

DOI: 10.13376/j.cblls/2020056

文章编号: 1004-0374(2020)05-0446-07

MDM2/MDMX异二聚体及MDMX 磷酸化调控p53的研究进展

王 兵^{1,2,3}, 王菊芳^{1*}

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃省空间辐射生物学重点实验室, 中国科学院重离子辐射生物医学重点实验室, 兰州 730000; 2 中国科学院大学, 北京100049; 3 John B. Little Center for Radiation Sciences, Harvard T.H. Chan School of Public Health, Boston, MA 02115)

摘要: p53 作为肿瘤抑制因子在维持机体内稳态和抑制肿瘤发生发展中起到关键作用。超过半数的人类肿瘤中都存在 p53 的突变。突变的 p53 具有“获得性功能”, 反而促进肿瘤的发生、转移和耐药。MDM2 和 MDMX 是两个最主要的 p53 负调控蛋白, 二者是同源蛋白, 可以独自或以异二聚体的方式调控 p53。在多种刺激信号下, MDM2/MDMX 异二聚体对 p53 的负调控作用被抑制, 使得 p53 活化进而激活下游复杂的信号网络, 维持细胞内稳态。磷酸化修饰是 MDMX 调节的重要方式之一, 对其自身的稳定性、核定位以及与 MDM2、p53 的相互作用均有影响。该文对以上内容进行简要综述, 并对现有治疗靶标和小分子化合物进行讨论, 为进一步开发新的有效的肿瘤治疗策略提供思路。

关键词: p53; MDM2/MDMX 异二聚体; MDMX 磷酸化; 肿瘤治疗

中图分类号: Q71; R73 **文献标志码:** A

Advances in regulation of p53 by MDM2/MDMX heterodimer and MDMX phosphorylation

WANG Bing^{1,2,3}, WANG Ju-Fang^{1*}

(1 Key Laboratory of Space Radiobiology of Gansu Province & Key Laboratory of Space Radiobiology of Gansu Province and Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Biology and Medicine of Chinese Academy of Sciences, Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3 John B. Little Center for Radiation Sciences, Harvard T.H. Chan School of Public Health, Boston, MA 02115, USA)

Abstract: The tumor suppressor p53 plays a critical role in guiding homeostasis and restraining the initiation or progression of cancer. Many human tumors carry p53 mutations with novel phenotypes which have contributed to tumor progression, metastasis and increased drug resistance, and these forms are referred to as mutant p53 gain-of-function. The two major essential negative regulators of p53 are MDM2 and MDMX. These homolog proteins work in co-ordination or individually which dictates the turnover of p53 upon diverse cell stress signal. And activated p53 assist in maintaining the cellular homeostasis through transactivating multiple target genes. Studies have shown that phosphorylation of MDMX can affect its degradation, intracellular localization and interaction with MDM2 and p53 and thus regulate p53. This review concentrates on the role of phosphorylation of MDMX and the interaction with MDM2 in regulation of p53. In addition, the review discusses the current anti-tumor therapeutic targets and small molecules, along with the potential and effective therapeutic targets to restore p53 activity.

Key words: p53; MDM2/MDMX heterodimer; MDMX phosphorylation; tumor therapy

收稿日期: 2019-10-27; 修回日期: 2019-12-24

基金项目: 甘肃省科技计划项目(145RTSA012, 17JR5RA307)

*通信作者: E-mail: jufangwang@impcas.ac.cn

1 p53研究史

40年前,p53 (tumor protein 53) 作为SV40 (Simian virus 40, 猿猴病毒 40) 的伴侣蛋白以原癌基因的身份被发现^[1-2]。随后的研究发现,p53并非原癌基因,而是重要的肿瘤抑制因子。超过半数的人类肿瘤中都存在TP53基因的突变。伴随TP53遗传突变的李-法美尼综合征患者肿瘤发生风险极高^[3]。正常生理状态下,p53蛋白的表达水平很低;应激状态下,p53作为转录因子激活下游复杂的信号网络,响应细胞刺激,维持基因组稳定和机体内稳态。

