

SUMO 化信号途径对 JNK 信号通路活性的调控*

黄 海^{1,2)} 朱南南^{1,2)} 焦仁杰^{1)**}

(¹⁾ 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; ²⁾ 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 c-Jun 氨基末端激酶(the c-Jun N-terminal kinase, JNK)家族是促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)超家族成员之一. JNK 信号通路对细胞生长、分化和凋亡等生物学活动都有重要作用. 而 SUMO 化是一种重要的生物学修饰, 可以调节多种细胞生理活动. 最近, 黄海等在 *Development* 发表文章首次将 SUMO 化途径与 JNK 信号通路通过 Hipk 激酶联系起来, 为进一步研究 SUMO 化的功能及其对 JNK 通路的调节建立了一个新的模型.

关键词 JNK 通路, SUMO 化, Hipk

学科分类号 Q25

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00254

c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK) 家族是促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)超家族的成员之一, 在 1990 年被发现, 它是分子质量为 54 ku 的丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶^[1]. JNK 信号通路参与多种生理过程的调节, 如细胞增殖、组织分化、细胞迁移以及细胞凋亡等^[2-9]. 研究发现, JNK 通路功能失调与心脏肥大、糖尿病、神经退行性疾病、慢性炎症性疾病、代谢综合症及多种人类肿瘤的发生、发展密切相关^[10-21]. 因此, JNK 信号通路是调节疾病状态细胞恢复正常的潜在靶点. SUMO 化是一种重要的生物学修饰, 可以调节多种细胞生理活动. 最近, Huang(黄海)等^[2]在 *Development* 发表文章第一次将 SUMO 化途径与 JNK 信号通路通过 Hipk 激酶联系起来, 为进一步研究 SUMO 化的功能及其对 JNK 通路的调节建立了一个新的模型.

1 JNK 信号途径成员

JNK 信号通路在进化上高度保守, 哺乳动物中 JNK 信号通路主要成员均在黑腹果蝇中被发现(图 1). JNK 信号通路可以被细胞外多种信号激活, 如各种细胞因子(肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、白介素 1(interleukin 1, IL-1))及各种应激(电离辐射、氧化压力、热休克等)^[7,22-23]. 细

胞表面的受体接受配体信号刺激, 并将信号传递至细胞内, 启动一系列级联放大的酶促反应, 即 JNKKK 到 JNKK 再到 JNK^[23-26]. JNK 信号活性的调节不仅受到其主要成员的直接调节(如 JNKKKK-JNK, 图 1), 还有一些激酶可以对 JNK 活性进行调节, 如 MEKK、MLKS (mixed lineage kinases)和本文将要提到的 Hipk (homeodomain-interacting protein kinases)等.

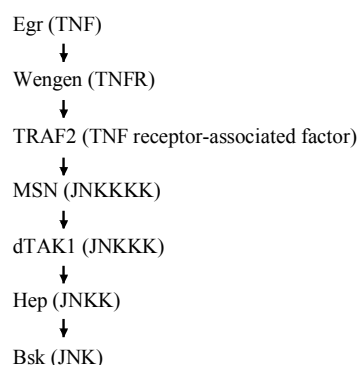


Fig. 1 Diagram showing the major relay path and main components of JNK signaling

图 1 JNK 信号通路示意图及核心成员

* 国家自然科学基金(31071087)和国家重点基础研究发展计划(973)(2009CB918702)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-64867568, E-mail: rjiao@ibp.ac.cn

收稿日期: 2011-06-08, 接受日期: 2011-06-09

2 SUMO 化过程及功能

SUMO (small ubiquitin-related modifier)是近年来被发现的数种与泛素(ubiquitin)相类似的一种多肽分子. 与泛素化的过程类似, SUMO 分子与靶蛋白上特定的赖氨酸残基形成共价键, 从而修饰靶蛋白, 这个过程称为 SUMO 化(sumoylation). 这一可逆的共价修饰反应由一系列的酶催化完成: 首先, E1 酶(SAE (SUMO-activating enzyme) 1/SAE2)激活 SUMO 分子, 然后, E2 连接酶 Ubc9 (ubiquitin-conjugating enzyme 9)与活化的 SUMO 分子结合, 最终, 在 E3 酶的协助下, SUMO 分子与底物蛋白结合^[27]. SUMO 化修饰是一个可逆的过程, 共价结合的 SUMO 分子可以被 SUMO 蛋白酶(SUMO protease)去除(图 2).

