

Received: 2010.04.28
Accepted: 2010.07.12
Published: 2010.08.20

Farmakologiczna aktywacja supresora nowotworu, natywnego białka p53 jako obiecująca strategia zwalczania nowotworów*

Pharmacological activation of tumor suppressor, wild-type p53 as a promising strategy to fight cancer

Alicja Szarkowska, Robert Olszewski, Joanna Zawacka-Pankau

Katedra Biotechnologii, Pracownia Diagnostyki Molekularnej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Streszczenie

Potężny supresor nowotworów – białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym, odgrywającym główną rolę w inicjacji odpowiedzi komórki na bodźce stresowe, głównie uszkodzenie DNA, niedotlenienie oraz nieprawidłowe sygnały proliferacyjne np. aktywacja onkogenu. Od odkrycia, trzydzieści jeden lat temu, p53 kojarzone jest z nowotworzeniem, gdyż wykazano zwiększone jego ilości w transformowanych nowotworowo komórkach. Stres komórkowy powoduje stabilizację białka p53, a zależnie od poziomu stresu dochodzi do zahamowania cyklu komórkowego bądź do eliminacji komórek nieodwracalnie uszkodzonych w procesie apoptozy. Białko p53 ulega inaktywacji w ponad 50% przypadków nowotworów w wyniku wzmożonej degradacji proteasomalnej lub też przez inaktywujące mutacje punktowe w jego genie. W licznych doniesieniach wykazano, iż związki niskocząsteczkowe wyodrębnione za pośrednictwem modelowania molekularnego czy też w testach biologiczno-funkcyjnych bardzo skutecznie aktywują białko p53 typu dzikiego w komórkach nowotworowych, co w rezultacie prowadzi do ich eliminacji w wyniku apoptozy zależnej od p53. W niniejszej pracy opisujemy strukturę i rolę białka p53 w komórce, a także najnowsze doniesienia, dotyczące związków o dużej aktywności przeciwnowotworowej, opartej na selektywnym przywróceniu funkcji supresorowej białka p53 w komórkach nowotworowych.

Słowa kluczowe:

białko supresora nowotworu p53 • białko MDM2 • kompleks p53-HDM2 • degradacja w proteasomach • apoptoza • terapia przeciwnowotworowa • związki niskocząsteczkowe

Summary

A powerful tumor suppressor – p53 protein is a transcription factor which plays a critical role in eliciting cellular responses to a variety of stress signals, including DNA damage, hypoxia and aberrant proliferative signals, such as oncogene activation. Since its discovery thirty one years ago, p53 has been connected to tumorigenesis as it accumulates in the transformed tumor cells. Cellular stress induces stabilization of p53 and promotes, depending on the stress level, cell cycle arrest or apoptosis in the irreversibly damaged cells. The p53 protein is found inactive in more than 50% of human tumors either by enhanced proteasomal degradation or due to the inactivating point mutations in its gene. Numerous data indicate that low molecular weight compounds, identified by molecular modeling or in the functional, cell-based assays, efficiently activate

* Praca współfinansowana z grantu na badania własne Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 6126/B/PO1/2010/38.

non-mutated p53 in cancer cells which in consequence leads to their elimination due to p53-dependent apoptosis. In this work we describe the structure and cellular function of p53 as well as the latest discoveries on the compounds with high anti-tumor activities aiming at reactivation of the tumor suppressor function of p53.

Key words: p53 tumor suppressor protein • MDM2 • p53-HDM2 complex • proteasomal degradation • apoptosis • antitumor therapy • low molecular weight compounds

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=917454>

Word count: 5533

Tables: 1

Figures: 5

References: 58

Adres autorki: dr Joanna Zawacka-Pankau, Katedra Biotechnologii, Pracownia Diagnostyki Molekularnej, Międzuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; e-mail: jzawacka@biotech.ug.gda.pl

Wykaz skrótów: **cDNA** – sekwencja kodująca (coding DNA sequence); **GADD45** – białko zatrzymania cyklu komórkowego indukowane uszkodzeniem DNA (growth arrest and DNA damage inducible protein 45); **HDM2** – ludzkie białko MDM2 (human double minute 2); **MDM2** – mysie białko MDM2 (murine double minute 2); **mtp53** – zmutowana postać białka p53 (mutant p53); **p53AIP1** – regulowane przez p53 białko indukujące apoptozę 1 (p53-regulated apoptosis-inducing protein 1); **PDT** – terapia fotodynamiczna (photodynamic therapy); **PpIX** – protoporfiryna IX; **PUMA** – regulowany przez p53 modulator apoptozy (p53 upregulated modulator of apoptosis); **RITA** – aktywacja p53 i indukcja apoptozy komórek nowotworowych (reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis); **wtp53** – typ „dziki” białka p53 (wild type p53).

WPROWADZENIE

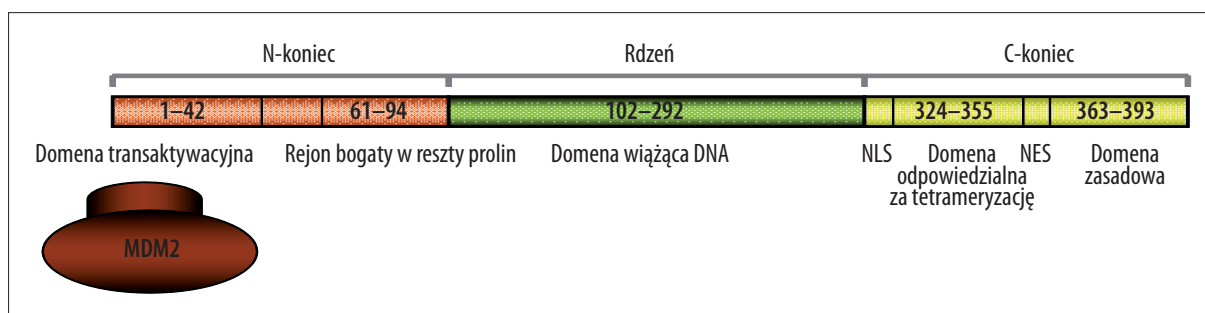
Już ponad 30 lat białko p53 jest w kręgu zainteresowania naukowców zajmujących się problematyką nowotworów u ludzi. Pierwsze odkrycia dokonane podczas badań na zwierzęcych nowotworach wywołanych przez wirusy (SV40) wskazywały, że białka p53 w komórkach nowotworowych jest znacznie więcej niż w prawidłowej hodowli oraz że komórki transformowane wytwarzały przeciwciała przeciwko p53 [24]. W kolejnych latach potwierdzono podwyższone stężenie białka p53 także w guzach innego pochodzenia (adenowirusy, HPV). Doprowadziło to do postawienia tezy, że gen *TP53* może być onkogenem a nadmierne wytwarzanie białka p53 prowadzi do transformacji nowotworowej. Po klonowaniu cDNA i genu *TP53* zarówno komórek zdrowych, jak i transformowanych, przetestowano ich aktywności [37]. Stwierdzono, że cDNA białka p53 może immortalizować komórki, a także całkowicie je transformować, przy jednoczesnym wprowadzeniu onkogenu *Ras*. *TP53* został ogłoszony onkogenem. Pięć lat później udowodniono, że białko p53 blokuje transformację szczyrzych fibroblastów, a w 1990 roku powiązano mutacje w genie *TP53* z zespołem dziedzicznej predyspozycji do powstawania nowotworów Li-Fraumeni [16].

Główną rolą białka p53 jest zabezpieczenie komórek przed zmianami w genomie, wynikającymi z szeroko pojętych uszkodzeń DNA i obejmującą przede wszystkim zatrzymanie cyklu komórkowego, indukcję apoptozy i starzenie się komórek. Wprowadzenie allelu genu *TP53* z mutacją

zerową (null mutation) do mysich komórek macierzystych za pośrednictwem rekombinacji homologicznej, spowodowało spontaniczne rozwinięcie różnych typów nowotworów u 75% osobników o fenotypie p53^(-/-) przed 6 miesiącem życia [15]. Natomiast wprowadzenie genu, kodującego typ „dziki” białka p53 (wtp53) do mysiej linii białaczki mielocytarnej pozbawionej aktywnego białka p53, spowodowało drastyczny spadek żywotności komórek i pojawienie się znamion apoptozy w postaci fragmentacji jądra, kondensacji chromatyny i fragmentacji DNA [52]. W dalszych badaniach dowiedziono, że białko p53 reguluje ekspresję, lokalizację i aktywność głównych efektorów procesu apoptozy [31].

Badania z zastosowaniem modeli mysich dowiodły, że przywrócenie endogennego wytwarzania białka p53 prowadzi do regresji nowotworów, a mechanizm za to odpowiedzialny zależy od typu nowotworu. W przypadku chłoniaka, konsekwencją przywrócenia aktywności białka p53 jest apoptoza komórek nowotworowych, natomiast w przypadku nowotworu wątroby i mięsaka, dochodzi do zatrzymania wzrostu i pojawienia się znamion starzenia komórek nowotworowych [48].

