

БЕЛОК p53 И ЕГО УНИВЕРСАЛЬНЫЕ ФУНКЦИИ В МНОГОКЛЕТОЧНОМ ОРГАНИЗМЕ

© 2007 г.

П. М. ЧУМАКОВ

*Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН,
Москва*

I. Введение. II. Исторический очерк. III. p53 обеспечивает альтруистическое поведение клеток многоклеточного организма. IV. Регуляция активности p53. V. Передача сигналов на p53. VI. Транскрипционная активность p53. VII. p53-регулируемые гены. VIII. Митохондриальная функция p53. IX. Регуляторные петли, контролирующие активность p53. X. p53 работает в любых условиях. XI. p53 и старение.

I. ВВЕДЕНИЕ

В последние годы, пожалуй, ни один другой белок не изучался так интенсивно, как p53. За четверть века с момента его открытия p53 было посвящено более 40 тысяч научных работ, и их число неуклонно продолжает расти. Повышенное внимание к p53 определяется, прежде всего, ключевой ролью этого белка в защите от рака, наиболее волнующей общество болезни. Раскрытие многочисленных механизмов функционирования p53 шло параллельно с изучением базовых механизмов распознавания и проведения сигналов внутри клетки, репарации генома, регуляции клеточного деления и клеточной смерти, координации метаболических процессов, регуляции взаимодействий между клетками. Поразительным образом функция p53 оказывалась связанной с каждым из перечисленных процессов, причем связи поддерживались на многих уровнях, образуя единую

Принятые сокращения: ДСД – ДНК-связывающий домен; СКД – С-концевой домен; ТА-домен – домен, участвующий в транскрипционной активации.

Адрес для корреспонденции: peter@chumakov.com

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 05-04-48979, гранта Медицинского института Ховарда Хьюза № 55005603 и грантов Национальных институтов здоровья США NIH R01 CA104903 и R01 AG025278.

регуляторную сеть. Очевидно, белок p53 не только получает сигналы о превышении некоторых пороговых величин в каждом из клеточных процессов, но и обеспечивает адекватные этим величинам ответы, обеспечивающие координированную коррекцию этих процессов, дальнейшее поведение и судьбу клеток. Роль p53 в организме можно сравнить с ролью дирижера в оркестре – его функции осуществляют контроль за выполнением выработанных эволюцией программ, схем поведения клеток в разнообразных условиях.

Выполняя свою контрольную функцию, p53 не является самостоятельным участником, необходимым для протекания тех или иных процессов: его активность проявляется только в ответ на отклонения от нормы. Белок p53 не нужен для нормальной дифференцировки клеток и развития организма – фенотип рождающихся мышей, лишенных гена p53, ничем не отличим от нормальной. Его биологическая роль заключается в обеспечении стабильности генома и генетической однородности клеток в целостном организме. Не случайно ген p53 часто характеризуют метафорически, как «страж генома» [1], «ангел-хранитель» [2], «ген совести клетки» [3], а мутантный ген – как «падший ангел» [4]. Эти эпитеты хорошо отражают роль p53 в предотвращении болезней и драматизм событий, связанных с утратой его функций. Контролирующая функция p53 заключается в предотвращении отклонений и связанных с ними патологий, а ее недостаточность ведет к неизбежному развитию серьезных заболеваний. Кроме этого, многие уже развившиеся патологические процессы приводят к гиперактивности p53, что в свою очередь, может усугублять течение заболевания. Сейчас установлена роль повреждений функции гена p53 в развитии не только онкологических, но также и сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, метаболических заболеваний; обсуждается участие p53 в процессах старения организма.

В данном обзоре нашей задачей было показать многогранность функций p53, многообразие сигналов, поступающих на p53 со стороны всевозможных процессов внутри и вне клетки, а также многовариантность ответов клетки на проявления активности p53. Мы посвящаем этот обзор осмыслению стратегии p53 в обеспечении генетической стабильности, в поддержании генетического гомеостаза в многоклеточном организме и его значению для сохранения здоровья. Вне внимания мы оставляем огромный массив данных о конкретных механизмах нарушений p53 при раке, вопросы, связанные с перспективами использования p53-зависимых механизмов в клинике. Эти вопросы были нами недавно детально рассмотрены в специальном обзоре [5].

II. ИСТОРИЧЕСКИЙ ОЧЕРК

В середине 20 века утвердилось представление о раке как о болезни генов, отвечающих за контроль деления клеток [6]. При изучении вирусного канцерогенеза было сформулировано представление об онкогенах как регуляторных генах, изменение активности которых приводит к опухолевой трансформации клетки [7]. К началу 70-х годов появилась технологическая база для изучения молекулярных функций генов, что позволило приступить к выяснению механизмов трансформации под действием вирусных онкогенов. Популярным объектом для изучения был мелкий ДНК-содержащий онкогенный вирус обезьян SV40, который онкогенен для грызунов и легко вызывает трансформацию клеток в культуре. Поскольку для трансформации вирусом SV40 необходим и достаточен только ген, кодирующий большой Т-антиген [8], с этим белком связывались надежды на раскрытие механизмов злокачественного перерождения.

В 1979 г. появилось несколько работ, указывающих на то, что в трансформированной клетке большой Т-антиген прочно связывается с клеточным белком с молекулярным весом около 53 кДа первоначально получившим название клеточного Т-антигена [9–12]. Появилась надежда, что открытый белок представляет собой мишень для Т-антигена вируса SV40, через которую он осуществляет трансформацию клетки. Вскоре было отмечено накопление этого же белка в клетках, трансформированных по другим причинам, а также в клетках опухолей человека [13]. В крови раковых больных раком были обнаружены антитела, реагирующие с клеточным Т-антигеном [14], который вскоре было решено называть «p53». Полученные данные указывали на то, что p53, являясь опухолевым антигеном, представляет собой часто встречающийся маркер опухолевых клеток.

Первые сведения о возможной функции p53 были получены в опытах по микроинъекции антител к p53 в культивируемые клетки, что приводило к задержке их вступления в S-фазу клеточного цикла [15]. Это указывало на некую роль p53 в процессах регуляции деления клеток, что дополнительно увеличило интерес к его изучению.

Успешное клонирование кДНК p53 [16, 17], а затем и самого гена [18, 19], открыло дорогу для современных молекулярно-генетических исследований. Было установлено, что при введении в клетки конструкций, экспрессирующих p53, наблюдается кооперация p53 с онкогеном Ras в трансформации клеток, в то время как сам по себе p53 способен повышать возможное число делений первичных клеток в культуре, и даже вызывать их иммортализацию, т.е. бессмертие в культуре [20–22]. При этом онкогенные свойства заметно активировались при

введении искусственных мутаций в различные участки молекулы p53 [23]. Таким образом, p53 оказался в числе потенциальных онкогенов, причем частое обнаружение высоких уровней этого белка в клетках опухолей человека наводило на мысль, что с активацией онкогена p53 связана значительная часть раковых заболеваний.

В 1989 г. произошло событие, которое вызвало переоценку прежних результатов. Было обнаружено, что ранее клонированные из культур клеток последовательности гена p53 содержат точечные мутации, и поэтому наблюдаемые онкогенные свойства в действительности соответствуют мутантным формам p53 [24]. При экспрессии в клетках последовательностей гена p53, выделенных из нормальных клеток, онкогенных эффектов не наблюдалось; напротив, это приводило к супрессии делений клеток в культуре [25–27]. В опухолях человека с большой частотой обнаруживались точечные мутации одной аллели гена p53, при одновременной делеции соответствующего участка второй хромосомы [28]. Это прямо указывало на то, что в опухолях человека ген p53 является частой мишенью для инактивации, и что сам ген p53 следует рассматривать не как онкоген, а как опухолевый супрессор [29].

Подтверждением антионкогенной природы p53 явились фенотипы мышей с экспериментальными делециями гена p53. Неожиданно оказалось, что мыши с полностью делетированными обеими копиями гена p53 при рождении ничем не отличаются от контрольных животных. Они нормально развиваются и не имеют видимых фенотипических отклонений до достижения 2–3-месячного возраста, когда начинает проявляться склонность к злокачественным заболеваниям. К девяти месяцам практически все родившиеся нокаутные мыши погибали от лимфом или других злокачественных заболеваний [30]. Выращиваемые в культуре фибробласты, полученные от эмбрионов мышей с делетированным p53, обладали беспрецедентной хромосомной нестабильностью, приводящей к преобладанию полиплоидных и анеуплоидных клеток (т.е. клеток с измененным числом хромосом) уже после первых делений в культуре [31, 32]. Стремительное накопление анеуплоидных клеток наблюдалось также в течение жизни мышей, и было одной из причин развития лимфом.

III. p53 ОБЕСПЕЧИВАЕТ АЛЬТРУИСТИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ КЛЕТОК МНОГОКЛЕТОЧНОГО ОРГАНИЗМА

С начала 90-х годов XX века было раскрыто множество фундаментальных механизмов, с помощью которых p53 снижает вероятность

возникновения злокачественных заболеваний. Белковая молекула p53 обладает множеством функций, однако их характер позволяет утверждать, что p53 обеспечивает соблюдение интересов целостного организма, в том числе, ценой пожертвований интересами отдельной клетки. Биологическая, эволюционная роль p53 присуща именно многоклеточным организмам. Благодаря активности p53 клеткам многоклеточного организма свойственно альтруистическое поведение, при котором ослабленные и поврежденные клетки сами жертвуют собой, не вступая в конкурентные взаимоотношения с окружающими более здоровыми клетками. В результате строго соблюдения запрета на конкуренцию между клетками становится невозможным генетический отбор, который позволил бы выживать и давать потомство наиболее приспособленным к тому или иному условию мутантным вариантам клеток. Функция p53, таким образом, обеспечивает генетическую стабильность, генетическую однородность соматических клеток.

Обеспечивая эти макроцели p53 использует множество альтернативных стратегий. Он выполняет функцию надзора за целостностью отдельных структур, за своевременностью и адекватностью тех или иных процессов в клетке. Очевидно, что любые повреждения и отклонения должны либо исправляться, либо клетка должна прекратить существование, чтобы не дать генетически-измененное потомство. Под контролем p53 устанавливаются границы допустимых отклонений от оптимума, допустимые уровни экспозиции на внешние и внутренние стрессовые факторы. Таким образом p53 может осуществлять профилактическую функцию, предупреждая повреждения от вредоносных воздействий. Клетка, попавшая в неблагоприятные условия и получившая повреждения, должна либо ускорить процессы репарации, либо лишиться способности к делению или даже погибнуть вследствие апоптоза. Судьба клетки определяется в зависимости от уровня и активности p53, что, в свою очередь, зависит от характера и интенсивности воздействия, а также от тканеспецифической настройки механизмов, регулирующих активность p53. За счет активности p53 происходит также тонкая адаптивная регуляция таких процессов, как соотношение между гликолитическим и аэробным метаболизмом, активность антиоксидантных систем, обеспечение более или менее экономного расходования ресурсов в зависимости от доступности питательных веществ. Благодаря функции p53 отслеживаются, оцениваются и координируются практически все процессы внутри клетки, а сам p53 как бы выступает в качестве «проводника божественной воли» в клетке, обеспечивая приоритет интересов организма над интересами отдельной клетки.

Каким же образом p53 осуществляет в клетке столь сложные функции? Безусловно, свою функцию p53 выполняет взаимодействуя с множеством компонентов единой регуляторной системы, центральным элементом которой он является. Эта система включает сложный и разветвленный сенсорный компонент, который собирает информацию о состоянии структур, условий и процессов внутри клетки, что далее трансформируется в адекватную условиям перенастройку аппарата, отвечающего за функциональное состояние белка p53. В соответствии с изменениями своей активности p53 влияет на эффекторные компоненты системы, функция которых определяет конечные последствия принятых решений. Следует, однако, иметь в виду, что результирующее действие p53 во многом зависит от типа клетки, или тканеспецифического контекста, в котором проявляется его активность.

Активности p53 не только сложно регулируются, но и чрезвычайно разнообразны по своей природе. Наиболее изучена его способность действовать в качестве транскрипционного фактора. Белковая молекула p53 имеет характерное для транскрипционного фактора строение и состоит из доменов, определяющих способность к узнаванию и связыванию со специфическими последовательностями ДНК, а также к взаимодействию с компонентами транскрипционной машины и ее активации. Связываясь с регуляторными участками определенных генов, p53 обычно вызывает их активацию, хотя некоторые гены он, напротив, репрессирует, используя для репрессии несколько альтернативных механизмов. Значительная часть эффектов, вызываемых p53, складывается из активностей регулируемых им генов. Следует учитывать выраженную индивидуальность в реакции различных типов клеток на действие p53, поскольку величины индукции или репрессии p53-регулируемых генов, а также их взаимные пропорции в разных типах клеток могут существенно различаться.

Активности p53 не ограничиваются его влиянием на транскрипцию. Описано несколько транскрипционно-независимых функций p53 (например, способность транслоцироваться в митохондрии и оказывать про-апоптозное действие, способность непосредственно участвовать в репарации повреждений ДНК), функциональная направленность которых также хорошо соответствует стратегии p53 на обеспечение генетической стабильности. Таким образом, p53 реализует свою стратегию всеми доступными средствами и выступает не только как интегратор и координатор, но, в некоторых случаях, и как непосредственный исполнитель поставленной задачи.

IV. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ p53

До недавнего времени считалось, что в нормальных клетках вне каких-либо стрессов активность p53 практически отсутствует. Независимо от условий ген p53 транскрибируется с постоянной интенсивностью, а синтезирующиеся мРНК транслируются с образованием белка p53. Однако белок p53 обладает исключительно коротким временем жизни, что достигается за счет регулируемого активного убиквитин-зависимого и убиквитин-независимого разрушения в системе 26S и 20S протеасом (рис. 1) [33, 34].

Инициаторами разрушения p53 в системе 26S протеасом служат несколько убиквитиновых лигаз типа E3. Наиболее изученной среди них является убиквитиновая лигаза Mdm2, которая сама является продуктом гена, активируемого p53 [35–37]. В результате, повышение активности p53 приводит к индукции Mdm2, и, соответственно, к усилению разрушения p53 в 26S протеасомах. Таким образом, за счет белка Mdm2 устанавливается обратная связь, обеспечивающая саморегуляцию активности p53. Недавно установлено участие других

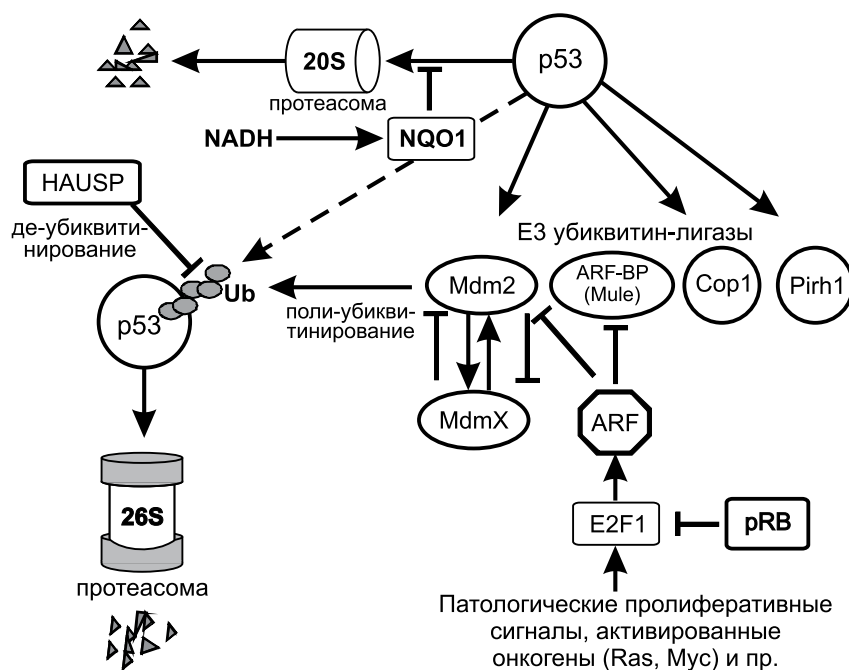


Рис. 1. Регуляция протеасомного разрушения белка p53.

убиквитин-лигаз типа E3 (Cop1, Pirh2, ARF-BP/MULE, CHIP) в регуляции уровней p53 [38–41], причем две из них (Cop1 и Pirh2), подобно белку Mdm2, выступают в качестве транскрипционных мишеней и, таким образом, вместе с p53 образуют обратные регуляторные связи. Это указывает на еще большую сложность регуляции разрушения p53, хотя вклад каждого из этих белков еще предстоит оценить.

Разрушение p53 может осуществляться также по убиквитин-независимому пути, в 20S протеасомах [42]. Этот путь быстрого разрушения характерен для белков, имеющих выраженные неструктурированные участки, в частности, он реализуется при разрушении денатурированных белков [43]. Маскирование неструктурированных участков при образовании белковых комплексов может способствовать стабилизации исходно нестабильных белков [34]. Белковая молекула p53 имеет неструктурированные участки в N- и C-концевых областях, что обуславливает ее разрушение в 20S протеасомах. Процесс вхождения неструктурированных белков в 20S протеасому регулируется NAD(P)H-зависимой хиноновой оксидоредуктазой NQO1, которая при наличии NADH связывается с такими белками и предотвращает их разрушение в 20S протеасомах [34]. Стрессы, приводящие к повреждению ДНК, способны усиливать взаимодействие NQO1 с p53, вызывая его накопление [42].

Механизмы разрушения p53 при участии убиквитиновой лигазы Mdm2 по-прежнему остаются наиболее изученными, и вероятнее всего, наиболее значимыми для регуляции его активности. Процесс взаимодействия p53 с белком Mdm2 тонко регулируется за счет множества механизмов [44]. Одни механизмы направлены на регуляцию активности Mdm2, в то время как другие – нацелены на модификации его мишени – самого белка p53 [45].

