

遍在蛋白-蛋白连接酶对骨形态发生蛋白/Smad 通路的调节

苏琼综述 林正梅审校

(中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院牙体牙髓病科 广州 510055)

[摘要] Smad 通路是转化生长因子(TGF)-β超家族包括骨形态发生蛋白(BMP)信号转导的经典通路。Smad 复合物的积聚导致其基因转录的过度活化,因此 Smad 的降解对 Smad 通路的调控至关重要。遍在蛋白-蛋白水解酶复合体通路降解 Smad,对调控 TGF-β 信号转导发挥重要的调节作用。遍在蛋白-蛋白连接酶(Smurf)作为这一系统的核心,参与调控 BMP 和 TGF-β 两个家族的分子信号转导过程。本文就 TGF-β/Smad 通路、遍在蛋白酶体途径、遍在蛋白-蛋白连接酶 Smurf 家族及其结构、遍在蛋白-蛋白连接酶 Smurf-1 对 Smad 信号通路的调节等研究进展作一综述。

[关键词] 遍在蛋白-蛋白酶体降解系统; 遍在蛋白-蛋白连接酶; Smad 遍在蛋白调节因子; 骨形态发生蛋白

[中图分类号] Q 51 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2011.06.018

The mechanism of ubiquitin-protein ligating enzyme regulate bone morphogenetic protein signal transduction Su Qiong, Lin Zhengmei. (Dept. of Conservative Dentistry and Endodontics, Hospital of Stomatology, Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510055, China)

[Abstract] Smad pathway is the classic pathway of transforming growth factor(TGF)-β superfamily, including bone morphogenetic protein(BMP) signal transduction. The accumulation of Smad complexes will lead to the excessive activation of gene transcription. Therefore, the degradation of Smad is essential to the regulation of Smad pathway. The ubiquitin proteasome pathway degrades Smad proteins, which play an important role in the regulation of TGF-β family signaling. As the core of the system, Smad ubiquitin regulatory factor are HECT-type ubiquitin-protein ligating enzyme that regulate TGF-β and BMP signaling. In the nucleus, according to related literatures and combined with the latest research advances, we review that the discovery and composition of Smurf-1 and its mechanisms in regulating BMP signaling.

[Key words] ubiquitin proteasome pathway; ubiquitin-protein ligating enzyme; Smad ubiquitin-protein regulatory factor; bone morphogenetic protein

转化生长因子(transforming growth factor, TGF)-β超家族和骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)家族,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。BMP生物学效应的分子机制涉及两条重要的信号通路:Smad 蛋白依赖性和 Smad 蛋白非依赖性信号转导途径。Smad 蛋白依赖性信号转导途径由靶细胞膜上 BMP 受体和细胞质内各型 Smad 蛋白协同完成,Smad 蛋白被跨膜受体磷酸化并与其结合成复合物经胞质移位入核内,与靶基因启动

子特异序列结合后启动特定基因转录,是 TGF-β超家族包括 BMP 信号转导的经典通路。Smad 复合物的积聚导致基因转录的过度活化,因此 Smad 的降解对 Smad 通路的调控至关重要。遍在蛋白-蛋白水解酶复合体通路降解 Smad,对调控 TGF-β 信号转导发挥着重要的调节作用。遍在蛋白-蛋白酶体降解系统广泛存在于各种真核细胞中,参与调控细胞的多种生理进程。遍在蛋白-蛋白连接酶(E₃)作为该系统中行使调控降解功能的核心成员,其重要作用已经越来越受到人们的重视。

