

病原菌调节宿主细胞丝裂原活化蛋白激酶 免疫防御信号的机理

葛建宁 邵峰*

(中国协和医科大学研究生院, 北京生命科学研究所, 北京 102206)

摘要 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 家族广泛存在于高等生物中, 介导多种生物学进程, 在固有免疫防御中发挥重要作用, 是真核细胞抵御病原菌侵染的第一道防线. 越来越多的研究发现, 病原菌可以利用多种方式激活或者抑制 MAPK 信号通路来增强其自身侵染力. 简单介绍了 MAPK 信号通路的背景并详细总结了近几年关于病原菌如何作用于 MAPK 信号通路的研究工作, 希望以此能够拓展对病原菌与宿主细胞作用方式的认识, 深化对 MAPK 重要作用的了解.

关键词 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK), 固有免疫, 病原菌

学科分类号 Q936

1 研究背景

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen- activated protein kinase, MAPK) 信号通路, 是固有免疫系统 (innate immune system) 的重要组成部分, 广泛存在于各种高等生物诸如植物, 酵母和哺乳动物中. MAPK 信号通路可以响应来自细胞外的多种刺激, 并将信号放大并传递到核内, 从而在转录水平影响细胞内多种生理途径, 如有丝分裂、细胞生长、迁移、分化、死亡以及产生炎症反应等^[1~9].

MAPK 信号通路都含有保守的 3 个级联相互作用的激酶, 分别称为 MEK 激酶 (MAPKK kinase/MAPKKK/MEKK), MAPK 激酶 (MAPK kinase/MAPKK/MEK) 和 MAPK. 当外来信号刺激时, MEKK, MEK, MAPK 被依次磷酸化激活, 活化的 MAPK 再磷酸化其下游的底物包括其他蛋白激酶, 磷脂酶, 转录因子, 细胞骨架蛋白等, 引起相应的细胞应答. 在经典的 Raf(MEKK)-MEK1/2(MEK)-ERK1/2(MAPK)途径中, 生长因子刺激细胞后, MEK1/2 被 Raf 磷酸化激活, 随后 MEK1/2 将 ERK1/2 中 Thr-Glu-Tyr 序列的苏氨酸及酪氨酸残基磷酸化使 Erk1/2 得以激活, 活化后的 Erk1/2 可以磷酸化众多底物包括转录因子 Elk1 和 c-Myc, 激酶 RSK (ribosomal S6 kinase) 等, 诱导

c-Fos 基因表达, 引起细胞增殖.

自然界中, 高等生物除了要抵抗自然环境的压力外, 还要时刻防御各种病原菌的入侵. 真核细胞可以利用自身的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)来识别各种病原菌相关分子表型(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)并激活免疫防御系统. 模式识别受体是存在于真核细胞表面或者内部的蛋白质受体, 它们可以直接识别病原微生物相关的分子结构如细菌的细胞壁组分, 鞭毛蛋白, 脂多糖, 非甲基化 CpGs 等. 植物 PRRs 包含 FLS2 受体激酶和 R 蛋白(resistance proteins), 动物细胞中 PRRs 则主要包括胞外的 TLRs(Toll like receptors)以及胞质中的 Nod (nucleotide-binding oligomerization domain proteins)分子. 病原菌侵染宿主细胞后通过 PRRs 诱发包括 MAPK 在内的信号转导途径, 进而激活与免疫防御相关的转录因子, 进一步启动宿主的免疫系统, 如在动物细胞中生成预炎症因子, 在植物中引起超敏反应(hypersensitive response, HR)等.

病原菌与宿主间的较量已经持续了数百万年, 在这一过程中, 病原菌进化出多种高效的方法用来

* 通讯联系人. Tel: 010-80726688-8560, Fax: 010-80728046

E-mail: shaofeng@nibs.ac.cn

收稿日期: 2007-05-17, 接受日期: 2007-06-05

抗衡宿主细胞的固有免疫防御系统. 近年来, 随着对病原菌与宿主细胞间相互作用的研究越来越深入, 已经有众多研究报道发现, 病原菌可以通过各种方式直接或者间接干扰宿主细胞的各种细胞结构和生理过程, 譬如有些革兰氏阴性菌通过保守的分泌系统将一些效应蛋白注射到宿主细胞内影响宿主细胞的细胞骨架、细胞周期、膜泡运输以及调节相关信号通路, 以此来增强病原菌的侵染力^[10~14]. 因此, MAPK 信号通路, 由于其在固有免疫系统中占有重要地位, 自然也就成了这些病原菌的重要攻击目标. 本文对于部分病原菌与宿主细胞 MAPK 通路之间相互作用的研究工作进行了简单总结, 希望能够借此阐明 MAPK 在宿主细胞免疫系统中的重要地位并加深对病原菌与宿主细胞间相互作用的

认识.

到目前为止, 通过生物信息学分析, 在拟南芥中已经发现 60 个可能编码 MEKK 的基因, 10 个编码 MEK 的基因, 约 20 种 MAPK, 有 3 种 MAPK 已确认在植物防御中起作用, 在哺乳动物中大约已鉴定出 5 类 MAPKs, 分别是 ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases), JNK1/2/3 (c-Jun amino-terminal kinases), P38 α / β / γ / δ , ERK3/4 和 ERK5, 但实际数目可能远不止这些 (图 1). 每条 MAPK 通路可以识别特定的外来刺激信号, 并激活相应的效应底物引起不同细胞应答, 譬如 ERK1/2 通路优先识别生长因子和佛波酯 (phorbol esters), 而 JNK 和 p38 通路则更易感受渗透压冲击、离子辐射和细胞因子的刺激.