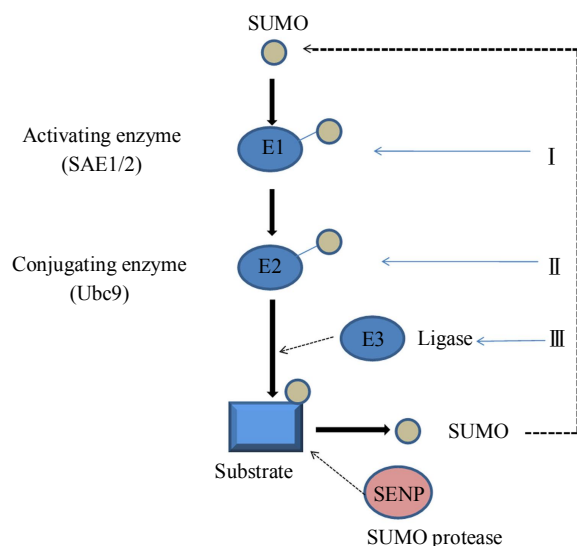


Fig. 2 Diagram showing the three major steps of sumoylation pathway
图 2 SUMO 化途径示意图

SUMO 化参与多种细胞生命活动. 主要功能包括: a. 影响蛋白质间的相互作用; b. 改变蛋白质的亚细胞定位; c. 增加蛋白质的稳定性; d. 影响细胞分裂; e. 对转录的调控; f. 调节 DNA 修复等等^[28-32].

3 SUMO 化途径活性下调造成 JNK 信号活性的上调

用果蝇研究 JNK 信号通路有许多独到的优势,

JNK 信号活性的上调能够造成一系列特征性表型, 诸如果蝇复眼出现粗糙和融合, 背部发生内陷, 小盾板缺失以及翅膀缩小等等^[25,33-34]. 这些易于观察的表型为我们进行遗传筛选实验提供了有力的工具. 我们发现了 SUMO 化信号(Smt3)活性的下降(通过敲低 SUMO 分子实现)会导致类似 JNK 通路上调的表型(图 3). 为了在分子水平证明这一结果, 我们利用 JNK 通路下游的靶基因的表达状况检测 JNK 信号活性. 我们选取了 *puckered(puc)*和 *Matrix metalloproteinase 1(MMP1)*这两个 JNK 下游的特征靶基因^[35-39]. 结果显示, GFP 标记区域(即 SUMO 分子被敲低区域)与对照区域(GFP 阴性区域)对比, 这两个靶基因的表达量显著提高, 说明 JNK 信号活性在 SUMO 敲低的情况下明显上升(图 4).

