

DOI: 10.13376/j.cbls/2018030

文章编号: 1004-0374(2018)03-0233-08

· 评述与综述 ·

## p53蛋白磷酸化及其功能

令吉明<sup>1,2</sup>, 王 建<sup>2</sup>, 徐晓琳<sup>1</sup>, 耿云峰<sup>1</sup>, 王伟龙<sup>1</sup>, 赵春玲<sup>1\*</sup>, 田春艳<sup>2\*</sup>

(1 潍坊医学院山东省高校生物药物重点实验室, 潍坊 261000; 2 军事科学院军事医学研究院生命组学研究所, 国家蛋白质科学中心(北京), 北京蛋白质组研究中心, 国家蛋白质组学重点实验室, 北京 102206)

**摘 要:** p53 作为最重要的抑癌基因之一, 在肿瘤的发生发展中起着非常重要的作用。在正常条件下, p53 的活性和蛋白水平在细胞内维持着一个较低的水平。当细胞感应应激, p53 发生系列翻译后修饰, 蛋白水平和活性发生改变, 主要作为转录因子调控多种下游靶基因的表达, 从而启动细胞周期阻滞、凋亡、衰老和分化等细胞学效应。p53 的翻译后修饰在响应应激和启动 p53 参与相应的细胞学效应的过程中起着重要的作用。p53 的磷酸化修饰是最常见的翻译后修饰, 能够影响 p53 的稳定性及与反应元件的结合能力, 从而调控 p53 的活性。现综述 p53 的功能结构域, p53 最常见的不同位点的磷酸化修饰及其参与的细胞学效应, 并阐释 p53 磷酸化在 p53 调控中的重要性和与疾病的相关性。

**关键词:** p53; 翻译后修饰; 磷酸化; 信号通路

**中图分类号:** Q50; R394.3 **文献标志码:** A

## Phosphorylation of p53 and its function

LING Ji-Ming<sup>1,2</sup>, WANG Jian<sup>2</sup>, XU Xiao-Lin<sup>1</sup>, GENG Yun-Feng<sup>1</sup>,  
WANG Wei-Long<sup>1</sup>, ZHAO Chun-Ling<sup>1\*</sup>, TIAN Chun-Yan<sup>2\*</sup>

(1 Key Laboratory of Biological Medicine in Universities of Shangdong Province, Weifang Medical College, Weifang 261000, China; 2 State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences (Beijing), Beijing Institute of Lifeomics, Beijing 102206, China)

**Abstract:** p53, as one of the most famous tumor suppressors, plays a very important role in tumorigenesis and cancer development. Under normal conditions, the activity and protein level of p53 are maintained at low levels in cells. In response to many kinds of stresses, p53 is modified and activated by many kinds of post-translational modifications. The activated p53, mainly as transcription factor, promotes the expression of its downstream target genes, which could trigger cell cycle arrest, apoptosis, senescence, differentiation and so on. Therefore, p53 posttranslational modification is essential to ensure appropriate p53 function. The most common post-translational modification of p53 is phosphorylation. p53 phosphorylation generally results in its stabilization, increases its sequence-specific DNA binding, and then activates p53 selectively. In order to elucidate the important role of phosphorylation on p53 regulation and relevance to disease, in this review, we summarized the functional domain of p53, the important phosphorylation sites of p53 and the related cellular effects.

**Key words:** p53; post-translational modification; phosphorylation; signal pathway

p53 作为抑癌基因在维持细胞稳态的过程中起着相当重要的作用。在正常状态下, p53 在细胞内

维持着较低的表达和活性。细胞感应不同的应激后, 可通过不同的信号通路对 p53 蛋白进行翻译后修饰,

收稿日期: 2017-09-22; 修回日期: 2017-11-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(81602433, 81572578); 山东省自然科学基金项目(ZR2015HM028)

\*通信作者: E-mail: 13391699535@163.com(田春艳); zhaochunlingbj@163.com(赵春玲)

使得 p53 的蛋白稳定性和活性发生改变, 迅速激活其相关的下游靶基因, 进一步启动周期阻滞、凋亡、衰老和分化等细胞学效应<sup>[1]</sup>。p53 的翻译后修饰包括磷酸化、泛素化、类泛素化、乙酰化和甲基化修饰等。p53 蛋白 N 端大概有 100 个氨基酸残基可以被修饰, C 端大概有 90 个氨基酸残基可以被修饰。N 端主要是磷酸化修饰, 而 C 端的修饰包括磷酸化、泛素化、乙酰化和 SUMO 修饰等。细胞应答不同的刺激时, p53 不同位点的磷酸化修饰在分子水平、蛋白水平、细胞水平乃至整个组织水平对 p53 活性的调控都起到相当重要的作用。为了阐述 p53 磷酸化对 p53 功能的影响, 本文主要综述了近几年一些重要的 p53 磷酸化修饰的研究。

