение, что образование агрегатов мутантного p53 может быть связано с онкогенезом из-за потери функции доминант-негативного или эффектов с получением новых функций [53]. Показано, что одна из мутантных форм p53 проявляет прионоподобные свойства [54, 55]. То есть, хотя его стандартные функции тесно связаны с подавлением опухоли, мутанты и агрегаты p53 участвуют в прогрессе опухоли. Такие агрегаты представляют собой гетерогенные аморфные олигомеры и амилоидоподобные фибриллы. Их наличие в опухолевых тканях, а также способность мутантных p53 коагрегировать с p53 дикого типа *in vitro* и обнаружение передачи данного эффекта от клетки к клетке указывают на то, что рак обладает основными характеристиками прионов и прионоподобных заболеваний [56].

4. ПТМ p53

Живые клетки постоянно подвергаются многочисленным воздействиям окружающей среды и должны адаптироваться к быстро меняющимся условиям. Для этого требуется динамичная, хорошо регулируемая система. Большинство белков – объект ПТМ, где а.о. могут химически модифицироваться. Ковалентные ПТМ белков представляют главный уровень регуляции и обеспечивают тонкий контроль (модулирование) белковых функций. Благодаря ПТМ может генерироваться огромное количество разных белковых видов (протеоформ), компенсирующих несоответствие между относительно небольшим

числом белок-кодирующих генов и огромным количеством вариабельных регуляторов, требующихся в сложных организмах. Таким образом, ПТМ увеличивают функциональное разнообразие протеома. По образному выражению – это спасение природы от генетического заточения (“It is nature's escape from genetic imprisonment”) [57]. Установлено, что более 5% человеческого генома кодирует ферменты, участвующие в проведении ПТМ [58]. Интересно, что почти все эти модификации обратимы.

В противоположность генной экспрессии, которая задаёт базовый уровень кодируемого белка, ПТМ обычно влияют на трёхмерную структуру белков, тем самым модулируя их субклеточную локализацию, стабильность, активность и функцию [5, 59]. Белок p53 также является объектом множественных ПТМ, возникающих как во время нормального гомеостаза, так и в ответ на многочисленные стрессовые стимулы [60]. Модифицируются боковые цепи а.о., или свободная N-концевая аминокислота, или свободный C-концевой гидроксил без каких-либо химических изменений полипептидной цепи [59]. Однако, функциональная роль большинства этих модификаций и знание сигнальных путей, ведущих к ним (рис. 3), пока ещё далеки от понимания [13, 61].

ПТМ, идентифицированные внутри доменов белка p53, включают ацетилирование, метилирование, убиквитинирование (UBI), сумоилирование (SUMO) и недидилирование (NEDD) остатков Lys (K); метилирование остатков Arg (R); фосфорилирование Ser (S) и Thr (T); ADP – рибозилирование Asn (N) или Glu (E) и Q – гликозилирование Ser(S) [60]. По функциональному действию на p53

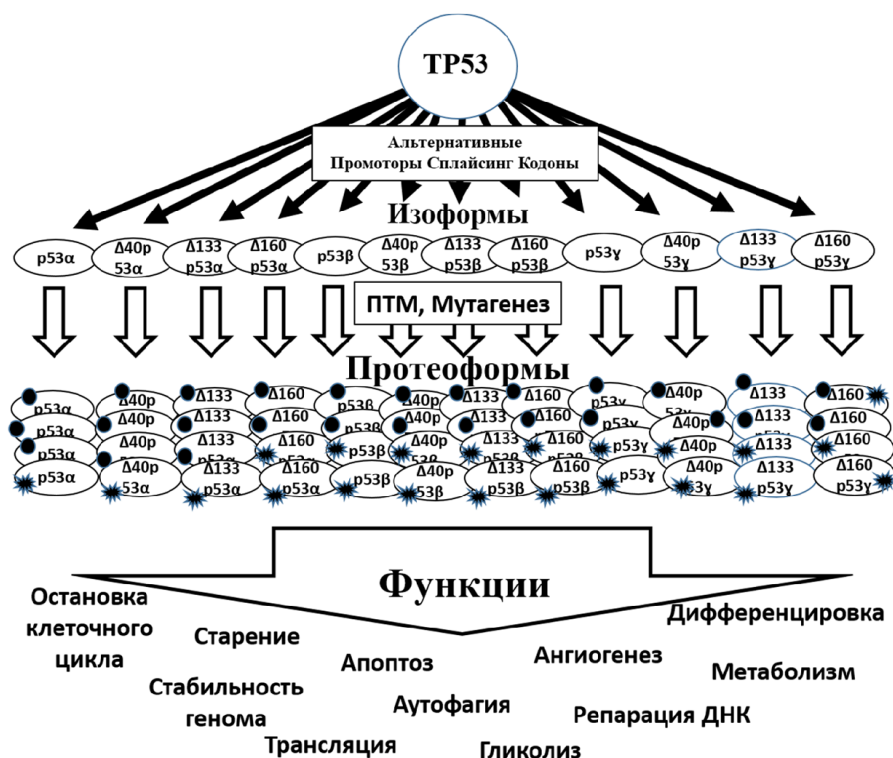


Рисунок 3. Графическое отображение механизмов возникновения изоформ и протеоформ p53. Указаны процессы, в которых функционирует p53.

ПТМ можно разделить на 2 группы: одна маркирует p53 для протеасомной деградации и инактивации (UBI, NEDD, SUMO, метилирование определенных лизинов), другая – стабилизирует и активирует (фосфорилирование, ацетилирование, метилирование) [10]. Большинство ПТМ происходит в неструктурированных областях: TAD1 и TAD2, линкерном и С-концевом доменах. Эти области служат сайтами для взаимодействия с многочисленными белками (>300). В настоящее время в базах данных указано около 1000 белков-партнеров, с которыми взаимодействует белок p53, и создана модель интерактома этого белка [6]. При этом ПТМ контролируют активность p53 через модулирование многих таких взаимодействий [49, 62].

Фосфорилирование – одна из самых распространённых модификаций, влияющих на регуляцию биологических процессов в клетке [11, 17]. Обнаружено около 500 генов, кодирующих серин- (Ser)/ треонин- (Thr)/ тирозин- (Tyr) киназы, и даже введен термин “кином” (полный набор протеин-киназ, кодируемых геномом человека) [63]. Активному фосфорилированию подвергается также и белок p53 [64, 65], что позволяет ему стабилизироваться, усиливать связывание с ДНК, инициировать остановку клеточного цикла и апоптоз. При фосфорилировании остатков ОН-группы серина, треонина, тирозина белок приобретает дополнительный отрицательный заряд. Сайты фосфорилирования p53 концентрируются в N- и С-концевых доменах. Большинство этих сайтов фосфорилируется при стрессе, а некоторые, например, Thr55 и Ser376, наоборот, – в нестрессированных клетках, а при стрессе дефосфорилируются. Наиболее изучено фосфорилирование N-концевых сайтов Ser15 и Ser20, приводящее к снижению аффинности взаимодействия с главным негативным регулятором Mdm2 (убиквитинлигаза) и рекрутированию транскрипционных коактиваторов [66].

Потенциал для регуляции метилированием представляют свободные аминогруппы лизина (Lys) и аргинина (Arg) белка p53; функциональные последствия – как активация, так и репрессия генов-мишеней в зависимости от локализации, числа присоединенных метильных групп (моно-, ди-, три-метилирование) [66]. При этом сохраняется положительный заряд указанных а.о.