1.1 p53的结构与功能

人源p53蛋白是由TP53基因编码,由393个氨基酸构成,分为5个结构域。N端(-NH₂,氨基端)有两个转录激活结构域和脯氨酸富集结构域,脯氨酸富集结构域包含5个PXXP模体(P为脯氨酸,X为任意其他氨基酸),负责与其他蛋白的相互作用^[4];中间是DNA结合结构域,特异性结合靶基因启动子区域的特异性DNA序列,进而开启同源四聚体化,激活其转录活性;另外,C端(COO⁻,羧基端)的调节结构域可以非特异性结合DNA^[5]。此外,p53还有核定位和核输出序列。核定位序列介于DNA结合结构域和四聚体结构域的中间,核输出序列定位于四聚体结构域^[6]。

p53蛋白主要是作为转录因子发挥其强大的调控功能。细胞受到不同的刺激后,如DNA损伤、氧化应激、原癌基因过度激活、核糖体压力、缺氧、端粒缩短等^[7],p53通过多重磷酸化、乙酰化和其他翻译后修饰迅速被活化,募集共激活复合物p300/CBP等共同激活下游靶基因^[8]。p53可以通过激活p21参与细胞周期阻滞和衰老,激活PUMA(p53 up-regulated modulator of apoptosis)参与凋亡,激活Atg10 (autophagy related 10)和FoxO3 (forkhead box O3)参与自噬等^[9]。越来越多的证据显示,轻微的生理波动,如葡萄糖或其他营养成分和活性氧等水平变化也可以活化p53,激活TIGAR (TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator)等一系列下游因子以维持正常的氧化应激和细胞代谢水平^[10]。

除了作为转录因子的功能,位于胞浆的p53还可以通过蛋白质间相互作用发挥功能。当小鼠受到全身照射时,细胞中的p53会转移到线粒体外膜,与BCL-2 (B-cell lymphoma 2)家族的蛋白相互作用,通透化线粒体外膜,触发线粒体膜间隙中促凋亡因子的释放,诱导凋亡^[11]。

1.2 p53与人类疾病

p53的转录活性可以同时改变至少上百个基因的表达,调控着复杂的下游信号网络,对基因组稳定性和细胞命运有着巨大的影响。p53的突变或丢失都与癌症的发生密切相关。此外,p53的异常表达还可以导致过早衰老和一些神经退行性疾病,如帕金森病和阿尔茨海默病等^[12-13]。

TP53是人类肿瘤细胞中发生突变率最高的基因,绝大多数突变是错义突变。通过国际癌症研究会的TP53突变数据库对21 587例体细胞突变进行分析发现^[14],在人类肿瘤中,绝大多数突变都发生在p53 DNA结合结构域,并且明显影响着p53的转录激活能力。这些突变被大致分成两大类:DNA接触突变和构象突变。R175、R273、R248 (R为精氨酸)是其中的三个热点突变位点。R273H (H为组氨酸)为DNA接触突变,在不影响p53整体构象的情况下,改变p53特异性结合DNA的能力。R175H为构象突变,导致p53 DNA结合结构域的构象部分或全部消失。野生型p53具有肿瘤抑制功能,但是突变p53会出现“获得性功能”,促进肿瘤发生、转移、化疗耐受或其他新功能。人结肠癌细胞中的p53 R248W (W为色氨酸)和R273H突变体可以选择性地分泌富集miR-1246的外泌体。这些外泌体被邻近的肿瘤相关巨噬细胞摄入,触发巨噬细胞依赖于miR-1246的重编程,分泌更多TGF- β (transforming growth factor β),产生一种抗炎的免疫抑制微环境,促进肿瘤的发展和转移^[15]。

2 MDM2/MDMX 异二聚体

在生理状态下,p53蛋白的表达水平很低,并且是动态变化的^[16]。在细胞受到刺激后,位于p53 N端的Ser15和Ser18等位点被磷酸化,MDM2/MDMX不能与p53结合进行泛素化降解^[17];同时MDM2开始降解自身和MDMX,使p53累积活化,并迅速激活下游相应的靶基因。这涉及一系列复杂的调控过程以确保p53的功能,包括控制p53蛋白的稳定性^[18]、核内的转运和停留^[19]、四聚体化^[20]、翻译后修饰等^[21]。同时,持续高水平的p53会开启PUMA、BAX等凋亡相关基因的转录,引发细胞凋亡。因此,需要一个灵敏而快速的系统负反馈p53的信号,使细胞在响应刺激后能够迅速回到稳态。在p53诸多负反馈调节机制中,最核心的调控机制是由MDM2/MDMX这一对同源异聚复合蛋白实现的。