Terapię genową ludzkim cDNA, kodującym białko p53 zastosowano u kobiety z zespołem Li-Fraumeni, cierpiącej na nowotwór komórek z warstwy ziarnistej, przerzutujący do wielu organów [40]. Siedem dni po iniekcji cDNA p53 zaobserwowano wzrost ekspresji białka p53, a także białka p21, wpływającego na zatrzymanie cyklu komórkowego



Ryc. 1. Struktura pierwszorzędowa białka p53 z uwzględnieniem podziału na domeny. Białko p53 składa się z trzech funkcjonalnych domen: N-terminalnej, wiążącej DNA i C-terminalnej. Domena N-terminalna składa się z poddomeny transaktywacyjnej (TAD) i rejonu bogatego w reszty prolinowe (PXXP). Domena wiążąca DNA jest odpowiedzialna za zależne od sekwencji wiązanie się białka p53 do DNA. Domena C-terminalna pełni funkcje regulatorowe; jest odpowiedzialna za tetrameryzację białka p53; niespecyficzne oddziaływanie z DNA, a także ma miejsca wiązania białek wspomagających aktywność transkrypcyjną białka p53. Liczby oznaczają numery reszt aminokwasowych. NLS-sekwencja sygnałowa lokalizacji jądrowej (nuclear localization signal sequence); NES-sekwencja sygnałowa eksportu z jądra komórkowego (nuclear export signal sequence) (wg [56])

i będącego pod kontrolą transkrypcyjną białka p53. Co więcej, zanotowano również wzrost poziomu aktywnej kaspazy 3 – molekularnego markera apoptozy oraz spadek poziomu inhibitora apoptozy – białka Bcl-2. Zaobserwowano ponadto trwałą, całkowitą remisję nakłutego guza, podczas gdy nietraktowane guzy wykazały znaczącą progresję. W związku z powyższym, farmakologiczne przywrócenie aktywności białka p53 wydaje się więc stanowić obiecującą strategię przeciwnowotworową.

Inaktywacja białka p53 w komórkach nowotworowych jest zjawiskiem powszechnym, przebiegającym w wyniku działania dwóch głównych mechanizmów – w około 50% przypadków dochodzi do punktowych mutacji w genie *TP53*, prowadzących do powstania nieaktywnego transkrypcyjnego białka, a w pozostałych przypadkach obserwuje się zaburzenia regulacji białka p53 przez jego główny negatywny regulator w komórce – białko MDM2 [49]. Z tego też powodu wydaje się więc, iż w ponad 50% przypadków przywrócenie funkcji białka p53 umożliwiłoby remisję nowotworu (wyeliminowanie guza) bez konieczności wykorzystywania terapii o niewielkiej selektywności, takich jak naświetlanie czy chemioterapia, które zabijają, oprócz komórek transformowanych nowotworowo, także wiele zdrowych. Byłaby to niewątpliwa korzyść takiej terapii, jednak funkcja białka p53 nie jest jeszcze w pełni poznana, w jego szlakach metabolicznych nadal jest kilka niewyjaśnionych interakcji oraz nie poznano wszystkich białek, z którymi p53 może oddziaływać.

Dodatkowym, bardzo ważnym problemem jest wprowadzenie aktywnego białka do komórek nowotworowych. Terapie genowe polegające na wprowadzaniu kopii *wtp53* do genomu są w fazie testów klinicznych, jednak takie działanie nastęrcza wielu problemów, np. nie wiadomo, czy wprowadzenie DNA za pomocą wektora wirusowego (adenowirusa) będzie skuteczne. Ponadto nie jesteśmy w stanie przewidzieć skutków integracji genu do komórek zdrowych (w grę wchodzi zmiany spowodowane niehomologiczną rekombinacją wirusowego DNA do genomu komórki) [18].

Wydaje się więc uzasadnione poszukiwanie związków, które selektywnie indukowałyby kumulację a zarazem aktywność białka p53 w komórkach nowotworowych przez

uwalnianie go z kompleksu z jego głównym regulatorem komórkowym, białkiem MDM2 – ligazą E3 ubikwityny. W pracy opisano najnowsze doniesienia o związkach niskocząsteczkowych indukujących apoptozę zależną od p53 w komórkach nowotworowych.

BUDOWA BIAŁKA P53

Wszystkie właściwości białka p53 są zapisane w jego genie. Struktura samego białka jest dość złożona biorąc pod uwagę jego niewielkie rozmiary (53 kDa), prawidłowo sfałdowane białko p53 tworzy tetramery i dopiero w tej postaci uzyskuje pełnię swoich aktywności.

Gen *P53* (lub *TP53*) u człowieka znajduje się na chromosomie 17p13.1 (znaleziono także analogi zwierzęce np. u myszy na chromosomie 11, u szczura na 10, u psa na 5, a u świni na 12). Gen ma niewielkie rozmiary, gdyż w całości liczy zaledwie 20 kbp, a same eksony (jest ich jedenaście, poprzedzielanych dziesięcioma intronami) kodują tylko 393 aminokwasy. Produkt genu zawiera siedem domen, które spełniając swe funkcje decydują o życiu i śmierci komórki [19]. Gen *TP53* należy do silnie konserwowanej rodziny genów, kodujących jeszcze przynajmniej dwa białka – p63 i p73 [55,57].

Złożoność budowy p53 odzwierciedla funkcjonalną złożoność ścieżek sygnalizacyjnych zależnych od tego białka. Aktywne białko p53 występuje w komórce jako tetramer złożony z czterech identycznych podjednostek zbudowanych z 393 aminokwasów (ryc. 1).

Każda podjednostka składa się z trzech dobrze scharakteryzowanych pod względem zawartości aminokwasów domen strukturalnych: domeny N-terminalnej, rdzenia i domeny C-terminalnej. W obrębie domeny N-terminalnej znajduje się domena transaktywacyjna (transactivating domain TAD1 i TAD2, aminokwasy 1–42) oraz rejon bogaty w reszty prolin (proline-rich region, 61–94), zbudowany z wielokrotnych powtórzeń motywu PXXP (gdzie P oznacza prolinę, a X dowolny aminokwas). Domenę tę wyróżnia to, że w białku p53 jest ona odpowiedzialna za indukcję apoptozy bez transaktywacji genów, czyli jedynie poprzez oddziaływanie z innymi białkami. Białkiem takim jest Bcl-XL (białko antyapoptotyczne mitochondriów)

– białko p53 wiąże Bcl-XL w odpowiedzi na stres, np. promieniowanie jonizujące i uniemożliwia ochronę mitochondriów przed czynnikami proapoptotycznymi, takimi jak białko Bax, które promują uwolnienie cytochromu C z mitochondriów i śmierć apoptotyczną komórki. Dodatkowo p53 może się przyłączać do białek proapoptotycznych z rodziny Bcl (np. Bax) i promować ich oligomeryzację, co skutecznie promuje apoptozę. Ponadto wykazano, że białko p53 bez aktywnej domeny AD2 nie może indukować apoptozy [19]. Co istotne, domena TAD zawiera trzy aminokwasy niezbędne do oddziaływania białka p53 z białkiem MDM2 (F19; W23; L26).

Rejon bogaty w proliny (61–94 aminokwasy) wiąże białka zawierające domeny SH3 i pełni funkcje regulatorowe w procesie apoptozy. Dodatkowo jest mediatorem interakcji między p53 a innymi białkami [20]. Delecja tego regionu uniemożliwia p53 inicjację apoptozy na ścieżce mitochondrialnej, choć nie hamuje transaktywacji Bax [39]. Istotną zmianą w działaniu białka p53 po delecji regionu prolinowego jest podwyższona podatność na degradację z udziałem ligazy ubikwityny MDM2 [2]. Delecja tej domeny zaburza także oddziaływanie p53 z genami *p21^{Waf1/Cip1}*, *MDM2*, *PIG* [47].

Na rdzeń białka p53, prawie w całości składa się domena wiążąca DNA (DBD, DNA binding core domain, 102–292). Kolejnym fragmentem białka jest koniec C-terminalny, w którym możemy znaleźć trzy swoiste fragmenty:

- NLS i NES – NLS (nuclear localization signals) to trzy sygnały, które umożliwiają białku dostanie się do wnętrza jądra, a NES (nuclear export signal) to sekwencje umożliwiające białku wydostanie się z jądra do cytoplazmy. Są one konieczne, ponieważ białko bierze udział w procesach jądrowych, cytoplazmatycznych oraz mitochondrialnych.
- Fragment TET – zbudowany z łańcucha beta, za którym znajduje się alfa helisa – takie połączenie umożliwia białku p53 dimeryzację a następnie dimeryzację dimerów, przez co powstaje tetramer, czyli właściwa, aktywna postać białka.
- Fragment wiążący nieswoiście DNA – sekwencja z jednej strony wiążąca się do uszkodzonego DNA i promująca jego naprawę lub śmierć komórki, a z drugiej zmniejszająca powinowactwo rdzenia białka do DNA (wiązaną fragmentów transaktywacyjnych na DNA jest silniejsza niż wiązanie fragmentów niespecyficznych dla p53, dlatego musi zostać atenuowane, aby możliwe było znajdowanie uszkodzeń) [49].

Na złożoność budowy białka p53 wpływają dodatkowo liczne modyfikacje potranslacyjne, z których najważniejszymi wydają się fosforylacja, acetylacja i ubikwitynacja [6,56]. Zależne od miejsca i czasu modyfikacje odpowiednich reszt aminokwasowych wpływają na aktywność i czas półtrwania białka p53, będąc jednocześnie markerami odpowiedzi stresowej komórki.

FUNKCJA I REGULACJA BIAŁKA P53 W KOMÓRCIE

Aktywność transkrypcyjna

Domena centralna wiążąca DNA (DBD) białka p53 wykazuje duże powinowactwo do konsensusowych sekwencji

DNA, do których się przyłącza, natomiast C-terminalna domena zasadowa wiąże DNA nieswoiście [25].

Należy zaznaczyć, że białko p53 w prawidłowej komórce niepoddanej żadnemu stresowi jest nieaktywne – związane z białkiem MDM2, który promuje ubikwitynację p53 i jego degradację w proteasomach. Istotne zatem jest to w jaki sposób dochodzi do jego aktywacji. Krytycznym momentem w aktywacji p53 jest fosforylacja końca N-terminalnego przez kinazy białkowe. Ufosforylowane p53 nie podlega ubikwitynacji, więc czas jego życia w komórce znacznie się zwiększa, a biorąc pod uwagę wysoki poziom transkrypcji genu *P53*, w szybkim czasie prowadzi to do nagromadzenia się dużej ilości białka w komórce [38].