Установлена ключевая роль ацетилирования белка p53 в промотор-специфической активации генов-мишеней [12, 60, 66-69]. Ацетилирование способствует стабилизации p53, исключая убиквитинирование того же сайта; ингибирует образование репрессивных комплексов HDM2/HDMX на промоторах генов-мишеней; приводит к связыванию кофакторов. Главные сайты ацетилирования человеческого p53 включают два лизиновых остатка Lys120 и Lys164 внутри DBD домена и кластер из шести лизинов в С-концевом домене (Lys370, Lys372, Lys373, Lys381, Lys382, Lys386). В результате ацетилирования происходит нейтрализация положительного заряда свободной аминогруппы $(-NH_3^+)$ лизина. Ацетилирование Lys120

критично для апоптоза, но практически не влияет на экспрессию p21. Белок p21, продукт гена *CDKN1A* – ингибитор циклин-зависимой киназы, требуется для остановки клеточного цикла и старения клетки. Тогда как одновременная утрата возможности ацетилирования всех указанных сайтов (при замене лизина на аланин) исключает и остановку клеточного цикла и апоптоз [68]. Эти же лизиновые остатки важны и для убиквитинирования p53 с помощью негативного регулятора MDM2 [68]. Согласно данным базы SwissProt, человеческий белок p53 (UniProtKB #P04637) может быть модифицирован по 60 из 393 а.о. (~ 15%).

Важными ПТМ являются UBI, SUMO, NEDD, связанные с обратимым ковалентным добавлением указанных белков к специфическим лизиновым остаткам. В случае белка p53 большинство таких лизиновых остатков, подвергающихся убиквитинированию, находятся в DBD и С-концевом домене. Лизины, которые подвергаются неддильрованию и сумоилированию, расположены в С-концевом домене [49]. Полиубиквитинирование – это сигнал для протеасомной деградации, а мононеддильрование, моносумоилирование и моноубиквитинирование могут служить метками для разной клеточной локализации p53 [70, 71].

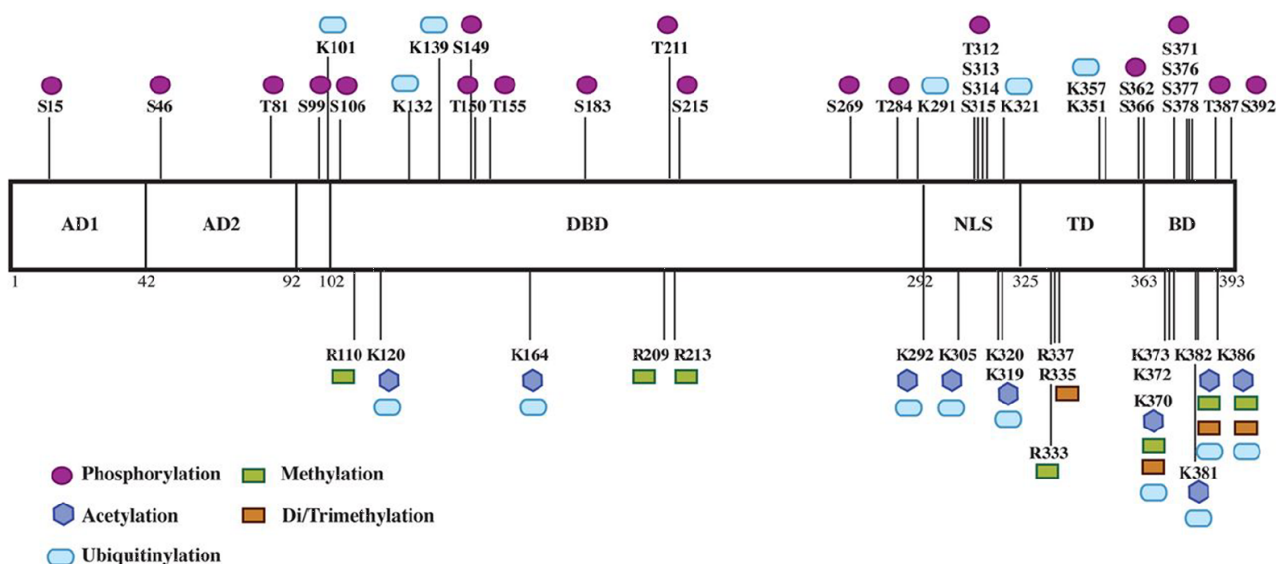
ПТМ p53 проявляют значительную избыточность и взаимозависимость [72]. N-концевое фосфорилирование влияет на С-концевое ацетилирование [49, 73]. Взаимозависимы процессы N-концевого фосфорилирования: замена Ser15 на аланин блокировала фосфорилирование Ser9, Thr18, Ser20 после активации ионизирующим излучением [74]. Взаимозависимость обнаружена для ацетилирования и метилирования сайтов в С-концевой области p53 [75, 76]. Разработаны программы для предсказания взаимовлияния ПТМ в различных белках, в том числе в белке p53 [77]. Авторы данных расчётов определили, что взаимовлияние предпочтительно происходит между ПТМ ближайших сайтов, особенно в неструктурированных областях белков.

Список ПТМ p53 был значительно расширен в работе DeHart и соавт. [51]. В норме концентрация белка p53 в клетке очень низкая; для получения популяции белка p53 в больших концентрациях с целью упрощения процедуры очистки и последующей идентификации были использованы клетки HFF, инфицированные аденовирусным мутантом типа 5, в котором не может происходить сборка вирус-специфической убиквитинлигазы, маркирующей p53 для протеасомной деградации. В результате в ядрах накапливается в очень высокой концентрации транскрипционно инертная популяция эндогенного человеческого p53. С помощью масс-спектрометрии высокого разрешения был проведён сравнительный анализ ПТМ p53 в двух популяциях одних и тех же клеток: с транскрипционно неактивным p53 и с p53, активированным этопозином (ингибитор топоизомеразы II, который инициирует апоптоз опухолевой клетки). Неожиданно, во всех функциональных доменах обеих популяций было

идентифицировано ~150 ранее не описанных ПТМ p53, а многие ранее описанные ПТМ были подтверждены (рис. 4). В полном каталоге модификаций белка в этой статье для белка p53 дикого типа указаны 99 сайтов и 222 ПТМ (~25%); для активированного p53 – 101 сайт и 230 ПТМ. Можно предположить, что различия в относительных степенях модификаций в специфических сайтах подчеркнут различия в функциональных свойствах этих двух популяций. По спектрам профили ПТМ обеих популяций очень похожи. Существенные различия в степени модифицирования показали лишь 2 сайта фосфорилирования Ser183, Ser185 и 4 сайта моно- и диметилирования Arg158, 248, 249, 273 (все сайты расположены в DBD-доме). Три остатка Arg248, Arg249, Arg273 важны для связывания с ДНК, и эти же сайты идентифицируются как “горячие”

точки мутаций *TP53* в человеческих опухолях. Уникальными оказались 4 сайта для контрольных клеток и 11 сайтов для клеток, обработанных этопозидом. В этой же статье [51] даётся анализ влияния отдельных модификаций на функции p53. Особое внимание обращено на 6 лизиновых остатков с многочисленными модификациями в домене REG (С-концевая область). Авторы делают общий вывод о том, что в данном типе клеток отсутствие или наличие отдельных ПТМ не является главной детерминантой свойств и биологической активности p53 [50]. Распределение ПТМ в двух популяциях, по-видимому, вмещает многочисленные субпопуляции со специфической комбинацией модифицированных остатков. Они и определяют локализацию, стабилизацию и супрессорную функцию белка p53 [51].

