

领域前沿 · 中国



张雷, 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所研究员, 博士生导师, 上海科技大学特聘教授。2001年毕业于中国科学院遗传与发育生物学研究所, 获得发育生物学博士学位; 2001年至2009年在美国西南医学中心先后为博士后、助理讲师; 2009年获中国科学院“百人计划”引进国外杰出人才项目资助, 回国建立实验室。张雷博士长期从事Hippo等信号转导通路异常与疾病发生的遗传与分子机理研究, 课题组主要利用果蝇遗传学模型, 并结合哺乳动物细胞系与疾病小鼠模型, 研究Hippo信号通路调控干细胞增殖与分化、组织发育和器官生长的分子遗传机制, 通过揭示Hippo通路异常导致相关疾病发生发展的分子机理, 为疾病的诊断和治疗提供策略和靶标。已在Dev Cell、PLoS Biol、eLife、Nat Commun、Cancer Cell、Cell Res等学术期刊发表论文40余篇。现任《中国细胞生物学学报》、《Acta Biochim Biophys Sin》、《遗传》等杂志的编委。上海市“浦江人才”获得者。

Hippo信号调控果蝇中肠稳态维持的机制研究

王超 张文翔 殷梦昕 张雷*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 细胞生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 Hippo信号通路是近年来发现在进化上高度保守的肿瘤抑制信号通路, 能通过协调细胞增殖与凋亡来控制组织、器官发育的大小, 并在干细胞的自我更新及组织稳态维持中发挥着极其重要的作用。Hippo信号通路关键成员的活性异常可以导致包括癌症在内的多种疾病的发生。因此, Hippo信号通路成员的蛋白稳定性调控是Hippo信号通路研究的重点之一。果蝇中的研究表明, Hippo信号通路上游成员Pez的蛋白稳定性受NEDD4(neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4)家族泛素连接酶Su(dx)及Kibra的共同调节, 进一步的研究揭示了该调控过程的具体分子机制。该调控在维持果蝇中肠干细胞(intestinal stem cell, ISC)稳态平衡中发挥了重要作用。在哺乳动物细胞中的研究则提示该调控机制存在进化上的保守性。这些研究成果不仅加深了我们对Hippo信号通路调控果蝇中肠稳态功能的认识, 还为我们研究相关肿瘤发生发展的机制和发掘潜在的肿瘤治疗靶点提供了新的思路。

关键词 Hippo信号通路; 果蝇中肠干细胞; 癌症; Pez; E3泛素连接酶; Su(dx)

The Study on the Regulatory Mechanisms of *Drosophila* Midgut Homeostasis by Hippo Signaling

Wang Chao, Zhang Wenxiang, Yin Mengxin, Zhang Lei*

(State Key Laboratory of Cell Biology, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract The Hippo signaling is a recently discovered and a highly conserved pathway that regulates

*通讯作者。Tel: 021-54921336, E-mail: rayzhang@sibcb.ac.cn

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921336, E-mail: rayzhang@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2015-05-04 17:13

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150504.1713.004.html>

not only tissue growth and organ size, but also participates in the maintenance of stem cells. The Hippo pathway exhibits its function via balancing cell proliferation and apoptosis. Malfunction of the key components of Hippo signaling could lead to development of various diseases, including cancers. Therefore, one of our research focuses is to dissect the regulatory mechanisms of the protein stability of the Hippo pathway components. In our study, we found Pez, one of the upstream component of the Hippo pathway, is regulated by E3 ubiquitin ligase, suppressor of deltex [Su(dx)], and Pez-binding protein, Kibra. Furthermore, we demonstrated the underlying molecular mechanisms of this regulation. We also showed that the regulation of Pez degradation is important for intestinal equilibrium by *in vivo* experiment in *Drosophila*. In addition, we proposed that this regulation might be a conserved process, based on the results obtained using mammalian cells. This study will not only improve our insight into the regulatory mechanisms of the Hippo pathway, but also shed some lights on identification of potential targets for therapeutic intervention and treatment of related cancers.