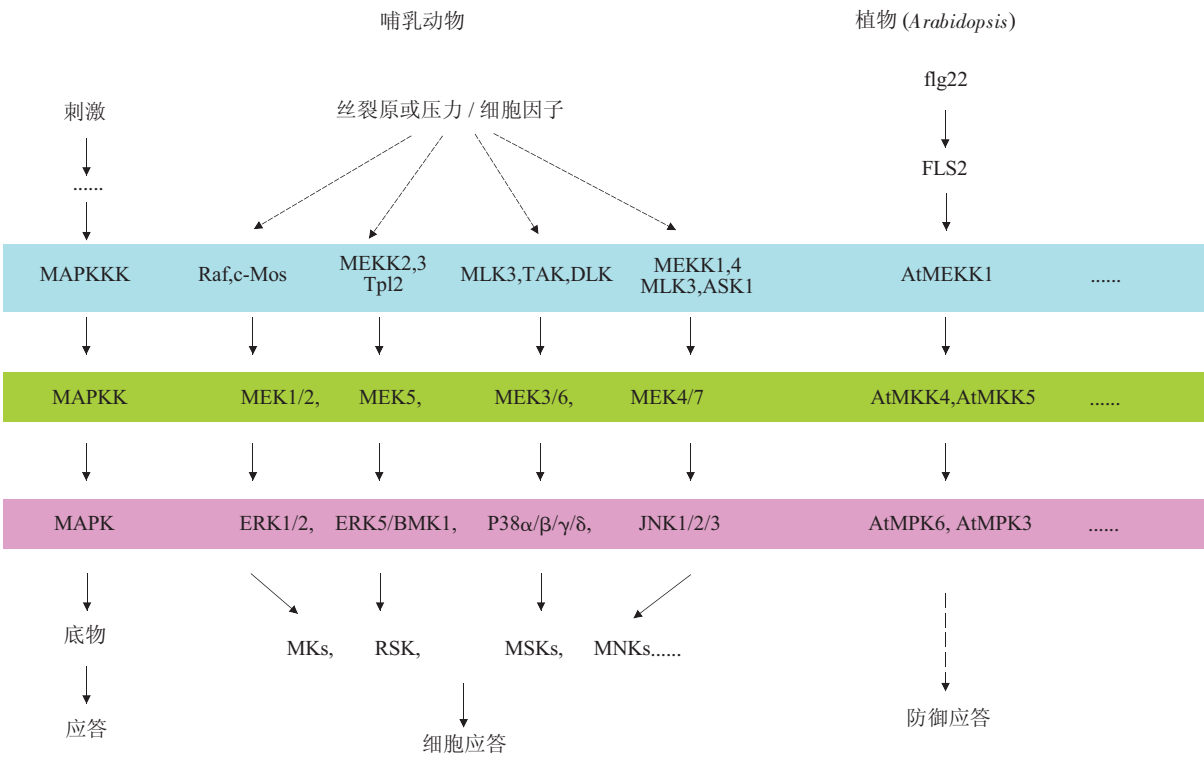


Fig. 1 Typical MAPK signal pathway in mammalian and plant cells
图 1 哺乳动物和植物细胞中典型的 MAPK 信号通路

2 病原菌对 MAPK 信号通路的作用方式

由于 MAPK 信号通路的复杂性与精密性^[15], 致病菌对于 MAPK 通路的作用方式也显得极为多样化. 最新研究发现: *Shigella* (志贺氏痢疾杆菌) 的 OspF^[16]和 *Yersinia* (耶尔森氏菌) 的 YopJ^[17, 18]家族成

员可以分别直接作用于 MAPK 通路的 MAPK 及 MEK, 利用不同的酶学活性阻碍 MAPK 通路成员的磷酸化过程; *Salmonella typhimurium* (鼠伤寒沙门氏菌) 的 SptP 同时拥有 2 种酶学活性, 协同作用于 MEKK 上游并抑制其激活^[19]; *Mycobacterium leprae* (麻风分枝杆菌) 则可以绕过经典的 MAPK 上

游途径, 通过 PKC 介导的途径激活 Erk1/2, 引起施旺细胞的去分化与增殖^[20].

2.1 裂合酶 (lyase)

存在于 *Shigella* 的 OspF 以及 *Salmonella* 的 SpvC 和能够感染植物的 *Pseudomonas syringae* (假单胞杆菌) 的 HopAI1 共同代表了一类新的三型分泌系统效应分子家族^[21]. 研究人员发现, 在 HEK293T 细胞中瞬时表达 OspF 可以有效地阻断 Erk1/2 和 JNK 信号而不影响 NF- κ B 途径, 同时无法检测到内源性 Erk1/2, JNK 和 p38 激酶的磷酸化修饰, 表明 OspF 很可能是阻碍了它们被磷酸化的过程. 通过使用组成型激活的 RasV12, v-Raf 或者 MEK1-ED, 作者发现, 在经典的 Ras-Raf-MEK-Erk 级联途径中, OspF 对 Erk 磷酸化的抑制作用处于 MEK1 的下游. HEK293T 细胞中, OspF 能直接与内源性 Erk1/2 结合而与 MEK1 没有相互作用, 此外, 体外的磷酸酶反应显示, 表达的重组 OspF 还能够将磷酸化的 Erk1/2, JNK 和 p38 去磷酸化, 并且在 Erk2 中, 这种去磷酸化活性选择性地作用于 pT-X-pY 区域的苏氨酸残基上. 因此, 表面上 OspF 作为一种磷酸酶, 直接作用于 Erk 并可以特异性去除其苏氨酸上的磷酸化修饰. 但让人惊奇的是, 通过质谱的检测发现, 磷酸化的 Erk 在被 OspF 作用前后分子质量相差了 98 u, 并且这个质量损失是发生在磷酸化苏氨酸上, 说明除了脱去一个磷酸基团 (80 u) 外还脱去一个水分子 (18 u), 这极有可能是由于在苏氨酸的侧链 α 碳原子和 β 碳原子间形成双键, 如果是这样, 就表示 OspF 并不是传统意义上的磷酸酶, 而是一类全新的磷酸化苏氨酸裂合酶 (phosphothreonine lyase), 理论上经过 OspF “去磷酸化” 的 Erk 应该无法再被磷酸化, 随后的试验也显示, OspF 的去磷酸化作用是不可逆的. 与此同时, Arbibe 以及 Kramer 2 个小组^[22, 23]也发现了 OspF 可以通过阻碍 MAPK 的磷酸化来抑制 MAPK 信号通路, 他们的实验结果都表明 OspF 可以直接去磷酸化 Erk 和 p38, 但是无法去除 JNK 的磷酸化修饰.

