

유비퀴틴화에 의한 세포 내 p53의 기능 조절

정진혁¹ · 이준영¹ · 이선미¹ · 최태부² · 안성관^{1,2*}

¹건국대학교 유전단백체 기능제어연구센터, ²건국대학교 미생물공학과

Regulation of cellular functions of p53 by ubiquitination

Jin Hyuk Jung¹, Joonyoung Lee¹, Sun-Mi Lee¹, Tae-Boo Choe², and Sungkwan An^{1,2*}

¹Functional Genoproteome Research Centre, Konkuk University, Seoul, Korea,

²Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul, Korea.

Abstract p53 undergoes various post-translational modifications, including phosphorylation, ubiquitination, sumoylation, acetylation, methylation, and poly(ADP-ribosyl)ation. Modification of p53 widely affects to various functions of p53. Acetylation and phosphorylation of p53 have been studied for regulating its transcriptional activity which is observed in various stress condition. Otherwise, ubiquitination of p53 by Mdm2 has been well-studied as a canonical ubiquitin-mediated proteasomal degradation pathway. Moreover several investigators have recently reported that ubiquitination of p53 modulates not only its proteasome-dependent degradation by poly-ubiquitination but also its localization and transcriptional activity by mono-ubiquitination which usually does not serve the proteasome dependent degradation. Here we review recent studies on the cellular functions of p53 regulated by post-translational modifications, particularly focusing on mechanisms of ubiquitination.

Keywords: p53, ubiquitin-mediated degradation, localization, modulation of transcriptional activity

서 론

p53은 대표적인 암 억제 유전자로서, 60% 이상의 암 조직에 돌연변이로 존재하고 있으며(1-4), p53은 'Guardian of genome' 이라고 불리는 것처럼(5), 유전자의 변형이나 파괴에 민감하게 반응하여 세포 주기를 중단시키거나(6, 7), 세포 자살을 일으키게 하는 역할을 한다(8-9). 더불어 telomere shortening에 의한 세포노화를 촉진시키며(10, 11), 영양분 결핍 시에 나타나는 autophagy 현상을 촉진시킬 수 있는(12) 등, 수많은 세포 내의 기능이 보고되고 있는 중요한 단백질 중 하나이다. 이러한 p53의 기능은 대부분 전사인자로서 다양한 단백질의 발현을 촉진하거나 억제하며(13-16), 과다 발현 시 세포사멸을 유도하는 단백질들의 발현을 돕거나(17, 18), 스트레스 시에 직접 세포질이나 미토콘드리아(mitochondria)에서 Bcl-2 family와 결합하여 미토콘드

리아의 붕괴를 촉진하여 세포 사멸을 일으킬 수 있다고 보고되고 있다(19). p53의 이러한 특성 탓에 정상적인 세포 내에서는 p53이 대단히 낮은 농도로 관찰되는데, 이는 전사 단계와 후전사 단계에서 이루어지는 많은 조절 기전이 관여하기 때문이다. 특히 유비퀴틴화 (ubiquitination)는 가장 대표적인 단백질의 분해 기전 중 하나로써(20), 다양한 기전을 통해 p53 단백질을 조절할 수 있다는 보고가 활발히 이루어지고 있다.

유비퀴틴 (ubiquitin)은 76개의 아미노산으로 구성되어 있는 작은 단백질로서 세포내 여러 기관이나 세포질에서 흔히 발견되며, 단백질에 결합함으로써 표지화시켜 단백질이 새로운 기능을 획득하게 된다. 유비퀴틴화는 세 가지의 효소가 관여 하는데 E1 단백질인 유비퀴틴 활성화 효소 (ubiquitin-activating enzyme)로 유비퀴틴을 활성화시키며, E2 단백질인 유비퀴틴 결합 효소 (ubiquitin-conjugating enzyme)는 E3 단백질에게 유비퀴틴을 인도하거나 스스로 목적 단백질에 유비퀴틴을 붙이는 역할을 한다. 마지막으로, E3 단백질인 유비퀴틴 접합 효소 단백질 (ubiquitin ligase enzyme, 혹은 E3 ligase)은 E2 단백질의 유비퀴틴을 목적

*Corresponding author

Tel: +82-2-450-4054, Fax: +82-2-3437-4055

e-mail: ansfgrc@konkuk.ac.kr

단백질에 접합시키는 역할을 한다(21). E3 ligase는 목적 단백질에 유비퀴틴을 접합시키므로 목적 단백질에 대한 특이성이 있으며, 구조에 따라서 HECT domain 타입과 RING-finger domain 타입 등으로 나뉜다. 유비퀴틴화된 단백질은 26S proteasome의 capping 단백질에 의해 유비퀴틴 사슬(ubiquitin chain)이 인지되어 proteasome안으로 들어가서 분해되며, 이것은 기본적인 단백질의 분해 과정 중 하나이다(22). 이 밖에도 단백질의 유비퀴틴화는 단백질의 위치 변화 및 기타 현상에 영향을 주며, 이로 인해 세포주기 조절이나 단백질의 발현 조절 등 많은 영역에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(23-25). p53의 유비퀴틴화에 의한 분해 기전은 유비퀴틴화 기전을 통한 단백질의 분해 기전의 대표적인 모델일 뿐 아니라, negative feedback loop를 통한 단백질의 자가 조절 기전으로서도 잘 알려져 있다. 최근에는 p53의 유비퀴틴화를 통한 분해 기전 뿐 아니라 여러 다른 기전이 보고되고 있어, 본 논문에서는 p53의 조절 기전 중 유비퀴틴화에 의한 다양한 기전에 초점을 맞추어 요약하였다.

Ubiquitination을 통한 p53의 분해 조절 기전

p53의 분해 기전은 1970년대 바이러스에 의한 암 유발 기전을 연구하는 사람들에 의해 p53이 발견되어지면서 함께 보고되기 시작하였다. p53은 여러 가지 암 유발 바이러스에 의해 불활성화 되기도 하는데, human papilloma virus에 의해 유도되는 암 유발 인자인 E6가 p53에 결합하며, 이로 인해 p53에 유비퀴틴화가 발생해 p53의 분해가 촉진되는 것이 관찰되었다(26). 이것이 최초의 유비퀴틴화에 의한 p53 단백질의 조절 기전의 발견이었으며, 바이러스에 의한 대표적인 암 발생 기전 중 하나로 인식되었다. 그러나 p53의 이러한 분해기전은 바이러스의 세포 내 침입 시 나타나는 현상이며, 평소에 세포 내에서 관찰되는 p53의 낮은 발현을 설명할 수는 없었다.