## 1 p53的结构

人类 p53 基因可以编码 393 个氨基酸。该基因的编码区含有 11 个外显子, 其中第一个外显子并不能编码蛋白质。如图 1 所示, p53 蛋白主要包括 5 个功能结构域: 转录激活结构域 (transactivation domain, TAD)、Pro 富集区域 (Pro-rich domain, PRD)、中间部位的 DNA 结合结构域 (DNA binding domain, DBD)、四聚化功能结构域 (tetramerization domain, TD) 和 C 端基本结构域 (C-terminal basic domain, BD)。TAD 结构域位于 1~42 位氨基酸残基之间, 对于 p53 的转录活性和与 p53 发生相互作用的蛋白是必要的; PRD 结构域位于 61~92 位氨基酸残基之间, 对于和 Sin3 的相互作用以及维持 p53 的稳定性是必要的; DBD 结构域位于 101~300 位氨基酸残基之间, 通过 DBD 结构域, p53 作为转录因子可以结合到相关的 DNA 序列; 全长 p53 的 TD 结构域位于 326~356 位氨基酸残基之间, 可以调控 p53 蛋白的寡聚化; BD 结构域位于 364~393 位氨基酸残基之间, 可以和非特异性的 DNA 序列结合, 从而调控 DBD 结合到特异性的 DNA 序列上, BD 结构域的去除可

增强 p53 与序列特异性 DNA 的结合。

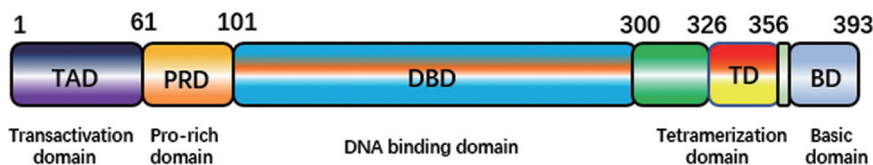
## 2 p53的磷酸化修饰

p53 的磷酸化修饰为稳定 p53 和增强 p53 转录活性的首要步骤<sup>[2]</sup>。p53 的磷酸化修饰是将磷酸基团加到 p53 蛋白的某个氨基酸残基的侧链羟基上的过程, 常见的这些氨基酸包括丝氨酸 (Ser) 和苏氨酸 (Thr) 残基等。整个 p53 含有 38 个丝氨酸残基和 22 个苏氨酸残基, 但是常见的磷酸化位点包括 N 端的 Ser6、9、15、20、33、37、46 以及 Thr18、55、81, DNA 结合结构域的 Ser149、166 以及 Thr150、155, C 端结构域的 Ser315、376、378 和 Ser392。迄今为止, 人们已经鉴定出了 30 多个 p53 的磷酸化位点<sup>[3]</sup>。在不同的应激状态下, p53 各个位点对应的蛋白激酶可以被激活, 从而使 p53 相应的位点被磷酸化修饰。每个位点对应的蛋白激酶至少有一种, 而且相同的蛋白激酶也可以磷酸化 p53 的不同位点, 激活或抑制 p53 的活性, 从而使 p53 参与不同的细胞学效应及信号通路。图 2 列举了本文所综述的每个磷酸化位点对应的磷酸化激酶。

### 2.1 p53 N端的磷酸化修饰

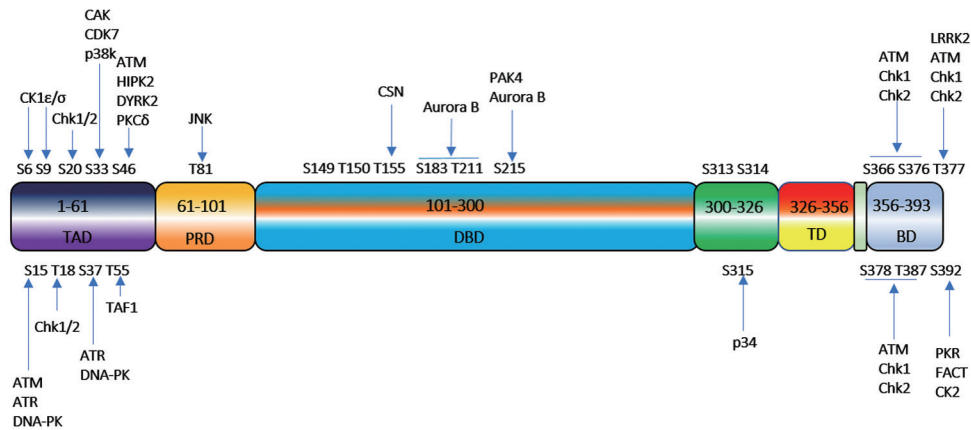
常见的 p53 N 端的磷酸化位点主要包括 Ser6、9、15、20、33、37、46 以及 Thr18、55、81 等。p53 N 端激活的蛋白激酶主要有 ATM、ATR、Chk2、CK1 和 p38K 等。细胞在应答不同刺激时, 在同一刺激的不同应激时间, 可以激活不同的蛋白激酶, 在 p53 的不同位点发生磷酸化修饰。

