

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00539

突变 p53 功能研究新进展与个性化的肿瘤治疗新策略

陆思千, 贾舒婷, 罗瑛

昆明理工大学生命科学与技术学院, 衰老与肿瘤分子遗传学实验室, 昆明 650224

摘要: p53 是迄今为止研究最多的一种抑癌蛋白, 最新研究仍在不断地揭示 p53 在调控机体代谢、生殖方面的新功能。同时, 也揭示了不同 p53 突变蛋白的获得性新功能在肿瘤发生中的促进作用。这些研究对于了解 p53 突变的个性化新功能, 寻找再激活野生型 p53, 校正突变 p53 的新途径奠定了基础, 不同突变 p53 蛋白的个性化治疗将是未来肿瘤治疗的热点。文章综述了已发现的一些突变 p53 的获得性新功能, 及针对不同的 p53 功能缺陷进行的 p53 蛋白功能再激活的策略: 通过小分子或多肽再激活肿瘤细胞中的 p53 突变蛋白的野生型功能; 通过重组的腺病毒在肿瘤细胞中表达野生型 p53 蛋白; 通过抑制 MDM2 与 p53 的相互作用稳定野生型 p53 蛋白。对 p53 不同位点突变的深入研究可以帮助我们制定更合理的个性化治疗方案, 寻求更有效的肿瘤治疗新途径。

关键词: 抑癌蛋白; p53 突变; 个性化治疗; p53 蛋白功能再激活; 肿瘤治疗

Recent advances in mutant p53 and novel personalized strategies for cancer therapy

LU Si-Qian, JIA Shu-Ting, LUO Ying

Lab of Molecular Genetics of Aging and Tumor, Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China

Abstract: Protein p53 is the most intensively studied tumor suppressor protein. Recent studies keep revealing its new function in metabolism and reproduction. At the same time, it is also found that varieties of p53 mutant gained new function in promoting tumorigenesis. These studies provide the basis for understanding the personalized gain of function of p53 mutants and help us searching for the new strategies for reactivation of wild-type p53 and correction of the function of p53 mutants. The personalized treatment targeting different p53 mutants will be the focus for cancer treatment. Here, we reviewed the discovered gain of function of some p53 mutants and the molecular strategies for reactivating wild type p53 function: by use of small molecules or polypeptides to reactivate the wild type function of p53 mutants in tumor cells; by exogenous expression of wild type p53 carried by recombinant adenovirus in tumor cells; and by inhibition the interaction between p53 and mdm2 to stabilize wild type p53 proteins. Further study of variety of p53 point mutations facilitates designing more effectively personalized strategies in the cancer therapy.

Keywords: tumor suppressor protein; p53 mutations; personalized strategy; reactivation of mutant p53; cancer therapy

收稿日期: 2010-08-26; 修回日期: 2011-03-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30771194, 30970598), 云南省教育厅科学研究基金项目(编号: 09J0001)和教育部新世纪优秀人才项目资助

作者简介: 陆思千, 博士研究生, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: lusiqian@yahoo.com.cn

通讯作者: 罗瑛, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: luoyingabc@yahoo.com

网络出版时间: 2011-4-19 9:20:21

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110419.0920.004.html>

1979 年研究者观察到一种与 SV40 病毒大 T 抗原相结合分子量约 53 kDa 的蛋白^[1,2], 并发现该蛋白在肿瘤细胞内表达水平很高^[3], 研究者将其命名为 p53, 从此开始了对 p53 的研究。在对该蛋白进行研究的前十年内, p53 一直被看作一种肿瘤抗原, 其编码基因 *TP53* 被认为是一种原癌基因。直到 80 年代后期, 大量的实验才最终证明了之前在大多数肿瘤细胞中发现的高表达的 p53 是以突变形式存在的, 而野生型的 *TP53* 实际上是一种抑癌基因^[4]。随后的研究进一步表明, p53 蛋白是一个非常重要的转录调控因子, 正常情况下细胞内 p53 蛋白的含量很低, 这主要是由于 MDM2(Murine double minute)介导的 p53 快速降解来调节的。当应激各种损伤信号时, p53 蛋白被磷酸化修饰, 避免了在细胞质中发生的 MDM2 对 p53 的降解, 从而使核内的 p53 水平迅速升高。激活的 p53 通过其 DNA 结合区结合靶基因的启动子, 并借助其转录激活区诱导其下游基因的转录表达, 进而诱导 DNA 损伤修复、细胞周期抑制、细胞衰老和细胞凋亡等生物效应。

TP53 突变在肿瘤发生中是非常常见的, 不同位点的点突变产生了多种形式的突变 p53 蛋白。以往认为, 突变 p53 失去野生型 p53 的转录激活功能(Loss of function), 不能有效激活 p53 下游的 DNA 损伤应激反应途径, 进而失去了肿瘤抑制功能。但最新的研究发现, 某些突变 p53 还具有获得性功能(Gain of function, GOF), 这些新功能包括负显性(Dominant negative)抑制野生型 p53 的活性以及诱导某些异常基因表达进而促进肿瘤的发生等。由于突变 p53 在肿瘤细胞中通常有较高水平的表达, 从而成为区别于正常细胞的一个特异性抗肿瘤靶点。对突变 p53 的结构及其获得性功能的研究是了解肿瘤发生和发展原理, 以及寻找肿瘤治疗新药物的重要途径。

1 p53 突变及其在肿瘤发生中的促进作用

p53 由 N 端的转录激活区, 中间的 DNA 结合区以及 C 端的多聚体区组成。研究发现约有 50% 以上的肿瘤患者 *TP53* 发生了突变^[5], 约 70%~80% 的肺癌患者有 *TP53* 突变。统计分析发现, 约 80% 的 *TP53* 突变是单核苷酸点突变, 其中约 73% 的单核苷酸点突变产生与野生型 p53 有一个氨基酸不同的突变 p53(即错义突变), 还有约 7% 的突变为无义突变。

p53 作为一个转录激活因子, 首先通过 C 端的多聚体区结合形成同源四聚体, 然后其 DNA 结合区与 DNA 结合, 反式激活下游基因的表达。*TP53* 错义突变, 特别是突变位点位于编码 DNA 结合区内的错义突变通常导致 p53 三维结构改变, 改变了其 DNA 结合能力。Basse 等^[6]对多种 p53 点突变进行了研究, M133L、V203A、N239Y 和 N268D 这 4 种突变 p53 的 DNA 结合区和野生型 p53 相似, 因而保存了 DNA 结合能力。而另一种突变体 R249S 导致了 p53 的 L3loop 区构象改变, 失去了 DNA 结合能力, Y220C 突变蛋白也有类似的改变。以上突变都改变了 p53 的三维结构, 而 R273H 突变失去 DNA 结合能力是因为 273 位突变后的精氨酸残基支链过长, 空间效应抑制了和 DNA 的结合^[7]。这些研究证明了 p53 核心结构域对其 DNA 结合能力的重要影响。而 *TP53* 无义突变则可造成 p53 翻译提前终止, 导致其 C 端多聚体结构域的缺失, 不能形成四聚体形式, 从而失去了转录激活功能。

