

# 泛素化和SUMO化对DEC1的拮抗调控作用

潘洪明 赵 锋 伍会健\*

(大连理工大学生命科学与技术学院, 大连 116024)

**摘要** 分化的胚软骨表达蛋白1(differentiated embryo-chondrocyte expressed gene 1, DEC1)作为一种时钟蛋白,除了在周期节律的调控中发挥转录抑制作用外,还在能量代谢以及多种肿瘤相关的信号通路的调控中发挥重要作用。此外,蛋白质的翻译后修饰是实现蛋白质功能精细调控的一种重要方式。目前发现,DEC1主要可被两种翻译后修饰,即泛素化和SUMO化修饰。尽管泛素化和SUMO化是两种过程非常类似的蛋白质翻译后修饰方式,但是它们对目的蛋白功能的调控却截然不同。由于泛素化和SUMO化与底物的作用靶点都是赖氨酸(Lys),因此在多数情况下,泛素化和SUMO化以拮抗性的方式调控底物蛋白的功能。鉴于此,该文旨在阐述泛素化和SUMO化修饰对DEC1功能的拮抗调节过程,为了解时钟蛋白DEC1对多种信号通路的调控过程中的分子机制提供新的思路。

**关键词** 泛素化修饰; SUMO化修饰; DEC1

## 引言

Shen等<sup>[1]</sup>在1997年将一种能够穿过细胞膜的cAMP加入培养基后发现,这样的培养基能够显著地诱导人软骨细胞的分化。随后发现了一种新的蛋白在软骨细胞分化的过程中起着非常重要的作用,将其命名为DEC1(differentiated embryo-chondrocyte expressed gene 1)。随着研究的深入,人们在不同的哺乳动物细胞中都发现了DEC1的表达,并根据其来源的不同分别命名为SHARP2、Stra13、bHLH2等。越来越多的研究证实了DEC1是一个基本的时钟蛋白,在维持生物体的周期节律过程中起着重要的作用;同时,DEC1与细胞的生长、分化、衰老等许多生理过程以及与肿瘤的发生和发展也有着密切的关系<sup>[2-3]</sup>。

蛋白质的翻译后修饰是实现蛋白质功能多样性的一个重要方式,在生物体的各种生理活动中发挥重要的作用,主要包括调节蛋白质的定位、稳定性以及转录活性等。蛋白质的翻译后修饰使蛋白质的结构更为复杂,相关功能的调节更为细致。在生物体内常见的蛋白质翻译后修饰方式有磷酸化、泛素化以及SUMO化等<sup>[4]</sup>。蛋白质的这些翻译后修饰并不是独立地存在的,而是多种修饰方式共同作用于一个或者多个信号通路,从而调节了目的基因的表达。目前,人们对DEC1的翻译后修饰的研究不是很多,主要发现DEC1能被泛素化和SUMO化修饰<sup>[5-6]</sup>。

## 1 DEC1蛋白的结构和功能

DEC1含有一个碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)结构域,因此,它也是bHLH超家族中的一个转录因子。DEC1由412个氨基酸组成,分子量大约为45 kDa。DEC1除了在其N端含有bHLH结构域外,在其C端还发现含有三个 $\alpha$ 螺旋结构域。DEC1的bHLH结构主要是由碱性区域和HLH区域两部分构成的,其中,碱性区域主要负责DEC1与目的基因启动子上的E-box元件结合,而HLH结构则主要介导了与其它蛋白质之间的相互作用。除此之外,C末端的三个 $\alpha$ 螺旋结构则与DEC1介导的某些转录抑制过程密切相关<sup>[7]</sup>。DEC1结构的复杂性决定了其功能上的多样性。

在哺乳动物周期节律系统中,DEC1通过募集组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase 1, HDAC1)抑制CLOCK/BMAL1异二聚体介导的下游基因的转录<sup>[8]</sup>。在对能量代谢的调控中,DEC1可与代谢相关的视黄酸X受体(retinoic acid X receptor, RXR)发生相互作用,并抑制RXR转录活性,降低由RXR-肝X受体(liver X receptor, LXR)介导的下游靶基因的表达,说