Keywords Hippo pathway; *Drosophila* intestinal stem cell; cancer; Pez; E3 ubiquitin ligase; Su(dx)

1 Hippo信号通路与器官大小调控

器官发育大小的决定是发育生物学的基础问题之一。细胞生长、增殖、分化和凋亡相互协调保证了生物体器官发育的正常进行, 过度增殖或过度凋亡的发生都会导致机体功能的异常。组织器官通过感知外部环境并整合自身信号来调控其正常发育是一个非常复杂的过程。近些年, 研究人员才逐渐揭示, TSC-TOR和Hippo信号转导通路主要通过调控细胞的大小和细胞的数目从而在器官发育大小调控中发挥关键的作用^[1]。

Hippo信号通路是近年来在果蝇中首先被发现和命名的并且在进化上高度保守的肿瘤抑制信号通路。这条信号通路的上游核心为由激酶Hippo(Hpo)、Warts(Wts)和相应的支架蛋白Salvador(Sav)、Mats共同组成的激酶级联复合体^[2-5]。该激酶复合体活化后, 可以通过磷酸化抑制Hippo通路下游主要效应子Yorkie(Yki)的活性^[6]。Yki作为转录辅因子, 与转录因子Scalloped(Sd)协同作用调控Hippo通路下游靶基因的表达(如: *diap1*、*cyclinE*、*bantam* microRNA等)^[7-9], 通过抑制细胞凋亡、促进细胞增殖, 从而维持组织生长的稳态平衡。Hippo通路中的主要成员在哺乳动物里都能够找到同源物, 如Hpo的同源物为STK4/3(serine/threonine kinase 4/3, 也称为MST1/2)、Sav的同源物为Sav1(salvador family WW domain containing protein 1, 也称为WW45)、Wts的同源物为Lats1/2、Yki的同源物为YAP(Yes-associated protein)/TAZ(neurofibromin 2)^[10-11], 这些哺乳动物同源物具有与果蝇同源基因类似的功能与调控方式。

已有的研究表明, Hippo信号通路与多种肿瘤的发生密切相关^[10,12-13]。例如, 遗传型缺失*NF2*基因能显著增加神经纤维瘤的发病概率^[14], 多种肿瘤细胞内都发现了Mats蛋白的缺失突变^[15]; 同时, 人的肾癌细胞系中发现了Sav的突变^[16], 人乳腺癌及肝癌样本中均有*YAP*基因的表达扩增^[17]。因此, 研究Hippo通路的调控机制和功能, 能够揭示Hippo通路异常导致相关肿瘤发生发展的分子机理, 为疾病的诊断和治疗提供策略和靶标。

2 Hippo信号通路在果蝇中肠稳态维持中的功能

干细胞潜在的应用前景使得干细胞生物学研究成为近些年的研究热点, 而成体干细胞研究是干细胞生物学的重要命题之一。成体干细胞具备自我更新及多向分化潜能, 在维持组织稳态平衡及损伤修复中发挥着重要作用, 是保持器官正常功能的重要保障。近年来的研究表明, Hippo信号通路在组织稳态维持和成体干细胞的自我更新等生命活动过程中, 发挥着极其重要的作用^[18-19]。

果蝇中肠组织的稳态维持的机理与哺乳动物肠道较为相似。中肠干细胞(intestinal stem cell, ISC)具备分化为成熟的中肠细胞[吸收功能的肠上皮细胞(enterocyte, EC)和分泌功能的肠内分泌细胞(enteroendocrine cell, ee cell)]的能力^[20], 保证了肠组织的自我更新和损伤修复, 从而维持其正常的形状、大小和生理功能。因此, 利用果蝇中肠作为研究模型, 揭示其干细胞稳态维持的调控机制, 有助于进一步理解高等哺乳动物成体干细胞的发育机制, 为进一

步探索这些过程的异常与癌症等疾病发生的关系提供依据。ISC的维持、更新和分化受到一些信号通路的严格调控,如Wnt和Hippo等信号转导通路。近年来的一些研究揭示了Hippo信号通路通过细胞自主(cell-autonomous)和非自主(non-cell-autonomous)两种方式调控ISC的增殖与分化^[21],并参与了细胞命运决定^[22]。我们实验室在以果蝇ISC系统为模型的前期研究中,发现表观遗传因子Brahma染色质重塑复合物介导Hippo信号在ISC的增殖及分化过程中发挥重要的功能^[23],并且揭示Hippo信号通路通过特异性地调节其靶基因***bantam*** microRNA的表达来调控果蝇ISC的增殖^[24]。至此,Hippo信号通路下游转录复合物及其调控的靶基因在ISC稳态维持中的作用和机制得以深入阐明,但Hippo信号通路上游成员在果蝇中肠稳态维持中的具体机制尚待进一步研究。