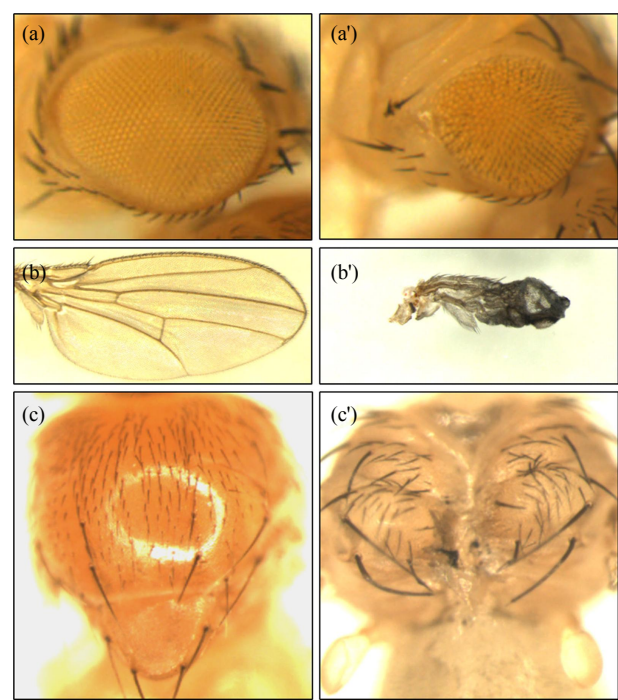


Fig. 3 Sumoylation pathway perturbation leads to various developmental defects in adult flies
图 3 SUMO 化活性敲低果蝇呈现出各种发育缺陷
利用 *ey-Gal4* 和 *A9-Gal4* 分别在果蝇眼睛和翅膀中敲低 Smt3 造成对应组织的减小如图中(a')和(b')所示. (a)、(b)和(c)是 *Gal4* 对照品系. *pnr-Gal4* 在在果蝇背部和小盾板区域敲低 Smt3 造成小盾板的缺失以及背部出现内陷如图中(c')所示.

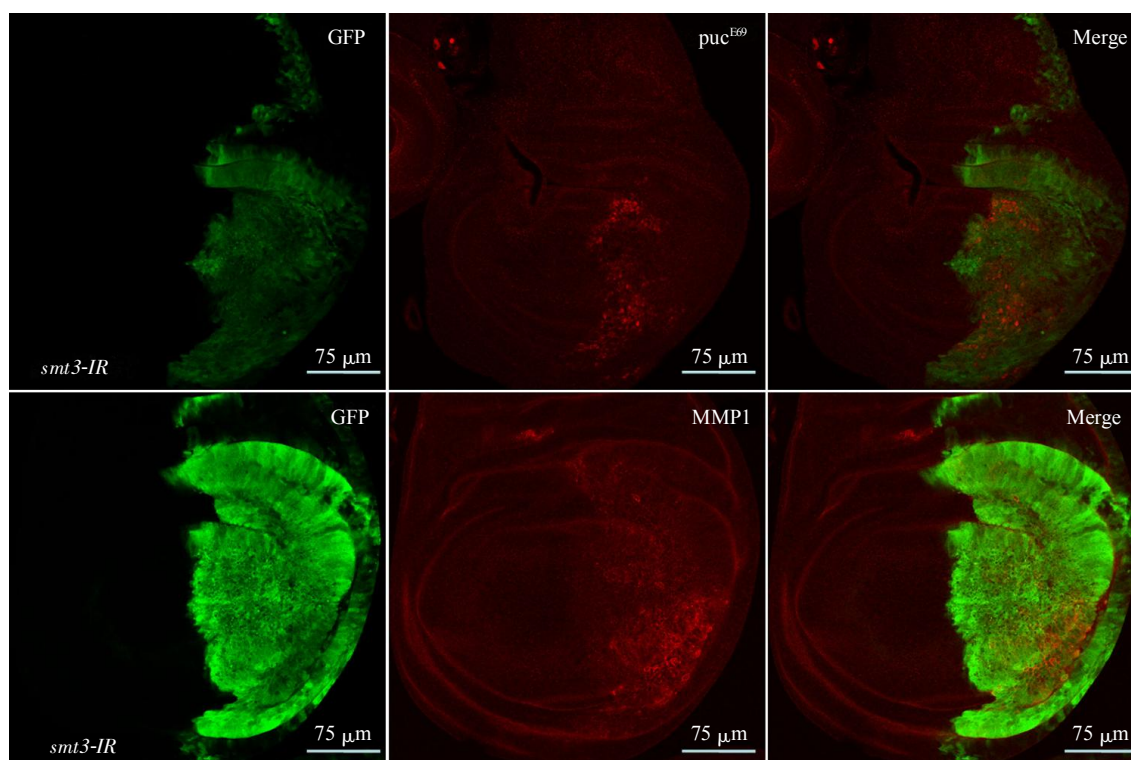


Fig. 4 Smt3 depletion promotes JNK activity^[2]

图4 SUMO化活性降低上调JNK活性^[2]

果蝇翅膀成虫盘分别用 lacZ 抗体和 MMP1 抗体进行抗体染色(红色荧光所示)。GFP 标记 *en-Gal4* 表达的区域。上排果蝇基因型为 *en-Gal4/+; UAS-smt3-IR/puc^{E69}*, 下排果蝇基因型为 *en-Gal4/+; UAS-smt3-IR/+*。

