

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001983

Smurf1 通过抑制 LKB1 的多聚泛素化而调控其蛋白稳定性

袁志¹, 马林强², 程志¹, 梁森³, 黄慧哲¹

(1. 重庆医科大学基础医学院发育生物学研究室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第一医院内分泌科, 重庆 400016; 3. 重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:为了探寻肝脏激酶 B1(liver kinase B1, LKB1)的上游调控分子,并研究其对 LKB1 的影响。**方法:**首先,利用 UbiBrowser 数据库预测 LKB1 可能的上游调控分子,并根据评分筛选出可能对 LKB1 具有调控作用的 Smurf1 基因。然后,构建 Smurf1 和 LKB1 相关过表达质粒,并转染 HEK293T 细胞,通过 Western blot 检测 LKB1 蛋白质表达的变化。最后,运用荧光定量 PCR(qPCR)、免疫共沉淀(Co-Immunoprecipitation)探索 Smurf1 调控 LKB1 可能的分子机制。**结果:**①成功构建 LKB1 和 Smurf1 相关过表达质粒。②在 HEK293T 细胞中过表达 0、0.5、1、2 μg 的野生型 Smurf1 时其对应的 LKB1 蛋白相对表达量分别为 0.026 2 ± 0.000 7、0.072 7 ± 0.000 3、0.130 1 ± 0.001 3、0.431 5 ± 0.001 0。经单因素方差分析,其结果为 $F=79\ 636.433$, $P=0.000$ 。与 0 μg 对照组相比,进一步采用 LSD-*t* 法分析,0.5、1、2 μg 各组 P 值分别为 0.000、0.000 和 0.000。③在 HEK293T 细胞中过表达 0、0.5、1、2 μg 的突变型 Smurf1 时其对应的 LKB1 的蛋白相对表达量分别为 0.018 0 ± 0.000 1、0.053 0 ± 0.000 4、0.125 0 ± 0.001 0、0.200 4 ± 0.001 7。经单因素方差分析,其结果为 $F=12\ 887.993$, $P=0.000$ 。与 0 μg 对照组相比,进一步采用 LSD-*t* 法分析,0.5、1、2 μg 各组 P 值分别为 0.000、0.000 和 0.000。④以 GAPDH 为内参,未过表达 Smurf1 组和过表达 Smurf1 组中, LKB1 的相对 mRNA 表达水平分别为 1.085 1 ± 0.412 5、2.398 2 ± 1.766 9。经独立样本 *t* 检验统计分析, $P=0.257$ 。⑤以 β-actin 为内参,未经 Smurf1 处理组、野生型 Smurf1(WT) 处理组、突变型 Smurf1(C699A) 处理组中 LKB1 的相对泛素化水平分别为 1.823 8 ± 0.027 8、0.088 1 ± 0.005 1、0.212 7 ± 0.006 2。经单因素方差分析,其结果为 $F=6\ 721.953$, $P=0.000$ 。与未经 Smurf1 处理组相比,进一步采用 LSD-*t* 法分析,野生型 Smurf1 组和突变型 Smurf1 组各组 P 值分别为 0.000 和 0.000。**结论:**这些结果表明 Smurf1 通过降低 LKB1 的多聚泛素化从而参与其蛋白稳定性的调节。

【关键词】Smurf1; LKB1; 多聚泛素化; 稳定性

【中图分类号】R3

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-05-01

Smurf1 regulates its protein stability by inhibiting the polyubiquitylation of LKB1

Yuan Zhi¹, Ma Linqiang², Cheng Zhi¹, Liang Sen³, Huang Huizhe¹

(1. Department of Developmental Biology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University;

2. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the upstream regulatory molecules of liver kinase B1(LKB1) and to investigate their effect on LKB1. **Methods:** First, the UbiBrowser database was used to predict the possible upstream regulatory molecules of LKB1, and the Smurf1 gene that may regulate LKB1 was screened out according to the score. Then, the Smurf1- and LKB1-related overexpression plasmids were constructed and transfected into HEK293T cells, and the changes in the expression of LKB1 protein were detected by Western blot. Finally, the possible molecular mechanism of Smurf1 regulating LKB1 was explored by quantitative polymerase chain reaction and co-immunoprecipitation. **Results:** ①The LKB1- and Smurf1-related overexpression plasmids were successfully constructed. ②The overexpression levels of 0, 0.5, 1, and 2 μg of wild-type Smurf1 in HEK293T cells corresponded to LKB1 protein expression levels of 0.026 2 ± 0.000 7, 0.072 7 ± 0.000 3, 0.130 1 ± 0.001 3, and 0.431 5 ± 0.001 0, respectively. One-way analysis of variance (ANOVA) showed a result of $F=79\ 636.433$ and $P=0.000$. Further analysis by the least significant difference (*LSD-t*) test yielded P values of 0.000, 0.000, and 0.000 for the 0.5, 1, and 2 μg groups, respectively, compared with the 0 μg control group. ③The overexpression levels of 0, 0.5, 1, and 2 μg of mutant Smurf1 in HEK293T cells corresponded to LKB1 protein expression levels of 0.018 0 ± 0.000 1, 0.053 0 ± 0.000 4, 0.125 0 ± 0.001 0, and 0.200 4 ±

作者简介:袁志, Email: xyz931277064@163.com,

研究方向: LKB1-AMPK 信号通路在肿瘤发生发展中的调控机制。

通信作者:黄慧哲, Email: Huangh@xmu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:31171388)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190222.0909.024.html>

(2019-02-22)