A Previously Described



B Novel

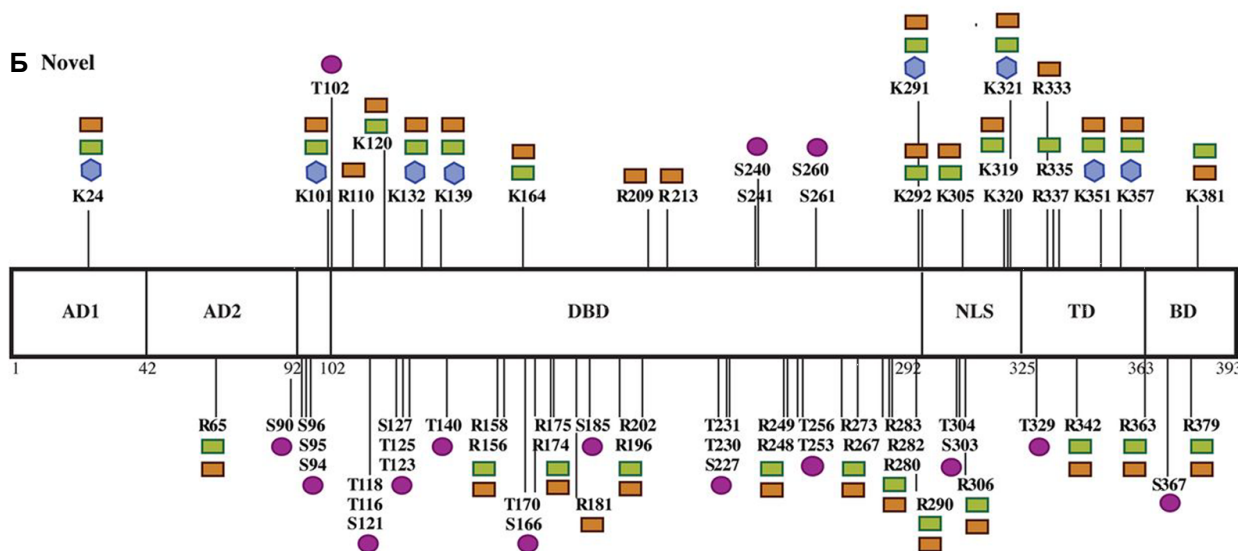


Рисунок 4. ПТМ p53 клеток HFF, инфицированных аденовирусом AdEasyE1D2347. Суммированы модификации, идентифицированные в трёх независимых образцах DE1Bp53. А – ранее описанные ПТМ, Б – новые ПТМ. AD1(TAD1), AD2(TAD2) – активационные домены; DBD – ДНК-связывающий домен; NLS – сигнал ядерной локализации; TD – тетрамеризационный домен; REG – основной регуляторный домен. Взято из [51] с разрешения издательства.

5. ПТМ И ОНКОСУПРЕССОРНАЯ ФУНКЦИЯ p53

Закономерно встаёт вопрос о важности ПТМ белка p53 в связи с его важнейшей функцией – онкосупрессорной, способностью подавлять неконтролируемую пролиферацию повреждённых клеток. Установлена роль p53 в мониторинге стрессовых сигналов путём активации транскрипции специфических генов-мишеней, которые контролируют репарацию повреждений ДНК, остановку клеточного цикла и апоптоз [66]. Обширный спектр ПТМ может модулировать эти специфические функции p53 *in vivo* [66].

Большинство сайтов ПТМ расположены в N-концевом (TD) и C-концевом (REG) доменах белка p53. Однако эти две области содержат небольшое число инактивирующих мутаций, обнаруженных в опухолевых клетках, по сравнению с ДНК-связывающим доменом (DBD), где в основном расположены мутации (горячие точки) (рис. 1). Механизмы, осуществляющие данную регуляцию, по-прежнему являются предметом дальнейшего изучения. Один из потенциальных механизмов такого контроля – обширный спектр ПТМ белка p53, которые активируют и стабилизируют белок, могут влиять на его селективное связывание с промоторами генов-мишеней, модулировать специфические функции p53 [66]. Ряд работ по исследованию онкосупрессорной функции p53 *in vivo* свидетельствует, что нарушение ПТМ p53 может давать вклад в канцерогенез. Удобной моделью являются линии генетически модифицированных мышей с точечными мутациями, которые нарушают ПТМ p53. Например, показано участие многих ПТМ в регуляции апоптоза: фосфорилирование Ser46 (при замене серина на аланин, S46A) [78], ацетилирование лизина (K120; DBD домен), а также ацетилирование лизина (K317; TD домен) [79]. У мышей с заменой S389A в p53 отмечено увеличение предрасположенности к раку кожи, вызванному ультрафиолетовым излучением [80]. На клетках аденокарциномы молочной железы (MCF7) показано, что монометилование лизинов K370, K382 и диметилование лизина K373 белка p53 являются потенциально онкогенными [81]. Предполагается, что специфическое фосфорилирование не функционирует в качестве переключателя для стабилизации или транскрипционной активности p53, но помогает тонкой настройке и регуляции функции белка p53. А через метилирование (моно-, ди-, три-) происходит модулирование активности p53 [81].

6. БЕЛОК p53 КАК ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР

Низкая концентрация белка p53 в клетке обусловлена действием E3 убиквитинпротеинлигазы Mdm2, которая убиквитинирует p53 для протеасомной деградации и обеспечивает его ядерный экспорт [71, 82]. ПТМ p53 могут ингибировать связь p53 с Mdm2 и предотвращать его деградацию. В ответ на клеточный стресс вновь синтезированный p53 подвергается серии стабилизирующих и активирующих ПТМ, входит в ядро, где действует как

сиквенс-специфический транскрипционный фактор, осуществляющий вместе с транскрипционными кофакторами (за счёт белок-белковых взаимодействий) как активацию, так и репрессию транскрипции генов-мишеней (~200) [83-85]. Молекулы p53 собираются в виде тетрамеров, состоящих из двух гомодимеров, соединённых между собой C-концами [18, 86-91]. В работе [87] для обнаружения гетеротетрамеров p53 α с Δ 40p53 использовали методику сшивки белков глутаровым альдегидом, в работе [91] – методику коиммунопреципитации. В системе *in vitro*, на клеточной линии H1299 (карцинома лёгкого, ноль-мутант по p53) показано, что инактивация тетрамера белка p53, то есть потеря транскрипционной активности достигается в случае мутаций трёх субъединиц (R249S, R273H), дефектных по связыванию с ДНК и одной укороченной субъединицы p53, лишённой N-концевого трансактивационного домена [92]. В мономерном состоянии белок p53 не способен к активации генов [93]. Следует отметить, что ПТМ подвергается как p53, так и гистоны вблизи от его мест связывания в хроматине, что даёт возможность осуществлять совместную трансактивацию генов-мишеней с высокой точностью [10, 17, 89].

До недавнего времени на основе результатов, полученных *in vitro* на клеточных линиях, доминировала точка зрения, что после генотоксического стресса происходит транскрипционная индукция и экспрессия классических генов-мишеней, таких как *CDKN1A*, *PMAIP1*, *BBC3*, *BAX*. Продукт гена *CDKN1A*, белок p21, участвует в остановке клеточного цикла [94]; продукты генов *PMAIP1*, *BBC3*, *BAX* требуются для индукции апоптоза [95, 96]. Это определяет способность p53 блокировать неконтролируемую пролиферацию трансформированных клеток, предотвращать мутации, быть онкосупрессором, “стражем генома”. Согласно этой точке зрения, происходит координация трёх ключевых ответов клетки: от блокирования клеточного цикла для эффективной репарации повреждений ДНК до старения и апоптоза, если повреждения носят многочисленный характер и не могут быть исправлены [97]. Эти альтернативные ответы определяются конкретным типом клеток, типом ткани, состоянием окружающей среды, природой и длительностью стимулов [9]. Обнаружены транскрипционно независимые пути апоптоза, опосредуемые p53, критерием которых является накопление белка p53 в цитозоле или митохондриях. Решающим условием для инициации этого пути является проницаемость митохондриальной внешней мембраны и физическое и функциональное взаимодействие белка p53 с несколькими белками членами семейства Bcl-2. При этом происходит прямая активация проапоптотического гена *BAX* [98]. Также происходит репрессия, например, инвазивных генов [99]; проапоптотического гена *BCL2* [100]; гена *TERT*, кодирующего каталитическую субъединицу теломеразы, что препятствует иммортализации клеток [101]. Белок p53 репрессирует многие гены путём индукции микро-РНК или длинных некодирующих РНК [102, 103]. Есть доказательства

того, что p53 помогает в сохранении митохондриального генома после транслокации в митохондрии и взаимодействия с репарационными белками митохондриальной ДНК [104]. Подчеркнём, что как минимум половина злокачественных новообразований сопровождается изменением или потерей функций p53 [105, 106].