Od odkrycia pierwszych genów znajdujących się pod kontrolą transkrypcyjną białka p53 we wczesnych latach dziewięćdziesiątych ub.w., ich lista bardzo wzrosła i ciągle się wydłuża. Znajdują się na niej geny zaangażowane w zatrzymanie cyklu komórkowego, naprawę DNA, a także apoptozę i starzenie się komórek. Geny, których ekspresja ulega indukcji na skutek aktywności białka p53, to m.in. *CDKN1A* (kodujący białko p21^{Waf1/Cip1}, decydujące o zatrzymaniu cyklu komórkowego w fazie G1), *GADD45* (growth arrest and DNA damage inducible gene) oraz liczne geny, których produkty są zaangażowane w proces apoptozy: *BAX* (Bcl-2-associated X protein), *DR5/KILLER* (death receptor 5), *CD95* (cell-death signaling receptor), *PIG3* (p53-inducible gene), *PUMA* (p53-upregulated modulator of apoptosis), *NOXA* i wiele innych. Oprócz pośredniej lub bezpośredniej aktywacji transkrypcji, białko p53 może również indukować represję transkrypcji niektórych genów. Ich produktami są białka, takie jak Bcl-2, Bcl-X, cyklina B1 czy MAP4 (microtubule associated protein 4) oraz surwiwina [20].

Inicjacja transkrypcji przez białko p53 rozpoczyna się przez jego związanie do sekwencji konsensusowej DNA. Sekwencje te składają się z dwóch palindromowych elementów o długości 10 pz. i budowie PuPuPuCA/TA/AGPyPyPy (Pu to puryna, a Py to pirymidyna), oddzielonych rejonem spacerowym o długości 0–13 nukleotydów [20]. Mechanizm, dzięki któremu białko p53 promuje transkrypcję, opiera się na założeniu, że region promotorowy genu, którego transkrypcję ma regulować białko p53, jest zazwyczaj niedostępny dla głównych czynników transkrypcyjnych i polimerazy RNA. Związanie białka p53 do sekwencji konsensusowej w obrębie rejonu promotorowego umożliwiłoby otwarcie promotora poprzez rekrutację czynników remodelujących chromatynę lub transacetylazę histonów i/lub metylotransferazy. Oddziaływanie białka p53 z transacetylazą histonów, białkiem p300 oraz metylotransferazami PRMT1 i CARM1, zostało bardzo dobrze udokumentowane. Dlatego też modyfikacje histonów i w konsekwencji zmiany w strukturze i funkcjonowaniu chromatyny, wydają się jednym z głównych następstw związania się białka p53 do jego sekwencji konsensusowej. Dodatkowo udowodniono, że białko p53 ułatwia formowanie kompleksu preinicjacyjnego oraz bezpośrednio stymuluje transkrypcję poprzez rekrutację głównych czynników transkrypcyjnych, takich jak TFIIA i TFIID [25].

Represja transkrypcji przez białko p53 nie jest dokładnie poznana, choć opisuje się możliwe mechanizmy. Pierwszy

opiera się na bezpośredniej interakcji z czynnikami transkrypcyjnymi, co uniemożliwia aktywację promotora. Drugi polega na usunięciu czynników transkrypcyjnych z rejonu promotorowego, jeśli sekwencje DNA, do których się wiążą, przylegają lub nachodzą na konsensusowe sekwencje wiązania białka p53. Białko p53 może również interferować ze składaniem maszyny transkrypcyjnej oraz rekrutować deacetylazy histonów, co w efekcie prowadzi do represji transkrypcji [24].

Oprócz oddziaływania z DNA, białko p53 może oddziaływać z innymi białkami komórkowymi. Interakcje te odpowiadają m.in. za inhibicję i aktywację białka p53, a także za wypełnianie niektórych funkcji białka p53 – np. indukcję śmierci apoptotycznej na ścieżce mitochondrialnej.

Rola białka p53 w regulacji procesów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych

Białko p53 reguluje wiele procesów i jest zaangażowane w utrzymanie stabilności genetycznej komórki nie tylko przez indukcję zahamowania proliferacji komórek i areszt cyklu komórkowego połączone z naprawą DNA, ale także w wyniku zapoczątkowania procesu apoptozy, który eliminuje zmienione genetycznie komórki z organizmu. Procesy wewnątrzkomórkowe regulowane przez p53 to m.in. starzenie komórki, przechodzenie przez kolejne punkty kontrolne cyklu komórkowego (p53 może zatrzymać komórkę na dwóch punktach kontrolnych cyklu komórkowego G₁/S oraz G₂/M), naprawa DNA, indukcja apoptozy (p53 determinuje, zależnie od stopnia nasilenia stresu i wielkości uszkodzenia, czy komórka zostanie zatrzymana w cyklu komórkowym i rozpocznie naprawę uszkodzonego DNA, czy wejdzie w stadium apoptozy – jeśli uszkodzenie jest zbyt poważne), a także – według najnowszszych doniesień – nadmierne wytwarzanie pigmentu w komórkach skóry i wytwarzanie opalenizny. Głównym celem działań zewnątrzkomórkowych białka p53 jest hamowanie angiogenezy i indukcja szoku tlenowego.

Białko p53 odgrywa główną rolę w indukcji apoptozy. Kontroluje ono główne szlaki indukcji apoptotycznej śmierci komórkowej. Wykazano, że inicjacja apoptozy może zachodzić w dwojaki sposób: w wyniku transaktywacji, bądź oddziaływań z innymi białkami komórki. Wykazano też, że bez aktywności transaktywacyjnej białko p53 jest w stanie zainicjować apoptozę, co doprowadziło do stwierdzenia, że w przypadku indukcji śmierci komórkowej (a także zatrzymania cyklu komórkowego), oddziaływania typu białko-białko pełnią w zasadzie pomocniczą rolę przyspieszając kilkakrotnie proces transkrypcyjny [9].

Pierwszym zidentyfikowanym, aktywowanym przez p53 genem, jest gen *bax*, proapoptotyczny członek rodziny Bcl-2. W ciągu kilku lat odnaleziono kolejne – *Noxa* [36] oraz *PUMA* [53], oba działające jako białka pomocnicze w procesie śmierci apoptotycznej na ścieżce mitochondrialnej. Białka powstające po aktywacji promotorów tych genów, wraz z produktem genu *p53AIP1*, są transportowane do mitochondriów i powodują otwarcie porów w błonie wewnętrznej. Otwarcie porów powoduje zaburzenia fosforylacji oksydacyjnej, spadek potencjału elektrochemicznego na błonie mitochondrialnej oraz uwolnienie cytochromu c. Zdarzenia te powodują całkowitą utratę

funkcji mitochondriów oraz aktywację kaskady Apaf1/kaspazy 9. Kaspazy to proteazy cysteinowe, które nieswoiście tną białka powodując degradację wnętrza komórki i w rezultacie jej śmierć [4].

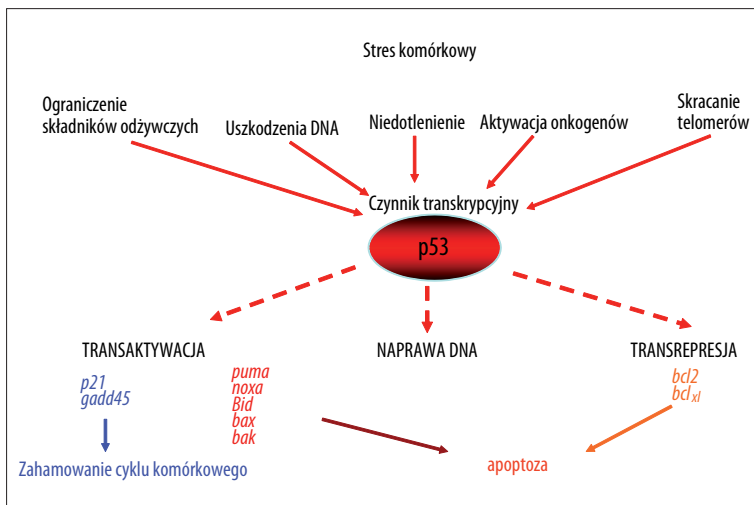
Następną grupą genów, aktywującą p53 to *PIGs* (p53 induced genes), które kodują białka enzymatyczne odpowiedzialne za kontrolę reakcji typu redox w komórce. Reaktywne formy tlenu (ROS) wytwarzane przez PIGs uszkodzają mitochondria, co indukuje apoptozę. Substancje antyoksydacyjne potrafią zahamować zależną od p53 apoptozę, a także cofnąć zmiany wywołane w błonie mitochondrialnej (przywrócić potencjał błonowy oraz zamknąć pory). Dodatkowo, p53 może być transportowane do mitochondriów, gdzie indukuje apoptozę niezależnie od transkrypcji [28].

Białko p53 jest także zaangażowane w ścieżkę zależną od błonowych receptorów śmierci. Już w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia wykazano, że p53 wzmacnia ekspresję genów kodujących receptory śmierci, takie jak FAS/APO1, DR5/KILLER, a także liganda jednego z tych receptorów – FASL. Promotor genu *DR5* okazał się bezpośrednio aktywowanym przez p53, natomiast ekspresja na powierzchni komórki receptora FAS jest promowana przez zwiększenie jego transportu z aparatu Golgiego do błony komórkowej [41]. Aktywacja receptorów śmierci prowadzi do ich trimeryzacji i inicjacji kaskady kaspaz. Dodatkowo aktywacja PIDD – białka zawierającego domenę śmierci – przez p53 również prowadzi do apoptozy podobnej do ścieżki receptorów śmierci.

Dodatkową funkcją białka p53 w aktywacji procesów apoptotycznych jest hamowanie transkrypcji czynników wzrostowych i promujących przeżycie komórki. Do czynników takich należą m.in. IGF1 (insulin-like growth factor 1) insulinopodobny czynnik wzrostu, surwiwiny – białka należące do rodziny IAP (inhibitor of apoptosis protein), które powodują inhibicję aktywacji kaspaz, przez co negatywnie regulują procesy proapoptotyczne, a także hamują aktywność telomeraz.