在应答电离辐射 (ionizing radiation, IR) 时, p53 Ser6、9、15 位的磷酸化出现在 30 min 之后<sup>[4]</sup>。在应答 UV 时, 磷酸化修饰比较晚, 但是这些位点磷酸化的修饰相对稳定。p53 Ser6 和 9 可以通过 CK1 蛋白激酶家族 CK1 $\sigma$  和 CK1 $\epsilon$  磷酸化。这两个位点受到多种基因毒性和非基因毒性的刺激后被磷酸化修饰, 但是, 这两个位点的修饰具体有什么功能却



p53 蛋白包括 393 个氨基酸。N 端包括 p53 的转录激活结构域, 泛素连接酶 MDM2 与 p53 的相互作用就发生在该区域, 从而抑制了 p53 的转录活性。N 端还包括脯氨酸富集区, 对于 p53 和 Sin3 的相互作用是必要的, 从而阻止了 p53 的降解。C 端包括四聚化结构域、核定位和核输出结构域。C 端的终端为碱性氨基酸富集区, 这个区域被视为 DNA 结合结构域的调控区域。p53 的突变有 73% 是错义突变, 而突变蛋白的功能也可以通过 p53 的翻译后修饰来调控, 如通过 p53 的磷酸化和乙酰化修饰。

图1 p53蛋白的功能结构域



p53最常见的翻译后修饰就是磷酸化修饰。大多数磷酸化位点都在p53的N端。一种蛋白激酶可以磷酸化不同的位点, 而某个位点也可以被一种或多种不同的蛋白激酶所修饰。p53 S15可以被ATM、ATR以及DNA-PK磷酸化修饰; 同时, ATR也可以磷酸化p53的S37位。JNK: c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase; CDK: cyclin-dependent kinase; DNA-PK: DNA-dependent protein kinase; ATM: ataxia telangiectasia mutated; ATR: ataxia telangiectasia and Rad3 related protein; PKC: protein kinase C; HIPK2: homeodomain-interacting protein kinase 2; CHK: checkpoint kinase; CSN: COP9 signalosome associated kinase complex; CK, casein kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; DYRK2: dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase。

图2 p53常见的磷酸化位点以及潜在的蛋白激酶

未知。有人假设这两个位点的修饰在非洲爪蟾中胚层发育的过程中起着非常重要的作用。p53对于诱导中胚层特定基因的表达是必要的。另外, Ser6和9的磷酸化在通过TGF- $\beta$ 通路促进肿瘤发生和癌细胞转移过程中起到非常重要的作用。

p53 Ser15的磷酸化可以通过顺铂 (cisplatin)<sup>[5]</sup>、依托泊甙 (etoposide)<sup>[6]</sup>和亚硝酸盐 (arsenite)<sup>[7]</sup>等经典诱导剂进行诱导。细胞未受各种压力刺激, 即在生理学环境下, p53 Ser15的磷酸化对p53的转录活性是必要的<sup>[6]</sup>。也有研究发现, 作为肿瘤抑制因子的FBXW7在许多人类癌症中都有突变, 体内外实验证实, 在人的结肠癌细胞中, FBXW7的缺失会导致p53 Ser15被异常磷酸化修饰, 而这种异常的磷酸化修饰可以作为FBXW7突变的一种标记<sup>[8]</sup>。报道称, 高血糖可以激活醛糖还原酶, 进一步产生生活性氧, 活性氧的产生导致了p53 Ser15的磷酸化, 然后促进了线粒体功能的紊乱, 阻断了抗凋亡蛋白Bcl-xl的功能<sup>[9]</sup>。人的成纤维细胞历经复制衰老时, p53 Ser15的磷酸化水平也会上升。细胞在应答IR时, p53 Ser15可以被ATM磷酸化。但是, 细胞在受到UV刺激时, ATR可以使p53 Ser15和Ser37发生磷酸化修饰。DNA-PK磷酸化p53 Ser15是体外最早被鉴定出来的p53磷酸化位点之一。有报道认为DNA-PK可以在体内磷酸化p53 Ser15。1998

年, Lambert等<sup>[10]</sup>通过体外实验证明, DNA-PK可以使p53 Ser15和37被磷酸化。之前已经证实CBP可以乙酰化p53的C端。CBP的上升与p53 Ser15和37的磷酸化相关, Ser15和37的磷酸化可以增强p53和CBP/p300的结合, 从而增强了p53 C端的乙酰化修饰。更重要的是, p53 Ser15的突变会抑制p53 C端的乙酰化, 而Ser37的突变对p53 C端的乙酰化并没有影响。体外p53 Ser15的磷酸化修饰可以抑制TFIID和p53的结合<sup>[10]</sup>。

另一方面, p53 Ser15和Ser20的磷酸化修饰还可以影响细胞的周期阻滞和DNA损伤修复。细胞在未接受外界刺激时, p53维持着一个较低的水平, 因为泛素连接酶MDM2可以与p53相互作用, 使p53被泛素化途径降解。当细胞受到外界刺激时, p53 Ser15和20位被磷酸化修饰, 阻断了MDM2与p53之间的相互作用, 使得p53的蛋白水平上升, 激活了p53的转录活性, p53通过调节相关的靶基因来控制细胞的命运<sup>[11]</sup>。在小鼠体内, 这两个位点是Ser18和Ser23<sup>[12]</sup>。丝氨酸和苏氨酸蛋白激酶Chk1和Chk2, 作为ATM和ATR下游靶分子, 可以磷酸化人的p53 Ser20<sup>[13]</sup>。在应答IR时ATM被激活, 进一步激活Chk2从而使p53磷酸化而被激活, 但是当细胞在受到UV刺激时, 被激活的蛋白激酶是ATR-Chk1<sup>[14]</sup>。细胞暴露于IR和UV较强的刺激