OspF 生化性质的研究表明, OspF 对于 MAPK 信号通路的抑制作用很可能是为了压制宿主细胞的固有免疫防御机制, 进而保证有利于自身增殖的细胞内环境. Kramer 等^[23]发现, 相对于野生型菌株而言, OspF 缺失的菌株感染后, 鼠肺部的中性粒细胞渗透现象有极大增强, 这表明 OspF 在一定程度上可以抑制感染时引起的强烈的固有免疫应答. 他

们还发现, 在酵母中 OspF 与酵母细胞壁完整性的信号通路关系密切, 而且这也依赖于 OspF 对 MAPK 信号通路的调节. 此外, 还有一些实验证据可能对于阐明 OspF 的生物学机制有一定帮助. Arbibe 等^[22]的工作发现, OspF 能够特异性减少某些染色质区域组蛋白 H3 中第 10 位丝氨酸的磷酸化, 进而降低转录因子 NF- κ B 与染色质的结合并降低下游基因的转录活性. 此外有趣的是, Zurawski 等^[24]则发现, 在 HeLa 细胞中过量表达的用红色荧光蛋白标记的 OspF 主要定位于细胞核中, 而同时在细胞质内也有部分 OspF 与微管结构相重叠, 但其具体的生物学意义尚不清楚, 也没有证据表明在感染水平, 病原菌分泌的内源性 OspF 与微管结构共定位.

尽管详细生物学机制尚未明了, 但在其他一些动植物病原菌中也发现有 OspF 的同源蛋白存在, 包括 *Salmonella typhimurium* 中的 SpvC 和 *Pseudomonas syringae* 中的 HopAI1. SpvC 与全长的 OspF 有着 63% 的同源性, 对于 *S. enterica* serovar Typhimurium 在鼠中产生完整毒力是必不可少的^[24], 关于 HopAI1 先前也已有工作表明, 它能够抑制植物中固有免疫应答的激活, 在表达 HopAI1 的转基因植物中出现黄叶等病状特征^[21]. 此外, 已有实验证明, SpvC 以及 HopAI1 在体外也拥有与 OspF 类似的酶学活性和动力学参数, 这也说明了 OspF 这种裂合酶的活性可能被动植物病原菌广泛利用, 并且这种酶学活性的不可逆性能够有效地避免 MAPK 的再磷酸化, 使得宿主细胞的固有免疫应答被持续高效抑制, 有助于病原菌的进一步侵染^[16]. 这也是首次发现病原菌利用裂合酶的性质来抑制宿主细胞的免疫信号通路, 由于细菌常常会模拟宿主细胞的调节机制来干扰宿主细胞的生理过程, 这是否也意味着真核细胞自身也存在这类裂合酶来调控胞内信号传导.

2.2 乙酰转移酶 (acetyl transferase)

Yersinia pestis, *Yersinia pseudotuberculosis* 以及 *Yersinia enterocolytica* 编码的三型分泌系统能够将一系列效应蛋白 Yops (YopO/YpkA, YopE, YopH, YopM, YopT 和 YopJ/YopP) 输入真核细胞^[25]. 早在 1997 年就有研究报道, YopJ 能诱导巨噬细胞产生凋亡^[26, 27], 此外 YopJ 还可以下调 p38 和 JNK 的活性, 抑制被感染宿主细胞生成细胞因子^[28, 29]. 刚开始的研究发现, YopJ 能够抑制 MAPK 以及 NF- κ B 信号通路的激活, 对此 Kim 认为, 这

是由于 YopJ 可以与 MAPKK 超家族成员结合并阻止其被磷酸化激活, 因此阻断了 MAPK 通路的三级酶联反应, 使得外来信号终止. 而随后通过对蛋白质结构特性的预测和分析, Kim 又发现, YopJ 的二级结构与腺病毒蛋白酶(AVP)有一定的相似性, 而 AVP 类似于酵母中的一个泛素样蛋白蛋白酶 1 (ubiquitin-like protein protease 1, Ulp1)^[30], 并且对于此类酶的保守位点三联氨基酸 (组氨酸, 天冬氨酸 / 谷氨酸, 半胱氨酸) 的突变试验也发现, 这几个位点对于 YopJ 的 MAPK 抑制作用是必不可少的. 也有研究发现, YopJ 拥有去泛素酶的活性 (deubiquitination, DUB)^[31], 由于泛素修饰在固有免疫应答系统中有重要调控作用, 包括 TRAF2, TRAF6, TAK1, TAB1, NEMO, I κ B α 等都受到不同类型的泛素化修饰^[32], 而且细胞中也存在相应的去泛素酶来平衡这种泛素化修饰, 如 CYLD 和 A20^[33, 34], 因此推测, YopJ 可能通过模仿细胞内去泛素酶的活性, 去除 MAPK 和 NF- κ B 信号通路某些蛋白质上的泛素化修饰, 进而抑制固有免疫应答信号的激活. 实验结果显示, YopJ 能够直接去除 TRAF6 和 TRAF2 上的 K63- 泛素链进而抑制 MAPK 和 NF- κ B 信号通路, 同时 I κ B α 上的 K48- 泛素链也可以被 YopJ 去除, 随后阻碍了蛋白酶体对 I κ B α 的降解, 还有研究发现, YopJ 可以去掉 IKK β 上连接的单泛素^[35], 尽管如此, 尚缺乏有力证据能够说明 YopJ 的去泛素酶活性和它的生物学功能之间的直接联系. 而在最新的研究中, Mukherjee 等^[18]意外地发现, YopJ 拥有乙酰转移酶 (ATF) 活性, 通过对 MKK 和 IKK β 激活环内关键位点的乙酰化修饰来抑制 MAPK 以及 NF- κ B 信号通路激活的. 他们发现, 当在大肠杆菌中与 YopJ 共表达时, MKK6 的 207 位丝氨酸和 211 位苏氨酸被乙酰化修饰, 而这 2 个位点也是 MKK6 被激活时所需要被磷酸化修饰的位点, 在无细胞体系中, 随着 MKK6 乙酰化修饰的增加, MKK6 的磷酸化水平也相应降低. 此外 IKK β 也能够被 YopJ 乙酰化进而阻碍了磷酸化的修饰^[17]. 因此, 将要被磷酸化的残基先进行乙酰化修饰, 看起来是病原菌高效调节宿主细胞固有免疫应答信号通路的一个重要手段, 这是否预示着真核细胞内本身对于这些信号通路也存在这种调节方式呢, 而且如果存在, 是否也会有相对应的去乙酰化酶存在, 同时, 尚不清楚 YopJ 对于宿主细胞内其他同源的 MEK 成员是否也拥有类似的作用, 其特异性如何, 这些都是进一步