Zależne od p53 zatrzymanie cyklu komórkowego jest ściśle związane z funkcją transaktywacyjną tego białka. Spośród wielu celów transaktywacji białka p53, p21^{WAF1/Cip1} jest tym, który zasługuje na uwagę. Aktywowany gen generuje produkt białkowy, mający zdolność do zatrzymania cyklu komórkowego zarówno w fazie G₁, jak i G₂. P21^{WAF1/Cip1} należy do rodziny CDK (cyclin dependent kinase), czyli kinaz zależnych od cyklin. Indukcja zatrzymania cyklu komórkowego przebiega w sposób analogiczny do przebiegu zatrzymania cyklu komórkowego po aktywacji białka p53. Komórki z delecją genu *p21^{WAF1/Cip1}* nie mają możliwości zatrzymania cyklu komórkowego na żadnym punkcie kontrolnym, dokładnie tak, jak komórki z nieaktywnym białkiem p53 [50,58].

Ważnym białkiem biorącym udział w zatrzymaniu cyklu komórkowego jest 14-3-3 sigma. Czynnikiem ten bierze udział w transdukcji sygnału (jak cała rodzina białek 14-3-3), m.in. poprzez przyłączanie i oddzielanie ufosforylowanych białek (rozdzielanie agregatów, rozłączanie kompleksów białkowych). Białko 14-3-3 sigma pełni istotną rolę w utrzymaniu aresztu cyklu komórkowego. Badania wykazały,



Ryc. 2. Główne procesy komórkowe regulowane przez uaktywnione białko p53 (schemat). Indukcja białka p53 przez czynniki stresowe powoduje jego aktywację polegającą na włączeniu jego zdolności transaktywacji bądź też transrepsji genów mających odpowiednią sekwencję konsensusową. W wyniku aktywacji p53 może dojść do zahamowania cyklu komórkowego bądź też indukcji apoptozy w zależności od stopnia uszkodzenia komórki. Aktywne białko p53 może też być bezpośrednio zaangażowane w naprawę DNA

że komórki, w których gen białka został usunięty, potrafiły zainicjować areszt G₁, ale nie potrafiły go utrzymać na tyle długo, aby mogło dojść do efektywnej naprawy DNA [10]. Białka z rodziny 14-3-3 mogą się wiązać do p53 i aktywować jego funkcje transaktywacyjne, zwłaszcza po iradiacji promieniowaniem jonizującym. Aktywacja p53 zapobiega wznowieniu cyklu komórkowego w uszkodzonych komórkach [51].

To, czy komórka przejdzie proces apoptozy, czy zostanie zatrzymana w cyklu komórkowym zależy od wielu czynników, m.in. od pozakomórkowych czynników przeżyciowych (np. IGF), zmian nowotworowych w komórce, dostępności czynników i kofaktorów transkrypcyjnych. Jednak białko p53 wpływa także na wybór ścieżki, którą podążą komórka. Zarówno typ, jak i intensywność stresu, któremu poddawana jest komórka ma znaczenie dla poziomu odpowiedzi wywołanej przez p53. Do indukcji apoptozy konieczny jest znacznie wyższy poziom aktywnego białka p53 niż do zatrzymania komórki w cyklu, co dowodzi, że p53 słabiej wiąże się do promotorów genów proapoptotycznych, niż kontrolujących zatrzymanie cyklu komórkowego [50].

Dodatkowo zmiana aktywności białka p53 wynika z modyfikacji (fosforylacje, zmiany konformacyjne), którym jest ono poddawane podczas aktywacji. Fosforylacja p53 na Ser46 jest konieczna do transaktywacji proapoptotycznego genu *p53AIP1* (p53-regulated apoptosis-inducing protein 1) oraz inhibicję kinazy odpowiedzialnej za fosforylację Ser46 przez WIP1 (inhibicja indukowana przez p53). Ta pętla zwrotna zapewnia kontrolę nad aktywnością białka p53 oraz zmniejsza jego aktywność proapoptotyczną [35]

Białko p53 jest nie tylko odpowiedzialne za zatrzymanie komórek w cyklu komórkowym i uniemożliwienie im powielania zmienionego materiału genetycznego, ale bierze też bezpośrednio udział w naprawie uszkodzeń DNA. Komórki bez funkcjonalnego p53 nie mają zdolności typu NER (nucleotide excision repair), naprawy DNA przez wycinanie nieprawidłowych nukleotydów, która jest odpowiedzialna za naprawę po uszkodzeniach spowodowanych promieniowaniem UV [50], a także BER (base excision repair) – wycinania zasad uszkodzonych przez czynniki alkilujące,

wolne rodniki tlenowe lub hydrolizę [58]. Koniec C' białka p53 wiąże się bezpośrednio do wielorakiego uszkodzonego DNA, m.in. jednoniciowego DNA, końców pęknięć podwójnej helisy DNA oraz powstałych w wyniku nieprawidłowych insercji bądź delecji „oczek” w DNA. Oprócz tego białko p53 ma aktywność egz nukleazy 3'-5', co wspomaga funkcje naprawcze.

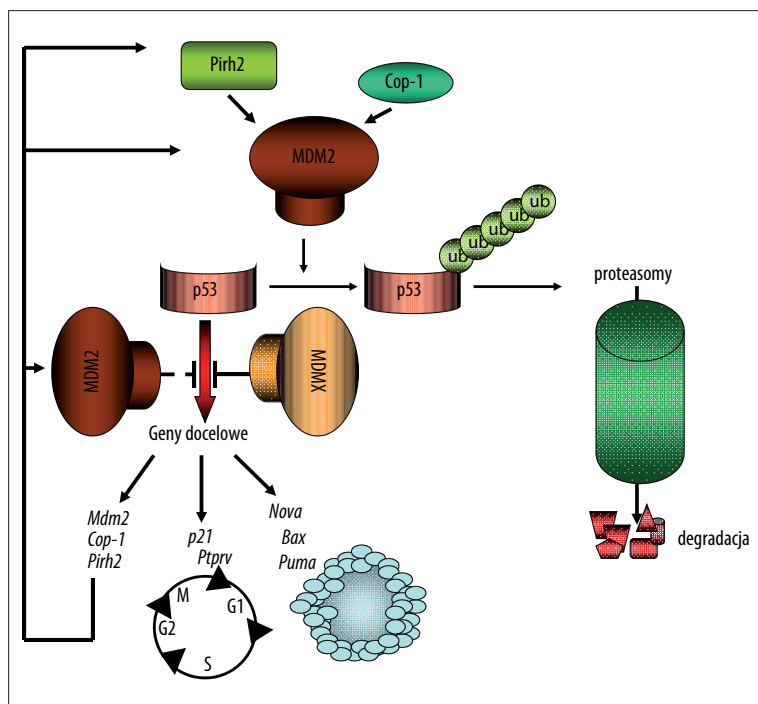
Ważnym elementem funkcji p53 w naprawie DNA jest możliwość przyłączania się do różnych białek zaangażowanych w naprawę uszkodzonego DNA. Do grupy tych białek należą m.in. CSB (zależny od ATP czynnik remodelowania chromatyny), Ref-1 (białko biorące udział w naprawie spontanicznych uszkodzeń DNA), XPB/ERCC3 (aktywuje helikazy DNA). Dodatkowo p53 może wchodzić w interakcje z samymi helikazami DNA – doświadczenia Linke i wsp. [27] wykazały koimmunoprecypitację z helikazami hRAD51 oraz hRAD54. Ścieżki regulowane przez białko p53 przedstawia ryc. 2.

Regulacja białka p53 w komórce

W prawidłowych warunkach białko p53 jest utrzymywane w komórce na niskim poziomie i występuje w postaci nieaktywnej. W czasie trwania cyklu komórkowego jego poziom jest ściśle kontrolowany. W prawidłowych komórkach, czas półtrwania białka p53 jest ograniczony do minut, podczas gdy w komórkach narażonych na stres lub ekspozycję na czynniki uszkadzające DNA, czas ten wydłuża się do godzin. Podwyższony poziom białka p53 jest utrzymywany głównie przez wydłużenie jego czasu półtrwania [25].

Za regulację poziomu i aktywności białka p53 jest odpowiedzialna cała sieć komórkowych białek, takich jak WT-1, MDM2, JNK, Pirh-2, PARP-1, MDM4. Szczególnie istotne w regulacji poziomu białka p53 w komórce w świetle ostatnich badań wydają się białka MDM2 i MDM4 (MDMX).

Gen *Mdm2* (murine double minute 2) odkryto w 1987 r. jako jeden z trzech genów (*Mdm1-3*) ulegających koamplifikacji w spontanicznie transformowanej linii mysiej 3T3-DM [8]. W ciągu pięciu lat udowodniono potencjał onkogeny *Mdm2*, a także wykazano, iż białko MDM2 wiąże i powoduje inhibicję aktywności białka p53. Przedstawiono



Ryc. 3. Kooperacja pomiędzy białkami MDM2 i MDM4 w kontroli białka p53. Przy braku sygnałów stresowych, podstawową funkcją białka MDM2 jest utrzymanie niskiego poziomu białka p53, poprzez katalizację jego ubikwitynacji. W sytuacji stresu komórkowego, białko p53 katalizuje transkrypcję genów biorących udział w zatrzymaniu cyklu komórkowego lub apoptozie, a także genu kodującego białko MDM2, przez co wytwarza się negatywna pętla regulatorowa. Białko MDM4 (MDMX) przyczynia się do zahamowania aktywności białka p53 niezależnie od białka MDM2. Białko MDM4 przez przyłączenie się do domeny transaktywacyjnej, powoduje inhibicję aktywności transkrypcyjnej białka p53, podczas gdy udział białka MDM2 w inhibicji aktywności transkrypcyjnej białka p53 pozostaje niepewny (linia przerywana). Inne ligazy ubikwityny (Pirh2 i Cop-1) także znajdują się pod kontrolą transkrypcyjną białka p53, ale ich aktywność wydaje się zależna od białka MDM2 (wg [29])

również, że ludzki homolog MDM2, białko HDM2 (human double minute 2) ulega amplifikacji w guzach typu mięsak. Dalsze badania dowiodły, że *Mdm2* ulega amplifikacji w 7,2% z 3889 ludzkich nowotworów, w których występuje typ 'dziki' białka p53 [33]. Najczęściej amplifikacja dotyczyła nowotworów tkanek miękkich (20%), mięsaka kościopochodnego (16%) i nowotworu przełyku (13%). Wykazano również, że polimorfizm jednego nukleotydu w rejonie promotorowym *Mdm2* prowadzi do dwu-, trzykrotnego wzrostu ekspresji białka MDM2, co z kolei koreluje ze wzmożonym powstawaniem nowotworów [44]. Nadekspresja białka MDM2 zachodzi również bez amplifikacji genu *Mdm2* [17].