最新的研究发现某些突变形式的 p53 蛋白能够在肿瘤细胞的核内积累, 形成更稳定的四聚体^[8]。以往的研究证明 p53 在正常细胞内含量很低, 野生型 p53 是通过修饰避免了水解从而得到激活, 而突变 p53 是怎样避免水解的呢? 研究发现, MDM2 作为 p53 最主要的负调控因子, 它的转录表达处于 p53 的控制之下。突变 p53 不能有效激活 MDM2 表达, 使 p53 失去了 MDM2 的负调控, 从而导致了突变 p53 在肿瘤细胞的核内积累^[9]。这一发现提示突变 p53 形成的四聚体可能具有与野生型 p53 不同的转录激活功能。

在一些肿瘤细胞中, 突变 p53 不仅仅只是失去了肿瘤抑制功能, 而且还能促进肿瘤的发生和发展, 称为获得性新功能(GOF)。Heinlein 等^[10]通过转基因小鼠研究了 R270H 突变在乳腺癌发展中的作用。在该模型中, SV40 大 T 抗原和突变 p53 表达处于小鼠乳清蛋白 WAP 启动子的控制下, 野生型 p53 被 SV40 大 T 抗原结合从而被抑制, 而突变 p53 不被 SV40 大 T 抗原识别, 这样就可以在乳腺组织中研究突变 p53 的功能而不受到野生型 p53 的影响。在这一模型中, 突变 p53 导致了乳腺肿瘤的数量和扩散能力整体提高了, 但并不影响基因组稳定性。在另一个实验中, Bossi 等^[11]通过一个可诱导 shRNA 重组

病毒载体抑制内源 R175H 或 R273H 突变的研究发现, 抑制突变能延迟肿瘤形成和肿瘤血管形成。这两个体内研究证明了突变 p53 在肿瘤发生中的促进作用, 我们实验室发现的一个 TP53 突变在肿瘤发生中与 RAS 有协同作用, 进一步的研究还在进行中。然而, 对突变 p53 的 GOF 机制仍存在一些争论, p53 仅失活也能促进肿瘤发展^[12], 在 p53 敲除的小鼠模型中就经常观察到肿瘤的发生与发展。Gadea 等^[12]发现, 仅野生型 p53 的失活就能增加细胞转移能力。并且, Bougeard 等^[13]发现在 Li-Fraumeni 患者中, TP53 的缺失与一些含 p53 热点突变的患者的在肿瘤性状上相似。这些发现证明了某些类型的突变 p53 对肿瘤的发生和发展有促进作用, 这些新功能是如何获得的呢?

最近的研究发现某些突变 p53 能在一定程度上控制或部分控制某些基因表达。Scian 等^[14]观察到, 在 H1299 细胞中引入 R175H, R273H 或 D281G 突变能激活 NF-kappaB2 途径, 使其具有了耐药性。在 H1299 细胞中, 沉默(Knock down)NF-kappaB2 能使具有依托泊甙(Etoposide)、顺铂(Cisplatin)、卡铂(Carboplatin)等耐药性的细胞重新对这些药物敏感, 这说明突变 p53 可能通过 NF-kappaB2 途径降低了肿瘤细胞的药物敏感性。通过在 H1299 细胞中表达突变 R175H, Strano 等^[15]证明该突变能促进 ID4 基因表达, 同时在小鼠体内诱导 ID-4 依赖的新血管生成。这些发现证明了突变 p53 诱导的异常基因的表达在促进肿瘤发生和发展中起作用。突变 p53 是如何诱导异常基因表达的呢? 研究推测突变 p53 蛋白并不直接与 DNA 结合, 可能是通过突变 p53 蛋白-突变 p53 结合蛋白相互作用并通过突变 p53 结合蛋白序列特异性与 DNA 结合。一些突变 p53 结合蛋白已经被证明, 如 E2F1 帮助 R175H 结合到 ID4 启动子上^[16], 其他还有 NF-Y 因子、p65 等。维生素 D3 在野生型 p53 细胞中有促凋亡作用, 但在一些表达突变 p53 细胞系中却表现出抗凋亡作用。Stambolsky 等^[17]发现 R175H 突变蛋白能与维生素 D3 受体免疫共沉淀, 后续研究发现 R175H 能结合到维生素 D3 受体上诱发了维生素 D3 受体介导的抗凋亡反应。突变 p53 R175H 与维生素 D3 受体的结合使维生素 D3 的目的基因发生了改变, 从而使维生素 D3 从一个促凋亡因子变为抗凋亡因子。尽管维生素 D3 和它的衍生物

在肿瘤治疗中的应用已经在研究中, p53 对它的影响也应该进一步研究。

在各种肿瘤发生和发展中, 是 p53 突变从而获得新的功能还是 p53 失活或者二者协同作用引起的需要进一步研究。通过转基因 R172H 小鼠模型, Caulin 等^[18]证明了野生型 p53 和突变 p53 受到相似的调控, 同时突变 p53 必须要稳定才能具有 GOF 活性, 这也可能解释了为什么在实验中很多突变 p53 GOF 是在突变 p53 过量表达的系统中才能观察到。突变 p53 在促进肿瘤中的作用仍然需要进一步研究。

2 肿瘤治疗新策略: 肿瘤细胞内重新激活 p53

由上所述, p53 突变和 p53 失活都将使 p53 失去肿瘤抑制功能, 而且突变 p53 还具有了获得性功能(GOF), 对肿瘤发展有促进作用。因此在肿瘤细胞中重新激活野生型 p53 和使突变 p53 恢复野生型 p53 功能将是未来肿瘤治疗中的一个重要方向。