Важным компонентом регуляции активности Mdm2 служит близкородственный белок MdmX, который имеет очень сходное строение [46], но в отличие от Mdm2 не обладает E3 убиквитин-лигазной активностью [47]. Белок MdmX связывается с N-концевой областью p53, подавляет его транскрипционную активность [48], но не вызывает его разрушения. Он также способен гетеро-олигомеризоваться с Mdm2 [49, 50], что с одной стороны, приводит к стабилизации Mdm2 [51], а с другой – к ускорению разрушения MdmX [52]. Таким образом, изменение соотношений этих двух белков может тонко регулировать количество и активность p53.

Образование комплексов p53 с белками Mdm2 и MdmX также регулируется: например, некоторые рибосомные белки (L5, L11 и L23) связываются с Mdm2, подавляют его активность в отношении

p53 [53–55] и одновременно стимулируют разрушение MdmX [56], что приводит к активации p53 в ответ на определенные состояния, характеризующиеся как рибосомальный стресс [57, 58].

Модификация активности белка Mdm2 происходит и при его связывании с белком-активатором транскрипции p300/CBP, что приводит к переключению способности Mdm2 с моно-убиквитинирования на полиубиквитинирование p53 [59], которое необходимо для узнавания 26S протеасомами и разрушения белка [60]. Транскрипционный фактор YY1 [61, 62] и транскрипционный репрессор KAP1 [63] также могут ускорять разрушение p53, поскольку связывание этих белков усиливает взаимодействие Mdm2 и p53. Активирует разрушение p53 также связывание Mdm2 с белком ганкирином, который, в свою очередь, взаимодействует с протеасомной АТФазой S6 [64].

Белок Mdm2, также как и p53, сам подвергается разрушению в 26S протеасомах, но этот процесс может регулироваться за счет специальных ферментов, удаляющих убиквитиновые остатки. Установлено, что белок HAUSP, один из таких ферментов, удаляет убиквитин с белка Mdm2 [65], в то время как другой белок, Дахх, образует комплекс с Mdm2 и HAUSP и предотвращает самоубиквитинирование Mdm2 [66], вызывая его стабилизацию [67], чем способствует ускорению разрушения p53. В то же время, HAUSP может удалять убиквитин и с самого p53, приводя к его стабилизации [68]. Оказывая противоположные эффекты на систему разрушения p53, белок HAUSP способствует тонкой регуляции активности p53.

Важным регулятором Mdm2-зависимого разрушения p53 выступает белок p14^{ARF} (или ARF [69]) – продукт альтернативной рамки трансляции гена CDKN2A, который также кодирует ингибитор циклин-зависимой киназы, белок p16. ARF представляет собой аномально щелочной белок, на 20% состоящий из аргинина, но не содержащий лизина. В свободном состоянии ARF неструктурирован, хотя он склонен к образованию комплексов с другими белками, что приводит к нейтрализации положительного заряда. ARF обладает свойствами опухолевого супрессора, и его отсутствие приводит к фенотипу, напоминающему отсутствие p53 [70]. Одной из мишеней белка ARF является Mdm2. Связываясь с Mdm2 ARF подавляет его убиквитинлигазную активность и вызывает активацию p53 [71–73].

Транскрипция ARF позитивно и негативно регулируется комплексами, содержащими транскрипционный фактор E2F1 [74, 75], который, в свою очередь, регулируется белком pRB. В нормальных тканях уровни транскрипции гена ARF незначительны. Однако, в случае активации онкогенов и постоянной стимуляции клеток к

пролиферации происходит транскрипционная активация гена ARF. Накапливающийся белок ARF блокирует Mdm2 и тем индуцирует p53, повышая чувствительность клеток к апоптозу [76].

ARF блокирует и другую E3 лигазу ARF-BP (или MULE), которая также принимает участие в разрушении p53. Однако, кроме p53, субстратами для E3 лигазы ARF-BP служат и некоторые другие белки, например про-апоптотный белок Mcl1 [77]. Поэтому белок ARF выступает как регулятор и активатор нескольких систем, потенциально защищающих организм от генетических повреждений и развития патологии [41].

ARF не является единственным фактором, вызывающим активацию p53 в ответ на индукцию онкогенов. Недавно установлено, что хиноновая оксидоредуктаза Seladin-1, которая также известна как один из ферментов, необходимых для синтеза холестерина [78], может вытеснять p53 из комплекса с белком Mdm2, в ответ на индукцию онкогенов и при окислительном стрессе [79]. Таким образом, существует разветвленная сеть факторов, взаимодействие которых определяет степень убиквитинирования и скорость разрушения белка p53.

Кроме изменений активности систем, регулирующих уровни p53, огромную роль играют модификации в самой молекуле p53, которые как бы меняют характер p53, влияют не только на количество белка, но и на качественные характеристики его активностей. Большое значение имеют ковалентные модификации белковой молекулы p53, выражающиеся в фосфорилировании, ацетилировании, метилировании, а также введении остатков убиквитина и убиквитин-подобных белков SUMO и NEDD8.

Строение белковой молекулы p53 отражает сложность выполняемых ею функций. Дополнительный уровень сложности связан с недавно обнаруженным существованием множественных альтернативно-сплайсированных форм p53 [80], а также укороченной с N-конца формы белка, образующейся за счет внутренней инициации трансляции [81, 82]. Значение этих форм в регуляции активностей p53 еще предстоит установить.

Активная молекула p53 (по крайней мере, функционирующая в качестве транскрипционного фактора) представляет собой тетрамер [83]. Мономер p53 имеет выраженную доменную организацию (рис. 2). В N-концевой области (1–73 а.к.) находится многокомпонентный трансактивационный (ТА) домен и примыкающий к нему (63–97 а.к.) богатый пролином SH3 домен. Центральную треть белковой молекулы (94–312 а.к.) занимает участок, ответственный за узнавание и связывание специфических элементов ДНК. На эту область

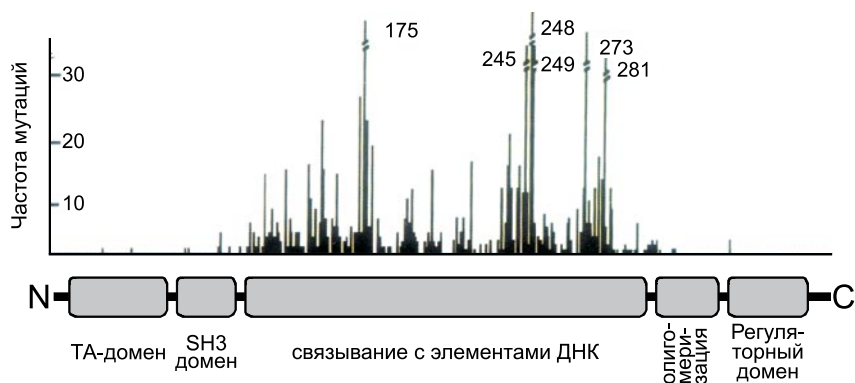


Рис. 2. Основные функциональные домены p53.

На верхней панели приведено распределение по молекуле p53 частот онкогенных мутаций, выявляемых в опухолях человека.

приходится большинство точечных мутаций гена p53. Ближе к C-концу располагается олигомеризационный домен (325–355 а.к.) и неструктурированный щелочной C-концевой домен (360–393), играющий важную роль в регуляции активности белка [84].

Ковалентные модификации белка p53, осуществляемые множеством различных ферментных систем в ответ на разнообразные воздействия меняют функциональный портрет p53, и позволяют ему наиболее адекватно реагировать на возникающие ситуации. Сейчас известно более 20 сайтов в молекуле p53, подвергающихся ковалентным модификациям [85]. Большая часть из них располагается в N- и C-концевых сегментах p53. Модификации в области N-конца p53 (например, фосфорилирование Ser15, Ser20, Thr18) могут препятствовать его связыванию с Mdm2 и другими E3-лигазами, вызывая стабилизацию белка [3]. Кроме того, за счет модификаций p53 происходит модуляция его способности взаимодействовать с ко-активаторами и ко-репрессорами транскрипционного аппарата, а также могут приводить к изменениям предпочтений в связывании с p53-респонсивными элементами тех или иных генов. Разнообразные модификации в C-концевых участках p53 (фосфорилирование, ацетилирование, метилирование, пришивание убиквитин-подобных белков SUMO [86] и NEDD-8 [87]) приводят к нейтрализации ингибирующего действия C-концевого сегмента, к дальнейшей стабилизации p53, как позитивной, так и негативной модуляции его активности и к изменениям его внутриклеточной локализации.

Разнообразные условия меняют также способность p53 вступать во взаимодействие и функционально кооперировать со множеством других белков, хотя не всегда понятно, насколько существенное влияние оказывает то или иное взаимодействие на реализацию его функций, тем более, что это во многом зависит от типа клетки. Множество белков, взаимодействуя с p53, вносят ковалентные модификации в его структуру. К таким белкам относятся более тридцати различных протеинкиназ, несколько протеинфосфатаз, несколько убиквитиновых лигаз и белков, регулирующих взаимодействие p53 с E3 лигазами, деубиквитирующие белки, белки, осуществляющие связывание с SUMO и NEDD8, несколько метилаз, ряд ацетилтрансфераз и деацетилирующих ферментов. Кроме модифицирующих ферментов p53 взаимодействует со множеством других белков, образуя с ними более или менее прочные комплексы. Например, белок семейства пептидил-пролилизомераз Pin1 связывается с p53 после фосфорилирования N-концевой части p53 и изменяет его конформацию, что приводит к определенным изменениям функции p53 [88, 89]. Разнообразные компоненты транскрипционного аппарата взаимодействуют с p53 во время его функционирования в качестве транскрипционного фактора. Ряд белков (HIF1 α , Ref-1, тиоредоксин, Wox1, COX2, NQO1) связываются с p53 в зависимости от его редокс состояния, дифференциально влияя на его функцию [90–95]. p53 связывается с большой группой белков, принимающих участие в репарации ДНК (RAD51, 53BP1, BRCA1/2, BARD1, MDC1, HMG1, BLM, WRN, MRE1, RPA1, ERCC6, SNF5, DNAPol α , mtDNAPol γ), что либо модифицирует функцию репарирующих систем, либо служит способом для передачи от них сигнала к p53. Отдельное место занимает связывание p53 с белками ASPP1 и ASPP2 [96, 97] и их антагонистом iASPP [98], которые регулируют специфичность связывания p53 с регуляторными элементами определенных функциональных групп генов, что приводит к изменениям реакции клеток на индукцию p53 – либо в сторону повышения выживаемости, либо в сторону индукции клеточной смерти [99]. Действуя независимо от своей транскрипционной функции p53 может вызывать апоптоз за счет прямого взаимодействия с белками BAX [100], Bcl-X_L [101], BNIP3L [102] и Scotin [103]. Кроме этого, известно, что p53 может вступать во взаимодействия еще с несколькими десятками белков, хотя функциональное значение многих из этих взаимодействий еще предстоит выяснить.

V. ПЕРЕДАЧА СИГНАЛОВ НА p53

На ранних этапах изучения индукции p53 было установлено, что активность p53 появляется в ответ на повреждения ДНК, а также в ответ на введение в клетки «рваной» ДНК [104–106]. Поэтому, было высказано предположение, что p53 устанавливает запрет на деления клеток с поврежденной ДНК. Однако, при дальнейшем изучении выяснилось, что существует множество альтернативных механизмов индукции p53, как в ответ на различные типы повреждений ДНК, так и при состояниях, непосредственно не влияющих на ДНК, но в конечном итоге способных повлиять на целостность генома. Подобные состояния и воздействия обозначаются как «генотоксические» [44].

Условия для появления генетически-измененных клеток возникают при самых разнообразных сбоях физиологических процессов. Поэтому неудивительно, что постоянно накапливаются конкретные примеры участия p53 в отслеживании самых разных состояний и реакции на них. Мы уже упоминали об индукции активности p53 в результате нарушений баланса пролиферативных сигналов и активации онкогенов. В этом случае один из сигналов передается посредством связанного с пролиферативным состоянием транскрипционного фактора E2F1, который стимулирует транскрипцию белка ARF [107]. В свою очередь, ARF подавляет активность Mdm2, что приводит к накоплению p53. При онкогенной активации происходят столь значительные изменения клеточной физиологии, что на p53 может поступать сразу множество независимых активирующих сигналов. Действительно, изменения морфологии, непривычные для нормальной клетки взаимодействия с внеклеточным матриксом в случае онкогенной активации, нарушения межклеточных контактов, изменения метаболизма, повышение уровня продукции кислородных радикалов, необычная по длительности активация отдельных сигнальных путей, ведущая к дисбалансу внутриклеточных процессов, ускоренное расходование энергетических ресурсов и локальное голодание, вызванное истощением субстрата, истощение компонентов для синтеза нуклеиновых кислот – эти и многие другие процессы по многочисленным путям передают тревожные сигналы на p53 [44, 108].

Описан целый ряд состояний, способных активировать p53. К ним относится истощение запасов нуклеотидов [109], нарушения цитоскелета (нарушения полимеризации актиновых волокон, деполимеризация микротрубочек) [110–112], нарушения биогенеза рибосом [113], состояние гипоксии и ишемии [114], состояние гипероксии [115], отсутствие или избыток некоторых ростовых факторов или цитокинов [116, 117], нарушения клеточной адгезии и

фокальных контактов [118], дефектные интегрины [119], нарушение прикрепления клеток к субстрату (что сопровождается p53-зависимым апоптозом, т.е. гибелью неприкрепленных клеток) [120], появление полиплоидных клеток [32, 121], образование микроядер [122], разрушение хромосомного веретена [112], гипер- и гипотермия [123, 124], действие окиси азота (NO) [125] и, очевидно, многое другое. Все эти состояния вызывают характерные для каждого из них модификации как самого белка p53, так и систем, контролирующих его уровень и активность. В свою очередь, это определяет поведение и судьбу измененной клетки, которая во многом зависит от тканевой принадлежности клеток, поскольку для каждого типа клеток понятие «норма» может сильно различаться.

В настоящее время наиболее изученным является процесс индукции p53 при повреждениях ДНК. В качестве примера механизма индукции p53 можно рассмотреть состояния, вызванные действием двух типов излучения – гамма радиации и ультрафиолета (рис. 3). Если в первом случае происходит более или менее «чистое» повреждение, с образованием разрыва цепи ДНК, то во втором наблюдаются сшивки ДНК, вызванные димерами тимина.

Узнавание разрывов ДНК осуществляется за счет ряда сенсорных белков (гетеротример белков RAD9, RAD1 и Hus1 и белок RAD17), и последующей активации киназы ATM, которая фосфорилирует несколько мишеней [126, 127]. Одной из мишеней является гистон H2AX, фосфорилирование которого в районе повреждения ДНК служит сигналом для привлечения в данный район систем репарации. Кроме этого, киназа ATM фосфорилирует несколько белков, участвующих в активации p53. Прежде всего, киназа ATM может напрямую активировать p53, фосфорилируя его по Ser15 [128]. Среди прочих мишеней киназа ATM фосфорилирует и активирует киназу сверточных точек Chk2 [129], которая, в свою очередь, фосфорилирует p53 по Ser20, вызывая его активацию [130].

Распознавание повреждений, представляющих собой препятствия на пути РНК полимераз включает несколько иные механизмы. К таким повреждениям, помимо последствий УФ-облучения, можно отнести модификации, наблюдаемые под действием противоракового препарата цисплатины. Активность РНК полимеразы II непосредственно сопряжена с системой удаления повреждений – это система репарации, совмещенная с транскрипцией (РСТ) [131]. Сканируя протяженные и наиболее значимые участки генома, РНК полимеразы II являются удобным сенсором для выявления повреждений, блокирующих транскрипцию. Подавление продвижения РНК-полимеразы II

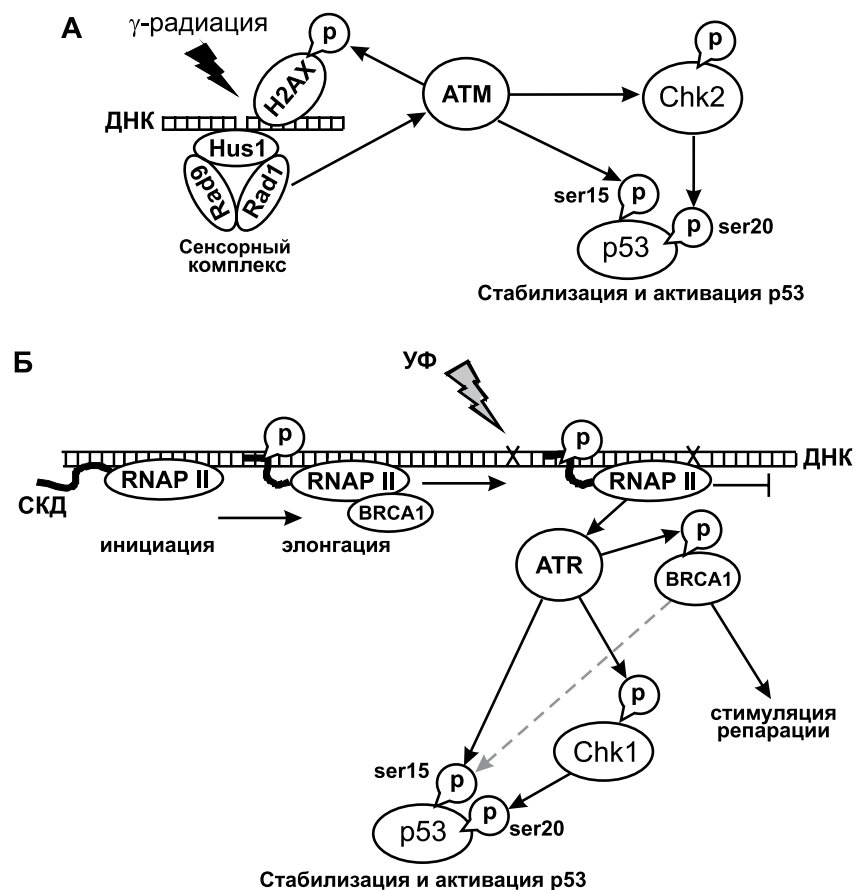


Рис. 3. Схема основных механизмов индукции p53 при действии проникающей радиации (А) и ультрафиолетового излучения (Б).