Zważywszy, że p53 reguluje dodatnio ekspresję genu *Mdm2*, powiązanie tych dwu białek tworzy sprzężenie zwrotne – pętlę, w której p53 samo kontroluje swą ilość w komórce. Analogiczna sytuacja występuje gdy pod uwagę wzięte zostaną wzajemne relacje białka p53 z ligazami ubikwityny np. Pirh2 i COP-1, które ubikwitynują białko p53 promując jego degradację, a wysoki poziom białka p53 indukuje ich ekspresję.

W późnych latach dziewięćdziesiątych ub.w., screening w poszukiwaniu białek wiążących białko p53 z użyciem mysiej biblioteki cDNA doprowadził do odkrycia białka, dzielącego strukturalną homologię z białkiem MDM2. Białko to nazwano początkowo MDMX, a następnie nadano oficjalną nazwę MDM4 (ludzkie homologii to odpowiednio HDMX lub HDM4). Ogromna rola tego białka w procesie nowotworzenia ujawniła się w ostatnich kilku latach. Okazało się, że gen *Mdm4* ulega amplifikacji w 10–20% z 800 przebadanych nowotworów, takich jak rak płuca, okrężnicy, żółądka czy piersi. W przypadku siatkówczaka, amplifikację genu *Mdm4* stwierdzono aż w 65% przypadków [44].

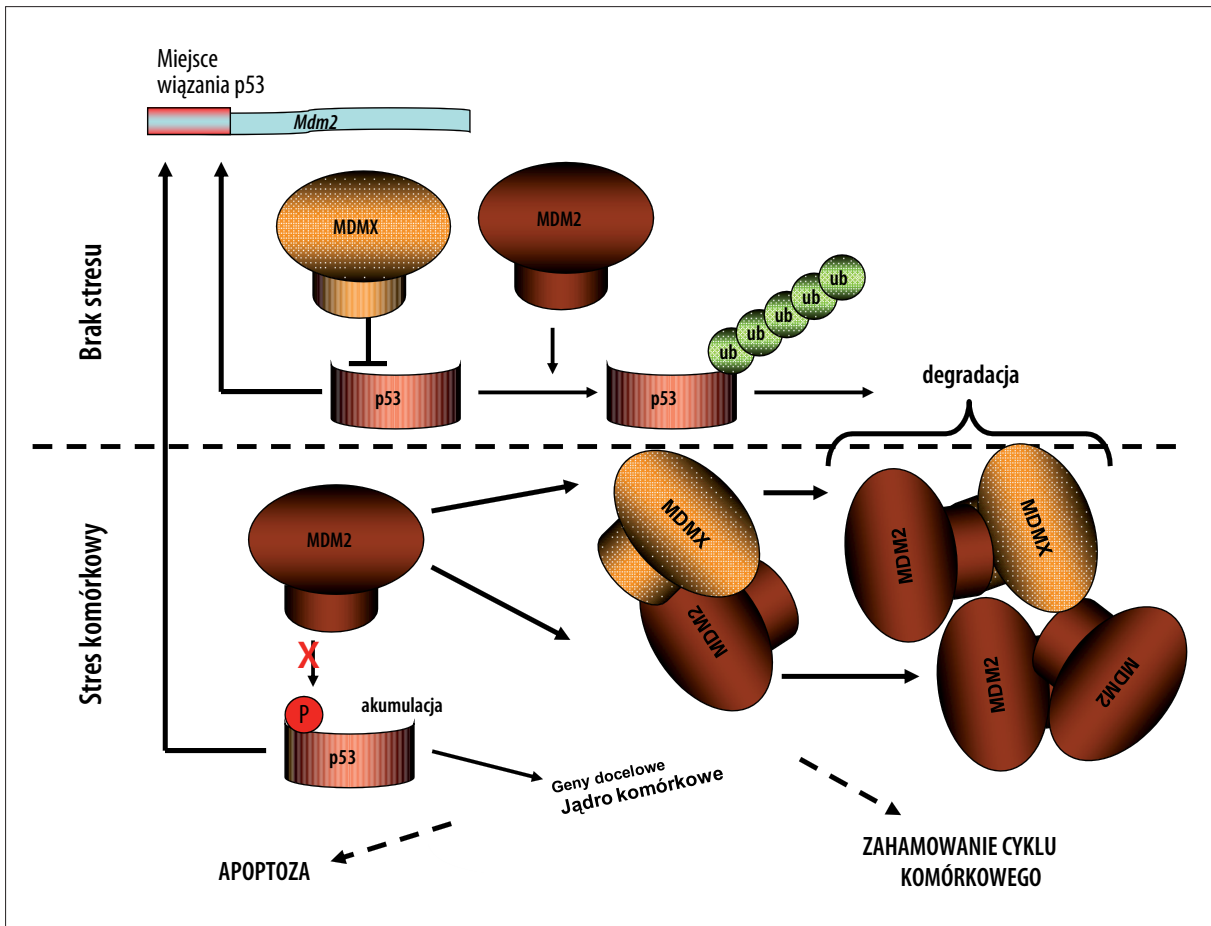
To, co czyni białka MDM2 i MDM4 wyjątkowymi, to to, że poza często zmienionym profilem ekspresji w nowotworach,

okazały się działać jako główne i swoiste inhibitory białka p53 w rozwoju embrjonalnym. Zarówno brak białka MDM2 (*Mdm2*^{-/-}), jak i białka MDM4 (*Mdm4*^{-/-}), w obecności aktywnego białka p53 w komórkach (*TP53*^{+/+}), prowadzi do śmierci myszy *in utero*. Jednak ani fenotyp *MDM2*^{-/-}, ani *MDM4*^{-/-} nie jest śmiertelny w przypadku braku aktywnego białka p53 w komórkach (*p53*^{-/-}) [29].

Jak wspomniano wcześniej, gen *Mdm2* znajduje się pod kontrolą transkrypcyjną białka p53. W komórce nienarażonej na stres białka p53 i MDM2 oscylują na podobnym, niskim poziomie. Dzieje się tak dlatego, że wytwarzane w niewielkiej ilości w prawidłowej komórce białko p53, indukuje transkrypcję genu *Mdm2*. Białko MDM2 jest negatywnym regulatorem białka p53, działającym na dwa główne sposoby. Po pierwsze, wiąże się ono do domeny N-terminalnej białka p53, blokując interakcje z czynnikami transkrypcyjnymi i kofaktorami transkrypcji oraz powodując eksport białka do cytoplazmy. W ten sposób MDM2 zmniejsza aktywność transkrypcyjną białka p53. Drugi mechanizm wpływa na stabilność białka p53 i wykorzystuje zdolność MDM2 do ubikwitynacji białka p53, dzięki aktywności E3 ligazy ubikwityny. Ubikwitynacja N-terminalnej domeny białka p53 promuje jego degradację w proteasomach. Mniejsza ilość białka p53 oznacza również zmniejszoną ekspresję genu *Mdm2*. W ten sposób tworzy się negatywna pętla regulatorowa między dwoma białkami [29]

Mimo iż odkryto inne ligazy ubikwityny, katalizujące ubikwitynację białka p53 (Pirh2, Cop-1 czy ARF/BP1), żadna z nich nie jest w stanie wydajnie, jeśli w ogóle, rekompensować braku białka MDM2 *in vivo* (ryc. 3) [45].

Wspomniane białko MDM4 towarzyszy białku MDM2 w inhibicji aktywności białka p53 (ryc. 4). Gen *Mdm4* nie znajduje się jednak pod kontrolą transkrypcyjną białka p53. Nadmierne wytwarzanie białka MDM4 prowadzi



Ryc. 4. Schematyczne porównanie zdarzeń komórkowych dotyczących regulacji aktywności białka p53 zachodzących w komórce w warunkach fizjologicznych jak i w warunkach stresu. W komórce nienarażonej na stres, poziom białka p53 regulowany jest przez negatywną pętlę regulatorową utworzoną przede wszystkim między białkami p53 i MDM2. W warunkach stresu dodatkowo białko MDM2 poprzez tworzenie heterodimerów katalizuje degradację białka MDMX i autodegradację, co prowadzi do fosforylacji (P) i następnie akumulacji białka p53. W odpowiedzi na stres wzrasta poziom białka MDM2, co prowadzi do jeszcze bardziej efektywnej degradacji MDMX i jednoczesnej pełnej aktywacji p53. Aktywne białko p53 ulega translokacji do jądra, gdzie reguluje transkrypcję genów, których produkty są zaangażowane w regulację cyklu komórkowego bądź apoptozę (wg [56])

do zahamowania aktywności transkrypcyjnej białka p53. Co więcej, w oparciu o doświadczenia z zastosowaniem dwuhybrydowego systemu drożdżowego, udało się dowiedzieć, że białko MDM4 bezpośrednio oddziałuje z białkiem MDM2. Wkrótce potem oddziaływanie to potwierdzono *in vivo*. Heterooligomeryzacja białek MDM2 i MDM4 okazała się prowadzić do powstania dużo stabilniejszego produktu niż homoooligomeryzacja każdego z tych białek [42]. Białko MDM4 oddziałuje więc bezpośrednio zarówno z białkiem p53, jak i z białkiem MDM2, co sugeruje, że bierze udział w regulacji interakcji MDM2-p53 [56].