Lowe 等^[19]对小鼠 DNA 损伤引起的肿瘤治疗研究中, 首次证明了 p53 介导的细胞凋亡能有效抑制肿瘤发展。从此, 对 p53 诱导细胞凋亡的研究证明了 p53 通过调控下游许多凋亡诱导因子的表达, 如 BAX、PUMA、Apaf-1、BID、Noxa、CD95、PERP、PIDD、PIGs 等, 进而诱导细胞凋亡^[20]。有趣的是, p53 在肿瘤清除的作用是依赖于肿瘤种类的, 如淋巴瘤主要通过 p53 介导的细胞凋亡清除^[21], 而肉瘤则主要通过 p53 介导的细胞衰老进行清除^[22]。

目前在肿瘤细胞中重新激活 p53 的途径主要有: 通过小分子或多肽校正突变 p53 蛋白, 在体内重新激活 p53 途径; 引入编码野生型 p53 的重组腺病毒载体, 直接在体内表达野生型 p53; 通过抑制 MDM2 从而稳定细胞中的 p53 水平, 见图 1。

2.1 小分子和多肽再激活 p53

绝大多数的 TP53 突变是错义突变, 这些突变位点多发生在 p53 的 DNA 结合结构域, 导致突变的 p53 不能与 DNA 正常结合, 失去了转录激活能力, 进而失去了肿瘤抑制的能力。通过对乳腺癌和肠癌的研究发现, TP53 在这些肿瘤中发生突变的频率很高^[23]。1993 年, Hupp 等^[24]发现引入 DnaK 与突变 p53 结合可以恢复其 DNA 结合功能, 这是最早的在肿瘤细胞中突变 p53 再激活的证据。

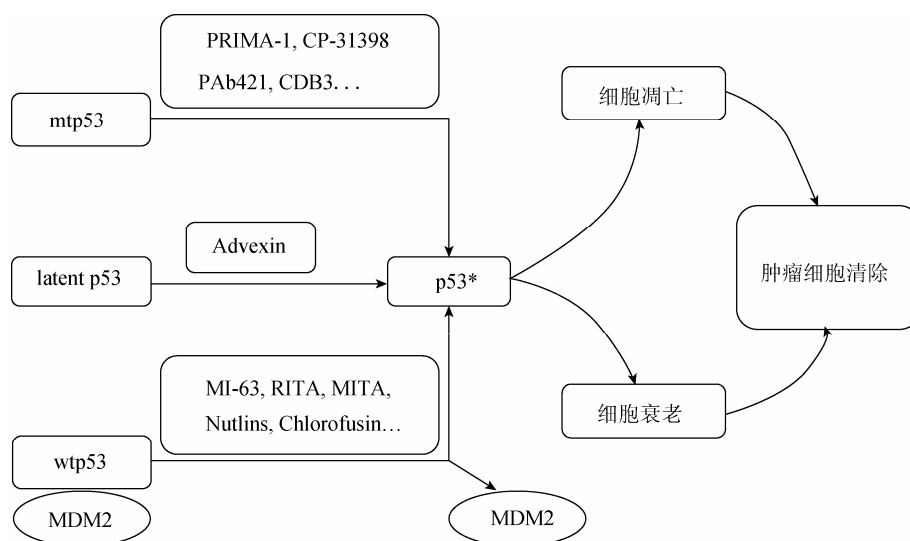


图 1 肿瘤细胞内重新激活 p53

wtp53: 野生型 p53; mtp53: 突变型 p53; latent p53: 微量或缺乏 p53; p53*: 激活的 p53。

2.1.1 引入多肽校正突变 p53

实验证明, 通过引入针对突变 p53 R273H、R273C、R248Q、R282W 的 C 末端设计的多肽, 通过其与突变蛋白的相互作用改变其构象能恢复突变 p53 对特定序列的 DNA 结合能力, 进而产生生长抑制或诱导凋亡^[25]。如常见的突变 R273H 可以通过显微注射 PAb421 抗体使突变 p53 恢复转录激活功能^[26]。一些单克隆抗体作用于 N 端抗原决定簇也能恢复突变 p53 的 DNA 结合能力^[27]。这些结果证明了一些 p53 突变类型可以通过引入多肽, 通过蛋白相互作用对其 C 端和 N 端进行特异性改造恢复突变 p53 的转录激活功能。目前, 一段根据 p53 C 端设计合成的多肽已被证明能够恢复一些热点突变 p53 蛋白的 DNA 结合和转录激活功能, 进而激活 p53 途径, 诱发细胞凋亡^[28], 这一结果可能是因为该多肽稳定了 p53 的核心折叠构象, 加强了与 DNA 的结合能力^[29]。最近, 在患腹腔癌和腹腔淋巴瘤的小鼠模型中, 通过注射表达该 p53C 端多肽的重组腺病毒, 可以观察到明显的肿瘤抑制效果^[30]。

p53 核心结构域(DNA 结合区)对 p53 发挥其抑癌作用起关键作用, 因此可以设想如果能稳定野生型 p53 的核心结构域和校正突变 p53 的核心结构域就能使其发挥抑癌作用。Friedler 等^[31]最早从事了对作用于校正突变 p53 核心结构域的多肽的设计。这一策略的构想是找到一种配基, 能正确与突变 p53

核心结构域结合, 并且能通过其结合改变突变 p53 的核心结构域, 使它的折叠构象向正确方向转变。ASPP(53BP2)是 p53 结合蛋白, 能与 p53 相互作用, 并与核心结构域作用并增强 p53 的转录激活能力, 有效激活 p53 的细胞凋亡途径^[32]。由 9 个氨基酸残基组成的多肽 CDB3, 就是根据 p53 核心结构域与 ASPP/53BP2 的结合设计的^[33], NMR 分析证明 CDB3 结合到突变 p53 核心结构域上并引起突变 p53 的核心折叠结构发生改变^[31], 体外实验证明 CDB3 能恢复某些突变 p53 的特异序列 DNA 结合功能, 如高度不稳定的突变 I195T^[34]。有趣的是, CDB3 还能促进野生 p53 和突变 p53 在细胞内的积累, 它在重新激活 p53 中的作用和机制值得进一步研究。

p53 蛋白的稳定还与细胞内的分子伴侣有关, 研究发现 p53 能与 Hsp40, Hsp70 和 Hsp90 结合^[35]。未折叠的突变 p53 与 Hsp70 有高亲和力, 远超过野生型 p53^[36], 这一发现提示我们, Hsp 蛋白可能稳定了突变 p53 的未折叠构象, 因此阻止 Hsp 蛋白与突变 p53 的结合有可能使突变 p53 恢复折叠构象。一些抗肿瘤抗生素如格尔德霉素能抑制 Hsp90 依赖的 p53 非折叠, 作用于 Hsp90 的小分子化合物研究已经进入临床试验阶段^[37]。