需要研究的问题. 另外, YopJ 的去泛素化活性在病原菌的致病过程中是否与乙酰化的活性同时存在, 病原菌是否真的通过这一种分子同时催化 2 种活性来高效抑制宿主细胞的免疫应答, 也需要深入研究.

2.3 磷酸酶 (phosphatase)

磷酸化是对细胞内信号通路进行调控的最常用的修饰手段, 在宿主细胞的固有免疫应答激活过程中, 磷酸化修饰几乎涉及到 MAPK 和 NF- κ B 信号通路中的各个层次, 而去磷酸化则相应地可以逆向将这些修饰去除, 抑制免疫应答信号的产生, 许多病原菌就模仿这种最简单的酶学机理, 利用自身表达的磷酸酶来抑制宿主细胞的免疫防御系统. *Salmonella typhimurium* 感染培养的肠上皮细胞后可以激活 MAPK 如 ERK、JNK 和 p38, 而这种激活依赖于三型分泌系统^[36]. 研究人员发现, 三型分泌系统效应蛋白 SptP 可以下调由 *S. typhimurium* 感染引起的 SAPK/JNK 的激活^[37], 而且在线虫中 SptP 也可以抑制 p38 信号通路^[38]. 根据分析 SptP 是一个有多重功能的效应蛋白, 其 C 端区域氨基酸序列与 *Yersinia* 的酪氨酸磷酸酶 YopH 以及其他真核生物酪氨酸磷酸酶相似, N 端部分则含有针对 Cdc42 和 Rac1 的 GAP (GTPase activating protein) 活性, 而且 Fu 等^[37]发现 SptP 能够逆转由该病原菌编码的 2 个 GEF (GTPase exchange factor) SopE 和 SopE2 在胞内的作用并促进细胞恢复. Murli 等^[39]发现, SptP 可以调控 MAPK 信号通路, 因为细胞感染 SptP 缺陷株的 *S. typhimurium* 后 Erk 信号通路激活水平要高于野生株 *S. typhimurium*, 而且这个过程依赖于 SptP C 端的酪氨酸磷酸酶活性. Lin 等^[19]发现 SptP 能够高效抑制由组成型激活的 Raf (Y340D) 引起的 fos-luciferase 报告基因的表达, 而对于组成型激活态的 MEK1 (S218D/S222D) 或者 MEK2 (S222D/S226D) 的激活作用却没有影响, 由此看出, SptP 可能是通过干扰 Raf 激酶的激活来抑制 Erk-MAPK 通路的激活. Raf 的激活既需要转运到细胞质膜, 同时也需要 Pak1, 3 磷酸化 Raf 第 228 位的丝氨酸, Src 激酶磷酸化 Raf 第 340/341 位的酪氨酸, Raf 的这 2 个位点均发生磷酸化后才能够达到最大活性^[40, 41], 因此 Lin 等推测的模式认为 SptP 的 2 个结构域能够分别在不同步骤抑制 Raf 的激活, SptP 中 C 端酪氨酸磷酸酶活性可以干扰 Raf 向质膜的转运, 因为实验表明 SptP 磷酸酶的活性对于带有膜定位序列的 Raf (Y340D) CAAX 的激活是没有抑

制作用的, 而 N 端 GAP 结构域则可以抑制 Cdc42/Rac1 对 Pak1, 3 的活化进而抑制其磷酸化并激活 Raf^[19]. 这些都表明 SptP 通过抑制上游的 Raf 的激活来抑制 MAPK 信号通路动物的固有免疫反应. 由此可以看出, 病原菌的效应蛋白已经不是单纯地利用去磷酸酶的活性来抑制 MAPK 信号通路, 而常常是一个分子包含不止一种酶学活性, 同时从不同的方面配合进行协同调节, 以达到更高的抑制效应, 也反应了宿主本身免疫系统信号传导机制的复杂性.

HopPtoD2 是 *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000 三型分泌系统的效应蛋白^[42], 其 C 端拥有蛋白质酪氨酸磷酸酶 PTP 活性, 这个活性依赖于保守的 378 位点 Cys 残基^[43]. HopPtoD2 能抑制 *P. syringae* 感染 *Nicotiana benthamiana* 时引起的超敏反应 (hypersensitive response), 而 378 位 Cys 突变的 HopPtoD2 则不能. 组成性激活型的 NtMEK2^{DD} 在 Tobacco 中瞬时表达能够引起 HR 样细胞死亡, 而当 HopPtoD2 与 NtMEK2^{DD} 共同转入植物细胞时, HR 被抑制, 同样 HopPtoD2_{C378S} 对 NtMEK2^{DD} 引起的 HR 没有影响^[43]. 这说明 HopPtoD2 作用于 MEK 下游, 但究竟是作用于何位点, 以及以何方式作用, 目前还没有相关报道.

