

E3 泛素连接酶 Smurf 家族在骨形态发生蛋白和转化生长因子信号转导中的作用*

王 磬¹⁾ 朱天慧¹⁾ 张 明¹⁾ 陈 棣^{1,2)**}

(¹⁾南开大学医学院, 医学分子生物学实验室, 天津 300071;

(²)University of Rochester Medical Center, Center for Musculoskeletal Research, Department of Orthopaedics, NY 14642, USA)

摘要 泛素-蛋白酶体降解系统广泛存在于各种真核细胞中, 参与调控细胞多种生理进程. 作为该系统中行使调控降解功能的核心成员, E3 泛素连接酶的重要作用已经越来越引起人们的重视. BMP 和 TGF- β 是骨组织中调控成骨细胞和软骨细胞增殖、分化和凋亡的关键分子, 通过不同的信号通路体系调控骨生理代谢, 参与骨组织的多种生理进程. 最近的研究表明, 泛素-蛋白酶体降解系统在骨细胞和骨组织中具有十分重要的作用, E3 泛素连接酶 Smurf 作为这一系统的核心, 参与调控骨组织中 BMP 和 TGF- β 两个家族的分子信号转导过程. 在前期成果的基础上, 结合最新的研究进展, 系统阐述了骨组织中 E3 泛素连接酶的发现, 及其调控 BMP 和 TGF- β 信号通路的机制以及其对成骨细胞和软骨细胞增殖和分化的影响.

关键词 泛素-蛋白酶体降解系统, E3 泛素连接酶, Smurf, 骨形态发生蛋白, 转化生长因子 β , 成骨细胞, 软骨细胞
学科分类号 Q75

2004年, 以色列科学家 Ciechanover、Hershko 和美国科学家 Rose 因发现细胞中泛素依赖性的蛋白质降解系统而获得诺贝尔化学奖. 泛素(ubiquitin)是一种含有 76 个氨基酸的高度保守的多肽, 因其在整个生物界广泛存在而得名. 生物体将需要被降解的蛋白质进行泛素化标记, 被标记的蛋白质继而能够在蛋白酶体(proteasome)中被降解. 这种在生物体中专一进行蛋白质降解的系统是生物在亿万年的进化过程中形成的. 细胞中泛素依赖的蛋白质降解系统通过降解缺陷和无用的蛋白质、失活的各种酶, 在调控细胞周期、细胞信号转导、遗传信息的复制与表达、染色体的结构及功能等常见的生命现象中发挥着极其重要的作用.

骨和软骨的形成受众多生长因子、信号转导因子和转录因子的调节. 其中, 骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)^[1]和转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)^[2]在骨细胞增殖、分化和凋亡过程中起着重要的作用, 并且两者通过不同的信号通路调节软骨内成骨. BMP 和 TGF- β 的信号转导经由丝苏氨酸激酶受体介导, 活化的受体激活信号转导分子 Smad1、Smad5 和 Smad8 (BMP 信号转导通路)或 Smad2 和 Smad3

(TGF- β 和活化素信号转导通路)^[3,4], 被激活的 Smads 蛋白又与其他转录因子作用, 从而激活各自信号通路下游靶基因的表达. Runx2/Cbfa1 是骨特异性转录因子^[5], 它不仅与 BMP 激活的 Smad1、5 相互作用^[6], 也与 TGF- β 激活的 Smad2、3 相互作用^[7]. 但迄今为止, 骨细胞中 BMP 和 TGF- β 的信号转导途径还未被完全阐明.

蛋白质的泛素化作为真核生物蛋白质降解的重要机制对许多重要的生物进程如细胞周期、基因转录和细胞信号转导等是至关重要的^[8]. 泛素介导的蛋白酶体降解是调节 BMP 和 TGF- β 蛋白信号转导功能的重要机制之一. 泛素-蛋白质结合物的形成需要 3 种酶催化泛素传递的级联反应, 这 3 种酶分别为泛素激活酶(E1)、泛素结合酶(E2)和泛素连接酶(E3). 其中, E3 泛素连接酶负责确定蛋白质泛素化的特异性, 识别靶蛋白底物, 并在引发 26 S 的蛋白酶体降解蛋白质的过程中起极其重要的作用^[9,10].

*天津市自然科学基金资助项目(05YFJMC01800).

