

## 泛素连接酶对 Notch 信号途径的调节作用 \*

钟 晨 黄 瑾<sup>△</sup>

(新疆石河子大学医学院生化教研室 新疆 石河子 832002)

摘要 Notch 信号途径是生物进化过程中高保守的信号通路,对细胞的定向发育及成熟起到决定性的作用。Notch 信号途径受到多种分子机制的严格调控。近年来,多项研究均突出了泛素化在调控 Notch 信号途径活性中的重要性。本文就四种 E3 泛素连接酶 Su(dx)/Itch、Sel-10、LNX 以及 Neuralized 对于调控 Notch 受体及 Notch 信号途径配体的研究现状作一综述。

关键词 Notch 信号途径; Su(dx)/Itch; Sel-10; Neuralized; LNX

中图分类号 Q55 Q813 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)20-3981-03

## Regulated Effects of Ubiquitin Ligase on Notch Signaling Pathway

ZHONG Chen, HUANG Jin<sup>△</sup>

(Department of Biochemistry, Shihezi University, Shihezi 832002, China)

**ABSTRACT:** Notch signaling pathway is a conserved signaling pathway in the organic evolution process, and plays a decisive role in the orientation of cell growth and maturation. Notch signaling pathway is regulated strictly by a variety of molecular mechanisms. In recent years, many studies have highlighted the importance of ubiquitination in the regulate of Notch signaling pathway. This paper summarized four types of E3 ubiquitin ligase Su(dx) / Itch, Sel-10, LNX, and Neuralized regarding regulate the Notch acceptor and Notch signal way ligand.

**Key words:** Notch signaling pathway; Su(dx)/Itch; Sel-10; Neuralized; LNX

**Chinese Library Classification(CLC):** Q55 Q813 Document code: A

**Article ID:** 1673-6273(2011)20-3981-03

Notch 途径是一个保守的级联反应信号传导过程,Notch 途径在所有多细胞动物有机体(从蠕虫到人类)的发育及细胞的分化过程中都是非常重要的。Notch 通过调节细胞基因表达、调节细胞分化信号和限制特化细胞数量,使得部分祖细胞保留向其他细胞特化的潜能,而另一部分祖细胞向某一特定方向分化。Notch 信号通路的活化是十分奇妙的,首先是 Notch 的配体 Delta(Dl)与受体结合,激活肿瘤坏死因子 $\alpha$  转换酶(TACE),TACE 会切去 Notch 受体的胞外区,使得 Notch 受体胞内区释放入细胞内,接着在核内激活 CSL 转录因子。能自主地拮抗 Notch 活性的内在调节因子是一种胞内蛋白 Numb,其特异的不对称分布在被 Notch 信号介导的细胞之间。

近年来有证据表明泛素化连接酶(E3)参与调节修饰 Notch 途径。而 E3 被认为是泛素化过程中最为关键的酶。泛素化的激活过程是泛素从泛素激活酶(E1)转移到泛素结合酶(E2),而 E3 泛素连接酶可准确地与底物 E2 靶向结合,从而催化与 E2 结合的泛素转移到底物的 Lys 末端残基上<sup>[1]</sup>。这个途径有两个去路:一个是可溶性蛋白的聚合泛素化,可使蛋白被蛋白酶体降解;另一个是跨膜蛋白的游离泛素化,会使得跨膜蛋白胞内区吞最后被溶酶体降解<sup>[2,3]</sup>。E3 根据与泛素结合酶(E2)相互作用的结构域的不同,可被分为 HECT 类、RING-Finger 类、U-box 三大类。RING-Finger E3s 是其中最大的家族,可分为两类,一类为单亚基 E3s,它是指一个多肽序列中同时包含有底物结合

元件和 Ring-finger 结构域,这类 E3s 可以直接与底物结合而不需要其他蛋白质协助去催化底物泛素化。另一类为多亚基 E3s,它通过与其他亚基构成复合物来募集和识别底物<sup>[4]</sup>。

本文着重概述下列四个泛素化连接酶如何调控 Notch 信号途径:Sel-10 及 Su(dx)/Itch 负调控 Notch 信号途径;Neuralized 及 LNX 正调控 Notch 信号途径。