3 Hippo信号通路上游成员Pez蛋白稳定性的调控机制的发现

经过十几年的研究,Hippo通路的信号调控网络已日趋完善,但作为一条相对比较新的信号通路,其调控机制的研究还存在许多悬而未决的问题。其中,Hippo信号通路成员蛋白稳定性的调控是关键问题之一。基于此,我们收集了果蝇中的泛素连接酶(E3),针对Hippo信号通路中已知的各个成员,通过生化方法在果蝇的S2细胞中进行了蛋白稳定性的筛选工作。研究发现,Hippo信号通路上游成员Pez可以被NEDD4(neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4)家族泛素连接酶Su(dx)特异性降解。Pez属于酪氨酸蛋白磷酸酶(protein-tyrosine phosphatase, PTP),此类磷酸酶在多种细胞生命过程中发挥重要作用,如细胞代谢、生长及分化。在果蝇中,Pez在维持成虫ISC稳态中发挥重要作用,其功能缺失会引起果蝇中肠干细胞的过度增殖^[25]。

我们进一步通过生化实验确认,过表达的Su(dx)可以显著降低Pez的蛋白水平,而RNA干扰Su(dx)能使Pez的蛋白稳定性增强,且抑制泛素-蛋白酶体途径能够阻碍Su(dx)介导的Pez蛋白的降解。同时,利用果蝇的中肠研究体系,我们发现,Su(dx)对内源Pez蛋白的稳定性调控对肠组织的稳态平衡至关重要。肠上皮细胞内Su(dx)蛋白水平的上调能下调内源Pez的蛋白水平,导致ISC过度增殖并最终

导致果蝇肠壁增生。

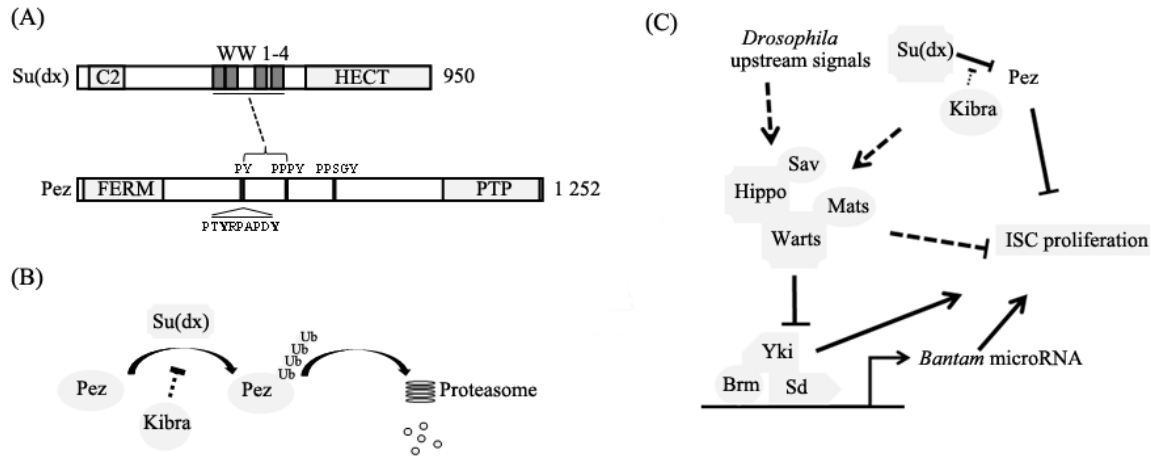
4 Su(dx)调控Pez蛋白稳定性分子机制的阐明

为进一步阐明Su(dx)降解Pez蛋白的分子机制,我们进行了系列的生化分析。体内和体外泛素化实验表明,Su(dx)促进了Pez蛋白的多聚泛素化并引起Pez蛋白通过蛋白酶体途径降解。利用免疫共沉淀的方法,我们发现,Su(dx)和Pez蛋白之间存在相互作用。在这个过程中,Pez蛋白Pro-rich序列和Su(dx)蛋白WW结构域引起我们的注意。Pro-rich序列及WW结构域是常见的介导蛋白相互作用的结构^[26]。而存在于Pez和Su(dx)中的这两种结构域从果蝇到哺乳动物均极为保守。通过进一步的生化鉴定并结合体内的功能验证,我们最终发现,Pez蛋白中PY/PPxY序列及Su(dx)蛋白中的WW结构域特异介导了二者的相互作用并且是Pez蛋白泛素化降解所必需的。在果蝇中肠中,PY/PPxY位点突变的Pez蛋白更稳定且能有效地抑制Su(dx)蛋白水平上升所引起的果蝇中肠组织增生。