그 후 지금까지 p53의 유비퀴틴화에 의한 분해를 일으키는 E3 ligase 중 가장 많은 연구가 되어 있는 것은 mouse double-minute 2 protein (mdm2)이다. Mdm2는 형질 전환된 3T3DM 세포에서 과발현되는 단백질로 밝혀졌으며(27), 암 유발 유전자로서 약 7%의 암세포에서 과발현되어 있다(28). Mdm2 null mice에서는 embryonic lethal이 관찰되는데(29, 30), 이 현상은 p53의 과다한 발현과 활성을 통한 것으로 보이며, p53-mdm2 double null mice에서는 이 현상으로부터 회복될 수 있으므로(29, 30), mdm2에 의한 p53 단백질의 발현과 활성 조절은 세포 및 개체의 항상성 유지에 절대적이라 할 수 있다. 또한 mdm2의 유비퀴틴화를 담당하고 있는 RING-finger domain을 돌연변이로 치환시켜 불활성화시킨 mdm2 RING-finger mutant의 knock-in mice의 phenotype 또한 embryonic lethal 형태를 보임으로 mdm2의 유비퀴틴화능이 중요하다고 최근 제시되었다(31). 이렇듯 p53의 발현과 활성 조절에 중요한 역할을 하는

mdm2의 조절 기전은 대표적으로 다음과 같다. 첫째는 유비퀴틴화 E3 ligase의 특징 중 하나인 mdm2의 자가 유비퀴틴화(self-ubiquitination)를 통한 mdm2 단백질의 발현량 감소와 활성 감소에 따른 p53의 활성 증가이다. DNA 손상에 따른 ARF의 활성증가는 mdm2의 자가 유비퀴틴화를 통해 p53의 활성을 높이며(32), mdm2는 탈 유비퀴틴화(deubiquitination) 효소인 HAUSP과의 결합이 떨어지면서 mdm2의 자가 유비퀴틴화능이 증가되어 mdm2 자신을 스스로 분해함으로써 p53의 단백질량과 활성을 높이는 p53-mdm2-HAUSP complex가 보고되었다(33). 두번째는 mdm2와 p53 결합의 조절에 의한 p53의 활성의 변화이다. 세포의 증식에 관여하는 대표적인 인산화 효소인 AKT에 의해 mdm2가 인산화가 되면 mdm2가 핵 안으로의 이동이 촉진되어 p53과 결합능이 높아져 p53의 활성을 억제한다(34). 이와 반대로, 다양한 스트레스에 의해 활성화된 여러 가지 인산화 효소들에 의해 p53의 N-말단 15번째 serine기가 인산화될 수 있는데(35), 이것은 mdm2와 p53과의 결합을 방해하여 p53을 mdm2로부터 보호하여 활성을 높인다(36). 또한 p53의 N-말단에는 p53의 활성에 중요한 역할을 미치는 아세틸화 효소인 p300이 mdm2와 경쟁적으로 결합할 수 있어, p53의 활성을 조절할 수 있다고 보고되었다(37). 이렇듯 mdm2는 자신의 후전사 변형과 p53의 후전사 변형 그리고, ARF나 p300, Numb과 같은 단백질에 의해서 p53과의 결합이 약해 질 수 있다(38, 39). Mdm2와 p53의 결합력을 약하게 하고 p53의 활성화를 증가시켜 궁극적으로 세포사멸을 돕는 합성물질로는 nutlin이 있다(40). Nutlin은 mdm2의 antagonist로써 p53의 활성을 증진시켜서 세포의 사멸을 돕는다는 보고가 있으며(41), nutlin을 통한 항암 치료제 개발이 진행 중이다. 세번째로 mdm2의 발현에 의해서 p53의 활성이 조절 받기도 하는데(42), mdm2의 발현은 p53에 의해서 이루어지며, DNA 손상 후 mdm2는 p53에 의해 발현되어 p53의 활성을 억제 할 수 있는 negative feedback loop로 설명되어진다(43), 그러나 SNP(309) mdm2를 포함한 세포는 estrogen에 의해 발현이 증가하는 현상을 보이며 이로 인해 p53의 활성이 저해 된다(44, 45). 또한 이러한 SNP를 가진 여성 유방암 환자의 경우 60대 이후의 예후가 매우 좋지 않다는 것이 통계학적으로 보고된 바 있다(46), mdm2의 비정상적인 과다 발현으로 인한 p53의 활성 저하가 암 발병 후에도 영향을 주는 것으로 제시되고 있다.

p53에 의해서 발현되어 p53을 유비퀴틴화 시켜서 분해하는 negative feedback loop를 가진 효소는 mdm2 외에 COP1과 Pirh2가 있다(47, 48). COP1은 arabidopsis에서 빛이 없을 때, photomorphogenesis를 억제하는 단백질로 많은 보고가 있어 왔으며(49), 최근에는 동물 세포에서 p53 뿐 아니라 당 대사를 조절하는 FoxO1을 유비퀴틴화 시켜서 분해하는 효소로 보고되어 있어(50), 세포의 증식과 대사에도 중요한 역할을 끼칠 것으로 보인다. COP1이 DNA 손상 후 빠르게 활성을 보이는 ATM 인산화 효소에 의해 인산화 되면 COP1의 자가 유비퀴틴화가 진행되어 p53의

활성이 유도된다(51). Pirh2는 p53의 결합단백질로 처음 밝혀졌으며, 유비퀴틴화에 의한 p53의 분해를 유도한다(52). 최근에는 Pirh2가 세포주기 활성을 억제시키는 p27 또한 분해할 수 있다는 보고로 인해서 세포 주기와 증식에 관여할 것으로 보인다(53). Calmodulin-dependent kinase II (caMK II)에 의해 인산화된 Pirh2는 p53에 대한 활성이 억제되고, 이 현상은 보통 세포에서는 관찰되지만, 암세포에서는 인산화가 발견이 되지 않은 것으로 보아 Pirh2의 인산화를 통한 p53의 조절이 암화를 막는데 중요할 것이라는 주장도 제기되었다(54).

이러한 negative feed back loop 기전을 가진 효소들은 세포의 항상성을 위해 p53에 의해 발현되어 p53을 분해시키는 것으로 설명을 할 수는 있지만, 기본적으로 p53의 활성에 의해서 발현이 증가되기 때문에 평상시 낮은 활성의 p53으로는 이들의 발현량이 낮아서 p53을 효과적으로 분해시킬 수 없을 수 있다. 물론 낮은 발현 상태의 mdm2는 세포핵 내에서 p53에 대한 모노유비퀴틴화 (mono-ubiquitination)를 통해 p53을 세포핵으로부터 세포질로 이동시켜 궁극적으로 p53의 활성을 조절하지만 p53의 분해를 촉진하지는 못한다. 따라서 정상적인 상태에서 p53의 발현이 조절 되는 기전을 설명하기에는 부족하므로 negative feedback loop를 가지고 있지 않는 다른 유비퀴틴화 E3나 E4 ligase가 정상적인 상태의 p53의 분해를 담당할 것으로 제시되고 있다(55). 또한 p53의 세포질 내로의 이동을 막는 Crm1 저해제인 leptomycin B 처리시 p53이 핵 안에 축적되는 것을 보아 정상적인 상태에서 p53의 분해기전은 세포질에서 일어난 것이라 예측하고 있다(56). 이러한 기전을 담당할 것으로 예상되는 E3 ligase 중 하나인 ARF-BP1/Mule은 ARF에 결합하는 단백질로 밝혀졌으며, p53을 유비퀴틴화를 통해 분해할 수 있고, negative feed back loop를 가지고 있지

않아 정상적인 상태에서의 조절 기능이 제시되고 있지만(57), 핵과 미토콘드리아에 위치하기도 하며, 암 유발인자인 Mcl-1을 분해시킨다는 보고도 있어서(57, 58) 앞으로 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다. p300은 p53의 아세틸화를 촉진하는 효소로 잘 알려져 있지만, p53과 mdm2를 안정화 시켜서 negative feedback loop를 활성을 유도하며(59), ligase 활성으로 인해서 직접 p53을 유비퀴틴화 하여 분해한다는 보고도 있어서 E3 혹은 E4 효소로 제시되고 있다(60). 그러나 p300에 의한 p53의 아세틸화와 유비퀴틴화가 세포 내에서 어떠한 환경에서 조절되는 지는 아직 밝혀지지 않았으며, 이러한 연구가 선행되어야 할 것으로 보인다. 이 밖에 소포체 (endoplasmic reticulum)에 위치한 p53의 E3 ligase인 synoviolin은 세포질 내의 p53을 분해하거나 핵으로부터 격리하여서, 전사인자로서의 활성을 억제시키는 것으로 보고되었다(61). 또한 최근에는 caspase-8과 -10을 분해하는 효소인 caspase-8/10-associated RING protein (CARP)가 비활성화 되어 있는 p53뿐 아니라 15번째 serine의 인산화되어 있는 p53도 분해시키는 효소로 보고되었다(62). ICP0와 Topors 같은 E3 ligase도 p53의 분해를 촉진시킬 수 있어서(63, 64), p53의 유비퀴틴화를 통한 분해 기전은 수많은 관점에서 연구되고 있다. Table 1에서 유비퀴틴화 기전을 통해 p53 단백질의 분해를 담당하는 p53의 유비퀴틴화 E3 ligase를 정리하였다.