с помощью ингибиторов транскрипции, на стадии элонгации, при которой С-концевой домен полимеразы полностью фосфорилирован, приводит к активации p53, причем накапливающийся белок p53 фосфорилирован по Ser15 и Lys382 [132]. По-видимому, похожая ситуация складывается и при остановке элонгации под действием препятствий на пути полимеразы, вызванных повреждениями ДНК. В обоих случаях происходит активация киназы ATR, которая близкородственна киназе ATM [133]. Киназа ATR, подобно киназе ATM может фосфорилировать напрямую p53 по Ser15, но кроме этого активирует киназу сверточной точки Chk1, которая, подобно

киназе Chk2, фосфорилирует p53 по Ser20 [134]. Другой механизм распознавания застреваний полимеразы на матрице включает белок BRCA1, который при элонгации ассоциирован с РНК-полимеразой II [135]. При остановке транскрипции происходит фосфорилирование BRCA1 и его удаление из транскрипционного комплекса [136]. BRCA1 вступает во взаимодействия с многими белками, и, по всей видимости, освобождение BRCA1 приводит к привлечению ферментов репарации, а также к возникновению дополнительных сигналов на p53 [137].

Существует также множество других путей, по которым возможна передача сигналов на p53 от систем, узнающих повреждения на ДНК, а также систем, отвечающих за репарацию повреждений. В частности, одним из сенсоров может выступать сам белок p53, поскольку он обладает способностью узнавать и связываться с поврежденными участками ДНК [138–141]. За счет своего С-концевого домена p53 не только может связываться с такими участками, но также выполняет функцию репарационного фермента. Белок p53 обладает активностью 3'-5' экзонуклеазы, и может вырезать поврежденные участки, которые затем могут достраиваться другими ферментами репарации [142]. Существует предположение, что прямое участие p53 в узнавании и репарации повреждений ДНК является его наиболее древней функцией, поскольку эта активность имеется также у эволюционного предшественника p53 беспозвоночных [143]. Вероятно, функция p53 эволюционировала по пути от непосредственного участия в репарации к выработке способности к координации систем контроля генетической стабильности. Это стало возможным после того как p53 приобрел функции транскрипционного фактора.

Связываясь с поврежденными участками ДНК p53 может становиться удобной мишенью для модификаций со стороны ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-ПК), или киназ ATM и ATR, что вызывает его накопление в ядре и способствует наиболее полному проявлению его активностей. В то же время, существуют и другие, колатеральные, связи p53 с системами, обеспечивающими репарацию повреждений, поскольку p53 обладает способностью образовывать межбелковые взаимодействия с рядом репарационных ферментов и факторов репликации ДНК, таких как RPA [144], BLM [145], WRN [146], RAD51 [147], ERCC2/3/6, XRCC9 [148]. Хотя последствия этих взаимодействий еще не выяснены до конца, понятно, что при этом происходит взаимное влияние p53 и указанных факторов друг на друга. Например, p53 способен взаимодействовать с белком Ref-1 [94], который выполняет функцию экзонуклеазы, вырезающей апури-

новые участки ДНК [149, 150]. В свою очередь, белок Ref-1 может модифицировать активность p53 за счет восстановления одного из цистеинов в случае его окисления [151]. Таким образом, эти процессы обеспечивают сопряжение систем репликации и репарации ДНК с p53, как важным координатором клеточных функций, что позволяет последнему «держать руку на пульсе» ключевых процессов воспроизведения клеток.

VI. ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ p53

Несмотря на то, что p53 способен выполнять самые разнообразные функции, участвуя непосредственно и в качестве адапторного белка, и кофактора ряда активных белковых комплексов, и в качестве фермента, наиболее функционально значимой активностью p53 является его способность регулировать транскрипцию генов, выступая в качестве транскрипционного фактора [152, 153]. Роль p53 в транскрипции разнообразна и имеет массу нюансов. Например, связываясь с регуляторными последовательностями в ДНК, p53 может как активировать транскрипцию ряда генов, так и репрессировать ряд других генов. Он может также репрессировать гены без связывания с ДНК, за счет подавления базальной активности транскрипционного аппарата, посредством блокирования базовых транскрипционных факторов СВР, ТВР и Sp1 [154–156].

Специфичность транскрипционной активации генов определяется способностью p53 взаимодействовать с регуляторными участками этих генов. Активный тетрамер p53 способен узнавать и связываться с последовательностями ДНК, состоящими из двух тандемно-расположенных десяти нуклеотидных сегментов, «полусайтов», следующих непосредственно друг за другом, или разделенных несколькими нуклеотидами. Консенсусная структура p53-связывающего элемента состоит из двух пар (полусайтов) расположенных «голова к хвосту» пентамеров, $\text{PuPuPuC}^{\text{A/T}}_{\text{T}}\text{GPyPyPy}-(\text{N}_n)\text{-PuPuPuC}^{\text{A/T}}_{\text{T}}\text{GPyPyPy}$, где Pu – пурины, а Py – пиримидины [157–159]. Допустимы широкие отклонения от консенсусной структуры, при которых в p53-связывающем сайте в одном или обоих полусайтах обнаруживается несколько замен [160]. Вырожденность p53-связывающего элемента обуславливает гетерогенность в отношении эффективности связывания p53, что отчасти объясняет несинхронность и широкий диапазон индукции отдельных p53-регулируемых генов [161, 162]. При этом p53-связывающие элементы могут располагаться не только впереди промоторных участков, но и на значительных расстояниях

от места начала транскрипции, иногда в интронах генов [163]. Некоторые р53-регулируемые гены имеют по два р53-связывающего элемента, разделенных значительными расстояниями. р53 может также узнавать элементы, сильно отличающиеся по структуре от консенсусных последовательностей, причем эти элементы могут вызывать активацию транскрипции не менее эффективно [164, 165]. Закономерности строения таких неканонических элементов пока неясны. Наряду с последовательностями, связывающими р53 и обеспечивающими транскрипционную активацию, описана разновидность элементов, обеспечивающих р53-зависимую транскрипционную репрессию. Такие элементы отличаются от консенсусных тем, что пентамеры в их полусайтах располагаются по типу «голова к хвосту». Связываясь с подобными элементами р53 принимает конформацию, способствующую привлечению комплекса Sin3A с гистоновыми диацетилазами и транскрипционной репрессии соответствующего гена [166, 167].

Белок р53 узнает специфические элементы ДНК и взаимодействует с ними за счет своего центрального ДНК связывающего домена (ДСД). Находясь в виде тетрамера, состоящего из молекул р53, соединенных через олигомеризационный домен недалеко от С-конца, ДСД каждого мономера связывается с пентамерным четвертьсайтом [168]. ДСД р53 образует непосредственный контакт с сегментом ДНК. При заменах практически любой аминокислоты ДСД (а этот домен включает около 100 а.о.) возникают в той или иной степени нарушения связывания с ДНК элементом. Попадание замены на критические участки, координирующие взаимоположение петель белковой цепи, образующих поверхность, контактирующую с ДНК, сопровождается развалом активной конформации р53 и полной потерей его способности к связыванию с элементами ДНК.

Поскольку при заменах практически любой аминокислоты ДСД происходит его инактивация, не удивительно, что мутации гена р53, сопровождающиеся заменой аминокислот (т.н. миссенс мутации) встречаются очень часто, приблизительно в половине всех случаев рака. На сегодняшний день описано около 20000 типов миссенс мутаций р53, которые обеспечивают ту или иную степень подавления его функции и поэтому подвергаются селекции в клетках опухолей [29, 169].

В ранних работах было установлено, что мутантные формы р53 оказывают трансдоминантное (или доминантно-негативное) действие на находящиеся в той же клетке молекулы р53 дикого типа [170, 171]. В то же время, в опухолевых клетках, как правило, мутации одной аллели дополняются делециями второй аллели за

счет утраты части или всей 17 хромосомы [28]. Впоследствии, при наблюдении в эксперименте контролируемых соотношений мутантного и дикого белка было установлено, что в тетрамерных комплексах должно присутствовать не менее трех молекул мутантного белка для того чтобы подавление транскрипционной активности p53 было эффективным [172]. Поскольку в смешанном тетрамерном комплексе, состоящем из дикого и мутантного p53, афинность взаимодействия с ДНК элементом в месте контакта с мутантной субъединицей значительно снижена, ослабляется и общая афинность всего комплекса. Это приводит к функциональным последствиям, поскольку для активации того или иного гена требуется больший уровень p53, а низкоафинные элементы некоторых генов могут вообще перестать активироваться. Поэтому, мутации в одной копии гена p53, очевидно, приводят к некоторому ослаблению контроля генетической стабильности, что повышает вероятность утраты второй копии за счет хромосомной делеции. В результате клетка полностью теряет контроль за сохранностью генома, начинает эволюционировать по законам одноклеточных организмов в сторону максимальной автономии и превращается в раковую.

В основе функциональной гетерогенности p53-связывающих элементов лежат сходные механизмы. Афинность взаимодействия с ДНК каждого мономера тетрамерного комплекса тем ниже, чем значительнее отклонения соответствующего пентамерного четвертьсайта от консенсусной структуры. Это приводит к существенным конформационным напряжениям в белковом тетрамерном комплексе, сидящем на ДНК, что влияет на общую афинность взаимодействия. Как следствие, кинетика индукции генов, имеющих элементы с той или иной степенью отклонения от консенсуса, может существенно варьировать, и поэтому каждый из p53-регулируемых генов реагирует на индивидуальный, присущий только ему диапазон концентраций p53. Это позволяет p53 играть роль искусного дирижера для всего оркестра p53-регулируемых генов, вызывая адекватные состоянию клетки эффекты, складывающиеся из различий в комбинации уровней экспрессии этих генов.

С-концевой домен p53 (СКД) также участвует во взаимодействии p53 с ДНК. Этот неструктурированный домен богат остатками серина и аргинина и является мишенью для всевозможных регуляторных модификаций (фосфорилирование, ацетилирование, метилирование, убиквитинирование, SUMOилирование, NEDDилирование), в результате которых изменяется как время жизни p53, так и его способность активировать транскрипцию. СКД p53 может неспецифически (неза-

висимо от последовательности нуклеотидов) связываться с ДНК, но имеет преимущественное сродство в отношении нелинейных сегментов ДНК, в том числе с поврежденными участками [138–141].

Много ранних работ было посвящено способности СКД подавлять специфическое связывание p53 с ДНК, которое тестировалось *in vitro* по сдвигу электрофоретической подвижности короткого олигонуклеотидного дуплекса, представляющего консенсус p53-связывающего элемента [173]. Согласно ранней модели модификация СКД приводит к снятию запрета на специфическое взаимодействие с p53-элементами и превращению «латентного» p53 в связанную с ДНК транскрипционно-активную форму [174]. Эта модель была опровергнута, поскольку при тестировании на длинных сегментах ДНК, содержащих p53-связывающие элементы, СКД не подавлял взаимодействие p53 с ДНК. Методом хроматиновой иммунопреципитации было установлено, что активация p53, приводящая к модификациям СКД, не влияет на присутствие p53 в области p53-связывающего элемента [175, 176]. По-видимому, прежде чем связаться со специфическим элементом, p53 взаимодействует с соседними участками ДНК через свой СКД, что приводит к конформационным перестройкам и активации центрального ДНК-связывающего домена. Такой активации не происходит при посадке на короткие олигонуклеотидные дуплексы, не имеющие окружающих элементов ДНК. Поэтому для посадки на элементы, расположенные в ДНК генома, очевидно требуется модификация СКД, приводящая к экспонированию центрального ДНК-связывающего домена. Что касается регуляторной функции СКД, то она, по-видимому, играет свою роль в модуляции транскрипционной активности p53, уже находящегося на промоторе, а также в определении времени жизни белка. Не исключено также, что модификации СКД способствуют переключению активности p53 с прямого узнавания и вырезания поврежденных участков ДНК на осуществление транскрипционных функций.

ДНК-связывающая активность p53 может регулироваться также за счет редокс-состояния белка и восстановления его цистеинов. Такую роль, в частности, играет редокс-активный белок Ref-1, функция которого зависит от редокс-состояния клетки. В частности, под влиянием селенометионина редокс-опосредованная активность белка Ref-1 возрастает, в результате чего изменяется спектр p53-модулируемых генов, в пользу генов, участвующих в репарации ДНК [177–181]. ДНК-связывающая активность p53 зависит также от некоторых метаболитов. В присутствии ADP или dADP происходит повышение, а в присутствии ATP и GTP – понижение связывания p53 с ДНК

[182]. Подавление ДНК связывания наблюдается и при повышении уровней TDP и NAD⁺ [183], что указывает на существование прямой связи между скоростью важных метаболических процессов в клетке и активностью p53.

На эффективность взаимодействия p53 с ДНК элементами могут оказывать влияние также продукты генов p63 и p73, которые, являясь членами общего с p53 семейства, способны взаимодействовать с очень похожими по структуре или даже идентичными ДНК элементами. Дополнительный уровень сложности связан с существованием нескольких альтернативных форм продуктов каждого из генов семейства p53. Изоформы отличаются по функциональным свойствам, а связываясь друг с другом в гетероолигомерные комплексы они могут давать многообразные функциональные комбинации [184]. Очевидно, взаимодействие различных изоформ может существенно влиять как на функцию p53, так и на функцию родственных ему генов. Посадка p53 на ДНК элементы генов не обязательно сопровождается транскрипционной активацией, поскольку для активации могут требоваться дополнительные стимулы, приводящие к снятию репрессорного действия белков таких как Mdm2 и MdmX. Поэтому ДНК элемент, уже занятый каким-либо вариантом белка семейства p53 будет закрыт для влияний со стороны других изоформ. Этим могут, отчасти, объясняться тканеспецифические различия в p53-зависимых эффектах, так как уровень экспрессии изоформ белков p63 и p73 может существенно варьировать.

Присутствие мутантного p53 в клетках опухолей приводит к модификациям активности p73 и p63, что выражается в проявлении так называемых новоприобретенных функций мутантного p53 [185–191]. Эти функции направлены на дальнейшее повышение злокачественности клеток и на приобретение устойчивости к противораковой терапии [192, 193].

Активация транскрипции на промоторах, регулируемых p53, осуществляется за счет N-концевой области p53, содержащей несколько участков, взаимодействующих с транскрипционной машиной или привлекающей факторы, модифицирующие локальную структуру хроматина. Вблизи N-конца p53 встречается большое число спаренных остатков аспартата и глутамата, что характерно для «кислых» активаторных доменов белков, взаимодействующих с компонентами транскрипционной машины [194]. Трансактиваторный (ТА) домен p53 слабо структурирован [195, 196], но образует короткие α -спиральные участки [197], взаимное расположение которых служит каркасом для посадки ряда белков. Введение единичных

мутаций в область ТА домена обычно не приводит к существенным изменениям активности, что согласуется с редкостью мутаций данной области в опухолях человека. Однако, введение парных мутаций позволило выявить два критических участка – замена двух гидрофобных аминокислот Leu22 и Trp23 значительно подавляет трансактиваторные свойства [198], в то время как мутации Trp53 и Phe54 приводят к избирательному подавлению активации некоторых проапоптозных генов-мишеней p53 [199]. В настоящее время ТА домен разделяют на два относительно независимых участка между 1–42 и 43–73 аминокислотными остатками [200], хотя во взаимодействии с компонентами транскрипционного аппарата участвуют и другие сегменты молекулы p53. Участок между 63 и 97 остатками отвечает за взаимодействие с пептидил пролил-изомеразой Pin1, осуществляющей конформационную перестройку ТА домена после активирующего фосфорилирования [88, 89], а также с ним связывается ко-активатор транскрипции белок СВР/p300 [201]. Примыкает к ТА домену недавно выявленный репрессорный домен (между 100 и 116 остатками), механизм активности которого пока мало понятен [202].

Детали механизма транскрипционной активации с участием p53 остаются не полностью раскрытыми, хотя существуют многочисленные данные в пользу модели, согласно которой связывание p53 со специфическим участком ДНК соответствующего гена сопровождается привлечением в это место факторов, модифицирующих структуру хроматина. Это приводит к «раскрытию» промотора гена для взаимодействия с «транскрипционной машиной» [203–205]. К числу таких факторов относятся взаимодействующие с p53 гистоновые ацетилтрансферазы и метилтрансферазы. Они модифицируют не только участок хроматина, но и сам p53, регулируя тем самым его активность [206–210]. Кроме хроматиновых эффектов p53 участвует в активации транскрипции путем прямого взаимодействия и локального привлечения базальных транскрипционных факторов, таких как TFIIA и TFIID [194, 211]. Не исключается также роль p53 в альтернативной схеме регуляции транскрипции, которая заключается в стимулировании реинициации, то есть возобновлению удлинения короткого инициаторного транскрипта, элонгация которого, при отсутствии стимулов, замораживается вскоре после начала транскрипции [212].

Регуляторные участки генов имеют сложное устройство и контролируют транскрипцию нижележащих участков за счет взаимодействия со многими факторами. Транскрипционные факторы функционально, а иногда и физически взаимодействуют друг с другом и поэтому конеч-

ный эффект их взаимодействия трудно просчитывается. Способность p53 активировать или репрессировать те или иные гены определяется не только наличием p53-связывающего ДНК элемента, но и тем, какие еще факторы контролируют работу данного гена.

