



靶向突变 p53 聚集体的肿瘤治疗 研究进展*

王嘉健 欧 霞 耿学业 张继虹**

(昆明理工大学医学院, 昆明 650500)

摘要 突变 p53 (mutant p53, Mut-p53) 聚集体的形成是 p53 突变后使原本包裹在其疏水核心内部的黏附序列暴露, 黏附序列迅速成核组装, 形成无定形的原纤维. Mut-p53 聚集体不仅可以以显性负效应 (dominant-negative effect, DN) 的方式使野生型 p53 (wild type p53, Wt-p53) 失活, 还表现出功能获得 (gain-of-function, GOF) 特性, 促进肿瘤的发生和发展. 在卵巢癌、结肠癌、前列腺癌等多种肿瘤细胞中均发现了 Mut-p53 的异常聚集, 其与肿瘤的转移、耐药和预后不良具有显著的相关性. 因此, p53 聚集是逆转化疗耐药及肿瘤治疗的潜在靶点. 设计和发现靶向 Mut-p53 聚集体的小分子化合物, 抑制 p53 疏水核心内部黏附序列的暴露, 恢复 p53 的功能从而发挥抗肿瘤作用成为了当今研究热点. 本文就 p53 聚集体对肿瘤发生发展的影响及目前靶向 Mut-p53 聚集体的研究策略进行了综述.

关键词 突变 p53, 聚集体, 靶向策略

中图分类号 R73, Q71

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0041

蛋白质的聚集及错误折叠是癌症、阿尔茨海默病、帕金森病及传染性海绵状脑病及衰老等疾病发生的重要标志^[1-3]. 尽管这些蛋白质在某种情况下具有功能性作用, 但是它们的不规则聚集会产生无法预料的后果. 最近, 大量的研究数据表明肿瘤抑制蛋白 p53 的突变体能够形成具有朊病毒样的聚集体, 并证明了突变型 p53 聚集体的形成与其显性负效应 (dominant-negative effect, DN) 和功能获得 (gain-of-function, GOF) 有关^[4-8]. 正常情况下, 野生型 p53 (Wt-p53) 作为肿瘤抑制因子, 调控其下游基因的表达而抑制肿瘤的发生发展. 但是, 在多种肿瘤细胞中 p53 以突变体的形式存在, 诱导和促进肿瘤的发生及发展, 其中突变 p53 (mutant p53, Mut-p53) 聚集体则是其促进肿瘤发生发展的重要原因之一. 由于 p53 是温度敏感型蛋白, 其突变后会使得结构不稳定性增加, 使包裹在 p53 疏水核心内部的黏附序列暴露在蛋白质表面, 从而驱动 p53 聚集体的形成, 进而使 p53 失去肿瘤抑制功能. 同时, 突变型 p53 聚集体还会以 GOF 的方式与 p53 同源家族蛋白 p63、p73 及其他蛋白质如 MDM2

(murine double minute 2)、热休克蛋白发生共聚集, 阻碍 p53 同源家族成员行使功能及抑制 Mut-p53 的有效降解, 导致参与调控细胞生长和凋亡的靶基因转录缺陷, 增加了肿瘤的耐药性及侵袭能力^[9-11]. Mut-p53 聚集体在多种肿瘤细胞中普遍存在, 且在肿瘤发生发展过程中发挥促进作用, 因此 p53 聚集可能是恶性肿瘤治疗的一个潜在靶点.

1 p53 及其聚集体的形成

1.1 p53 及其突变类型

TP53 (tumor protein p53) 作为肿瘤抑制基因主要由 11 个外显子及 10 个内含子构成, 其编码的 p53 蛋白由 393 个氨基酸残基组成, 包含了五大功能结构域: N 端反式激活结构域 (transcription activation domain, TAD)、富含脯氨酸结构域 (proline-rich domain, PRD)、核心 DNA 结合结构

* 国家自然科学基金 (81960670) 和云南省重点项目 (202001AS070012) 资助.

** 通讯联系人.

Tel: 15331717268, E-mail: zhjihong2000@kust.edu.cn

收稿日期: 2021-02-18, 接受日期: 2021-04-08

域 (DNA-binding domain, DBD, p53C)、四聚化结构域 (tetramerization domain, TD) 和调节结构域 (regulatory domain, RD)^[12]. 在恶性肿瘤中, p53 发生的绝大多数突变为 DBD 区的错义突变. 根据突变对 p53 蛋白结构及功能的影响, 将突变分为下列 3 种类型. a. 结构突变体: 发生在 DNA 接触面与 β 片层骨架之间氨基酸的改变 (R175H、R249S、R248Q) 或发生在 β 片层骨架内部的氨基酸残基的改变 (Y220C、V143A). 该类突变会使得环片-螺旋模体 (loop-sheet-helix motif, LSH) 的稳定性下降, 从而造成 DBD 结构发生改变, 以致于 p53 失去其原有的转录激活功能. 与此同时, 该类突变对温度较为敏感, 在 24~30°C 的环境下, 其能够保持 Wt-p53 或接近于 Wt-p53 的构象. 但 37°C 的环境会造成其蛋白质构象不稳定而发生去折叠, 使得 p53 失去转录活性^[13]. b. 接触突变体: 位于 DNA 接触面的氨基酸残基发生了改变 (R273H、R248W), 该类突变会造成 p53 作为转录因子失去其与 DNA 的结合活性以及蛋白质的热力学稳定性降低. c. 锌结合类突变: p53 蛋白的 DBD 区含有一个锌离子结合位点, 由 Cys176、His179、Cys238 和 Cys242 的侧链配位, 起到稳定 DBD 结构的作用. 此类突变使 DNA 接触面的氨基酸残基发生改变, 从而使锌离子失去结合特异性 (R175H、C176Y). Butler 等^[14] 通过动力学研究发现, 突变型 p53 在锌离子缺失时会造成 DBD 区的稳定性降低, 破坏 DBD 区在原生状态和未折叠状态之间动态平衡. 他们发现, 在绝大部分含有 p53 突变的肿瘤细胞中, p53 可能以折叠的无锌形式存在, 并且无锌 DBD (ApoDBD) 似乎能够以促进成核的方式使得 p53 发生聚集.