2.1 MDM2和MDMX的结构与功能

MDM2 N端的 p53 结合结构域可以结合到 p53 的转录激活结构域, 阻碍 p53 与其共转录激活因子的结合, 抑制 p53 靶基因的激活^[22](图1)。另一方面, MDM2 C端的 RING (really interesting new gene) 结构域具有 E3 (ubiquitin ligase) 泛素连接酶活性, 可以泛素化降解 p53 和 MDMX, 其自身也可被泛素化。同时, MDM2 是 p53 的靶基因, 表达水平受到 p53 的调控。在 *Mdm2*^{C462A} (C 为半胱氨酸, A 为丙氨酸) 突变的小鼠模型中, MDM2 E3 泛素连接酶的活性消失, 在胚胎发育过程中不能有效控制 p53 的活性, 出现胚胎致死现象^[23]。

作为 MDM2 的同源蛋白, MDMX 的结构与 MDM2 相似(图1), 但是 MDMX 的 RING 结构域没有 E3 泛素连接酶活性, 不能单独泛素化降解 p53, 可以通过与 MDM2 的 RING 结构域结合共同泛素化降解 p53。同时, MDMX 缺少核定位和核输出序列, 在没有与 MDM2 或其他可入核蛋白结合的情况下, MDMX 只能定位在细胞质中^[24]。在未受刺激的细胞中, p53 由于 MDM2 RING 结构域介导的泛素化维持在较低的水平。MDMX 占据 p53 的转录激活结构域, 使 p53 不能被激活。细胞受到刺激后, p53 不能被 MDM2 泛素化降解, 蛋白水平升高并活化, 同时 MDM2 作为 p53 的靶基因大量表达, 更有效地泛素化 MDMX, 使其无法占据 p53 的转录激活结构域, 确保 p53 的全面激活。

MDMX 和 MDM2 虽然具有很高的同源性, 但是它们在负调节 p53 中的作用并不能彼此代偿。小鼠体内研究显示, 敲除 MDM2 后出现 p53 依赖的胚胎致死现象, 杂合敲除 MDM2 的小鼠与敲除 p53

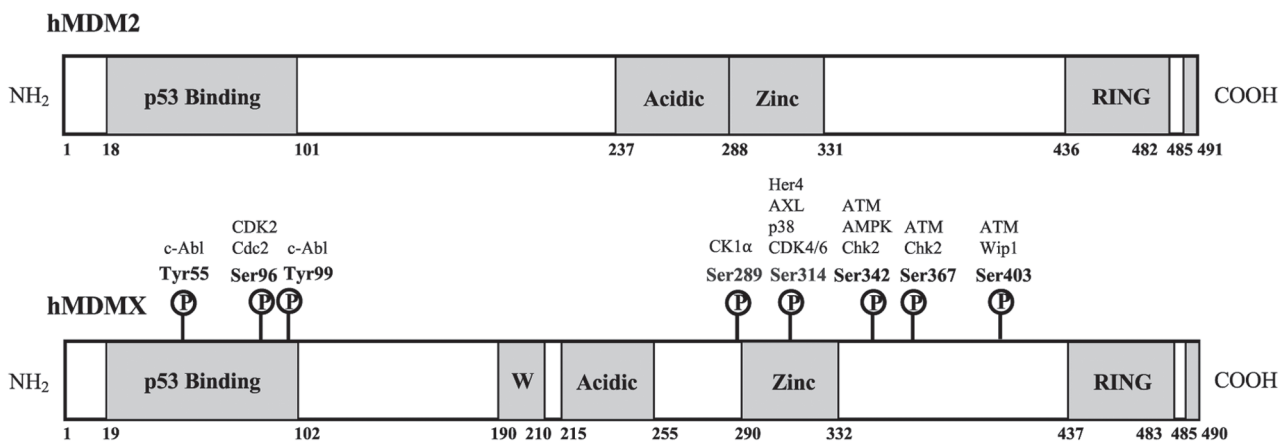
的小鼠杂交后, 胚胎致死现象得到很大程度的缓解^[25]。当小鼠敲除 MDMX 后同样出现胚胎致死现象, 与 MDM2 类似, 通过与 p53 缺失的小鼠杂交可以得到 MDMX 和 p53 双敲除的小鼠^[26-27]。尽管它们的 MDMX 或 MDM2 是完整的, 单独敲除 MDM2 或 MDMX 的小鼠死于胚胎, 表明 MDMX 和 MDM2 在调控 p53 的过程中不能替代对方。