Новый взгляд на механизм того, как p53 может супрессировать образование опухоли следует из результатов экспериментов с использованием трансгенных технологий *in vivo* [107, 108] на линиях мышеч с p53, мутантным по сайтам, ответственным за транскрипционную индукцию гена *CDKN1A*, кодирующего белок p21 (остановка клеточного цикла), и генов *BBC3* и *PMAIP1* (апоптоз). Это двойной мутант p53^{25,26/25,26} [107] и тройной мутант p53^{3KR/3KR} (K117, K161, K162) [108]. В обоих случаях замена лизина на аргинин ингибирует ацетилирование указанных сайтов. В результате исключается транскрипционная индукция соответствующих генов. Были проведены эксперименты на мышцах с полностью отсутствующими генами *CDKN1A*, *PMAIP1*, *BBC3* (*CDKN1A*-/*BBC3*-/*PMAIP1*-) [109]. Во всех случаях способность супрессировать опухоль сохранялась в значительной степени; кроме того, не менялась способность p53 регулировать экспрессию генов-мишеней (*TIGAR*, *GLS2*, *SLC2A3*), которые контролируют обмен глюкозы и антиоксидантную защиту (понижение уровня активных форм кислорода). Авторы полагают, что индукция апоптоза, остановка клеточного цикла и, возможно, физиологическое старение, то есть полный потенциал p53 в активации транскрипции классических генов-мишеней не являются необходимыми для супрессии спонтанного развития опухоли [108, 110, 111]. Кроме того, критичны и другие процессы, такие как регуляция энергетического метаболизма и антиоксидантная функция [109, 112-114]. То есть, прямой вклад супрессорной активности p53 в процессы остановки клеточного цикла, старения и апоптоза всё еще остаётся предметом дискуссий.

7. БЕЛОК p53 И ПРОТЕОМИКА

Обширные литературные данные свидетельствуют о том, что белок p53 функционирует в клетке как динамичный конформационный ансамбль, содержащий множество протеоформ (комбинация изоформ и ПТМ), и способный выполнять многочисленные функции. Недавно опубликованный обзор, в частности, посвящён обоснованию концепции белковой структурно-функциональной непрерывности (Protein Structure-Function Continuum Concept) [6]. Весьма вероятно, что использование протеомной методологии в отношении белка p53 окажется полезной и в медицинской практике. Это может быть проиллюстрировано на примере ряда работ.

Вестерн-блоттинг с использованием специфических антител, а также измерение уровня мРНК с помощью обратной транскрипции и специфических праймеров дают возможность идентифицировать изоформы белка p53, что открыло новые перспективы в исследовании рака. Анализ белка по биосигнатуре,

представляющей несколько изоформ p53, может дать информацию о его функциях. Как уже отмечалось, варианты p53 экспрессируются на уровне мРНК тканеспецифическим образом и могут регулировать транскрипционную активность полноразмерного p53. Так, вариант $\Delta 133p53\alpha$ экспрессируется в клетках большинства нормальных тканей, но не детектируется в клетках простаты, матки, скелетных мышц и молочной железы [36]. Вариант мРНК, кодирующий изоформу $\Delta 133p53\beta$, обнаружен в нескольких нормальных тканях, таких как толстая кишка, костный мозг, яичко, мозг эмбриона и кишечник [36]. Вариант мРНК, кодирующий $\Delta 133p53\gamma$, экспрессируется в большинстве нормальных тканей, но не обнаруживается в мозге, сердце, лёгком, печени эмбриона, слюнной и грудной железе и кишечнике [35]. Изоформа $\Delta 133p53\alpha$ модулирует транскрипционную активность p53 и активно экспрессируется в разных человеческих опухолях. На клетках высокоангиогенной глиобластомы человека U87, экспрессирующей эндогенные изоформы p53(α,γ), $\Delta 133p53(\alpha,\beta)$, показано, что трансфекция с помощью малых интерферирующих РНК (siRNA), в данном случае для $\Delta 133p53\alpha$, подавляет экспрессию $\Delta 133p53\alpha$ и индуцирует экспрессию p53 α на уровне мРНК и белка. В этой же работе установлено, что $\Delta 133p53\alpha$ стимулирует ангиогенез и прогрессию опухоли, то есть является доминант-негативным фактором относительно полноразмерного p53, и эти процессы можно регулировать, меняя соотношение $\Delta 133p53\alpha$ и p53 [34]. В другой работе показано, что изоформы $\Delta 133p53$ и p53 β по-разному экспрессируются на уровне мРНК при гастрите и раке желудка, то есть являются потенциальными мишенями для диагностики и терапии рака [115].

Экспрессию p53 γ связывают с благоприятным прогнозом у пациентов с раком молочной железы как при наличии p53 дикого типа, так и мутантного белка p53, но с пониженной выживаемостью, плохим прогнозом у больных с серозным раком матки [116, 117]. В p53-ноль клеточных линиях H1299 (рак лёгкого) и SAOA-2 (остеосаркома), трансдуцированных ретровирусными векторами, экспрессия изоформ p53 β и p53 γ усиливала чувствительность клеток к противоопухолевым препаратам [118]. Обнаружено, что в глиобластоме и глиозных клетках (глиоз головного мозга – неспецифическое реактивное изменение глиальных клеток в ответ на повреждение центральной нервной системы) наиболее часто присутствуют детектируемые на белковом уровне изоформы p53 α и $\Delta 40p53$. Ни одна из них не определяется в нормальных клетках коры головного мозга [119]. На клетках меланомы, трансдуцированных лентивирусом, кодирующим экзогенный $\Delta 40p53$, показано, что $\Delta 40p53$ увеличивает уровень эндогенного активированного p53 и экспрессию проапоптотического гена-мишени *PIDD*, но подавляет экспрессию гена-мишени белка p21 в ответ на клеточные стрессы [120]. В этой же работе показано, что $\Delta 40p53$ образовывал ядерные тетрамеры с полноразмерным p53 (то есть гетеротетрамеры) и изменял промоторную занятость указанных генов. При исследовании экспрессии изоформ p53

в клеточных линиях меланомы после обработки цисплатином показано, что $\Delta 40p53$ ингибирует, а $p53\beta$ усиливает $p53$ -зависимую транскрипцию генов *p21* и *PUMA* [121]. В мутантной линии рака лёгкого детектируется изоформа $\Delta 160p53$, которой нет в линии дикого типа [37]. Исследования показывают, что экспрессируемый набор изоформ $p53$ может играть решающую роль во внутриклеточной регуляции в ответ на различные стрессы и на химиотерапию, поскольку функции разных изоформ могут усиливать или понижать онкосупрессорную активность $p53$. Таким образом, изоформы $p53$, вероятно, играют ключевую роль в канцерогенезе.

Двумерный электрофорез (2DE) и последующий Вестерн-блоттинг с использованием специфических антител – мощная техника для обнаружения протеоформ белков, и интерес к получению такой информации с целью возможной идентификации новых прогностических и терапевтических маркеров весьма высок. Результатом таких экспериментов является получение изображения белкового профиля (сигнатуры), представляющего комбинацию изоформ $p53$ с различными ПТМ. Сравнение 2DE-Вестерн-блоттинга белка в норме и при патологии может дать картину изменений по таким параметрам, как количество, интенсивность, размер и положение отдельных белковых пятен. Немодифицированная форма $p53$ характеризуется $pI=6,4$, а фосфорилирование или ацетилирование приводит к понижению этой величины [122]. 2DE-вестерн-блоттинг позволил обнаружить разный набор протеоформ белка $p53$ в двух линиях лимфомы, при этом наблюдалась значительная разница в концентрациях нуклеотидного аналога флударабина (FDA), необходимых для индукции апоптоза в этих линиях [123]. Усовершенствованный метод, включающий корреляционный анализ протеомных профилей белка $p53$ успешно применили для клинической классификации острого лимфобластного лейкоза и острого миелоидного лейкоза (ОЛЛ и ОМЛ) [122]. В работе [35] изучали изменение сигнатуры белка $p53$ у больных ОМЛ в процессе химиотерапии. До терапии это – полноразмерный $p53$ и изоформа $\Delta p53$ (делеция 66 аминокислотных остатков в ДНК-связывающем домене) [38]; после терапии наблюдали быстрое накопление полноразмерного белка. Анализ экспрессии белковых сигнатур $p53$ в бластах периферической крови пациентов больных ОМЛ с мутациями NPM1 (молекулярный шаперон нуклеофосмин; мутация связана с хорошим прогнозом) и FLT3 (рецепторная тирозинкиназа, мутация в которой связана с плохим прогнозом) показал корреляцию изоформ $p53$ с клиническим исходом (рис 5; 4А и 4В). В первом случае наблюдается экспрессия изоформ $p53\beta/\gamma$, во втором случае – полноразмерного белка $p53$ и изоформ β/γ . Кроме того, пациенты с высокой экспрессией указанных изоформ по сравнению с полноразмерным $p53$ лучше реагировали на интенсивную химиотерапию и демонстрировали значительно более высокую выживаемость [124]. На основании сравнения сигнатур белковых препаратов лейкоцитов здоровых