** 通讯联系人.

Tel: 001-585-273-5631, Fax: 001-585-275-1121

E-mail: di_chen@urmc.rochester.edu

收稿日期: 2005-11-08, 接受日期: 2005-12-30

1 E3 泛素连接酶 Smurf1、Smurf2 和 WWP1 的发现

通过酵母双杂交技术, Zhu 等^[11]分离鉴定出了与 Smad1、5 具有相互作用的 Smad 泛素调节因子 1 (Smad ubiquitin regulatory factor 1, Smurf1). 通过综合应用表达序列作为标签的数据库搜索技术和以 Smad2 为诱饵的酵母双杂交实验, Lin 等^[12]和 Zhang 等^[13]分离鉴定出 Smurf2. 人 Smurf1 蛋白含有 731 个氨基酸, 人 Smurf2 蛋白含有 748 个氨基酸, 两者具有 80% 的同源性^[13], 同属于 E3 泛素连接酶家族, 都含有 HECT 结构域. Smurf1 和 Smurf2 与不同的 Smad 蛋白相互作用 (Smad1、5 与 Smurf1 作用, Smad2、3 与 Smurf2 作用), 从而引发这些 Smad 蛋白以及与这些 Smad 蛋白相互作用的蛋白质的泛素化和降解. 含有 HECT 结构域的蛋白质是 E3 连接酶家族中的一个主要的亚族, 在其 HECT 结构域的羧基端有一个高度保守的半胱氨酸残基, 该半胱氨酸与泛素之间可形成硫酯键^[11] (图 1). 将这个高度保守的半胱氨酸残基突变为丙氨酸 (Smurf1, C710A; Smurf2, C716A) 或甘氨酸 (Smurf2,

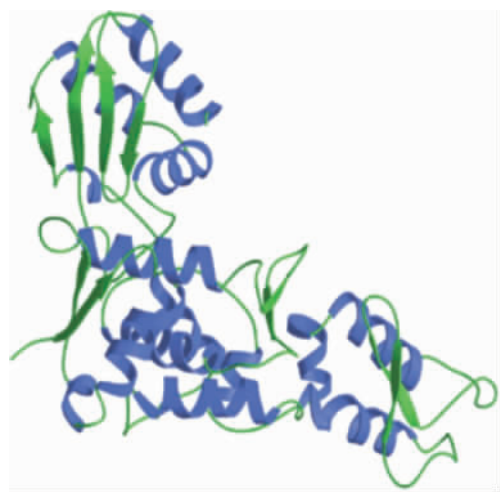


Fig. 1 Basic structure of HECT domain

图 1 蛋白质 HECT 结构域的基本结构

HECT 结构域 (homologous to the E6-AP carboxyl terminus) 位于 E3 泛素连接酶家族的羧基端, 是一个大约 40 ku 的催化结构域. 这个结构域的功能是特异性地结合 E2 泛素结合酶, 催化其自身的 HECT 结构域的半胱氨酸与 E2 泛素结合酶上的泛素, 通过泛素-硫酯键相互结合形成中间物, 接着将泛素转移到 E3 泛素连接酶的作用底物蛋白质的亮氨酸拉链五氨基酸结构上或者连接到正在生长中的多聚泛素链的末端. 催化含有泛素的硫酯中间物的形成, 是 E3 泛素连接酶家族中具有 HECT 结构域的成员的独特功能, E3 泛素连接酶的其他家族成员没有这样的功能.

C716G) 后, Smurf1 和 Smurf2 完全丧失其泛素化和降解特定蛋白质的活性^[11~13]. WW 结构域是 E3 泛素连接酶 HECT 结构域蛋白质家族的另一个重要特征 (图 2). 这个结构域含有大约 30 个氨基酸, 其中包含高度保守的两个色氨酸和一个脯氨酸^[11,13], 具有同富含脯氨酸的小肽 (PPXY 结构) 结合的能力. 并且, 不同的 WW 结构域表现出对底物选择不同的特异性. Smurf1 和 Smurf2 分别有 2 个和 3 个 WW 结构域, Smurf1 的 WW 结构域定位于其第 236 到 311 位氨基酸之间^[11], Smurf2 的 WW 结构域定位于其第 248 到 369 位氨基酸之间^[13]. PY 结构 (富含脯氨酸和酪氨酸的结构域) 发生突变的 Smad 蛋白失去与 Smurf 蛋白相互作用的能力, 并由此抑制 Smad 蛋白的降解^[11,13]. 最近, 通过酵母双杂交实验又分离鉴定出一个可与 Smad7 相互作用的新的 E3 泛素连接酶 WWP1^[14]. WWP1 也属于具有 HECT 结构域的 E3 泛素连接酶家族, 其结构与 Smurf1 和 Smurf2 相似. WWP1 通过特异性介导 TGF- β I 型受体的降解抑制 TGF- β 信号转导通路, 但是对 Smad 蛋白的降解没有影响^[14].



Fig. 2 Basic structure of WW domain

图 2 蛋白质 WW 结构域的基本结构

WW 结构域在蛋白质中非常常见, 由大约 30~40 个氨基酸残基组成, 它特异性结合富含脯氨酸的蛋白质序列.

2 Smurf1 和 Smurf2 在 BMP 和 TGF- β 信号转导过程中的作用

TGF- β 家族和 BMP 家族都是 TGF- β 超家族的成员, 在骨细胞的形成、发育、增殖和分化等方面发挥着至关重要的作用. TGF- β 超家族成员进行的信号转导是通过其受体的磷酸化并激活细胞内信号蛋白 Smads 来实现的. Smad1、5、8 受 BMP I 型受体的激活; Smad2、3 受 TGF- β 和 activin I 型受体的激活.