유비퀴틴화를 통한 세포 내 p53의 위치 변화

p53은 평소에는 핵과 세포질에서 관찰되어진다(89). p53이 전사인자로서 역할을 수행하기 위해서는 스트레스 신호에 의하여 핵으로 이동해야 하기 때문에(90), p53의 핵으로의 이동은 p53의 전사인자로서의 활성에 중요한 역할을

Table 1. Known E3 ligases responsible for the ubiquitin-proteasome dependent degradation of p53

E3 ligases	Type	Localization	Negative feedback loop	Activation	Deactivation	Other targets for ubiquitin-mediated degradation
Mdm2	RING (65)	Nucleus, cytoplasm (66)	Yes (67)	Phosphorylated by AKT (S166/S186) (34); stabilized by sumoylation (K466) (68)	Phosphorylated by ATM (S395) (69) and c-Abl (Y394) (70); degraded by ARF (38)	Mdmx (71), ARC (72), L26 (73), FoxO3a (74)
Pirh2	RING (47)	Nucleus, cytoplasm (75)	Yes (47)	Not reported	Phosphorylated by CAMKII (Y154/S155) (54)	p27 (53), HDAC1 (76)
COP1	RING (77)	Nucleus, cytoplasm (78)	Yes (48)	Dark condition in <i>Arabidopsis</i> (79)	Phosphorylated by ATM (S387) (51)	FoxO1 (50)
p300	Nature form (60)	Mainly nucleus (80)	Not reported	Not reported regarding its ligase activity	Not reported regarding its ligase activity	Not reported
ARF-BP1	HECT (57)	Nucleus, mitochondria (57)	Not reported	Not reported	Not reported	Mcl-1 (58)
Synoviolin	RING (61)	Endoplasmic reticulum (61)	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported
CARP	RING (81)	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported	RIP (82), Caspase-8/10 (81)
ICP0	RING (83)	Nucleus (84)	Not reported	Stabilized by USP7 (85)	Not reported	I- κ B α (86)
Topors	RING (87)	Nucleus (87)	Not reported	Not reported	Not reported	NKx3.1 (88)

담당한다. 세포질의 p53은 dynein과 결합하여 핵막 주변으로 이동하며 핵막 단백질인 importin에 의해 핵 안으로 이동한다. 이때 p53의 nuclear localization signal (NLS)은 핵막으로의 이동에 주요 역할을 담당하고 있다(91, 92). 반대로 p53이 핵에서 세포질로 이동할 때에는 p53의 nuclear export signal (NES)이 필요하며(93, 94), 핵막 단백질인 Crm1은 p53을 인지하여 세포질로 이동시킨다(95). p53의 핵에서 세포질내로의 이동에 있어서 유비퀴틴화는 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. Mdm2에 의한 C-말단의 유비퀴틴화는 NES의 구조적인 변화를 유발시키고 Crm1을 통해 세포질로의 이동을 촉진시킨다(96). 이는 p53 C-말단에 유비퀴틴을 붙여 합성된 p53을 세포에 발현시켰을 때의 세포 내의 위치가 기존에 p53을 발현시켰을 때와는 다르게 핵과 세포질에 고르게 나타난 최근의 실험에서도 나타나 어지며(97), mdm2에 의한 이러한 현상은 폴리유비퀴틴화(poly-ubiquitination)를 통한 p53의 분해 기전과는 다르게 모노유비퀴틴화에 의한 것으로 보고되었다(98). 유비퀴틴화에 의한 단백질의 분해는 proteasome을 통하여 이루어지는데, proteasome의 capping protein은 4개 이상의 유비퀴틴 사슬을 인지할 수 있어서(99), 모노유비퀴틴화는 세포 내에서 분해 기전과 다른 역할을 담당하고 있다. Mdm2의 이러한 역할은 세포 내 mdm2의 발현 정도에 따라 달라질 수 있으며, 적은 수의 mdm2는 모노유비퀴틴화를 유도하며, 많은 수의 mdm2는 p53의 폴리유비퀴틴화를 일으킨다고 보고되었다(98). Mdm2는 일반적으로 세포 내에 적은 농도로 존재하기 때문에 정상적인 상태에서는 유비퀴틴화를 통해서 p53을 핵 밖으로 위치시킬 수 있다고 생각되며, 아마 다른 E3 ligase나 모노유비퀴틴화된 p53을 인지하여 proteasome으로 인도하는 E4가 있을 것이라 추측된다(55).

최근에는 WWP1과 UBC13, MSL2가 각각 p53의 모노유비퀴틴화를 유발, 핵 밖으로의 이동을 유도하여 전사인자로서의 p53의 활성을 억제한다는 보고가 있으며(100-102), cullin-7 complex는 세포질에서 p53을 모노유비퀴틴화 시켜, 전사인자로서의 활성을 저해시킨다고 보고되었다(103). 세포질에 위치한 E3 ligase인 Parc은 p53과 결합하여 세포질에 p53을 고정시키므로, 전사인자로서의 p53의 역할을 방해한다(104). Jab1은 mdm2와 결합하여 mdm2의 단백질 활성을 높여서 p53의 핵 밖으로의 이동을 촉진하여 p53의 분해를 돕는다(105). MSL2는 mdm2와는 독립적으로 p53을 유비퀴틴화 시켜서 세포질로의 이동을 촉진한다(102). 또한 PIASy에 의한 수모화(sumoylation)는 유비퀴틴화와 협력하여 p53을 핵 밖으로 이동시킨다. 일반적인 수모화는 단백질의 위치 이동을 변화시키는 기전으로 잘 알려져 있으며, p53의 경우에는 유비퀴틴화와 수모화의 조절이 p53의 위치변화에 중요한 역할을 담당 할 수 있다는 것을 제시하였다(97). 이러한 보고들을 통해, 초기에 p53의 유비퀴틴화에 의한 세포 내의 위치변화는 p53의 전사인자 활성을 저해시키는 조절 기능 중심으로 연구되었다. 그러나 최근 들어 세포질의 p53에 의한 직접적인 미토콘드리아 세포사멸 기전이나 암화

(tumorigenesis)에 따른 스트레스(oncogenic stress)에 의한 autophagy를 저해시키는 등의 새로운 기전이 보고되고 있으므로, 향후 p53을 세포질로 이동시키는 유비퀴틴화와 이러한 기능과의 관계가 보다 활발하게 연구될 것으로 전망된다. 일부 보고에 따르면, 유비퀴틴화된 형태의 p53은 Bcl-2 family와 결합할 수 없으며(106), 탈유비퀴틴화 되어야 하기 때문에 모노유비퀴틴화로 인해 핵 밖으로 나간 모든 p53이 직접적인 미토콘드리아 세포사멸 기전에 참여하는 것은 아니라고 생각되어진다. p53의 탈유비퀴틴화 기전에는 탈유비퀴틴화 효소인 HAUSP이 관련되어 있고(107), 탈유비퀴틴화된 p53은 단백질 활성과 양이 증가되므로, 유비퀴틴화가 p53의 미토콘드리아 세포사멸 신호를 저해할 수 있을 것으로 예상된다. 유비퀴틴화에 의한 p53 위치변화 조절 기전을 Fig. 1에 정리하였다.