0.001 7, respectively. One-way ANOVA showed a result of $F=12\ 887.993$ and $P=0.000$. Further analysis by the LSD- t test yielded P values of 0.000, 0.000, and 0.000 for the 0.5, 1, and 2 μg groups, respectively, compared with the 0 μg control group. ④With *GAPDH* as the internal reference substance, the relative mRNA expression levels of *LKB1* in the *Smurf1* non-overexpression group and *Smurf1* overexpression group were $1.085\ 1 \pm 0.412\ 5$ and $2.398\ 2 \pm 1.766\ 9$, respectively. The P value was 0.257 by independent samples t -test analysis. ⑤With β -actin as the internal reference substance, the relative ubiquitination levels of *LKB1* in the *Smurf1*-untreated group, wild-type *Smurf1*-treated group, and mutant *Smurf1*(C699A)-treated group were $1.823\ 8 \pm 0.027\ 8$, $0.088\ 1 \pm 0.005\ 1$, and $0.212\ 7 \pm 0.006\ 2$, respectively. One-way ANOVA showed a result of $F=6\ 721.953$ and $P=0.000$. Further analysis by the LSD- t test yielded P values of 0.000 and 0.000 for the wild-type *Smurf1*-treated group and mutant *Smurf1*-treated group, respectively, compared with the *Smurf1*-untreated group. **Conclusion:** These results indicate that *Smurf1* is involved in the regulation of the stability of *LKB1* protein by reducing its polyubiquitination.

【Key words】*Smurf1*; *LKB1*; polyubiquitination; stability

肝脏激酶 B1(liver kinase B1, *LKB1*)也称 serine/threonine kinase 11(*STK11*),其编码基因位于人染色体 19p13.3^[1],编码蛋白为 48 kD 大小的丝氨酸/苏氨酸激酶。*LKB1* 广泛表达于机体组织,参与细胞生长、能量代谢及肿瘤抑制等生物学过程。

LKB1 最先发现与黑斑息肉综合征 (Peutz-Jeghers syndrome, PJS) 有关。PJS 是一种罕见的常染色体显性遗传性疾病,主要临床特点是口唇皮肤黏膜色素沉着、多发性胃肠道息肉及高发良恶性肿瘤的危险性,而致病原因正是由于 *LKB1* 基因发生胚系突变^[2]。最新研究证实 *LKB1* 缺失突变和失活突变与多种肿瘤密切相关,如非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)^[3]、宫颈癌、乳腺癌等^[4],揭示 *LKB1* 具有抑癌作用。

LKB1 作为蛋白质激酶,调控一系列蛋白质的磷酸化修饰,其中包括 *AMPK* 及其相关的蛋白质激酶(如 *NUAK1*、*NUAK2*)。*AMPK* 是细胞主要的能量感受器,当葡萄糖下降或 *AMP:ATP* 升高时,*LKB1* 通过磷酸化 *AMPK* 的第 172 位苏氨酸而激活 *AMPK*^[5],激活的 *AMPK* 进一步通过促进分解代谢及抑制合成代谢来维持细胞的能量平衡^[6]。此外,*LKB1* 在细胞生长、极化、自噬等过程中也发挥着重要作用^[7]。

LKB1 蛋白及其活性受到一系列分子的调控。研究发现,能量应激时 *LKB1* 通过与 *STRAD α* 和 *MO25* 形成异源三聚体,从细胞核转移到胞质,进一步 Axin 募集 *LKB1* 复合体聚集至溶酶体膜,与 *AMPK* 结合并激活下游通路^[8-9]。乙酰化转移酶 *SIRT1* 使 *LKB1* 去乙酰化修饰后,有利于 *LKB1* 从胞核向胞质转运;此外,过氧硝基盐和二甲双胍能够诱导 *PKC ζ* 向胞核转运,核内的 *PKC ζ* 可以对 *LKB1*

的第 307 和 428 位的丝氨酸进行磷酸化修饰,促进了 *LKB1* 的出核^[10-13]。而孤儿核受体 Nur77 可以结合 *LKB1* 并阻碍其出核,从而抑制 *LKB1* 所调控的相关信号通路^[14-15]。*AURKA* 对 *LKB1* 的第 299 位丝氨酸磷酸化后,削弱了 *LKB1-AMPK* 信号通路,并且促进了非小细胞肺癌的侵袭和迁移^[16]。在能量应激下,*SUMO1* 对 *LKB1* 的第 178 位赖氨酸进行 SUMO 化修饰后,从而促进了 *LKB1* 与 *AMPK* 相互作用进而减少细胞凋亡^[17]。然而,这一系列的调控之间如何联系? 是否还有其他分子参与? 仍有待进一步探究。

基于 *LKB1* 在诸多生物学活动中发挥着重要的功能,而其上游调控机制尚未完全阐明。因此,本研究利用 Ubibrowser 数据库找到潜在调控 *LKB1* 的上游分子 *Smurf1*。*Smurf1* 是一种 E3 泛素连接酶,主要参与对 *Smad1*、*Smad4*、*Smad5* 的泛素化降解,从而负调控 *TGF β* 信号通路^[18-19]。为明确 *Smurf1* 对 *LKB1* 的调控作用,通过在细胞中过表达 *Smurf1*,发现了 *Smurf1* 可以上调 *LKB1* 表达,并且其作用机制为抑制 *LKB1* 泛素化降解。

1 材料与方法

1.1 细胞、质粒、菌株

HEK293T 细胞、真核表达质粒 pCMV5-HA/FLAG、pCMV5-*Smurf1*-C699A-HA、pCMV5-*Smurf1*-MYC、泛素 Ub-WT-HA 质粒、大肠埃希菌 DH5 α 均由本实验室保存。