[收稿日期] 2010-09-30; [修回日期] 2011-07-22

[作者简介] 苏琼(1983—),女,湖南人,硕士

[通讯作者] 林正梅, Tel: 020-83762040

1 TGF-β/Smad 通路

TGF-β 超家族是一个包括 TGF-β、活化素

(activin, Act)、抑制素和 BMP 等的多肽生长因子家族,调控细胞的增殖、分化、迁移和程序性死亡^[1]。BMP 作为配体,首先与跨膜型受体(丝氨酸/苏氨酸激酶)结合,然后型受体与型受体形成异源复合体并导致型受体磷酸化,继而通过 Smad 通路启动细胞反应。哺乳动物 Smad 蛋白分为受体激活型 Smad(receptor-activated Smad, R-Smad)、共同调节型 Smad(common mediator Smad, Co-Smad)和抑制型 Smad(inhibitory Smads, I-Smad)^[2]。其中 R-Smad 包括 Smad_{1、2、3、5、8、9}; Co-Smad 包括 Smad₄; I-Smad 包括 Smad_{6、7}。在结构上, R-Smad 与 Co-Smad 在其 N 端和 C 端具有高度相似的 MH (Mad homology)-1 和 2 结构域。在 MH-1 和 2 结构域之间,具有不同序列长度的富有脯氨酸的连接子区域。

R-Smad 和 Co-smad 的 MH-1 区域高度保守, I-Smad 的 MH-1 区域与其他 Smad 的 MH-1 区域的氨基酸序列差异较大。在所有的 Smad 当中, MH-2 区域是高度保守的,而连接区域具有差异性^[3]。在功能上, MH-1 区域着重于核内输入与 DNA 结合; MH-2 区域与受体的相互作用与 Smad 的寡聚化有关,其对于 Smad 在胞质中锚定已激活的受体十分重要。MH-1 和 2 区域介导了转录因子的相互作用。连接区域包含许多磷酸化位点和一个 PY(富含脯氨酸和酪氨酸)基序,磷酸化位点对与其他信号途径的串话十分关键, PY 基序能特异性地与遍在蛋白-蛋白连接酶相互作用,这对于调节 TGF- β 和 BMP 途径是重要的。

2 遍在蛋白酶体途径

遍在蛋白酶体途径是一个当下备受关注的调节蛋白质降解与功能的重要系统^[4],在诸多细胞生命过程中起调节作用,包括细胞周期循环、信号转导、核酸密码翻译、DNA 损伤修复、异常蛋白质代谢、抗原呈递和细胞受体功能等,并与许多疾病的发生发展密切相关^[5]。遍在蛋白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。遍在蛋白-蛋白质结合物的形成需要三种酶催化遍在蛋白传递的级联反应,这三种酶分别为遍在蛋白活化酶(E_1)、遍在蛋白缀合酶(E_2)和遍在蛋白-蛋白连接酶。其中遍在蛋白-蛋白连接酶的种类最多,它负责降解底物的识别和决定反应底物的特异性。

一般来说,遍在蛋白活化酶没有选择性识别

能力,遍在蛋白-蛋白质连接的选择性主要决定于特异性的遍在蛋白-蛋白连接酶,它通过识别靶蛋白底物,在引发 26S 的蛋白酶体降解蛋白质的过程中起极其重要的作用^[6]。遍在蛋白-蛋白连接酶可通过遍在蛋白缀合酶的募集或直接与底物作用发挥分子抑制作用^[7-9]。

3 Smad 遍在蛋白因子家族

遍在蛋白-蛋白连接酶分为 2 个不同的家族:即 HECT(homologous to E_6 -AP C-terminus)遍在蛋白-蛋白连接酶家族[至少有 20 种以上,如 Smad 遍在蛋白调节因子(Smad ubiquitin regulatory factor, Smurf)、NEDD₄(Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated₄)、含 WW 结构域遍在蛋白-蛋白连接酶-1(WW domain containing E_3 ubiquitin protein ligase-1, WWP-1)、含 WW 结构域遍在蛋白-蛋白连接酶-2(WW domain containing E_3 ubiquitin protein ligase-2, WWP-2)、阿托品-1 相互作用蛋白-4(Atropin-1-interacting protein-4, AIP-4)、 E_6 相关蛋白(E_6 -associated protein, E_6 -AP)、核糖体生产要素-1(ribosome production factor-1, RPF-1)等]和 RING finger 遍在蛋白-蛋白连接酶家族(如 ROC-1、2)。HECT 家族是遍在蛋白-蛋白连接酶的一个主要的亚家族,靠近 C 端 HECT 结构域有一个高度保守的半胱氨酸残基,它可与遍在蛋白形成硫脂键。WW 结构域是遍在蛋白-蛋白连接酶 HECT 结构域蛋白质家族的另一个重要特征,这个含有大约 30 个氨基酸残基的区域中包含高度保守的 2 个色氨酸和 1 个脯氨酸。WW 结构域优先与底物蛋白富含脯氨酸的 PPXY 结构域结合,不同的 WW 结构域有着不同的底物结合特异性;而位于 HECT 结构域中的遍在蛋白连接区能促进多聚体遍在蛋白酶稳定地结合遍在蛋白化底物,从而发生一系列生物学效应^[10]。