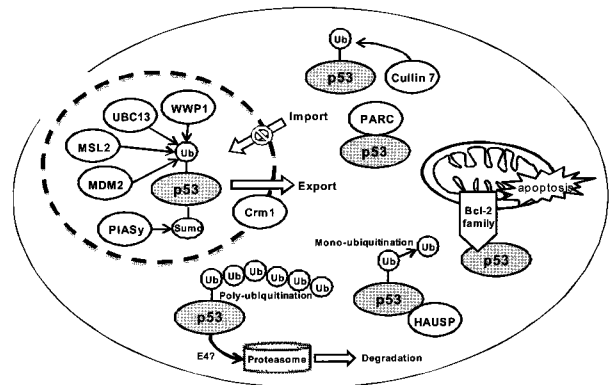


Fig. 1. Ubiquitin-mediated localization of p53.

Low dose of mdm2 and WWP1, UBC13, and MSL2 induce the ubiquitin-mediated export of p53 to cytoplasm. In cytoplasm, mono-ubiquitinated p53 may be degraded through proteasome-dependent manners by unknown E3 or E4 ligases. Otherwise, mono-ubiquitinated p53 has to be de-ubiquitinated by HAUSP for its exo-nuclear function. And wild type of p53 is ubiquitinated by cullin 7 to sequester p53 in cytoplasm. Parc also sequesters p53 in cytoplasm.

유비퀴틴화를 통한 p53의 전사인자 활성 조절

p53은 전사인자로서 다양한 단백질의 발현조절을 통해 세포사멸과 세포주기, 세포 분화, 세포대사, autophagy 등 수많은 기능을 나타낸다. 따라서 p53이 어떠한 기전을 통해 이러한 단백질의 발현을 조절하는지에 대해서 많은 연구자들이 궁금해 하는 것은 당연한 것이며, 다양한 방면에 응용될 수 있는 중요한 기전이라고 할 수 있겠다. 특히 세포사멸을 유도하는 단백질들의 발현을 증가시키는 p53의 활성 조절 측면은 항암제 개발과 함께 많은 연구가 이루어졌으며, p53의 인산화나 아세틸화 같은 후전사 변형 혹은 다양한 결합 단백질이 p53의 전사인자로서의 활성을 조절한다고 보고되었다. 예를 들어 스트레스 환경에서 관찰되어지는 N-말단의 인산화나 C-말단의 아세틸화는 p53의 전사인자

로써의 역할을 증가시키며(108, 109), HzF나 Cas같은 p53의 결합 단백질은 p53의 전사인자로서의 활성을 조절하여, 세포주기 정지와 세포사멸을 조절하기도 한다(110, 111). 그 중에서 유비퀴틴화와 연계되어 p53의 활성에 영향을 주는 것으로 보고되어 있는 기전은 p53의 아세틸화이다. p300/CBP에 의한 아세틸화는 p53의 C-말단 부분 6개의 lysine에 발생하여 p53의 DNA binding domain (DBD)의 구조 변화를 통하여 DNA와의 결합을 유도하는 것으로 보고되었다(112). p53의 탈아세틸화 효소인 Sirt1의 활성을 인위적으로 낮추면 p53의 전사인자 활성에 의한 세포사멸이 유도되므로, C-말단의 아세틸화는 p53의 전사인자로서의 활성을 촉진시킨다는 것이 제시되었다(113). 또한 이 6개의 lysine 잔기는 mdm2에 의해 유비퀴틴화도 될 수 있으므로, 유비퀴틴화와 아세틸화의 경쟁적 변형을 통하여 p53의 활성과 그에 따른 세포의 운명이 결정되어진다. 이 밖에도 다른 아세틸화 효소인 p300/CBP associated factor (PCAF)에 의한 320번째 lysine 잔기의 아세틸화가 다양한 스트레스 상태에서 세포사멸을 촉진한다고 보고되었다(114). 최근 E4F1이 동일한 아미노산 잔기에 유비퀴틴화를 유발한다는 보고가 있었으며, 흥미롭게도 이 유비퀴틴화는 기존 보고와 다른 기전을 통해 p53의 활성 조절 기능을 하는 것으로 나타났다(115). E4F1은 p53에 유비퀴틴화를 통하여 puma나 noxa와 같은 p53에 의한 미토콘드리아 세포사멸 관련 유전자들의 발현을 감소시키며, p21의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다. 이를 통해 세포주기는 억제시키고 동시에 세포사멸은 감소시킨다는 새로운 유비퀴틴화 기전을 밝혀냈으며, 이 기전은 세포사멸 관련 단백질의 발현에 중요한 역할을 하는 같은 잔기의 PCAF에 의한 아세틸화와 경쟁하여 생기는 현상이라 주장하였다(115). 또한 E4F1은 세포에 스트레스가 왔을 때 세포주기를 멈추어 DNA repair 등의 복구 시스템을 활성화시켜서 세포 자신을 살릴 것인가 혹은 세포사멸을 촉진시킬 것인가를 결정짓는 스위치의 역할을 담당할 수도 있을 것이라는 가능성을 제시 하였다. 이러한 보고들로 인하여 p53의 유비퀴틴화는 기존에 밝혀진 C-말단 lysine 잔기의 경쟁적 변형 뿐 아니라, 320번째 아세틸화 잔기에도 경쟁적 변형을 통해 p53의 전사인자로서의 기능을 조절하는 것으로 볼 수 있다. 최근에 밝혀진 p53 DBD의 120번째와 164번째 lysine의 p300/CBP에 의한 아세틸화는 세포사멸에 관여하는 단백질들의 발현능에 중요하며(116, 117), 특히 164번째 lysine의 아세틸화는 p53에 대한 mdm2와 mdmx와의 결합을 방해하여 p53의 DNA 결합력 증대를 유도함이 보고되었다. 이러한 lysine 잔기들은 기본적으로 유비퀴틴화 될 수 있고(118), p53 DBD의 lysine 또한 in vitro 상태에서 유비퀴틴화 된다는 보고가 있으므로(119), 기존에 보고되어졌던 유비퀴틴화와 아세틸화의 결합이 새로운 아세틸화 잔기인 120번째와 164번째 lysine에도 일어날 수 있을 것으로 예상된다. 향후 연구에서는 기존에 밝혀진 ligase 혹은 신규 ligase가 p53의 어느 lysine에 유비퀴틴화를 시키느냐에 따라 그 자리에 기존에

밝혀진 변형과의 결합을 통해서 단지 p53의 분해 과정 뿐 아니라 세포 내에서의 위치 변화 조절과 전사인자로서의 활성 또한 조절할 수 있는지에 대해 관심 있게 다뤄질 것으로 예상된다. 특히 전사인자 활성 조절 측면에서는 최근의 p53 DBD의 아세틸화 보고처럼 유비퀴틴화로 인해 p53과 DNA와의 결합이 조절될 수 있고 더 나아가 여러 다양한 p53의 downstream gene의 프로모터 부위에 대한 결합의 특이성 조절로 인한 downstream gene의 발현 조절과 그에 따른 p53의 역할의 다양성이 어떻게 조절되는지에 대한 연구가 이루어질 것으로 전망된다. Fig. 2에서는 유비퀴틴화를 통한 p53의 전사인자 활성의 조절을 정리하였다.