2.1.2 作用于突变 p53 的小分子

相比多肽来说, 小分子治疗拥有更多优势, 如不易引起免疫排斥反应, 使用方便, 可静脉注射或

口服等, 因此寻找有效的小分子就显得尤为重要。对作用于突变 p53 的小分子的寻找有两个主要途径: 蛋白分子水平分析和细胞水平效应分析, 前一种方法可以确认突变 p53 蛋白与小分子作用后的蛋白变化和了解相应的机制, 但不能确定该小分子是否能进入细胞及是否有细胞毒性等; 而后一种方法可以观察到小分子作用后细胞的变化, 是否能诱导细胞凋亡等, 但却不容易解释详细的分子机制。

通过以上两种方法, 目前找到了一些作用于突变 p53 的小分子化合物, 如 CP-31398、PRIMA-1、MIRA-1 等。CP-31398^[38]是在热变性条件下, 从大量小分子中筛选出的能保护 p53 核心结构域的小分子, 而 PRIMA-1、MIRA-1 这两个小分子则是通过筛选能引起表达突变 p53 的肿瘤细胞凋亡的小分子发现的^[39]。在体外, 这些小分子能激活 p53 的正常功能, 诱导 p53 目的基因如 *p21*、*MDM2* 和 *PUMA* 等的表达, 而且 CP-31398、PRIMA-1 还能在小鼠体内抑制肿瘤生长。

CP-31398 的作用机制目前还未阐明, 虽然 CP-31398 能稳定 p53 核心结构域, 但 NMR 分析未发现 CP-31398 与 p53 核心结构域的结合^[40]。研究还发现, CP-31398 能通过防止 p53 泛素化从而增高了细胞内的 p53 水平, 并且与以往发现的机制不同, 并未发现 MDM2 和 p53 的磷酸化^[41], 同时 CP-31398 还能影响某些基因表达和引起细胞死亡, 该凋亡可以不依赖于 p53 途径^[42], 证明可能还有其他机制来诱导细胞死亡。

在 Saos2- R273H 和 H1299- R175H 细胞中, PRIMA-1 都使突变 p53 重新折叠为和野生型 p53 一样的构象^[43], PRIMA-1 完全抑制了 Saos2-R273H 细胞的生长, 但只是轻微减缓了 Sao2 细胞的生长, 这可能是由于突变 R273H 蛋白在肿瘤细胞中拥有较高含量。研究还发现 PRIMA-1 能有效激活 *GADD45* 和 *NOXA* 基因的转录。在免疫缺陷小鼠中, PRIMA-1 能通过激活 p53 抑制移植肿瘤。最近研究还发现 PRIMA-1 能诱导 Hsp90 的表达, Hsp90 与突变 p53 结合形成复合物, 该复合物具有野生型 p53 的转录激活功能, 能有效激活 p53 下游基因表达^[44]。为了了解 PRIMA-1 诱导的细胞凋亡详细的分子机制, Rokaeus 等^[45]引入了 PRIMA-1(MET), 研究发现 PRIMA-1(MET)能改变突变 p53 及早幼粒性细胞白

血病(PML)相关蛋白、cAMP 结合蛋白(CBP)和 Hsp70 等蛋白在核仁内的重新分布。最新研究还证明在 Saos2-R273H 细胞中, PRIMA-1(MET)能改变突变 p53 的构象从而重新激活 p53 介导的细胞凋亡^[46]。PRIMA-Dead 作为 PRIMA-1MET 结构类似物不能引起突变 p53 及 PML 在核仁内的重新分布, 这一发现提示突变 p53 在核仁内的分布及突变 p53 与 PML 相关蛋白、CBP、Hsp70 的相互作用在恢复 p53 功能中有重要作用。进一步的研究发现, PRIMA-1 能诱导突变 p53 依赖的细胞凋亡但却没有转录和蛋白合成, 甚至不需要细胞核^[47], 这一观点在 PRIMA-1 通过 JNK 途径诱导凋亡中得到了证实^[48]。因此, PRIMA-1 可能通过其他途径诱导凋亡。

CP-31398 与 PRIMA-1 在重新激活 p53 的机制完全不同, 但它们都能增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 尤其是携带野生型 p53 的肿瘤细胞。在体内和体外实验中发现, CP31398 与 adriamycin 或 cisplatin, PRIMA-1MET 与 adriamycin, cisplatin 和 fludarabine 有协同作用^[41, 49]。这在肿瘤治疗中很有意义, 可以通过组合治疗可以减少用药量和相对更少的副作用。

作用于突变 p53 的小分子还包括 WR1065, 该分子能通过清除自由基和其他未知机制保护正常细胞在放射性下不受伤害, 而肿瘤细胞却被放射性杀死。而且在 37 °C 下, WR1065 还能部分改变温度敏感突变 p53 V272M 的构象, 使其恢复正常构象, 进而激活其 DNA 结合活性并诱导 p53 目的基因 *p21*、*GADD45* 和 *MDM2* 的表达, 导致细胞周期 G1 停滞^[50]。

MIRA-1 及其相关化合物都包含一个顺丁烯二酰亚胺基团, 该基团能与蛋白中的硫基和氨基反应, 有趣的是在该基团中存在 3-4 个双键是对突变 p53 起作用必须的^[49]。人类 p53 含 10 个半胱氨酸, 都位与核心结构域内, p53 也要受氧化还原反应的控制^[51], 因此可以假设通过对半胱氨酸的修饰在恢复突变 p53 构象和功能上有作用, 半胱氨酸的修饰可能导致分子间或分子内形成二硫键, 促进蛋白构象改变或抑制蛋白水解, 进一步的研究正在进行中。