Stabilność białka MDM4 zależy od białka MDM2, które może katalizować jego ubikwitynację i promować degradację w proteasomach. Według modelu Toledo i Wahla, [44], białka MDM2 i MDM4 regulują poziom białka p53 odmiennie, acz komplementarnie: MDM4 wpływa na aktywność białka p53, a MDM2 reguluje głównie jego stabilność. Jednak dokładna rola białka MDM4 w regulacji aktywności białek MDM2 i p53 pozostaje ciągle nie w pełni zbadana [29].

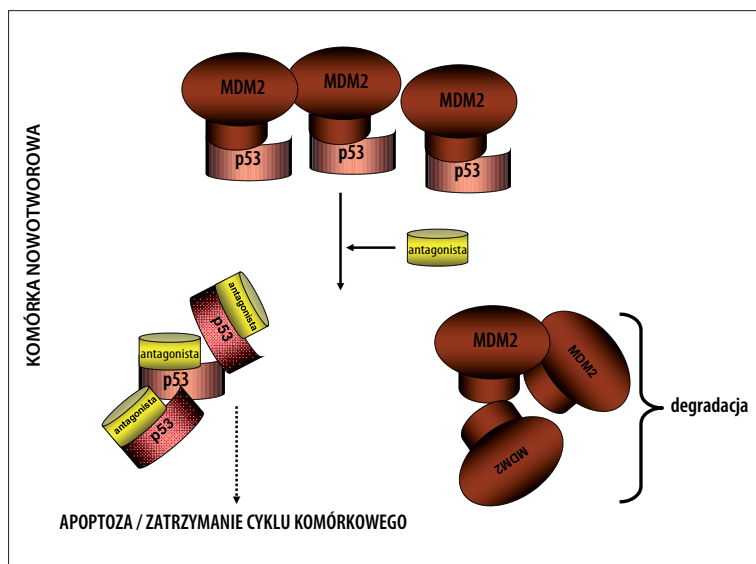
W warunkach stresu białko MDM2 ulega autodegradacji, a także poprzez formowanie heterooligomerów z białkiem

MDM4, katalizuje degradację białka MDM4. Prowadzi to do akumulacji białka p53 w komórce. Ze względu na to, że gen *Mdm2* znajduje się pod transkrypcyjną kontrolą białka p53, wzrasta ekspresja genu *Mdm2* i poziom białka MDM2 w komórce. Skutkuje to jeszcze bardziej efektywną degradacją białka MDM4 i jednoczesną pełną aktywacją białka p53 [29,44] (ryc. 4).

Mapowanie interakcji MDM2-p53 wskazuje, że w formowaniu kompleksu bierze udział trzynaście kluczowych aminokwasów N-terminalnego końca białka MDM2 i aminokwasów 19–25 domeny transaktywacyjnej białka p53 [44]. Krystalizacja kompleksu pozwoliła uwidocznnić, że za oddziaływanie ściśle odpowiedzialna jest hydrofobowa kieszeń na powierzchni białka MDM2 oraz trzy główne hydrofobowe aminokwasu białka p53: Phe19, Leu22 i Trp23.

INAKTYWACJA BIAŁKA P53 W NOWOTWORACH JAKO KLUCZ DO EFEKTYWNEJ TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Jak wspomniano wcześniej, w większości nowotworów ludzkich aktywność białka p53 nie jest pełna. Jest to warunek konieczny do progresji nowotworu, dlatego zwykle jedną



Ryc. 5. Selektywne, farmakologiczne zahamowanie interakcji p53-MDM2 jako obiecująca strategia przeciwnowotworowa. Związki niskocząsteczkowe zaburzające tworzenie kompleksu p53-MDM2 (antagoniści) przywracają aktywność białka wtp53 w komórkach nowotworowych, prowadząc do masywnej akumulacji białka ze względu na aktywowane w nich onkogeny a potem do zatrzymania cyklu komórkowego bądź apoptozy (wg [56])

z pierwszych mutacji jest taka, która umożliwia obejście mechanizmów komórki odpowiedzialnych za wykrywanie i naprawę uszkodzeń DNA podczas zatrzymania cyklu komórkowego lub indukcję apoptozy w nieprawidłowych komórkach. Istnieje kilka możliwości mutacji, których efektem będzie dezaktywacja białka p53 bezpośrednio (białko p53 występuje w komórce w postaci nieprawidłowej) lub pośrednie hamowanie jego funkcji (białko p53 zachowuje wszystkie swoje funkcje, ale mimo to nie może zahamować podziałów komórkowych ani indukować śmierci komórki).

W sytuacji, kiedy nie obserwujemy mutacji w genie *TP53*, ale komórka jest w stanie przejść przez punkty kontrolne cyklu oraz nie wchodzi w stadium apoptozy mimo uszkodzenia DNA, oznacza to, że funkcje białka p53 zostały zablokowane.

Jednym z częstszych powodów braku aktywności białka p53 jest nadekspresja czynników je wiążących, takich jak MDM2 i MDM4. Zwiększona ilość MDM2 w komórce powoduje, że większość białka p53 jest związana i w rezultacie nieaktywna, a ponadto powoduje znaczny wzrost trawienia p53 w proteasomach.

Wiele przytoczonych wyżej dowodów wskazuje, iż białko MDM2 jest głównym negatywnym regulatorem białka p53 oraz głównym supresorem jego aktywności w nowotworach z nadekspresją białka MDM2 [3]. Uwalniając białko p53 z kompleksu z białkiem MDM2 można by więc stabilizować supresor nowotworów oraz aktywować ścieżkę sygnalizacyjną białka p53, prowadzącą do zatrzymania cyklu komórkowego i apoptozy. Hipoteza ta została zweryfikowana wielokrotnie [5,11,12]. Wyniki wskazują, że uwolnione z kompleksu białko p53 ulega gwałtownej akumulacji w jądrach komórek nowotworowych, skutkując zatrzymaniem cyklu komórkowego i indukcją apoptozy. Dobrze scharakteryzowana interakcja białek stała się podstawą do zaprojektowania niebiałkowych, niskocząsteczkowych inhibitorów interakcji MDM2-p53, a także MDM4-p53, prowadzących do reaktywacji p53 i będących potencjalnymi lekami przeciwnowotworowymi [45]. Schemat potencjalnego działania inhibitora oddziaływań p53-MDM2 przedstawiono na ryc. 5.

Można wyodrębnić trzy główne strategie ograniczenia oddziaływań między MDM2 i p53 oparte na: zahamowaniu ekspresji MDM2, inhibicji oddziaływania MDM2 – p53 oraz blokowaniu aktywności MDM2 jako ligazy ubikwityny. Zostaną one szczegółowo opisane w kolejnym rozdziale.

ZWIĄZKI NISKOCZĄSTECZKOWE AKTYWUJĄCE BIAŁKO p53 W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Pierwsza ze wspomnianych strategii terapeutycznych opiera się na zahamowaniu ekspresji białka MDM2. Blokade ekspresji z genu *Mdm2* uzyskano m.in. za pomocą antysensownych oligonukleotydów zarówno w kulturach *in vitro* jak i w modelach mysich. Wprowadzenie hipomorficznego allelu genu *Mdm2* do modelu mysiego spowodowało obniżenie poziomu białka do –30% w porównaniu z myszą typu dzikiego i w rezultacie nieznaczny wzrost aktywności p53, który wystarczył do prawidłowego wzrostu i zahamowania rozwoju nowotworu w modelach mysich [30].

Interakcje p53-MDM2 to obecnie jeden z głównych kierunków badań nad potencjałem terapeutycznym białka p53 w zwalczaniu chorób nowotworowych. Odkryto już wiele związków i molekuł, które w różny sposób ingerują w oddziaływanie MDM2 – p53 typu dzikiego (tabela 1).

Białko MDM2 wiąże się z N-terminalną domeną p53 i poprzez to wiązanie blokuje zdolności transaktywacyjne białka p53. Aminokwasy 25–109 białka MDM2 tworzą hydrofobowe wgłębienie, w które mieści się cała domena transaktywacyjna p53, mimo że nie cała bierze udział w wiązaniu (trzy aminokwasy pełnią istotną rolę w wiązaniu MDM2, są to Phe19, Trp23 oraz Leu26).

Jak wspomniano, obecnie wykorzystuje się trzy główne sposoby poszukiwania molekuł aktywujących białko p53 w komórkach nowotworowych. Pierwsza oparta jest na screeningu *in vitro* związków, które wiążą się do białka MDM2 bądź blokują aktywność E3 ligazy tego białka. Doprowadziło to w 2004 r. do identyfikacji grupy związków o rdzeniu *cis*-imidazolinowym, zwanych nutlinami [46]. Nutliny to związki łączące się bezpośrednio do białka MDM2 i przez

Tabela 1. Związki niskocząsteczkowe aktywujące białko p53 typu niezmutowanego (w oparciu o [7])

Związek	Mechanizm działania	Faza badań klinicznych
Nutlin	wiązanie do MDM2 [46]	I
MI-219	wiązanie do MDM2 [14]	I
Tenovin-6	inhibicja SIRT1 i SIRT2 [23]	przedkliniczna
RITA	wiązanie do p53 [22]	przedkliniczna
Leptomycyna B	wiązanie do CRM1 [34]	I
Aktynomycyna D	uwolnienie RPL11 i RPL5 [13]	zaakceptowana (daktynomycyna)

to hamujące jego aktywność regulatorową względem białka p53. Dzięki budowie mimikującej trzy reszty aminokwasowe domeny transaktywacyjnej białka p53, wiąże się do hydrofobowej kieszeni białka MDM2 i w konsekwencji blokuje jego interakcję z białkiem p53. Inhibitory te zaburzają tworzenie się kompleksu między białkiem MDM2 a p53 już w stężeniach nanomolowych ($IC_{50}=90$ nM dla nutliny 3a, aktywnego enancjomera nutliny 3) [45]. Dowiedziono, iż nutliny są pobierane przez wiele typów komórek nowotworowych, prowadząc do stabilizacji białka p53 i aktywacji jego ścieżki sygnałowej. Proliferujące komórki nowotworowe, po ekspozycji na mikromolowe stężenia nutliny, były efektywnie zatrzymywane w fazie G1 i G2 oraz ulegały apoptozie. Niestety, związki te okazały się słabymi antagonistami interakcji p53 – MDM4 oraz wykazywały dużą toksyczność systemową u myszy [7].