有意思的是,Kibra是已知的与Pez相互结合的蛋白,但其对Pez的调控机制尚不清楚^[25]。我们通过进一步的生化实验发现,Kibra蛋白同样利用其WW结构域,通过与Pez蛋白中PY/PPxY序列结合,拮抗Su(dx)对Pez蛋白的降解。因此,Pez的蛋白稳定性是受Su(dx)和Kibra共同调节的(图1)。

5 意义、前景及展望

Hippo通路在细胞的增殖、凋亡、干细胞的自我更新以及组织稳态维持等生物体的生命活动过程中发挥着极其重要的作用,其活性异常已被证实可以导致多种癌症及疾病的发生,研究Hippo信号通路成员的稳定性调控将进一步揭示该通路活性调控机制及其与疾病发生的相互关系。我们在果蝇中的研究发现了Su(dx)泛素化降解Pez,并利用果蝇ISC研究模型,证明Su(dx)对Pez蛋白稳定性的调节对肠组织的稳态维持至关重要。而Pez是一个进化上十分保守的蛋白,Pez与其哺乳动物同源物PTPN14(protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14)之间的关键结构域相似性在45%以上^[28]。我们在哺乳动物细胞中的初步研究结果显示,Su(dx)及其同源物WWP1(WW domain containing E3



A: WW结构域和PY/PPPY序列介导Su(dx)和Pez相互作用; B: Su(dx)促进Pez蛋白泛素化并通过蛋白酶体途径降解, Kibra能够抑制Su(dx)降解Pez; C: Hippo信号调控果蝇中肠干细胞(ISC)增殖。

A: WW domains and PY/PPPY motifs mediate the interaction between Su(dx) and Pez; B: Su(dx) ubiquitylates Pez and facilitates its degradation through proteasome-pathway which can be inhibited by Kibra; C: the Hippo signaling pathway regulates the proliferation of ISC.

图1 Su(dx)调控Pez蛋白降解并维系果蝇中肠稳态及Hippo信号通路调控果蝇中肠干细胞增殖(根据参考文献[23-24,27]修改)

Fig.1 Su(dx) mediates Pez degradation and modulates *Drosophila* midgut homeostasis and the Hippo signaling pathway regulates the proliferation of ISCs (modified from references [23-24,27])

ubiquitin protein ligase 1)均能结合PTPN14, 且二者过表达均能降低PTPN14蛋白水平。PTPN14在人体内分布广泛, 如乳腺、肾脏、骨骼肌、肺脏及胎盘等, 其功能缺失与乳腺癌和大肠癌的发生密切相关^[29-30], 而在人类乳腺癌和前列腺癌的细胞中, *WWP1*基因被过度扩增且其蛋白水平显著升高^[31-32], 但其致病的机理尚不清晰。Su(dx)降解调控Pez机制的阐明可能为相关癌症的治疗提供新的思路和潜在的靶点。

参考文献 (References)