2.2 重组的腺病毒在肿瘤细胞中表达野生 p53

通过重组包含 p53cDNA 的腺病毒 Advexin, 在肿瘤细胞中表达野生 p53 进而激活 p53 途径, 抑制

和清除肿瘤^[52]。选用 Advexin 载体是因为它能够转染多种细胞,包括分化和未分化的细胞,并且不会整合到宿主基因组上,同时它能够大批量生产,并且它的安全性已经得到证实^[53]。最近的一个女性 Li-Fraumeni syndrome 患者, p53 基因发生突变,体内产生多种原发肿瘤,并且转移到多个器官,在尝试了所有传统治疗无效后,她接受了含 p53 cDNA 的复制缺陷型 Advexin 的注射^[54]。Advexin 注射 7 天后,观察到 p53 在肿瘤细胞内表达,同时观察到 p21 等 p53 下游基因的表达增加,也观察到凋亡标记分子 cleaved caspase-3 的增加,凋亡抑制因子 BCL-2 减少。通过 positron emission tomography scanning 和 computed tomography scanning 分析证明肿瘤得到了控制,而未经治疗的肿瘤细胞严重恶化。

在 Advexin 的临床试验中,90 名颈鳞状细胞癌患者被分成 2 个组,一个组接受了肿瘤内注射重组表达野生 p53 的腺病毒 Advexin,并同时接受放射治疗;另一个组只接受放射治疗,8 周后,接受了重组腺病毒 Advexin 的小组中 64% 的患者症状得到了减轻,相比另一小组只有 20% 的患者症状得到减轻。这一结果证明了在人类肿瘤细胞中恢复 p53 活性进而激活 p53 途径在肿瘤治疗的作用^[55]。

2.3 抑制 MDM2 重新激活 p53

在人类肿瘤和癌细胞中,经常能观察到 MDM2 原癌基因的过度表达。MDM2 蛋白是研究最多的 p53 负控蛋白^[56],MDM2 是一种 E3 泛素连接酶,能够与 p53 结合进而促进 p53 水解,同时 MDM2 的 DNA 结合结构域与 p53 的转录激活域有重叠,因此会抑制 p53 的转录激活功能。在一些肿瘤细胞中,即使在野生 p53 存在的条件下,MDM2 的过度表达也能有效抑制 p53 的活性,从而失去对肿瘤的抑制能力^[57,58]。因此,抑制 MDM2 将是在肿瘤和癌细胞内重新激活 p53 途径的重要手段^[59]。p53-MDM2 复合物的空间晶体结构已经清楚^[60],它们之间的疏水间隙被 p53 的 3 个氨基酸 p53-Phe19, Leu26 和 Trp23 占据,因此可以设想一些小分子模拟这 3 个氨基酸和它们的方位来阻止 MDM2-p53 的相互作用。通过高通量分析和计算机模拟,发现了一些 MDM2-p53 阻断分子,如 Nutlins-3^[61]。在含野生 p53 并过度表达 MDM2 的野生型和肿瘤衍生的细胞系中,低浓度的 Nutlins-3 就

能有效激活 p53 途径,诱导细胞周期抑制和细胞凋亡。

MI-63 作为一种新发现的小分子,在含野生 p53 的前列腺癌细胞中抑制 p53-MDM2 相互作用有明显作用^[62]。以往的 p53-MDM2 抑制小分子多是根据他们之间的 3 个氨基酸 p53-Phe19、Leu26 和 Trp23 设计的,而 MI-63 的设计还加入了第 4 个氨基酸 Leu22,该氨基酸对 p53-MDM2 结合有重要作用。MI-63 高度亲和的结合到 MDM2 上,抑制 p53-MDM2 相互结合。除了对前列腺癌有作用外,MI-63 对小儿骨肉瘤及急性骨髓性白血病治疗中也显示出明显的肿瘤抑制作用^[62,63]。在 MI-63 处理过的小儿横纹肌肉瘤细胞中,p53 和 p21、BAX、caspase-3 等蛋白明显增加了,但在正常细胞中,p53 水平不受影响。在这些细胞中,MI-63 表现出比 Nutlins-3 更强的 p53-MDM2 抑制能力,更强的促凋亡能力,同时还发现 MI-63 与阿霉素有强协同作用^[62]。

绝大多数的 MDM2-p53 干扰小分子都是结合到 MDM2 上的来抑制 MDM2-p53 相互作用的,可看作 MDM2 的抗体。但 RITA(Reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis)不同,RITA 结合到 p53N 端,促进 p53 的积累,同时在体内外抑制 p53 与 MDM-2 的相互作用,因此 RITA 促进了 p53 下游基因的表达并能有效诱导凋亡,RITA 的肿瘤抑制能力是野生型 p53 依赖的^[64]。但这一解释遭到了质疑,最新的研究发现 RITA 在一些含 p53 热点突变的肿瘤治疗中重新激活了 p53 介导的细胞凋亡,也就是说 RITA 并不是完全野生型依赖的^[65]。RITA 稳定 p53 的机制还在研究中,Krajewski^[66] 通过 NMR 数据证明 RITA 并不是直接作用于 p53 而是通过其他机制稳定了 p53。通过细胞效应研究,RITA 的发现者们最近又找到一个新的小分子 MITA,该小分子分子量很低,能在多种人类肿瘤如肺癌、肠癌、乳腺癌细胞中引起细胞凋亡^[67]。MITA 能在体内外抑制 p53-MDM2 相互作用,进而稳定 p53 水平。

通过对具有干扰 MDM2-p53 的相互作用天然化合物进行筛选,发现如 Chlorofusin 分子等多种具有显著抗肿瘤活性的复杂大环天然产物,Chlorofusin 分子由非常见氨基酸组成的环肽部分和一个未见报道的发色团组成^[68]。对这些化合物的结构进行研究有助与未来化合物设计合成。