## 1 Su(dx)/Itch 对 Notch 的负调控作用

Su(dx)是果蝇 *deltex(dx)* 的突变抑制因子,最初发现它会抑制由 *deltex* 引起的果蝇翅脉的增厚,还可影响 Notch 介导的遗传相互作用。Itch 是突变(*Itchy*)小鼠的免疫缺陷因子,研究发现它会造小鼠肺部和胃部的炎症、淋巴及造血干细胞的增生。这两个因子是同源蛋白,它们均包含 1 个 C2 结构域,4 个 WW 序列和 1 个羧基末端 HECT 型 E3 泛素化连接酶元件<sup>[5]</sup>。

Baron 教授<sup>[6]</sup>实验室的研究表明,Su(dx)具有 Notch 信号负调控蛋白的特性。Su(dx)的表达降低或不表达会抑制 Notch 和 Delta 引起的表型的改变,即抑制毛发的增加。相反,Su(dx)过表达时会增强 Notch 和 Delta 表型的改变。这个反效等位基因与 HECT 结构域中的微小缺失有关,这个等位基因所编码的蛋白能够识别底物但不能调控泛素化。*deltex* 编码的是 Ring finger 蛋白,它的产物是调节 Notch 途径的另一个候选泛素化连接酶 E3。尽管 *deltex* 在 Notch 信号途径中的作用机制还未定论,但

\* 基金项目 国家自然科学基金(30760063)

作者简介:钟晨(1985-),男,硕士。电话:15199385210

<sup>△</sup>通讯作者:黄瑾,教授,博士,研究方向:蛋白因子的功能与机制研究,E-mail:huangjin623@163.com。

(收稿日期:2011-03-02 接受日期:2011-03-26)

缺少 Ring finger 序列的 deltex 蛋白同样可以激活 deltex 的表型并激活许多具有额外功能的表型<sup>[9]</sup>。这个结果显示 Ring finger 结构域对于 deltex 的功能不是必需的。不过 Ring finger 结构域的存在与 2 组 WWE 结构域一样,是泛素化相关蛋白的一组序列,这个序列提示我们泛素化通路对 deltex 的某个方面有一定的影响<sup>[10]</sup>。

Liu.Y 等<sup>[7]</sup>完成了对于 Itch 的生物化学方面的研究,研究结果表明 Itch 的靶向作用因子是 Notch。Itch 通过 WW 结构域与胞内区 Notch(NIC)结合从而通过 HECT 结构域来促进 NIC 的泛素化。Su(dx)/Itch 根据其 C2 结构域(磷脂结合序列)可以判断其定位在细胞膜上。事实上,Itch 与 Notch 的膜锚定蛋白相互作用,促进 Notch 膜锚定蛋白的泛素化。通过这一研究足以证明 Su(dx)和 Itch 直接调控 Notch<sup>[8]</sup>。

## 2 Sel-10 对 Notch 的负调控作用

Sel-10 基因是秀丽隐杆线虫的 lin-12 亚效等位基因的负调控因子,可以抑制 lin-12 引起的产卵缺陷<sup>[11]</sup>。当减少 Sel-10 的量会增加 lin-12 的活性,同时加大 Sel-10 的量会降低 lin-12 的活性,由此可见 Sel-10 是 lin-12 活性的负调控因子。Sel-10 是一个 Cdc4 关联蛋白,其含有 1 个 F box 结构域和 7 个 WD40 序列,它能与 NIC 自然结合<sup>[12]</sup>。

近年来,Kitajewski, Lendahl 和 Israel 等<sup>[13-15]</sup>对 Sel-10 的研究主要集中在哺乳动物 Sel-10 的功能。研究表明,Sel-10 是通过 WD40 来结合 NIC 从而调节 NIC 的泛素化,使其最终快速降解。而缺少 F box 的 Sel-10(Sel-10 $\Delta$ FB)相当于蛋白酶体的抑制剂,可使 NIC 不被降解。Wu. G 等<sup>[13]</sup>在体外试验中证实 SCF 复合物引起 NIC 泛素化,SCF 复合物包含 Sel-10、Cul-1、Skp-1 和 1 个 Ring finger 蛋白 Hrt-1。Sel-10 $\Delta$ FB 不能结合入 SCF 复合物中,所以不能使 NIC 泛素化,这一结果为 Sel-10 的显性负调控作用提供了分子基础。