1.2 Mut-p53 聚集体的形成

在癌症中, 基因突变通常会造成蛋白质过度表达, 或其天然结构改变, 或蛋白质相互作用改变, 进而促进肿瘤的增殖^[15]. 肿瘤抑制蛋白 p53 常常因为突变、错配或聚集而导致蛋白质功能的丧失^[16-17]. 因此, p53 聚集体的形成也被归纳于淀粉样疾病之中. 各种蛋白质的淀粉样纤维都具有共同的结构即交叉 β 棘. 交叉 β 棘是由两个 β 片层平行端堆叠而成. 两个 β 片层之间能够形成一个干燥而紧密的互补空间拉链, 其主要是通过 β 片层的主链及侧链的氢键相连, 从而形成淀粉样纤维^[18-19]. 正常情况下蛋白质的功能结构往往是由热力学和动力学所驱动的. p53 是一种典型的多结构域蛋白, 主要

包括 3 个极为重要的结构域: 反式激活结构域、核心 DNA 结合结构域、四聚化结构域. 有报道称 p53 聚集主要是由 p53 核心 DNA 结合结构域 (p53C) 所介导的^[20-23]. p53C 本质上是不稳定的, 它会在略高于体温的温度下融化, 使得其能够在正确折叠与错误折叠之间达到一种微妙的平衡. 然而这种平衡非常容易被突变打破, 突变通常会通过降低其热稳定性而促进聚集体的形成进而使其失活^[24]. Fersht 团队^[5, 25-26] 使用差示扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC) 和光谱学分析来评估不同 p53 突变体 (R175H、C242S、R248Q、R249S 和 R273H) 的热力学稳定性, 结果显示大多数 p53 核心结构域的突变体在生理温度下变性至少 50%. 由于突变造成了 p53 蛋白的热稳定性降低, 因此在生理条件下即 37°C, p53 发生了不可逆的变性和聚集.

p53 聚集体形成的关键是由埋藏在 p53C 疏水核心中的黏附片段所驱动的^[27]. Goldschmidt 等^[28] 利用 ZipperDB 算法推算出 p53 的 DBD 中含有几个被称为立体空间拉链的黏附片段, 该片段又被称为高纤颤倾向片段, 其中 252~258 残基被确定为最容易发生聚集的片段, 称之为 LTIITLE 结构 (图 1). 随后, Xu 等^[29] 发现 p53 核心区域中的片段 251~257 足以驱动细胞系中 p53 聚集. 通过免疫荧光实验对 p53 野生型、结构突变体 (R110P、R175H、R248Q、R249S 和 R282W) 及接触突变体 (R248W 和 R273H) 在细胞内的聚集状态进行了探究, 发现 p53 野生型及接触突变体表现一致, 均以单体、二聚体、四聚体以及八聚体的形式均匀地分布于细胞核中. 而 p53 结构突变体由于其结构极为不稳定的特点, 导致了埋藏于 p53 蛋白内部位于 p53 DBD 区的“疏水核心”暴露, 进而使得横跨疏水核心的片段 251~257 暴露出来, 导致 LTIITLE 能够形成 β 链, 驱动 p53 聚集 (图 2a). 为了进一步揭示 LTIITLE 对 p53 聚集的重要意义, Xu 等^[29] 和 Wang 等^[30] 在黏附序列 LTIITLE 中引入了聚集抑制突变 I254R, 发现 I254R 突变的存在有效地抑制了 p53 结构突变体在细胞中的聚集程度, 证实了 LTIITLE 结构在 p53 聚集体形成的过程中发挥着决定性的作用. 同时 Soragni 等^[31] 以 R175、R248 突变位点为背景, 通过细胞穿透性肽 ReACp53 覆盖 LTIITLE (252~258) 结构的方法同样有效地抑制了 p53 聚集体的形成, 为 p53 聚集体形成的原因提供了证据.