非洲爪蟾中与 Smad₁ 直接结合的遍在蛋白-蛋白连接酶,被命名为 Smurf-1,是遍在蛋白-蛋白连接酶 HECT 家族新成员。随后,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试验,分离出 Smurf-2。人 Smurf-1 蛋白含有 731 个氨基酸,人 Smurf-2 蛋白含有 748 个氨基酸,分别有 2 个和 3 个 WW 结构域。Smurf-1 的 WW 结构域定位于其第 236 到 311 位氨基酸之间^[10], Smurf-2 的 WW 结构域定位于

其第 248 到 369 位氨基酸之间^[11], Smurf-1、2 间具有 80% 的同源性。PY 结构发生突变的 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^[11-12]。除了 HECT 结构域和 2 个 WW 结构域, Smurf-1 的 N 端还有一个由 15 个氨基酸残基组成的磷脂-钙结合 C₂ 结构域(phospholipids-calcium binding C₂-domain), 该结构域决定其胞质定位。

4 Smurf-1 对 Smad 信号通路的调节

Smad 通路是将 TGF- β 超家族胞外信号经跨膜受体传递到核内的主要通路。Smurf-1 的发现, 揭示了 Smad 的降解可受到遍在蛋白-蛋白酶体途径的调控。

4.1 R-Smad 的降解

Smurf-1 是 HECT 家族中的一种遍在蛋白-蛋白连接酶, 能特异地与 BMP 信号通路中的 Smad_{1、5} 相互作用。Smad_{1、5、8} 受 BMP- 型受体的激活, Smad_{2、3} 则受 TGF- β 和 Act- 型受体的激活。Smurf-1 优先与 Smad_{1、5} 接头区域的 PPXY 结构域结合并独立地诱导 Smad_{1、5} 遍在蛋白化和降解, 但不与 Smad_{2、3} 结合。异位表达 Smurf-1 可以降解 BMP/Smad 通路的 Smad 信号蛋白, 而不能降解 TGF- β /Act-Smad。爪蟾与人的 Smurf-1 之间有 91% 同源性, smurf-1 基因突变导致 BMP 信号转导通路阻抑并影响非洲爪蟾的胚胎发育^[13]。

4.2 对 Co-Smad 的降解

尽管 Smad₄ 蛋白质的水平和活性也受遍在蛋白蛋白酶复合体通路影响, 但是 Smad₄ 缺乏 PY 基序, 因此 Smurf 不能直接将其降解。

4.3 对 I-Smad 的降解

TGF- β 超家族成员可以有效地诱导 Smad₆ 和 Smad₇ mRNA 的产生, 因此 I-Smad 可以通过自身分泌负反馈环来控制 TGF- β 信号的强度和持续时间^[14]。I-Smad 能够有效地与活化的 型受体相互作用, 从而阻止 R-Smad 与活化的 型受体的接近^[15]。Smurf-1 的 N 端还有一个由 15 个氨基酸残基组成的磷脂-钙结合 C₂ 结构域, 它使 Smad₇ 从核内移至细胞膜, 从而结合膜上 型受体后使其发生降解; 当 C₂ 区域缺失时, Smad₇ 直接从核内移至胞外, Smurf-1 仅能诱导 Smad₇ 降解而无法降解膜上 型受体; 故 Smurf-1 能与 Smad₇ 结合致其最终的遍在蛋白化以及移位至胞质^[16]。