- Tumaneng K, Russell RC, Guan KL. Organ size control by Hippo and TOR pathways. *Curr Biol* 2014; 22(9): R368-79.
- Wu S, Huang J, Dong J, Pan D. hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell* 2003; 114(4): 445-56.
- Udan RS, Kango-Singh M, Nolo R, Tao C, Halder G. Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nat Cell Biol* 2003; 5(10): 914-20.
- Harvey KF, Pflieger CM, Hariharan IK. The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell* 2003; 114(4): 457-67.
- Wei X, Shimizu T, Lai ZC. Mob as tumor suppressor is activated by Hippo kinase for growth inhibition in *Drosophila*. *EMBO J* 2007; 26(7): 1772-81.
- Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* homolog of YAP. *Cell* 2005; 122(3): 421-34.
- Goulev Y, Fauny JD, Gonzalez-Marti B, Flagiello D, Silber J, Zider A. SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in *Drosophila*. *Curr Biol* 2008; 18(6): 435-41.
- Zhang L, Ren F, Zhang Q, Chen Y, Wang B, Jiang J. The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Dev Cell* 2008; 14(3): 377-87.
- Wu S, Liu Y, Zheng Y, Dong J, Pan D. The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Dev Cell* 2008; 14(3): 388-98.
- Pan D. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell* 2010; 19(4): 491-505.
- Yu FX, Guan KL. The Hippo pathway: Regulators and regulations. *Genes Dev* 2013; 27(4): 355-71.
- Zeng Q, Hong W. The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals. *Cancer Cell* 2008; 13(3): 188-92.
- Liu AM, Xu MZ, Chen J, Poon RT, Luk JM. Targeting YAP and Hippo signaling pathway in liver cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14(8): 855-68.
- McClatchey AI, Giovannini M. Membrane organization and tumorigenesis—the NF2 tumor suppressor, Merlin. *Genes Dev* 2005; 19(19): 2265-77.
- Lai ZC, Wei X, Shimizu T, Ramos E, Rohrbach M, Nikolaidis N, et al. Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats. *Cell* 2005; 120(5): 675-85.
- Tapon N, Harvey KF, Bell DW, Wahrer DC, Schiripo TA, Haber D, et al. Salvador promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell* 2002; 110(4): 467-78.
- Overholtzer M, Zhang J, Smolen GA, Muir B, Li W, Sgroi DC,

- et al.* Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(33): 12405-10.
- 18 Yin MX, Zhang L. Hippo signaling in epithelial stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2015; 47(1): 39-45.
- 19 Mo JS, Park HW, Guan KL. The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO Rep* 2014; 15(6): 642-56.
- 20 Casali A, Batlle E. Intestinal stem cells in mammals and *Drosophila*. *Cell Stem Cell* 2009; 4(2): 124-7.
- 21 Ren F, Wang B, Yue T, Yun EY, Ip YT, Jiang J. Hippo signaling regulates *Drosophila* intestine stem cell proliferation through multiple pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(49): 21064-9.
- 22 Le Bouteiller M, Jensen KB. Hippo signalling directs intestinal fate. *Nat Cell Biol* 2015; 17(1): 5-6.
- 23 Jin Y, Xu J, Yin MX, Lu Y, Hu L, Li P, *et al.* Brahma is essential for *Drosophila* intestinal stem cell proliferation and regulated by Hippo signaling. *Elife* 2013; 2: e00999.
- 24 Huang H, Li J, Hu L, Ge L, Ji H, Zhao Y, *et al.* Bantam is essential for *Drosophila* intestinal stem cell proliferation in response to Hippo signaling. *Dev Biol* 2014; 385(2): 211-9.
- 25 Poernbacher I, Baumgartner R, Marada SK, Edwards K, Stocker H. *Drosophila* Pez acts in Hippo signaling to restrict intestinal stem cell proliferation. *Curr Biol* 2012; 22(5): 389-96.
- 26 Hu H, Columbus J, Zhang Y, Wu D, Lian L, Yang S, *et al.* A map of WW domain family interactions. *Proteomics* 2004; 4(3): 643-55.
- 27 Wang C, Zhang W, Yin MX, Hu L, Li P, Xu J, *et al.* Suppressor of Deltex mediates Pez degradation and modulates *Drosophila* midgut homeostasis. *Nat Commun* 2015; 6: 6607.
- 28 Edwards K, Davis T, Marcey D, Kurihara J, Yamamoto D. Comparative analysis of the Band 4.1/ezrin-related protein tyrosine phosphatase Pez from two *Drosophila* species: Implications for structure and function. *Gene* 2001; 275(2): 195-205.
- 29 Nguyen Huu NS, Ryder WD, Zeps N, Flaszka M, Chiu M, Hanby AM, *et al.* Tumour-promoting activity of altered WWP1 expression in breast cancer and its utility as a prognostic indicator. *J Pathol* 2008; 216(1): 93-102.
- 30 Zhi X, Chen C. WWP1: A versatile ubiquitin E3 ligase in signaling and diseases. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(9): 1425-34.
- 31 Chen C, Zhou Z, Ross JS, Zhou W, Dong JT. The amplified WWP1 gene is a potential molecular target in breast cancer. *Int J Cancer* 2007; 121(1): 80-7.
- 32 Chen C, Sun X, Guo P, Dong XY, Sethi P, Zhou W, *et al.* Ubiquitin E3 ligase WWP1 as an oncogenic factor in human prostate cancer. *Oncogene* 2007; 26(16): 2386-94.