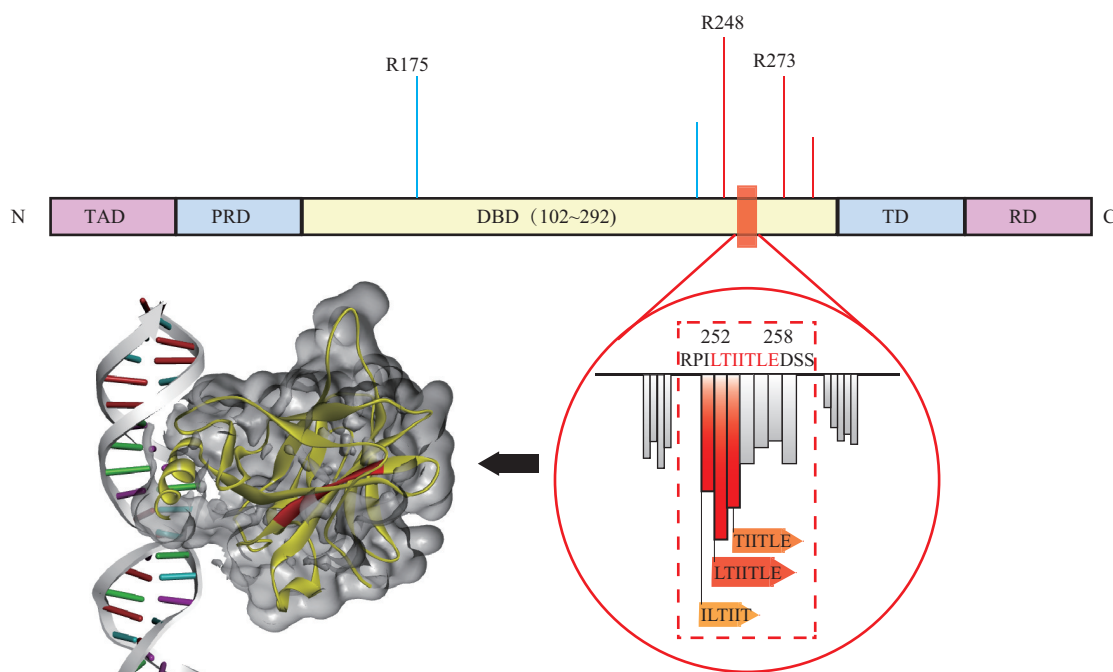


Fig. 1 The position of adhesion sequence in the primary and higher structures of p53

图1 黏附序列在p53一级结构及高级结构中的位置

p53聚集体的形成不仅与热稳定性及黏附片段相关, 还与其他的一些影响因素密切相关, 如水化作用、骨架氢键 (backbone hydrogen bonds, BHBs) 等。一方面, 水化作用驱动着各种生物过程, 包括蛋白质折叠、配体结合、大分子组装、酶动力学和信号转导。蛋白质与蛋白质之间通常通过水介导的接触产生的疏水性相互作用力来保证蛋白质结构的稳定以及极性的维持^[32]。由此可见水化作用在蛋白质正确折叠过程中发挥着至关重要的作用。水化作用通常与回旋半径 (radius of gyration, R_g)、溶剂可及表面积 (solvent accessible surface area, SASA) 和疏水残基 SASA 的概率密度函数 (probability density function, PDF) 等参数密切相关。Li 等^[33]通过计算 p53 野生型、结构突变体 (R175H)、接触突变体 (R273H) 所有残基的 R_g 、SASA 和疏水残基 SASA 的 PDF, 发现 R175H 和 R273H 突变体的残基 R_g 和 SASA 均大于 Wt-p53。该数据提示 R175H 和 R273H 突变使得 p53 蛋白体积增大以及埋藏在 p53 蛋白内部的“疏水核心”暴露于蛋白质表面, 促进 p53 聚集。同时, 在水化作用的影响下, p53 熔融球 (molten-globule, MG) 状态的形成进一步促进了 p53 聚集体的产生。正常情况下, p53 的 DBD 区整体呈现“三明治”结构, 由

四股 β 片层骨架和五股 β 片层骨架反向平行构成, 在 β 片层骨架之上还有两个环结构 (L2/L3) 及一个环片-螺旋模体, 共同组成 DNA 接触面。其中环结构可以与锌离子配位来稳定 p53 的结构, 因此 p53-DBD 区的环结构对 p53 的去折叠与聚集起着至关重要的作用。Li 等^[33]发现 R175H 和 R273H 突变体均表现出比 Wt-p53C 更高的环柔性, 使其蛋白质构象特征与倾向于聚集的熔融球态的结构特征相似。熔融球态是一种蛋白质的紧密形式, 其保留了蛋白质的二级结构, 增加了蛋白质疏水表面积及侧链的旋转异构化, 具有较高的环柔性和体积变化, 其在某变性剂诱导的许多蛋白质展开过程中被观察到, 参与到蛋白质的结构转换过程中, 增加了蛋白质展开与折叠的转换频率, 提高了蛋白质错误折叠的可能性, 促进聚集的发生^[24, 34-35]。Pedrote 等^[22]证明了 p53C 的熔融球态能够诱导聚集, 为之提供了更加有力的数据支持。另一方面, BHBs 在 p53 聚集的过程中也发挥着重要的调节作用^[36]。有研究表明, 在大多数可溶性蛋白质中, 除少数极性基团外, 大多数 BHBs 都被非极性基团包裹在分子内^[37]。BHBs 的保护直接关系到蛋白质结构的稳定和形成淀粉样聚集体的趋势。当 BHBs 周围缺乏足够的疏水原子, 便会促进不稳定键与水分子的相互

作用, 削弱主链的相互作用, 进而降低蛋白质结构的完整性. 因此, BHBs的暴露会使得p53C的稳定性降低, 聚集趋势显著提升, 表现为聚集更快、程度更大, 更易变性的状态.

2 p53聚集对肿瘤形成的影响

p53构象的改变或者热力学稳定性的降低等因素都可能促进肿瘤的发生. p53淀粉样聚集已经在多种肿瘤组织或癌细胞系中发现. p53聚集体的形成能够改变p53蛋白的活性构象, 从而使其失去细胞周期阻滞、促进凋亡的能力. 突变型p53聚集体的形成可能与显性负效应和GOF效应促进癌症的发生有关.