доноров и больных ОМЛ (полноразмерный белок $p53$ и две изоформы ($p53\beta$ и $p53\gamma$)) был разработан потенциальный метод диагностики этого заболевания [125]. Разница в сигнатурах белка $p53$ в контрольном образце и после γ -облучения показана в работе [126]. Полноразмерный белок $p53$ из клеточной линии с моноцитарным лейкозом, определяемый как цепочка из 5 пятен, превращался в сплошную полосу со значительным сдвигом в сторону более высоких pH , что свидетельствует об активации белка $p53$ ионизирующим излучением и значительных модификациях $p53$, повышающих его pI (рис 5; 2А и 2В).

Аналогичный эффект обнаружен в наших экспериментах: 2DE с последующим Вестерн-блоттингом на клетках глиобластомы человека, контрольных и γ -облученных дозой 35 Гр (рис 5; 3А и 3В). В экспериментах полностью следовали методике, изложенной в статье [127]. Для Вестерн-блоттинга в качестве первичных антител использовали мышиные N-концевые моноклональные антитела DO-1 к $p53$. Эпитопом были аминокислотные остатки 20-25 $p53$, что позволяет идентифицировать только три изоформы белка $p53$: $p53\alpha$ (FL), $p53\beta/\gamma$ ($p53\beta$ и $p53\gamma$ имеют одинаковую м.м., равную 48 кДа). После активации ионизирующим облучением сигнатура $p53$ менялась, в частности, появлялись новые протеоформы, характеризующиеся более высокими значениями pI . Возможный механизм появления таких модификаций – дефосфорилирование $p53$ [128]. Также были обнаружены протеолитические производные $p53$ с меньшей м.м.. Более низкие значения pI этих производных предполагают протеолитическую деградацию $p53$ с C-конца при сохранении N-концевого домена.

В базах данных SWISS-2DPAGE представлены 2DE-карты белка $p53$, полученные с помощью иммуноблоттинга, и характеристики (pI , м.м.) протеоформ белка $p53$ из разных клеточных линий человека: DLD1 (рак толстой и прямой кишки) – 6 протеоформ; HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома) – 10 протеоформ; печень – 10 протеоформ. У всех протеоформ наблюдался сдвиг pI в сторону высоких pH . На рисунке 5 (1А, 1В, 1С) представлены результаты экспериментов, проведенных в нашей лаборатории с белковым материалом из двух клеточных линий глиобластомы человека. В линии Т (рис. 5; 1С) обнаружено более 30 протеоформ [127], в линии L (рис. 5; 1В) – около 20. Учитывая, что немодифицированная форма $p53$ имеет значение $pI=6,4$ и м.м. 53 кДа, мы обнаружили протеоформы полноразмерного белка, со значениями pI , сдвинутыми в сторону низких pH за счёт фосфорилирования и ацетилирования, а также протеоформы $p53\beta/\gamma$ с более низкой м.м.

Огромный прогресс в протеомных исследованиях белков, идентификации ПТМ, в том числе белка $p53$, достигнут благодаря использованию масс-спектрометрии. К настоящему времени, как уже было указано выше, наиболее полный возможный набор ПТМ $p53$ удалось получить De Hart с соавт. в экспериментах с нормальными

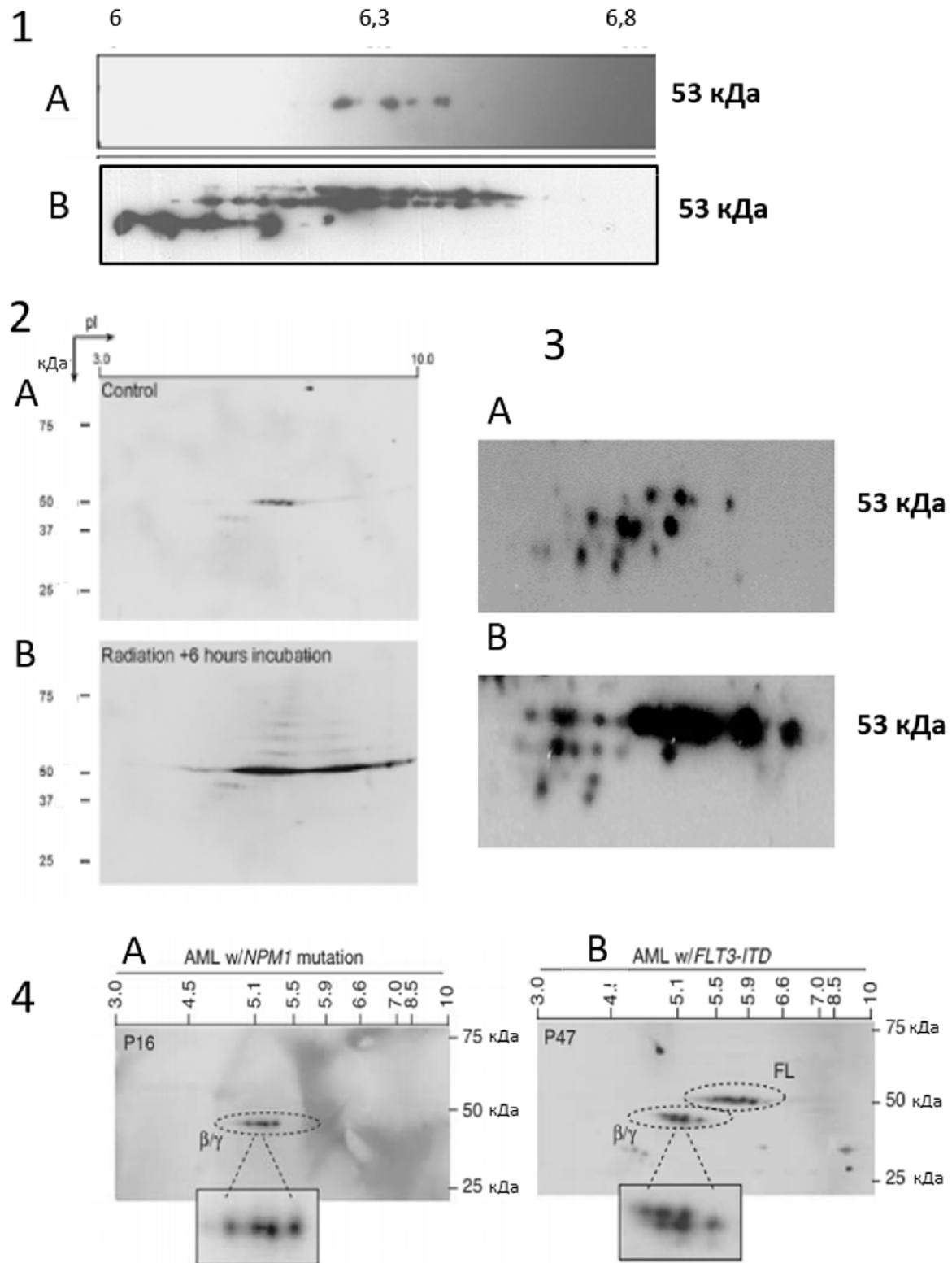


Рисунок 5. Изменение протеомного профиля белка p53 в условиях разного вида стрессов. 2DE Вестерн-блоты с использованием антител, детектирующих p53FL, p53β, p53γ. **1** – **A** – лизат нормальных клеток (фибробласты, ФЛЭЧ); **B**, **C** – лизат опухолевых клеток (глиобластомы линий L и T (адаптировано с разрешения из [127]); **2** – клеточная линия моноцитарного лейкоза: **A** – контроль; **B** – γ-облучение дозой 25 Гр с последующей инкубацией в течение 6 ч (адаптировано с разрешения из [126]); **3** – лизат клеток глиобластомы линии “Л”: **A** – до облучения; **B** – после γ-облучения дозой 35 Гр с последующей инкубацией в течение 4 ч (наши неопубликованные данные); **4** – корреляция биосигнатуры белка p53 с молекулярными прогностическими маркерами у пациентов (ОМЛ) с разным мутационным статусом: **A** – мутация NPM1, детектируется положительная корреляция с изоформами p53β/γ – положительный прогноз; **B** – мутация FLT3 (рецептор тирозинкиназы), детектируются p53FL и изоформы p53β/γ – негативный прогноз (адаптировано с разрешения из [35]).