时, Ser20 被磷酸化出现在 1~2 h, 但是 Thr18 的磷酸化修饰出现在 2 h 之后<sup>[15]</sup>。总之, p53 的 Ser15、Thr18 和 Ser20 磷酸化后, 可以通过阻断 MDM2 介导的 p53 的降解, 增强 p53 转录活性。

p53 Ser33 和 Ser46 在介导细胞凋亡的过程中起着相当重要的作用。细胞在受到 UV 和 IR 刺激时, Ser33 的磷酸化修饰出现在 1 h 之后。细胞周期蛋白激酶 CAK 是转录因子 II H 多蛋白复合体的重要组成元件, 它包括三个亚基, 分别是 CDK7、cyclin H 和 p36MAT1。在体外, CAK 蛋白激酶可以使 Ser33 磷酸化。丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 也可以使 Ser33 和 Ser46 磷酸化, 而当这两个位点被突变之后, 可以抑制 UV 照射下 p53 介导的细胞凋亡。已经有研究证实, 氧化应激可以激活蛋白激酶 p38, 激活的 p38 导致 p53 Ser33 直接被磷酸化, 从而激活 p53 的转录活性, p53 作为转录因子激活 miR-200a-3p 的表达, 最终导致细胞死亡<sup>[16]</sup>。

p53 介导细胞凋亡的功能需要其 Ser46 被磷酸化, 从而增强 p53AIP1 等凋亡相关靶基因的表达。有证据表明, 一些蛋白激酶可以磷酸化 p53 Ser46, 这些蛋白激酶包括 HIPK2<sup>[17]</sup>、ATM<sup>[11-18]</sup>、DYRK2<sup>[19]</sup> 和 PKC $\delta$ <sup>[20]</sup>。前期研究发现在 DNA 受损时, 过表达 p53DINP1 会激活 p53 Ser46 的磷酸化和 p53AIP1 的表达水平, 使得细胞走向凋亡。而 p53 Ser46 磷酸化水平的上升是因为 p53DINP1 募集 PKC $\delta$  使得 p53 Ser46 被磷酸化。最近有报道, Palmdelphin 作为一种新的凋亡前基因, 可以介导细胞的凋亡。当 DNA 损伤时, p53 Ser46 被磷酸化修饰; 同时, 检测到 PALMD 蛋白水平的上升, PALMD 上升之后在核定位信号的作用下入核, 从而介导了细胞的凋亡。而当 PALMD 的水平下调之后, 细胞将以消耗 ATP 的方式走向坏死<sup>[21]</sup>。细胞在应答 IR 时, ATM 可以通过磷酸化 p53 Ser15 和 Ser20 稳定 p53 水平并增强 p53 的活性。同样地, 细胞在受到 IR 刺激时, p53 Ser46 也可以被 ATM 磷酸化, p53 Ser46 的磷酸化促进了 p53AIP1 的表达, 从而介导了细胞的凋亡。DYRK2 作为另外一种蛋白激酶, 可以直接磷酸化 p53 Ser46, 在细胞暴露在基因毒性压力下时, DYRK2 进入细胞核使 p53 Ser46 发生磷酸化, 同样诱导了 p53AIP1 的表达。这表明, 在 DNA 受损时, DYRK2 可以调控 p53 诱导的细胞凋亡。化疗药物 cisplatin 可以促进 HIPK2 蛋白的表达, 同时可以激活 HIPK2 的激酶活性。而 HIPK2 与 cisplatin 介导

的细胞凋亡是相关的, 因此, HIPK2 在触发 p53 依赖的细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用。总之, 细胞在应答不同刺激时, p53 Ser46 磷酸化水平的上升可以促进细胞凋亡基因的表达, 进而促进细胞的凋亡。Garufi 和 D'Orazi<sup>[22]</sup> 发现, 高糖可以抑制 ADR 诱导的 p53 Ser46 的磷酸化, 从而抑制 p53 介导的细胞凋亡。

近几年关于 p53 Thr55 的磷酸化的报道相对较少。有报道称, DNA 受损的后期由于 ATP 水平的升高, TAF1 可以直接导致 p53 Thr55 被磷酸化, 进而导致 p53 从 p21 的启动子区域解离下来, 最终导致了靶基因 p21 的失活。在同样的条件下, 还可以导致 p53 其他靶基因的失活, 如 LAGLS7/PIG1、TRIAP1、PLXNB2、SESN2、GPC1 和 MDM4 等<sup>[23]</sup>。

在 DNA 受损或者细胞受到应激信号刺激时, p53 的 Thr81 可以被 JNK (Jun N-terminal-kinase) 磷酸化, 突变该位点或者过表达 JNK 特定位点磷酸酶 MKP5 可以抑制 p53 的转录活性和细胞凋亡<sup>[24]</sup>。