По биоинформатическим расчетам в геноме человека присутствует не менее 4000 генов, содержащих p53-связывающие элементы [213], хотя по экспериментальным оценкам, основанным на данных хроматиновой иммунопреципитации, число p53-регулируемых генов находится в пределах 500–1600 [214, 215]. Примечательно, что лишь половина генов, содержащих p53-респонсивные элементы ДНК и связывающих p53 (по данным хроматиновой иммунопреципитации) увеличивают транскрипцию при активации p53 – другая половина реагирует на p53 понижением транскрипции [215].

Неоднозначность ответа на p53 может объясняться взаимовлияниями различных транскрипционных факторов. При действии физиологических и патологических стимулов обычно индуцируется сразу несколько сигнальных путей, и, соответственно, задействуется множество транскрипционных факторов. Поэтому, при воздействиях на клетку факторов, вызывающих индукцию p53, ответ клетки в виде изменения транскрипции генов значительно отличается от результатов, получаемых в опытах по «чистой» гиперэкспрессии рекомбинантного p53. Например, в ответ на ограниченную доступность питательных веществ, за счет взаимодействия транскрипционного фактора FoxO3a с p53 происходит переключение p53-зависимой репрессии гена SIRT1 на его активацию [216]. Показательно также взаимодействие фактора NFκB и p53. Известно, что транскрипционный фактор NFκB влияет на регуляцию апоптоза по нескольким механизмам, причем обычно он оказывает анти-апоптотное действие. В некоторых системах NFκB подавляет и p53-зависимый апоптоз. Но, парадоксальным образом, активность NFκB оказывается необходимой для полноценной индукции клеточной смерти под действием p53 [217, 218]. По-видимому, NFκB кооперирует с p53 регулируя некоторые гены, необходимые для индукции апоптоза, в частности, рецептор клеточной смерти KILLER/DR5 [219]. Кооперация p53 с фактором Miz нужна для эффективной индукции гена CDKN1A (p21) [220], а p53-зависимая активация гена *BBC3* (PUMA) подавляется при одновременном действии SLUG, что приводит к защите предшественников гематопоетических клеток от p53-зависимого апоптоза [221]. Модификация активности p53 за счет связывания с KLF5 сопровождается снятием p53-зависимой репрессии гена, кодирующего ингибитор апоптоза Survivin [222]. Функционально противоположный эффект оказывают факторы YB1

и MUC1, которые избирательно подавляют способность p53 индуцировать некоторые про-апоптотические гены [223, 224].

Избирательно регулирует баланс между p53 регулируемые гены, оказывающими апоптотическое действие и генами, способствующими выживаемости клеток также модуль белков ASPP1/ASPP2/iASPP. Первые два белка могут связываться с p53 на границе между ТА и ДНК-связывающим доменами и изменять специфичность посадки p53 на ДНК-связывающие элементы, усиливая экспрессию про-апоптотических генов [96], в то время как iASPP, являясь антагонистом ASPP1 и ASPP2, блокирует их про-апоптотическую активность. Связывание ASPP белков приводит к конформационным изменениям p53, изменяющим его специфичность в отношении p53-респонсивных элементов [97].

Сходные структурные превращения происходят и при фосфорилировании Ser46, находящегося в области второго ТА домена p53. Фосфорилирование Ser46 осуществляется протеинкиназой С дельта (PKCdelta) [225], связыванию которой с p53 способствует продукт p53-регулируемого гена p53DINP1 [226]. В то же время, другой p53-регулируемый ген, кодирующий протеинфосфатазу PPM1D/Wip1 действует в противоположном направлении, препятствуя фосфорилированию Ser46 [227]. Фосфорилирование Ser46 способствует взаимодействию ТА домена p53 с субъединицей транскрипционного фактора TFIIH, p62/Tfb1 [228], а это приводит к изменению спектра индуцируемых генов, в пользу про-апоптотических генов [229] при одновременном снятии p53-зависимой репрессии с синтеза анти-апоптотических факторов, например белка galektin-3 [230]. Таким образом, регуляция транскрипционной активности p53 включает множество компонентов и механизмов, что позволяет клеткам дифференциально реагировать на всевозможные ситуации, обеспечивая принятие оптимальных решений.

VII. p53-РЕГУЛИРУЕМЫЕ ГЕНЫ

Большая часть функций белка p53 осуществляется за счет его транскрипционной активности. Поэтому, значительные усилия были направлены на идентификацию генов, транскрипция которых регулируется p53. Выявление таких генов проводилось как путем обнаружения потенциальных p53 связывающих элементов в ДНК, так и по факту изменений экспрессии генов в ответ на активацию или подавление p53. Важную роль в выявлении p53-регулируемых генов сыграл метод серийного анализа экспрессии генов (SAGE)

[231, 232], а также применение гибридизации с микропанелями проб, специфичных на транскрипты генов человека [233].

Среди первых идентифицированных p53-активируемых продуктов генов были два негативных регулятора клеточных делений – белок Gadd45 [163] и ингибитор циклин-зависимых киназ белок p21 [234]. Вскоре появились сообщения об обнаружении p53-регулируемых генов, участвующих в запуске апоптоза [235, 236]. Все это хорошо согласовалось с наблюдениями, согласно которым индукция p53 сопровождается задержкой в сверхочных точках клеточного цикла, а в некоторых системах – индукцией клеточной смерти. Последующие наблюдения значительно дополнили список p53-регулируемых генов, что существенно расширило представление о масштабе участия p53 в контроле внутриклеточных процессов. Ниже мы коротко перечислим группы p53-регулируемых генов, объединенных общей функциональной направленностью их действия.

ГЕНЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В КОНТРОЛЕ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

Задержка клеток в фазе G1 важна для поддержания целостности генома, поскольку она предотвращает репликацию поврежденной ДНК. Важную роль в задержке клеток в фазе G1 играет p53-регулируемый белок p21, который блокирует активность CDK2 и CDK4, тем самым предотвращая фосфорилирование pRB, запуск транскрипции таких генов, как *Cyclin K*, *hCDC4*, *p53RFP*, а также комплекса генов, ответственных за синтез ДНК [233]. Задержке клеток в фазе G1 способствуют также p53-индуцируемые гены *BTG2* (подавляет циклин E1) [237], и *MCG10* [238]. Белок p53 может вызвать задержку также во время фазы синтеза ДНК, за что, по-видимому, отвечает одна из его альтернативных изоформ [239], участвующая в индукции белка 14-3-3σ и p21 [240]. Повреждения и сбои в S-фазе вызывают ATR-зависимую индукцию киназы Chk1, которая модифицирует p53. Однако, функция полноразмерного p53 в S-фазе в основном заключается не в задержке клеточного цикла, а в стимуляции репарации ДНК [241]. Задержка в фазе G2/M важна для предотвращения сегрегации поврежденных и недореплицированных хромосом. Остановка в этой точке происходит за счет подавления активности комплекса Cdc2-циклин B, чему способствует сразу несколько p53-индуцируемых генов – *GADD45*, *BTG2*, *B99 (GTSE-1)*, *REPRIMO*, *HZF* и *MCG10* [241, 242].

ГЕНЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ПРОЦЕССАХ РЕПАРАЦИИ ДНК

Среди мишеней p53 – гены, кодирующие компоненты системы глобальной геномной репарации (ГГР) – *DDB2 (XPE)* [243] и *XPC*

[244]. Поэтому, в клетках с дефектами p53 происходит переключение эксизионной репарации нуклеотидов с ГГР на репарацию, совмещенную с транскрипцией (PCT) [241]. p53-индуцируемыми являются также факторы репарации неспаренных нуклеотидов *MSH2*, *PCNA*, *MLH1* и *PMS2* [245–248]. Интересно, что при существенных повреждениях, вызывающих значительное повышение уровня p53, за счет нарабатываемого белка PMS2 происходит стимуляция про-апоптозной функции p73, что указывает на роль этого белка в качестве дозиметра повреждений [241]. Белок p53 индуцирует ДНК полимеразу η [249], что способствует репарации повреждений вблизи репликационной вилки. Участвует он также и в подавлении процессов, осуществляемых с использованием гомологичной рекомбинации – не только за счет прямого связывания и модификации активности таких факторов как RPA, RAD51, WRN и BLM, но и путем репрессии транскрипции генов *RAD51*, *WRN* и *RecQ4* [250–252]. Наконец, p53 индуцирует ген *p53R2*, структурный гомолог рибонуклеотид редуктазы, что важно для поддержания запасов нуклеотидных предшественников при репарации ДНК [253].

ГЕНЫ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ АНГИОГЕНЕЗ И ДРУГИЕ ТКАНЕВЫЕ РЕАКЦИИ

Эти гены играют важную роль в сдерживании роста опухоли и предотвращения ситуаций, способствующих выживанию и распространению измененных клеток. Сюда относятся такие p53-регулируемые гены как ингибиторы ангиогенеза тромбоспондин (*TSP-1*) [254], *GD-AIF* [255], *BAlI* [256], ингибиторы инвазии и метастазирования *KAlI* [257], коллагеназы *MMP2* [258], *MASPIN* [259], ингибитор активатора плазминогена *PAI-1* [260], а также несколько секретлируемых факторов, действие которых на соседние клетки сопровождается угнетением их пролиферации [261].

ГЕНЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ИНДУКЦИИ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ

Пожалуй, это самая многочисленная из известных групп p53-индуцируемых генов. Существует несколько альтернативных путей индукции клеточной смерти, и практически на каждом ключевом этапе определенную роль играют p53-регулируемые гены. Апоптоз представляет собой форму программированной клеточной смерти, осуществляемой через действие цистеиновых протеиназ каспаз. Эффекторные каспазы 2, 3, 7 осуществляют основной демонтаж клеточных структур. Они активируются под действием инициаторных каспаз 8 и 9. Запуск инициаторных каспаз осуществляется по

двум принципиальным механизмам. Один из них обуславливает активацию «рецепторов смерти», реагирующих с определенными внеклеточными лигандами, что сопровождается сборкой протеазных комплексов, активирующих инициаторную каспазу 8 (так называемый внешний путь индукции). Второй – митохондриальный путь, когда стимулом служит освобожденный из митохондрий цитохром С, который активирует белок Araf1, осуществляющий активирующий протеолиз инициаторной каспазы 9 [262]. Регуляция проницаемости митохондриальной мембраны осуществляется за счет баланса взаимодействующих белков семейства Bcl2, среди которых одни действуют в сторону понижения проницаемости митохондриальной мембраны (анти-апоптозные белки), а другие, про-апоптозные белки, наоборот, стимулируют выброс цитохром С. Белок p53 влияет как на внешний, так и на митохондриальный пути индукции апоптоза [263–265]. Действуя на митохондриальный путь, p53 репрессирует транскрипцию анти-апоптозного белка Bcl2 и активирует транскрипцию про-апоптозных белков Bax [266], Noxa [267], p53AIP1 [229] и Puma [236, 268]. Кроме того, p53 активирует транскрипцию гена *APAF1* [269–271], повышает чувствительность клеток к внешним про-апоптозным лигандам, стимулируя транскрипцию генов *FAS (APO1)* [272] и *KILLER/DR5* [273]. Белок p53 индуцирует также множество других белков, связанных с индукцией апоптоза. К ним относятся Perp [274], Pidd [275], Wip1 [276], Scotin [103], GML, STAG1, p53CABC1, p53RDL1 [233] и другие. Существует также значительная группа p53-индуцируемых генов, функция которых связана с изменением редокс баланса клетки. К ним относятся, гены *PIG3*, *PIG8* [277], *FDXR* [278] и некоторые другие. Согласно одной из моделей [277], резкое повышение уровня внутриклеточных кислородных радикалов, происходящее при индукции данной группы генов может способствовать ускорению клеточной смерти. Недавно появились сообщения о принципиально новой стратегии p53 в отношении индукции клеточной смерти, которая включает транскрипционную активацию гена, кодирующего микроРНК. МикроРНК представляют собой короткие шпильчатые нетранслируемые РНК, которые взаимодействуют с определенными мРНК, к которым они имеют сродство, вызывая подавление их функции [279]. Активируемая p53 микроРНК miR34 также способна влиять на экспрессию ряда генов, хотя точные мишени ее пока неясны. Само по себе введение конструкций, экспрессирующих miR34 вызывает остановку делений и апоптоз. Таким образом, повышая экспрессию miR34 p53 влияет на целый спектр генов, оказывающих супрессорный эффект [280–283]

АНТИОКСИДАНТНЫЕ ГЕНЫ

Наряду с p53-индуцируемыми генами, проявление которых сопровождается повышением уровня кислородных радикалов, p53 повышает экспрессию также ряда антиоксидантных белков, таких как глутатион-пероксидазы Gpx1 [284] и Gpx2 [285], супероксид-дисмутаза Sod2 [284], альдегид дегидрогеназа 4 Aldh4A1 [286], а также двух представителей семейства сестринов, RA26 [287] и Hi95 [288]. Сестрины принимают участие в регенерации перекисленных пероксиредоксинов [289] – пероксидаз, которые удаляют избыток H₂O₂. Перекись водорода не только является побочным и нежелательным продуктом митохондриального дыхания, но и служит важной сигнальной молекулой. Выработка H₂O₂ может осуществляться NADPH-зависимыми оксидазами в ответ на взаимодействие лигандов с мембранными рецепторами, что требуется для модификации ряда компонентов сигнальных путей [290]. Таким образом, образование H₂O₂ является физиологическим процессом, необходимым для проведения внутриклеточных сигналов. Сестрины осуществляют контроль активности пероксиредоксинов, тем самым, обеспечивая защиту генома от окисления и приобретения вредных мутаций. Подавление экспрессии p53 методом РНК интерференции, а также избирательное подавление сестринов приводит к значительному усилению окисления ДНК и повышению мутагенеза [291]. По-видимому, вне стрессов p53 осуществляет важную антиоксидантную функцию, которая обеспечивает поддержание низкого уровня кислородных радикалов внутри клетки. Интересно, что добавление в диету p53-нокаутных мышей антиоксидантов приводит к снижению уровня кислородных радикалов и предотвращает развитие ранних лимфом [291]. В то же время, в процессе трансформации под действием онкогена Ras наблюдается значительное повышение уровня кислородных радикалов, что, в частности, связано с подавлением активности сестринов. Это повышение приводит к индукции p53, что сопровождается апоптозом или необратимой задержкой клеточного деления. В случае поломок p53-зависимых механизмов ограничение роста клеток, экспрессирующих онкоген Ras, не происходит, а увеличенный уровень кислородных радикалов ускоряет мутагенез, приводя к дальнейшему развитию опухолевого процесса [292]. Таким образом, антиоксидантная активность p53 является важной составляющей его функции, направленной на предотвращение развития опухолей.

ГЕНЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА МЕТАБОЛИЗМ

В начале 30-х годов Варбург установил, что раковые клетки преимущественно используют гликолиз даже в аэробных условиях [293]. Это явление («эффект Варбурга») долгое время оставалось без объяснений. Недавно было установлено, что, по-видимому, основную роль в эффекте Варбурга играет способность p53 индуцировать транскрипцию гена SCO2, который кодирует фактор, необходимый для сборки митохондриального респираторного комплекса COXII [294]. Мыши с делециями гена p53 обладают значительно меньшей выносливостью к физическим нагрузкам, что объясняется недостаточностью процессов аэробного дыхания. Другой p53-регулируемый ген *TIGAR* оказался важным регулятором гликолитического пути. Этот ген кодирует белок, гомологичный фосфофруктокиназе, ферменту гликолиза, осуществляющему превращение глюкозо-6-фосфата в фруктозо-2,6-бифосфат [295]. Данная реакция обратима, поскольку фосфофруктокиназа имеет бифосфатазный домен, осуществляющий превращение фруктозо-2,6-бифосфата в фруктозо-6-фосфат, который затем изомеризуется в глюкозо-6-фосфат. Продукт гена *TIGAR* гомологичен лишь бифосфатазному домену фосфофруктокиназы, и поэтому он способен блокировать гликолиз на стадии глюкозо-6-фосфата, тем самым активируя обходной пентозо-фосфатный путь. Отсутствие активности p53 приводит к усилению гликолиза и ослаблению реакций пентозофосфатного пути, являющегося важным источником синтеза NADPH. Поэтому, одним из следствий недостаточности p53 может быть снижение уровня NADPH и повышение уровня внутриклеточных кислородных радикалов, при одновременном усилении гликолиза и ослаблении аэробного метаболизма [296].

VIII. МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ p53

Белок p53 способен не только активировать гены, участвующие в индукции клеточной смерти за счет своей транскрипционной функции, но и принимает непосредственное участие в индукции митохондриального пути клеточной смерти [297–301]. После активации p53 под действием всевозможных стрессов часть p53 поступает в митохондрии, где он вступает во взаимодействие с анти- и про-апоптозными белками Bcl-семейства (BclXL/Bcl2 и Bak, соответственно). Эти взаимодействия приводят к нарушению проницаемости наружной митохондриальной мембраны, утечке цитохрома C и индукции апоптоза. Поступление p53 в митохондрии регулируется за счет убиквитинирования: его полиубиквитинированные формы поступают в 26S протеасомы,

где подвергаются разрушению, а моноубиквитинированные – идут в митохондрии [302]. В митохондрии p53 поступает из цитоплазмы, минуя входение в ядро. Под влиянием стрессов стабилизированный p53 поступает либо в ядро, где участвует в транскрипционной регуляции, либо сразу в митохондрии. Белок Mdm2 сам по себе не участвует в транспорте p53 в митохондрии, но его фоновая активность обеспечивает моноубиквитинирование, необходимое для транслокации в митохондрии. Возможно также участие других E3 лигаз в моноубиквитинировании p53.