2.1 Mut-p53聚集体的显性负效应

显性负效应是指某些信号转导蛋白突变后不仅自身无功能, 还能抑制或阻断同一细胞内的野生型信号转导蛋白质的作用, 其作用机制为突变型蛋白质和相关蛋白质形成无功能的二聚体/四聚体, 从而抑制野生型蛋白质的功能. 众所周知, p53发挥其转录作用是以p53单体通过四聚化结构域形成四聚体为前提. Mut-p53的显性负效应是由于Mut-p53和Wt-p53分子混合于四聚体之中, 导致细胞内功能性p53的浓度降低, 导致Wt-p53不能够发挥其肿瘤抑制功能.

Mut-p53发挥显性负效应的机制可能与以下几个因素有关: a. Mut-p53驱动野生型蛋白质构象改变并失活; b. p53聚集抑制Wt-p53入核. 一方面, Mut-p53驱动野生型蛋白质构象改变并失活. 在神经母细胞瘤、胶质母细胞瘤、结肠癌及乳腺癌等多种癌细胞中均观察到了Mut-p53或Wt-p53的异常聚集^[38-40]. 实验表明R248Q p53C淀粉样低聚物和纤维混合物加速了Wt-p53C的聚集. Silva等^[41]和Forget等^[42]证明了Mut-p53或者p53C具有朊病毒样的特性, 其在释放出细胞后能够被其他细胞摄取, 与胞内可溶性的Wt-p53发生共聚集, 并诱导后者的构象发生改变. 另一方面, p53聚集抑制Wt-p53入核, 使Wt-p53作为转录因子丧失了DNA结合能力. 有文献报道, 在人骨肉瘤Saos-2细胞系及高级浆液性卵巢癌细胞 (high grade serous ovarian cancer, HGSOc) 中通过免疫荧光实验对p53定位发现细胞核染色减少, 胞质出现“点状”染色^[29]. 点状染色显示Mut-p53在核周内聚集成较大的聚集体, 提示p53聚集能够使p53的核输入受损, 不能够有效地与DNA结合来发挥转录功能.

Lasagna-Reeves等^[6]在基底细胞癌 (basal cell carcinoma, BCC) 发现p53寡聚物和原纤维失去了与DNA结合的能力, 从而丧失了p53的功能.

2.2 p53聚集体与其他蛋白质的相互作用

Mut-p53在发生聚集的过程中还可以通过GOF的方式参与细胞生长和凋亡的转录调控, 加剧肿瘤的恶化. Mut-p53 GOF的关键机制是与p53家族成员或其他抗凋亡蛋白的结合. Mut-p53聚集不仅诱导Wt-p53聚集, 而且还能够与p63和p73发生共聚集. Li等^[43]发现p53能够与p63及p73在细胞中发生相互作用. Mut-p53致癌特性的一个关键机制是p53与同源家族成员p63和p73发生相互作用并减弱其功能. 由于p53家族成员p63和p73的反式激活亚型与p53拥有功能重叠, 同时p53与p63和p73具有序列高度相似的高纤颤倾向片段 (p53 (251~257)、p63 (321~327) 和p73 (271~277)), 因而驱动共聚集体的形成^[44]. 在Saos-2细胞中共表达了突变型p53和p63或p73 (TAp63 α /TAp73 α) 的反式激活结构域. 在Wt-p53存在的情况下, p63和p73主要定位于细胞核; 相反, Mut-p53 (R282W和R110P) 与TAp63 α /TAp73 α 的共表达将p63和p73驱动到核周聚集, 说明p53能够与p63和p73在胞质内发生共聚集, 阻止p63及p73入核发挥转录调控的功能. 在引入聚集抑制Mut-p53 (I254R)、p63 (I324R) 和p73 (I274R) 后, Mut-p53与p63和p73的相互作用完全消除, 并恢复p73的转录调控功能. 通过RT-qPCR检测Mut-p53聚集对MDM2、p21和BAX表达的影响, 发现p53聚集突变体R282W的共同表达实质上抑制了p63和p73的功能.

除此之外, Mut-p53还可以与许多其他转录因子和蛋白质发生相互作用, 以促进肿瘤侵袭及耐药性. 由于蛋白质变性和聚集是热休克反应的重要触发因素, p53聚集物可能通过激活热休克蛋白获得抗凋亡特性. 有研究表明p53聚集能够引起Hsp70和Hsp90的上调. Wiech等^[45]发现p53与Hsp70及MDM2发生相互作用产生具有 β 淀粉样特征的“假聚集体”结构, 从而维持了p53突变体的稳定. Hsp70胞内浓度的增加部分抑制了MDM2介导的Mut-p53泛素化降解途径而导致p53半衰期的增加, 同时还引起了p53易感区的短暂性暴露, 表明Hsp70能够增加p53突变体的稳定性并加剧p53聚集体的形成. 另一方面, Hsp90可以将p53转化为熔融的球状状态, 加速p53展开与折叠的转换频

率, 促进p53聚集。

3 靶向p53聚集体的策略

p53淀粉样聚集体在各种癌症患者的组织活检中发现, 并与肿瘤的侵袭有关, 携带p53聚集体的患者的长期存活率明显降低, 且预后较差。同时, p53聚集体与化疗耐药相关。因此, 对p53聚集状态的调节及预防聚集物的积累可成为肿瘤治疗策略之一。目前, 肽稳定剂、小分子类化合物和核酸适体都表现出了显著抑制Mut-p53聚集体的作用。