除了以上几种,目前已发现了多种作用于

MDM2-p53 阻断的化合物, 通过对它们结构的研究和试验, 以期找到更有效, 毒副作用更小的小分子。

3 p53 基因单核苷酸多态性在肿瘤发生中的作用

TP53 第 72 位密码子单核苷酸多态性(SNPs)C/G, 在不同种族间, 该等位基因频率表现出不同^[69], 如非洲人 p53 第 72 位密码子为 C 的频率为 33%, 而亚洲人为 50%, 欧洲人为 77%。可以观察到这一差异似乎与纬度有关, 最新的研究发现这一差异的出现与温度和紫外线强度有关。*TP53* 中 72 位密码子的多态性, 导致 2 种不同的 p53 蛋白 p53-密码子 72-Pro 和 p53-密码子 72-Arg^[70]。研究证明这些残基的不同将影响野生 p53 和突变 p53 蛋白诱导凋亡的能力。在表达野生 p53 的细胞中, 野生 p53-密码子 72-Arg 比 p53-密码子 72-Pro 在诱导凋亡中更为有效^[71], 随后的研究也发现, 在可诱导 p53 的等基因系中, 野生 p53-密码子 72-Arg 也表现出更强的凋亡诱导能力, 不管是不是接受化疗治疗。在 H1299 细胞系中, 野生 p53-密码子 72-Arg 在表现出更强的诱导凋亡的能力是因为它能增强与凋亡有关的因子基因的转录, 如 *PUMA*、*PERP* 和 *AIPI1*, 在表达野生 p53 但密码子 72 位不同的 B 细胞系中, 也观察到一样的情况, 这一差异可能是野生 p53-密码子 72-Pro 与 iASPP 蛋白的高亲和力有关^[72, 73]。有趣的是, 在突变 p53 中, 表达突变 p53-密码子 72-Pro 的细胞比表达突变 p53-密码子 72-Arg 的细胞更容易走向凋亡^[74]这可能是因为突变 p53-密码子 72-Arg 与 p73 的高亲和力, 从而抑制它引起凋亡^[75]。这些研究使我们了解到, 根据肿瘤或癌细胞中不同的 p53 突变, 以及不同病人在 p53 密码子 72 上的不同, 制定不同的治疗。那些保存野生 p53-密码子 72-Arg 的病人将在治疗中表现出更好的疗效和得到更大的存活几率, 而在突变 p53 中, 突变 p53-密码子 72-Pro 将更容易存活^[74]。

4 展望

TP53 突变是导致 p53 失活进而失去肿瘤抑制能力的主要原因, 对不同肿瘤细胞内 *TP53* 的突变位点进行分析和统计对了解肿瘤发生和发展的分子机制具有重要意义, 进而可针对 *TP53* 的突变位点设计个

性化的肿瘤治疗策略。目前根据 IARC 的统计可观察到 *TP53* 的一些点突变与某些肿瘤类型有高度相关性, 对 *TP53* 的突变特点及其相关肿瘤的研究将是未来肿瘤治疗的热点。

最新的研究还不断发现 p53 突变在肿瘤发展中的促进作用, 即突变 p53 蛋白的获得性功能, 这也诠释了以前发现的突变 p53 在一定程度上具有原癌基因的功能。突变 p53 的 GOF 机制很复杂, 包括与野生型 p53 的相互作用, 与其他转录调控因子的相互作用等等。且不同突变 p53 的 GOF 程度与机制有所不同, 并需要肿瘤细胞中的突变 p53 积累和保持在稳定水平, 对不同突变 p53 的 GOF 机制也需要进一步研究。

针对个性化突变 p53 的药物开发已经取了一些成果, 像 PRIMA-1, RITA 等药物已经进入了一期和二期临床试验, Advexin 已进入三期临床试验。更多新的药物等待开发, 以期找到疗效显著和毒副作用小的新药物。

参考文献(References):

- [1] Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 1979, 278(5701): 261-263.
- [2] Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 1979, 17(1): 43-52.
- [3] Rotter V, Witte ON, Coffman R, Baltimore D. Abelson murine leukemia virus-induced tumors elicit antibodies against a host cell protein, P50. *J Virol*, 1980, 36(2): 547-555.
- [4] Levine AJ, Finlay CA, Hinds PW. P53 is a tumor suppressor gene. *Cell*, 2004, 116(2 Suppl.): S67-S69.
- [5] Efeyan A, Serrano M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle*, 2007, 6(9): 1006-1010.
- [6] Basse N, Kaar JL, Settanni G, Joerger AC, Rutherford TJ, Fersht AR. Toward the rational design of p53-stabilizing drugs: probing the surface of the oncogenic Y220C mutant. *Chem Biol*, 2010, 17(1): 46-56.
- [7] Joerger AC, Ang HC, Fersht AR. Structural basis for understanding oncogenic p53 mutations and designing rescue drugs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(41): 15056-15061.

- [8] Joerger AC, Fersht AR. The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2(6): a000919.
- [9] Kato S, Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R, Ishioka C. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(14): 8424–8429.
- [10] Heinlein C, Krepulat F, Löhler J, Speidel D, Deppert W, Tolstonog GV. Mutant p53^{R270H} gain of function phenotype in a mouse model for oncogene-induced mammary carcinogenesis. *Int J Cancer*, 2008, 122(8): 1701–1709.
- [11] Bossi G, Lapi E, Strano S, Rinaldo C, Blandino G, Sacchi A. Mutant p53 gain of function: reduction of tumor malignancy of human cancer cell lines through abrogation of mutant p53 expression. *Oncogene*, 2006, 25(2): 304–309.
- [12] Gadea G, de Toledo M, Anguille C, Roux P. Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices. *J Cell Biol*, 2007, 178(1): 23–30.
- [13] Bougeard G, Brugières L, Chompret A, Gesta P, Charbonnier F, Valent A, Martin C, Raux G, Feunteun J, Bressac-de Paillerets B, Frébourg T. Screening for TP53 rearrangements in families with the Li-Fraumeni syndrome reveals a complete deletion of the TP53 gene. *Oncogene*, 2003, 22(6): 840–846.
- [14] Scian MJ, Stagliano KER, Anderson MAE, Hassan S, Bowman M, Miles MF, Deb SP, Deb S. Tumor-derived p53 mutants induce NF-kappaB2 gene expression. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(22): 10097–10110.
- [15] Strano S, Dell'Orso S, Di Agostino S, Fontemaggi G, Sacchi A, Blandino G. Mutant p53: An oncogenic transcription factor. *Oncogene*, 2007, 26(15): 2212–2219.
- [16] Fontemaggi G, Dell'Orso S, Trisciuglio D, Shay T, Melucci E, Fazi F, Terrenato I, Mottolose M, Muti P, Domany E, Del Bufalo D, Strano S, Blandino G. The execution of the transcriptional axis mutant p53, E2F1 and ID4 promotes tumor neo-angiogenesis. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16(10): 1086–1093.
- [17] Stambolsky P, Tabach Y, Fontemaggi G, Weisz L, Maor-Aloni R, Siegfried Z, Shiff I, Kogan I, Shay M, Kalo E, Blandino G, Simon I, Oren M, Rotter V. Modulation of the vitamin D3 response by cancer-associated mutant p53. *Cancer Cell*, 2010, 17(3): 273–285.
- [18] Caulin C, Nguyen T, Lang GA, Goepfert TM, Brinkley BR, Cai WW, Lozano G, Roop DR. An inducible mouse model for skin cancer reveals distinct roles for gain- and loss-of-function p53 mutations. *J Clin Invest*, 2007, 117(7): 1893–1901.
- [19] Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, Housman DE, Jacks T. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science*, 1994, 266(5186): 807–810.
- [20] Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature*, 1997, 389(6648): 300–305.
- [21] Martins CP, Brown-Swigart L, Evan GI. Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell*, 2006, 127(7): 1323–1334.
- [22] Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, 2007, 445(7128): 656–660.
- [23] Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JKV, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu CS, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*, 2006, 314(5797): 268–274.
- [24] Hupp TR, Meek DW, Midgley CA, Lane DP. Activation of the cryptic DNA binding function of mutant forms of p53. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(14): 3167–3174.
- [25] Selivanova G, Wiman KG. Reactivation of mutant p53: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Oncogene*, 2007, 26(15): 2243–2254.
- [26] de Fromentel CC, Gruel N, Venot C, Debussche L, Conseiller E, Dureuil C, Teillaud JL, Tocque B, Bracco L. Restoration of transcriptional activity of p53 mutants in human tumour cells by intracellular expression of anti-p53 single chain Fv fragments. *Oncogene*, 1999, 18(2): 551–557.
- [27] Cohen PA, Hupp TR, Lane DP, Daniels DA. Biochemical characterization of different conformational states of the Sf9 cell-purified p53His175 mutant protein. *FEBS Lett*, 1999, 463(1–2): 179–184.
- [28] Kim AL, Raffo AJ, Brandt-Rauf PW, Pincus MR, Monaco R, Abarzua P, Fine RL. Conformational and molecular basis for induction of apoptosis by a p53 C-terminal peptide in human cancer cells. *J Biol Chem*, 1999, 274(49): 34924–34931.
- [29] Selivanova G, Ryabchenko L, Jansson E, Iotsova V, Wiman KG. Reactivation of mutant p53 through interaction of a C-terminal peptide with the core domain.