2.2 MDM2与MDMX 独立调控p53

前期实验表明, MDMX 和 MDM2 可以分别独立调控 p53。MDM2 可以泛素化降解 p53、协助 p53 核输出进行降解或抑制 p53 的转录活性等; 另一方面, MDMX 主要通过与 p53 转录激活结构域结合抑制 p53, 抑制其转录激活活性。因此, MDM2 和 MDMX 必须利用空间和时间上的差异, 独立执行对 p53 的调控。在胃肠道的平滑肌细胞中特异性条件敲除 MDM2 可以导致胚胎致死, 但是敲除 MDMX 并没有出现胚胎致死现象或其他病理缺陷^[28], 在心肌细胞中也得到了类似的结果^[29]。这表明 MDMX 和 MDM2 在全身调控 p53 时的确存在空间差异。MDM2 敲除小鼠通过诱导凋亡导致胚胎致死, MDMX 敲除小鼠同样导致胚胎致死, 但是没有出现明显的细胞凋亡现象, 仅出现细胞周期阻滞^[27]。这表明 MDM2 可以抑制 p53 诱导凋亡的能力, 但 MDMX 可能抑制 p53 诱导细胞周期阻滞的能力。

2.3 MDM2/MDMX 异二聚体调控p53

越来越多的证据显示, MDMX 和 MDM2 形成异二聚体后可以更有效地调控 p53。单体 MDM2 E3 泛素连接酶的活性非常低, 其活性需要与 MDMX RING 结构域的相互作用^[30-31]。酵母双杂交实验发现, MDM2 可以通过 RING 结构域与自身形成同源



p53 Binding, p53结合结构域; Acidic, 中心酸性结构域; Zinc, 锌指结构域; RING, RING结构域; W, 色氨酸模体。

图1 人源MDM2与MDMX蛋白结构和MDMX的磷酸化位点示意图

复合物或者与MDMX形成异源复合物,但是MDMX在体内或体外实验中均不能与自身形成同源复合物^[24,32]。MDMX/MDM2 RING结构域的结合亲和力高于MDM2同源二聚体的结合亲和力,体外实验中MDMX和MDM2形成的异二聚体更稳定,也可以更有效募集E2泛素转移酶泛素化p53^[33]。

Huang等^[26]在MDMX RING结构域引入一个碱基对的突变C462A。在*Mdmx*^{C462A}突变的小鼠模型中,MDM2不受影响,同时保留了MDMX与p53转录激活结构域的结合能力,因此MDM2和MDMX均保留了各自调控p53的能力,但是MDMX RING结构域的突变导致其不能与MDM2蛋白结合,阻止了MDM2/MDMX异二聚体的形成。该模型小鼠不能产生*Mdmx*^{C462A/C462A}纯合突变后代,与*Mdm2*或*Mdmx*敲除小鼠类似,出现p53依赖的胚胎致死现象。同期,另一个实验室Pant等^[34]利用敲除MDMX整个RING结构域的方法阻止MDM2/MDMX异二聚体的形成。与Huang的实验结果一致,在完全敲除RING结构域的小鼠模型中同样出现了p53依赖的胚胎致死。这些研究结果表明,不仅MDMX和MDM2对胚胎存活是必需的,同时两者以异二聚体调控p53的方式在胚胎发育过程中也发挥关键作用。

3 MDMX磷酸化修饰及其对p53的影响

MDMX虽然缺少E3泛素连接酶的活性,无法直接介导p53的降解,但是其本身可以通过分子内部结构的折叠、展开与修饰来调控p53。其中,MDMX的磷酸化在维持自身的稳定性、核定位以及与MDM2、p53的相互作用中发挥重要作用。人源MDMX蛋白潜在的丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸磷酸化位点有18个,目前被报道已知功能的磷酸化位点有8个(图1)。MDMX蛋白的结构与MDM2类似,由p53结合结构域、中心酸性结构域(acidic domain, AD)、锌指结构域和RING结构域构成。

3.1 p53结合结构域的磷酸化位点: Tyr55、Ser96、Tyr99

位于p53结合结构域的已知功能的磷酸化位点有Tyr55(酪氨酸,酪氨酸)、Ser96(丝氨酸,丝氨酸)、Tyr99。DNA损伤后,压力应激酪氨酸激酶c-Abl(Abelson tyrosine kinase)可以磷酸化MDMX的Tyr99位点,使p53从被抑制状态中释放并激活^[35]。Tyr99的磷酸基团能够与p53的C末端产生空间位阻,导致MDMX对p53的结合亲和力明显降低。这解释了应激诱导MDMX磷酸化后是如何将p53从抑制

复合物中释放激活响应DNA损伤的^[36]。在DNA受到损伤时,被c-Abl磷酸化的另一个位点是Tyr55。Tyr55的有效磷酸化至少部分地需要Tyr99的磷酸化。在非压力状态下,Tyr96位点被CDK2/Cdc2(cyclin-dependent kinase 2/1)磷酸化,使得MDMX更多地定位在胞质中并促进MDM2的核输出^[37]。