Smurf1 和 Smurf2 蛋白介导降解的底物分别是

Smad1/5^[11]以及 Smad2/3^[12]. Smad2 的蛋白酶体性降解是通过激活 TGF- β 信号通路并引发 Smad2 蛋白磷酸化来实现的^[15]. Smad2 的 C 端磷酸化位点的突变将阻止其磷酸化作用, 进而阻碍其泛素化. 将 Smad2 的 N 端融合到 SV40 大 T 抗原的核定位信号(NLS)后, 这个融合蛋白将在细胞核中积聚, 并且在不激活 TGF- β 信号通路的情况下就发生了泛素化现象. 这些结果表明, Smad2 向核内转移和在核内聚集是其泛素-蛋白酶体降解所必需的. 虽然 Smurf 蛋白最初是通过与 Smad 蛋白的相互作用而被发现的, 但有意思的是, 它们也介导与 Smad 蛋白相互作用的其他蛋白质的降解. 有报道表明, Smurf2 可与 Smad7 相互作用并介导 TGF- β I 型受体的降解. Smurf2 与 Smad7 的结合导致了它们一起从细胞核中迁移到细胞质中. IFN γ 刺激 Smad7 的表达, 诱导 Smad7/Smurf2 复合体的形成并增加 TGF- β 受体周转率^[16]. Smurf2 也同 Smad2 相互作用, 介导转录抑制因子 SnoN 的降解, 而 SnoN 具有与 Smad2 相互作用并抑制 TGF- β 信号转导的能力^[17].

与 Smurf2 相似, Smurf1 同 Smad6/7 在细胞核内结合, 然后共同出核被运送到细胞膜上引发 TGF- β I 型受体和 BMP 受体的降解^[18, 19]. 研究发现, Smurf1 蛋白的羧基端区域具有一个细胞核输出信号(nuclear export signal, NES). Smurf1 蛋白可以与出核因子 CRM1 (chromosome maintenance region 1) 相互作用. CRM1 属于 importin- β 相关核转运受体家族, 能够特异性地与细胞核输出信号(NES)结合并介导含有 NES 信号的蛋白质(如 Smurf1)的出核运输. 发生在 Smurf1 蛋白 NES 区域的突变可以阻止 Smurf1/Smad7 复合体的出核运输^[20]. 虽然 Smurf1 和 Smurf2 的有些功能是互相重叠的, 但是 Smurf1 更倾向于介导 BMP 信号蛋白的降解^[6, 11, 20~24]; 而 Smurf2 却倾向于选择性地引发 TGF- β 信号蛋白的降解^[12, 16, 17].

3 E3 泛素连接酶对成骨细胞增殖和分化的调控

3.1 Smurf1 介导成骨细胞中 Smad1 蛋白和转录因子 Runx2 的降解

几年前, 人们就发现 Smurf1 可以在 COS-1 和 293T 细胞系中介导 Smad1 的降解^[11], 最近, 我们检测了成骨细胞中 Smurf1 对 Smad1 降解的介导作用, 发现在成肌/成骨前体细胞 C2C12 细胞系中

Smurf1 可以剂量依赖性地介导 Smad1 的降解. 并且, Smurf1 介导 Smad1 的降解是以一种蛋白酶体依赖性的方式进行的. 我们发现, 催化位点突变了 Smurf1(C710A)对 Smad1 的降解作用明显变弱, 并且蛋白酶体抑制剂可以剂量依赖性地逆转 Smurf1 对 Smad1 的降解作用. 同时, 我们也发现, 许多不同的蛋白酶体抑制剂均可以增强内源性 Smad1 蛋白的水平^[6].

由于转录因子 Runx2 蛋白结构中含有 Smurf1 可识别的 PY 结构, 我们研究了 Smurf1 在 C2C12 和成骨前体细胞系 2T3 中对 Runx2 蛋白降解的介导作用. 我们发现, 在上述细胞系中 Smurf1 可以剂量依赖性地显著降低细胞中原本十分稳定表达的 Runx2 蛋白水平, 并且这种降解现象是蛋白酶体依赖性的. 通过免疫共沉淀实验, 我们证实了 Smurf1 蛋白和 Runx2 蛋白之间的相互作用^[6]. Ducy 等^[25]将 Runx2 特异性结合的增强子序列(OSE2 序列)进行了 6 次重复(6 $\times$ OSE2), 然后连接到骨钙素基因(osteocalcin, OC)基础启动子上游, 克隆到 pGL3 荧光素酶报告基因载体中, 构建成 6 $\times$ OSE2-OC-Luc 荧光素酶检测系统. 共转染 Smurf1 和 Runx2 到 C2C12 细胞中, 将会抑制转录因子 Runx2 激活其报告基因 6 $\times$ OSE2-OC-Luc 的活性. 这说明 Smurf1 可以介导 C2C12 细胞中 Runx2 的降解, 从而降低了 Runx2 的表达水平和功能. 作为对照, 共转染缺乏催化活性的突变型 Smurf1 和正常的 Runx2 基因到 C2C12 细胞中, 突变的 Smurf1 对 Runx2 激活报告基因(荧光素酶)的活性没有明显影响^[6]. 在 Smurf1 转染成骨细胞 OB-6 细胞系的试验中也发现了类似的结果^[26]. 我们最近的实验表明, Smad6 可与 Runx2 结合, 增强 Smurf1 对 Runx2 的降解作用, 同时 Smurf2 和 WWP1 也有类似的作用^[27]. 由于 Runx2 是 BMP 信号通路中的重要分子, 在该通路中 Smad1 蛋白同 Runx2 蛋白结合形成一种复合物, 共同激活下游靶基因的表达^[6, 28]. 可见 Smurf1 诱导 Runx2 降解是细胞对 BMP 信号通路进行负调控的一种手段^[6, 27].