## 2.2 p53 DNA结合结构域的磷酸化修饰

目前, 在 p53 DNA 结合结构域发现的磷酸化位点较少, 常见的有 Ser149、Thr150、Thr155 和 Ser215 等。但是, 近 5 年并没有关于 Ser149 和 Thr150 的报道。2017 年, Lee 等<sup>[25]</sup> 报道, p53 Thr155 被 CNS 磷酸化修饰后, 对于 Jab1 (Jun activation-domain binding protein 1) 介导的 p53 从细胞核输出到细胞质是非常必要的。Xu 和 Lai<sup>[26]</sup> 报道 PAK4 可以直接磷酸化 p53 Ser215, 从而促进肝癌的转移。他们发现 PAK4 蛋白在肝癌中的表达要比癌旁组织中高, 通过在肝癌细胞中过表达或敲低 PAK4 后发现, PAK4 对肝癌细胞的迁移有非常重要的作用; 同时, 还发现 PAK4 可以直接磷酸化 p53 Ser215, 从而抑制 p53 的转录活性和 p53 介导的抑制肝癌细胞侵袭的能力, 即在肝癌细胞中高表达的 PAK4 可以磷酸化 p53 Ser215, 从而促进肝癌的转移。2012 年, Gully 等<sup>[27]</sup> 发现, Aurora B 可以磷酸化 p53 Ser183、Thr211 和 Ser215, 进一步加快 p53 通过泛素化的降解。而这些位点的磷酸化修饰抑制了 p53 的转录活性, 抑制了 p53 的细胞周期和细胞凋亡相关的靶基因。总之, 在不同的状态下, 不同的蛋白激酶可以磷酸化 p53 Ser215, 从而改变 p53 的转录活性, 进而改变 p53 下游靶基因的活性, 最终参与 p53 所介导的不同的效应。

## 2.3 p53 C端的磷酸化修饰

p53 C 端的磷酸化位点, 主要包括 Ser313、

Ser314、Ser315、Ser366、Ser376、Thr377、Ser378、Thr387 和 Ser392。细胞在应答 DNA 损伤时, ATM 激酶可以激活细胞周期检验点相关的激酶 Chk1 和 Chk2, 从而磷酸化 p53 C 端的相关位点, 这些位点主要包括 Ser313、Ser314、Ser366、Thr377、Ser378 和 Thr387。p53 C 端的磷酸化修饰主要是增强了 p53 的转录活性, 但是不同位点磷酸化的作用机制却是不同的, 从而决定了细胞的不同命运。

然而, 近 10 年却没有对 p53 Ser313 和 Ser314 的磷酸化修饰的报道。p53 Ser315 和 392 是最早被鉴定出的 C 端的磷酸化位点<sup>[28]</sup>。后续的分析表明, 在接受 UV 照射之后, 体内的这两个位点也可以被磷酸化。这些修饰与提升 p53 的转录活性是一致的, 即这些位点的磷酸化可以增强 p53 的转录活性。与此相反, 细胞受到 IR 刺激时, p53 Ser315 和 Ser392 的磷酸化修饰相当弱。细胞周期蛋白 B 依赖性的蛋白激酶 p34 (cell division cycle 2, Cdc2) 可以使 p53 的 Ser315 被磷酸化。在 DNA 受损之后, p53 Ser315 特异性抗体检测表明, 体内 p53 Ser315 可以被磷酸化修饰; 同时, 使用细胞周期依赖性蛋白激酶抑制剂可以减弱内源性 p53 的转录活性。体内和体外实验表明, 磷酸激酶 hcdc14 可以和 p53 发生相互作用, 推测 hcdc14 在 p53 介导的细胞周期调控过程中起着非常重要的作用。UV 照射而非 IR 可以引发 p53 Ser392 的磷酸化, 并且已经鉴定出了两个激酶可以作用于该位点: 一个是双链 RNA 激活蛋白激酶 (RNA activated protein kinase, PKR)<sup>[29]</sup>, 干扰素可以加强 PKR 和 p53 的相互作用, 并且该相互作用需要人野生型 p53 C 端的 30 个氨基酸残基; 另外一个激酶是一个多亚基复合体, 该复合体约为 700 kDa, 包含 CK2 和 FACT<sup>[30]</sup>。另外, Slee 和 Lu<sup>[31]</sup> 发现, 在小鼠体内 p53 Ser312 (相当于人的 Ser315) 的磷酸化对抑制化学药物 (烷化剂 MNU, 它可以显著地导致 T 细胞淋巴瘤) 的致癌作用是非常必要的。

Rajagopalan 等<sup>[32]</sup>发现, 14-3-3 的不同剪接体可以促进 p53 的转录活性, 但是不同的剪接体所介导的功能却是不同的。他们发现, p53 Ser366、Ser378 和 Thr387 被磷酸化修饰后, 14-3-3 的  $\gamma$  和  $\epsilon$  这两种剪接体可以和 p53 形成复合体, 而 Ser366、Ser378 和 Thr387 的去磷酸化并不影响 14-3-3 对 p53 转录活性的增强。2017 年, Ho 等<sup>[33]</sup>发现, LRRK2 作为 p53 的磷酸激酶可以磷酸化 p53, 从而促进肿瘤坏死因子 TNF $\alpha$  的表达, 进而诱导小神经

胶质细胞肿瘤坏死因子 TNF $\alpha$  介导的神经毒性。他们发现, LPS 处理可以增强 LRRK2 的激酶活性, 从而磷酸化 p53 Thr304/Thr377, 这两个位点的磷酸化增强了 TNF $\alpha$  的表达, 进一步促进了神经炎症。

### 3 不同应激条件下, p53 的磷酸化修饰参与的信号通路

p53 磷酸化修饰作为最常见的一种 p53 翻译后修饰, 在不同的应激条件下, 其不同位点可以被至少一种磷酸激酶磷酸化, 被修饰的 p53 改变了其稳定性和活性, 作为转录因子进一步激活相关的下游靶基因的表达, 从而参与不同的细胞学效应。