3.2 AD结构域的磷酸化位点: Ser289

位于AD结构域的Ser289虽然并不是定位于p53结合结构域,但是被上游激酶CK1 α (casein kinase 1 α)磷酸化后,可以抑制MDMX与p53的结合。CK1 α 响应DNA损伤、生物钟变化、Wnt1(Wing-less type family member 1)信号通路中 β -catenin降解等多种信号磷酸化MDMX^[38]。MDMX抑制p53序列特异性结合DNA,需要CK1 α 的共同参与以及Ser289的磷酸化。MDMX的AD和RING结构域可以稳定地与p53的DNA结合结构域相互作用,但是这种结合仅发生在MDMX和p53 N端的经典特异性结合之后,被认为是次级相互作用^[39-40]。

3.3 RING结构域的磷酸化位点: Ser342、Ser367、Ser403

DNA双链断裂激活ATM(protein kinase ataxia-telangiectasia mutated)和Chk2(checkpoint kinase 2)激酶,活化的ATM可以磷酸化位于MDMX RING结构域近侧区的三个位点: Ser342、Ser367和Ser403。这些位点的磷酸化可以保证MDMX在响应DNA损伤后的有效降解。MDMX的这三个位点被磷酸化后,与去泛素化蛋白酶HAUSP(ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7, USP7)的结合减少,使得MDMX更易受到MDM2介导的泛素化降解和蛋白酶体的降解^[41]。其中,Ser403可以被ATM直接磷酸化,Ser342和Ser367的磷酸化还需要Chk2激酶的参与。Ser342和Ser367磷酸化后,MDMX可以与多种14-3-3蛋白亚型结合,促进MDMX在核内的累积及其降解^[42]。蛋白磷酸酶Wip1(wild-type p53-induced phosphatase 1)也可以响应DNA损伤应答,直接去磷酸化Ser403,间接抑制Ser342和Ser367的磷酸化,稳定MDMX,减少DNA损伤导致的MDMX的泛素化和降解,抑制p53的活性^[43]。

AMPK(AMP-activated protein kinase)蛋白激酶是生物能量代谢调控的关键分子,也可以磷酸化Ser342。在体外实验中,利用AMPK的激活剂AICAR或者葡萄糖剥夺法激活AMPK,活化的AMPK可以磷酸化MDMX的Ser342位点,增强MDMX和14-3-3蛋白的相互作用,抑制p53的泛素化,提高

p53 的稳定性^[44]。

3.4 新的磷酸化位点: Ser314

2016年, Yuan 实验室^[45]发现一个新的 MDMX 磷酸化位点: Ser314。受体酪氨酸激酶家族的表皮生长因子受体 Her4 (human epidermal growth factor receptor 4) 在肿瘤细胞中过表达可以提高 MDM2/MDMX 异二聚体的稳定性, 抑制 p53 的活性。通过磷酸化蛋白质组学筛选发现, 在已知的磷酸化位点中, MDM2 没有明显的磷酸化, MDMX 的 Ser367 有轻微磷酸化, 位于 MDMX 锌指结构域的 Ser314 位点出现了明显的磷酸化。研究发现, Her4 可以通过激酶 CDK4/6 磷酸化 Ser314 位点, 该位点的磷酸化改变了 MDMX 的构象使其更稳定, 同时与 MDM2 结合提高 MDM2/MDMX 异二聚体的稳定性^[45]。随后, 发现受体酪氨酸激酶 AXL 通过 CDK4/6 (cyclin-dependent kinase 4/6) 和 p38 磷酸化 Ser314 位点, 与 Her4 一样可以稳定 MDM2/MDMX 异二聚体, 支持 MDMX 的入核, 保护 MDMX 不被 MDM2 介导的泛素化降解, 提高其稳定性, 降低 p53 的转录活性^[46]。

酪氨酸激酶在多种肿瘤中过表达, 并与耐药密切相关。MDMX 的 Ser314 作为多种酪氨酸激酶的磷酸化位点, 在肿瘤发生的信号网络中起到重要作用, 可以作为新的肿瘤治疗靶标。