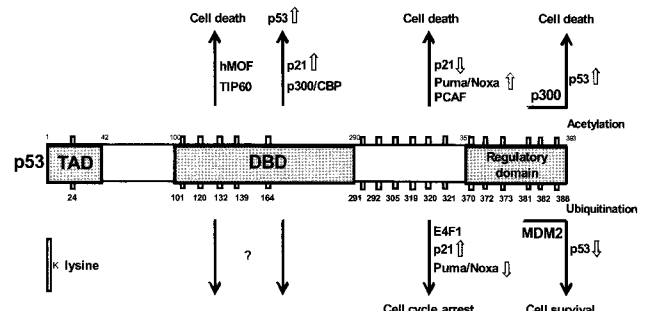


Fig. 2. Ubiquitin-mediated modulation of the transcriptional activity of p53.

Six lysine residues of the C-terminal end of p53 are acetylated by p300 to induce its transcriptional activity and express apoptosis-associated genes. Same lysines are also ubiquitinated by mdm2, which inhibits the transcriptional activity of p53. Moreover, lysine 320 of p53 is acetylated by PCAF for its apoptotic role, and E4F1 ubiquitinates at the same lysine for p21 not puma/noxa expression, which resulting cell cycle arrest rather than apoptosis. Two lysine residues (120 and 164) at DNA-binding domain are known as potent acetylation sites for expressing apoptosis-associated molecules, and it has been an unsolved question whether these sites can be ubiquitinated and also regulate functions of p53.

요 약

p53은 전사인자로서 세포의 사멸이나 세포주기 조절 등 다양한 세포 활성을 보이기 때문에 일반적인 환경에서는 매우 낮은 수준으로 단백질 양이 확인된다. p53의 단백질 양과 활성은 다양한 세포 내 신호에 의하여 이루어지는 후전사 변형을 통하여 조절 받는다. 이중 유비퀴틴화는 세포 내에서 p53 단백질의 발현 수준이 낮게 유지되는 것이 가능하게 하는 대표적인 기전이다. 이러한 기전을 일으키는 대표적인 p53의 E3 ligase로는 mdm2, Pirh2, COP1, ARF-BP1 등이 보고되어 있으며, 각각 negative feedback loop나 다른 기전을 통하여 p53 단백질의 분해를 유도하여 세포의 항상성을 조절한다. 이 밖에도 p53은 mdm2나 WWP1, UBC13, MSL2와 같은 E3 ligase로 인해서 모노

유비퀴틴화 되고, p53의 세포 내 위치가 조절되어 전사인자로서의 활성이 억제된다. p53의 세포 내 위치와는 관계 없이 p53의 전사인자로서의 활성 또한 아세틸화와 유비퀴틴화의 경쟁적 반응으로 인해 조절 될 수 있다. E4F1에 의한 유비퀴틴화는 세포주기와 관련된 유전자의 발현을 증가시키며 세포사멸 관련 유전자의 발현은 감소시키는 것으로 보아 p53의 수많은 downstream gene의 발현 또한 유비퀴틴화를 통해 조절 될 수 있음이 제시되었다. 앞으로의 연구는 신규 E3 ligase에 의한 p53의 유비퀴틴화 기전 연구 뿐 아니라 이와 관련된 다른 변형과의 관계에 대한 연구 또한 매우 중요하게 부각되어 질 것으로 예상된다.

감 사

본 연구는 보건복지가족부 암정복추진연구개발사업 및 지식경제부 전력산업연구개발사업에 의해 지원되었으며, 이에 감사드립니다.

접수 : 2009년 2월 9일, 게재승인 : 2009년 5월 14일

REFERENCES

- Baker, S. J., A. C. Preisinger, J. M. Jessup, C. Paraskeva, S. Mrakowitz, J. K. Willson, S. Hamilton, and B. Vogelstein (1990), p53 gene mutation occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis, *Cancer Res.* **23**, 717-722.
- Hsu, I. C., R. A. Metcalf, T. Sun, J. A. Welsh, N. J. Wang, and C. C. Harris (1991), Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas, *Nature* **350**, 427-428.
- Sidransky, D., A. von Eschenbach, Y. C. Tsai, P. Jones, I. Summerhayes, F. Marshall, M. Paul, P. Green, S. R. Hamilton, and P. Frost (1991), Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples, *Science* **252**, 706-709.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein, and C. C. Harris (1991), p53 mutations in human cancers, *Science* **253**, 49-53.
- Lane, D. P. (1992), Cancer. p53, guardian of the genome, *Nature* **358**, 15-16.
- Dulic, V., W. K. Kaufmann, S. J. Wilson, T. D. Tlsty, E. Lees, J. W. Harper, S. J. Elledge, and S. I. Reed (1994), p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest, *Cell* **76**, 1013-1023.
- el-Deiry, W. S., J. W. Harper, P. M. O'Connor, V. E. Velculescu, C. E. Canman, J. Jackman, J. A. Pietsenpol, M. Burrell, D. E. Hill, and Y. Wang (1994), WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis, *Cancer Res.* **54**, 1169-1174.
- Yonish-Rouach, E., D. Resnitzky, J. Lotem, L. Sachs, A. Kimchi, and M. Oren (1991), Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6, *Nature* **352**, 345-347.
- Lowe, S. W., E. M. Schmitt, S. W. Smith, B. A. Osborne, and T. Jacks (1993), p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes, *Nature* **362**, 847-849.
- Vaziri, H., M. D. West, R. C. Allsopp, T. S. Davison, Y. S. Wu, C. H. Arrowsmith, G. G. Poirier, and S. Benchimol (1997), ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase, *EMBO J.* **16**, 6018-6033.
- Bond, J., M. Haughton, J. Blaydes, V. Gire, D. Wynford-Thomas, and F. Wyllie (1996), Evidence that transcriptional activation by p53 plays a direct role in the induction of cellular senescence, *Oncogene* **13**, 2097-2104.
- Crichton, D., S. Wilkinson, J. O'Prey, N. Syed, P. Smith, P. R. Harrison, M. Gasco, O. Garrone, T. Crook, and K. M. Ryan (2006), DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis, *Cell* **126**, 121-134.
- Kastan, M. B., Q. Zhan, W. S. el-Deiry, F. Carrier, T. Jacks, W. V. Walsh, B. S. Plunkett, B. Vogelstein, and A. J. Fornace Jr (1992), A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia, *Cell* **71**, 587-597.
- Owen-Schaub, L. B., W. Zhang, J. C. Cusack, L. S. Angelo, S. M. Santee, T. Fujiwara, J. A. Roth, A. B. Deisseroth, W. W. Zhang, and E. Kruzel (1995), Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression, *Mol. Cell Biol.* **15**, 3032-3040.
- Miyashita, T. and J. C. Reed (1995), Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene, *Cell* **80**, 293-299.
- Budhram-Mahadeo, V., P. J. Morris, M. D. Smith, C. A. Midgley, L. M. Boxer, and D. S. Latchman (1999), p53 suppresses the activation of the Bcl-2 promoter by the Brn-3a POU family transcription factor, *J. Biol. Chem.* **274**, 15237-15244.
- Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi, and N. Tanaka (2000), Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis, *Science* **288**, 1053-1058.
- Nakano, K. and K. H. Vousden (2001), *PUMA*, a novel

