

SUMO 化信号途径对 JNK 信号通路活性的调控

黄海，朱南南，焦仁杰*

中国科学院生物物理研究所
100101，北京市大屯路 15 号

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，黄海等人在《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 化的功能以及对 JNK 通路的调节建立了一个新的模型[1]。

关键词

JNK 通路 SUMO 化 Hipk

* 通讯作者

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, 它是分子量为 54kD 的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 [2]。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 [1,3,4,5,6,7,8,9]。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 [10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21]。因此, JNK 信号通路是调节疾病状态细胞恢复正常的一个潜在靶点。

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 (如图 1 所示)。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 (如电离辐射、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 [23,24,25,26]。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, 见图 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。

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)。

SUMO 化参与多种细胞生命活动。主要功能包括: 1) 影响蛋白质间的相互作用; 2) 改变蛋白质的亚细胞定位; 3) 增加蛋白质的稳定性; 4) 影响细胞分裂; 5) 对转录的调控; 6) 调节 DNA 修复等等 [28,29,30,31,32]。

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 (如图 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 puckerred (puc)和 Matrix metalloproteinase 1 (MMP1)这两个 JNK 下游的特征靶基因[35,36,37,38,39]。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（如图 4）。

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（如图 5A 所示）。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（如图 5B 和 C 所示），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（如图 6A 所示）。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（如图 6B 和 C 所示）。

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。通过检测 Hipk 在细胞质和细胞核中的分布，我们发现 SUMO 化途径通过影响 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[1]。

6 展望

至此，亟待回答的重要问题如下：（1）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？（2）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进行寻找。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。

致谢

本文得到了国家自然科学基金（31071087）和 973（2009CB918702）的资助。

参考文献

1. Huang H, Du G, Chen H, Liang X, Li C, et al. (2011) *Drosophila* Smt3 negatively regulates JNK signaling through sequestering Hipk in the nucleus. *Development*.
2. Kyriakis JM, Avruch J (1990) pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem* 265: 17355-17363.
3. Ichijo H (1999) From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* 18: 6087-6093.
4. Kanda H, Miura M (2004) Regulatory roles of JNK in programmed cell death. *J Biochem* 136: 1-6.
5. Lin A (2003) Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays* 25: 17-24.
6. Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 87: 565-576.
7. Moreno E, Yan M, Basler K (2002) Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. *Curr Biol* 12: 1263-1268.
8. Ventura JJ, Hubner A, Zhang C, Flavell RA, Shokat KM, et al. (2006) Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell* 21: 701-710.
9. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270: 1326-1331.
10. Ferrandi C, Ballerio R, Gaillard P, Giachetti C, Carboni S, et al. (2004) Inhibition of c-Jun N-terminal kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and infarct size after myocardial ischemia and reperfusion in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 142: 953-960.
11. Heasley LE, Han SY (2006) JNK regulation of oncogenesis. *Mol Cells* 21: 167-173.
12. Karin M, Lawrence T, Nizet V (2006) Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 124: 823-835.
13. Nateri AS, Spencer-Dene B, Behrens A (2005) Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development. *Nature* 437: 281-285.
14. Slevin M, Elsbali AB, Miguel Turu M, Krupinski J, Badimon L, et al. (2006) Identification of differential protein expression associated with development of unstable human carotid plaques. *Am J Pathol* 168: 1004-1021.
15. Smith WW, Gorospe M, Kusiak JW (2006) Signaling mechanisms underlying Abeta toxicity: potential therapeutic targets for Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5: 355-361.
16. Storling J, Binzer J, Andersson AK, Zullig RA, Tonnesen M, et al. (2005) Nitric oxide contributes to cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells via potentiation of JNK activity and inhibition of Akt. *Diabetologia* 48: 2039-2050.
17. Tuncman G, Hirosumi J, Solinas G, Chang L, Karin M, et al. (2006) Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10741-10746.
18. Uehara T, Bennett B, Sakata ST, Satoh Y, Bilter GK, et al. (2005) JNK mediates hepatic ischemia