虽然一些重要的通路已经被证实, 如 IR 可以通过 ATM-Chk2 通路激活 p53, UV 可以通过 ATR-Chk1 通路激活 p53, 但是, p53 依赖的信号通路的分子机制仍然不太清楚。

细胞在应答 IR 时, p53 Ser15 可以被 ATM 磷酸化; 同时, IR 照射可以激活 CHK1/CHK2 蛋白激酶, 从而使 p53 Ser20 被磷酸化, Ser20 的磷酸化抑制了 p53 和 MDM2 的结合, 从而抑制了 p53 被降解, 导致蛋白水平上升, 在细胞核内堆积; 同时, p53 的转录活性激活后通过调节相关的靶基因来控制细胞的命运。

对于 p53 依赖的细胞凋亡, 人的上皮细胞在 UV 照射下要比 IR 照射下敏感。在 UV 照射下, ATR 可以使 p53 Ser15 和 Ser37 发生磷酸化修饰。此外, Ser15 和 Ser37 的磷酸化修饰可以增强 p53 和 CBP/p300 的结合, 从而增强 p53 C 端的乙酰化; 同时, UV 照射下, MAPK 激活可以使 Ser33 和 Ser46 磷酸化, 这两个位点的磷酸化修饰可以激活 p53 凋亡相关靶基因的表达, 而当这两个位点被突变之后, 可以抑制 UV 照射下 p53 介导的细胞凋亡。因此, Ser33 和 Ser46 在介导细胞凋亡的过程中起着相当重要的作用。而在应激状态下, p53 Ser46 还可以通过 PKC、DYRK2、HIPK2 和 ATM 蛋白激酶被磷酸化, 从而激活凋亡相关靶基因 p53AIP1 的表达, 促进细胞的凋亡。细胞受到 UV 照射之后, 还可以使 Thr55 的磷酸化修饰下降, 增加 p53 的稳定性。在紫外照射下, CDC2/CDK2 被激活, 从而使 p53 Ser315 被磷酸化, 从而增强了 p53 的转录活性。在内质网应激条件下, GSK-3 $\beta$  激酶也可以使 p53 Ser315 被磷酸化, 进而抑制 p53 介导的细胞凋亡。

此外, 只要细胞受到的外界压力在正常生理可控的范围之内, 细胞将通过不同的方式进行 DNA

损伤修复。UV 照射之后可以通过核苷酸切除修复的两个分支进行修复, 一个是全基因切除修复通路 (global genome repair, GGR), 另一个是转录偶联修复通路 (transcription-coupled repair, TCR)。UV 诱导的 DNA 损伤可以阻断 RNA 聚合酶 II 进行的转录, 从而激活 p53 的活性。GGR 依赖于 p53 的下游靶基因 Gadd45, Gadd45 结合在受损的染色体上, 并且可以影响染色体的重建。Gadd45 的表达依赖于 p53 的转录活性, 但是, p53 的翻译后修饰影响 GGR 的具体机制目前尚未知。

细胞在受到 IR、UV 和活性氧等一些刺激后, 可以通过不同的途径激活 p53。然而, 细胞未受到基因毒性的刺激时也可以激活 p53。p53 可以在低氧的状态下被激活, 低氧降低了 MDM2 的表达并且形成了 p53/E6/E6AP 复合体, 从而抑制了 p53 的出核。p53 在细胞核内的积累导致了细胞周期阻滞和细胞凋亡。但是, 低氧怎样激活 p53 信号通路也是未知的。因此, 需要进一步的工作来阐释各种应激条件下的 p53 激活的机制及可能的信号通路。表 1 列举了目前研究比较清楚的 p53 磷酸化位点及其

相应的蛋白激酶, 以供研究者进一步对 p53 磷酸化机制开展研究<sup>[34]</sup>。

#### 4 p53磷酸化和糖尿病

p53 作为典型的肿瘤抑制分子, 在癌症的治疗中起到相当重要的作用。根据其相应的功能机制, 临床上已经开发了大量的化疗药物。人类大约有一半的肿瘤是由于 p53 的突变所造成的, 因此, 大多数临床药物的开发都是针对于激活肿瘤细胞中 p53 的正常功能, 如 PRIMA-1、cisplatin 和 etoposide 可以增加 p53 的磷酸化水平促进肿瘤细胞的凋亡, 从而抑制肿瘤的形成。

除肿瘤以外, p53 的磷酸化修饰在介导其他疾病发生与发展中也起到了重要的作用。在糖尿病中, 血小板异常是其并发症之一, 异常的血小板增加患者血管中血栓的形成, 但具体的分子机制确未知。Tang 等<sup>[9]</sup>报道, 糖醛还原酶介导的 p53 磷酸化可以导致线粒体紊乱和糖尿病患者血小板损伤。他们发现, 高血糖诱导了糖醛还原酶的活化, 产生的活性氧增强了 p53 Ser15 的磷酸化, 进而促进了糖尿