Druga strategia poszukiwania związków o wysokim potencjale przeciwnowotworowym oparta jest na screeningu związków chemicznych dostępnych w bazie NCI (National Cancer Institute) w testach biologicznych na modelach komórkowych. W ten sposób zidentyfikowano związek o nazwie RITA (reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis), niegenotoksyczny aktywator białka p53, który wiążąc się do jego domeny transaktywacyjnej, uniemożliwia interakcję z białkiem MDM2 [22]. RITA wiąże się do białka p53 w obrębie domeny N-terminalnej i zaburza oddziaływanie p53 z MDM2 zarówno *in vitro* jak i w komórkach. Udowodniono, że RITA indukuje ekspresję genów znajdujących się pod kontrolą transkrypcyjną białka p53 oraz apoptozę w wielu liniach komórek nowotworowych, zachowujących typ dziki białka p53 [22]. Ponadto doniesienia tej grupy wykazały, iż RITA jest bardzo skutecznym chemioterapeutycznym również *ex vivo* i hamuje rozwój guzów u myszy w sposób zależny od białka p53.

Szeroko zakrojone przeszukiwanie biblioteki związków naturalnych zaowocowało identyfikacją aktynomycyny D, antybiotyku pozyskiwanego z promieniowca *Streptomyces parvulus* jako silnego aktywatora białka p53. Związek ten powoduje zahamowanie syntezy rybosomalnego RNA, co uniemożliwia biogenezę rybosomów i uwalnia białka rybosomalne RPL11 i RPL5, które wiążą i inaktywują białko MDM2. Mimo iż aktynomycyna D powoduje uszkodzenie DNA i jest związkiem toksycznym w wysokich stężeniach, w małych dawkach okazała się bardzo skutecznym aktywatorem białka p53 w komórkach nowotworowych [13]. Ponadto jest ona obecnie wykorzystywana w leczeniu pacjentów z chorobami nowotworowymi (tabela 1).

Trzecia strategia, mająca na celu identyfikację związków niskocząsteczkowych, zaburzających interakcję p53 – MDM2 polega na modelowaniu molekularnym w oparciu o strukturę obu białek. Owocem tej techniki jest odkrycie spirooxindoli, inhibitorów białka MDM2 [14]. Wykazano, iż związki te po podaniu do komórek nowotworowych, indukują zatrzymanie cyklu komórkowego i śmierć komórkową, natomiast w przypadku zdrowych komórek, jedynie zatrzymanie cyklu komórkowego. Działanie tych inhibitorów jest ściśle zależne od reaktywacji białka p53 w traktowanych komórkach. Spiro-oxindole zaburzają kompleksy p53-MDM2 w wielu liniach komórkowych przy wartościach IC_{50} wynoszących już 30–2000 nM. Najbardziej obiecującą pochodną tych inhibitorów okazał się związek MI-219, wykazujący najlepszą farmakodynamikę i biodostępność w modelach mysich. Wykazano, iż MI-219 indukuje regresję nowotworu, nie generując jednocześnie toksyczności specyficznej tkankowo. Jednak poziom białka p53 indukowany przez MI-219 jest niski i niewystarczający do aktywacji apoptozy nawet we wrażliwych tkankach, takich jak gruczoł [7].

Jak już wcześniej wspomniano, białko p53 ulega wielu modyfikacjom potranslacyjnym, wpływającym na jego aktywność. Okazuje się, iż na wzrost stężenia białka p53 w komórkach nowotworowych można wpływać nie tylko przez zaburzanie formowania się kompleksu z białkiem MDM2, ale także celując w inne białka regulatorowe. Przykładem takich związków są zidentyfikowane w oparciu o testy komórkowe, tenovina 1 i jej lepiej rozpuszczalna w roztworach wodnych pochodna, tenovina 6 [23]. Tenoviny powodują nagły wzrost poziomu białka p53 w komórkach traktowanych już stężeniami mikromolowymi związku. Co więcej, tenovina 6 podawana dootrzewnowo w dawce 50 mg/dzień znacząco opóźniała wzrost ksenografów ludzkich komórek czerniaka w modelach mysich [23]. W dwuhybridowym teście drożdżowym wykazano, iż tenoviny powodują zahamowanie aktywności NAD⁺-zależnych deacetylaz SIRT1 i SIRT2, należących do rodziny sirtuin – trzeciej klasy deacetylaz histonów. Deacetylacja białka p53 powoduje jego destabilizację i hamuje aktywność transkrypcyjną, więc inhibicja sirtuin powinna prowadzić do akumulacji białka p53 i indukcji p53-zależnej apoptozy. Rzeczywiście, traktowanie tenovinami komórek raka piersi (MCF7) powodowało akumulację w nich acetylowanego białka p53 oraz acetylowanej tubuliny – substratów odpowiednio SIRT1 i SIRT2. Po identyfikacji dokładnego mechanizmu działania tych związków, dalsza chemiczna optymalizacja ich aktywności polegająca na strukturalnej

modyfikacji w celu podniesienia np. swoistości substratowej, jest obecnie możliwa [7].

Interesującym sposobem identyfikacji specyficznych aktywatorów białka p53, jest testowanie znanych molekuł, regulujących zjawiska wpływające na aktywność p53. Najlepszym przykładem opisywanym w literaturze jest leptomycyna B i jej pochodne – inhibitory eksportu białek z jądra. Leptomycyna B jest inhibitorem eksportyny CRM1, a jej pochodne wykazały korzystne działanie w badaniach przedklinicznych z użyciem modeli zwierzęcych [34].

Nasze wieloletnie badania nad mechanizmami leżącymi u podstaw terapii fotodynamicznej (PDT) wykazały, iż fotouczulacz, protoporfiryna IX (PpIX), bezpośrednio oddziałuje z typem „dzikim” białka p53 *in vitro* oraz indukuje śmierć komórek raka okrężnicy (HCT 116) w sposób zależny i niezależny od białka p53 [54]. W pracy wykazaliśmy, iż PpIX może bezpośrednio wiązać się z białkiem p53, przez co zaburza formowanie kompleksu z białkiem MDM2. Zapobiega to degradacji białka p53 i prowadzi do jego stabilizacji. PpIX działa więc analogicznie do opisywanych wcześniej niskocząsteczkowych inhibitorów interakcji p53 – MDM2, potencjalnych leków przeciwnowotworowych. W efekcie obserwuje się indukcję zależnej od białka p53 apoptozy jeszcze w ciemności, przed wzbudzeniem protoporfiryny światłem. Wzbudzenie światłem o energii 2 J/cm² indukuje apoptozę w komórkach zawierających białko p53 (p53^{+/+}), jak i jego pozbawionych (p53^{-/-}), co dowiedziono badając indukcję proapoptotycznego genu *PUMA*, będącego jednocześnie pod kontrolą transkrypcyjną białka

p53. Ostatnie badania wskazują, że białko p73, homolog białka p53, może prowadzić do indukcji apoptozy przez transaktywację genu *PUMA*. Białko p73 ulega ekspresji zarówno w linii HCT 116 p53^{+/+}, jak i p53^{-/-}. Możliwe jest więc, że w komórkach niemających aktywnego białka p53, dochodzi do indukcji apoptozy poprzez aktywację białka p73 przez protoporfirynę IX [54,55,57].

W zgodzie z tymi obserwacjami są badania Mitsunaga i wsp. [32], w których wykazano, że indukcja wczesnej apoptozy w komórkach HCT 116 na skutek PDT jest zależna od obecności proapoptotycznego białka Bax i białka p53. W porównaniu do typu dzikiego, komórki HCT 116 Bax^{-/-} i p53^{-/-} wykazały dużo większą żywotność w odpowiedzi na PDT.

Ostatnie doniesienia literaturowe podają, że inhibitory oddziaływać p53 – MDM2 oraz p53 – MDM4 mogłyby być stosowane w leczeniu około 2–3 milionów pacjentów diagnozowanych z nowotworem każdego roku [43].

WNIOSKI

Powszechnie przyjęto, iż białko p53 jest najistotniejszym sensorem stresu w komórkach. Jego celowa inaktywacja w komórkach nowotworowych w wyniku nagromadzenia się zmian genetycznych, potwierdza jego istotną rolę w rozwoju i przetrzutowaniu guzów. Dlatego też wydaje się, iż strategię terapeutyczne opierające się na reaktywacji białka p53 w komórkach nowotworowych powinny stanowić w przyszłości skuteczne narzędzie w zwalczaniu tzw. dżumy XXI wieku.