- reperfusion injury. *J Hepatol* 42: 850-859.
19. Uhlirova M, Jasper H, Bohmann D (2005) Non-cell-autonomous induction of tissue overgrowth by JNK/Ras cooperation in a *Drosophila* tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13123-13128.
 20. Wilhelm M, Xu Z, Kukekov NV, Gire S, Greene LA (2007) Proapoptotic Nix activates the JNK pathway by interacting with POSH and mediates death in a Parkinson disease model. *J Biol Chem* 282: 1288-1295.
 21. Winn RA, Marek L, Han SY, Rodriguez K, Rodriguez N, et al. (2005) 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* 280: 19625-19634.
 22. Ryoo HD, Gorenc T, Steller H (2004) Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev Cell* 7: 491-501.
 23. Xue L, Igaki T, Kuranaga E, Kanda H, Miura M, et al. (2007) Tumor suppressor CYLD regulates JNK-induced cell death in *Drosophila*. *Dev Cell* 13: 446-454.
 24. Stronach B, Perrimon N (2002) Activation of the JNK pathway during dorsal closure in *Drosophila* requires the mixed lineage kinase, slipper. *Genes Dev* 16: 377-387.
 25. Takatsu Y, Nakamura M, Stapleton M, Danos MC, Matsumoto K, et al. (2000) TAK1 participates in c-Jun N-terminal kinase signaling during *Drosophila* development. *Mol Cell Biol* 20: 3015-3026.
 26. Tateno M, Nishida Y, Adachi-Yamada T (2000) Regulation of JNK by Src during *Drosophila* development. *Science* 287: 324-327.
 27. Geiss-Friedlander R, Melchior F (2007) Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 947-956.
 28. Chen H, Qi L (2010) SUMO modification regulates the transcriptional activity of XBP1. *Biochem J* 429: 95-102.
 29. Dou H, Huang C, Singh M, Carpenter PB, Yeh ET (2010) Regulation of DNA Repair through DeSUMOylation and SUMOylation of Replication Protein A Complex. *Mol Cell* 39: 333-345.
 30. Heun P (2007) SUMO organization of the nucleus. *Curr Opin Cell Biol* 19: 350-355.
 31. Lin X, Sun B, Liang M, Liang YY, Gast A, et al. (2003) Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Mol Cell* 11: 1389-1396.
 32. Rui HL, Fan E, Zhou HM, Xu Z, Zhang Y, et al. (2002) 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* 277: 42981-42986.
 33. Igaki T, Kanda H, Yamamoto-Goto Y, Kanuka H, Kuranaga E, et al. (2002) Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO J* 21: 3009-3018.
 34. Tiwari AK, Roy JK (2009) Mutation in Rab11 results in abnormal organization of ommatidial cells and activation of JNK signaling in the *Drosophila* eye. *Eur J Cell Biol* 88: 445-460.
 35. Agnes F, Suzanne M, Noselli S (1999) The *Drosophila* JNK pathway controls the morphogenesis of imaginal discs during metamorphosis. *Development* 126: 5453-5462.
 36. Miotto B, Sagnier T, Berenger H, Bohmann D, Pradel J, et al. (2006) Chameau HAT and DRpd3 HDAC function as antagonistic cofactors of JNK/AP-1-dependent transcription during *Drosophila* metamorphosis. *Genes Dev* 20: 101-112.
 37. Rodahl LM, Haglund K, Sem-Jacobsen C, Wendler F, Vincent JP, et al. (2009) Disruption of Vps4

- and JNK function in *Drosophila* causes tumour growth. PLoS One 4: e4354.
38. Uhlirva M, Bohmann D (2006) JNK- and Fos-regulated Mmp1 expression cooperates with Ras to induce invasive tumors in *Drosophila*. EMBO J 25: 5294-5304.
 39. Zeitlinger J, Bohmann D (1999) Thorax closure in *Drosophila*: involvement of Fos and the JNK pathway. Development 126: 3947-3956.

图题和图注

图 1 JNK 信号通路示意图及核心成员

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

图 2 SUMO 化途径示意图

Fig. 2 Diagram showing the three major steps of sumoylation pathway

图 3 SUMO 化活性敲低果蝇呈现出各种发育缺陷

Fig. 3 Sumoylation pathway perturbation leads to various developmental defects in adult flies

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。

图 4 SUMO 化活性降低上调 JNK 活性

Fig. 4 *Smt3* depletion promotes JNK activity

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/+*。比例尺显示 75 微米。

图 5 Hipk 激酶是 SUMO 化途径激活 JNK 信号通路的效应子

Fig. 5 *Smt3*-depletion-induced JNK activation is dependent on Hipk

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。比例尺显示 75 微米。

图 6 Hipk 于 JNK 附近对 JNK 信号通路实施调控

Fig. 6 Hipk regulates JNK signaling hierarchy at the position of JNK

A) *pnr>hipk* 果蝇背部缺陷(右上图)可以被 JNK 敲低部分挽回(如左下图所示),但不能被 JNKKK 敲低挽回(如右下图所示)。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。

Title: The sumoylation pathway modulates JNK signaling in *Drosophila*

Hai Huang^{1,2}, Nannan Zhu^{1,2} and Renjie Jiao^{1,*}

¹State Key Laboratory of Brain and Cognitive Science, Institute of Biophysics, the Chinese Academy of Sciences, Datun Road 15, Beijing 100101, China

²Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

* Author for correspondence: Dr. Renjie Jiao

Tel: +86-10-64867568 Email: rjiao@sun5.ibp.ac.cn

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

Acknowledgements

This work was financially supported by the grants from The National Natural Science Foundation of China (31071087) and 973 program (2009CB918702).