在哺乳动物的多种细胞内, I-Smad 与 Smurf-

1 可联合增强抑制作用。Smurf-1 不仅能直接连接 R-Smad, 还通过 Smurf-1-Smad₆ 复合体连接并激活 R-Smad, 使其发生更有效的降解。Smurf-1 也通过 Smad_{6、7} 来结合 BMP- 型受体, 使其遍在蛋白化并降解^[13]。Smurf-1-Smad₆ 复合体过度表达可迟缓肥大软骨细胞成熟, 在引起估量减少的同时, Smad₆ 过度表达能抑制 Smad_{1、5、8} 的磷酸化, 引起骨量的减少。这说明 Smad₆ 过表达不会影响成骨, 只是会延缓骨的发生。Smurf-1 过度表达虽无明显变化, 但 Smurf-1-Smad₆ 复合体过表达时, 抑制作用较 Smad₆ 单独过表达时要大很多^[17]。Smurf-1 还能结合 Smad₆ 启动子的成骨细胞特异性顺式作用元件-2 位点, 抑制 Smad₆ 启动子的活性, 影响 Smad₆ 的表达^[18], 维持通路的通畅。

5 结语

在 BMP 信号通路中, Smurf 还在细胞有丝分裂和压力信号通路中扮演着至关重要的角色^[19]。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, 但 Smurf-1 倾向于针对成骨细胞中的 BMP-Smad 信号通路发挥作用。当 I-Smad 的降解维持着信号转导途径的畅通或放大信号通路, 而被激活的 BMP 受体复合物和 R-Smad 的降解却能减弱信号转导的活化状态。遍在蛋白酶体途径介导的 Smad 信号功能失调必将影响 BMP 的功能并导致一系列的病理生理学改变。因此, 研究 Smurf-1 对 Smad 的降解调控作用具有重要的意义。

6 参考文献

- [1] Siegel PM, Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(11): 807-821.
- [2] Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system[J]. EMBO J, 2000, 19(8): 1745-1754.
- [3] Salentey V, Claus S, Bougault C, et al. Human chondrocyte responsiveness to bone morphogenetic protein-2 after their *in vitro* dedifferentiation: Potential use of bone morphogenetic protein-2 for cartilage cell therapy[J]. Pathol Biol(Paris), 2009, 57(4): 282-289.
- [4] Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: Structures, functions, mechanisms[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1695(1/2/3): 55-72.
- [5] Jesenberger V, Jentsch S. Deadly encounter: Ubiquitin meets apoptosis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(2): 112-121.