3.1 肽稳定剂ReACp53

由于p53疏水核心内部的黏附序列在p53聚集的过程中发挥着决定性的作用, 因此, 通过设计覆盖p53黏附序列来抑制p53聚集成为了靶向p53聚集的策略。Soragni等^[31]设计了一种能够抑制突变型p53淀粉样蛋白聚集的细胞穿透肽(命名为ReACp53)。根据LTIITLE结构中的侧链排列位置并用Rosetta算法对片段进行计算分析, 评估合成的肽序列与原始模板序列的结构互补性。通过筛选发现, 第3位发生精氨酸取代的LTRITLE序列与其他LTIITLE分子的结合发生冲突, 即LTRITLE在与空间拉链结合时, 第3位的精氨酸会与相邻的 β 片层产生空间冲突, 从而阻碍分子发生黏附(图2b中①)。在正常情况下, Wt-p53的溶解温度大约在42°C, 生理温度下其保持着天然的蛋白质结构, 疏水核心中的黏附序列难以暴露于蛋白质表面, 因此不容易发生聚集。但是当p53突变后(尤其是结构突变), 其天然蛋白质结构被破坏, 导致黏附序列的暴露, 促进聚集体的产生。基于Mut-p53在生理温度下暴露黏附序列的特点, ReACp53对Mut-p53拥有了良好的靶向性。在免疫荧光及异种移植瘤实验中, Soragni团队^[31]证实了ReACp53能够明显抑制卵巢癌患者原代细胞中p53的聚集, 并使之以活性构象重新定位于细胞核中, 同时ReACp53还导致了体内携带易形成聚集的p53突变体异种移植瘤的缩小。近期, Zhang等^[46]在原发性前列腺癌(prostate cancer, PCa)中证明了ReACp53可以作用于Mut-p53聚集, 导致p53蛋白的构象改变, 进而促进了Mut-p53与相关蛋白因子的结合。

3.2 小分子化合物

抑制聚集的另一种策略是通过提高p53的溶解温度、稳定其野生型的构象使得埋藏于p53内部的黏附序列难以暴露来实现的(图2b中②)。目前,

有报道了能够抑制Mut-p53聚集的小分子化合物, 如以空腔黏合剂PK083、烷基化剂PRIMA-1、锌金属伴侣ZMC1为代表的靶向恢复Mut-p53野生型功能的化合物^[47-49]。这些化合物以促进蛋白质重折叠致使Mut-p53疏水核心暴露出的黏附序列LTIITLE(252~258)重新埋藏于p53的疏水核心之中或是通过提高Mut-p53的稳定性使得p53黏附序列LTIITLE(252~258)难以暴露等方式调控p53聚集。烷基化剂PRIMA-1在体内转化为活性迈克尔受体亚甲基奎宁环酮(MQ)与p53核心区的半胱氨酸残基发生共价结合, 主要是Cys124和Cys277, 从而促进p53蛋白重新折叠为活性构象, 在抑制聚集的同时使其发挥肿瘤抑制功能; 空腔黏合剂KP083与锌金属伴侣ZMC1则是以提高蛋白质的 T_m 值作为抑制聚集的主要策略。Alan团队以作用于突变诱导的p53(Y220C)空腔, 增加p53热稳定性并恢复其野生型功能为目标, 筛选了一系列以咪唑为核心的化合物, 差示扫描荧光分析(differential scanning fluorimetry, DSF)及光散射实验结果显示这些化合物在不同程度上提高了p53蛋白核心结构域的 T_m 值, 同时在体外抑制了p53(Y220C)核心结构域的聚集能力^[47, 50]。由于碘在卤素原子与蛋白质的相互作用中发挥着重要作用, Miller等^[51]用金属伴侣的方法设计了两种双功能配体(LI/LH)来调节p53的聚集及p53与锌离子的结合。由于碘能够与蛋白质的疏水片段发生良好的相互作用, 双功能配体LI与p53发生了结合, 同时其金属伴侣的本质提高了细胞内的锌离子水平, 增加了锌离子与Mut-p53的结合能力, 进而调节Mut-p53聚集。透射电子显微镜对p53聚集体形态的研究证实了Mut-p53与LI共孵育后能够明显抑制聚集体的形成。同时使用p53抗体DO-1与抗寡聚物抗体A11在人胃癌NUGC细胞中进行免疫荧光实验观察到LI处理后寡聚物的量减少、DO-1与A11之间的共定位减少, 表明LI可以有效地减少Mut-p53细胞系中p53聚集。

除以上化合物之外, 有报道白藜芦醇、聚精氨酸及核酸适体也表现出抑制p53聚集体形成的能力。尽管Ferraz等^[52]证明了白藜芦醇和Wt-p53C在体外相互作用, 并抑制Wt-p53C和p53 R248Q突变体的聚集, 但是具体的作用机制并不清楚, 需进一步研究。精氨酸是一种广泛应用于稳定蛋白质聚集, 并在蛋白质形成过程中纠正蛋白质折叠的阳离子氨基酸, 其抑制蛋白质聚集在于精氨酸分子簇可

以在水溶液中通过三个亚甲基的排列形成疏水表面从而覆盖抑制了蛋白质-蛋白质的聚集^[53]. Chen等^[54]通过硫黄素-T检测p53的聚集动力学,发现多聚精氨酸有效抑制了Mut-p53聚集.推测精氨酸分子与p53之间的疏水相互作用可能破坏了聚集单体之间氢键的形成,从而抑制聚集体的形成,因此精氨酸有望成为治疗Mut-p53聚集及错误折叠蛋白质相关癌症的候选药物.近期,有报道称RNA或同源的DNA序列对p53聚集有调节作用^[55-56]. RNA

调节p53聚集体形成的一种解释为RNA与p53C的结合会封闭蛋白质与蛋白质相互作用界面,从而限制聚集或影响发生聚集的蛋白质稳定性.同源DNA序列则是通过增加p53蛋白的稳定性来抑制聚集. Ishimaru等^[56]的研究结果表明与同源序列的相互作用防止了p53C聚集为淀粉样结构,并观察到p53C或全长p53在与同源DNA序列结合时表现出了更高的稳定性.