4 SUMO 化途径通过 Hipk 蛋白调节 JNK 信号通路

接下来的问题是, SUMO 化途径调控 JNK 通路的效应分子是什么? 我们利用 SUMO 分子敲低造成 JNK 活性上调的表型进行遗传筛选。果蝇中的 RNAi 品系为筛选提供了丰富的资源。我们通过寻找 *A9>smt3-IR* 的遗传抑制因子, 发现了 Hipk 的敲低能够挽回 *A9>smt3-IR* 果蝇翅膀的缺陷(图 5a)。为了进一步确定 Hipk 是 Smt3 调节 JNK 活性的作用因子, 我们用细胞凋亡和 MMP1 的量来显示 JNK 的活性。结果表明敲低 Hipk 能够抑制 Smt3 敲低引起的 JNK 活性上调(图 5b, c), 说明了 SUMO 化信号途径是通过 Hipk 激酶调节 JNK 信号通路的活性。

5 Hipk 在 JNK 信号通路中的位置

为了将 Hipk 激酶准确地定位在 JNK 信号通路

中, 我们利用遗传上位实验确定 Hipk 与 JNK 信号通路中主要成员的上下游关系。在 *pnr>hipk* 果蝇中, 由于 Hipk 蛋白的过量表达, 会在果蝇的背部和小盾板造成缺陷, 也是典型的 JNK 信号途径上调的表型(图 6a)。Hipk 过量表达的表型可以被 JNK(Bsk)敲低所挽回, 但不能被 JNKKK(dTAK1)敲低挽回, 说明 Hipk 处于 JNKKK 与 JNK 之间。我们在另一个模型中对这一结果进行验证。SUMO 途径活性降低可以通过 Hipk 激活 JNK 信号活性, 因而可以遗传定位 SUMO 途径在 JNK 信号通路中的位置, 从而确定 Hipk 在 JNK 通路中的位置。我们利用 *A9>smt3-IR* 果蝇小翅膀的表型进行遗传上位实验, 结果显示 JNKKK(dTAK1)与 JNKK(Hep)均无法挽回小翅膀表型, 而 JNK(Bsk)可以有效挽回果蝇翅膀的缺陷(图 6b, c)。以上遗传学实验说明 Hipk 在 JNK 信号通路中位于 JNK 位置发挥作用, 而不是通过 JNKK 或 JNKKK 起作用。通过检