在 HEK293T 细胞中过表达不同 *Smurf1* 浓度梯度(0、0.5、1、2 μg)对 *LKB1* 表达的影响,以及探究 *Smurf1* 是如何影响 *LKB1* 表达的。每组实验重复 3 次。

1.2 主要试剂

Exonuclease III 连接酶、限制性内切酶 *BamH I*、*Nde I*、

Xba I、*Bgl* II、PrimeSTAR[®] HS(Premix)、DNA Marker、Prime-Script[™] RT reagent Kit 试剂盒均购自宝日生物技术(北京)有限公司(Takara);Gel Extraction Kit 试剂盒购自美国OMEGA公司;聚醚酰亚胺(PEI)购自美国 Sigma 公司;DMEM 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司, MG132、PEI、兔抗 HA、FLAG 标签抗体和鼠源 FLAG、HA 磁珠购自美国 Sigma 公司, 兔抗 *GAPDH*、 β -*actin* 单克隆一抗购自天津三箭生物技术有限公司, HRP 标记的羊抗鼠和羊抗兔二抗购自江苏三联生物工程技术有限公司;总 RNA 提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司;UltraSYBR Mixture 购自康为世纪生物科技有限公司, BeyoECL Star、Western blot 及 IP 细胞裂解液购自碧云天生物技术有限公司, 引物合成和测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.3 真核表达质粒的构建

LKB1 和 *Smurf1* 基因编码序列来自 GenBank, 序列号分别为 NM_000455 和 NM_181349.2。应用 Primer Premier 5.0 设计 *LKB1* 和 *Smurf1* 引物序列。*LKB1*-HA 正义链:5'-GCCATGGGCCATATGATGGAGGTGGTGGACCC-3', 反义链:5'-CCGGGATCCTCTAGATCACTGCTGCTTGCAGG-3';*LKB1*-FLAG 正义链:5'-GACGACAAGCATATGATGGAGGTGGTGGACCC-3', 反义链:5'-CCGGGATCCTCTAGATCACTGCTGCTTGCAGG-3';*Smurf1*-HA 正义链:5'-GCCATGGGCCATATGATGTCGAACCCCGGGACA-3', 反义链:5'-CCGGGATCCTCTAGATCACTCCACAGCAAACCC-3'(注:引物序列下方带双下划线的碱基序列为相应载体的 15 bp 同源臂,带虚下划线的碱基序列为目的基因的引物),引物送生工生物工程(上海)股份有限公司合成。提取人胚肾细胞 HEK293T 细胞总的 RNA,以逆转录的 cDNA 为模板,进行 PCR 目的基因扩增。30 mL 体系的 PCR 反应液按试剂盒相关说明进行。预变性 98 °C, 3 min, 1 个循环。98 °C 变性, 15 s; 55 °C 退火, 15 s; 72 °C 延伸 90 s(*LKB1*)或者 150 s(*Smurf1*), 30 个循环。72 °C 延伸 10 min。此外,用于构建目的基因 *LKB1* 和 *Smurf1* 过表达的相应载体 pCMV5-HA 和 pCMV5-FLAG 都使用 *Nde* I、*Xba* I 于 37 °C 过夜双酶切线性化,线性化后的载体与扩增的目的基因片段分别用胶回收试剂盒纯化。采用非连接反应依赖性克隆方法(LIC)构建过表达质粒,该方法相比常规 T4 连接法更高效,其中 *Exonuclease* III 连接酶对双链 DNA 具有 3'→5' 方向外切酶活性逐步催化去除单核苷酸,利用该酶的这个优点设计基因引物与载体大概 15 bp 重复的同源臂序列,然后将目的基因与相应线性化载体按摩尔数比例(2~4:1)混合之后,经 *Exonuclease* III 连接酶在 4 °C、1 h 条件下反应切割后,两者之间形成互补配对的序列,然后通过 60 °C、5 min 退火,冰上冷却 5 min,最后将连接体系转入大肠埃希菌 DH5 α 中,在含氨苄抗性 LB 平板上培养过夜,挑取单克隆,继续用氨苄抗性 LB 液体培养基于 37 °C 培养过夜,提取质粒。用 *Bam*H I 酶切鉴定 pCMV5-*LKB1*-HA/FLAG 质粒,*Bgl* II 酶切鉴定 pCMV5-HA-*Smurf1* 质粒。阳性结果送测序,测序正确即构建质粒成功。

1.4 细胞培养与转染

人胚肾细胞 293T 细胞培养在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中(37 °C, 5% CO₂)。均匀分盘,细胞生长 10~16 h 后细胞密度到达 50%~70% 时,开始转染。转染前 2 h 换预热的(37 °C)培养基。按照 1 mg/mL 的 PEI 转染试剂与表达质粒成(摩尔比 PEI:DNA=3:1)比例转染。转染后 6 h 换预热的完全培养基,继续培养 36~48 h 后观察转染效率或处理细胞进行后续相关实验。