4 靶向p53、MDM2、MDMX的肿瘤治疗策略

抗肿瘤药物主要集中在恢复或提高 p53 的活性, 目前已开展直接针对 p53 或者干扰 p53 与 MDM2 或 MDMX 结合的小分子化合物的临床试验。APR-246 可以使 R273、R175 或 R248 发生突变的 p53 构象重新折叠, 恢复具有野生型构象的功能, 诱导肿瘤细胞凋亡^[47-48]。AZD1775 (MK-1775) 以 ATP 竞争的方式抑制 Wee1 激酶。p53 突变的肿瘤细胞往往存在细胞周期 G₁/S 检查点的缺陷, 使得肿瘤细胞 DNA 的复制及损伤修复过程更依赖于 G₂/M 检查点。作为 G₂/M 检查点的关键激酶, Wee1 被 AZD1775 抑制活性后, p53 突变型肿瘤细胞的 DNA 损伤不能及时修复, 造成基因组不稳定性, 导致肿瘤细胞凋亡^[49]。目前已开展 AZD1775 针对非小细胞肺癌、卵巢癌等 II 期临床试验以及联合吉西他滨、铂类药物联用的临床试验^[50]。在肿瘤微环境中再活化 p53 可以激活树突状细胞、巨噬细胞和 CD8⁺ T 细胞, 逆转免疫抑制状态, 提高抗肿瘤的免疫能力^[51]。

Nutlin-3 可以结合到 MDM2 N 端的 p53 结合区, 阻止 MDM2 与 p53 的结合, 在肿瘤细胞中激活 p53,

诱导肿瘤细胞周期阻滞和凋亡^[52]。目前也有一些特异性结合 MDMX N 端的药物, 如 α 螺旋肽 SAH-P53-8 可以干扰 MDMX 与 p53 的结合, 已经进入临床前测试^[53]。双环 β - 脯氨酸单体衍生物也可以抑制 p53 与 MDM2 或 MDMX 的相互作用^[54]。但是用 Nutlin-3 处理黑色素瘤只能部分再激活 p53^[55]。因此, 仅靶向 MDM2 或 MDMX 与 p53 的相互作用不足以有效恢复 p53 的活性。另外, 新型的纳米药物如 PMI, 一种药物肽段两亲物, 其被细胞摄取和核内累积能力增强, 可以在细胞核内与 MDM2、MDMX 结合, 激活 p53 发挥抗肿瘤作用^[56]。Kuser-Abali 等^[57]发现一种小分子化合物 JBL5 在体内体外均可以有效阻止 MDM2 与 MDMX 形成异二聚体, 有效激活 p53, 可以开发成为新的肿瘤治疗药物。

5 展望

磷酸化作为蛋白质翻译后修饰的一种主要方式影响着蛋白质的最终功能。MDMX 的不同磷酸化位点可被多种激酶磷酸化来响应不同的压力信号。MDMX 的 Ser314 位点可以被多种受体酪氨酸激酶磷酸化, 受体酪氨酸激酶被发现在多种肿瘤中过表达, 同时磷酸化的 Ser314 位点使得 MDM2/MDMX 的异二聚体更加稳定。如果阻止该位点的磷酸化, 应该可以有效提高 p53 的活性, 抑制肿瘤。在笔者实验室的 *Mdmx*^{S314A} 小鼠模型中皮下注射鼠源乳腺癌细胞, 与野生型小鼠相比, 肿瘤的发生发展明显被抑制^[58]。另外, 体内体外试验均表明, MDM2 与 MDMX 形成异二聚体可以更有效地调控 p53, 如果以破坏该异二聚体为靶标会比单独靶向 MDM2 或者 MDMX 与 p53 的结合更有效地激活 p53, 这为开发更有效的肿瘤治疗药物提供了新思路 and 参考。

[参 考 文 献]

- [1] 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: 43-52
- [2] Smith, AE, Smith R, Paucha E. Characterization of different tumor antigens present in cells transformed by simian virus 40. *Cell*, 1979, 18: 335-46
- [3] Amina A, Maria WA, Pierre H. Revisiting tumor patterns and penetrance in germline TP53 mutation carriers: temporal phases of Li-Fraumeni syndrome. *Curr Opin Oncol*, 2018, 30: 23-9
- [4] Walker KK, Levine AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 15335-40