человеческими фибробластами (HFF), используя масс-спектрометрический подход “снизу-вверх” [51] (рис. 4). В недавней работе эти же авторы, используя ещё и подход “сверху-вниз”, проанализировали аспекты модификаций только одного типа (фосфорилирование киназой Chk1) и показали, что в реальности количество модификаций в единичной молекуле p53 ограничено. Если подход “снизу-вверх” показал 41 сайт фосфорилирования в p53, то подход “сверху-вниз”, выявил не больше 8 ПТМ в одной молекуле p53. Авторы также используют термин “модформ” (“modform”) для индивидуальных белковых молекул с уникальным набором ПТМ [57]. С помощью подхода “сверху-вниз” делается попытка на модельной системе интактных (полноразмерных) молекул рекомбинантного белка p53 человека, фосфорилированного киназой Chk1 *in vitro*, определить распределение модформ в популяции, что, по мнению авторов, даёт наиболее полную информацию о глобальном взаимном влиянии ПТМ белка p53 и его способности кодировать информацию и выполнять различные функции в данном биологическом контексте [129].

Суммируя все вышеизложенное, мы можем заключить, что, хотя, на первый взгляд, возможное разнообразие p53 выглядит необъятным, в реальности всё-таки имеются некие сдерживающие эту вариабельность механизмы. Это и позволяет нам с неким оптимизмом смотреть на возможную перспективу описания и выявления функциональности многочисленных протеоформ p53.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование проведено в рамках выполнения Государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”-ПИЯФ на 2018-2021 годы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

ЛИТЕРАТУРА

- Roy B.M., Haupt L.R., Griffiths L. (2013) *Curr. Genomics*, **14**, 182-194.
- Pan Q., Shai O., Lee L.J., Frey B., Blencowe B.J. (2008) *Nat. Genet.*, **40**, 1413-1415.
- Wang E.T., Sandberg R., Luo S., Khrebtkova I., Zhang L., Mayr C., Kingsmore S.F., Schroth G.P., Burge C.B. (2008) *Nature*, **456**, 470-476.
- Smith L.M., Kelleher N.L. (2013) *Nat. Methods.*, **10**, 186-187.
- Pagel O., Loroch S., Sickmann A., Zahedi R.P. (2015) *Expert. Rev. Proteomics*, **12**, 235-253.
- Uversky V.N. (2016) *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 1874.
- Копнин Б.П., Копнин П.Б., Хромова Н.Б., Агапова Л.С. (2008) *Клиническая онкогематология*, **1**, 2-9. [Kopnin B.P., Kopnin P.B., Hromova N.B., Agapova L.S. (2008) *Klinicheskaya onkogematologiya*, **1**, 2-9.]
- Watson I.R., Irwin M.S. (2006) *Neoplasia*, **8**, 655-666.
- Gu B., Zhu W.G. (2012) *Int. J. Biol. Sci.*, **8**, 672-674.
- Marouco D., Garabadgiu A.V., Melino G., Barlev N.A. (2013) *Oncotarget*, **4**, 1556-1571.
- Loughery J., Meek D. (2013) *Biodiscovery*, **8**, e8946.
- Reed S.M., Quelle D.E. (2014) *Cancers (Basel)*, **7**, 30-69.
- Чумаков П.М. (2007) *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1399-1421. [Chumakov P.M. (2007) *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1399-1421.]
- Meek D.W., Anderson C.W. (2009) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **1**, a000950.
- Joerger A.C., Fersht A.R. (2010) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a000919.
- Cho Y., Gorina S., Jeffrey P.D., Pavletich N.P. (1994) *Science*, **15**, 346-355.
- Jenkins L.M.M., Durrell S.R., Mazur S.J. (2012) *Carcinogenesis*, **33**, 1441-1449.
- Riley T., Sontag E., Chen P., Levine A. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 402-412.
- Lane D.P., Crawford L.V. (1979) *Nature*, **15**, 261-263.
- Linzer D.I., Levine A.J. (1979) *Cell*, **17**, 43-52.
- Kress M., May E. (1979) *J. Virol.*, **31**, 472-483.
- Smith A.E., Smith R., Paucha E. (1979) *Cell*, **18**, 335-346.
- Ziener M.A., Mason A., Carlson D.M. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 11176-11180.
- Matlashewski G., Lamb P., Pim D. (1984) *EMBO J.*, **3**, 3257-3262.
- Marcel V., Dichtel-Danjoy M.L., Sagne C., Hafsi H., Ma D., Ortiz-Cuaran S., Olivier M., Hall J., Mollereau B., Hainaut P., Bourdon J.C. (2011) *Cell Death Differ.*, **18**, 1815-1824.
- Асатурова А.В. (2015) *Успехи современного естествознания*, **3**, 9-13. [Asaturova A.V. (2015) *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*, **3**, 9-13.]
- Kabel A.M. (2015) *J. Cancer Res. Treat.*, **3**, 25-27.
- Courtois S., Verhaegh G., North S., Luciani M.G., Lassus P., Hibner U., Oren M., Hainaut P. (2002) *Oncogene*, **21**, 6722-6728.
- Ghosh A., Stewart D., Matlashewski G. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 7987-7997.
- Bourdon J.C. (2007) *Br. J. Cancer*, **97**, 277-282.
- Khouri M.P., Bourdon J.C. (2011) *Genes Cancer*, **2**, 453-465.
- Marcel V., Perrier S., Aoubala M., Ageorges S., Groves M.J., Diot A., Fernandes K., Tauro S., Bourdon J.C. (2010) *FEBS Lett.*, **584**, 4463-4468.
- Graupner V., Schulze-Osthoff K., Essmann F., Jänicke R.U. (2009) *Cell Cycle*, **8**, 1238-1248.
- Bernard H., Garmy-Susini B., Ainaoui N., van den Berghe L., Peurichard A., Javerzat S., Bikfalvi A., Lane D.P., Bourdon J.C., Prats A.C. (2013) *Oncogene*, **32**, 2150-2160.
- Anensen N., Oyan A.M., Bourdon J.C., Kalland K.H., Bruserud O., Gjertsen B.T. (2006) *Clin. Cancer Res.*, **12**, 3985-3992.
- Bourdon J., Fernandes K., Murray-Zmijewski F., Liu G., Diot A., Xirodimas D.P., Saville M.K., Lane D.P. (2005) *Genes Dev.*, **19**, 2122-2137.
- Candeias M.M., Hagiwara M., Matsuda M. (2016) *EMBO Rep.*, **17**, 1542-1551.
- Rohaly G., Chemnitz J., Dehde S., Nunez A.M., Heukeshoven J., Deppert W., Domreiter I. (2005) *Cell*, **122**, 21-32.
- Garcia-Alai M.M., Tidow H., Natan E., Townsley F.M., Veprintsev D.B., Fersht A.R. (2008) *Protein Sci.*, **17**, 1671-1678.
- Senturk S., Yao Z., Camiolo M., Stiles B., Rathod T., Walsh A.M., Nemajero A., Lazzara M.J., Altorki N.K., Krainer A., Moll U.M., Lowe S.W., Cartegni L., Sordella R. (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E3287-E3296.