表1 常见的p53磷酸化蛋白激酶<sup>[34]</sup>

蛋白激酶	不同的刺激	相应的磷酸化位点	分子或细胞水平的变化
ATM	DNA损伤	Ser15	细胞凋亡
ATR	γ射线或紫外照射	Ser15、Ser37	细胞凋亡
AURKA	AURKA的过表达	Ser315	p53泛素化降解
CDC2/CDK2	紫外照射	Ser315	增强p53的转录
CHK1/CHK2	电离辐射	Ser20	阻断p53/MDM2复合物
CK1	DNA损伤	Ser6、Ser9、Thr18	抑制MDM2稳定了p53
CSN相关激酶复合物	未接受刺激	Thr150、Thr155、Ser149	p53被降解
DNA-PK	DNA 损伤	Ser15、37	阻断p53/MDM2复合物
ERKs	紫外照射	Ser15	细胞凋亡
ERK2	阿霉素处理	Thr55	激活p53
FACT-CK2	紫外照射	Ser392	激活p53
GSK3β	内质网应激	Ser315、Ser376	抑制p53介导的凋亡
HIPK2	紫外照射	Ser46	促进CBP介导的p53乙酰化; 细胞周期阻滞; 细胞凋亡
JNK	紫外照射	Ser20	细胞凋亡
JNK	DNA损伤	Thr81	稳定p53
MAPKAPK2	紫外照射	Ser20	细胞凋亡
P38激酶	紫外照射	Ser15	细胞凋亡
P38激酶	紫外照射	Ser33、Ser46	稳定p53; 细胞凋亡
P38激酶	紫外照射、DNA损伤	Ser392	增强p53结合DNA的能力
PKC	未接受刺激; 电离辐射	Ser376、Ser378	p53泛素化降解; 增强p53结合DNA的能力
PKR	干扰素处理	Ser392	ND

注: 在应激条件和正常条件下, p53不同位点的磷酸激酶被激活, 从而使p53发生不同的调控, 进一步参与不同的细胞学效应及信号通路。



病患者线粒体紊乱及损伤, 最终降低了线粒体膜的通透性, 促进了血小板的凋亡。Lee 等<sup>[34]</sup>也发现, 糖尿病患者出现氧化应激和 ROS 水平的上升。高水平的 ROS 可以诱导 p53 Ser15 的磷酸化以及激活 JNK 蛋白激酶, p53 Ser15 的磷酸化诱导了线粒体紊乱和血栓的形成, JNK 的激活诱导了细胞的自噬, 形成了自噬小体, 而线粒体的自噬又可以保护血小板的功能。糖尿病的发病率和死亡率上升的一个重要原因是患者血栓的形成, 氧化应激通过增加 p53 磷酸化水平介导线粒体损伤, 进而导致糖尿病患者血栓的形成, 对 p53 异常磷酸化水平的干预将逐渐成为血栓形成的糖尿病的治疗的一个重要靶标。

## 5 总结及展望

磷酸化修饰是 p53 重要的翻译后修饰之一, p53 的不同结构域有不同的磷酸化位点, 而每一个磷酸化位点可以被相同或不同的蛋白激酶所修饰。在应激状态下, p53 同一位点可以被不同的蛋白激酶磷酸化, p53 不同位点亦可以被同一种蛋白激酶磷酸化, 从而选择性地参与相同或不同的信号通路, 表现出纷繁复杂的功能活性。p53 磷酸化水平的适度激活, 不仅在肿瘤的发生发展和响应化疗药物中起着重要作用, 而且与糖尿病的发生发展密切相关。p53 的磷酸化的异常增高可以导致线粒体紊乱和糖尿病患者血小板损伤, 从而促进血栓形成。可以通过干预 p53 的磷酸化水平调控血小板的自噬和凋亡, 从而有助于糖尿病的治疗。

p53 作为基因组稳定性的守护者, 其活性的严谨调控在细胞和机体的稳态维持中起着至关重要的作用。p53 的翻译后修饰是 p53 活性调控的重要手段之一, 磷酸化是 p53 翻译后修饰中最常见的一种。在不同的时空条件下, p53 不同位点的磷酸化如何发生、如何终止、如何与其他翻译后修饰进行协同作用、如何影响 p53 与其繁多的调控分子之间的相互作用, 选择性地调控下游不同功能群靶基因的表达, 从而决定细胞“生”与“死”的抉择, 影响机体稳态的维持和疾病的转归, 将会长期作为 p53 研究领域的重点。