Mol Cell Biol, 1999, 19(5): 3395–3402.

- [30] Snyder EL, Meade BR, Saenz CC, Dowdy SF. Treatment of terminal peritoneal carcinomatosis by a transducible p53-activating peptide. *PLoS Biol*, 2004, 2(2): E36.
- [31] Friedler A, Hansson LO, Veprintsev DB, Freund SMV, Rippin TM, Nikolova PV, Proctor MR, Rüdiger S, Fersht AR. A peptide that binds and stabilizes p53 core domain: chaperone strategy for rescue of oncogenic mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(2): 937–942.
- [32] Liu WK, Jiang XY, Ren JK, Zhang ZX. Expression pattern of the ASPP family members in endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Onkologie*, 2010, 33(10): 500–503.
- [33] Demma M, Maxwell E, Ramos R, Liang LZ, Li C, Hesk D, Rossman R, Mallams A, Doll R, Liu M, Seidel-Dugan C, Bishop WR, Dasmahapatra B. SCH529074, a small molecule activator of mutant p53, which binds p53 DNA binding domain (DBD), restores growth-suppressive function to mutant p53 and interrupts HDM2-mediated ubiquitination of wild type p53. *J Biol Chem*, 2010, 285(14): 10198–10212.
- [34] Issaeva N, Friedler A, Bozko P, Wiman KG, Fersht AR, Selivanova G. Rescue of mutants of the tumor suppressor p53 in cancer cells by a designed peptide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(23): 13303–13307.
- [35] Nagaraj NS, Singh OV, Merchant NB. Proteomics: a strategy to understand the novel targets in protein misfolding and cancer therapy. *Expert Rev Proteomics*, 2010, 7(4): 613–623.
- [36] Rüdiger S, Freund SMV, Veprintsev DB, Fersht AR. CRINEPT-TROSY NMR reveals p53 core domain bound in an unfolded form to the chaperone Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(17): 11085–11090.
- [37] Sharp S, Workman P. Inhibitors of the HSP90 molecular chaperone: current status. *Adv Cancer Res*, 2006, 95: 323–348.
- [38] Xu JM, Timares L, Heilpern C, Weng ZP, Li CZ, Xu H, Pressey JG, Elmets CA, Kopelovich L, Athar M. Targeting wild-type and mutant p53 with small molecule CP-31398 blocks the growth of rhabdomyosarcoma by inducing reactive oxygen species-dependent apoptosis. *Cancer Res*, 2010, 70(16): 6566–6576.
- [39] Farnebo M, Bykov VJN, Wiman KG. The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(1): 85–89.
- [40] Rippin TM, Bykov VJN, Freund SMV, Selivanova G, Wiman KG, Fersht AR. Characterization of the p53-rescue drug CP-31398 in vitro and in living cells. *Oncogene*, 2002, 21(14): 2119–2129.
- [41] Takimoto R, Wang W, Dicker DT, Rastinejad F, Lyssikatos J, el-Deiry WS. The mutant p53-conformation modifying drug, CP-31398, can induce apoptosis of human cancer cells and can stabilize wild-type p53 protein. *Cancer Biol Ther*, 2002, 1(1): 47–55.
- [42] Wang WG, Takimoto R, Rastinejad F, El-Deiry WS. Stabilization of p53 by CP-31398 inhibits ubiquitination without altering phosphorylation at serine 15 or 20 or MDM2 binding. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(6): 2171–2181.
- [43] Wiman KG. Restoration of wild-type p53 function in human tumors: strategies for efficient cancer therapy. *Adv Cancer Res*, 2007, 97: 321–338.
- [44] Rehman A, Chahal MS, Tang XT, Bruce JE, Pommier Y, Daoud SS. Proteomic identification of heat shock protein 90 as a candidate target for p53 mutation reactivation by PRIMA-1 in breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, 2005, 7(5): R765–R774.
- [45] Rökaeus N, Klein G, Wiman KG, Szekeley L, Mattsson K. PRIMA-1^{MET} induces nucleolar accumulation of mutant p53 and PML nuclear body-associated proteins. *Oncogene*, 2007, 26(7): 982–992.
- [46] Lambert JMR, Moshfegh A, Hainaut P, Wiman KG, Bykov VJN. Mutant p53 reactivation by PRIMA-1^{MET} induces multiple signaling pathways converging on apoptosis. *Oncogene*, 2010, 29(9): 1329–1338.
- [47] Chipuk JE, Maurer U, Green DR, Schuler M. Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell*, 2003, 4(5): 371–381.
- [48] Li Y, Mao YH, Brandt-Rauf PW, Williams AC, Fine RL. Selective induction of apoptosis in mutant p53 premalignant and malignant cancer cells by PRIMA-1 through the c-Jun-NH₂-kinase pathway. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(6): 901–909.
- [49] Bykov VJN, Issaeva N, Zache N, Shilov A, Hultcrantz M, Bergman J, Selivanova G, Wiman KG. Reactivation of mutant p53 and induction of apoptosis in human tumor cells by maleimide analogs. *J Biol Chem*, 2005, 280(34): 30384–30391.
- [50] North S, Pluquet O, Maurici D, El-Ghissassi F, Hainaut P. Restoration of wild-type conformation and activity of a temperature-sensitive mutant of p53 (p53^{V272M}) by the cytoprotective aminothioliol WR1065 in the esophageal cancer cell line TE-1. *Mol Carcinog*, 2002, 33(3): 181–188.
- [51] Buzek J, Latonen L, Kurki S, Peltonen K, Laiho M. Redox state of tumor suppressor p53 regulates its sequence-specific DNA binding in DNA-damaged cells by cysteine 277. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(11): 2340–2348.