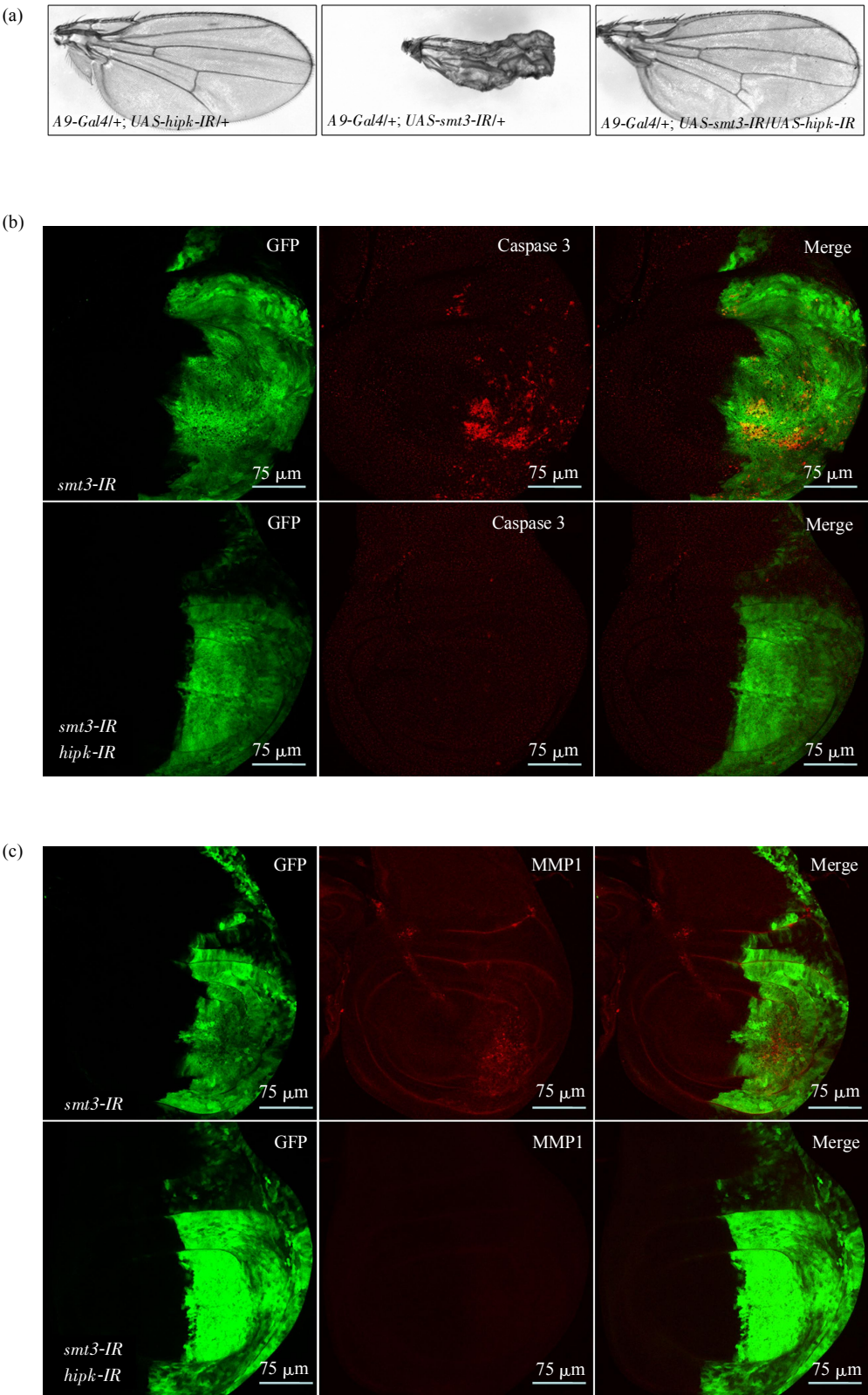


Fig. 5 Smt3-depletion-induced JNK activation is dependent on Hipk^[2]

图 5 Hipk 激酶是 SUMO 化途径激活 JNK 信号通路的效应子^[2]

(a) Hipk 敲低挽回 *A9>smt3-IR* 造成的小翅膀表型; (b) Hipk 的降低能够抑制 Smt3 缺失引起的凋亡; (c) 敲低 Hipk 能够挽回 Smt3 造成的 JNK 活性上调.