Sel-10 调节 Notch 的方式与 Su(dx)/Itch 的调节方式有所不同。首先,Sel-10 调节 Notch 需要 NIC 的 PEST 结构域,但 Su(dx)/Itch 调节 Notch 则不需要 NIC 的 PEST 结构域;其次,Sel-10 只作用于细胞核内的 NIC 却不能与胞膜上及胞质中的 NIC 相互作用,而 Su(dx)/Itch 可作用于胞膜上及胞质中的 NIC。Gupta-Rossi<sup>[15]</sup>发现 NIC 磷酸化过程的最后一步需要在细胞核内进行,并且特别需要 Sel-10 去识别 NIC 的特异性的高度磷酸化区域<sup>[13,15]</sup>。重要的是,它解释了 Notch 的细胞定位:在组织细胞核内找不到 Notch,只能通过 Notch 影响靶基因转录的能力来间接推断核内 Notch 的存在,而这一研究发现 Sel-10 参与 NIC 在核内的磷酸化,从而使 NIC 极度的不稳定,故很难发现定位在核内的 Notch。

## 3 Neuralized 对 Notch 的正调控作用

30 多年前研究就已证实,果蝇的 Neuralized(Neur)基因是使来自神经系统的外胚层细胞向表层细胞转变时起重要作用的六个基因中的一个<sup>[16]</sup>。目前认为 Neur 是 Notch 配体内吞的关键调节因子,作为膜相关泛素连接酶(E3 ligase),Neur 通过使配体泛素化,促进其内吞,进而激活 Notch 信号途径。Neur 编码一种由 3 个保守区域组成的细胞膜蛋白,包括 2 个 neur 的

同源重复序列 NHR(NHR1 和 NHR2)和 1 个羧基末端的 Ring finger 结构域<sup>[16,17]</sup>。从 Neur 突变细胞株中可见其在接收 Notch 信号的细胞中起着非常重要的作用,Neur 主要定位在细胞膜上,这说明它可能调控一个细胞膜上的靶基因。当 Neur 去除 Ring finger(Neur  $\Delta$ RF)时,它对发育过程的异位表达起着强烈的显性负调控作用。从这点可以发现 Ring finger 结构域对于 Neur 的活性起着决定性的作用<sup>[18,19]</sup>。

Rubin, Kintner 等<sup>[20]</sup>近年来的研究基本明确了 Neur 的分子生物学功能,并在体外实验中证实了 Neur 的 Ring finger 具有同泛素化连接酶 E3 的功能,Delta 是 Neur E3 活性的一个主要靶基因。在体内功能丢失及增强实验中提示 Neur 能促进 Ring finger 依赖性 delta 的内吞及降解;在体外功能丢失及增强实验中提示 Neur 能促进 delta 的泛素化;同时发现 delta 能与 Neur 和 Neur  $\Delta$ RF 结合。Neur 作为泛素连接酶 E3,使 Delta 泛素化从而促进 Delta 内吞进而激活 Notch 信号途径。Neur 表达降低可使配体 Delta 的内吞受抑制,导致 Notch 信号的传导被终止。Neur 过表达可增强 Delta 的内吞,减少细胞膜上的配体,从而使细胞接受 Notch 信号的能力增强。可见 Delta 内吞是观察 Neur 对 Notch 信号传导影响的一个重要指标<sup>[21]</sup>。

## 4 LNX 对 Notch 的正调控作用

McGlade 和 colleagues<sup>[24]</sup>等研究发现,LNX 是一个泛素化连接酶 E3,它含有 Ring finger 结构域的蛋白,能调节 Numb 的泛素化从而使其降解。LNX 包含 1 个氨基末端的 Ring finger 结构域和 4 个 PDZ 结构域<sup>[25]</sup>。