- proapoptotic gene, is induced by p53, *Mol. Cell* **7**, 683-694.
19. Mihara, M., S. Erster, A. Zaika, O. Petrenko, T. Chittenden, P. Pancoska, and U. M. Moll (2003), p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria, *Mol. Cell* **11**, 577-590.
 20. Hershko, A. and A. Ciechanover (1992), The ubiquitin system for protein degradation, *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 761-807.
 21. Hochstrasser, M. (1996), Ubiquitin-dependent protein degradation, *Annu. Rev. Genet.* **30**, 405-439.
 22. Chau, V., J. W. Tobias, A. Bachmair, D. Marriott, D. J. Ecker, D. K. Gonda and A. Varshavsky (1989), A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein, *Science* **243**, 1576-1583.
 23. Terrell, J., S. Shih, R. Dunn, and L. Hicke (1998), A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor, *Mol. Cell* **1**, 193-202.
 24. Murray, A. (1995), Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis, *Cell* **81**, 149-152.
 25. Weake, V. M. and J. L. Workman (2008), Histone ubiquitination: triggering gene activity, *Mol. Cell* **29**, 653-663.
 26. Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, and P. M. Howley (1990), The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53, *Cell* **63**, 1129-1136.
 27. Fakharzadeh, S. S., S. P. Trusko, and D. L. George (1991), Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line, *EMBO J.* **10**, 1565-1569.
 28. Courjal, F., M. Cuny, C. Rodriguez, G. Louason, P. Speiser, D. Katsaros, M. M. Tanner, R. Zeillinger, and C. Theillet (1996), DNA amplifications at 20q13 and MDM2 define distinct subsets of evolved breast and ovarian tumours, *Br. J. Cancer* **74**, 1984-1989.
 29. Jones, S. N., A. E. Roe, L. A. Donehower, and A. Bradley (1995), Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53, *Nature* **378**, 206-208.
 30. Montes, de Oca Luna R., D. S. Wagner, and G. Lozano (1995), Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53, *Nature* **378**, 203-206.
 31. Itahana, K., H. Mao, A. Jin, Y. Itahana, H. V. Clegg, K. P. Bhat, V. L. Godfrey, G. I. Evan, and Y. Zhang (2007), Targeted inactivation of Mdm2 RING finger E3 ubiquitin ligase activity in the mouse reveals mechanistic insights into p53 regulation, *Cancer Cell* **12**, 355-366.
 32. Zhang, Y., Y. Xiong, and W. G. Yarbrough (1998), ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways, *Cell* **92**, 725-734.
 33. Li, M., D. Chen, A. Shiloh, J. Luo, A. Y. Nikolaev, J. Qin, and W. Gu (2002), Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization, *Nature* **416**, 648-653.
 34. Mayo, L. D. and D. B. Donner (2001), A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 11598-11603.
 35. Siliciano, J. D., C. E. Canman, Y. Taya, K. Sakaguchi, E. Appella, and M. B. Kastan (1997), DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53, *Genes Dev.* **11**, 3471-3481.
 36. Shieh, S. Y., M. Ikeda, Y. Taya, and C. Prives (1997), DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2, *Cell* **91**, 325-334.
 37. O'Connor, M. J., H. Zimmermann, S. Nielsen, H. U. Bernard, and T. Kouzarides (1999), Characterization of an E1A-CBP interaction defines a novel transcriptional adapter motif (TRAM) in CBP/p300, *J. Virol.* **73**, 3574-3581.
 38. Honda, R. and H. Yasuda (1999), Association of p19 (ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53, *EMBO J.* **18**, 22-27.
 39. Colaluca, I. N., D. Tosoni, P. Nuciforo, F. Senic-Matuglia, V. Galimberti, G. Viale, S. Pece, and P. P. di Fiore (2008), NUMB controls p53 tumour suppressor activity, *Nature* **451**, 76-80.
 40. Vassilev, L. T., B. T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi and E. A. Liu (2004), *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2, *Science* **303**, 844-848.
 41. Kojima, K., M. Konopleva, T. McQueen, S. O'Brien, W. Plunkett and M. Andreeff (2006), Mdm2 inhibitor Nutlin-3a induces p53-mediated apoptosis by transcription-dependent and transcription-independent mechanisms and may overcome Atm-mediated resistance to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia, *Blood* **108**, 993-1000.
 42. Wu, X., J. H. Bayle, D. Olson, and A. J. Levine (1993), The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop, *Genes Dev.* **7**, 1126-1132.
 43. Joseph, T. W., A. Zaika, and U. M. Moll (2003), Nuclear and cytoplasmic degradation of endogenous p53 and HDM2 occurs during down-regulation of the p53 response after multiple types of DNA damage, *FASEB J.* **17**, 1622-1630.
 44. Bond, G. L., K. M. Hirshfield, T. Kirchhoff, G. Alexe, E. E. Bond, H. Robins, F. Bartel, H. Taubert, P. Wuerl, W. Hait, D. Toppmeyer, K. Offit, and A. J. Levine (2006), MDM2 SNP 309 accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner, *Cancer Res.* **66**, 5104-5110.
 45. Hu, W., Z. Feng, L. Ma, J. Wagner, J. J. Rice, G. Stolovitzky, and A. J. Levine (2007), A single

- nucleotide polymorphism in the MDM2 gene disrupts the oscillation of p53 and MDM2 levels in cells, *Cancer Res.* **67**, 2757-2765.
46. Paulin, F. E., M. O'Neill, G. McGregor, A. Cassidy, A. Ashfield, C. W. Ali, A. J. Munro, L. Baker, C. A. Purdie, D. P. Lane, and A. M. Thompson (2008), MDM2 SNP309 is associated with high grade node positive breast tumours and is in linkage disequilibrium with a novel MDM2 intron 1 polymorphism, *BMC Cancer.* **8**, 281.
 47. Leng, R. P., Y. Lin, W. Ma, H. Wu, B. Lemmers, S. Chung, J. M. Parant, G. Lozano, R. Hakem, and S. Benchimol (2003), Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation, *Cell* **112**, 779-791.
 48. Dornan, D., I. Wertz, H. Shimizu, D. Arnott, G. D. Frantz, P. Dowd, K. O'Rourke, H. Koeppen and V. M. Dixit (2004), The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53, *Nature* **429**, 86-92.
 49. Osterlund, M. T., L. H. Ang, and X. W. Deng (1999), The role of COP1 in repression of *Arabidopsis* photomorphogenic development, *Trends Cell Biol.* **9**, 113-118.
 50. Kato, S., J. Ding, E. Pisk, U. S. Jhala, and K. Du (2008), COP1 Functions as a FoxO1 Ubiquitin E3 Ligase to Regulate FoxO1-mediated Gene Expression, *J. Biol. Chem.* **283**, 35464-35473.
 51. Dornan, D., H. Shimizu, A. Mah, T. Dudhela, M. Eby, K. O'Rourke, S. Seshagiri, and V. M. Dixit (2006), ATM engages autodegradation of the E3 ubiquitin ligase COP1 after DNA damage, *Science* **313**, 1122-1126.
 52. Sheng, Y., R. C. Laister, A. Lemak, B. Wu, E. Tai, S. Duan, J. Lukin, M. Sunnerhagen, S. Srisailam, M. Karra, S. Benchimol, and C. Arrowsmith (2008), Molecular basis of Pirh2-mediated p53 ubiquitylation, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 1334-1342.
 53. Hattori, T., T. Isobe, K. Abe, H. Kikuchi, K. Kitagawa, T. Oda, C. Uchida, and M. Kitagawa (2007), Pirh2 promotes ubiquitin-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1, *Cancer Res.* **67**, 10789-10795.
 54. Duan, S., Z. Yao, D. Hou, Z. Wu, W. G. Zhu and M. Wu (2007), Phosphorylation of Pirh2 by calmodulin-dependent kinase II impairs its ability to ubiquitinate p53, *EMBO J.* **26**, 3062-3074.
 55. Brooks, C. L. and W. Gu (2006), p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond, *Mol. Cell* **21**, 307-315.
 56. Freedman, D. A. and A. J. Levine (1998), Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6, *Mol. Cell Biol.* **18**, 7288-7293.
 57. Chen, D., N. Kon, M. Li, W. Zhang, J. Qin, and W. Gu (2005), ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor, *Cell* **121**, 1071-1083.
 58. Zhong, Q., W. Gao, F. Du, and X. Wang (2005), Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis, *Cell* **121**, 1085-1095.
 59. Grossman, S. R., M. Perez, A. L. Kung, M. Joseph, C. Mansur, Z. X. Xiao, S. Kumar, P. M. Howley, and D. M. Livingston (1998), p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation, *Mol. Cell* **2**, 405-415.
 60. Grossman, S. R., M. E. Deato, C. Brignone, H. M. Chan, A. L. Kung, H. Tagami, Y. Nakatani, and D. M. Livingston (2003), Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300, *Science* **300**, 342-344.
 61. Yamasaki, S., N. Yagishita, T. Sasaki, M. Nakazawa, Y. Kato, T. Yamadera, E. Bae, S. Toriyama, R. Ikeda, L. Zhang, K. Fujitani, E. Yoo, K. Tsuchimochi, T. Ohta, N. Araya, H. Fujita, S. Aratani, K. Eguchi, S. Komiya, I. Maruyama, N. Higashi, M. Sato, H. Senoo, T. Ochi, S. Yokoyama, T. Amano, J. Kim, S. Gay, A. Fukamizu, K. Nishioka, K. Tanaka, and T. Nakajima (2007), Cytoplasmic destruction of p53 by the endoplasmic reticulum-resident ubiquitin ligase Synoviolin, *EMBO J.* **26**, 113-122.
 62. Yang, W., L. M. Rozan, E. R. McDonald 3rd, A. Navaraj, J. J. Liu, E. M. Matthew, W. Wang, D. T. Dicker and W. S. El-Deiry (2007), CARPs are ubiquitin ligases that promote MDM2-independent p53 and phospho-p53ser20 degradation, *J. Biol. Chem.* **282**, 3273-3281.
 63. Boutell, C. and R. D. Everett (2003), The herpes simplex virus type 1 (HSV-1) regulatory protein ICP0 interacts with and ubiquitinates p53, *J. Biol. Chem.* **278**, 36596-36602.
 64. Rajendra, R., D. Malegaonkar, P. Pungaliya, H. Marshall, Z. Rasheed, J. Brownell, L. F. Liu, S. Lutzker, A. Saleem, and E. H. Rubin (2004), Topors functions as an E3 ubiquitin ligase with specific E2 enzymes and ubiquitinates p53, *J. Biol. Chem.* **279**, 36440-36444.
 65. Boddy, M. N., P. S. Freemont, and K. L. Borden (1994), The p53-associated protein MDM2 contains a newly characterized zinc-binding domain called the RING finger, *Trends Biochem. Sci.* **19**, 198-199.
 66. Roth, J., M. Dobbelstein, D. A. Freedman, T. Shenk, and A. J. Levine (1998), Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein, *EMBO J.* **17**, 554-564.
 67. Barak, Y., T. Juven, R. Haffner, and M. Oren (1993), Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity, *EMBO J.* **12**, 461-468.
 68. Buschmann, T., S. Y. Fuchs, C. G. Lee, Z. Q. Pan, and Z. Ronai (2000), SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53, *Cell* **101**, 753-762.
 69. Khosravi, R., R. Maya, T. Gottlieb, M. Oren, Y.