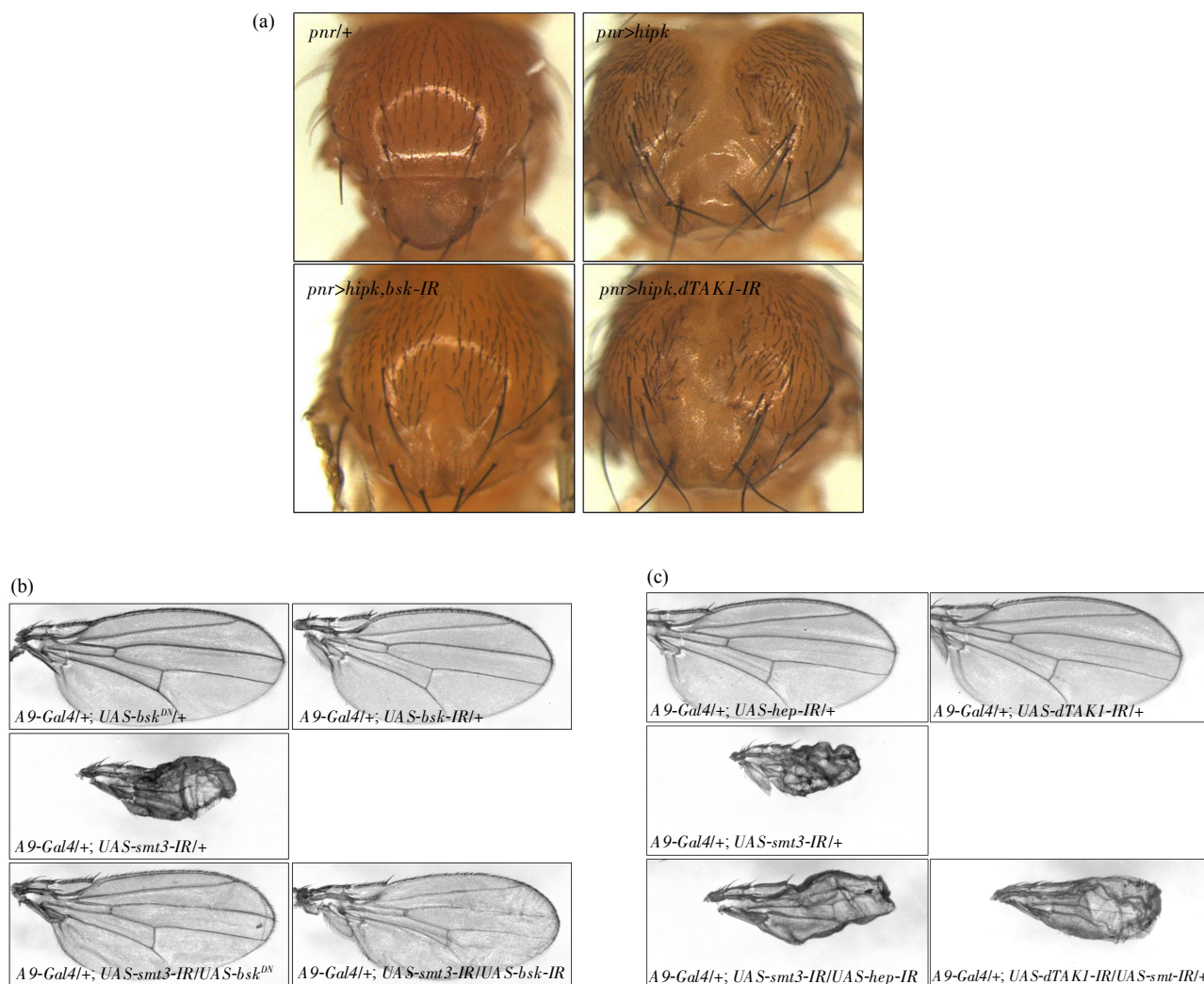


Fig. 6 Hipk regulates JNK signaling hierarchy at the position of JNK^[2]

图6 Hipk 于 JNK 附近对 JNK 信号通路实施调控^[2]

(a) *pnr>hipk* 果蝇背部缺陷(右上图)可以被 JNK 敲低部分挽回(左下图), 但不能被 JNKKK 敲低挽回(右下图). (b) JNK 敲低能够挽回 Smt3 敲低引起的果蝇翅膀缺陷. (c) JNKK 和 JNKKK 不能挽回 Smt3 敲低引起的果蝇翅膀缺陷.

测 Hipk 在细胞质和细胞核中的分布, 我们发现 SUMO 化途径影响 Hipk 激酶的亚细胞定位, 即在 SUMO 缺乏的情况下, Hipk 从细胞核转移到细胞质内激活 JNK 的活性^[2].

6 展 望

至此, 亟待回答的重要问题如下: a. 去 SUMO 化的 Hipk 直接磷酸化 JNK 吗? 如果是, 那在什么情况下? 是如何被调节的? b. 果蝇细胞中存在去 SUMO 化的酶吗? 如果有, 那是如何调节的? 等等.

细胞自身是如何调节 Hipk 的核 - 质转运的呢? 一种可能性是: 在某些特定信号刺激下, 如肿瘤坏死因子(TNF)的存在, 能够导致细胞核内的 Hipk 发生去 SUMO 化, 从而转运到细胞质中, 激活 JNK 信号途径. 目前, 在果蝇中尚未鉴定出去 SUMO 化蛋白酶, 我们正在利用遗传筛选的方法寻找. 我们的工作显示了 SUMO 化信号途径能够调节 JNK 信号通路的活性, 反过来 JNK 信号的活性是否也影响 SUMO 化途径的活性尚不清楚. SUMO 化信号通路和 JNK 信号通路可能存在相互调节的机制.