41. Vieler M., Sanyal S. (2018) *Cancers* (Basel), **10**, E288.
42. Surget S., Khoury M.P., Bourdon J.C. (2013) *Onco Targets Ther.*, **7**, 57-68.
43. Freed-Pastor W.A., Prives C. (2012) *Genes Dev.*, **26**, 1268-1286.
44. Billant O., Léon A., Le Guellec S., Friocourt G., Blondel M., Voisset C. (2016) *Oncotarget*, **7**, 69549-69564.
45. Oren M., Rotter V. (2010) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a001107.
46. Bouaoun L., Sonkin D., Ardin M., Hollstein M., Byrnes G., Zavadil J., Olivier M. (2016) *Hum. Mutat.*, **37**, 865-876.
47. Lee M.K., Teoh W.W., Phang B.H., Tong W.M., Wang Z.Q., Sabapathy K. (2012) *Cancer Cell*, **22**, 751-764.
48. Zhu J., Sammons M.A., Donahue G., Dou Z., Getlik M., Barsyte-Lovejoy D., Al-Awar R., Katona B.W., Shilatifard A., Huang J., Hua X., Arrowsmith C.H., Berger S.L. (2016) *Nature*, **525**, 206-211.
49. Nguyen T.-A., Menendes D., Resnick M.A., Anderson C.W. (2014) *Hum. Mutat.*, **35**, 738-755.
50. Brázdová M., Navrátilová L., Tichý V., Němcová K., Lexa M., Hrstka R., Pečinka P., Adámik M., Vojtesek B., Paleček E., Deppert W., Fojta M. (2013) *PLoS One*, **8**, e59567.
51. DeHart C.J., Chahal J.S., Flint S., Perlman D.H. (2014) *Mol. Cell Proteomics*, **13**, 1-17.
52. Ishimaru D., Andrade L.R., Teixeira L.S.P., Quesado P.A., Maiolino L.M., Lopez P.M., Cordeiro Y., Costa L.T., Heckl W.M., Weissmüller G., Foguel D., Silva J.L. (2003) *Biochem.*, **42**, 9022-9027.
53. Kim S., An S.S. (2016) *Medicine*, **95**, e3993.
54. Ano Bom A.P., Rangel L.P., Costa D.C., de Oliveira G.A., Sanches D., Braga C.A., Gava L.M., Ramos C.H., Cepeda A.O., Stumbo A.C., de Moura Gallo C.V., Cordeiro Y., Silva J.L. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 28152-28162.
55. Silva J.L., Cino E.A., Soares I.N., Ferreira V.F., de Oliveira G. (2018) *Acc. Chem. Res.*, **51**, 181-190.
56. Rangel L.P., Costa D.C., Vieira T.C., Silva J.L. (2014) *Prion*, **8**, 75-84.
57. Prabakaran S., Lippens G., Steen H., Gunawardena J. (2012) *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, **4**, 565-583.
58. Venne A.S., Kollipara L., Zahedi R.P. (2014) *Proteomics*, **14**, 513-524.
59. Ryšlavá H., Doubnerová V., Kavan D., Vaněk O. (2013) *J. Proteomics*, **92**, 80-109.
60. Kruse J.-P., Gu W. (2009) *Cell*, **137**, 609-622.
61. Anderson C.W., Appella E. (2010) in: *Handbook of Cell Signaling* (Bradshaw R.A., Dennis E.A., eds.), Chapter 264. Academic Press, New York., pp. 2185-2204.
62. Huang Y., Jeong J.S., Okamura J., Sook-Kim M., Zhu H., Guerrero-Preston R., Ratovitski E.A. (2012) *Cell Cycle*, **11**, 2367-2379.
63. Duong-Ly K.C., Peterson J.R. (2013) *Curr. Protoc. Pharmacol.*, **02**, Unit 2.9.
64. MacLaine N.J., Hupp T.R. (2009) *Aging*, **1**, 490-502.
65. Olsen J.V., Blagoev B., Gnäd F., Macek B., Kumar C., Mortensen P., Mann M. (2006) *Cell*, **127**, 635-648.
66. Dai C., Wei Gu (2010) *Trend Mol. Mod.*, **16**, 528-536.
67. Barlev N.A., Liu L., Chehab N.H., Mansfield K., Harris K.G., Halazonetis T.D., Berger S.L. (2001) *Mol. Cell*, **8**, 1243-1254.
68. Tang Y., Wenhui Z., Chen Y., Zhao Y., Gu W. (2008) *Cell*, **133**, 612-626.
69. Berger S.L. (2010) *Cell*, **1**, 17-19.
70. Дакс А., Мелино Д., Барлев Н. (2013) *Цитология*, **55**, 673-687. [Daks A., Melino D., Barlev N. (2013) *Citologiya*, **55**, 673-687.]
71. Hock A., Vousden K.H. (2010) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **42**, 1618-1621.
72. Warnock L.J., Raines S.A., Milner J. (2011) *Cancer Biol. Ther.*, **12**, 1059-1068.
73. Sakaguchi K., Herrera J.E., Saito S., Miki T., Bustin M., Vassilev A., Anderson C.W., Appella E. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 2831-2841.
74. Saito S., Yamaguchi H., Higashimoto Y., Chao C., Xu Y., Fornace A.J., Appella E., Anderson C.W. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 37536-37544.
75. West L., Gozani O. (2011) *Epigenomics*, **3**, 361-369.
76. Ivanov G.S., Ivanova T., Kurash J., Ivanov A., Chuikov S., Gizatullin F., Herrera-Medina E.M., Rauscher F., 3rd, Reinberg D., Barlev N.A. (2007) *Mol. Cell Biol.*, **27**, 6756-6769.
77. Huang Y., Xu B., Zhou X., Li Y., Lu M., Jiang R., Li T. (2015) *Mol. Cell Proteomics*, **14**, 761-770.
78. Feng L., Hollstein M., Xu Y. (2006) *Cell Cycle*, **5**, 2812-2819.
79. Chao C., Wu Z., Mazur S.J., Borges H., Rossi M., Lin T., Wang J.Y., Anderson C.W., Appella E., Xu Y. (2006) *Mol. Cell Biol.*, **26**, 6859-6869.
80. Attardi L.D., Broz D.K. (2010) *Carcinogenesis*, **31**, 1311-1318.
81. Chuikov S., Jenuwein T., Berger S.L., Huang J., Reinberg D., Zhang X., Jenuwein T., Reinberg D., Berger S.L. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 9636-9641.
82. Brooks C.L., Gu W. (2011) *FEBS Lett.*, **585**, 2803-2809.
83. Lane D., Levine A. (2010) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a000893.
84. Funk W.D., Pak D.T., Karas R.H., Wright W.E., Shay J.W. (1992) *Mol. Cell Biol.*, **12**, 2866-2871.
85. El-Deiry W.S., Kern S.E., Pietenpol J.A., Kinzler K.W., Vogelstein B. (1992) *Nat. Genet.*, **1**, 45-49.
86. Timofeev O., Schlereth K., Wanzel M., Braun A., Nieswandt B., Pagenstecher A., Rosenwald A., Elsässer H.P., Stiewe T. (2013) *Cell Rep.*, **3**, 1512-1525.
87. Takahashi R., Markovic S.N., Scrable H.J. (2014) *J. Invest. Dermatol.*, **134**, 791-800.
88. Ho W.C., Fitzgerald M.X., Marmorstein R. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 20494-20502.
89. Kamada R., Toguchi Y., Nomura T., Imagawa T., Sakaguchi K. (2016) *Biopolymers*, **106**, 598-612.
90. Inobe T., Nozaki M., Nukina N. (2015) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **467**, 322-327.
91. Hafsi H., Santos-Silva D., Courtois-Cox S., Hainaut P. (2013) *BMC Cancer*, **13**, 134.
92. Chan W.M., Siu W.Y., Lau A., Poon R.Y. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 3536-3551.
93. Zhang J., Lucchesi C., Chen X. (2016) *Cell Cycle*, **15**, 2854-2855.
94. Deng C., Zhang P., Wade Harper J., Elledge S.J., Leder P. (1995) *Cell*, **82**, 675-684.
95. Michalak E.M., Villunger A., Adams J.M., Strasser A. (2008) *Cell Death Differ.*, **15**, 1019-1029.
96. Rinn J.L., Huarte M. (2011) *Trends Cell Biol.*, **21**, 344-353.
97. Vousden K.H., Prives C. (2009) *Cell*, **137**, 413-431.
98. Speidel D. (2010) *Trends Cell Biol.*, **20**, 14-24.
99. Powell E., Piwnica-Worms D., Piwnica-Worms H. (2014) *Cancer Discov.*, **4**, 405-414.
100. Wang Y., Szekely L., Okan I., Klein G., Wiman K.G. (1993) *Oncogene*, **8**, 3427-3431.
101. Shats I., Milyavsky M., Tang X., Stambolsky P., Erez N., Brosh R., Kogan I., Braunstein I., Tzukerman M., Ginsberg D., Rotter V. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 50976-50985.
102. Liao J., Cao B., Zhou X., Lu H. (2014) *J. Mol. Cell Biol.*, **6**, 206-213.