- [6] Laney JD, Hochstrasser M. Substrate targeting in the ubiquitin system[J]. Cell, 1999, 97(4) :427-430.
- [7] Ogunjimi AA, Briant DJ, Pece-Barbara N, et al. Regulation of Smurf-2 ubiquitin ligase activity by anchoring the E₂ to the HECT domain[J]. Mol Cell, 2005, 19(3) : 297-308.
- [8] Gallagher E, Gao M, Liu YC, et al. Activation of the E₃ ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(6) :1717-1722.
- [9] Wiesner S, Ogunjimi AA, Wang HR, et al. Autoinhibition of the HECT-type ubiquitin ligase Smurf-2 through its C₂ domain[J]. Cell, 2007, 130(4) :651-662.
- [10] Ogunjimi AA, Wiesner S, Briant DJ, et al. The ubiquitin binding region of the Smurf HECT domain facilitates polyubiquitylation and binding of ubiquitylated substrates[J]. J Biol Chem, 2010, 285(9) :6308-6315.
- [11] Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, et al. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation[J]. Nature, 1999, 400(6745) :687-693.
- [12] Zhang Y, Chang C, Gehling DJ, et al. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E₃ ubiquitin ligase[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(3) : 974-979.
- [13] Murakami G, Watabe T, Takaoka K, et al. Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf-1 and inhibitory Smads[J]. Mol Biol Cell, 2003, 14(7) :2809-2817.
- [14] Whitman M. Signal transduction. Feedback from inhibitory SMAD[J]. Nature, 1997, 389(6651) :549-551.
- [15] Ishisaki A, Yamato K, Hashimoto S, et al. Differential inhibition of Smad₆ and Smad₇ on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells[J]. J Biol Chem, 1999, 274(19) :13637-13642.
- [16] Suzuki C, Murakami G, Fukuchi M, et al. Smurf-1 regulates the inhibitory activity of Smad₇ by targeting Smad₇ to the plasma membrane[J]. J Biol Chem, 2002, 277(42) : 39919-39925.
- [17] Horiki M, Imamura T, Okamoto M, et al. Smad₆/Smurf-1 overexpression in cartilage delays chondrocyte hypertrophy and causes dwarfism with osteopenia[J]. J Cell Biol, 2004, 165(3) :433-445.
- [18] Wang Q, Wei X, Zhu T, et al. Bone morphogenetic protein 2 activates Smad₆ gene transcription through bone-specific transcription factor Runx-2[J]. J Biol Chem, 2007, 282(14) :10742-10748.
- [19] Sapkota G, Alarcón C, Spagnoli FM, et al. Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad₁ linker[J]. Mol Cell, 2007, 25(3) :441-454.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第683页)

- Prosthet Dent, 1998, 79(3) :264-269.
- [12] Rahimi S, Shahi S, Nezafati S, et al. *In vitro* comparison of three different lengths of remaining gutta-percha for establishment of apical seal after post-space preparation[J]. J Oral Sci, 2008, 50(4) :435-439.
- [13] Metzger Z, Abramovitz R, Abramovitz L, et al. Correlation between remaining length of root canal fillings after immediate post space preparation and coronal leakage[J]. J Endod, 2000, 26(12) :724-728.
- [14] Pappen AF, Bravo M, Gonzalez-Lopez S, et al. An *in vitro* study of coronal leakage after intraradicular preparation of cast-dowel space[J]. J Prosthet Dent, 2005, 94(3) :214-218.
- [15] Fan B, Wu MK, Wesselink PR. Leakage along warm gutta-percha fillings in the apical canals of curved roots[J]. Endod Dent Traumatol, 2000, 16(1) :29-33.
- [16] Gopikrishna V, Parameswaren A. Coronal sealing ability of three sectional obturation techniques—SimpliFill, Thermafil and warm vertical compaction—compared with cold lateral condensation and post space preparation[J]. Aust Endod J, 2006, 32(3) :95-100.
- [17] Aydemir H, Ceylan G, Tasdemir T, et al. Effect of immediate and delayed post space preparation on the apical seal of root canals obturated with different sealers and techniques[J]. J Appl Oral Sci, 2009, 17(6) :605-610.
- [18] Zmener O, Pameijer CH, Macri E. Evaluation of the apical seal in root canals prepared with a new rotary system and obturated with a methacrylate based endodontic sealer: An *in vitro* study[J]. J Endod, 2005, 31(5) :392-395.
- [19] Verissimo DM, do Vale MS. Methodologies for assessment of apical and coronal leakage of endodontic filling materials: A critical review[J]. J Oral Sci, 2006, 48(3) : 93-98.
- [20] Oruçoğlu H, Sengun A, Yilmaz N. Apical leakage of resin based root canal sealers with a new computerized fluid filtration meter[J]. J Endod, 2005, 31(12) :886-890.
- [21] Maltezos C, Glickman GN, Ezzo P, et al. Comparison of the sealing of Resilon, Pro Root MTA, and Super-EBA as root-end filling materials: A bacterial leakage study[J]. J Endod, 2006, 32(4) :324-327.
- [22] Xu Q, Fan MW, Fan B, et al. A new quantitative method using glucose for analysis of endodontic leakage[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2005, 99(1) :107-111.

(本文编辑 王晴)