3.2 Smurf1 通过抑制 BMP 信号通路而抑制成骨细胞分化和骨形成

为了确定 Smurf1 对成骨细胞分化的影响, 我们构建了稳定转染 Smurf1 表达质粒的成骨前体细胞 2T3 的亚克隆细胞系(2T3/Smurf1). 我们发现在 2T3/Smurf1 细胞系中, Smad1 和 Runx2 的蛋白质表达水平明显降低^[23]. 接下来, 我们检测了在该细胞

系中 Smurf1 对碱性磷酸酶活性、成骨特异性标志基因的表达和矿化骨节结形成的影响. 我们发现, 与作为对照的 2T3/Vector 单克隆细胞系相比, 2T3/Smurf1 单克隆细胞系的碱性磷酸酶活性下降了 80% 以上. 同时, 在 2T3/Smurf1 单克隆细胞系中几种成骨特异性标志基因如 Osterix、Runx2、I 型胶原和骨钙素(osteocalcin)的表达量显著降低. 为了确定 Smurf1 蛋白对成骨细胞终末分化的影响, 我们在 2T3 细胞中检测了 Smurf1 对矿化骨节结形成的作用, 发现过表达 Smurf1 可以显著抑制矿化骨节结的形成^[23]. 与这些结果相一致的是, 瞬时转染突变的 Smurf1 表达质粒到 C2C12 细胞中可以增强其基础和经 BMP-2 诱导的碱性磷酸酶活性, 并增强该细胞系骨钙素的表达^[6].

Smurf1 首先被发现能够特异性地诱导 TGF- β I 型受体的降解^[18], 为了进一步证实 Smurf1 是否仅对 TGF- β 信号通路具有抑制作用, 我们将 Smad1 特异性结合的增强子序列 (SBE 序列) 进行了 12 次重复 (12 $\times$ SBE), 然后连接到骨钙素基因 (osteocalcin, OC) 基础启动子上游, 并克隆到 pGL3 荧光素酶报告基因载体中, 构建成 12 $\times$ SBE-OC-Luc 荧光素酶检测系统. Smad1 分别转染 BMP 信号通路报道基因质粒 12 $\times$ SBE-OC-Luc^[6] 和 TGF- β 信号通路报道基因质粒 p3TP-Lux^[29] 到 2T3/vector 和 2T3/Smurf1 稳定转染细胞系中, 并且分别使用 BMP 和 TGF- β 处理细胞. 在 2T3/Smurf1 细胞系中, 最终证实 BMP 信号通路被显著抑制, 相反地, TGF- β 信号通路并未受影响. 这个结果表明 Smurf1 特异性地抑制成骨前体细胞中 BMP 信号通路的转导. 转染 Smad6 基因到 2T3/Smurf1 细胞系中可以进一步抑制 BMP 信号通路, 这表明 Smad6 和 Smurf1 对 BMP 信号通路的抑制是通过各自独立的途径进行的^[23].

Ying 等^[22]最近报道, 在小鼠成肌/成骨前体细胞系 (C2C12) 中增加 Smurf1 的表达量会促进 C2C12 细胞向成肌方向分化, 并阻断 BMP 诱导的成骨分化, 但是对 TGF- β 诱导的分化抑制作用没有影响. 另一方面, 通过 RNA 干扰技术沉默 C2C12 细胞内源性的 Smurf1 可以促使该细胞系向成骨方向分化. 此外, 我们最新的研究表明, 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 可以诱导成骨前体细胞 2T3 和 C2C12 中 Smurf1 和 Smurf2 的表达并诱发 Runx2 蛋白的降解从而抑制骨形成. 同时, 特异性沉默 Smurf1 和 Smurf2 可以阻止 TNF 发挥其诱导 Runx2