- Shiloh, and D. Shkedy (1999), Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14973-14977.
70. Dias, S. S., D. M. Milne, and D. W. Meek (2006), c-Abl phosphorylates Hdm2 at tyrosine 276 in response to DNA damage and regulates interaction with ARF, *Oncogene* **25**, 6666-6671.
 71. Pan, Y. and J. Chen (2003), MDM2 promotes ubiquitination and degradation of MDMX, *Mol. Cell Biol.* **23**, 5113-5121.
 72. Foo, R. S., L. K. Chan, R. N. Kitsis, and M. R. Bennett (2007), Ubiquitination and degradation of the anti-apoptotic protein ARC by MDM2, *J. Biol. Chem.* **282**, 5529-5535.
 73. Ofir-Rosenfeld, Y., K. Boggs, D. Michael, M. B. Kastan, and M. Oren, (2008), Mdm2 regulates p53 mRNA translation through inhibitory interactions with ribosomal protein L26, *Mol. Cell* **32**, 180-189.
 74. Yang, J. Y., C. S. Zong, W. Xia, H. Yamaguchi, Q. Ding, X. Xie, J. Y. Lang, C. C. Lai, C. J. Chang, W. C. Huang, H. Huang, H. P. Kuo, D. F. Lee, L. Y. Li, H. C. Lien, X. Cheng, K. J. Chang, C. D. Hsiao, F. J. Tsai, C. H. Tsai, A. A. Sahin, W. J. Muller, G. B. Mills, D. Yu, G. N. Hortobagyi, and M. C. Hung (2008), ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation, *Nat. Cell Biol.* **10**, 138-148.
 75. Logan, I. R., V. Sapountzi, L. Gaughan, D. E. Neal, and C. N. Robson (2004), Control of human PIRH2 protein stability: involvement of TIP60 and the proteasome, *J. Biol. Chem.* **279**, 11696-11704.
 76. I. R. Logan, L. Gaughan, S. R. McCracken, V. Sapountzi, H. Y. Leung, and C. N. Robson (2006), Human PIRH2 enhances androgen receptor signaling through inhibition of histone deacetylase 1 and is overexpressed in prostate cancer, *Mol. Cell Biol.* **26**, 6502-6510.
 77. Von Arnim, A. G. and X. W. Deng (1993), Ring finger motif of *Arabidopsis thaliana* COP1 defines a new class of zinc-binding domain, *J. Biol. Chem.* **268**, 19626-19631.
 78. Stacey, M. G., S. N. Hicks, and A. G. von Arnim (1999), Discrete domains mediate the light-responsive nuclear and cytoplasmic localization of *Arabidopsis* COP1, *Plant Cell* **11**, 349-364.
 79. Hou, Y., A. G. von Arnim, and X. W. Deng (1993), A new class of *Arabidopsis* constitutive photomorphogenic genes involved in regulating cotyledon development, *Plant Cell* **5**, 329-339.
 80. Ogryzko, V. V., R. L. Schiltz, V. Russanova, B. H. Howard, and Y. Nakatani (1996), The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases, *Cell* **87**, 953-959.
 81. McDonald, E. R. 3rd and W. S. El-Deiry (2004), Suppression of caspase-8- and -10-associated RING proteins results in sensitization to death ligands and inhibition of tumor cell growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 6170-6175.
 82. Liao W, Q. Xiao, V. Tchikov, K. Fujita, W. Yang, S. Wincovitch, S. Garfield, D. Conze, W. S. El-Deiry, S. Schutez, and S. M. Srinivasula (2008), CARP-2 is an endosome-associated ubiquitin ligase for RIP and regulates TNF-induced NF-kappaB activation, *Curr. Biol.* **18**, 641-649.
 83. Moriuchi, H., M. Moriuchi, and J. I. Cohen (1994), The RING finger domain of the varicella-zoster virus open reading frame 61 protein is required for its transregulatory functions, *Virology* **205**, 238-246.
 84. Mullen, M. A., D. M. Ciufo, and G. S. Hayward (1994), Mapping of intracellular localization domains and evidence for colocalization interactions between the IE110 and IE175 nuclear transactivator proteins of herpes simplex virus, *J. Virol.* **68**, 3250-3266.
 85. Canning, M., C. Boutell, J. Parkinson, and R. D. Everett (2004), A RING finger ubiquitin ligase is protected from autocatalyzed ubiquitination and degradation by binding to ubiquitin-specific protease USP7, *J. Biol. Chem.* **279**, 38160-38168.
 86. Diao, L., B. Zhang, J. Fan, X. Gao, S. Sun, K. Yang, D. Xin, N. Jin, Y. Geng, and C. Wang (2005), Herpes virus proteins ICP0 and BICP0 can activate NF-kappaB by catalyzing I-kappaB-alpha ubiquitination, *Cell Signal.* **17**, 217-229.
 87. Jr Haluska, P., A. Saleem, Z. Rasheed, F. Ahmed, E. W. Su, L. F. Liu, and E. H. Rubin (1999), Interaction between human topoisomerase I and a novel RING finger/arginine-serine protein, *Nucleic Acids Res.* **27**, 2538-2544.
 88. Guan, B., P. Pungaliya, X. Li, C. Uquillas, L. N. Mutton, E. H. Rubin, and C. J. Bieberich (2008), Ubiquitination by TOPORS regulates the prostate tumor suppressor NKX3.1, *J. Biol. Chem.* **283**, 4834-4840.
 89. Shaulsky, G., A. Ben-Ze'ev, and V. Rotter (1990), Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells, *Oncogene* **5**, 1707-1711.
 90. Shaulsky, G., N. Goldfinger, M. S. Tosky, A. J. Levine, and V. Rotter (1991), Nuclear localization is essential for the activity of p53 protein, *Oncogene* **6**, 2055-2065.
 91. Giannakakou, P., D. L. Sackett, Y. Ward, K. R. Webster, M. V. Blagosklonny, and T. Fojo (2000), p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein, *Nat. Cell Biol.* **2**, 709-719.
 92. Shaulsky, G., N. Goldfinger, A. Ben-Ze'ev, and V. Rotter (1990), Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis, *Mol. Cell Biol.* **10**, 6565-6577.
 93. Middeler, G., K. Zerf, S. Jenovai, A. Thulig, M.