参 考 文 献

- [1] Kyriakis J M, Avruch J. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem*, 1990, **265**(28): 17355-17363
- [2] Huang H, Du G, Chen H, Liang X, Li C, *et al.* Drosophila Smt3 negatively regulates JNK signaling through sequestering Hipk in the nucleus. *Development*, 2011, **138**(12): 2477-2485
- [3] Ichijo H. From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene*, 1999, **18**(45): 6087-6093
- [4] Kanda H, Miura M. Regulatory roles of JNK in programmed cell death. *J Biochem*, 2004, **136**(1): 1-6
- [5] Lin A. Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays*, 2003, **25**(1): 17-24
- [6] Liu Z G, Hsu H, Goeddel D V, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*, 1996, **87**(3): 565-576
- [7] Moreno E, Yan M, Basler K. Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the Drosophila homolog of the TNF superfamily. *Curr Biol*, 2002, **12**(14): 1263-1268
- [8] Ventura J J, Hubner A, Zhang C, Flavell R A, Shokat K M, *et al.* Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell*, 2006, **21**(5): 701-710
- [9] Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg M E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 1995, **270**(5240): 1326-1331
- [10] Ferrandi C, Ballerio R, Gaillard P, Giachetti C, Carboni S, *et al.* Inhibition of c-Jun N-terminal kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and infarct size after myocardial ischemia and reperfusion in anesthetized rats. *Br J Pharmacol*, 2004, **142**(6): 953-960
- [11] Heasley L E, Han S Y. JNK regulation of oncogenesis. *Mol Cells*, 2006, **21**(2): 167-173
- [12] Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell*, 2006, **124**: 823-835
- [13] Nateri A S, Spencer-Dene B, Behrens A. Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development. *Nature*, 2005, **437**(7056): 281-285
- [14] Slevin M, Elsbali A B, Miguel Turu M, Krupinski J, Badimon L, *et al.* Identification of differential protein expression associated with development of unstable human carotid plaques. *Am J Pathol*, 2006, **168**(3): 1004-1021
- [15] Smith WW, Gorospe M, Kusiak J W. Signaling mechanisms underlying Abeta toxicity: potential therapeutic targets for Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2006, **5**(3): 355-361
- [16] Stirling J, Binzer J, Andersson A K, Zullig R A, Tonnesen M, *et al.* Nitric oxide contributes to cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells via potentiation of JNK activity and inhibition of Akt. *Diabetologia*, 2005, **48**(10): 2039-2050
- [17] Tuncman G, Hirosumi J, Solinas G, Chang L, Karin M, *et al.* Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(28): 10741-10746
- [18] Uehara T, Bennett B, Sakata S T, Satoh Y, Bilter G K, *et al.* JNK mediates hepatic ischemia reperfusion injury. *J Hepatol*, 2005, **42**(6): 850-859
- [19] Uhlirova M, Jasper H, Bohmann D. Non-cell-autonomous induction of tissue overgrowth by JNK/Ras cooperation in a Drosophila tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(37): 13123-13128
- [20] Wilhelm M, Xu Z, Kukekov N V, Gire S, Greene L A. Proapoptotic Nix activates the JNK pathway by interacting with POSH and mediates death in a Parkinson disease model. *J Biol Chem*, 2007, **282**(2): 1288-1295
- [21] Winn R A, Marek L, Han S Y, Rodriguez K, Rodriguez N, *et al.* Restoration of Wnt-7a expression reverses non-small cell lung cancer cellular transformation through frizzled-9-mediated growth inhibition and promotion of cell differentiation. *J Biol Chem*, 2005, **280**(20): 19625-19634
- [22] Ryoo H D, Gorenc T, Steller H. Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev Cell*, 2004, **7**(4): 491-501
- [23] Xue L, Igaki T, Kuranaga E, Kanda H, Miura M, *et al.* Tumor suppressor CYLD regulates JNK-induced cell death in *Drosophila*. *Dev Cell*, 2007, **13**(3): 446-454
- [24] Stronach B, Perrimon N. Activation of the JNK pathway during dorsal closure in Drosophila requires the mixed lineage kinase, slipper. *Genes Dev*, 2002, **16**(3): 377-387
- [25] Takatsu Y, Nakamura M, Stapleton M, Danos M C, Matsumoto K, *et al.* TAK1 participates in c-Jun N-terminal kinase signaling during *Drosophila* development. *Mol Cell Biol*, 2000, **20**(9): 3015-3026
- [26] Tateno M, Nishida Y, Adachi-Yamada T. Regulation of JNK by Src during Drosophila development. *Science*, 2000, **287**(5451): 324-327
- [27] Geiss-Friedlander R, Melchior F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, **8**(12): 947-956
- [28] Chen H, Qi L. SUMO modification regulates the transcriptional activity of XBP1. *Biochem J*, 2010, **429**(1): 95-102
- [29] Dou H, Huang C, Singh M, Carpenter P B, Yeh ET. Regulation of DNA repair through deSUMOylation and SUMOylation of replication protein A complex. *Mol Cell*, 2010, **39**(3): 333-345
- [30] Heun P. SUMO Organization of the nucleus. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, **19**(3): 350-355
- [31] Lin X, Sun B, Liang M, Liang Y Y, Gast A, *et al.* Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Mol Cell*, 2003, **11**(5): 1389-1396
- [32] Rui H L, Fan E, Zhou H M, Xu Z, Zhang Y, *et al.* SUMO-1 modification of the C-terminal KVEKVD of Axin is required for JNK activation but has no effect on Wnt signaling. *J Biol Chem*, 2002, **277**(45): 42981-42986