收稿日期: 2012-02-07 接受日期: 2012-03-07

国家自然科学基金(No.31171353)和国家重点基础研究发展规划(973计划)(No.2011CB504201)资助项目

\*通讯作者。Tel/Fax: 0411-84706105, E-mail: wuhj@dlut.edu.cn

明DEC1可调控配体依赖性LXR信号通路,并在RXR-LXR异二聚体中作为辅抑制因子发挥功能<sup>[9]</sup>。在低氧条件下,DEC1抑制过氧化物酶体增生物激活受体(peroxisome proliferators activator receptors, PPAR)的启动子活性,从而作为低氧介导的抑制脂肪生成的效应子发挥功能<sup>[10]</sup>。

另外,DEC1在胚胎发育、增殖、凋亡、细胞分化等方面均发挥重要作用。基于此,研究发现DEC1在多种肿瘤中表达异常。在胃癌组织中,DEC1表达上调,值得注意的是,DEC1表达的上调与低分化的肿瘤组织相关,这说明DEC1与胃癌的低分化和发展程度有着密切关系<sup>[11-12]</sup>。而在非小细胞肺癌中,DEC1的缺失是恶性转变的早期标志之一。肺癌早期,DEC1的基因启动子通常高甲基化,从而伴随其低表达;而随着肿瘤低氧环境的形成,DEC1表达被激活,表明在肺癌发生发展的不同时期,DEC1发挥着不同的作用,而在这一过程中,不同的通路调控可能对DEC1发挥不同的功能<sup>[13]</sup>。在乳腺癌组织中,从正常组织到侵染性肿瘤组织伴随着DEC1表达的上调,而临床研究也发现,DEC1的表达与肿瘤发展的程度呈明显的正相关<sup>[14]</sup>。然而在肝癌组织中,与邻近正常组织相比,肝癌组织的DEC1主要呈细胞核分布,但细胞核中随着肝癌组织分化程度的降低,DEC1的表达逐渐降低<sup>[15]</sup>。由此看见,在肝癌细胞中,DEC1的低表达与组织的低分化及恶性程度密切相关。但DEC1在肝癌细胞中的这种分布还需要进一步研究。综上所述可以看出,DEC1与多种肿瘤的发生发展都有着密切的关系。

## 2 泛素化及SUMO化修饰机制

生物体内蛋白质降解的信号通路对维持细胞正常的生理过程是至关重要的。细胞通过泛素化降解通路能够迅速地抑制或者激活生物体内的相关信号通路以对外界环境的刺激作出正确的应答反应。哺乳动物细胞内的泛素化修饰是由泛素蛋白介导的,泛素是一个由76个氨基酸组成的非常保守的多肽,由于泛素在真核生物的细胞内是广泛存在的,因此将其命名为泛素。当蛋白质与泛素分子共价结合后可被蛋白酶体识别,随后靶蛋白被水解掉,这是细胞内短周期蛋白以及一些外源蛋白降解的普遍途径。因此,泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)在真核细胞内起着非常重要的调节作用<sup>[16-17]</sup>。泛素介导的蛋白质降解过程需要三种酶的参与,即泛素激活酶(E1)、泛素结合酶(E2)和泛素连接酶(E3)<sup>[18]</sup>。UPS系统介导的蛋白质降解通路是一个受到多步骤精细调控的过程(图1)。首先,非活性的泛素分子在激活酶E1的作用下转变为活性状态的泛素;然后,活化后的泛素在结合酶E2的作用下形成E2-Cys-Ub复合物;随后,结合复合物在连接酶E3的作用下与底物分子结合;最后,底物在结合复合物的介导下经蛋白酶体通路降解。

SUMO, 即类泛素修饰物,所谓类泛素指的是SUMO的三维结构和修饰过程与泛素非常类似,但不同的是泛素化修饰主要介导了蛋白质的降解,而SUMO化修饰,在蛋白间相互作用、蛋白的细胞定位、转录因子的转录活性、基因组稳定性等方面都发挥重要的调控作用。