Numb 是一个含有 PTB 结构域的蛋白,它不对称地分布在被 Notch 信号所调控的细胞中。Numb 能直接地与 Notch 的胞内区结合,从而拮抗 Notch 活性<sup>[22]</sup>。Numb 会在果蝇细胞有丝分裂时不对称分布在两个子细胞中的一个细胞中,它的分布是通过一个复合物分离 Numb 使其分布到细胞皮层的一边,并只能让一个子细胞接着有丝分裂<sup>[23]</sup>。研究表明 LNX 是一个与 Numb 的 PTB 结构域相结合的蛋白,LNX 可能是通过降低 Numb 的水平来增强 Notch 信号<sup>[25]</sup>。LNX 过表达会增加 Notch 受体诱导基因转录的活性。LNX 最后的 3 个 PDZ 结构域在介导泛素化及 Numb 降解的过程中不是必需的,但 PDZ 结构域的缺失会增加 Numb 与 Notch 受体的亲和力。可见 LNX 的 3 个 PDZ 结构域在 LNX-Numb 相互作用中起负调控作用,与 LNX 识别底物有关<sup>[26]</sup>。

在小鼠和人类中已发现 LNX 基因,但是在蠕虫中尚未发现,说明 LNX 的活性可能只存在于脊椎动物体内。而缺少 Ring finger 结构域的 LNX 亚基却在脑中高度表达<sup>[25]</sup>。虽然这个 LNX 亚基的功能还不清楚,但是从它的结构可以看出它极有可能是自然存在的显性负调控因子。

## 5 展望

近年来泛素化通路对 Notch 信号途径的调节成为研究热点,但仍有许多问题亟待解决。许多有关 E3s 的关键问题尚无合理的解释,Su(dx)/Itch 是如何影响 Notch 的胞内区,哪些激酶能够修饰 NIC 从而使其能被 Sel-10 所识别;细胞中哪些因子可影响 Delta 的内吞从而影响由 Neur 介导的 Notch 信号的传

导；在活体内接受 Notch 信号的细胞是否需要 LNX 去调节 Numb。

Notch 信号途径的调节与许多因子之间的相互作用有关。例如,已发现 Sel-10 通过对 Sel-12 起负调控作用来影响 Notch 受体的增殖<sup>[27]</sup>,所以 Sel-10 可能通过很多方面来调节 Notch 信号途径。此外,有些证据显示这些因子的 E3s 结构域具有负性调控功能,这表明 Sel-10 和 Neur 的 E3 结构域能与自身靶向结合从而被蛋白酶体降解。还发现一些特殊的小分子也参与调控 Notch。例如,小分子的锚定蛋白序列 Nrap 可以同 NIC 以及 CSL 结合成一个三元络合物,在非洲蟾蜍物种中其调控 NIC 的水平<sup>[28]</sup>,Nrap 与 NIC 以及 CSL 的结合方式及 Nrap 的降解方式都未有详细报道。希望将来对 Notch 信号通路的研究能更加细致和准确,为机体如何调控 Notch 信号通路找到更加满意的答案。