- [33] Igaki T, Kanda H, Yamamoto-Goto Y, Kanuka H, Kuranaga E, *et al.* Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO J*, 2002, **21**(12): 3009–3018
- [34] Tiwari A K, Roy J K. Mutation in Rab11 results in abnormal organization of ommatidial cells and activation of JNK signaling in the *Drosophila* eye. *Eur J Cell Biol*, 2009, **88**(8): 445–460
- [35] Agnès F, Suzanne M, Noselli S. The *Drosophila* JNK pathway controls the morphogenesis of imaginal discs during metamorphosis. *Development*, 1999, **126**(23): 5453–5462
- [36] Miotto B, Sagnier T, Berenger H, Bohmann D, Pradel J, *et al.* Chameau HAT and DRpd3 HDAC function as antagonistic cofactors of JNK/AP-1-dependent transcription during *Drosophila* metamorphosis. *Genes Dev*, 2006, **20**(1): 101–112
- [37] Rodahl L M, Haglund K, Sem-Jacobsen C, Wendler F, Vincent J P, *et al.* Disruption of Vps4 and JNK function in *Drosophila* causes tumour growth. *PLoS One*, 2009, **4**(2): e4354
- [38] Uhlirova M, Bohmann D. JNK- and Fos-regulated Mmp1 expression cooperates with Ras to induce invasive tumors in *Drosophila*. *EMBO J*, 2006, **25**(22): 5294–5304
- [39] Zeitlinger J, Bohmann D. Thorax closure in *Drosophila*: involvement of Fos and the JNK pathway. *Development*, 1999, **126** (17): 3947–3956

The Sumoylation Pathway Modulates JNK Signaling in *Drosophila**

HUANG Hai^{1,2}, ZHU Nan-Nan^{1,2}, JIAO Ren-Jie^{1)**}

⁽¹⁾ State Key Laboratory of Brain and Cognitive Science, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁽²⁾ Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract The c-Jun N-terminal kinase, JNK, is one of the mitogen-activated protein kinase superfamily members. JNK signaling pathway plays important roles in a variety of biological activities such as cell growth, differentiation and apoptosis. Post-translational modification by the small ubiquitin-related modifier (SUMO), termed as sumoylation, regulates multiple cellular and physiological processes. A very recent report in *Development* by Huang *et al.* establishes a link between sumoylation pathway and JNK pathway through the action of homeodomain-interacting protein kinase (Hipk), which advances our understanding of the JNK signaling regulation in *Drosophila*.

Key words JNK pathway, sumoylation, Hipk

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00254

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31071087) and National Basic Research Program of China (2009CB918702).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64867568, E-mail: rjiao@ibp.ac.cn

Received: June 8, 2011 Accepted: June 9, 2011