- Tschodrich-Rotter, U. Kubitscheck, and R. Peters (1997), The tumor suppressor p53 is subject to both nuclear import and export, and both are fast, energy-dependent and lectin-inhibited, *Oncogene* **14**, 1407-1417.
94. Stommel, J. M., N. D. Marchenko, G. S. Jimenez, U. M. Moll, T. J. Hope, and G. M. Wahl (1999), A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking, *EMBO J.* **18**, 1660-1672.
 95. Lohrum, M. A., D. B. Woods, R. L. Ludwig, E. Balint, and K. H. Vousden (2001), C-terminal ubiquitination of p53 contributes to nuclear export, *Mol. Cell Biol.* **21**, 8521-8532.
 96. Geyer, R. K., Z. K. Yu, and C. G. Maki (2000), The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export, *Nat. Cell Biol.* **2**, 569-573.
 97. Carter, S., O. Bischof, A. Dejean, and K. H. Vousden (2007), C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53, *Nat. Cell Biol.* **9**, 428-435.
 98. Li, M., C. L. Brooks, F. Wu-Baer, D. Chen, R. Baer, and W. Gu (2003), Mono-versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2, *Science* **302**, 1972-1975.
 99. Thrower, J. S., L. Hoffman, M. Rechsteiner, and C. M. Pickart (2000), Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal, *EMBO J.* **19**, 94-102.
 100. Laine, A. and Z. Ronai (2007), Regulation of p53 localization and transcription by the HECT domain E3 ligase WWP1, *Oncogene* **26**, 1477-1483.
 101. Laine, A., I. Topisirovic, D. Zhai, J. C. Reed, K. L. Borden, and Z. Ronai (2006), Regulation of p53 localization and activity by Ubc13, *Mol. Cell Biol.* **26**, 8901-8913.
 102. Kruse, J. P. and W. Gu (2008), MSL2 promotes MDM2 independent cytoplasmic localization of p53, *Epub ahead of print* 2008 Nov 25.
 103. Andrews, P., Y. J. He, and Y. Xiong (2006), Cytoplasmic localized ubiquitin ligase cullin 7 binds to p53 and promotes cell growth by antagonizing p53 function, *Oncogene* **25**, 4534-4548.
 104. Nikolaev, A. Y., M. Li, N. Puskas, J. Qin, and W. Gu (2003), Parc: a cytoplasmic anchor for p53, *Cell* **112**, 29-40.
 105. Oh, W., E. W. Lee, Y. H. Sung, M. R. Yang, J. Ghim, H. W. Lee, and J. Song (2006), Jab1 induces the cytoplasmic localization and degradation of p53 in coordination with Hdm2, *J. Biol. Chem.* **281**, 17457-17465.
 106. Marchenko, N. D., S. Wolff, S. Erster, K. Becker, and U. M. Moll (2007), Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation, *EMBO J.* **26**, 923-934.
 107. Li, M., D. Chen, A. Shiloh, J. Luo, A. Y. Nikolaev, J. Qin, and W. Gu (2002), Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization, *Nature* **416**, 648-653.
 108. Mayr, G. A., M. Reed, P. Wang, Y. Wang, J. F. Schweds, and P. Tegtmeier (1995), Serine phosphorylation in the NH2 terminus of p53 facilitates transactivation, *Cancer Res.* **55**, 2410-2417.
 109. Barlev, N. A., L. Liu, N. H. Chehab, K. Mansfield, K. G. Harris, T. D. Halazonetis, and S. L. Berger (2001), Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases, *Mol. Cell* **8**, 1243-1254.
 110. Das, S., L. Raj, B. Zhao, Y. Kimura, A. Bernstein, S. A. Aaronson, and S. W. Lee (2007), Hzf Determines cell survival upon genotoxic stress by modulating p53 transactivation, *Cell* **130**, 624-637.
 111. Tanaka, T., S. Ohkubo, I. Tatsuno, and C. Prives (2007), hCAS/CSE1L associates with chromatin and regulates expression of select p53 target genes, *Cell* **130**, 638-650.
 112. Gu, W. and R. G. Roeder (1997), Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**, 595-606.
 113. Lain, S., J. J. Hollick, J. Campbell, O. D. Staples, M. Higgins, M. Aoubala, A. McCarthy, V. Appleyard, K. E. Murray, L. Baker, A. Thompson, J. Mathers, S. J. Holland, M. J. Stark, G. Pass, J. Woods, D. P. Lane, and N. J. Westwood (2008), Discovery, in vivo activity, and mechanism of action of a small-molecule p53 activator, *Cancer Cell* **13**, 454-463.
 114. Liu, L., D. M. Scolnick, R. C. Trievel, H. B. Zhang, R. Marmorstein, T. D. Halazonetis, and S. L. Berger (1999), p53 sites acetylated *in vitro* by PCAF and p300 are acetylated *in vivo* in response to DNA damage, *Mol. Cell Biol.* **19**, 1202-1209.
 115. Le Cam, L., L. K. Linares, C. Paul, E. Julien, M. Lacroix, E. Hatchi, R. Triboulet, G. Bossis, A. Shmueli, M. S. Rodriguez, O. Coux, and C. Sardet (2006), E4F1 is an atypical ubiquitin ligase that modulates p53 effector functions independently of degradation, *Cell* **127**, 775-788.
 116. Sykes, S. M., H. S. Mellert, M. A. Holbert, K. Li, R. Marmorstein, W. S. Lane, and S. B. McMahon (2006), Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction, *Mol. Cell* **24**, 841-851.
 117. Tang, Y., W. Zhao, Y. Chen, Y. Zhao, and W. Gu (2008), Acetylation is indispensable for p53 activation, *Cell* **133**, 612-626.
 118. Xu, P. and J. Peng (2008), Characterization of polyubiquitin chain structure by middle-down mass spectrometry, *Anal. Chem.* **80**, 3438-3444.
 119. Chan, W. M., M. C. Mak, T. K. Fung, A. Lau, W. Y. Siu, and R. Y. Poon (2006), Ubiquitination of p53 at multiple sites in the DNA-binding domain, *Mol. Cancer Res.* **4**, 15-25.