В митохондриях p53 подвергается быстрому ферментативному деубиквитинированию под действием митохондриального HAUSP и превращению в активную форму. p53 вступает во взаимодействие с ВН4 доменом анти-апоптозных белков BclXL и Bcl2, причем взаимодействующий участок p53 соответствует ДНК-связывающему домену [101]. Этим объясняется тот парадоксальный факт, что онкогенные мутации p53 инактивируют одновременно и транскрипционную и митохондриальную функции p53 [300]. Связывание с анти-апоптозными белками высвобождает и активирует про-апоптозные белки Bax и Bid. Активация белка Bax под действием цитоплазматического p53 происходит за счет перестройки конформации и олигомеризации, что способствует перемещению цитозольного Bax в митохондрии [100, 303]. Кроме того, связываясь в митохондриях с белком Bak белок p53 непосредственно стимулирует его олигомеризацию и активацию [297, 298, 300], а также вытесняет его из комплекса с анти-апоптозным белком Mcl-1 [298]. Все эти взаимодействия вызывают выброс цитохрома C и индукцию апоптоза даже без транскрипционной активации про-апоптозных генов-мишеней p53. Интересно, что полиморфный вариант p53 Arg72 обладает значительно большей способностью к митохондриальной транслокации по сравнению с Pro72 p53, и это коррелирует с различиями их про-апоптозной активности [304].

Прямая индукция апоптоза под действием p53, по-видимому, является первой и очень быстрой реакцией на массивные повреждения. Например, при облучении радиочувствительных тканей (тимус или селезенка) транслокация p53 в митохондрии и активация эффекторной каспазы 3 проявляются очень быстро (уже через 30 минут), то есть задолго до наработки достаточного количества продуктов p53-регулируемых генов. Вторая волна индукции апоптоза отмечается только через 6–7 часов, и она связана с транскрипционной активностью p53 в ядре [297]. Присутствие p53 в цитоплазме sensibilзирует клетки к продуктам p53-регулируемых генов PUMA и

NOXA. Белок Puma очень эффективно вытесняет p53 из комплекса с VclXL, и освободившийся p53 активирует про-апоптозную функцию белка Вах. Кроме того, более активный белок Puma вытесняет из комплексов с VclXL менее активные про-апоптозные белки Bim и Bid, что повышает эффективность индукции апоптоза [303, 305, 306]. Таким образом, действуя сразу на нескольких уровнях и путем использования совершенно разных механизмов, p53 осуществляет как быстрые реакции на сильные стрессы, так и реализует замедленную, но очень эффективную программу апоптоза поврежденных клеток.

IX. РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПЕТЛИ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ АКТИВНОСТЬ p53

Активность p53 регулируется разнообразными и многочисленными сигналами. Можно смело утверждать, что в определении судьбы клетки p53 играет роль верховного судьи, который тщательно оценивает всю полноту поступающей информации о состоянии клетки и ее соответствие правилам поведения данной клетки в организме при конкретных обстоятельствах, и в соответствии с этой информацией принимает адекватные меры к исправлению наметившихся отклонений или к удалению безнадежных клеток из организма. Для того чтобы играть такую сложную роль p53 функционально взаимодействует с многочисленными сигнальными путями клетки и вступает в отношения взаимной регуляции со многими из компонентов этих путей. В настоящее время выявлено по меньшей мере десять регуляторных модулей, в которых активность p53 регулируется либо в сторону усиления, либо в сторону подавления клеточных процессов [307]. Надо, однако, иметь в виду, что выделение этих регуляторных модулей из единой регуляторной системы является весьма искусственным и условным.

В качестве примера можно привести фрагмент регуляторного модуля с участием белков p53, Mdm2 и ARF. Белок ARF связывается с Mdm2 и предотвращает убиквитинирование и разрушение p53, что приводит к повышению уровня p53 [308]. Транскрипция гена ARF активируется факторами E2F1 [309] и β -катенином [310] и репрессирована самим p53. В то же время, экспрессия ARF повышается под действием онкогенов Ras и Muc [76]. Белок ARF может также регулировать активность Muc [311]. Располагаясь в ядрышках белок ARF влияет на процессинг рРНК и созревание рибосомных субъединиц [312]. В свою очередь, Mdm2 в ядрышке связывается с рибосомными белками L5, L11, L23, что сопровождается снижением его

убиквитинлигазной активности [55]. Белок pRB может образовывать комплекс и с p53, и с Mdm2, что приводит к активации p53 и усилению апоптоза [313]. Повышенный уровень свободного, не связанного с pRB фактора E2F1 переключает активность p53 на апоптоз. Белок pRB, как и белок Mdm2 подавляется подавляются за счет фосфорилирования киназой Cdc2/cyclin E. Белок p53 способствует синтезу p21, который подавляет Cdc2/cyclin E, что сказывается на комплексе pRB/Mdm2, и это способствует p53-зависимому апоптозу. Повреждения ДНК приводят к АТМ-зависимому фосфорилированию p53 и Mdm2, что повышает активность p53 и сопровождается апоптозом, также как это происходит при образовании комплекса p53-Mdm2-pRB [314].

Прямые и обратные регуляторные связи с участием p53 можно перечислять бесконечно, поскольку каждый из компонентов взаимодействий в свою очередь связан с множеством других элементов сигнальных путей. Следует также иметь в виду, что регуляторные взаимодействия индивидуальны для каждого типа клеток, так как настроенность сигнальных путей, а также уровень и активность отдельных регуляторных белков в разных клетках могут кардинально отличаться.

Х. p53 РАБОТАЕТ В ЛЮБЫХ УСЛОВИЯХ

До недавнего времени считалось, что активность p53 характерна для клеток, находящихся в состоянии стресса, или имеющих серьезные повреждения. Представлялось, что функция p53 складывается в основном из мер пресечения в отношении клеток, поведение которых создает угрозу возникновения и закрепления мутаций. Открытие новых функций p53, направленных на стимуляцию процессов репарации ДНК, регуляцию гликолитического и аэробного метаболизма, регуляцию уровней основных метаболитов, а также уровней кислородных радикалов указывает на то, что роль p53 в контроле над процессами в клетке практически безгранична. Функция p53 заключается в обеспечении оптимальной сбалансированности всех процессов во всех тканях и при любых условиях. Белок p53 призван вмешиваться в течение событий в случаях отклонений от оптимума. Можно предположить, что активность p53 полностью отсутствует только в состоянии полного покоя. Но такого состояния в организме практически не бывает, поэтому даже временная несбалансированность процессов, вызванная физиологическими нагрузками, может индуцировать те или иные изменения уровня p53.

Можно условно выделить два качественно различающихся режима функционирования p53. В пределах физиологически-допустимых отклонений, при умеренных стрессах, физиологических нагрузках, нарушениях диеты, незначительных воспалительных процессах и т. п. активность p53 при его сравнительно низком, базовом, уровне направлена на обеспечение гомеостаза, поддержание адекватного уровня репарации, мобилизацию оптимальных источников энергетических ресурсов, переключение процессов биосинтеза, обеспечение защиты генома от мутагенных воздействий со стороны избытка кислородных радикалов. При превышении физиологически допустимого уровня повреждений задачей p53 становится избавление от генетически опасных дефектных клеток, что достигается либо путем активации апоптоза, либо за счет терминального выхода клеток из процесса деления, что является формой генетической смерти.

Последствия недостаточности или отсутствия базовой активности p53 проявляются при изучении поведения клеток или трансгенных животных после искусственного выключения p53 и при содержании их в условиях, максимально исключающих стрессы. Даже в таких условиях существенно повышается уровень внутриклеточных кислородных радикалов, что сопровождается увеличением окисления ДНК, повышением уровня мутаций, хромосомной нестабильностью [291]. Это происходит из-за отсутствия p53-зависимой настройки систем антиоксидантной защиты в сторону адекватного и оперативного удаления перекисных соединений, образующихся в клетках даже при физиологическом режиме функционирования сигнальных путей. При физиологических нагрузках у дефектных по p53 животных проявляется недостаточность контроля за переключением метаболизма, слабость реакций аэробного пути и преобладание гликолиза, что, в частности, выражается в понижении выносливости мутантных мышей в тесте на плавание [294].

К базовой активности p53 относится и его способность к адаптивному переключению метаболизма глюкозы, путем его влияния на активность регуляторного модуля IGF-1-Akt-mTOR [315, 316]. Этот модуль реагирует на степень доступности глюкозы и определяет оптимальный путь энергетического метаболизма. Сенсорным компонентом модуля является AMP-зависимая протеинкиназа AMPK, которая активируется в ответ на понижение соотношения АТФ/АМР. AMPK фосфорилирует и активирует GTPазу TSC2 [317], которая в комплексе с TSC1 подавляет активность G-белка RHEB, служащего активатором киназы mTOR [318]. В результате понижение уровня глюкозы вызывает выключение киназы mTOR, что способствует

активации процесса аутофагии – поедания клеткой части цитоплазмы изнутри. Аутофагия проявляется образованием внутри клетки зон, окруженных мембраной, которые затем сливаются с лизосомами и перевариваются, снабжая клетку освободившимися питательными веществами [319]. mTOR киназа фосфорилирует белок 4EBP1, который подавляет фактор инициации трансляции 4E [320], а также фосфорилирует и активирует киназу S6, которая участвует в биогенезе рибосом и регулирует доставку и потребление кислорода [321]. Таким образом, активная киназа mTOR способствует эффективной трансляции и потреблению энергии при избытке глюкозы. Подавление mTOR ведет к преобладанию катаболизма и энергосбережению. Эти процессы регулируются инсулиноподобным фактором роста, гормоном IGF-1 и киназой Akt. Гормон IGF-1 активирует Akt-1 киназу, которая подавляет транскрипционные факторы семейства FOXO, меняя пропорции экспрессии многих генов, участвующих в метаболизме и антиоксидантной защите [316, 322]. Akt-1 также подавляет активность ГТФазы TSC2, что приводит к активации киназы mTOR [323]. Белок p53 транскрипционно регулирует сразу несколько ключевых компонентов этого регуляторного модуля, активируя две субъединицы AMPK, протеинфосфатазу PTEN, ГТФазу TSC2 и ингибитор IGF1 белок IGF-1R [315].

Таким образом, при активации p53 происходит подавление активности mTOR, что ведет к преобладанию процессов катаболизма, сбережению энергии, большей активности FOXO, усилению процессов аутофагии, снижению уровня внутриклеточных кислородных радикалов. Одновременно с подавлением модуля IGF1-mTOR белок p53 активирует энергетически более выгодные процессы аэробного метаболизма. Таким образом, физиологически-допустимые отклонения вызывают мягкую p53-зависимую коррекцию метаболизма, переход к более экономному расходованию энергоресурсов и понижению уровня кислородных радикалов.

Последствия недостаточности стрессовой активации p53, при более серьезных стрессах, существенных повреждениях или перманентной активации онкогенов гораздо более выражены. В этом случае в организме происходит накопление генетически измененных клеток, которые начинают конкурировать друг с другом, вызывая отбор наиболее быстро растущих и неприспособленных к внешним условиям клеток. Это неминуемо приводит к развитию опухоли. Не совсем понятным остается значение того или иного пути активации p53 в предотвращении рака. Если на одних моделях противоопухолевая функция p53 проявлялась преимущественно за счет активности ARF,

а индукция p53, основанная на распознавании повреждений ДНК, практически не играла существенной роли [324, 325], то на других моделях было установлено, что стрессы, сопровождающиеся повреждениями ДНК все же могут быть важными для активации p53 и супрессии опухолеобразования, даже при неактивном пути индукции белка p53 через активацию белка ARF [326, 327]. Это противоречие очевидно связано с различиями клеточных моделей, что подчеркивает многовариантность p53-зависимых механизмов.

XI. p53 И СТАРЕНИЕ

Будучи центром контроля правильности выполнения генетических программ, p53 неминуемо должен иметь отношения и к процессам старения организма. Старение следует отличать от сопутствующих позднему возрасту болезней. До сих пор неясно, является ли процесс старения организма непосредственно запрограммированным процессом, или он ускоряется после прекращения действия программ регенерации и репарации организма по достижении определенного возраста. Существенные различия продолжительности жизни организмов разных видов указывают на существование ее генетической предопределенности. В то же время, известны значительные отклонения в продолжительности жизни организмов в пределах одного вида, причем имеются веские аргументы в пользу наследуемости признака долголетия. Поэтому наследственность можно рассматривать как первый из факторов, определяющих продолжительность жизни [328]. Вторым фактором, безусловно, является образ жизни, поскольку существует множество указаний влияния образа жизни на ее продолжительность [329].

Наиболее обоснованным и достоверным представляется вывод о роли ограничения калорийности питания в увеличении продолжительности жизни [330]. Эволюционный смысл этого явления хорошо понятен – в условиях ограниченности пищевых ресурсов для сохранения вида требуется дожить до лучших времен. Наоборот, при избытке калорий интенсивная, со значительными энергетическими нагрузками, активным размножением, жизнь, полная стрессов и потрясений, как правило, бывает короче [331, 332].

Достаточно аргументированным является также представление о роли окислительных процессов в развитии процессов старения. Организм обладает мощными антиоксидантными системами, эффективно защищающими компоненты клеток от окисления и обеспе-

чивающие быструю репарацию возникающих повреждений, однако эти механизмы со временем исчерпывают свой ресурс и ослабевают.

Существующие в настоящее время представления о роли p53 в старении весьма противоречивы. Генетические манипуляции с геном p53 на мышах дают весьма неоднозначные результаты. Изучение старения на модели мышей, лишенных p53 невозможно, поскольку эти мыши не доживают до одного года, погибая от злокачественных лимфом [30]. Пересадка мышам частично активированного гена p53 приводит к существенному уменьшению частоты спонтанных опухолей, однако при этом наблюдается феномен преждевременного старения [333]. В то же время, введение в геном мышей дополнительной копии немодифицированного гена p53 [334], или снижение экспрессии гена Mdm2 [335] приводит к защите от развития рака без снижения продолжительности жизни. У людей распространен полиморфизм гена p53 по 72-й аминокислоте [336]. Аллель Arg72, в отличие от Pro72, отличается лучшей защитой против рака, так как с этой аллелью связана митохондриальная нетранскрипционная функция p53. Люди гомозиготные по аллели Pro72 обладают пониженной противораковой защитой, чаще страдают онкологическими заболеваниями по сравнению с гомозиготными носителями аллели Arg72, но в то же время характеризуются большей средней продолжительностью жизни [337]. Эти результаты указывают на то, что противораковая защита имеет обратную сторону – ускорение процессов старения [338].

Каким же образом можно объяснить этот парадокс и существуют ли способы преодоления негативного действия p53? Для того чтобы найти ответ на этот вопрос надо вспомнить, что определяет проявление двух противоположных свойств p53. Низкие уровни p53 способствуют оптимальной сбалансированности процессов, снижению риска возникновения мутаций и повышению скорости процессов репарации. Очевидно, что это свойство p53 благоприятно как в плане профилактики рака, так и в замедлении процессов старения. Продление жизни организмов путем ограничения потребления калорий, вероятно, также не обходится без участия p53, поскольку при физиологически допустимом уровне p53 тормозится модуль IGF-mTOR, а дефицит глюкозы способствует адаптивному повышению активности p53, посредством стимуляции АМР-зависимой киназы АМРК. Полезную роль может играть также активация аутофагии, в частности, с участием контролируемого p53 гена *DRAM* [339]. В процессе аутофагии происходит омоложение цитоплазмы клеток. Это осуществляется за счет переваривания в лизосомах накапливающихся в цитоплазме поврежденных белков, характерных для стареющих

клеток (например липофуксина), а также за счет преимущественного удаления поврежденных митохондрий, выделяющих повышенные количества кислородных радикалов [340]. При низком уровне p53 его антиоксидантная функция дополнительно снижает риск накопления мутаций. Она оберегает организм от преждевременной выработки ресурса, поскольку постоянно высокий уровень кислородных радикалов приводит к ускоренной эрозии теломер, которые при каждом делении укорачиваются протяженными блоками [341].

Таким образом, при умеренном образе жизни активность гена p53 направлена как против риска возникновения рака, так и против преждевременного старения.