1.5 Western blot 及 Co-Immunoprecipitation 检测相关蛋白表达

弃培养基,预冷的 PBS 洗涤,用预冷的含有 1% PMSF 的蛋白裂解液于冰上裂解细胞 15 min 后收集细胞裂解液,12 000 r/min、15 min 离心,1/3 上清做 Western blot,2/3 上清做 Co-Immunoprecipitation。做 Western blot 的上清加 6 \times SDS,煮沸 8 min,Co-Immunoprecipitation 的上清与适量包被 HA、FLAG 抗体的磁珠混匀,4 °C 孵育过夜,2 000 r/min,2 min 离心洗涤,留适量上清加 6 \times SDS,煮沸 5 min。样品经 SDS-PAGE 电泳分离,转膜,5% 脱脂奶粉封闭, TBST 洗涤, HA、FLAG 一抗(1:3 000)、 β -*actin*(1:5 000)抗体于 4 °C 孵育过夜,洗膜,HRP 标记的二抗(1:8 000)室温孵育 1 h,洗膜,ECL 发光。

1.6 细胞总 RNA 提取和逆转录

弃培养基,预冷的 PBS 洗涤,加入裂解液,用氯仿抽提,后续步骤按相关说明书进行提取总 RNA,然后使用 1 mg 总 RNA 为模板在逆转录酶作用下逆转录为 cDNA。将其保存于 -80 °C 便于后续的定量 PCR 实验。

1.7 qRT-PCR

qRT-PCR 是利用 SYBR Mixture 在 Bio-Rad CFX 96 qRT-PCR 仪上完成。qRT-PCR 程序为预变性 95 °C、10 min,变性 95 °C、15 s,退火/延伸 60 °C、1 min,共 40 循环。*GAPDH* 正义链:5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3',反义链:5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'。*LKB1* 正义链:5'-TTCAAGGTGGACATCTGGTTCG-3',反义链:5'-TGGCCGGTTCGTACTCAA-3'。*Smurf1* 正义链:5'-AAGATCGCACCGAAAGAC-3',反义链:5'-AGAGCCCGTAATAAGGATT-3'。

1.8 统计分析方法

计量数据用均数 \pm 标准差表示,采用 Gel-Pro 软件对 Western blot 结果进行定量分析,并应用 GraphPad Prism 7 软件作图及 SPSS 23.0 统计分析,*Smurf1* 对 *LKB1* 的蛋白相对表达水平以及泛素化水平影响采用单因素方差分析,*Smurf1* 对 *LKB1* 的 mRNA 相对表达水平采用独立样本 *t* 检验分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 利用 Ubibrowser 数据库探寻 *LKB1* 上游调控分子

由于激活后的 *LKB1* 通过磷酸化 *AMPK* 的第 172 位苏

氨酸去激活 AMPK,而活化后的 AMPK 调控能量代谢、自噬、脂肪合成、固醇合成等多种生物学活动,据前文所述, *LKB1* 发挥着多种生物学功能,其上游的调控分子报道尚不完善,而且现报道的这些调控分子的调控机制是相对独立的,那么在生物体内可能存在多种调控 *LKB1* 的上游分子及调控机制,故而充分探索这些上游调控分子是极其必要的。首先,利用 Ubibrowser 数据库 (<http://ubibrowser.ncpsb.org/>) 选择“substrate”,输入目的基因 *LKB1* (*STK11*) 自动进入在线检索程序,程序运行结束之后网站提供预测的可能调控 *LKB1* (*STK11*) 的分子(图 1),然后选择评分最高的 *Smurf1* 分子进行研究,并通过后续的实验证实 *Smurf1* 与 *LKB1* 之间是什么样的关系以及相互之间有何影响。

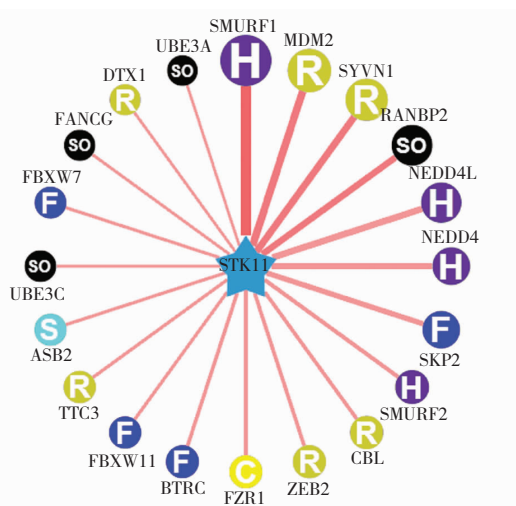


图 1 Ubibrowser 数据库预测的 *LKB1* (*STK11*) 部分上游调控分子

2.2 真核过表达质粒的构建和鉴定

根据 Ubibrowser 数据库预测结果,选择 *Smurf1* 为研究对象,于是构建 *Smurf1* 和 *LKB1* 的一系列重组过表达质粒。以 DL10000、DL2000 DNA marker 为参照, *LKB1* 基因 PCR 产物为 1.2 kb 片段,重组质粒 pCMV5-*LKB1*-HA/FLAG 用 *Bam*H I 酶切鉴定后为 4.7、1.1 kb 片段。*Smurf1* 基因 PCR 产物为 2.2 kb。重组质粒 pCMV5-*Smurf1*-HA 经 *Bg* III 酶切鉴定后依次为 5.1、1.0、0.45 kb 条带大小。实验结果符合预期,将阳性克隆送测序,且测序结果正确。结果表明真核重组质粒 pCMV5-*LKB1*-HA/FLAG 和 pCMV5-*Smurf1*-HA 构建成功(图 2)。