- [5] Sullivan KD, Galbraith MD, Andrysk Z, et al. Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death Differ*, 2018, 25: 133-43
- [6] Stommel JM, Marchenko ND, Jimenez GS, et al. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J*, 1999, 18: 1660-72
- [7] Horn HF, Vousden KH. Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene*, 2007, 26: 1306-16
- [8] Dai CH, Gu W. p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med*, 2010, 16: 528-36
- [9] Kruse JP, Gu W. Modes of p53 regulation. *Cell*, 2009, 137: 609-22
- [10] Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, et al. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*, 2006, 126: 107-20
- [11] Vaseva AV, Moll UM. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1787: 414-20
- [12] Massimiliano A, Gerry M, Francesca B. The p53 family in brain disease. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29: 1-14
- [13] Jembrek MJ, Newberg K, Šimić G. The role of p53 in Alzheimer's disease: impact on tau pathology[M]// Singh S, Joshi N. Pathology, prevention and therapeutics of neurodegenerative disease. Singapore: Springer, 2019: 39-48
- [14] Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: *in vitro* hypotheses, *in vivo* veritas. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6: 909-23
- [15] Cooks T, Pateras IS, Jenkins LM, et al. Mutant p53 cancers reprogram macrophages to tumor supporting macrophages via exosomal miR-1246. *Nat Commun*, 2018, 9: 771
- [16] Chene P. Targeting p53 in cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2001, 1: 151-61
- [17] Wu L, He Y, Hu Y, et al. Real-time surface plasmon resonance monitoring of site-specific phosphorylation of p53 protein and its interaction with MDM2 protein. *Analyst*, 2019, 144: 6033-40
- [18] Ashcroft M, Vousden KH. Regulation of p53 stability. *Oncogene*, 1999, 18: 7637-43
- [19] Vousden KH, Vande Woude GF. The ins and outs of p53. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: E178-80
- [20] Chene P. The role of tetramerization in p53 function. *Oncogene*, 2001, 20: 2611-17
- [21] Kruse JP, Gu W. SnapShot: p53 posttranslational modifications. *Cell*, 2008, 133: 930-30.e1
- [22] Momand J, Zambetti GP, Olson DC, et al. The *mdm-2* oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 1992, 69: 1237-45
- [23] Itahana K, Mao H, Jin A, et al. Targeted inactivation of *mdm2* RING finger E3 ubiquitin ligase activity in the mouse reveals mechanistic insights into p53 regulation. *Cancer Cell*, 2007, 12: 355-66
- [24] Kosztyu P, Slaninová I, Valčíková B, et al. A single conserved amino acid residue as a critical context-specific determinant of the differential ability of *Mdm2* and *MdmX* RING domains to dimerize. *Front Physiol*, 2019, 10: 1-14
- [25] de Oca Luna RM, Wagner DS, Lozano G. Rescue of early embryonic lethality in MDM2-deficient mice by deletion of p53. *Nature*, 1995, 378: 203-6
- [26] Huang L, Yan Z, Liao X, et al. The p53 inhibitors MDM2/MDMX complex is required for control of p53 activity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 12001-6
- [27] Parant J, Chavez-Reyes A, Little NA, et al. Rescue of embryonic lethality in *Mdm4*-null mice by loss of *Trp53* suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nat Genet*, 2001, 29: 92-5
- [28] Boesten LS, Zadelaar SM, De Clercq S, et al. MDM2, but not *Mdm4*, protects terminally differentiated smooth muscle cells from p53-mediated caspase-3-independent cell death. *Cell Death Differ*, 2006, 13: 2089-98
- [29] Grier JD, Xiong S, Elizondo-Fraire AC, et al. Tissue-specific differences of p53 inhibition by MDM2 and *Mdm4*. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 192-8
- [30] Uldrijan S, Pannekoek WJ, Vousden KH. An essential function of the extreme C-terminus of MDM2 can be provided by MDMX. *EMBO J*, 2007, 26: 102-12
- [31] Yang LX, Song TJ, Cheng Q, et al. Mutant p53 sequestration of the MDM2 acidic domain inhibits E3 ligase activity. *Mol Cell Biol*, 2019, 39: 1-14
- [32] Tanimura S, Ohtsuka S, Mitsui K, et al. MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains. *FEBS Lett*, 1999, 447: 5-9
- [33] Linke K, Mace PD, Smith CA, et al. Structure of the MDM2/MDMX ring domain heterodimer reveals dimerization is required for their ubiquitylation *in trans*. *Cell Death Differ*, 2008, 15: 841-8
- [34] Pant V, Xiong S, Iwakuma T, et al. Heterodimerization of MDM2 and *Mdm4* is critical for regulating p53 activity during embryogenesis but dispensable for p53 and MDM2 stability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 11995-2000
- [35] Zuckerman V, Lenos K, Popowicz GM, et al. c-Abl phosphorylates *Hdmx* and regulates its interaction with p53. *J Biol Chem*, 2009, 284: 4031-9
- [36] Chen X, Gohain N, Zhan C, et al. Structural basis of how stress-induced MDMX phosphorylation activates p53. *Oncogene*, 2016, 35: 1919-25
- [37] Elias B, Laine A, Ronai Z. Phosphorylation of MDMX by CDK2/Cdc2 (p34) is required for nuclear export of MDM2. *Oncogene*, 2005, 24: 2574-9
- [38] Chen L, Li C, Pan Y et al. Regulation of p53-MDMX interaction by casein kinase 1 α . *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 6509-20
- [39] Wei X, Wu S, Song T, et al. Secondary interaction between MDMX and p53 core domain inhibits p53 DNA binding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E2558-63
- [40] Liu X, Huang QL, Chen LH, et al. Tumor-derived CK1 α mutations enhance MDMX inhibition of p53. *Oncogene*, 2020, 39: 176-86
- [41] Meulmeester E, Maurice MM, Boutell C, et al. Loss of HAUSP-mediated deubiquitination contributes to DNA damage-induced destabilization of *Hdmx* and *Hdm2*. *Mol Cell*, 2005, 18: 565-76