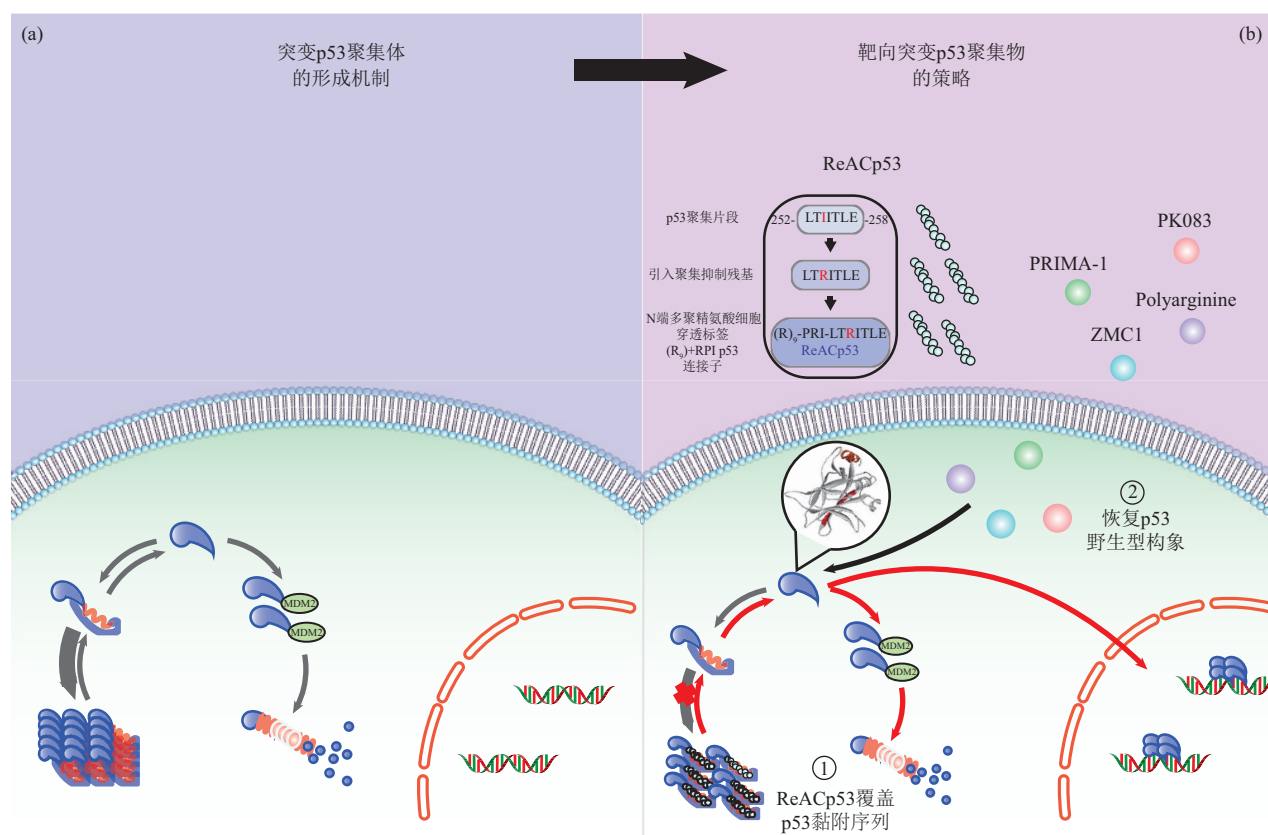


Fig. 2 Strategies for targeting mutated p53 aggregates

图2 靶向突变p53聚集体的策略

(a) 突变p53聚集体的形成机制: 由于结构不稳定性, p53突变后会造成黏附序列的暴露, 驱动聚集体的形成. (b) 靶向突变p53聚集体的策略: ①ReAcP53覆盖p53黏附序列抑制聚集; ②通过恢复p53野生型构象抑制聚集.

4 展 望

现阶段, 随着科学技术的不断进步, 尽管人们在肿瘤的诊断及治疗方面取得了极大的进步, 但是肿瘤的发生及预后不良仍然是我们所要面临的主要问题. Mut-p53聚集体的形成在多种恶性肿瘤细胞中被发现, 并与肿瘤恶性转变、耐药及预后息息相

关. 根据目前对 Mut-p53 聚集体的研究发现抑制 Mut-p53 聚集体的形成能挽救 p53 的功能, 但是具体作用机制及靶向性、安全性有待进一步阐明. 由于目前关于靶向 Mut-p53 聚集体的研究处于起步阶段, 接下来的研究需对靶向 p53 聚集体的具体作用机制和治疗作用进一步探索, 以更好的表征 p53 聚集的机制、GOF 效应及抑制聚集的具体作用位点,