2.3 *Smurf1* 上调了 *LKB1* 表达并增强了 *LKB1* 的稳定性

由 Ubibrowser 数据库预测结果猜想 *Smurf1* 与 *LKB1* 之间可能存在着某种调控关系。为了探索两者之间是何种关系,在 HEK293T 细胞中共转染 *LKB1* 和 *Smurf1* 相关质粒,转染 36 h 后,收集蛋白,用包被 HA 标签抗体的琼脂磁珠去免疫共沉淀蛋白裂解液中的 *Smurf1*,4 °C 过夜,洗脱离心,加适量 6 × SDS 煮沸,最后经 Western blot,用 Flag 标签抗体检测 *LKB1*。Co-Immunoprecipitation 实验发现 *LKB1*-FLAG 与 *Smurf1*-HA 之间存在着相互作用(图 3A)。那么 *Smurf1* 与

LKB1 结合之后对 *LKB1* 有何影响呢? 于是在 HEK293T 细胞中过表达不同含量的野生型的 *Smurf1* (WT) 和 *LKB1*-FLAG 之后,以 β -actin 为内参,采用 Gel-Pro 软件定量分析不同含量的 *Smurf1* 处理对 *LKB1* 表达有何影响?*Smurf1*-WT-HA 组中 0、0.5、1、2 μ g 不同含量下 *LKB1* 的相对表达量分别为 0.0262 ± 0.0007 、 0.0727 ± 0.0003 、 0.1301 ± 0.0013 、 0.4315 ± 0.0010 。经单因素方差分析,结果表明此 4 组中不同浓度野生型 *Smurf1* 对 *LKB1* 表达的影响差异是具有统计学意义的 ($F=79\ 636.433$, $P=0.000$)。与 0 μ g 对照组相比,进一步采用 LSD-*t* 法分析,0.5、1、2 μ g 各组差异统计结果 *P* 值分别为 0.000、0.000、0.000。这说明随着 *Smurf1*-WT 含量的增加, *LKB1* 表达水平逐渐增高 ($P<0.05$),这表明 *Smurf1* 可上调 *LKB1* 的表达(图 3B 左)。

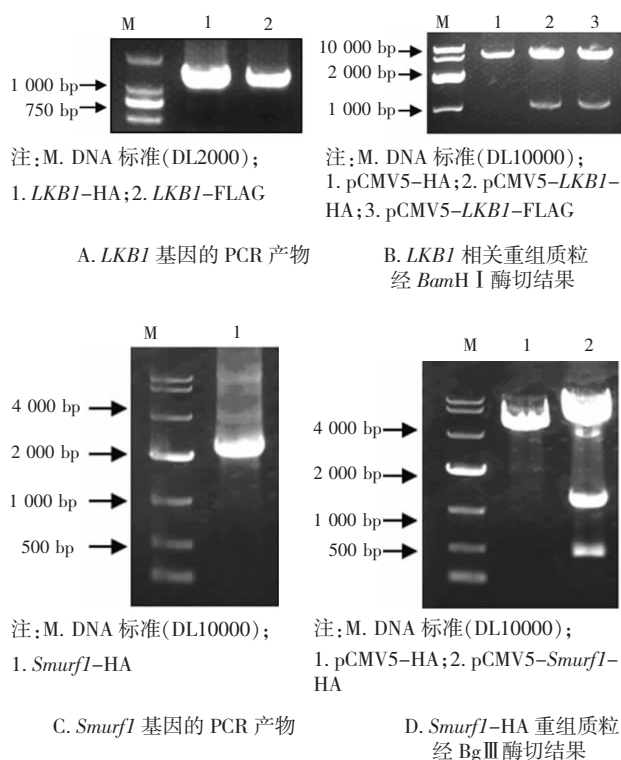


图 2 琼脂糖凝胶电泳实验鉴定 *LKB1* 和 *Smurf1* 的 PCR 产物和酶切结果

那么, *Smurf1* 如何上调 *LKB1* 表达呢? 蛋白量的调节主要受到转录合成与蛋白降解两个方面影响。首先从转录合成来看,以 2-^{ΔΔCt} 法比较 *LKB1* 的 mRNA 水平在不同组别中的差异。以 *GAPDH* 为内参,在未过表达 *Smurf1* 的对照组中, *LKB1* 的相对 mRNA 表达水平为 $1.085\ 1 \pm 0.412\ 5$,在过表达 *Smurf1* 的实验组中, *LKB1* 的相对 mRNA 表达水平为 $2.398\ 2 \pm 1.766\ 9$ 。独立样本 *t* 检验统计分析显示 2 组中 *LKB1* 的相对 mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P=0.257$)(图 3C),这表明 *Smurf1* 对 *LKB1* 的调控不依赖于转录水平调控。由此,本课题组进一步从蛋白质稳定性调控方向探讨机制,泛素蛋白酶体途径是蛋白质选择性降解的主要方式之一,通过 MG132

阻断蛋白酶体,抑制泛素化蛋白降解。以 β -actin 为内参,采用 Gel-Pro 软件定量分析在 MG132 处理下, *Smurf1* (WT/C699A)对 *LKB1* 的泛素化水平有何影响? 未经 *Smurf1* 处理组、野生型 *Smurf1* (WT)处理组、突变型 *Smurf1* (C699A)处理组 *LKB1* 的相对泛素化水平分别为 $1.823\ 8 \pm 0.027\ 8$ 、 $0.088\ 1 \pm 0.005\ 1$ 、 $0.212\ 7 \pm 0.006\ 2$ 。经单因素方差分析该 3 组中不同处理因素下对 *LKB1* 相对泛素化水平的影响差异具有统计学意义的($F=6\ 721.953$, $P=0.000$)。与未经 *Smurf1* 处理组相比,进一步采用 LSD-*t* 法分析,结果表明野生型 *Smurf1* ($P=0.000$)和突变型 *Smurf1* ($P=0.000$)都明显降低了 *LKB1* 的泛素化水平($P<0.05$) (图 3D),这提示 *Smurf1* 可能抑制 *LKB1* 的多聚泛素化修饰。