2.4 蛋白酶 (protease)

病原菌所利用的不同的修饰方法可以在一定程度上抑制宿主细胞的免疫应答, 但是细胞内每一种修饰方式都有可能相应的逆向调控来平衡, 比如磷酸化与去磷酸化, 乙酰化与去乙酰化, 泛素化与去泛素化等等, 而当蛋白质被直接降解后, 只有被重新合成才能继续发挥功能, 因此对病原菌来说, 直接降解免疫应答信号通路中的重要靶蛋白可能是更彻底有效的调控途径. 革兰氏阳性菌 *Bacillus anthracis* (炭疽杆菌) 被吸入人体后, 病原菌所产生的孢子就会被巨噬细胞所吞噬. 而 *B. anthracis* 可以在吞噬泡中生存, 在跟随巨噬细胞到达局部淋巴结后立刻裂解巨噬细胞进入血液引起系统性休克^[44]. *B. anthracis* 可以分泌 3 种蛋白, 保护性抗原 PA (protective antigen), 水肿因子 EF (edema factor) 和致死因子 LF (lethal factor). PA 和巨噬细胞表面特异性受体结合后, 可以协助将 EF 和 LF 转运到细胞质^[45]. LF 是一类锌离子金属蛋白酶, 体外反应体系中能够切割人以及果蝇的 MEK^[46, 47], 并且抑制 MAPK 的激活^[48]. LF 能够诱使经 LPS 刺激的巨噬细胞迅速凋亡, 而未受 LPS 刺激的细胞不受影响. 由

于 LPS 刺激巨噬细胞可以激活 ERK、JNK 和 p38 等 MAPK, 但是只有 p38 特异性抑制剂能够诱导经 LPS 刺激过的巨噬细胞产生和 LF 类似的凋亡现象. 为了证明 LF 诱导的这种凋亡现象是和 LF 对 MEK 的作用相关联的, 研究人员使用了一种不能被 LF 有效切割的 MEK 突变体 MKK6CR, 结果发现, MKK6CR 能够有效地降低由 LF 诱发的凋亡, 而且 MKK6CR 对于 p38 特异性抑制剂所诱发的凋亡没有影响, 这些都说明 LF 所诱发的凋亡是通过切割 MEK 进而阻碍 p38 的激活造成的^[49].

2.5 其他

除了干扰经典的 MEKK-MEK-MAPK 信号通路外, Tapinos 和 Rambukkana^[20]发现了一条不依赖于 MEK 的信号通路, *Mycobacterium leprae* 感染宿主细胞后能够通过 Src 家族成员 p56Lck (lymphoid cell kinase) 直接激活 Erk1/2, 这个过程并不依赖于 MEK, 却依赖于 PKC ϵ . 这条信号通路的激活导致了核内 cyclin D1 的积累, 诱使从 G1 期向 S 期转变, 细胞持续增殖, 利于病原菌的进一步感染. *M. leprae* 能够感染无髓鞘施旺细胞却不能感染有髓鞘施旺细胞, 但是当有髓鞘施旺细胞被 *M. leprae* 粘附时, 则可以发生脱髓鞘变成无髓鞘细胞并被 *M. leprae* 感染, 随后 *M. leprae* 调控被感染的无髓鞘施旺细胞的细胞周期, 使其脱离静息期并开始增殖, 产生更多的无髓鞘施旺细胞以帮助 *M. leprae* 逃避宿主免疫细胞的攻击^[50]. 实验中他们发现, 被感染的施旺细胞比正常施旺细胞摄入了更多的 BrdUrd (5-bromodeoxyuridine), 并且能够观察到较多分裂的细胞核, 这说明感染后的施旺细胞增殖速度加快. 与此同时, cyclin D 的转录水平与蛋白质表达水平都得到上调. 由于 cyclinD1 和 G1 期进程是受到包括 Erk1/2 和 PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) 等多条信号通路的调控, 作者检测了细胞中 Erk1/2 的激活情况, 发现在感染细胞中 Erk1/2 有显著的磷酸化现象. 有趣的是, 特异性的 MEK1/2 抑制剂 (MEK inhibitor, MEKI) U0126 和 PI3K 抑制剂 (PI3K inhibitor, PI3KI) LY204002 均不影响 Erk1/2 的磷酸化, 此时激活的 Erk1/2 依然能够高效地磷酸化下游的 Elk-1^[20]. 而 MEK1/2 是已知的仅有的能激活 Erk1/2 的上游激酶, 哺乳动物中目前还没有发现 MEK1/2 以外的途径来激活 Erk1/2. 实验中, 在有 MEKI 和 PI3KI 存在的条件下, 受感染细胞转染入显性失活突变 (dominant-negative mutant) 形式的 PKC ϵ 后 Erk1/2 的磷酸化水