进行降解的功能^[30]. 综上所述, 这些结果表明, 在成骨细胞中 Smurf1 倾向于影响 BMP 信号通路. 在对果蝇的研究中, 这个推断进一步地被证实. 在果蝇试验中, dSmurf 的突变导致了 dpp (一种果蝇特有的与哺乳动物 BMP2/4 同源的基因) 下游基因表达水平的升高^[21]. 为了进一步阐明 Smurf1 是否在生物体内的骨形成过程中起着至关重要的作用, 我们建立了转基因小鼠系. 我们使用鼠的 2.3 kb I 型胶原启动子将带 Flag 标记的 Smurf1 基因 (Col1a1-Smurf1) 定位到小鼠成骨细胞中进行表达^[23]. 该 Col1a1-Smurf1 转基因鼠系小梁骨容量、骨形成率和成骨细胞的数量都明显下降, 并且该鼠系成骨细胞的增殖和分化都被明显抑制. 这表明 Smurf1 转基因小鼠骨形成的缺陷主要是由于其成骨细胞增殖和分化水平的降低而造成的^[23]. 与这些结果一致, 最近的研究证实 Smurf1 基因敲除小鼠的骨形成明显增强, 其骨矿质密度、小梁骨容量和骨形成率都明显升高^[31]. 最近发现的蛋白酶体抑制剂在体外和在体试验中, 均能刺激骨形成的事实进一步阐明了泛素-蛋白酶体通路在骨细胞分化和骨形成过程中具有重要的调节作用^[32].

4 E3 泛素连接酶对软骨细胞增殖和分化的调控

4.1 TGF- β /BMP 超家族信号通路在软骨发生和发育过程中的作用

与成骨细胞相似, 软骨细胞的成熟和分化的进程起始于软骨祖细胞. 转录因子 Sox-9 的表达和 II 型胶原 (Col2) 水平的持续上调引发软骨祖细胞向软骨细胞方向分化^[33]. 随后, 其他软骨特异性基因如 VI、IX 和 XI 型胶原开始表达^[34]. 随着细胞增殖速度加快和增殖标志性基因, 如 X 型胶原、碱性磷酸酶^[35]、indian hedgehog (Ihh)^[36] 以及 BMP-6^[37] 等表达水平的明显上调, 参与软骨内骨化的软骨细胞逐渐成熟. 分化末期的细胞产生基质囊泡并且最终进入细胞凋亡进程. 相比较而言, 正常情况下不进行软骨内骨化的关节软骨细胞并不表达这些增殖标志性基因. 但是, 它们却持续地表达 II、VI、IX 和 XI 型胶原以及蛋白聚糖 (aggrecan) 基因^[38]. 虽然这些细胞没有显著增殖, 但是通过胶原和蛋白多糖的周转率就可以看出它们的新陈代谢十分活跃.

软骨细胞成熟的过程受几个关键性的生长因子及其相应的信号通路调节. 其中, 最重要并已被广泛研究的信号通路分子就是前面提到的 TGF- β 因

子超家族, 包括 TGF- β s 和 BMPs. 就软骨细胞对这些因子的反应来看, BMPs 是已知最有效的刺激软骨发生和软骨细胞成熟的因子^[38]. 相反地, 虽然 TGF- β s 也可以刺激软骨发育, 但是它们同时还能够有效地抑制软骨细胞向终末成熟阶段分化^[39]. 这种抑制软骨细胞成熟的作用对维持关节软骨细胞的表型十分重要, 同时也对促使未进入终末成熟阶段的软骨细胞在生长板处大量增殖起着关键作用. 为了确定 TGF- β 在软骨细胞中的作用, Serra 等^[39]构建了过表达功能缺陷型(dominant-negative)TGF- β II 型受体的小鼠动物模型, 这种小鼠表现出骨性关节炎(OA)样软骨侵蚀、关节软骨细胞成熟化(即软骨内骨化)和由于生长板软骨细胞肥大而导致的增生区过于狭窄等表型. 敲除了 Smad3 基因从而抑制 TGF- β 信号通路的小鼠动物模型也表现出这些表型^[40]. 分析上述表型的形成很可能是由于其软骨细胞缺乏对其自身成熟的抑制作用, 而这种抑制作用是由 TGF- β 信号通路来维系的. 当这种抑制作用消失后, 不适宜的关节软骨细胞的成熟就会发生, 并且软骨的退化也随之而来. 基于上述实验, 我们得出结论, 由于软骨细胞成熟抑制因子的缺失而引发关节软骨细胞肥大是导致骨性关节炎病症形成的重要机制. 此外, TGF- β 通路信号的消失会导致生长板处软骨细胞的加速成熟, 从而导致动物体生长和骨形成表型的出现. 可见, TGF- β /BMP 超家族信号通路在软骨发生和发育的生物过程中是极其重要的.

4.2 Smurf1 和 Smurf2 通过抑制 TGF- β /BMP 信号通路抑制软骨细胞的成熟和分化

已证实 Smurf1 通过介导降解 Smad1/5 来抑制 BMP 信号通路, 据此推断软骨细胞中 Smurf1 的过表达会抑制软骨细胞的成熟并延迟或是减弱软骨内骨的形成. 为了验证这个推断, Horiki 等^[41]建立了由软骨特异性基因 XI 型胶原(Col-XI)启动子进行组织定位的过表达 Smurf1 蛋白的转基因小鼠系. 有趣的是, Col-XI-Smurf1 小鼠没有显示明显的相关表型特征, 其中一部分原因可能是与已经被用来构建众多的转基因小鼠模型 II 型胶原的启动子相比, XI 型胶原基因启动子活性不如前者高^[41]. 当该转基因小鼠与 Col-XI-Smad6 小鼠杂交后, 其后代小鼠生长板表现出明显的软骨细胞成熟的延迟, 其表型为生长板增生区的消失和小梁骨变细^[41]. 这种表型的严重程度超过了单纯的 Col-XI-Smad6 小鼠, 这说明 Smad6 和 Smurf1 可协同抑制 BMP 信号通路的

转导, 并且当这两种抑制机制同时作用时将会造成对该通路更彻底的阻断. 这些发现是到目前为止确定 Smurf1 在软骨中功能的唯一证据. 进一步的研究将侧重于缺失和过表达 Smurf1 蛋白的体内和体外实验上, 这样便于我们更好地探究该基因在软骨中的功能.