Smurf1 作为一种 E3 泛素连接酶,主要功能是介导其靶蛋白的多聚泛素化修饰并通过蛋白酶体途径降解,其 C699 位是人源 *Smurf1* 发挥泛素化修饰的功能位点^[20],然而它的突变

体 *Smurf1* (C699A)缺失泛素连接酶活性。在 HEK293T 细胞中过表达突变体 *Smurf1* (C699A),以 β -actin 为内参,采用 Gel-Pro 软件定量分析 *LKB1* 蛋白表达水平, *Smurf1*-C699A-HA 组中 0、0.5、1、2 μ g 不同含量下 *LKB1* 的蛋白相对表达量分别为 $0.018\ 0 \pm 0.000\ 1$ 、 $0.053\ 0 \pm 0.000\ 4$ 、 $0.125\ 0 \pm 0.001\ 0$ 、 $0.200\ 4 \pm 0.001\ 7$ 。经单因素方差分析,结果表明该 4 组中不同浓度突变型 *Smurf1* 对 *LKB1* 表达的影响差异具有统计学意义($F=12\ 887.993$, $P=0.000$)。与 0 μ g 对照组相比,进一步采用 LSD-*t* 法分析,0.5、1、2 μ g 各组差异统计结果 P 值分别为 0.000、0.000、0.000。结果表明随着 *Smurf1* (C699A)含量的增加, *LKB1* 表达水平也是逐渐增高的($P<0.05$) (图 3B 右),且突变型 *Smurf1* 降低 *LKB1* 的泛素化水平($P<0.05$) (图 3D),这提示着 *Smurf1* 对 *LKB1* 的调控不依赖其泛素连接酶活性。总之,这些结果表明了 *Smurf1* 通过不依赖其泛素连接酶活性去降低 *LKB1* 的泛素化水平,从而参与 *LKB1* 蛋白稳定性的调节。

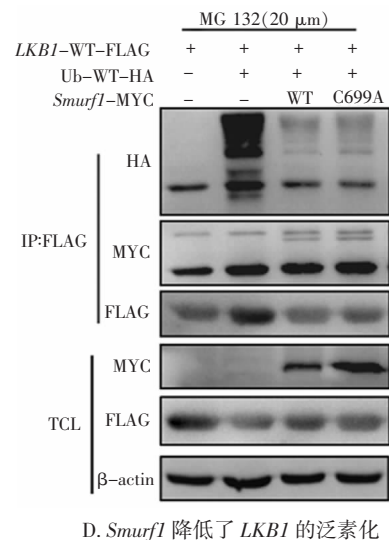
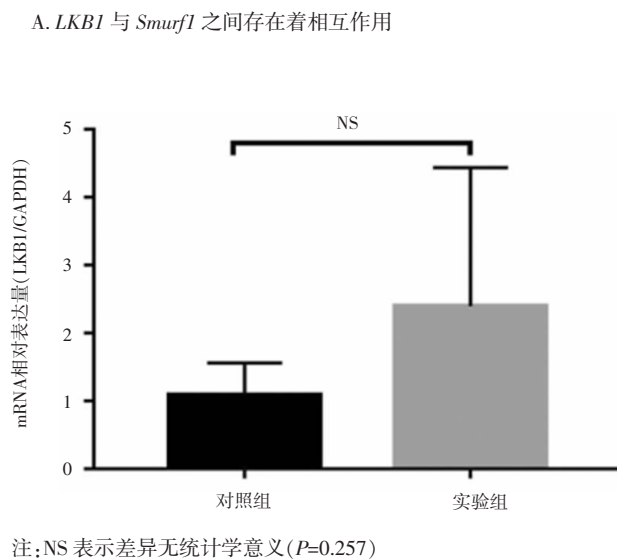
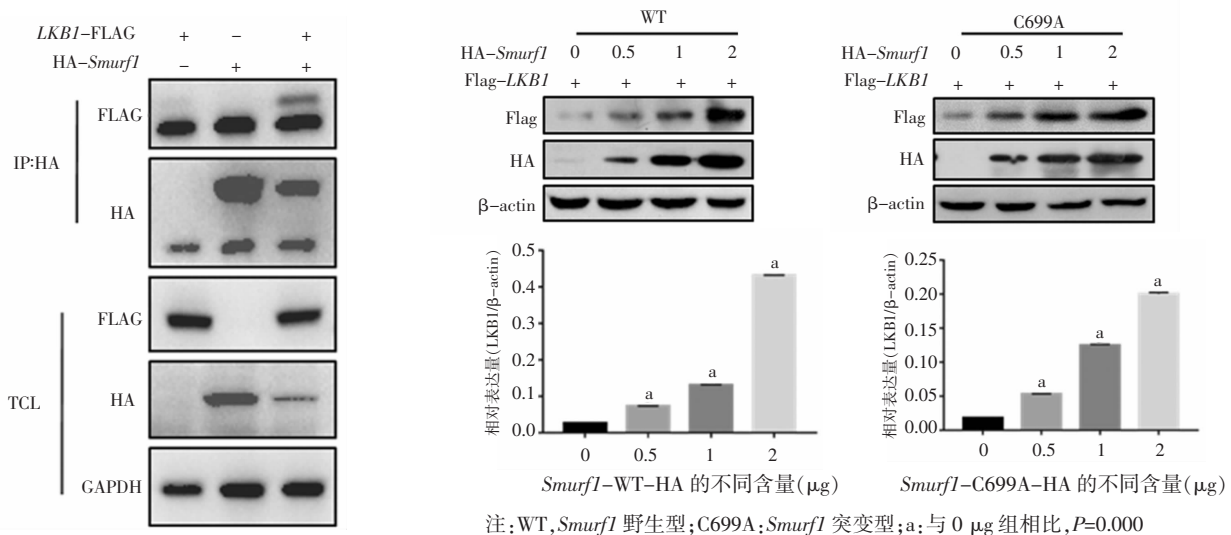