#### 参考文献(References)

- [1] Lorick KL, Tsai YC, Yang Y, et al. RING fingers and relatives: Determination of protein fate[M]. Mayer RJ, M. Rechsteiner,editors. Weinheim, Germany: VCH Verlag,2005 (b): 44-101
- [2] Hicke L. A new ticket for entry into budding vesicles ubiquitin [J]. Cell. 2001,106(5):527-530
- [3] Hershko A, and Ciechanover A. The ubiquitin system [J]. Biochem. 1998,67:425-479
- [4] Ardley HC, Robinson PA. E3 ubiquitin ligases [J]. Essays Biochem. 2005,41:15-30
- [5] Bernassola F, Karin M, Ciechanover A, et al. The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development [J]. Cancer Cell. 2008,14(1):10-21
- [6] Fostier M, Evans D, Baron M, et al. Genetic characterization of the Drosophila melanogaster Suppressor of deltex gene: a regulator of Notch signaling[J]. Genetics.1998,150(4):1477-1485
- [7] Qiu L, Joazeiro C, Fang N.H.W, et al. Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a HECT-type E3 ubiquitin ligase [J]. J. Biol.Chem. 2000,275(46): 35734 - 35737
- [8] Bellomaria A, Barbato G, Melino G, et al. Recognition of p63 by the E3 ligase ITCH: Effect of an ectodermal dysplasia mutant. Cell Cycle. 2010,9(18):3730-9
- [9] Matsuno K, Diederich RJ, Go MJ, et al. Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. Development. 1995, 121(8):2633-2644
- [10] Aravind L. The WWE domain: a common interaction module in protein ubiquity nation and ADP ribosylation. Trends Biochem Sci. 2001,26(5): 273-275
- [11] Sundaram M, and Greenwald I. Suppressors of a lin-12 hypomorph define genes that interact with both lin-12 and glp-1 in Caenorhabditis elegans. Genetics.1993, 135:765-783
- [12] Hubbard E, Wu G, Kitajewski J, et al. sel-10, a negative regulator of lin-12 activity in Caenorhabditis elegans, encodes a member of the CDC4 family of proteins. Genes. 1997,11: 3182-3193
- [13] Wu G, Lyapina S, Das I, et al.Sel-10 is an inhibitor of Notch signaling that targets Notch for ubiquitin-mediated protein degradation. Cell Biol. 2001,21:7403-7415
- [14] Oberg CJL, Pauley A, Wolf E, et al. The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. J. Biol. Chem,2001,276:35847-35853
- [15] Gupta-Rossi N, Le Bail O, Gonen H, et al. Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor[J]. J. Biol. Chem,2001,276: 34371-34378
- [16] Price BD, Chang Z, Smith R. The Drosophila neuralized gene encodes a C3HC4 zinc finger[J]. EMBO J,1993,12:2411 -2418
- [17] Boulianne GL, de la Concha A, Campos-Ortega JA, et al. The Drosophila neurogenic gene neuralized encodes a novel protein and is expressed in precursors of larval and adult neurons. EMBO J,1991,10: 2975-2983
- [18] Lai EC, and Rubin GM. Neuralized functions cell autonomously to regulate a subset of Notch-dependent processes during adult Drosophila development[J]. Dev. Biol, 2001, 231: 217-233
- [19] Lai EC, and Rubin GM. Neuralized is essential for a sub- set of Notch pathway-dependent cell fate decisions during Drosophila eye development[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A,2001,98: 5637-5342
- [20] Lai EC, Deblandre G, Kintner C, et al. Drosophila Neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the interna-lization and degradation of Delta[J]. Dev.Cell,2001, 1: 783-794
- [21] De Renzis S, Yu J, Zinzen R, et al. Dorsal-Ventral Pattern of Delta Trafficking Is Established by a Snail-Tom-Neuralized Pathway [ J]. Dev Cell,2008,10(2): 257-264
- [22] Wang S, Younger-Shepherd S, Jan LY. Only a subset of the binary cell fate decisions mediated by Numb/ Notch signaling in Drosophila sensory organ lineage requires Sup- pressor of Hairless [J]. Development,997,124: 4435-4446
- [23] Lu B, Rothenberg M, Jan. Partner of Numb colocalizes with Numb during mitosis and directs Numb asymmetrical localization in Drosophila neural and muscle progenitors[J]. Cell,1998, 95: 225-235
- [24] Nie J, McGill M, Dermer M. LNX functions as a RING type E3 ubiquitin ligase that targets the cell fate determinant Numb for ubiquitin dependent degradation[J]. EMBO J,2002,21: 93-102
- [25] Dho S, Jacob S, Wolting C, et al. The mammalian numb phosphotyrosine bind- ing domain[J]. J. Biol. Chem, 1998,273(15): 9179-9187
- [26] Chen J, Xu J, Zhao W,et al. Characterization of human LNX, a novel ligand of Numb protein X that is downregulated in human gliomas[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(11): 2273-83
- [27] Wu G, Hubbard E, Kitajewski J, et al. Evidence for functional and physical association between Caenorhabditis elegans SEL-10, a Cdc4p-related protein, and SEL-12 presenilin [J]. Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A. 1998,95: 15787-15791
- [28] Lamar E, Deblandre G, Wettstein D, et al. Nrap is a novel intracellular component of the Notch signaling pathway[J]. Genes Dev,2001, 15: 1885- 1899