平明显降低,说明可能 Erk1/2 的激活是经由 PKC ϵ 介导的. Erk1/2 本身并不是 PKC ϵ 的底物,因此 PKC ϵ 极有可能是通过另一个激酶作用来激活^[51]. 已有报道称, Lck (lymphoid cell kinase)是 PKC 的一个底物,是在淋巴组织中发现的一个非受体 Src 家族酪氨酸激酶^[52, 53],并且体外重组鼠源 Lck 能够磷酸化 Erk1/2^[54]. Src 激酶的药物抑制剂 PP2 能够有效抑制病原菌诱发 Erk1/2 的磷酸化. PI3KI, MEKI 对于 *M. leprae* 所诱发的 Erk1/2 磷酸化,核 cyclin D1 的积累,净 S 期细胞的数量没有影响,但是当在上述体系中加入 PKC 和 Lck 的抑制剂则显著减少核内 cyclinD1 以及净 S 期细胞的数量^[20]. 所以,似乎很明显 *M. leprae* 通过 PKC ϵ - Lck-Erk1/2 而非经典的 Ras-Raf-MEKK-MEK- Erk1/2 通路来调整细胞的分化去分化与细胞周期的进程,但是 *M. leprae* 如何启动这条信号通路,是在胞外和施旺细胞接触时还是必须进入细胞内部才能引起宿主细胞周期的改变,又通过何种手段引起 PKC ϵ 的激活仍然有待进一步研究. 此外, Lck 是一类酪氨酸激酶,而 Erk1/2 的激活需要特定定位点的酪氨酸和苏氨酸双重

磷酸化, Tapinos 发现, Lck 可以磷酸化 Erk1/2 上的酪氨酸位点,但是 Erk1/2 中苏氨酸位点的磷酸化位点又是谁介导的,可能存在另一个激酶与 Lck 配合,共同激活 Erk1/2 信号,这也提示我们,细胞中是否也存在着 Ras-Raf-MEKK-MEK-MAPK 之外其他的途径来调节 MAPK 信号.

此外,尚有不少其他研究发现病原菌调控宿主细胞的 MAPK 信号通路,但是相应机理还很明白了. He 等^[55]利用基于细胞的遗传筛选寻找三型分泌系统的效应分子,他们发现,在 *Arabidopsis* 中来自 DC3000 的 AvrPto 和 AvrPtoB 能够特异性抑制 MAMP (microbe-associated molecular pattern) 介导的早期防御应答,包括基因转录激活和 MAPK 信号的发生. 不同于其他动物细胞病原菌的三型系统效应分子, AvrPto 和 AvrPtoB 并不直接作用于 MEK 和 MAPK,而是作用于 MEKK 的上游,由于 AvrPto 和 AvrPtoB 定位在原生质体膜上,因此可能是作用于 MAMP 信号通路中的膜受体附近,至于其利用什么样的机制来抑制 MAPK 信号通路,有待进一步的实验探讨.

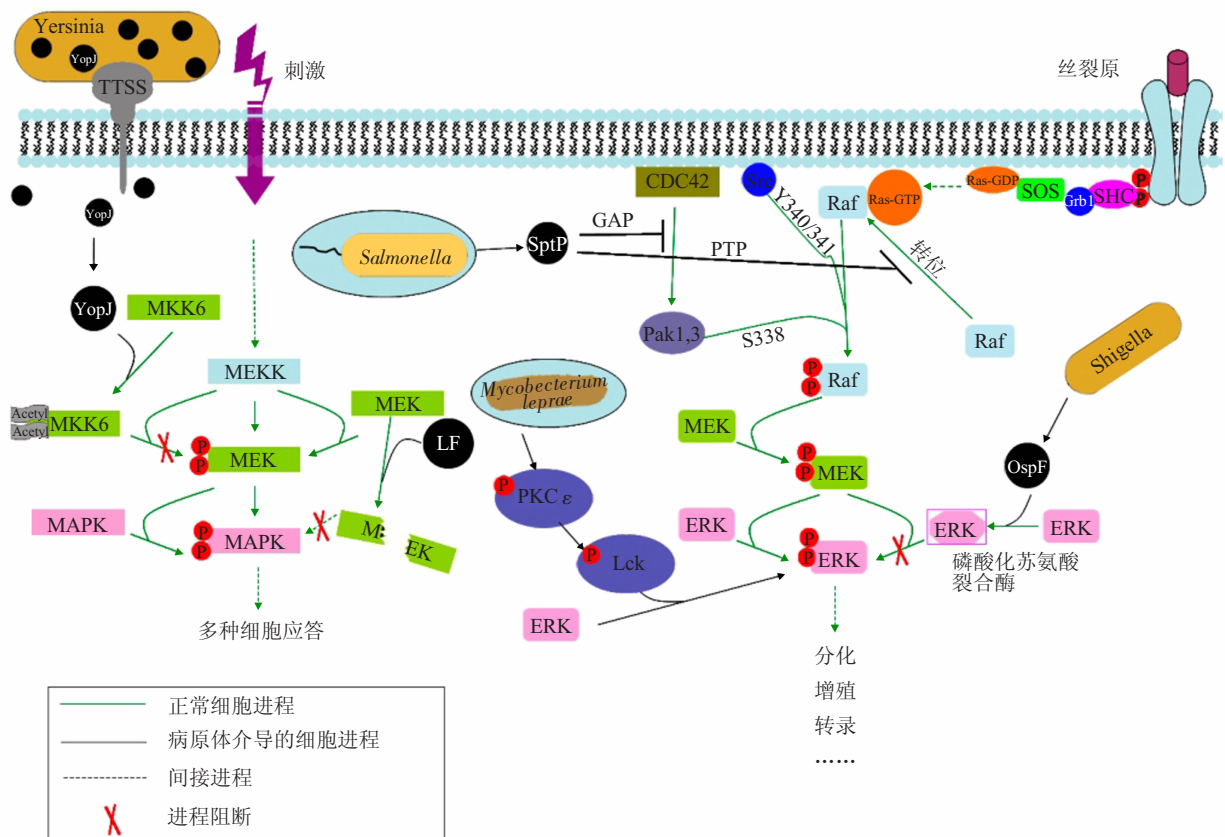


Fig. 2 Pathogen hijacks eukaryotic MAPK signal pathway
图 2 病原体攻击真核细胞 MAPK 信号通路示意图