- [52] Nemunaitis J, Nemunaitis J. Head and neck cancer: response to p53-based therapeutics. *Head Neck*, 2011, 33(1): 131–134.
- [53] Kozarsky KF, Wilson JM. Gene therapy: adenovirus vectors. *Curr Opin Genet Dev*, 1993, 3(3): 499–503.
- [54] Senzer N, Nemunaitis J, Nemunaitis M, Lamont J, Gore M, Gabra H, Eeles R, Sodha N, Lynch FJ, Zumstein LA, Menander KB, Sobol RE, Chada S. p53 therapy in a patient with Li-Fraumeni syndrome. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(5): 1478–1482.
- [55] Peng ZH. Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther*, 2005, 16(9): 1016–1027.
- [56] Bond GL, Hu W, Levine AJ. MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting. *Curr Cancer Drug Targets*, 2005, 5(1): 3–8.
- [57] Freedman DA, Wu L, Levine AJ. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 55(1): 96–107.
- [58] Onel K, Cordon-Cardo C. MDM2 and prognosis. *Mol Cancer Res*, 2004, 2(1): 1–8.
- [59] Vassilev LT. MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol Med*, 2007, 13(1): 23–31.
- [60] Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, Higgins B, Kolinsky K, Hilton H, Zhao XL, Vu BT, Qing WQ, Packman K, Myklebost O, Heimbrook DC, Vassilev LT. Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(6): 1888–1893.
- [61] Hori T, Kondo T, Kanamori M, Tabuchi Y, Ogawa R, Zhao QL, Ahmed K, Yasuda T, Seki S, Suzuki K, Kimura T. Nutlin-3 enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through up-regulation of death receptor 5 (DR5) in human sarcoma HOS cells and human colon cancer HCT116 cells. *Cancer Lett*, 2010, 287(1): 98–108.
- [62] Canner JA, Sobo M, Ball S, Hutzen B, DeAngelis S, Willis W, Studebaker AW, Ding K, Wang S, Yang D, Lin J. MI-63: a novel small-molecule inhibitor targets MDM2 and induces apoptosis in embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma cells with wild-type p53. *Br J Cancer*, 2009, 101(5): 774–781.
- [63] Samudio IJ, Duvvuri S, Clise-Dwyer K, Watt JC, Mak D, Kantarjian H, Yang DJ, Ruvolo V, Borthakur G. Activation of p53 signaling by MI-63 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma*, 2010, 51(5): 911–919.
- [64] Issaeva N, Bozko P, Enge M, Protopopova M, Verhoef LGGC, Masucci M, Pramanik A, Selivanova G. Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nat Med*, 2004, 10(12): 1321–1328.
- [65] Zhao CY, Grinkevich VV, Nikulenkov F, Bao WJ, Selivanova G. Rescue of the apoptotic-inducing function of mutant p53 by small molecule RITA. *Cell Cycle*, 2010, 9(9): 1847–1855.
- [66] Krajewski M, Ozdowy P, D'Silva L, Rothweiler U, Holak TA. NMR indicates that the small molecule RITA does not block p53-MDM2 binding *in vitro*. *Nat Med*, 2005, 11(11): 1135–1136.
- [67] Hedström E, Issaeva N, Enge M, Selivanova G. Tumor-specific induction of apoptosis by a p53-reactivating compound. *Exp Cell Res*, 2009, 315(3): 451–461.
- [68] Duncan SJ, Gruschow S, Williams DH, McNicholas C, Purewal R, Hajek M, Gerlitz M, Martin S, Wrigley SK, Moore M. Isolation and structure elucidation of Chlorofusin, a novel p53-MDM2 antagonist from a *Fusarium sp.* *J Am Chem Soc*, 2001, 123(4): 554–560.
- [69] Harris N, Brill E, Shohat O, Prokocimer M, Wolf D, Arai N, Rotter V. Molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein. *Mol Cell Biol*, 1986, 6(12): 4650–4656.
- [70] Sakamuro D, Sabbatini P, White E, Prendergast GC. The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene*, 1997, 15(8): 887–898.
- [71] Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(2): 1092–1100.
- [72] Dumont P, Leu JIJ, Della Pietra AC III, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet*, 2003, 33(3): 357–365.
- [73] Bergamaschi D, Samuels Y, Sullivan A, Zvelebil M, Breysens H, Bisso A, Del Sal G, Syed N, Smith P, Gasco M, Crook T, Lu X. iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. *Nat Genet*, 2006, 38(10): 1133–1141.
- [74] Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, Sullivan A, Syed N, Trigiant G, Yulug I, Merlano M, Numico G, Comino A, Attard M, Reelfs O, Gusterson B, Bell AK, Heath V, Tavassoli M, Farrell PJ, Smith P, Lu X, Crook T. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell*, 2003, 3(4): 387–402.
- [75] Marin MC, Jost CA, Brooks LA, Irwin MS, O'Nions J, Tidy JA, James N, McGregor JM, Harwood CA, Yulug IG, Vousden KH, Allday MJ, Gusterson B, Ikawa S, Hinds PW, Crook T, Kaelin WG Jr. A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 47–54.