Другое проявление активности p53 связано с вынужденными радикальными мерами, к которым организму приходится прибегать при серьезных стрессах, интоксикациях, облучении, инфекциях и воспалениях, перегрузке организма калориями, нарушениях метаболизма вследствие болезней (например, диабете), злоупотреблении лекарственными средствами. Все эти воздействия могут приводить к качественно иному уровню активации p53, что приводит к апоптозу наиболее поврежденных клеток. Апоптоз сопровождается массивным выбросом кислородных радикалов, которые действуют не только на апоптозные клетки, но и оказывают действие на все микроокружение [342]. Это создает условия для окисления ДНК, возникновения мутаций, изменения внеклеточного матрикса, с последующим накоплением поврежденных белков, развитием тканевых патологий, гибелью клеток паренхимы органов, развитием фиброза [343] и т.п. Хронические воспаления вызывают перманентный окислительный стресс в пораженных тканях, способствуя ускоренной эрозии теломер и локальной выработки ресурса регенерации ткани. Это может приводить к «локальным прогериям», то есть к локальному старению тканей, что лежит, например, в основе ряда нейродегенеративных заболеваний, а также способствует развитию легочной эмфиземы, патологии почек и т. д [332]. В патогенезе всех этих состояний самую активную роль играет p53. Таким образом, функция p53 не только обеспечивает пресечение «неправильного поведения» клеток, но и решает судьбу людей в случае их неразумного обращения со своим здоровьем. Знание механизмов действия p53 еще раз убеждает в неоспоримом преимуществе профилактического подхода к борьбе с болезнями. В основе здоровья и долголетия лежит умеренность, и тогда p53 действительно становится нашим «Ангелом Хранителем».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря высокой частоте обнаружения поломок гена p53 при онкологических заболеваниях для исследования функций этого гена были приложены уникальные по масштабу усилия. Было установлено, что белковой молекуле p53 свойственны несколько независимых по природе активностей. Значительная часть функций p53 связана с его способностью работать в качестве транскрипционного фактора и активировать транскрипцию множества генов. Другие активности p53 обуславливают репрессию транскрипции другой части генов, позволяют ему служить в качестве фермента репарации (ДНК-экзонуклеазы), а также связываться с большим числом других белков (ферментов, транскрипционных факторов, адапторных белков) и тем самым влиять на множества внутриклеточных процессов. Несмотря на разнообразие активностей белка p53, каждая из них вносит вклад в обеспечение единой макрофункции – поддержания генетической идентичности клеток многоклеточного организма. Биологическая роль белка p53 заключается в выполнении важной «социальной» функции внутри организма, заключающейся в обеспечении подчинения каждой отдельной клетки интересам организма в целом. Функция белка p53 обуславливает альтруистическое поведение клеток, при котором поврежденные и неполноценные клетки самостоятельно принимают решение о своей гибели. Активность белка p53 меняется в зависимости от состояния практически всех процессов внутри клетки. Через многочисленные связи на p53 сходятся сигналы об отклонениях от оптимума процессов, а также о наличии структурных повреждений, что, в зависимости от степени отклонения, приводит либо к ускорению процессов репарации и защиты, либо к остановке клеточных делений или апоптозу. В результате такой стратегии p53 гарантирует генетическую однородность клеток и предотвращение селекции клеток, имеющих ростовые или прочие преимущества. Утрата функции гена p53 наблюдается практически в каждом случае злокачественных заболеваний, а его недостаточность неминуемо приводит к развитию опухолей. Понимание функции белка p53 позволяет разрабатывать не только новые подходы к лечению онкологических заболеваний, но и определять стратегию профилактики множества болезней, включая меры по замедлению процессов старения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lane, D.P. (1992) *Nature*, **358**, 15–16.
2. Royds, J.A., Iacopetta, B. (2006) *Cell Death. Differ.*, **13**, 1017–1026.
3. Чумаков П.М. (2000) *Биохимия*, **65**, 28–40.
4. Deppert, W. (2007) *Oncogene*, **26**, 2142–2144.
5. Алмазов В.П., Кочетков Д.А., Чумаков П.М. (2007) *Молекулярная биология*, **41**.
6. Kufe, D.W., Holland, J.F., Frei, E., *American Cancer Society*. BC Decker, Hamilton, Ont.; Lewiston, N.Y., **2003**.
7. Huebner, R.J., Todaro, G.J. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **64**, 1087–1094.
8. Toozе, J., Acheson, N.H. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., **1980**.
9. Chang, C., Simmons, D.T., Martin, M.A., Mora, P.T. (1979) *J. Virol.*, **31**, 463–471.
10. Kress, M., May, E., Cassingena, R., May, P. (1979) *J. Virol.*, **31**, 472–483.
11. Lane, D.P., Crawford, L.V. (1979) *Nature*, **278**, 261–263.
12. Linzer, D.I., Levine, A.J. (1979) *Cell*, **17**, 43–52.
13. DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W., Old, L.J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2420–2424.
14. Barque, J.P., Danon, F., Peraudeau, L., Yeni, P., Larsen, C.J. (1983) *Embo J.*, **2**, 743–749.
15. Mercer, W.E., Nelson, D., DeLeo, A.B., Old, L.J., Baserga, R. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6309–6312.
16. Oren, M., Levine, A.J. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 56–59.
17. Чумаков П.М., Йоцева В.С., Георгиев Г.П. (1982) *Доклады АН СССР*, **267**, 1272–1275.
18. Wolf, D., Laver-Rudich, Z., Rotter, V. (1985) *Mol. Cell Biol.*, **5**, 1887–1893.
19. Бухман В.Л., Нинкина Н.Н., Чумаков П.М., Хиленкова М.А., Самарина О.П. (1987) *Генетика*, **23**, 1547–1554.
20. Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D., Oren, M. (1984) *Nature*, **312**, 646–649.
21. Jenkins, J.R., Rudge, K., Currie, G.A. (1984) *Nature*, **312**, 651–654.
22. Parada, L.F., Land, H., Weinberg, R.A., Wolf, D., Rotter, V. (1984) *Nature*, **312**, 649–651.
23. Jenkins, J.R., Rudge, K., Chumakov, P., Currie, G.A. (1985) *Nature*, **317**, 816–818.
24. Hinds, P., Finlay, C., Levine, A.J. (1989) *J. Virol.*, **63**, 739–746.
25. Baker, S.J., Markowitz, S., Fearon, E.R., Willson, J.K., Vogelstein, B. (1990) *Science*, **249**, 912–915.
26. Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O., Oren, M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 8763–8767.
27. Finlay, C.A., Hinds, P.W., Levine, A.J. (1989) *Cell*, **57**, 1083–1093.
28. Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., vanTuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y., White, R., Vogelstein, B. (1989) *Science*, **244**, 217–221.
29. Levine, A.J., Momand, J., Finlay, C.A. (1991) *Nature*, **351**, 453–456.
30. Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S., Bradley, A. (1992) *Nature*, **356**, 215–221.
31. Tsukada, T., Tomooka, Y., Takai, S., Ueda, Y., Nishikawa, S., Yagi, T., Tokunaga, T., Takeda, N., Suda, Y., Abe, S., et al. (1993) *Oncogene*, **8**, 3313–3322.
32. Agapova, L.S., Ilyinskaya, G.V., Turovets, N.A., Ivanov, A.V., Chumakov, P.M., Kopnin, B.P. (1996) *Mutat. Res.*, **354**, 129–138.
33. Brooks, C.L., Gu, W. (2006) *Mol. Cell.*, **21**, 307–315.
34. Asher, G., Reuven, N., Shaul, Y. (2006) *Bioessays*, **28**, 844–849.

35. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., Oren, M. (1997) *Nature*, **387**, 296–299.
36. Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D., Levine, A.J. (1992) *Cell*, **69**, 1237–1245.
37. Oliner, J.D., Kinzler, K.W., Meltzer, P.S., George, D.L., Vogelstein, B. (1992) *Nature*, **358**, 80–83.
38. Dornan, D., Wertz, I., Shimizu, H., Arnott, D., Frantz, G.D., Dowd, P., O'Rourke, K., Koepfen, H., Dixit, V.M. (2004) *Nature*, **429**, 86–92.
39. Leng, R.P., Lin, Y., Ma, W., Wu, H., Lemmers, B., Chung, S., Parant, J.M., Lozano, G., Hakem, R., Benchimol, S. (2003) *Cell*, **112**, 779–791.
40. Chen, D., Kon, N., Li, M., Zhang, W., Qin, J., Gu, W. (2005) *Cell*, **121**, 1071–1083.
41. Shmueli, A., Oren, M. (2005) *Cell*, **121**, 963–965.
42. Asher, G., Shaul, Y. (2005) *Cell Cycle*, **4**, 1015–1018.
43. Yano, M., Koumoto, Y., Kanasaki, Y., Wu, X., Kido, H. (2004) *Biomacromolecules*, **5**, 1465–1469.
44. Horn, H.F., Vousden, K.H. (2007) *Oncogene*, **26**, 1306–1316.
45. Lavin, M.F., Gueven, N. (2006) *Cell Death. Differ.*, **13**, 941–950.
46. Shvarts, A., Steegenga, W.T., Riteco, N., van Laar, T., Dekker, P., Bazuine, M., van Ham, R.C., van der Houven van Oordt, W., Hateboer, G., van der Eb, A.J., Jochemsen, A.G. (1996) *Embo J.*, **15**, 5349–5357.
47. Jackson, M.W., Berberich, S.J. (2000) *Mol. Cell Biol.*, **20**, 1001–1007.
48. Francoz, S., Froment, P., Bogaerts, S., De Clercq, S., Maetens, M., Doumont, G., Bellefroid, E., Marine, J.C. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 3232–3237.
49. Sharp, D.A., Kratowicz, S.A., Sank, M.J., George, D.L. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 38189–38196.
50. Tanimura, S., Ohtsuka, S., Mitsui, K., Shirouzu, K., Yoshimura, A., Ohtsubo, M. (1999) *FEBS Lett* **447**, 5–9.
51. Gu, J., Kawai, H., Nie, L., Kitao, H., Wiederschain, D., Jochemsen, A.G., Parant, J., Lozano, G., Yuan, Z.M. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 19251–19254.
52. de Graaf, P., Little, N.A., Ramos, Y.F., Meulmeester, E., Letteboer, S.J., Jochemsen, A.G. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 38315–38324.
53. Dai, M.S., Lu, H. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 44475–44482.
54. Dai, M.S., Zeng, S.X., Jin, Y., Sun, X.X., David, L., Lu, H. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 7654–7668.
55. Zhang, Y., Wolf, G.W., Bhat, K., Jin, A., Allio, T., Burkhart, W.A., Xiong, Y. (2003) *Mol. Cell Biol.*, **23**, 8902–8912.
56. Gilkes, D.M., Chen, L., Chen, J. (2006) *Embo J.*, **25**, 5614–5625.
57. Gilkes, D.M., Chen, J. (2007) *Cell Cycle*, **6**, 151–155.
58. Lindstrom, M.S., Deisenroth, C., Zhang, Y. (2007) *Cell Cycle*, **6**, 434–437.
59. Grossman, S.R., Deato, M.E., Brignone, C., Chan, H.M., Kung, A.L., Tagami, H., Nakatani, Y., Livingston, D.M. (2003) *Science*, **300**, 342–344.
60. Weissman, A.M. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 169–178.
61. Gronroos, E., Terentiev, A.A., Punga, T., Ericsson, J. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12165–12170.
62. Sui, G., Affar el, B., Shi, Y., Brignone, C., Wall, N.R., Yin, P., Donohoe, M., Luke, M.P., Calvo, D., Grossman, S.R., Shi, Y. (2004) *Cell*, **117**, 859–872.
63. Wang, C., Ivanov, A., Chen, L., Fredericks, W.J., Seto, E., Rauscher, F.J., 3rd, Chen, J. (2005) *Embo J.*, **24**, 3279–3290.
64. Higashitsuji, H., Higashitsuji, H., Itoh, K., Sakurai, T., Nagao, T., Sumitomo, Y., Masuda, T., Dawson, S., Shimada, Y., Mayer, R.J., Fujita, J. (2005) *Cancer Cell*, **8**, 75–87.
65. Li, M., Brooks, C.L., Kon, N., Gu, W. (2004) *Mol. Cell*, **13**, 879–886.
66. Tang, J., Qu, L.K., Zhang, J., Wang, W., Michaelson, J.S., Degenhardt, Y.Y., El-Deiry, W.S., Yang, X. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **8**, 855–862.

67. Cummins, J.M., Vogelstein, B. (2004) *Cell Cycle*, **3**, 689–692.
68. Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A.Y., Qin, J., Gu, W. (2002) *Nature*, **416**, 648–653.
69. Sherr, C.J. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 731–737.
70. Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grossveld, G., Sherr, C.J. (1997) *Cell*, **91**, 649–659.
71. Kamijo, T., Weber, J.D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M.F., Sherr, C.J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 8292–8297.
72. Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., Cordon-Cardo, C., DePinho, R.A. (1998) *Cell*, **92**, 713–723.
73. Zhang, Y., Xiong, Y., Yarbrough, W.G. (1998) *Cell*, **92**, 725–734.
74. Rowland, B.D., Denissov, S.G., Douma, S., Stunnenberg, H.G., Bernards, R., Peepker, D.S. (2002) *Cancer Cell*, **2**, 55–65.
75. Aslanian, A., Iaquinta, P.J., Verona, R., Lees, J.A. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 1413–1422.
76. Lowe, S.W., Sherr, C.J. (2003) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **13**, 77–83.
77. Zhong, Q., Gao, W., Du, F., Wang, X. (2005) *Cell*, **121**, 1085–1095.
78. Wechsler, A., Brafman, A., Shafir, M., Heverin, M., Gottlieb, H., Damari, G., Gozlan-Kelner, S., Spivak, I., Moshkin, O., Fridman, E., Becker, Y., Skaliter, R., Einat, P., Faerman, A., Bjorkhem, I., Feinstein, E. (2003) *Science*, **302**, 2087.
79. Wu, C., Miloslavskaya, I., Demontis, S., Maestro, R., Galaktionov, K. (2004) *Nature*, **432**, 640–645.
80. Bourdon, J.C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D.P., Saville, M.K., Lane, D.P. (2005) *Genes Dev.*, **19**, 2122–2137.
81. Ray, P.S., Grover, R., Das, S. (2006) *EMBO Rep.*, **7**, 404–410.
82. Yang, D.Q., Halaby, M.J., Zhang, Y. (2006) *Oncogene*, **25**, 4613–4619.
83. Jeffrey, P.D., Gorina, S., Pavletich, N.P. (1995) *Science*, **267**, 1498–1502.
84. Liptenko, O., Prives, C. (2006) *Cell Death. Differ.*, **13**, 951–961.
85. Appella, E., Anderson, C.W. (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 2764–2772.
86. Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Midgley, C.A., Lane, D.P., Hay, R.T. (1999) *Embo J.*, **18**, 6455–6461.
87. Xirodimas, D.P., Saville, M.K., Bourdon, J.C., Hay, R.T., Lane, D.P. (2004) *Cell*, **118**, 83–97.
88. Zacchi, P., Gostissa, M., Uchida, T., Salvagno, C., Avolio, F., Volinia, S., Ronai, Z., Blandino, G., Schneider, C., Del Sal, G. (2002) *Nature*, **419**, 853–857.
89. Zheng, H., You, H., Zhou, X.Z., Murray, S.A., Uchida, T., Wulf, G., Gu, L., Tang, X., Lu, K.P., Xiao, Z.X. (2002) *Nature*, **419**, 849–853.
90. An, W.G., Kanekal, M., Simon, M.C., Maltepe, E., Blagosklonny, M.V., Neckers, L.M. (1998) *Nature*, **392**, 405–408.
91. Anwar, A., Dehn, D., Siegel, D., Kepa, J.K., Tang, L.J., Pietenpol, J.A., Ross, D. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 10368–10373.
92. Chang, N.S. (2002) *Int. J. Mol. Med.*, **9**, 19–24.
93. Corcoran, C.A., He, Q., Huang, Y., Sheikh, M.S. (2005) *Oncogene*, **24**, 1634–1640.
94. Jayaraman, L., Murthy, K.G., Zhu, C., Curran, T., Xanthoudakis, S., Prives, C. (1997) *Genes Dev.*, **11**, 558–570.
95. Ueno, M., Masutani, H., Arai, R.J., Yamauchi, A., Hirota, K., Sakai, T., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Yodoi, J., Nikaido, T. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 35809–35815.
96. Samuels-Lev, Y., O'Connor, D.J., Bergamaschi, D., Trigiant, G., Hsieh, J.K., Zhong, S., Campargue, I., Naumovski, L., Crook, T., Lu, X. (2001) *Mol. Cell*, **8**, 781–794.
97. Bergamaschi, D., Samuels, Y., Jin, B., Duraisingham, S., Crook, T., Lu, X. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 1341–1350.

98. Bergamaschi, D., Samuels, Y., O'Neil, N.J., Trigiante, G., Crook, T., Hsieh, J.K., O'Connor, D.J., Zhong, S., Campargue, I., Tomlinson, M.L., Kuwabara, P.E., Lu, X. (2003) *Nat. Genet.*, **33**, 162–167.
99. Sullivan, A., Lu, X. (2007) *Br. J. Cancer*, **96**, 196–200.
100. Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., Green, D.R. (2004) *Science*, **303**, 1010–1014.
101. Petros, A.M., Gunasekera, A., Xu, N., Olejniczak, E.T., Fesik, S.W. (2004) *FEBS Lett.*, **559**, 171–174.
102. Fei, P., Wang, W., Kim, S.H., Wang, S., Burns, T.F., Sax, J.K., Buzzai, M., Dicker, D.T., McKenna, W.G., Bernhard, E.J., El-Deiry, W.S. (2004) *Cancer Cell*, **6**, 597–609.
103. Bourdon, J.C., Renzing, J., Robertson, P.L., Fernandes, K.N., Lane, D.P. (2002) *J. Cell Biol.*, **158**, 235–246.
104. Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K., Wahl, G.M. (1994) *Genes Dev.*, **8**, 2540–2551.
105. Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R.W. (1991) *Cancer Res.*, **51**, 6304–6311.
106. Maltzman, W., Czyzyk, L. (1984) *Mol. Cell Biol.*, **4**, 1689–1694.
107. Lin, A.W., Lowe, S.W. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 5025–5030.
108. Vousden, K.H., Lane, D.P. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 275–283.
109. Agarwal, M.L., Agarwal, A., Taylor, W.R., Chernova, O., Sharma, Y., Stark, G.R. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14775–14780.
110. Blagosklonny, M.V., Schulte, T.W., Nguyen, P., Mimnaugh, E.G., Trepel, J., Neckers, L. (1995) *Cancer Res.*, **55**, 4623–4626.
111. Rubtsova, S.N., Kondratov, R.V., Kopnin, P.B., Chumakov, P.M., Kopnin, B.P., Vasiliev, J.M. (1998) *FEBS Lett.*, **430**, 353–357.
112. Sablina, A.A., Agapova, L.S., Chumakov, P.M., Kopnin, B.P. (1999) *Cell Biol. Int.*, **23**, 323–334.
113. David-Pfeuty, T., Nouvian-Dooghe, Y., Sirri, V., Roussel, P., Hernandez-Verdun, D. (2001) *Oncogene*, **20**, 5951–5963.
114. Graeber, T.G., Peterson, J.F., Tsai, M., Monica, K., Fornace, A.J., Jr., Giaccia, A.J. (1994) *Mol. Cell Biol.*, **14**, 6264–6277.
115. O'Reilly, M.A., Staversky, R.J., Stripp, B.R., Finkelstein, J.N. (1998) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **18**, 43–50.
116. Agarwal, M.L., Taylor, W.R., Chernov, M.V., Chernova, O.B., Stark, G.R. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 1–4.
117. Blandino, G., Scardigli, R., Rizzo, M.G., Crescenzi, M., Soddu, S., Sacchi, A. (1995) *Oncogene*, **10**, 731–737.
118. Sablina, A.A., Chumakov, P.M., Levine, A.J., Kopnin, B.P. (2001) *Oncogene*, **20**, 899–909.
119. Bachelder, R.E., Marchetti, A., Falcioni, R., Soddu, S., Mercurio, A.M. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 20733–20737.
120. Nikiforov, M.A., Hagen, K., Ossovskaia, V.S., Connor, T.M., Lowe, S.W., Deichman, G.I., Gudkov, A.V. (1996) *Oncogene*, **13**, 1709–1719.
121. Агапова, Л.С., Туровец, Н.А., Иванов, А.В., Ильинская, Г.В., Чумаков, П.М. (1996) *Genetika*, **32**, 1080–1087.
122. Sablina, A.A., Ilyinskaya, G.V., Rubtsova, S.N., Agapova, L.S., Chumakov, P.M., Kopnin, B.P. (1998) *J. Cell Sci.*, **111** (Pt 7), 977–984.
123. Seo, Y.R., Smith, M.L., Han, S.S., Fairbairn, D.W., O'Neill, K.L., Ryu, J.C. (1999) *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **104**, 285–292.
124. Matijasevic, Z., Snyder, J.E., Ludlum, D.B. (1998) *Oncol. Res.*, **10**, 605–610.
125. Forrester, K., Ambs, S., Lupold, S.E., Kapust, R.B., Spillare, E.A.,