PIŚMIENICTWO

- [1] Bennett M., Macdonald K., Chan S.W., Luzio J.P., Simari R., Weissberg P.: Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science*, 1998; 282: 290–293
- [2] Berger M., Vogt Sionov R., Levine A.J., Haupt Y.: Role for the proline domain of p53 in its regulation by MDM2. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 3785–3790
- [3] Bond G.L., Hu W., Levine A.J.: MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2005; 5: 3–8
- [4] Bossy-Wetzel E., Green D.R.: Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. *Mutat. Res.*, 1999; 434: 243–251
- [5] Böttger A., Böttger V., Sparks A., Liu W.L., Howard S.F., Lane D.P.: Design of a synthetic Mdm2-binding mini protein that activates the p53 response *in vivo*. *Curr. Biol.*, 1997; 1: 860–869
- [6] Brooks C.L., Gu W.: Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2003; 15: 164–171
- [7] Brown C.J., Lain S., Verma C.S., Fersht A.R., Lane D.P.: Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat. Rev. Cancer*, 2009; 9: 862–873
- [8] Cahilly-Snyder L., Yang-Feng T., Francke U., George D.L.: Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 1987; 13: 235–244
- [9] Chan T.A., Hermeking H., Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B.: 14-3-3 sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*, 1999; 401: 616–620
- [10] Chao C., Saito S., Kang J., Anderson C.W., Appella E., Xu Y.: p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage. *EMBO J.*, 2000; 19: 4967–4975
- [11] Chène P.: Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2003; 3: 102–109
- [12] Chène P., Fuchs J., Bohn J., García-Echeverría C., Furet P., Fabbro D.: A small synthetic peptide, which inhibits the p53-hdm2 interaction, stimulates the p53 pathway in tumour cell lines. *J. Mol. Biol.*, 2000; 299: 245–253
- [13] Choong M.L., Yang H., Lee M.A., Lane D.P.: Specific activation of the p53 pathway by low dose actinomycin D: a new route to p53 based cyclotherapy. *Cell Cycle*, 2009; 8: 2810–2818
- [14] Ding K., Lu Y., Nikolovska-Coleska Z., Qiu S., Ding Y., Gao W., Stuckey J., Krajewski K., Roller P.P., Tomita Y., Parrish D.A., Deschamps J.R., Wang S.: Structure-based design of potent non-peptide MDM2 inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005; 127: 10130–10131
- [15] Donehower L.A., Harvey M., Slagle B.L., McArthur M.J., Montgomery C.A. Jr., Butel J.S., Bradley A.: Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 1992; 356: 215–221
- [16] Finlay C.A., Hinds P.W., Levine A.J.: The p53 protooncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*, 1989; 57: 1083–1093
- [17] Freedman D.A., Wu L., Levine A.J.: Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 1999; 55: 96–107
- [18] Gebow D., Miselis N., Liber H.L.: Homologous and nonhomologous recombination resulting in deletion: effects of p53 Status, microhomology, and repetitive DNA length and orientation. *Mol. Cell. Biol.*, 2000; 20: 4028–4035
- [19] Harms K.L., Chen X.: The C terminus of p53 family proteins is a cell fate determinant. *Mol. Cell. Biol.*, 2005; 25: 2014–2030
- [20] Hoh J., Jin S., Parrado T., Edington J., Levine A.J., Ott J.: The p53 MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 8467–8472
- [21] Hsieh J.K., Chan F.S., O'Connor D.J., Mittnacht S., Zhong S., Lu X.: Rb regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Mol. Cell*, 1999; 3: 181–193
- [22] Issaeva N., Bozko P., Enge M., Protopopova M., Verhoef L.G., Masucci M., Pramanik A., Selivanova G.: Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nat. Med.*, 2004; 10: 1321–1328

- [23] Lain S., Hollick J.J., Campbell J., Staples O.D., Higgins M., Aoubala M., McCarthy A., Appleyard V., Murray K.E., Baker L., Thompson A., Mathers J., Holland S.J., Stark M.J., Pass G., Woods J., Lane D.P., Westwood N.J.: Discovery, *in vivo* activity, and mechanism of action of a small-molecule p53 activator. *Cancer Cell*, 2008; 13: 454–463
- [24] Lane D.P., Crawford L.V.: T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 1979; 278: 261–263
- [25] Laptenko O., Prives C.: Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ.*, 2006; 13: 951–961
- [26] Lin Y., Ma W., Benchimol S., Pidd, a new death-domain – containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nat. Genet.*, 2000; 26: 122–127
- [27] Linke S.P., Sengupta S., Khabie N., Jeffries B.A., Buchhop S., Miska S., Henning W., Pedoux R., Wang X.W., Hofseth L.J., Yang Q., Garfield S.H., Stürzbecher H.W., Harris C.C.: p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. *Cancer Res.*, 2003; 63: 2596–2605
- [28] Marchenko N.D., Zaika A., Moll U.M.: Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 16202–16212
- [29] Marine J.C., Francoz S., Maetens M., Wahl G., Toledo F., Lozano G.: Keeping p53 in check: Essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell Death Differ.*, 2006; 13: 927–934
- [30] Mendrysa S.M., O’Leary K.A., McElwee M.K., Michalowski J., Eisenman R.N., Powell D.A., Perry M.E.: Tumor suppression and normal aging in mice with constitutively high p53 activity. *Genes Dev.*, 2006; 20: 16–21
- [31] Meulmeester E., Jochemsen A.G.: p53: a guide to apoptosis. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2008; 8: 87–97
- [32] Mitsunaga M., Tsubota A., Nariai K., Namiki Y., Sumi M., Yoshikawa T., Fujise K.: Early apoptosis and cell death induced by ATX-S10Na (II)-mediated photodynamic therapy are Bax- and p53-dependent in human colon cancer cells. *World J. Gastroenterol.*, 2007; 13: 692–698
- [33] Momand J., Jung D., Wilczynski S., Niland J.: The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res.*, 1998; 26: 3453–3459
- [34] Mutka S.C., Yang W.Q., Dong S.D., Ward S.L., Craig D.A., Timmermans P.B., Murli S.: Identification of nuclear export inhibitors with potent anticancer activity *in vivo*. *Cancer Res.*, 2009; 69: 510–517
- [35] Oda K., Arakawa H., Tanaka T., Matsuda K., Tanikawa C., Mori T., Nishimori H., Tamai K., Tokino T., Nakamura Y., Taya Y.: p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*, 2000; 102: 849–862
- [36] Oda E., Ohki R., Murasawa H., Nemoto J., Shibue T., Yamashita T., Tokino T., Taniguchi T., Tanaka N.: Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 2000; 288: 1053–1058
- [37] Oren M., Levine A.J.: Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983; 80: 56–59
- [38] Sakaguchi K., Sakamoto H., Lewis M.S., Anderson C.W., Erickson J.W., Appella E., Xie D.: Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry*, 1997; 36: 10117–10124
- [39] Sakamuro D., Sabatini P., White E., Prendergast G.C.: The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene*, 1997; 15: 887–898
- [40] Senzer N., Nemunaitis J., Nemunaitis M., Lamont J., Gore M., Gabra H., Eeles R., Sodha N., Lynch F.J., Zumstein L.A., Menander K.B., Sobol R.E., Chada S.: p53 therapy in a patient with Li-Fraumeni syndrome. *Mol. Cancer Ther.*, 2007; 6: 1478–1482
- [41] Takimoto R., El-Deiry W.S.: Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene*, 2000; 19: 1735–1743
- [42] Tanimura S., Ohtsuka S., Mitsui K., Shirouzu K., Yoshimura A., Ohtsubo M.: MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains. *FEBS Lett.*, 1999; 447: 5–9
- [43] Toledo F., Wahl G.M.: Regulating the p53 pathway: *In vitro* hypotheses, *in vitro* veritas. *Nat. Rev. Cancer*, 2006; 6: 909–923
- [44] Toledo F., Wahl G.M.: MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007; 39: 1476–1482
- [45] Vassilev L.T.: MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol. Med.*, 2007; 13: 23–31
- [46] Vassilev L.T., Vu B.T., Graves B., Carvajal D., Podlaski F., Filipovic Z., Kong N., Kammlott U., Lukacs C., Klein C., Fotouhi N., Liu E.A.: *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*, 2004; 303: 844–848
- [47] Venot C., Maratrat M., Dereuil C., Conseiller E., Bracco L., Debussche L.: The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific *PIG3* gene. *EMBO J.*, 1998; 17: 4668–4679
- [48] Ventura A., Kirsch D.G., McLaughlin M.E., Tuveson D.A., Grimm J., Lintault L., Newman J., Reczek E.E., Weissleder R., Jacks T.: Restoration of p53 function leads to tumour regression *in vivo*. *Nature*, 2007; 445: 661–665
- [49] Vousden K.H., Lu X.: Live or let die: the cell’s response to p53. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 594–604
- [50] Wani M.A., Zhu Q.Z., El-Mahdy M., Wani A.A.: Influence of p53 tumor suppressor protein on bias of DNA repair and apoptotic response in human cells. *Carcinogenesis*, 1999; 20: 765–772
- [51] Waterman M.J., Stavridi E.S., Waterman J.L., Halazonetis T.D.: ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat. Genet.*, 1998; 19: 175–178
- [52] Yonish-Rouach E., Resnitzky D., Lotem J., Sachs L., Kimchi A., Oren M.: Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*, 1999; 352: 345–347
- [53] Yu J., Zhang L., Hwang P.M., Kinzler K.W., Vogelstein B.: PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol. Cell*, 2001; 3: 673–682
- [54] Zawacka-Pankau J., Issaeva N., Hossain S., Pramanik A., Selivanova G., Podhajskaja A.J.: Protoporphyrin IX interacts with wild-type p53 protein *in vitro* and induces cell death of human colon cancer cells in a p53-dependent and -independent manner. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 2466–2472
- [55] Zawacka-Pankau J., Kostecka A., Sznarkowska A., Hedström E., Kawiak A.: p73 tumor suppressor protein: A close relative of p53 not only in structure but also in anti-cancer approach? *Cell Cycle*, 2010; 9: 720–728
- [56] Zawacka-Pankau J., Krachulec J., Grulkowski I., Bielawski K.P., Selivanova G.: The p53-mediated cytotoxicity of photodynamic therapy of cancer: recent advances. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2008; 232: 487–497
- [57] Zawacka-Pankau J., Maleńczyk K., Sznarkowska A.: The structure and cellular regulation of p73: Their implication in anticancer therapy. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2010; 64: 78–86
- [58] Zurer I., Hofseth L.J., Cohen Y., Xu-Welliver M., Hussain S.P., Harris C.C., Rotter V.: The role of p53 in base excision repair following genotoxic stress. *Carcinogenesis*, 2004; 25: 11–19

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.