图 3 *Smurf1* 上调了 *LKB1* 的表达及稳定性

3 讨论

LKB1 参与广泛生物学过程。在此,本课题组通过 Ubibrowser 数据库预测及细胞学实验,发现并证实泛素连接酶 *Smurf1* 正调控 *LKB1* 的蛋白表达,作用机制为 *Smurf1* 与 *LKB1* 直接结合,并通过非泛素连接酶活性抑制 *LKB1* 的多聚泛素化降解,继而提高了 *LKB1* 的稳定性。

泛素化修饰参与蛋白质功能调节及降解过程。多聚泛素化修饰通常发生在泛素(Ub)分子的第 48 或第 63 位赖氨酸(K48/K63),K63 位多聚泛素化修饰多与细胞信号活性调控相关^[21],K48 位的泛素化多促进靶蛋白经蛋白酶体途径降解^[22]。最近 1 项研究发现,*LKB1* 经 Skp2-SCF 以 K63 多聚泛素化修饰之后,增强了 *LKB1*-*STRADα*-*MO25* 复合体完整性,从而在能量应激时增强了细胞生存能力^[23]。而 *CHIP* 结合 *HSP70* 后可以促进 *LKB1* 泛素化降解^[24],揭示了泛素化在 *LKB1* 功能调节中的重要作用。

Smurf1 作为泛素连接酶,主要通过多聚泛素化修饰靶蛋白促进其降解^[18-19]。然而,本研究发现 *Smurf1* 通过非泛素连接酶活性调节 *LKB1* 的稳定性。有研究也报道了 *Smurf1* 通过调节 *Nur77* 的非经典泛素化来阻断 *Nur77* 的降解^[25],该研究中作为 E3 泛素连接酶 *Smurf1* 也并没有对 *Nur77* 起到促降解作用,反而稳定了 *Nur77*,这表明 *Smurf1* 可能存在着多种生物学功能,而这些功能中不仅仅是起到 E3 泛素连接酶活性。此外,这种作用方式也类似于我们之前报道的 E3 泛素连接酶 *Rn25* 通过竞争性结合 *Nkd1*(非泛素连接酶活性)破坏 *Nkd1*-*Axin* 复合体,进而抑制 *Wnt* 信号通路^[26]。目前已知的 *CHIP* 促进 *LKB1* 泛素化降解,但是其具体的修饰位点仍然未知。本课题组推测,*Smurf1* 有可能通过与 *CHIP* 竞争性结合 *LKB1*,或者 *Smurf1* 结合 *LKB1* 后影响了 *CHIP* 对 *LKB1* 的泛素化修饰,继而减少了 *LKB1* 多聚泛素化降解,具体机制仍有待进一步探究。此外,一个 E3 泛素连接酶是否对靶分子起到泛素化降解作用,除了底物靶分子的特异性和机体所处的内外环境等因素之外,还取决于泛素分子的泛素化类

型,除了常见的 K48、K63 型泛素化修饰之外,泛素分子还具有 K6、K11、K27、K29、K33、Met1 其他 6 种类型的泛素化修饰形式^[27],所以同一个泛素连接酶对不同的靶分子可能存在着不同类型的泛素化修饰形式,从而发挥着不同的功能,而这些功能可能不一定是泛素化降解作用。此外,E3 泛素连接酶可能对其他也调控靶分子的分子起到某些调控作用而间接地调控靶分子,这些可能的调控机制亟待深入研究。

据现有研究报道 *LKB1* 参与多种分子的调控中,比如 *LKB1* 调控 *AMPK*、*NUAK1*、*SNRK*、*BRSK1* 和 *BRSK2* 等 14 种 *AMPK* 相关蛋白激酶^[7],而其中研究较多的 *LKB1*-*AMPK* 信号通路是最经典的。首先,单纯 *LKB1* 量的上调,并不能直接促进 *AMPK* 的活化,*LKB1* 与 *AMPK* 的结合依赖于 *STRADα*、*MO25*、*Axin* 的辅助,*Axin*^{-/-} 细胞模型中 *LKB1* 不能活化 *AMPK*^[9]。此外,在能量应激时,*AMPKγ* 亚基结合 *AMP*,引起 *AMPKα* 亚基变构暴露 T172 位点,才能被 *LKB1* 识别和磷酸化修饰而激活^[28]。也有研究报道 *LKB1* 的 K63 多聚泛素化修饰有助于 *AMPK* 的活化^[23]。本研究表明 *Smurf1* 能上调 *LKB1* 蛋白的表达,且 *Smurf1* 过表达时明显抑制了 *LKB1* 多聚泛素化过程,那么经 *Smurf1* 调控后的 *LKB1* 对其所调控的信号通路是否有何影响呢? 比如对 *LKB1* 调控的经典的 *LKB1*-*AMPK* 信号通路有何影响呢? 因此,*Smurf1* 对 *LKB1*-*AMPK* 信号通路及其他 *LKB1* 所调控的信号通路的功能研究也亟待进行。本研究内容为丰富完善 *LKB1* 上下游的调控分子研究中提供了一定的铺垫,为详尽阐明 *LKB1* 在生物体中发挥生物学功能的机制研究提供了一定的实验证据。

参 考 文 献

- [1] Mehenni H, Gehrig C, Nezu J, et al. Loss of *LKB1* kinase activity in Peutz-Jeghers syndrome, and evidence for allelic and locus heterogeneity[J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 63(6): 1641-1650.
- [2] Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome[J]. *Duodecim*, 1998, 114(7): 667-668.