### [参 考 文 献]

- [1] Zhang J, Cao M, Dong J, et al. ABRO1 suppresses tumorigenesis and regulates the DNA damage response by stabilizing p53. *Nat Commun*, 2014, 5: 5059
- [2] Nguyen TA, Menendez D, Resnick MA, et al. Mutant TP53 posttranslational modifications: challenges and opportunities. *Hum Mutat*, 2014, 35: 738-55
- [3] Ji X, Huang Q, Yu L, et al. Bioinformatics study of cancer-related mutations within p53 phosphorylation site motifs. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 13275-98
- [4] Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, et al. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, 1997, 91: 325-34
- [5] Kobayashi N, Abedini M, Sakuragi N, et al. PRIMA-1 increases cisplatin sensitivity in chemoresistant ovarian cancer cells with p53 mutation: a requirement for Akt down-regulation. *J Ovarian Res*, 2013, 6: 7
- [6] Loughery J, Cox M, Smith LM, et al. Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 7666-80
- [7] He J, Wang F, Luo F, et al. Effects of long term low- and high-dose sodium arsenite exposure in human transitional cells. *Am J Transl Res*, 2017, 9: 416-28
- [8] Li N, Lorenzi F, Kalakouti E, et al. FBXW7-mutated colorectal cancer cells exhibit aberrant expression of phosphorylated-p53 at Serine-15. *Oncotarget*, 2015, 6: 9240-56
- [9] Tang WH, Stitham J, Jin Y, et al. Aldose reductase-mediated phosphorylation of p53 leads to mitochondrial dysfunction and damage in diabetic platelets. *Circulation*, 2014, 129: 1598-609
- [10] Lambert PF, Kashanchi F, Radonovich MF, et al. Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *J Biol Chem*, 1998, 273: 33048-53
- [11] Enari M, Matsushima-Hibiya Y, Miyazaki M, et al. Studies of ATM kinase activity using engineered ATM sensitive to ATP analogues (ATM-AS). *Methods Mol Biol*, 2017, 1599: 145-56
- [12] Jenkins LM, Durell SR, Mazur SJ, et al. p53 N-terminal phosphorylation: a defining layer of complex regulation. *Carcinogenesis*, 2012, 33: 1441-9
- [13] Shieh SY, Ahn J, Tamai K, et al. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev*, 2000, 14: 289-300
- [14] Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, et al. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science*, 2000, 287: 1824-7
- [15] Sakaguchi K, Saito S, Higashimoto Y, et al. Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding. *J Biol Chem*, 2000, 275: 9278-83
- [16] Xiao Y, Yan W, Lu L, et al. p38/p53/miR-200a-3p feedback loop promotes oxidative stress-mediated liver cell death. *Cell Cycle*, 2015, 14: 1548-58
- [17] Taira N, Yoshida K. Post-translational modifications of p53 tumor suppressor: determinants of its functional targets. *Histol Histopathol*, 2012, 27: 437-43
- [18] Serrano MA, Li Z, Dangeti M, et al. DNA-PK, ATM and ATR collaboratively regulate p53-RPA interaction to facilitate homologous recombination DNA repair. *Oncogene*,

- 2013, 32: 2452-62
- [19] Perez M, Garcia-Limones C, Zapico I, et al. Mutual regulation between SIAH2 and DYRK2 controls hypoxic and genotoxic signaling pathways. *J Mol Cell Biol*, 2012, 4: 316-30
- [20] Iordanskiy S, Van Duyne R, Sampey GC, et al. Therapeutic doses of irradiation activate viral transcription and induce apoptosis in HIV-1 infected cells. *Virology*, 2015, 485: 1-15
- [21] Dashzeveg N, Taira N, Lu ZG, et al. Palmdelphin, a novel target of p53 with Ser46 phosphorylation, controls cell death in response to DNA damage. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1221
- [22] Garufi A, D'Orazi G. High glucose dephosphorylates serine 46 and inhibits p53 apoptotic activity. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014, 33: 79
- [23] Wu Y, Lin JC, Piluso LG, et al. Phosphorylation of p53 by TAF1 inactivates p53-dependent transcription in the DNA damage response. *Mol Cell*, 2014, 53: 63-74
- [24] Buschmann T, Potapova O, Bar-Shira A, et al. Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 2743-54
- [25] Lee EW, Oh W, Song HP, et al. Phosphorylation of p53 at threonine 155 is required for Jab1-mediated nuclear export of p53. *BMB Rep*, 2017, 50: 373-8
- [26] Xu HT, Lai WL, Liu HF, et al. PAK4 Phosphorylates p53 at serine 215 to promote liver cancer metastasis. *Cancer Res*, 2016, 76: 5732-42
- [27] Gully CP, Velazquez-Torres G, Shin JH, et al. Aurora B kinase phosphorylates and instigates degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: E1513-22
- [28] Appella E, Anderson CW. Signaling to p53: breaking the posttranslational modification code. *Pathol Biol (Paris)*, 2000, 48: 227-45
- [29] Cuddihy AR, Wong AH, Tam NW, et al. The double-stranded RNA activated protein kinase PKR physically associates with the tumor suppressor p53 protein and phosphorylates human p53 on serine 392 *in vitro*. *Oncogene*, 1999, 18: 2690-702
- [30] Keller DM, Zeng X, Wang Y, et al. A DNA damage-induced p53 serine 392 kinase complex contains CK2, hSpt16, and SSRP1. *Mol Cell*, 2001, 7: 283-92
- [31] Slee EA, Lu X. Requirement for phosphorylation of P53 at Ser312 in suppression of chemical carcinogenesis. *Sci Rep*, 2013, 3: 3105
- [32] Rajagopalan S, Sade RS, Townsley FM, et al. Mechanistic differences in the transcriptional activation of p53 by 14-3-3 isoforms. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: 893-906
- [33] Ho DH, Seol W, Eun JH, et al. Phosphorylation of p53 by LRRK2 induces microglial tumor necrosis factor  $\alpha$ -mediated neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482: 1088-94
- [34] Lee SH, Du J, Stitham J, et al. Inducing mitophagy in diabetic platelets protects against severe oxidative stress. *EMBO Mol Med*, 2016, 8: 779-95
- [35] Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 793-805