3 小结与展望

综上所述,病原菌对 MAPK 信号通路的作用千变万化,很多机制还不甚明了,而且在真核细胞中仍存在众多未发现的 MAPK 通路,已发现的通路中对于各个组分的具体功能、作用机制的了解也不是很透彻,这在一定程度上限制了对病原菌与固有免疫系统相互作用的研究进展.但是以上的工作极大地丰富了这个领域,给了研究人员更广阔的视野,他们的工作也引出了一些潜在的工作方向.病原菌对 MAPK 信号通路的作用方式非常多(图 2):可以作用于 MAPK 信号通路的不同部位,如 OspF 作用于 MAPK, YopJ 作用于 MEK, SptP 作用于 MEKK;也可以用不同酶学活性去阻碍 MAPK 通路组分的磷酸化,这里有 OspF 的裂解酶活性,也有 YopJ 的乙酰转移酶活性,它们都可以阻断靶蛋白的磷酸化, *B. anthracis* 的 LF 可以直接将 MEK 的 N 端与催化区切开,并且这些活性可能是不可逆的, SptP 还同时拥有 GAP 和 PTP 的活性协同作用于 MEKK;也可以经由其他信号通路间接作用于 MAPK 信号通路,比如 *M. leprae* 绕过 MEKK 和 MEK 直接作用于 MAPK,而且这种作用不是抑制,而是激活,引起细胞的去分化进程.此外,尽管看起来 YopJ 的去泛素化活性可能与其生物学功能关系不大,但是却不能排除病原菌利用泛素化修饰方式来干扰 MAPK 通路,因为生物信息学的分析已经在越来越多的病原菌中发现有与真核细胞内泛素系统结构域相类似的蛋白质编码基因,而且也有研究证明病原菌感染宿主细胞与泛素系统有一定的关联^[56, 57].知己知彼,百战不殆,病原菌与宿主细胞间的斗争激烈而有趣,这个领域的不断发展,不仅有利于我们加深对自身的免疫系统的认识,也更有利于我们寻找更好的针对各种病原菌侵袭的防治方法.

参 考 文 献

- Ausubel F M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?. *Nat Immunol*, 2005, **6** (10): 973~979
- Dong C, Davis R J, Flavell R A. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*, 2002, **20**: 55~72
- Krens S F, Spaik H P, Snaar-Jagalska B E. Functions of the MAPK family in vertebrate-development. *FEBS Lett*, 2006, **580** (21): 4984~4990
- Mishra N S, Tuteja R, Tuteja N. Signaling through MAP kinase networks in plants. *Arch Biochem Biophys*, 2006, **452** (1): 55~68
- Pedley K F, Martin G B. Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, **8** (5): 541~547
- Roux P P, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, **68** (2): 320~344
- Zhang S, Klessig D F. MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci*, 2001, **6** (11): 520~527
- Zhang T, Liu Y, Yang T, *et al.* Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiol Biochem*, 2006, **44** (5~6): 274~283
- Zhang Y L, Dong C. MAP kinases in immune responses. *Cell Mol Immunol*, 2005, **2** (1): 20~27
- Espinosa A, Alfano J R. Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. *Cell Microbiol*, 2004, **6** (11): 1027~1040
- Galan J E, Cossart P. Host-pathogen interactions: a diversity of themes, a variety of molecular machines. *Curr Opin Microbiol*, 2005, **8** (1): 1~3
- Kahn R A, Fu H, Roy C R. Cellular hijacking: a common strategy for microbial infection. *Trends Biochem Sci*, 2002, **27** (6): 308~314
- Marjomaki V, Schaible U E. Microbial strategies to exploit host cells. Meeting on spatial and temporal dynamics of the endomembrane system. *EMBO Rep*, 2005, **6** (5): 408~412
- Tournier J N, Quesnel-Hellmann A. Host-pathogen interactions: a biological rendez-vous of the infectious nonself and danger models?. *PLoS Pathog*, 2006, **2** (5): e44
- Murphy L O, Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci*, 2006, **31** (5): 268~275
- Li H, Xu H, Zhou Y, *et al.* The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. *Science*, 2007, **315** (5814): 1000~1003
- Mittal R, Peak-Chew S Y, McMahon H T. Acetylation of MEK2 and I kappa B kinase (IKK) activation loop residues by YopJ inhibits signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103** (49): 18574~18579
- Mukherjee S, Keitany G, Li Y, *et al.* Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science*, 2006, **312** (5777): 1211~1214
- Lin S L, Le T X, Cowen D S. SptP, a *Salmonella typhimurium* type III -secreted protein, inhibits the mitogen-activated protein kinase pathway by inhibiting Raf activation. *Cell Microbiol*, 2003, **5** (4): 267~275
- Tapinos N, Rambukkana A. Insights into regulation of human Schwann cell proliferation by Erk1/2 via a MEK-independent and p56Lck-dependent pathway from leprosy bacilli. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (26): 9188~9193
- Li X, Lin H, Zhang W, *et al.* Flagellin induces innate immunity in nonhost interactions that is suppressed by *Pseudomonas syringae* effectors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (36): 12990~12995
- Arbibe L, Kim D W, Batsche E, *et al.* An injected bacterial effector targets chromatin access for transcription factor NF-kappaB to alter transcription of host genes involved in immune responses. *Nat Immunol*, 2007, **8** (1): 47~56