为肿瘤治疗提供思路。

参考文献

- [1] Kaye R, Head E, Sarsoza F, *et al.* Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. *Molecular Neurodegeneration*, 2007, **2**:18
- [2] Glabe C. Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol Aging*, 2006, **27**(4):570-575
- [3] Kaye R, Head E, Thompson J, *et al.* Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 2003, **300**(5618):486-489
- [4] Bom A P D A, Rangel L, Costa D, *et al.* Mutant p53 aggregates into prion-like amyloid oligomers and fibrils: implications for cancer. *J Biol Chem*, 2012, **287**(33):28152-28162
- [5] Wilcken R, Wang G, Boeckler F M, *et al.* Kinetic mechanism of p53 oncogenic mutant aggregation and its inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(34):13584-13589
- [6] Lasagna-Reeves C, Clos A, Castillo-Carranza D, *et al.* Dual role of p53 amyloid formation in cancer; loss of function and gain of toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, **430**(3):963-968
- [7] Rangel L, Costa D, Vieira T, *et al.* The aggregation of mutant p53 produces prion-like properties in cancer. *Prion*, 2014, **8**(1):75-84
- [8] Ghosh S, Salot S, Sengupta S, *et al.* p53 amyloid formation leading to its loss of function: implications in cancer pathogenesis. *Cell Death and Differentiation*, 2017, **24**(10):1784-1798
- [9] Wang G, Fersht A R. Propagation of aggregated p53: cross-reaction and coaggregation vs. seeding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(8):2443-2448
- [10] Yang-Hartwich Y, Soteras M, Lin Z, *et al.* p53 protein aggregation promotes platinum resistance in ovarian cancer. *Oncogene*, 2015, **34**(27):3605-3616
- [11] Stenger J, Tegtmeyer P, Mayr G, *et al.* p53 oligomerization and DNA looping are linked with transcriptional activation. *EMBO J*, 1994, **13**(24):6011-6020
- [12] Joerger A C, Fersht A R. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Ann Rev Biochem*, 2008, **77**:557-582
- [13] Butler J, Loh S. Folding and misfolding mechanisms of the p53 DNA binding domain at physiological temperature. *Protein Science*, 2006, **15**(11):2457-2465
- [14] Butler J S, Loh S N. Zn(2+)-dependent misfolding of the p53 DNA binding domain. *Biochemistry*, 2007, **46**(10):2630-2639
- [15] Huo Q. Protein complexes/aggregates as potential cancer biomarkers revealed by a nanoparticle aggregation immunoassay. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, 2010, **78**(2):259-265
- [16] De Smet F, Rubio S M, Hompes D, *et al.* Nuclear inclusion bodies of mutant and wild-type p53 in cancer: a hallmark of p53 inactivation and proteostasis remodelling by p53 aggregation. *J Pathol*, 2017, **242**(1):24-38
- [17] Stiewe T, Haran T. How mutations shape p53 interactions with the genome to promote tumorigenesis and drug resistance. *Drug Resistance Updates*, 2018, **38**:27-43
- [18] Eisenberg D, Jucker M. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell*, 2012, **148**(6):1188-1203
- [19] Nelson R, Sawaya M, Balbirnie M, *et al.* Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature*, 2005, **435**(7043):773-778
- [20] Cañadillas J, Tidow H, Freund S, *et al.* Solution structure of p53 core domain: structural basis for its instability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(7):2109-2114
- [21] Lima I, Navalkar A, Maji S, *et al.* Biophysical characterization of p53 core domain aggregates. *Biochem J*, 2020, **477**(1):111-120
- [22] Pedrote M, De Oliveira G, Felix A, *et al.* Aggregation-primed molten globule conformers of the p53 core domain provide potential tools for studying p53C aggregation in cancer. *J Biol Chem*, 2018, **293**(29):11374-11387
- [23] Ishimaru D, Andrade L, Teixeira L, *et al.* Fibrillar aggregates of the tumor suppressor p53 core domain. *Biochemistry*, 2003, **42**(30):9022-9027
- [24] de Oliveira G, Silva J. The push-and-pull hypothesis in protein unfolding, misfolding and aggregation. *Biophys Chem*, 2017, **231**:20-26
- [25] Bullock A N, Henckel J, Dedeker B S, *et al.* Thermodynamic stability of wild-type and mutant p53 core domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(26):14338-14342
- [26] Wang G, Fersht A R. Mechanism of initiation of aggregation of p53 revealed by Φ -value analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(8):2437-2442
- [27] Das A, Makarov D E. Effect of mutation on an aggregation-prone segment of p53: from monomer to dimer to multimer. *J Phys Chem B*, 2016, **120**(45):11665-11673
- [28] Goldschmidt L, Teng P, Riek R, *et al.* Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(8):3487-3492
- [29] Xu J, Reumers J, Couceiro J, *et al.* Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol*, 2011, **7**(5):285-295
- [30] Wang G, Fersht A. Multisite aggregation of p53 and implications for drug rescue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(13):E2634-E2643
- [31] Soragni A, Janzen D, Johnson L, *et al.* A designed inhibitor of p53 aggregation rescues p53 tumor suppression in ovarian carcinomas. *Cancer Cell*, 2016, **29**(1):90-103
- [32] Silva J L, Vieira T C, Gomes M P, *et al.* Ligand binding and hydration in protein misfolding: insights from studies of prion and p53 tumor suppressor proteins. *Acc Chem Res*, 2010, **43**(2):271-279
- [33] Li L, Li X, Tang Y, *et al.* Common cancer mutations R175H and R273H drive the p53 DNA-binding domain towards aggregation-prone conformations. *Phys Chem Chem Phys*, 2020, **22**(17):9225-9232
- [34] Langenberg T, Gallardo R, van der Kant R, *et al.* Thermodynamic and evolutionary coupling between the native and amyloid state of globular proteins. *Cell Rep*, 2020, **31**(2):107512