基于 Smurf2 特异性降解 Smad2、TGF- β 受体和 Smad1 的作用, 我们推测 Smurf2 介导了对 TGF- β 和 BMP 信号通路的抑制作用. Smurf2 的这种双重功能使得我们难于确定其在软骨细胞中扮演的角色, 而以上的研究表明 Smurf2 在软骨细胞中的主要靶点可能是 TGF- β /Smad2 信号通路. Smurf2 基因在关节软骨细胞中的过表达不仅显著阻断了 TGF- β 信号通路, 而且诱导其向骨质增生表型发展. X 型胶原 mRNA 水平和碱性磷酸酶水平的升高标志着这些细胞的成熟. 这些体外实验的发现表明, Smurf2 可显著阻断 TGF- β 信号通路的转导, 并诱发或促使软骨细胞成熟. 为了进一步验证这个推断, 我们构建了由 II 型胶原的启动子进行组织特异性定位在软骨中过表达 Smurf2 的转基因小鼠系. 我们的研究发现, 这些小鼠的关节软骨细胞在较早的时间点(2 到 5 个月)表现出进行性增生, 在 7 个月时表现出进行性侵蚀、纤维化和开裂. 同时, 7 个月时小鼠出现骨赘, 这是小鼠骨性关节炎的表型. 我们在对该小鼠系的研究中还发现, 磷酸化的 Smad3 被 Smurf2 诱导降解是导致其软骨的不正常成熟和造成小鼠骨性关节炎表型的原因, 而 Smurf2 对 Smad1 和 Smad2 的降解并没有影响. 此外, 在对来自该动物模型的新生小鼠胸骨细胞进行的体外实验中, 过表达的 Smurf2 使得该细胞系 TGF- β 信号通路被明显抑制, 但是 BMP 信号通路却没有受到影响. 进一步研究 Smurf2 基因缺失的动物模型将会确定 Smurf2 对关节软骨或生长板软骨细胞所起的重要作用.

5 总 结

Smurf1 和 Smurf2 作为两个在 BMP 和 TGF- β 信号转导通路中起着重要作用的蛋白质, 最近被鉴定为 E3 泛素连接酶的成员. 我们最新的研究首次证实了 Smurf1 可以介导骨特异性转录因子 Runx2 的降解, 并且能够在体外和在体水平上调控骨形成过程. 同时, 我们首次发现 Smurf2 是在关节软骨细胞中起关键调节作用的蛋白质. Smurf1 可能倾向于针对成骨细胞中的 BMP 信号通路发挥作用, 而

Smurf2则更倾向于调控关节软骨细胞中 TGF- β 信号通路的转导. 这些发现表明, 泛素 - 蛋白酶体调

控机制在成骨细胞和软骨细胞的生理进程中起着至关重要的作用 (图 3).

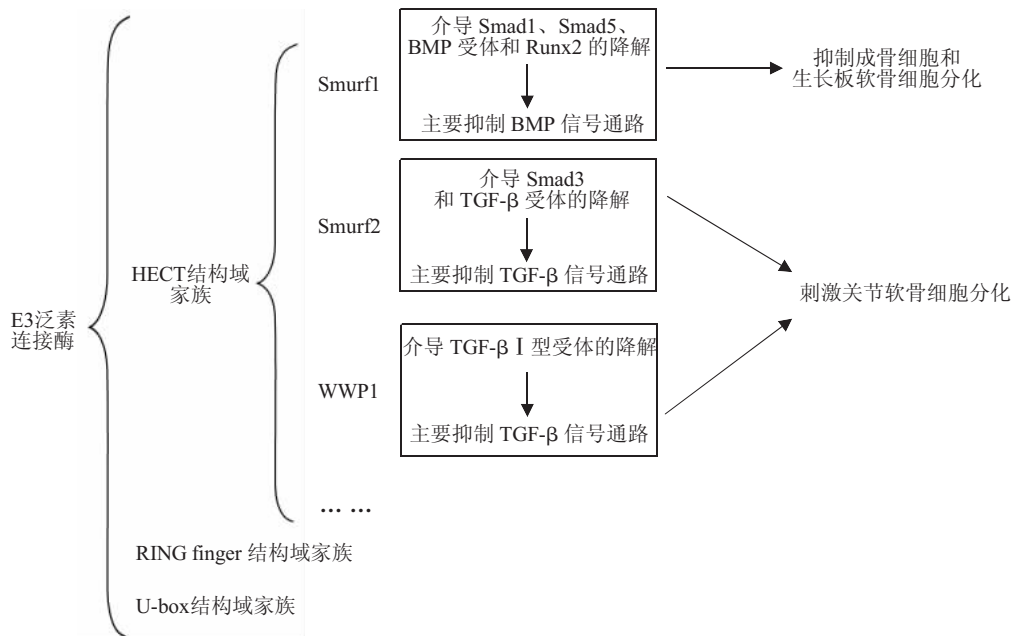


Fig. 3 E3 ligases mediate the proliferation and differentiation of osteoblasts and chondrocytes through BMP and TGF- β signalings