- Weinberg, W.C., Felley-Bosco, E., Wang, X.W., Geller, D.A., Tzeng, E., Billiar, T.R., Harris, C.C. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 2442–2447.
126. Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J., Wang, H. (2003) Oncogene, **22**, 5834–5847.
127. Niida, H., Nakanishi, M. (2006) Mutagenesis, **21**, 3–9.
128. Sarkaria, J.N., Busby, E.C., Tibbetts, R.S., Roos, P., Taya, Y., Karnitz, L.M., Abraham, R.T. (1999) Cancer Res., **59**, 4375–4382.
129. Matsuoka, S., Huang, M., Elledge, S.J. (1998) Science, **282**, 1893–1897.
130. Chehab, N.H., Malikzay, A., Appel, M., Halazonetis, T.D. (2000) Genes Dev., **14**, 278–288.
131. Hanawalt, P.C. (1989) Genome, **31**, 605–611.
132. Ljungman, M., O'Hagan, H.M., Paulsen, M.T. (2001) Oncogene, **20**, 5964–5971.
133. Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Williams, J.M., Sarkaria, J.N., Cliby, W.A., Shieh, S.Y., Taya, Y., Prives, C., Abraham, R.T. (1999) Genes Dev., **13**, 152–157.
134. Chehab, N.H., Malikzay, A., Stavridi, E.S., Halazonetis, T.D. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 13777–13782.
135. Scully, R., Anderson, S.F., Chao, D.M., Wei, W., Ye, L., Young, R.A., Livingston, D.M., Parvin, J.D. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94**, 5605–5610.
136. Krum, S.A., Miranda, G.A., Lin, C., Lane, T.F. (2003) J. Biol. Chem., **278**, 52012–52020.
137. Ljungman, M., Lane, D.P. (2004) Nat. Rev. Cancer, **4**, 727–737.
138. Bakalkin, G., Selivanova, G., Yakovleva, T., Kiseleva, E., Kashuba, E., Magnusson, K.P., Szekely, L., Klein, G., Terenius, L., Wiman, K.G. (1995) Nucleic Acids Res., **23**, 362–369.
139. Lee, S., Cavallo, L., Griffith, J. (1997) J. Biol. Chem., **272**, 7532–7539.
140. Wetzel, C.C., Berberich, S.J. (2001) Biochim. Biophys. Acta, **1517**, 392–397.
141. Zotchev, S.B., Protopopova, M., Selivanova, G. (2000) Nucleic Acids Res., **28**, 4005–4012.
142. Mummensbrauer, T., Janus, F., Muller, B., Wiesmuller, L., Deppert, W., Grosse, F. (1996) Cell, **85**, 1089–1099.
143. Janus, F., Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Wiesmuller, L., Grosse, F., Deppert, W. (1999) Cell Mol. Life Sci., **55**, 12–27.
144. Dutta, A., Ruppert, J.M., Aster, J.C., Winchester, E. (1993) Nature, **365**, 79–82.
145. Garkavtsev, I.V., Kley, N., Grigorian, I.A., Gudkov, A.V. (2001) Oncogene, **20**, 8276–8280.
146. Blander, G., Kipnis, J., Leal, J.F., Yu, C.E., Schellenberg, G.D., Oren, M. (1999) J. Biol. Chem., **274**, 29463–29469.
147. Sturzbecher, H.W., Donzelmann, B., Henning, W., Knippschild, U., Buchhop, S. (1996) Embo J., **15**, 1992–2002.
148. Wang, X.W., Vermeulen, W., Coursen, J.D., Gibson, M., Lupold, S.E., Forrester, K., Xu, G., Elmore, L., Yeh, H., Hoeijmakers, J.H., Harris, C.C. (1996) Genes Dev., **10**, 1219–1232.
149. Herring, C.J., West, C.M., Wilks, D.P., Davidson, S.E., Hunter, R.D., Berry, P., Forster, G., MacKinnon, J., Rafferty, J.A., Elder, R.H., Hendry, J.H., Margison, G.P. (1998) Br. J. Cancer, **78**, 1128–1133.
150. Xanthoudakis, S., Miao, G., Wang, F., Pan, Y.C., Curran, T. (1992) Embo J., **11**, 3323–3335.
151. Hanson, S., Kim, E., Deppert, W. (2005) Oncogene, **24**, 1641–1647.
152. Raycroft, L., Wu, H.Y., Lozano, G. (1990) Science, **249**, 1049–1051.
153. Liu, G., Chen, X. (2006) J. Cell Biochem., **97**, 448–458.
154. Kubicka, S., Kuhnel, F., Zender, L., Rudolph, K.L., Plumpe, J., Manns, J.

- M., Trautwein, C.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 32137–32144.
155. *Mack, D.H., Vartikar, J., Pipas, J.M., Laimins, L.A.* (1993) *Nature*, **363**, 281–283.
156. *Ohlsson, C., Kley, N., Werner, H., LeRoith, D.* (1998) *Endocrinology*, **139**, 1101–1107.
157. *Funk, W.D., Pak, D.T., Karas, R.H., Wright, W.E., Shay, J.W.* (1992) *Mol. Cell Biol.*, **12**, 2866–2871.
158. *el-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B.* (1992) *Nat. Genet.*, **1**, 45–49.
159. *Hoh, J., Jin, S., Parrado, T., Edington, J., Levine, A.J., Ott, J.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8467–8472.
160. *Tomso, D.J., Inga, A., Menendez, D., Pittman, G.S., Campbell, M.R., Storici, F., Bell, D.A., Resnick, M.A.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 6431–6436.
161. *Inga, A., Storici, F., Darden, T.A., Resnick, M.A.* (2002) *Mol. Cell Biol.*, **22**, 8612–8625.
162. *Кондратов П.В., Кузнецов Н.В., Бугачева Е.Н., Алмазов В.П., Прасолов В.С., Копнин Б.П., Чумаков П.М.* (1996) *Молекулярная биология*, **30**, 613–620.
163. *Kastan, M.B., Zhan, Q., el-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B., Fornace, A.J., Jr.* (1992) *Cell*, **71**, 587–597.
164. *Zheng, X., Chen, X.* (2001) *FEBS Lett.*, **489**, 4–7.
165. *Contente, A., Dittmer, A., Koch, M.C., Roth, J., Dobbstein, M.* (2002) *Nat. Genet.*, **30**, 315–320.
166. *Johnson, R.A., Ince, T.A., Scotto, K.W.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 27716–27720.
167. *Dannenberg, J.H., David, G., Zhong, S., van der Torre, J., Wong, W.H., Depinho, R.A.* (2005) *Genes Dev.*, **19**, 1581–1595.
168. *Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D., Pavletich, N.P.* (1994) *Science*, **265**, 346–355.
169. *Hamroun, D., Kato, S., Ishioka, C., Claustres, M., Beroud, C., Soussi, T.* (2006) *Hum. Mutat.*, **27**, 14–20.
170. *Gannon, J.V., Greaves, R., Iggo, R., Lane, D.P.* (1990) *Embo J.*, **9**, 1595–1602.
171. *Levine, A.J.* (1989) *Princess Takamatsu Symp.*, **20**, 221–230.
172. *Chan, W.M., Siu, W.Y., Lau, A., Poon, R.Y.* (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 3536–3551.
173. *Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A., Lane, D.P.* (1992) *Cell*, **71**, 875–886.
174. *Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A., Lane, D.P.* (1993) *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3167–3174.
175. *Kaesler, M.D., Iggo, R.D.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 95–100.
176. *Kaneshiro, K., Tsutsumi, S., Tsuji, S., Shirahige, K., Aburatani, H.* (2007) *Genomics*, **89**, 178–188.
177. *Brash, D.E., Havre, P.A.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 13969–13971.
178. *Fischer, J.L., Lancia, J.K., Mathur, A., Smith, M.L.* (2006) *Anticancer Res.*, **26**, 899–904.
179. *Gudkov, A.V.* (2002) *Nat. Med.*, **8**, 1196–1198.
180. *Seo, Y.R., Kelley, M.R., Smith, M.L.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14548–14553.
181. *Smith, M.L., Lancia, J.K., Mercer, T.I., Ip, C.* (2004) *Anticancer Res.*, **24**, 1401–1408.
182. *Okorokov, A.L., Milner, J.* (1999) *Mol. Cell Biol.*, **19**, 7501–7510.
183. *McLure, K.G., Takagi, M., Kastan, M.B.* (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 9958–9967.
184. *Моргункова А.А.* (2005) *Биохимия*, **70**, 955–971.
185. *Weisz, L., Oren, M., Rotter, V.* (2007) *Oncogene*, **26**, 2202–2211.
186. *Dittmer, D., Pati, S., Zambetti, G., Chu, S., Teresky, A.K., Moore, M., Finlay, C., Levine, A.J.* (1993) *Nat. Genet.*, **4**, 42–46.

187. Di Como, C.J., Gaiddon, C., Prives, C. (1999) *Mol. Cell Biol.*, **19**, 1438–1449.
188. Bensaad, K., Le Bras, M., Unsal, K., Strano, S., Blandino, G., Tominaga, O., Rouillard, D., Soussi, T. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 10546–10555.
189. Marin, M.C., Jost, C.A., Brooks, L.A., Irwin, M.S., O'Nions, J., Tidy, J.A., James, N., McGregor, J.M., Harwood, C.A., Yulug, I.G., Vousden, K.H., Allday, M.J., Gusterson, B., Ikawa, S., Hinds, P.W., Crook, T., Kaelin, W.G., Jr. (2000) *Nat. Genet.*, **25**, 47–54.
190. Lang, G.A., Iwakuma, T., Suh, Y.A., Liu, G., Rao, V.A., Parant, J.M., Valentin-Vega, Y.A., Terzian, T., Caldwell, L.C., Strong, L.C., El-Naggar, A.K., Lozano, G. (2004) *Cell*, **119**, 861–872.
191. Olive, K.P., Tuveson, D.A., Ruhe, Z.C., Yin, B., Willis, N.A., Bronson, R.T., Crowley, D., Jacks, T. (2004) *Cell*, **119**, 847–860.
192. Gloushankova, N., Ossovskaya, V., Vasiliev, J., Chumakov, P., Kopnin, B. (1997) *Oncogene*, **15**, 2985–2989.
193. Pugacheva, E.N., Ivanov, A.V., Kravchenko, J.E., Kopnin, B.P., Levine, A.J., Chumakov, P.M. (2002) *Oncogene*, **21**, 4595–4600.
194. Ko, L.J., Prives, C. (1996) *Genes Dev.*, **10**, 1054–1072.
195. Bell, S., Klein, C., Muller, L., Hansen, S., Buchner, J. (2002) *J. Mol. Biol.*, **322**, 917–927.
196. Dawson, R., Muller, L., Dehner, A., Klein, C., Kessler, H., Buchner, J. (2003) *J. Mol. Biol.*, **332**, 1131–1141.
197. Lee, H., Mok, K.H., Muhandiram, R., Park, K.H., Suk, J.E., Kim, D.H., Chang, J., Sung, Y.C., Choi, K.Y., Han, K.H. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 29426–29432.
198. Lin, J., Chen, J., Elenbaas, B., Levine, A.J. (1994) *Genes Dev.*, **8**, 1235–1246.
199. Candau, R., Scolnick, D.M., Daripino, P., Ying, C.Y., Halazonetis, T.D., Berger, S.L. (1997) *Oncogene*, **15**, 807–816.
200. Chang, J., Kim, D.H., Lee, S.W., Choi, K.Y., Sung, Y.C. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 25014–25019.
201. Dornan, D., Shimizu, H., Burch, L., Smith, A.J., Hupp, T.R. (2003) *Mol. Cell Biol.*, **23**, 8846–8861.
202. Curtin, J.C., Spinella, M.J. (2005) *Oncogene*, **24**, 1481–1490.
203. Bochar, D.A., Wang, L., Beniya, H., Kinev, A., Xue, Y., Lane, W.S., Wang, W., Kashanchi, F., Shiekhattar, R. (2000) *Cell*, **102**, 257–265.
204. Hill, D.A., de la Serna, I.L., Veal, T.M., Imbalzano, A.N. (2004) *J. Cell Biochem.*, **91**, 987–998.
205. Lee, D., Kim, J.W., Seo, T., Hwang, S.G., Choi, E.J., Choe, J. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 22330–22337.
206. An, W., Kim, J., Roeder, R.G. (2004) *Cell*, **117**, 735–748.
207. Avantiaggiati, M.L., Ogryzko, V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A.S., Kelly, K. (1997) *Cell*, **89**, 1175–1184.
208. 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.
209. Hsu, C.H., Chang, M.D., Tai, K.Y., Yang, Y.T., Wang, P.S., Chen, C.J., Wang, Y.H., Lee, S.C., Wu, C.W., Juan, L.J. (2004) *Embo J.*, **23**, 2269–2280.
210. Lill, N.L., Grossman, S.R., Ginsberg, D., DeCaprio, J., Livingston, D.M. (1997) *Nature*, **387**, 823–827.
211. Xing, J., Sheppard, H.M., Corneillie, S.I., Liu, X. (2001) *Mol. Cell Biol.*, **21**, 3652–3661.
212. Braastad, C.D., Han, Z., Hendrickson, E.A. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 8261–8268.
213. Lu, X. (2005) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **15**, 27–33.
214. Cawley, S., Bekiranov, S., Ng, H.H., Kapranov, P., Sekinger, E.A., Kampana, D., Piccolboni, A., Sementchenko, V., Cheng, J., Williams, A.J., Wheeler, R., Wong, B., Drenkow, J.,

- Yamanaka, M., Patel, S., Brubaker, S., Tammana, H., Helt, G., Struhl, K., Gingeras, T.R.* (2004) *Cell*, **116**, 499–509.
215. *Wei, C.L., Wu, Q., Vega, V.B., Chiu, K.P., Ng, P., Zhang, T., Shahab, A., Yong, H.C., Fu, Y., Weng, Z., Liu, J., Zhao, X.D., Chew, J.L., Lee, Y.L., Kuznetsov, V.A., Sung, W.K., Miller, L.D., Lim, B., Liu, E.T., Yu, Q., Ng, H.H., Ruan, Y.* (2006) *Cell*, **124**, 207–219.
216. *Nemoto, S., Fergusson, M.M., Finkel, T.* (2004) *Science*, **306**, 2105–2108.
217. *Tergaonkar, V., Pando, M., Vafa, O., Wahl, G., Verma, I.* (2002) *Cancer Cell*, **1**, 493–503.
218. *Ryan, K.M., Ernst, M.K., Rice, N.R., Vousden, K.H.* (2000) *Nature*, **404**, 892–897.
219. *Shetty, S., Graham, B.A., Brown, J.G., Hu, X., Vegh-Yarema, N., Harding, G., Paul, J.T., Gibson, S.B.* (2005) *Mol. Cell Biol.*, **25**, 5404–5416.
220. *Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., Syvaaja, J., Saluz, H.P., Haenel, F., Eilers, M.* (2002) *Mol. Cell*, **10**, 509–521.
221. *Wu, W.S., Heinrichs, S., Xu, D., Garrison, S.P., Zambetti, G.P., Adams, J.M., Look, A.T.* (2005) *Cell*, **123**, 641–653.
222. *Zhu, N., Gu, L., Findley, H.W., Chen, C., Dong, J.T., Yang, L., Zhou, M.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 14711–14718.
223. *Homer, C., Knight, D.A., Hananeia, L., Sheard, P., Risk, J., Lasham, A., Royds, J.A., Braithwaite, A.W.* (2005) *Oncogene*, **24**, 8314–8325.
224. *Wei, X., Xu, H., Kufe, D.* (2005) *Cancer Cell*, **7**, 167–178.
225. *Yoshida, K., Liu, H., Miki, Y.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 5734–5740.
226. *Nakanishi, K., Kukita, F., Asai, K., Kato, T.* (2001) *Neurosci. Lett.*, **304**, 85–88.
227. *Bulavin, D.V., Demidov, O.N., Saito, S., Kauraniemi, P., Phillips, C., Amundson, S.A., Ambrosino, C., Sauter, G., Nebreda, A.R., Anderson, C.W., Kallioniemi, A., Fornace, A.J., Jr., Appella, E.* (2002) *Nat. Genet.*, **31**, 210–215.
228. *Mayo, L.D., Seo, Y.R., Jackson, M.W., Smith, M.L., Rivera Guzman, J., Korgaonkar, C.K., Donner, D.B.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 25953–25959.
229. *Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y., Taya, Y.* (2000) *Cell*, **102**, 849–862.
230. *Cecchinelli, B., Lavra, L., Rinaldo, C., Iacovelli, S., Gurtner, A., Gasbarri, A., Ulivieri, A., Del Prete, F., Trovato, M., Piaggio, G., Bartolazzi, A., Soddu, S., Sciacchitano, S.* (2006) *Mol. Cell Biol.*, **26**, 4746–4757.
231. *Tokino, T., Thiagalingam, S., el-Deiry, W.S., Waldman, T., Kinzler, K.W., Vogelstein, B.* (1994) *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 1537–1542.
232. *Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Rago, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 14517–14522.
233. *Nakamura, Y.* (2004) *Cancer Sci.*, **95**, 7–11.
234. *el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B.* (1993) *Cell*, **75**, 817–825.
235. *Polyak, K., Waldman, T., He, T.C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B.* (1996) *Genes Dev.*, **10**, 1945–1952.
236. *Nakano, K., Vousden, K.H.* (2001) *Mol. Cell*, **7**, 683–694.
237. *Rouault, J.P., Falette, N., Guehenneux, F., Guillot, C., Rimokh, R., Wang, Q., Berthet, C., Moyret-Lalle, C., Savatier, P., Pain, B., Shaw, P., Berger, R., Samarut, J., Magaud, J.P., Ozturk, M., Samarut, C., Puisieux, A.* (1996) *Nat. Genet.*, **14**, 482–486.
238. *Zhu, J., Chen, X.* (2000) *Mol. Cell Biol.*, **20**, 5602–5618.