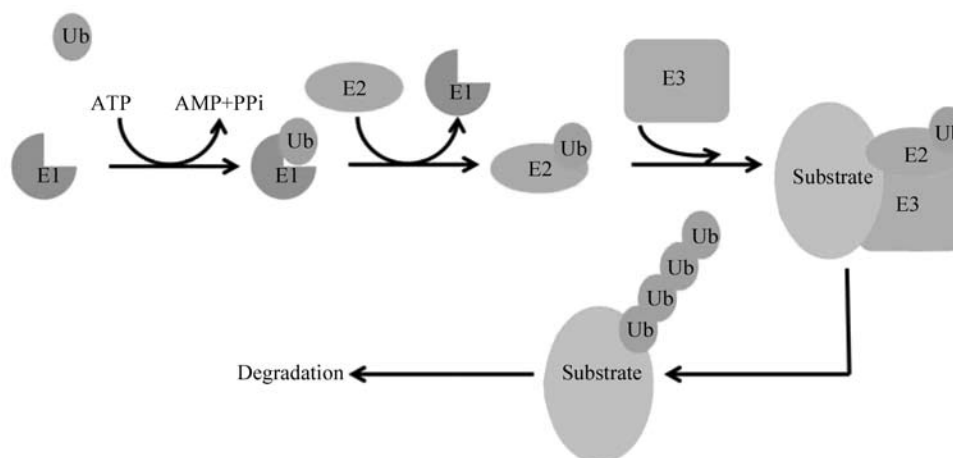


图1 泛素化修饰系统

Fig.1 Ubiquitin-proteasome system

SUMO化修饰是SUMO蛋白与其作用底物赖氨酸残基共价结合的过程。目前,人们已经确定了几十种分布广泛的SUMO化修饰的靶蛋白,包括核受体、转录因子、基因组结构蛋白等<sup>[19]</sup>。由于SUMO是一种类泛素蛋白,因此它与底物结合过程与泛素类似,通过活化酶E1、结合酶E2和连接酶E3这一系列酶的作用对靶蛋白进行修饰,而且这种修饰过程是可逆的,可以通过SUMO特异性蛋白酶(SUMO-specific protease, SENPs)作用使SUMO分子从靶蛋白上解离出来,从而形成一个可逆的循环过程(图2)<sup>[20-21]</sup>。虽然在修饰过程中类似,但在对SUMO前体的加工中略微不同。在哺乳动物细胞中, SUMO通常也是以前体形式存在的,通过SENPs的切割,使其C末端的双Gly残基暴露出来,形成成熟的SUMO,从而对底物进行修饰。通过序列同源性比对分析,发现在哺乳动物细胞中主要含有五种SUMO特异性蛋白酶,分别为SEN1、SEN2、SEN3、SEN5和SEN6。研究发现,所有的SENPs都含有一个保守的催化结构域,但N末端具有较大的差别,这就决定了SENPs在细胞中的不同的功能和定位。

### 3 DEC1的SUMO化修饰与泛素化修饰的拮抗调控作用

Ivanova等<sup>[5]</sup>利用酵母双杂交实验发现DEC1能够与泛素结合酶Ubc9(Ubiquitin-conjugating enzyme, Ubc9)相互作用,并且在哺乳动物细胞中也同样证实了DEC1能够与Ubc9结合。进一步的研究发现,DEC1在泛素结合酶Ubc9的介导下能够被泛素化修饰,并导致了DEC1经26S蛋白酶体途径而降解。在HEK293细胞中用蛋白质合成抑制剂放线菌酮(cycloheximide, CHX)处理细胞后发现, DEC1的半

衰期大约为12 h, 而DEC1的C末端(184~412)缺失体的稳定性显著降低, 半衰期缩短为2 h。这就说明了DEC1的C末端与其泛素化修饰以及稳定性是密切相关的。