- [35] Baldwin R, Rose G. Molten globules, entropy-driven conformational change and protein folding. *Curr Opin Structural Biol*, 2013, **23**(1):4-10
- [36] Cino E, Soares I, Pedrote M, *et al.* Aggregation tendencies in the p53 family are modulated by backbone hydrogen bonds. *Sci Rep*, 2016, **6**:32535
- [37] Fernández A, Scheraga H A. Insufficiently dehydrated hydrogen bonds as determinants of protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(1):113-118
- [38] Ostermeyer A, Runko E, Winkfield B, *et al.* Cytoplasmically sequestered wild-type p53 protein in neuroblastoma is relocated to the nucleus by a C-terminal peptide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(26):15190-15194
- [39] Pedrote M, Motta M, Ferretti G, *et al.* Oncogenic gain of function in glioblastoma is linked to mutant p53 amyloid oligomers. *iScience*, 2020, **23**(2):100820
- [40] Levy C, Stumbo A, Ano Bom A, *et al.* Co-localization of mutant p53 and amyloid-like protein aggregates in breast tumors. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, **43**(1):60-64
- [41] Silva J, Rangel L, Costa D, *et al.* Expanding the prion concept to cancer biology: dominant-negative effect of aggregates of mutant p53 tumour suppressor. *Biosci Rep*, 2013, **33**(4):e00054
- [42] Forget K, Tremblay G, Roucou X. p53 Aggregates penetrate cells and induce the co-aggregation of intracellular p53. *Plos One*, 2013, **8**(7):e69242
- [43] Li Y, Prives C. Are interactions with p63 and p73 involved in mutant p53 gain of oncogenic function?. *Oncogene*, 2007, **26**(15):2220-2225
- [44] Costa D C, De Oliveira G A, Cino E A, *et al.* Aggregation and prion-like properties of misfolded tumor suppressors: is cancer a prion disease?. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, **8**(10):a023614
- [45] Wiech M, Olszewski M, Tracz-Gaszewska Z, *et al.* Molecular mechanism of mutant p53 stabilization: the role of HSP70 and MDM2. *PLoS One*, 2012, **7**(12): e51426
- [46] Zhang Y, Xu L, Chang Y, *et al.* Therapeutic potential of ReACp53 targeting mutant p53 protein in CRPC. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2020, **23**(1):160-171
- [47] Bauer M, Jones R, Tareque R, *et al.* A structure-guided molecular chaperone approach for restoring the transcriptional activity of the p53 cancer mutant Y220C. *Future Med Chem*, 2019, **11**(19):2491-2504
- [48] Silva J, Lima C, Rangel L, *et al.* Recent synthetic approaches towards small molecule reactivators of p53. *Biomolecules*, 2020, **10**(4):635
- [49] Loh S N. Follow the mutations: toward class-specific, small-molecule reactivation of p53. *Biomolecules*, 2020, **10**(2):303
- [50] Liu X, Wilcken R, Joerger A, *et al.* Small molecule induced reactivation of mutant p53 in cancer cells. *Nucleic Acids Res*, 2013, **41**(12):6034-6044
- [51] Miller J, Blanchet A, Orvain C, *et al.* Bifunctional ligand design for modulating mutant p53 aggregation in cancer. *Chem Sci*, 2019, **10**(46):10802-10814
- [52] Ferraz Da Costa D C, Campos N, Santos R, *et al.* Resveratrol prevents p53 aggregation *in vitro* and in breast cancer cells. *Oncotarget*, 2018, **9**(49):29112-29122
- [53] Das U, Hariprasad G, Ethayathulla A, *et al.* Inhibition of protein aggregation: supramolecular assemblies of arginine hold the key. *PLoS One*, 2007, **2**(11):e1176
- [54] Chen Z, Chen J, Keshamouni V, *et al.* Polyarginine and its analogues inhibit p53 mutant aggregation and cancer cell proliferation *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, **489**(2):130-134
- [55] Kovachev P, Banerjee D, Rangel L, *et al.* Distinct modulatory role of RNA in the aggregation of the tumor suppressor protein p53 core domain. *J Biol Chem*, 2017, **292**(22):9345-9357
- [56] Ishimaru D, Ano Bom A, Lima L, *et al.* Cognate DNA stabilizes the tumor suppressor p53 and prevents misfolding and aggregation. *Biochemistry*, 2009, **48**(26):6126-6135

Research Progress in Tumor Treatment Targeting Mutated p53 Aggregates*

WANG Jia-Jian, OU Xia, GENG Xue-Ye, ZHANG Ji-Hong**

(Medical School, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract The formation of mutant p53 aggregates is caused by the exposure of the adhesion sequences wrapped in the hydrophobic core of p53 after mutation. After exposure, the adhesion sequences will quickly nucleate and assemble to form amorphous fibrils. The mutant p53 aggregates can not only inactivate wild type p53 (Wt-p53) in a dominant-negative effect manner, but also exhibit gain-of-function (GOF) characteristic to promote the development and progression of tumors. Abnormal aggregation of mutant p53 has been found in various tumors, such as ovarian cancer, colon cancer and prostate cancer. The mutant p53 aggregates are significantly correlated with tumor metastasis, drug resistance and poor prognosis. Therefore, p53 aggregation is considered as a potential therapeutic target. The discovery of small molecule compounds targeting mutated p53 aggregates, which can inhibit the exposure of adhesion sequences in the hydrophobic core of p53 and restores the function of p53, is becoming a promising strategy in cancer therapy. In this review, we summarized the mechanism of p53 aggregation and the potential therapeutic strategies.

Key words mutant p53, aggregates, targeting strategy

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0041

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81960670) and Key Project of Yunnan Province (202001AS070012).

** Corresponding author.

Tel: 86-15331717268, E-mail: zhjihong2000@kust.edu.cn

Received: February 18, 2021 Accepted: April 8, 2021