239. Rohaly, G., Chemnitz, J., Dehde, S., Nunez, A.M., Heukeshoven, J., Deppert, W., Dornreiter, I. (2005) *Cell*, **122**, 21–32.
240. Hermeking, H., Benzinger, A. (2006) *Semin. Cancer Biol.*, **16**, 183–192.
241. Helton, E.S., Chen, X. (2007) *J. Cell Biochem.*, **100**, 883–896.
242. Harms, K., Nozell, S., Chen, X. (2004) *Cell Mol. Life Sci.*, **61**, 822–842.
243. Hwang, B.J., Ford, J.M., Hanawalt, P.C., Chu, G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 424–428.
244. Adimoolam, S., Ford, J.M. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12985–12990.
245. Scherer, S.J., Maier, S.M., Seifert, M., Hanselmann, R.G., Zang, K.D., Muller-Hermelink, H.K., Angel, P., Welter, C., Schartl, M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 37469–37473.
246. Xu, J., Morris, G.F. (1999) *Mol. Cell Biol.*, **19**, 12–20.
247. Chen, J., Sadowski, I. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 4813–4818.
248. Shimodaira, H., Yoshioka-Yamashita, A., Kolodner, R.D., Wang, J.Y. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2420–2425.
249. Liu, G., Chen, X. (2006) *Mol. Cell Biol.*, **26**, 1398–1413.
250. Arias-Lopez, C., Lazaro-Trueba, I., Kerr, P., Lord, C.J., Dexter, T., Iravani, M., Ashworth, A., Silva, A. (2006) *EMBO Rep.*, **7**, 219–224.
251. Sengupta, S., Shimamoto, A., Koshiji, M., Pedoux, R., Rusin, M., Spillare, E.A., Shen, J.C., Huang, L.E., Lindor, N.M., Furuichi, Y., Harris, C.C. (2005) *Oncogene*, **24**, 1738–1748.
252. Yamabe, Y., Shimamoto, A., Goto, M., Yokota, J., Sugawara, M., Furuichi, Y. (1998) *Mol. Cell Biol.*, **18**, 6191–6200.
253. Kimura, T., Takeda, S., Sagiya, Y., Gotoh, M., Nakamura, Y., Arakawa, H. (2003) *Nat. Genet.*, **34**, 440–445.
254. Dameron, K.M., Volpert, O.V., Tain-sky, M.A., Bouck, N. (1994) *Science*, **265**, 1582–1584.
255. Van Meir, E.G., Polverini, P.J., Chazin, V.R., Su Huang, H.J., de Tribolet, N., Cavenee, W.K. (1994) *Nat. Genet.*, **8**, 171–176.
256. Nishimori, H., Shiratsuchi, T., Urano, T., Kimura, Y., Kiyono, K., Tatsumi, K., Yoshida, S., Ono, M., Kuwano, M., Nakamura, Y., Tokino, T. (1997) *Oncogene*, **15**, 2145–2150.
257. Mashimo, T., Watabe, M., Hirota, S., Hosobe, S., Miura, K., Tegtmeier, P.J., Rinker-Shaeffer, C.W., Watabe, K. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11307–11311.
258. Bian, J., Sun, Y. (1997) *Mol. Cell Biol.*, **17**, 6330–6338.
259. Zou, Z., Gao, C., Nagaich, A.K., Connell, T., Saito, S., Moul, J.W., Seth, P., Appella, E., Srivastava, S. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 6051–6054.
260. Kunz, C., Pebler, S., Otte, J., von der Ahe, D. (1995) *Nucleic Acids Res.*, **23**, 3710–3717.
261. Komarova, E.A., Diatchenko, L., Rokhlin, O.W., Hill, J.E., Wang, Z.J., Krivokrysenko, V.I., Feinstein, E., Gudkov, A.V. (1998) *Oncogene*, **17**, 1089–1096.
262. Alberts, B. Garland Science, New York, **2008**.
263. Gottlieb, T.M., Oren, M. (1998) *Semin. Cancer Biol.*, **8**, 359–368.
264. Vousden, K.H., Lu, X. (2002) *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 594–604.
265. Vousden, K.H. (2000) *Cell*, **103**, 691–694.
266. Miyashita, T., Reed, J.C. (1995) *Cell*, **80**, 293–299.
267. Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., Tanaka, N. (2000) *Science*, **288**, 1053–1058.
268. Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (2001) *Mol. Cell*, **7**, 673–682.

269. Fortin, A., Cregan, S.P., MacLaurin, J.G., Kushwaha, N., Hickman, E.S., Thompson, C.S., Hakim, A., Albert, P.R., Ceconi, F., Helin, K., Park, D.S., Slack, R.S. (2001) *J. Cell Biol.*, **155**, 207–216.
270. Moroni, M.C., Hickman, E.S., Lazzerini Denchi, E., Caprara, G., Colli, E., Ceconi, F., Muller, H., Helin, K. (2001) *Nat. Cell Biol.*, **3**, 552–558.
271. Robles, A.I., Bemmels, N.A., Foraker, A.B., Harris, C.C. (2001) *Cancer Res.*, **61**, 6660–6664.
272. Owen-Schaub, L.B., Zhang, W., Cusack, J.C., Angelo, L.S., Santee, S.M., Fujiwara, T., Roth, J.A., Deisseroth, A.B., Zhang, W.W., Kruzel, E., et al. (1995) *Mol. Cell Biol.*, **15**, 3032–3040.
273. Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald, E.R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R., Hamilton, S.R., Spinner, N.B., Markowitz, S., Wu, G., et al. (1997) *Nat. Genet.*, **17**, 141–143.
274. Attardi, L.D., Reczek, E.E., Cosmas, C., Demicco, E.G., McCurrach, M.E., Lowe, S.W., Jacks, T. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 704–718.
275. Lin, Y., Ma, W., Benchimol, S. (2000) *Nat. Genet.*, **26**, 122–127.
276. Fiscella, M., Zhang, H., Fan, S., Sakaguchi, K., Shen, S., Mercer, W.E., Vande Woude, G.F., O'Connor, P.M., Appella, E. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6048–6053.
277. Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1997) *Nature*, **389**, 300–305.
278. Hwang, P.M., Bunz, F., Yu, J., Rago, C., Chan, T.A., Murphy, M.P., Kelso, G.F., Smith, R.A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (2001) *Nat. Med.*, **7**, 1111–1117.
279. Valencia-Sanchez, M.A., Liu, J., Hannon, G.J., Parker, R. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 515–524.
280. Chang, T.C., Wentzel, E.A., Kent, O.A., Ramachandran, K., Mullen-dore, M., Lee, K.H., Feldmann, G., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Lowenstein, C.J., Arking, D.E., Beer, M.A., Maitra, A., Mendell, J.T. (2007) *Mol. Cell.*, **26**, 745–752.
281. He, L., He, X., Lim, L.P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., Jackson, A.L., Linsley, P.S., Chen, C., Lowe, S.W., Cleary, M.A., Hannon, G.J. (2007) *Nature*, **447**, 1130–1134.
282. Raver-Shapira, N., Marciano, E., Meiri, E., Spector, Y., Rosenfeld, N., Moskovits, N., Bentwich, Z., Oren, M. (2007) *Mol. Cell*, **26**, 731–743.
283. Tarasov, V., Jung, P., Verdoodt, B., Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., Meister, G., Hermeking, H. (2007) *Cell Cycle*, **6**.
284. Hussain, S.P., Amstad, P., He, P., Robles, A., Lupold, S., Kaneko, I., Ichimiya, M., Sengupta, S., Mechanic, L., Okamura, S., Hofseth, L.J., Moake, M., Nagashima, M., Forrester, K.S., Harris, C.C. (2004) *Cancer Res.*, **64**, 2350–2356.
285. Yan, W., Chen, X. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 7856–7862.
286. Yoon, K.A., Nakamura, Y., Arakawa, H. (2004) *J. Hum. Genet.*, **49**, 134–140.
287. Velasco-Miguel, S., Buckbinder, L., Jean, P., Gelbert, L., Talbott, R., Laidlaw, J., Seizinger, B., Kley, N. (1999) *Oncogene*, **18**, 127–137.
288. Budanov, A.V., Shoshani, T., Faerman, A., Zelin, E., Kamer, I., Kalinski, H., Gorodin, S., Fishman, A., Chajut, A., Einat, P., Skaliter, R., Gudkov, A.V., Chumakov, P.M., Feinstein, E. (2002) *Oncogene*, **21**, 6017–6031.
289. Budanov, A.V., Sablina, A.A., Feinstein, E., Koonin, E.V., Chumakov, P.M. (2004) *Science*, **304**, 596–600.
290. Rhee, S.G., Kang, S.W., Jeong, W., Chang, T.S., Yang, K.S., Woo, H.A. (2005) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 183–189.

291. Sablina, A.A., Budanov, A.V., Ilyinskaya, G.V., Agarova, L.S., Kravchenko, J.E., Chumakov, P.M. (2005) *Nat. Med.*, **11**, 1306–1313.
292. Kopnin, P.B., Agarova, L.S., Kopnin, B.P., Chumakov, P.M. (2007) *Cancer Res.*, **67**, 4671–4678.
293. Warburg, O.H. (1947) *Abh. der Deutschen Akad. der Wissenschaften zu Berlin*
294. Matoba, S., Kang, J.G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J., Bunz, F., Hwang, P.M. (2006) *Science*, **312**, 1650–1653.
295. Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., Vousden, K.H. (2006) *Cell*, **126**, 107–120.
296. Bensaad, K., Vousden, K.H. (2007) *Trends Cell Biol.*, **17**, 286–291.
297. Erster, S., Mihara, M., Kim, R.H., Petrenko, O., Moll, U.M. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 6728–6741.
298. Leu, J.I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., George, D.L. (2004) *Nat. Cell Biol.*, **6**, 443–450.
299. Marchenko, N.D., Zaika, A., Moll, U.M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 16202–16212.
300. Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., Moll, U.M. (2003) *Mol. Cell*, **11**, 577–590.
301. Moll, U.M., Wolff, S., Speidel, D., Deppert, W. (2005) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 631–636.
302. Marchenko, N.D., Wolff, S., Erster, S., Becker, K., Moll, U.M. (2007) *Embo J.*, **26**, 923–934.
303. Schuler, M., Green, D.R. (2005) *Trends Genet.*, **21**, 182–187.
304. Dumont, P., Leu, J.I., Della Pietra, A.C., 3rd, George, D.L., Murphy, M. (2003) *Nat. Genet.*, **33**, 357–365.
305. Chipuk, J.E., Green, D.R. (2006) *Cell Death. Differ.*, **13**, 994–1002.
306. Moll, U.M., Marchenko, N., Zhang, X.K. (2006) *Oncogene*, **25**, 4725–4743.
307. Harris, S.L., Levine, A.J. (2005) *Oncogene*, **24**, 2899–2908.
308. Honda, R., Yasuda, H. (1999) *Embo J.*, **18**, 22–27.
309. Zhu, J.W., DeRyckere, D., Li, F.X., Wan, Y.Y., DeGregori, J. (1999) *Cell Growth Differ.*, **10**, 829–838.
310. Damalas, A., Kahan, S., Shtutman, M., Ben-Ze'ev, A., Oren, M. (2001) *Embo J.*, **20**, 4912–4922.
311. Datta, A., Nag, A., Pan, W., Hay, N., Gartel, A.L., Colamonici, O., Mori, Y., Raychaudhuri, P. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 36698–36707.
312. Sugimoto, M., Kuo, M.L., Roussel, M.F., Sherr, C.J. (2003) *Mol. Cell*, **11**, 415–424.
313. Xiao, Z.X., Chen, J., Levine, A.J., Modjtahedi, N., Xing, J., Sellers, W.R., Livingston, D.M. (1995) *Nature*, **375**, 694–698.
314. Yamasaki, L. (2003) *Cancer Treat. Res.*, **115**, 209–239.
315. Feng, Z., Hu, W., de Stanchina, E., Teresky, A.K., Jin, S., Lowe, S., Levine, A.J. (2007) *Cancer Res.*, **67**, 3043–3053.
316. Levine, A.J., Feng, Z., Mak, T.W., You, H., Jin, S. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 267–275.
317. Shaw, R.J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R.L., Witters, L.A., DePinho, R.A., Cantley, L.C. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3329–3335.
318. Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., Guan, K.L. (2002) *Nat. Cell Biol.*, **4**, 648–657.
319. Lum, J.J., Bauer, D.E., Kong, M., Harris, M.H., Li, C., Lindsten, T., Thompson, C.B. (2005) *Cell*, **120**, 237–248.
320. Hay, N., Sonenberg, N. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 1926–1945.
321. Thomas, G. (2002) *Biol. Res.*, **35**, 305–313.
322. Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M. (2005) *Science*, **307**, 1098–1101.

323. Zhang, Y., Gao, X., Saucedo, L.J., Ru, B., Edgar, B.A., Pan, D. (2003) *Nat. Cell Biol.*, **5**, 578–581.
324. Christophorou, M.A., Ringshausen, I., Finch, A.J., Swigart, L.B., Evan, G.I. (2006) *Nature*, **443**, 214–217.
325. Efeyan, A., Garcia-Cao, I., Herranz, D., Velasco-Miguel, S., Serrano, M. (2006) *Nature*, **443**, 159.
326. Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., Orntoft, T., Lukas, J., Bartek, J. (2005) *Nature*, **434**, 864–870.
327. Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Ditullio, R.A., Jr., Kastrinakis, N.G., Levy, B., Kletsas, D., Yoneta, A., Herlyn, M., Kittas, C., Halazonetis, T.D. (2005) *Nature*, **434**, 907–913.
328. Capri, M., Salvioli, S., Sevini, F., Valensin, S., Celani, L., Monti, D., Pawelec, G., De Benedictis, G., Gonos, E.S., Franceschi, C. (2006) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1067**, 252–263.
329. Depp, C.A., Glatt, S.J., Jeste, D.V. (2007) *Curr. Psychiatry Rep.*, **9**, 7–13.
330. Guarente, L. (2005) *Mech. Ageing Dev.*, **126**, 923–928.
331. Beckman, K.B., Ames, B.N. (1998) *Physiol. Rev.*, **78**, 547–581.
332. Droge, W. (2002) *Physiol. Rev.*, **82**, 47–95.
333. Tyner, S.D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., Hee Park, S., Thompson, T., Karsenty, G., Bradley, A., Donehower, L.A. (2002) *Nature*, **415**, 45–53.
334. Garcia-Cao, I., Garcia-Cao, M., Martin-Caballero, J., Criado, L.M., Klatt, P., Flores, J.M., Weill, J.C., Blasco, M.A., Serrano, M. (2002) *Embo J.*, **21**, 6225–6235.
335. Mendrysa, S.M., O'Leary, K.A., McElwee, M.K., Michalowski, J., Eisenman, R.N., Powell, D.A., Perry, M.E. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 16–21.
336. Bukhman, V.L., Ninkina, N.N., Chumakov, P.M., Khilenkova, M.A., Samarina, O.P. (1987) *Genetika*, **23**, 1547–1554.
337. van Heemst, D., Mooijaart, S.P., Beekman, M., Schreuder, J., de Craen, A.J., Brandt, B.W., Slagboom, P.E., Westendorp, R.G. (2005) *Exp. Gerontol.*, **40**, 11–15.
338. Campisi, J. (2003) *Nat Rev Cancer*, **3**, 339–349.
339. Crighton, D., Wilkinson, S., Ryan, K.M. (2007) *Autophagy*, **3**, 72–74.
340. Terman, A., Gustafsson, B., Brunk, U.T. (2007) *J. Pathol.*, **211**, 134–143.
341. Saretzki, G., Von Zglinicki, T. (2002) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **959**, 24–29.
342. Pletjushkina, O.Y., Fetisova, E.K., Lyamzaev, K.G., Ivanova, O.Y., Domnina, L.V., Vyssokikh, M.Y., Pustovidko, A.V., Vasiliev, J.M., Murphy, M.P., Chernyak, B.V., Skulachev, V.P. (2005) *Cell Death Differ.*, **12**, 1442–1444.
343. Poli, G., Parola, M. (1997) *Free Radic. Biol. Med.*, **22**, 287–305.