图 3 E3 泛素连接酶通过 BMP 和 TGF- β 信号通路调控成骨细胞和软骨细胞的增殖和分化

参 考 文 献

- Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. Clin Orthop, 1998, (346): 26~37
- Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. Cell, 2003, **113** (6): 685~700
- Chen D, Ji X, Harris M A, *et al.* Differential roles for BMP receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. J Cell Biol, 1998, **142** (1): 295~305
- Macias-Silva M, Abdollah S, Hoodless P A, *et al.* MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. Cell, 1996, **87** (7): 1215~1224
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, *et al.* Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell, 1997, **89** (5): 747~754
- Zhao M, Qiao M, Oyajobi B, *et al.* E3 ubiquitin ligase Smurf1 mediates core-binding factor α 1/Runx2 degradation and plays a specific role in osteoblast differentiation. J Biol Chem, 2003, **278** (30): 27939~27944
- Alliston T, Choy L, Ducy P, *et al.* TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. EMBO J, 2001, **20** (9): 2254~2272
- Weissman A M. Themes and variations on ubiquitylation. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, **2** (3): 169~178
- Hershko A. Ubiquitin: roles in protein modification and breakdown. Cell, 1983, **34** (1): 11~12
- Ciechanover A, Orian A, Schwartz A L. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. J Cell Biochem, 2000, **77** (S34): 40~51
- Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, *et al.* SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. Nature, 1999, **400** (6745): 687~693
- Lin X, Liang M, Feng X. Smurf2 is an ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling. J Biol Chem, 2000, **275** (47): 36818~36822
- Zhang Y, Chang C, Gehling D J, *et al.* Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, **98** (3): 974~979
- Komuro A, Imamura T, Saitoh M, *et al.* Negative regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by WW domain-containing protein 1 (WWP1). Oncogene, 2004, **23** (41): 6914~6923
- Lo R S, Massagué J. Ubiquitin-dependent degradation of TGF-beta-activated Smad2. Nat Cell Biol, 1999, **1** (8): 472~478
- Kavsak P, Rasmussen R K, Causing C G, *et al.* Smad7 binds to

- Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF- β receptor for degradation. *Mol Cell*, 2000, **6** (6): 1365~1375
- 17 Bonni S, Wang H, Causing C G, *et al.* TGF- β induces assembly of a Smad2-Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation. *Nat Cell Biol*, 2001, **3** (6): 587~595
- 18 Suzuki C, Murakami G, Fukuchi M, *et al.* Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J Biol Chem*, 2002, **277** (42): 39919~39925
- 19 Tajima Y, Goto K, Yoshida M, *et al.* Chromosomal region maintenance 1 (CRM1)-dependent nuclear export of Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1) is essential for negative regulation of transforming growth factor-beta signaling by Smad7. *J Biol Chem*, 2003, **278** (12): 10716~10721
- 20 Murakami G, Watabe T, Takaoka K, *et al.* Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell*, 2003, **14** (7): 2809~2817
- 21 Podos S D, Hanson K K, Wang Y C, *et al.* The dSmurf ubiquitin-protein ligase restricts BMP signaling spatially and temporally during drosophila embryogenesis. *Dev Cell*, 2001, **1** (4): 567~578
- 22 Ying S X, Hussain Z J, Zhang Y E. Smurf1 facilitates myogenic differentiation and antagonizes the bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast conversion by targeting Smad5 for degradation. *J Biol Chem*, 2003, **278** (40): 39029~39036
- 23 Zhao M, Qiao M, Harris S E, *et al.* Smurf1 inhibits osteoblast differentiation and bone formation *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem*, 2004, **279** (13): 12854~12859
- 24 Shi W, Chen H, Sun J, *et al.* Overexpression of Smurf1 negatively regulates mouse embryonic lung branching morphogenesis by specifically reducing Smad1 and Smad5 proteins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, **286** (2): L293~300
- 25 Ducy P, Karsenty G. Two distinct osteoblast-specific *cis*-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Mol Cell Biol*, 1995, **15** (4): 1858~1869
- 26 Bellido T, Ali A A, Plotkin L I, *et al.* Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts: a putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism. *J Biol Chem*, 2003, **278** (50): 50259~50272
- 27 Shen R, Chen M, Wang Y, *et al.* Smad6 interacts with Runx2 and mediates Smad ubiquitin regulatory factor I -induced Runx2 degradation. *J Biol Chem*, 2006, **281** (6): 3569~3576
- 28 Chikazu D, Li X, Kawaguchi H, *et al.* Bone morphogenetic protein 2 induces cyclo-oxygenase 2 in osteoblasts *via* a Cbfa1 binding site: role in effects of bone morphogenetic protein 2 *in vitro* and *in vivo*. *J Bone Miner Res*, 2002, **17** (8): 1430~1440
- 29 Carcamo J, Zentella A, Massague J. Disruption of transforming growth factor beta signaling by a mutation that prevents transphosphorylation within the receptor complex. *Mol Cell Biol*, 1995, **15** (3): 1573~1581
- 30 Kaneki H, Gao R, Chen D, *et al.* Tumor necrosis factor promotes Runx2 degradation through up-regulation of Smurf1 and Smurf2 in osteoblasts. *J Biol Chem*, 2006, **281** (7): 4326~4333
- 31 Yamashita M, Ying S X, Zhang G M, *et al.* Ubiquitin ligase Smurf1 controls osteoblast activity and bone homeostasis by targeting MEKK2 for degradation. *Cell*, **121** (1): 101~113
- 32 Garrett I R, Chen D, Gutierrez G, *et al.* Selective inhibitors of the osteoblast proteasome stimulate bone formation *in vivo* and *in vitro*. *J Clin Invest*, 2003, **111** (11): 1771~1782
- 33 Lefebvre V, Huang W, Harley V R, *et al.* SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro $\alpha 1$ (II) collagen gene. *Mol Cell Biol*, 1997, **17** (4): 2336~2346
- 34 Mundlos S, Olsen B R. Heritable diseases of the skeleton. Part I: Molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways. *FASEB J*, 1997, **11** (2): 125~132
- 35 Buckwalter J A, Mankin H J. Articular cartilage. *J Bone Joint Surg*, 1997, **79A**: 600~632
- 36 Grimsrud C D, Romano P R, D'Souza M, *et al.* BMP signaling stimulates chondrocyte maturation and the expression of Indian hedgehog. *J Orthop Res*, 2001, **19** (1): 18~25
- 37 Carey D E, Liu X. Expression of bone morphogenetic protein-6 messenger RNA in bovine growth plate chondrocytes of different size. *J Bone Miner Res*, 1995, **10** (3): 401~405
- 38 Zhang X, Ziran N, Goater J J, *et al.* Primary murine limb bud mesenchymal cells in long term culture complete chondrocyte differentiation: TGF-beta delays hypertrophy and PGE2 inhibits terminal differentiation. *Bone*, 2004, **34** (5): 809~817
- 39 Serra R, Johnson M, Filvaroff E H, *et al.* Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J Cell Biol*, 1997, **139** (2): 541~552
- 40 Yang X, Chen L, Xu X, *et al.* TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J Cell Biol*, 2001, **153** (1): 35~46
- 41 Horiki M, Imamura T, Okamoto M, *et al.* Smad6/Smurf1 overexpression in cartilage delays chondrocyte hypertrophy and causes dwarfism with osteopenia. *J Cell Biol*, 2004, **165** (3): 433~445

The Role of E3 Ubiquitin Ligase Smurfs in BMP and TGF- β Signaling in Bone Cells*

Wang Qing¹⁾, Zhu Tian-Hui¹⁾, Zhang Ming¹⁾, Chen Di^{1,2)}**

¹⁾Laboratory of Molecular Medicine, Medical College, Nankai University, Tianjin 300071, China;

²⁾University of Rochester Medical Center, Center for Musculoskeletal Research, Department of Orthopaedics, NY 14642, USA)

Abstract The ubiquitin-proteasome system is composed by multiple enzymes which are ubiquitously expressed in mammalian cells and plays an essential role in a variety of biological processes. As key members of the protein degradation enzymatic system, the function of E3 ubiquitin ligases has been extensively investigated. BMP and TGF- β are critical molecules that regulate proliferation, differentiation and apoptosis of osteoblasts and chondrocytes through different signaling pathways. Recent findings indicate that the ubiquitin-proteasome system functions as a key regulator in bone cells and the E3 ligase mediates the proteolytic degradation of critical molecules in BMP and TGF- β signaling pathways. Recent progress on studies of HECT domain E3 ligase, Smurf, in osteoblasts and chondrocytes were summarized. The regulatory role of Smurf1 and Smurf2 in BMP and TGF- β signaling and osteoblast and chondrocyte function has been reviewed.

Key words ubiquitin-proteasome system, E3 ubiquitin ligase, Smurf, bone morphogenetic proteins (BMPs), transforming growth factor- β (TGF- β), osteoblast, chondrocyte

*This work was supported by a grant from The Natural Sciences Foundation of Tianjin City (05YFJMJC01800).

**Corresponding author . Tel: 001-585-273-5631, Fax: 001-585-275-1121, E-mail: di_chen@urmc.rochester.edu

Received: November 8, 2005 Accepted: December 30, 2005