SUMO与靶蛋白赖氨酸残基特异性结合, 需要靶蛋白的赖氨酸残基处于特定的结构中。多数情况下, 靶蛋白的SUMO化修饰发生在保守的 $\Psi$ KXE/D基序上, 其中,  $\Psi$ 代表的是一个大的疏水氨基酸, 而X代表一个任意氨基酸。但也并不是所有的SUMO化底物都含有这个保守的 $\Psi$ KXE基序<sup>[22]</sup>。通过氨基酸序列分析后发现, DEC1上含有两个潜在的SUMO化位点, 即位于C末端的第159位赖氨酸(K159)和第279位赖氨酸(K279)。利用定点突变技术以及免疫印记的方法确定DEC1能够被SUMO化修饰, 并且K159和K279是其主要的两个SUMO化位点。进一步研究DEC1的SUMO化对其功能的影响发现, SUMO化修饰能够促进DEC1作为转录抑制因子对由CLOCK/BMAL1介导的时钟基因表达的抑制作用<sup>[6]</sup>。另外, 将DEC1上两个SUMO化位点K159和K279突变后能够使得DEC1的半衰期缩短为6 h左右, 说明SUMO化修饰还可以延长DEC1的半衰期, 并可以提高其稳定性<sup>[6]</sup>。由于DEC1的稳定性与其泛素化修饰水平密切相关, 因此, 利用免疫共沉淀的方法发现SUMO化位点突变的DEC1的泛素化水平显著高于野生型的DEC1, 这就证明了SUMO化修饰通过抑制DEC1的泛素降解通路提高它的稳定性。

对SUMO与泛素分子的氨基酸序列分析后发现, 尽管SUMO-1只有18%的残基与泛素是相同的, 然而, 它们的空间结构以及对底物蛋白的修饰过程却非常相似。不同之处在于SUMO上有一个N末端延伸而泛素却没有, 更重要的一点是, SUMO表面带

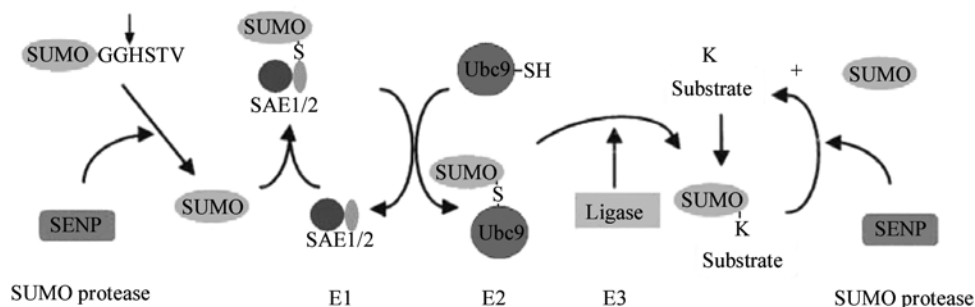


图2 SUMO化修饰过程(根据参考文献[21]修改)

Fig.2 The process of SUMOylation(modified from reference [21])

的是负电荷而泛素分子表面带的是正电荷, 这也许就影响了它们的酶和底物结合的特异性以及各自不同的生物学功能<sup>[22]</sup>。泛素化修饰主要介导了底物蛋白经过26S蛋白酶体介导的降解过程; 而SUMO化修饰对靶蛋白的功能具有广泛的影响, 包括调节转录因子的转录活性、蛋白质之间的相互作用、蛋白质的细胞定位以及稳定性等方面。由于泛素化与SUMO化的靶点都是赖氨酸, 因此在多数情况下, 泛素化与

SUMO化修饰能够拮抗性地调控底物蛋白的功能。DEC1的SUMO化位点突变体能够显著降低DEC1的泛素化水平, 说明DEC1的两个SUMO化位点也可能是它的两个泛素化位点。SUMO化修饰通过拮抗性地抑制DEC1的泛素化以提高DEC1的稳定性, 并进一步影响了DEC1的功能(图3)。虽然发现DEC1可被泛素及SUMO修饰, 但其泛素E3连接酶及SUMO E3连接酶目前还没有被发现, 有待于进一步研究。