- [42] Pereg Y, Lam S, Teunisse A, et al. Differential roles of ATM- and Chk2-mediated phosphorylations of Hdmx in response to DNA damage. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 6819-31
- [43] Zhang X, Lin L, Guo H, et al. Phosphorylation and degradation of MdmX is inhibited by Wip1 phosphatase in the DNA damage response. *Cancer Res*, 2009, 69: 7960-8
- [44] He G, Zhang YW, Lee JH, et al. AMP-activated protein kinase induces p53 by phosphorylating MDMX and inhibiting its activity. *Mol Cell Biol*, 2014, 34: 148-57
- [45] Gerarduzzi C, de Polo A, Liu XS, et al. Human epidermal growth factor receptor 4 (Her4) suppresses p53 protein via targeting the MDMX-MDM2 protein complex: implication of a novel mdmx ser-314 phosphosite. *J Biol Chem*, 2016, 291: 25937-49
- [46] de Polo A, Luo Z, Gerarduzzi C, et al. AXL receptor signaling suppresses p53 in melanoma through stabilization of the MDMX-MDM2 complex. *J Mol Cell Biol*, 2017, 9: 154-65
- [47] Lambert JM, Gorzov P, Veprintsev DB, et al. PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer Cell*, 2009, 15: 376-88
- [48] Perdrix A, Najem A, Saussez S, et al. PRIMA-1 and PRIMA-1^{Met} (APR-246): from mutant/wild type p53 reactivation to unexpected mechanisms underlying their potent anti-tumor effect in combinatorial therapies. *Cancers (Basel)*, 2017, 9: E172
- [49] Kreaehling JM, Gemmer JY, Reed D, et al. MK1775, a selective Wee1 inhibitor, shows single-agent antitumor activity against sarcoma cells. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11: 174-82
- [50] Matheson CJ, Venkataraman S, Amani V, et al. A WEE1 inhibitor analog of AZD1775 maintains synergy with cisplatin and demonstrates reduced single-agent cytotoxicity in medulloblastoma cells. *ACS Chem Biol*, 2016, 11: 921-30
- [51] Guo G, Yu M, Xiao W, et al. Local activation of p53 in the tumor microenvironment overcomes immune suppression and enhances antitumor immunity. *Cancer Res*, 2017, 77: 2292-305
- [52] Vassilev LT, Vu BT, Graves B, et al. *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*, 2004, 303: 844-8
- [53] Bernal F, Wade M, Godes M, et al. A stapled p53 helix overcomes HDMX-mediated suppression of p53. *Cancer Cell*, 2010, 18: 411-22
- [54] Su A, Wang S, Sada A, et al. Non-naturally occurring helical molecules can interfere with p53-MDM2 and p53-MDMX protein-protein interactions. *Chem Pharm Bull*, 2019, 67: 1139-43
- [55] de Lange J, Ly LV, Lodder K, et al. Synergistic growth inhibition based on small molecule p53 activation as treatment for intraocular melanoma. *Oncogene*, 2012, 31: 1105-16
- [56] Liang C, Yan X, Zhang R, et al. Enhanced cellular uptake and nuclear accumulation of drug-peptide nanomedicines prepared by enzyme-instructed self-assembly. *J Control Release*, 2019, 317: 109-17
- [57] Kuser-Abali G, Gong L, Yan J, et al. An EZH2-mediated epigenetic mechanism behind p53-dependent tissue sensitivity to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 3452-7
- [58] Wang B, Lim CB, Yan J, et al. MDMX phosphorylation-dependent p53 downregulation contributes to an immunosuppressive tumor microenvironment. *J Mol Cell Biol* (Accepted).