- [3] Sanchez-Céspedes M. The role of *LKB1* in lung cancer[J]. *Fam Cancer*, 2011, 10(3):447–453.
- [4] Avizienyte E, Loukola A, Roth S, et al. *LKB1* somatic mutations in sporadic tumors[J]. *Am J Pathol*, 1999, 154(3):677–681.
- [5] Xiao B, Sanders MJ, Carmena D, et al. Structural basis of *AMPK* regulation by small molecule activators[J]. *Nat Commun*, 2013, 4:3017.
- [6] Hardie DG, Alessi DR. *LKB1* and *AMPK* and the cancer–metabolism link—ten years after[J]. *BMC Biol*, 2013, 11:36.
- [7] Shackelford DB, Shaw RJ. The *LKB1*–*AMPK* pathway: metabolism and growth control in tumour suppression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(8):563–575.
- [8] Boudeau J, Baas AF, Deak M, et al. *MO25α/β* interact with *STRAD α/β* enhancing their ability to bind, activate and localize *LKB1* in the cytoplasm[J]. *EMBO J*, 2003, 22(19):5102–5114.
- [9] Zhang Y, Guo H, Zhang C, et al. AMP as a low–energy charge signal autonomously initiates assembly of *AXIN*–*AMPK*–*LKB1* complex for *AMPK* activation[J]. *Cell Metab*, 2013, 18(4):546–555.
- [10] Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N, et al. *SIRT1* modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of *LKB1*. Possible role in AMP–activated protein kinase activation[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(41):27628–27635.
- [11] Xie Z, Dong Y, Scholz R, et al. Phosphorylation of *LKB1* at serine 428 by protein kinase C–zeta is required for metformin–enhanced activation of the AMP–activated protein kinase in endothelial cells[J]. *Circulation*, 2008, 117(7):952–962.
- [12] Song P, Xie Z, Wu Y, et al. Protein kinase Czeta–dependent *LKB1* serine 428 phosphorylation increases *LKB1* nucleus export and apoptosis in endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(18):12446–12455.
- [13] Xie Z, Dong Y, Zhang J, et al. Identification of the serine 307 of *LKB1* as a novel phosphorylation site essential for its nucleocytoplasmic transport and endothelial cell angiogenesis[J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(13):3582–3596.
- [14] Pols TW, Ottenhoff R, Vos M, et al. *Nur77* modulates hepatic lipid metabolism through suppression of *SREBP1c* activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 366(4):910–916.
- [15] Zhan YY, Chen Y, Zhang Q, et al. The orphan nuclear receptor *Nur77* regulates *LKB1* localization and activates *AMPK*[J]. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(11):897–904.
- [16] Zheng X, Chi J, Zhi J, et al. Aurora–A–mediated phosphorylation of *LKB1* compromises *LKB1/AMPK* signaling axis to facilitate NSCLC growth and migration[J]. *Oncogene*, 2017, 37(4):502–511.
- [17] Ritho J, Arold ST, Yeh ET. A critical *SUMO1* modification of *LKB1* regulates *AMPK* activity during energy stress[J]. *Cell Rep*, 2015, 12(5):734–742.
- [18] Morén A, Raja E, Heldin CH, et al. Negative regulation of *TGFβ* signaling by the kinase *LKB1* and the scaffolding protein *LIP1*[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(1):341–353.
- [19] 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.
- [20] Wang HR, Zhang Y, Ozdamar B, et al. Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting *RhoA* for degradation[J]. *Science*, 2003, 302(5651):1775–1779.
- [21] Chen ZJ, Sun LJ. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling[J]. *Mol Cell*, 2009, 33(3):275–286.
- [22] Komander D, Rape M. The ubiquitin code[J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81(7):203–229.
- [23] Lee SW, Li CF, Jin G, et al. Skp2–dependent ubiquitination and activation of *LKB1* is essential for cancer cell survival under energy stress[J]. *Molecular Cell*, 2015, 57(6):1022–1033.
- [24] Gaude H, Aznar N, Delay A, et al. Molecular chaperone complexes with antagonizing activities regulate stability and activity of the tumor suppressor *LKB1*[J]. *Oncogene*, 2012, 31(12):1582–1591.
- [25] Lin H, Lin Q, Liu M, et al. *PKA/Smurf1* signaling–mediated stabilization of *Nur77* is required for anticancer drug cisplatin–induced apoptosis[J]. *Oncogene*, 2014, 33(13):1629–1639.
- [26] Gao R, Ma LQ, Du X, et al. *Rnf25/AO7* positively regulates wnt signaling via disrupting *Nkd1*–*Axin* inhibitory complex independent of its ubiquitin ligase activity[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(17):23850–23859.
- [27] Kulathu Y, Komander D. Atypical ubiquitylation—the unexplored world of polyubiquitin beyond *Lys48* and *Lys63* linkages[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(8):508–523.
- [28] Alessi DR, Sakamoto K, Bayascas JR. *LKB1*–dependent signaling pathways[J]. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75:137–163.

(责任编辑:冉明会)