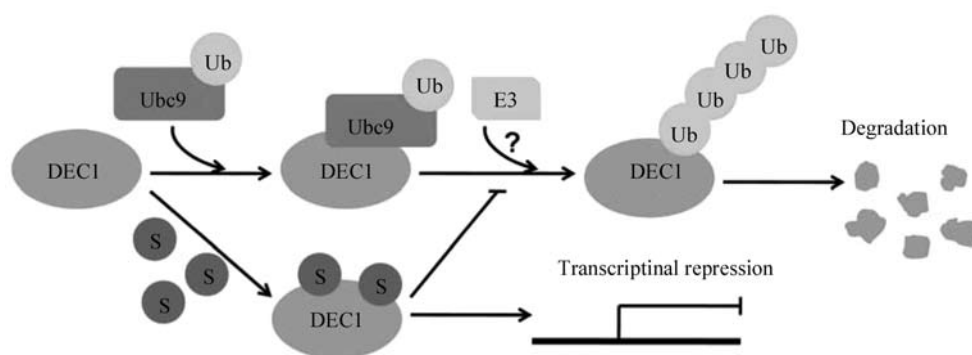


图3 DEC1的SUMO化与泛素化间的拮抗作用

Fig.3 The antagonism effect between ubiquitination and SUMOylation of DEC1

#### 4 结语

不同的翻译后修饰方式对蛋白质的功能有不同的调控作用, 这就进一步增加了蛋白质功能的多样性。由于泛素化和SUMO化修饰底物的靶点都是赖氨酸残基, 因此, 这为泛素化和SUMO化拮抗性地调节时钟蛋白DEC1的稳定性, 并进一步影响其相关的功能提供了作用基础。SUMO化修饰通过抑制泛素化通路来延长DEC1的半衰期, 提高其稳定性, 这就增加了DEC1在细胞核中发挥转录调控作用的时间, 从而对DEC1调控的相关基因的表达产生影响。不同翻译后修饰对同一靶蛋白的共同作用是一个级联效应, 并能对生物体的不同生理过程产生重要的影响。因此, 泛素化与SUMO化对DEC1的拮抗调控作用为我们进一步了解DEC1对多种信号通路的精细调控提供了新的思路。

#### 参考文献 (References)

- Shen M, Kawamoto T, Yan W, Nakamasu K, Tamagami M, Koyano Y, *et al.* Molecular characterization of the novel basic helix-loop-helix protein DEC1 expressed in differentiated human embryo chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236(2): 294-8.
- Nakashima A, Kawamoto T, Honda KK, Ueshima T, Noshiro M, Iwata T, *et al.* DEC1 modulates the circadian phase of clock gene expression. *Mol Cell Biol* 2008; 28(12): 4080-92.
- 敖翔, 李淑晶, 伍会健. 周期节律与肿瘤关系的分子机理. *中国生物化学与分子生物学报* 2010; 26(11): 998-1002.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007; 128(4): 693-705.
- Ivanova AV, Ivanov SV, Danilkovitch-Miagkova A, Lerman MI. Regulation of STRA13 by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein, hypoxia, and the UBC9/ubiquitin proteasome degradation pathway. *J Biol Chem* 2001; 276(18): 15306-15.
- Hong Y, Xing X, Li S, Bi H, Yang C, Zhao F, *et al.* SUMOylation of DEC1 protein regulates its transcriptional activity and enhances its stability. *PLoS One* 2011; 6(8): e23046.
- Sun H, Taneja R. Stra13 expression is associated with growth arrest and represses transcription through histone deacetylase (HDAC)-dependent and HDAC-independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(8): 4058-63.
- Sato F, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M, Honda KK, Honma S, *et al.* Functional analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 in circadian regulation. Interaction with BMAL1. *Eur J Biochem* 2004; 271(22): 4409-19.
- Cho Y, Noshiro M, Choi M, Morita K, Kawamoto T, Fujimoto K, *et al.* The basic helix-loop-helix proteins differentiated embryo chondrocyte (DEC) 1 and DEC2 function as corepressors of retinoid X receptors. *Mol Pharmacol* 2009; 76(6): 1360-9.
- Yun Z, Maecker HL, Johnson RS, Giaccia AJ. Inhibition of PPAR

- gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stral3: A mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev Cell* 2002; 2(3): 331-41.
- 11 Zheng Y, Jia Y, Wang Y, Wang M, Li B, Shi X, *et al.* The hypoxia-regulated transcription factor DEC1 (Stra13, SHARP-2) and its expression in gastric cancer. *Omics* 2009; 13(4): 301-6.
  - 12 Zheng Y, Shi X, Wang M, Jia Y, Li B, Zhang Y, *et al.* The increased expression of DEC1 gene is related to HIF-1 $\alpha$  protein in gastric cancer cell lines. *Mol Biol Rep* 2011; 39(4): 4229-36.
  - 13 Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Turley H, Wykoff CC, Gatter KC, *et al.* DEC1 (STRA13) protein expression relates to hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  and carbonic anhydrase-9 overexpression in non-small cell lung cancer. *J Pathol* 2003; 200(2): 222-8.
  - 14 Chakrabarti J, Turley H, Campo L, Han C, Harris AL, Gatter KC, *et al.* The transcription factor DEC1 (stra13, SHARP2) is associated with the hypoxic response and high tumour grade in human breast cancers. *Br J Cancer* 2004; 91(5): 954-8.
  - 15 Shi XH, Zheng Y, Sun Q, Cui J, Liu QH, Qu F, *et al.* DEC1 nuclear expression: A marker of differentiation grade in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2011; 17(15): 2037-43.
  - 16 Pickart CM. Back to the future with ubiquitin. *Cell* 2004; 116(2): 181-90.
  - 17 Hershko A, Ciechanover A, Varshavsky A. Basic medical research award. The ubiquitin system. *Nat Med* 2000; 6(10): 1073-81.
  - 18 杨春华, 刘 英, 伍会健.  $\beta$ -Trecp与肿瘤关系的研究. *中国细胞生物学学报* 2011; 33(7): 796-801.
  - 19 Johnson ES. Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 355-82.
  - 20 Anckar J, Sistonen L. SUMO: Getting it on. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(Pt 6): 1409-13.
  - 21 肖利云, 杨春华, 邢欣荣, 伍会健. SENP1与前列腺癌. *中国生物化学与分子生物学报* 2008; 24(3): 209-13.
  - 22 Schwartz DC, Hochstrasser M. A superfamily of protein tags: Ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem Sci* 2003; 28(6): 321-8.

## The Antagonism Regulation of Ubiquitination and SUMOylation for DEC1

Pan Hongming, Zhao Feng, Wu Huijian\*

(School of life Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

**Abstract** DEC1 (differentiated embryo-chondrocyte expressed gene 1) is a clock protein which plays negative roles in regulation of circadian rhythm. Besides, DEC1 also takes important effect in metabolism and multi-tumor related signaling pathway. Moreover, post-translational modification is also an important regulation way to achieve the meticulous regulation of the protein functions. Recently, DEC1 could mainly be modified by two post-translational modifications—ubiquitination and SUMOylation. Although the processes of ubiquitination and SUMOylation are very similar, it is distinct in regulating the function of substrate proteins. Since the substrate target of both ubiquitination and SUMOylation is Lysine (Lys), it is usually ubiquitination and SUMOylation that antagonistically regulate the functions of substrate protein. Therefore, this article aims to describe the antagonism regulation of ubiquitination and SUMOylation for DEC1, which gives new insights into the molecular mechanism of clock protein DEC1 in regulating multi-signaling pathway.

**Key words** ubiquitination; SUMOylation; DEC1

Received: February 7, 2012 Accepted: March 7, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31171353) and the State Key Development Program for Basic Research of China (No.2011CB504201)

\*Corresponding author. Tel/Fax: 86-411-84706105, E-mail: wuhj@dlut.edu.cn