103. Zhang Q., Cao L.Y., Cheng S.J., Zhang A.M., Jin X.S., Li Y. (2015) *Oncol. Rep.*, **33**, 1335-1341.
104. Park J.H., Zhuang J., Li J., Hwang P.M., Just W. (2016) *FEBS Lett.*, **590**, 924-934.
105. Vogelstein B., Lane D., Levine A.J. (2000) *Nature*, **408**, 307-310.
106. Gudkov A.V., Komarova E.A. (2003) *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 117-129.
107. Brady C.A., Jiang D., Mello S.S., Johnson T.M., Jarvis L.A., Kozak M.M., Kenzelmann Broz D., Basak S., Park E.J., McLaughlin M.E., Karnezis A.N., Attardi L.D. (2011) *Cell*, **145**, 571-583.
108. Li T., Kon N., Jiang L., Tan M., Ludwig T., Zhao Y., Baer R., Gu W. (2012) *Cell*, **149**, 1269-1283.
109. Valente L.J., Gray D.H., Michalak E.M., Pinon-Hofbauer J., Egle A., Scott C.L., Janic A., Strasser A. (2013) *Cell Rep.*, **3**, 1339-1345.
110. Hock A.K., Vousden K.H. (2012) *Cell*, **149**, 1183-1185.
111. Jiang D., Brady C.A., Johnson T.M., Lee E.Y., Park E.J., Scott M.P., Attardi L.D. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 17123-17128.
112. Wang S.J., Gu W. (2014) *Curr. Opin. Oncol.*, **26**, 78-85.
113. Bensaad K., Tsuruta A., Selak M.A., Vidal M.N., Nakano K., Bartrons R., Gottlieb E., Vousden K.H. (2006) *Cell*, **126**, 107-120.
114. Puzio-Kuter A.M. (2011) *Genes Cancer*, **2**, 385-391.
115. Ji W., Zhang N., Zhang H., Ma J., Zhong H., Jiao J., Gao Z. (2015) *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **8**, 10468-10474.
116. Bourdon J.C., Khoury M.P., Diot A., Baker L., Fernandes K., Aoubala M., Quinlan P., Purdie C.A., Jordan L.B., Prats A.C., Lane D.P., Thompson A.M. (2011) *Breast Cancer Res.*, **13**, R7.
117. Bischof K., Knappskog S., Stefansson I., McCormack E.M., Trovik J., Werner H.M., Woie K., Gjertsen B.T., Bjorge L. (2018) *BMC Cancer*, **18**, 1-10.
118. Silden E., Hjelle S.M., Wergeland L., Sulen A., Andresen V., Bourdon J.C., Micklem D.R., McCormack E., Gjertsen B.T. (2013) *PLoS One*, **8**, e56276.
119. Takahashi R., Giannini C., Sarkaria J.N., Schoeder M., Rogers J., Mastroeni D., Scrable H. (2013) *Oncogene*, **32**, 3165-3174.
120. Takahashi R., Markovic S., Scrable H. (2014) *J. Invest. Dermatol.*, **134**, 791-800.
121. Avery-Kiejda K.A., Xu D.Z., Adams L.J., Scott R.J., Vojtesek B., Lane D.P., Hersey P. (2008) *Clin. Cancer Res.*, **14**, 1659-1668.
122. van Belle W., Anensen N., Haaland I., Bruserud Ø., Høgda K-A., Gjertsen B.T. (2006) *BMC Bioinformatics*, **7**, 198.
123. Henrich S., Christopherson R.I. (2008) *Leukemia*, **22**, 657-660.
124. Anensen N., Hjelle S.M., Van Belle W., Haaland I., Silden E., Bourdon J.C., Hovland R., Taskén K., Knappskog S., Lønning P.E., Bruserud Ø., Gjertsen B.T. (2012) *Oncogene*, **31**, 1533-1545.
125. Hjelle S.M., Sulen A., Øye O.K., Jørgensen K., McCormack E., Hollund B.E., Gjertsen B.T. (2012) *J. Proteomics*, **76**, 69-78.
126. Øye O.K., Jørgensen K.M., Hjelle S.M., Sulen A., Urvang D.M., Gjertsen B.T. (2013) *BMC Bioinformatics*, **14**, 215.
127. Нарыжный С.Н., Ронжина Н.Л., Майнкова М.А., Белякова Н.В., Пантина Р.А., Филатов М.В. (2014) *Биомед. химия*, **60**, 308-321. [Naryzhny S.N., Ronzhina N.L., Mainskova M.A., Belyakova N.V., Pantina R.A., Filatov M.V. (2014) *Biomed. khim.*, **60**, 308-321.]
128. Yan H., Solozobova V., Zhang P., Armant O., Kuehl B., Brenner-Weiss G., Blattner C. (2015) *Cell Death Dis.*, **6**, e1662.
129. DeHart C.J., Fornelli L., Anderson L.C., Feller R.T., Lu D., Hendrickson C.L., Lahav G., Gunawardena J., Kelleher N.L. (2018) *Cold Spring Harb Lab bioRxiv preprint*. DOI: 10.1101/455527.

Поступила в редакцию: 17. 04. 2019.
После доработки: 17. 06. 2019.
Принята к печати: 19. 06. 2019.

STRUCTURAL-FUNCTIONAL DIVERSITY OF p53 PROTEOFORMS

S.N. Naryzhny*, O.K. Legina

Petersburg Nuclear Physics Institute NRC Kurchatov Institute,
Leningrad region, Gatchina, 188300 Russia; *e-mail: snaryzhny@mail.ru

Protein p53 is one of the most studied proteins. This attention is primarily due to its key role in the cellular mechanisms associated with carcinogenesis. Protein p53 is a transcription factor involved in a wide variety of processes: cell cycle regulation and apoptosis, signaling inside the cell, DNA repair, coordination of metabolic processes, regulation of cell interactions, etc. This multifunctionality is apparently determined by the fact that p53 is a vivid example of how the same protein can be represented by numerous proteoforms bearing completely different functional loads. By alternative splicing, using different promoters and translation initiation sites, the *TP53* gene gives rise to at least 12 isoforms, which can additionally undergo numerous (>200) post-translational modifications. Proteoforms generated due to numerous point mutations in the *TP53* gene are adding more complexity to this picture. The proteoforms produced are involved in various processes, such as the regulation of p53 transcriptional activity in response to various factors. This review is devoted to the description of the currently known p53 proteoforms, as well as their possible functionality.

Key words: gene; proteoforms; p53

Funding. The study was conducted within the framework of the fulfillment of the State assignment of Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of NRC "Kurchatov Institute" for 2018-2021.

Received: 17.04.2019, revised: 17.06.2019, accepted: 19.06.2019.