- 23 Kramer R W, Slagowski N L, Eze N A, *et al.* Yeast functional genomic screens lead to identification of a role for a bacterial effector in innate immunity regulation. *PLoS Pathog*, 2007, **3** (2): e21
- 24 Zurawski D V, Mitsuhashi C, Mumy K L, *et al.* OspF and OspC1 are *Shigella flexneri* type III secretion system effectors that are required for postinvasion aspects of virulence. *Infect Immun*, 2006, **74** (10): 5964~5976
- 25 Viboud G I, Bliska J B. *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*, 2005, **59**: 69~89
- 26 Mills S D, Boland A, Sory M P, *et al.* *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (23): 12638~12643
- 27 Monack D M, Mecsas J, Ghori N, *et al.* *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (19): 10385~10390
- 28 Palmer L E, Hobbie S, Galan J E, *et al.* YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF- α production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol Microbiol*, 1998, **27** (5): 953~965
- 29 Schesser K, Spiik A K, Dukuzumuremyi J M, *et al.* The yopJ locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF- κ B activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Mol Microbiol*, 1998, **28** (6): 1067~1079
- 30 Li S J, Hochstrasser M. A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature*, 1999, **398** (6724): 246~251
- 31 Zhou H, Monack D M, Kayagaki N, *et al.* *Yersinia* virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF- κ B activation. *J Exp Med*, 2005, **202** (10): 1327~1332
- 32 Chen Z J. Ubiquitin signalling in the NF- κ B pathway. *Nat Cell Biol*, 2005, **7** (8): 758~765
- 33 Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, *et al.* The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF- κ B signalling by deubiquitination. *Nature*, 2003, **424** (6950): 801~805
- 34 Wertz I E, O'Rourke K M, Zhou H, *et al.* De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- κ B signalling. *Nature*, 2004, **430** (7000): 694~699
- 35 Carter R S, Pennington K N, Ungurait B J, *et al.* Signal-induced ubiquitination of I κ B Kinase- β . *J Biol Chem*, 2003, **278** (49): 48903~48906
- 36 Hobbie S, Chen L M, Davis R J, *et al.* Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol*, 1997, **159** (11): 5550~5559
- 37 Fu Y, Galan J E. A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature*, 1999, **401** (6750): 293~297
- 38 Tenor J L, McCormick B A, Ausubel F M, *et al.* *Caenorhabditis elegans*-based screen identifies *Salmonella* virulence factors required for conserved host-pathogen interactions. *Curr Biol*, 2004, **14** (11): 1018~1024
- 39 Murli S, Watson R O, Galan J E. Role of tyrosine kinases and the tyrosine phosphatase SptP in the interaction of *Salmonella* with host cells. *Cell Microbiol*, 2001, **3** (12): 795~810
- 40 Chaudhary A, King W G, Mattaliano M D, *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338. *Curr Biol*, 2000, **10** (9): 551~554
- 41 Sun H, King A J, Diaz H B, *et al.* Regulation of the protein kinase Raf-1 by oncogenic Ras through phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42/Rac and Pak. *Curr Biol*, 2000, **10** (5): 281~284
- 42 Petnicki-Ocwieja T, Schneider D J, Tam V C, *et al.* Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (11): 7652~7657
- 43 Espinosa A, Guo M, Tam V C, *et al.* The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. *Mol Microbiol*, 2003, **49** (2): 377~387
- 44 Hanna P. Lethal toxin actions and their consequences. *J Appl Microbiol*, 1999, **87** (2): 285~287
- 45 Bradley K A, Mogridge J, Mourez M, *et al.* Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature*, 2001, **414** (6860): 225~229
- 46 Duesbery N S, Webb C P, Leppla S H, *et al.* Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science*, 1998, **280** (5364): 734~737
- 47 Guichard A, Park J M, Cruz-Moreno B, *et al.* Anthrax lethal factor and edema factor act on conserved targets in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103** (9): 3244~3249
- 48 Duesbery N S, Resau J, Webb C P, *et al.* Suppression of ras-mediated transformation and inhibition of tumor growth and angiogenesis by anthrax lethal factor, a proteolytic inhibitor of multiple MEK pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (7): 4089~4094
- 49 Park J M, Greten F R, Li Z W, *et al.* Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science*, 2002, **297** (5589): 2048~2051
- 50 Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, *et al.* Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. *Science*, 2002, **296** (5569): 927~931
- 51 Telenti A, Philipp W J, Sreevatsan S, *et al.* The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med*, 1997, **3** (5): 567~570
- 52 Molina T J, Perrot J Y, Penninger J, *et al.* Differential requirement for p56lck in fetal and adult thymopoiesis. *J Immunol*, 1998, **160** (8): 3828~3834
- 53 Ping P, Song C, Zhang J, *et al.* Formation of protein kinase C (epsilon)-Lck signaling modules confers cardioprotection. *J Clin Invest*, 2002, **109** (4): 499~507

- 54 Ettehadieh E, Sanghera J S, Pelech S L, *et al.* Tyrosyl phosphorylation and activation of MAP kinases by p56lck. *Science*, 1992, **255** (5046): 853~855
- 55 He P, Shan L, Lin N C, *et al.* Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell*, 2006, **125** (3): 563~575
- 56 Perrin A J, Jiang X, Birmingham C L, *et al.* Recognition of bacteria in the cytosol of mammalian cells by the ubiquitin system. *Curr Biol*, 2004, **14** (9): 806~811
- 57 Veiga E, Cossart P. Ubiquitination of intracellular bacteria: a new bacteria-sensing system?. *Trends Cell Biol*, 2005, **15** (1): 2~5

Hijacking The Eukaryotic MAPK Pathway by Pathogens

GE Jian-Ning, SHAO Feng*

(Graduate School of Peking Union Medical College, National Institute of Biological Sciences, Beijing 102206, China)

Abstract MAPK (mitogen- activated protein kinase) family, which is conserved throughout high eukaryotes, is implicated in multiple cellular processes including cell growth, migration, proliferation, differentiation, survival and development. Pathogen hijacks hosts' MAPK pathways to facilitate its pathogenesis using diverse strategies. To further explore the mechanism underlying interactions between pathogens and hosts' MAPK pathway, is of benefit to our understanding of nature as well as to our fight against pathogen infection.

Key words mitogen- activated protein kinase (MAPK), innate immunity, pathogen

*Corresponding author . Tel: 86-10-80726688-8560, Fax: 86-10-80728046, E-mail: shaofeng@nibs.ac.cn

Received: May 17, 2007 Accepted: June 5, 2007