

混合谱系酶 3 与神经细胞凋亡的研究进展

许妙^{1,2} 综述 张智博² 审校

1. 南华大学研究生学院, 湖南省衡阳市 421001

2. 长沙市第一医院神经内科, 湖南省长沙市 410005

摘要: 混合谱系酶 3 (MLK3) 是丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶 (MAP3Ks) 中的一员, 广泛表达于人体组织中, 可以激活不同的 MAPK 途径来调控细胞的增殖、分化、迁移和凋亡。近几年的研究发现其活性的变化在神经细胞的凋亡中发挥重要作用, 可通过激活 JNK 或 p38MAPK 通路介导神经细胞凋亡, 并且对 MLK3 活性的抑制可以减少神经细胞的凋亡及相应的脑损害。因此, 深入、系统的研究 MLK3 在神经细胞凋亡中的作用机制, 可能为神经系统疾病中神经细胞的凋亡提供新的靶点。

关键词: 混合谱系酶 3; 神经细胞; 凋亡; 神经变性疾病; 脑缺血

混合谱系酶 3 (mixed-lineage protein kinase 3, MLK3) 是 MAP3Ks 中的一员, 参与多种信号级联反应, 包括细胞外信号调节激酶 (ERK)、c-jun 氨基末端激酶 (JNK) 和 p38MAPK 通路以及磷脂酰肌醇 3 激酶和 (或) 蛋白激酶 B (PI3K-Akt) 信号通路。MLK3 广泛表达于人体组织中, 首先在人类胸腺中发现^[1], 但研究发现 MLK3 也表达于神经细胞^[2]、树突细胞^[3,4] 和其他细胞类型中。以前的研究主要集中于 MLK3 与肿瘤的形成及转移, 目前 MLK3 在神经细胞中的研究日益受到重视, 主要参与神经变性疾病中的神经细胞凋亡, 以及脑缺血性神经细胞的凋亡。本文将对 MLK3 在神经细胞凋亡中的作用机制作一综述。

1 MLK3 的组成与活性调节及其生物学效应

1.1 MLK3 的组成

MLK3 分子量为 93 kDa, 属于丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶 (MAP3K)^[5]。MLK3 具有很多蛋白质结构域, 由 N 端到 C 端依次有: Src homology 3 (SH3) 结构域、激酶结构域、亮氨酸拉链结构域、cdc42/Rac 相互作用基元 (cdc42/Rac interactive binding, CRIB; 即能与 RHO 家族 GTPases Rac 和 cdc42 相互结合的区域) 以及 C 端脯氨酸结构域。MLK3 是表达最广泛的 MLK 家族成员^[6], MLK1-4 中 N 端具高度同源性, 而 C 端却各有不同, 意味着这些区域可能执行不同的调节功能, 但所有 C 端都富含脯氨酸, 而富含脯氨酸区域的功能尚不清楚。MLK3 具有甘氨酸-脯氨酸富集区域, 这有别于 MLK1、MLK2 和 MLK4^[7]。

1.2 MLK3 的活性调节

蛋白激酶, 包括 MAP3Ks 都是通过磷酸化调节, 在它们的催化结构域中, 活化环通常包含调节磷酸化位点。质谱分析法共鉴定出 12 个潜在的 MLK3 磷酸化位点, 大部分聚集在 C 端^[8]。尽管这些位点在机体内并没有全都被磷酸化, 但这一结果强调了磷酸化对 MLK3 调节的重要性。在 MLK3 的活化环中发现基序 TTXXS (277-281 位点, T 表示苏氨酸, X 表示任意氨基酸, S 表示丝氨酸), 并且突变研究支持 Thr277 和 Ser281 作为 MLK3 的正性调节磷酸化位点^[9]。

MLK3 的蛋白质结构域可以相互作用从而调节 MLK3 的活性。在分子水平, MLK3 被小 GTPases、cdc42 和 Rac 调节^[10], 它们与 MLK3 的蛋白质结构域结合在一起, 能引起其通过亮氨酸拉链调节蛋白同型二聚化, 导致蛋白活化环中 Thr277 和 Ser281 的自磷酸化, 最终导致 MLK3 被激活, 并进一步激活其下游信号^[5,11]。完整的亮氨酸拉链结构域的缺失导致 MLK3 突变而使其自磷酸化失败, 且不能激活其下游 JNK 信号通路, 然而这种突变体仍然能被激活的 cdc42 诱导自磷酸化, 却不能磷酸化其下游 MKK4 的 T258 位点 (MKK4 活化环内 2 个磷酸化位点之一)^[12]。这说明 cdc42 调节 MLK3 并不需要亮氨酸拉链调节二聚化, 但二聚化是适当底物相互作用和磷酸化的先决条件。MLK3 的 SH3 结构域能募集具有特定脯氨酸基序的蛋白质, 以达到定位和信号转导, 并且 SH3 结构域可以连接亮氨酸拉链结构域与 CRIB 结构域之间的单个脯氨酸,

收稿日期: 2013-08-28; 修回日期: 2013-11-11

作者简介: 许妙 (1988-), 女, 在读研究生, 主要从事脑血管病的研究。Email: 531673341@qq.com。

通讯作者: 张智博, 男, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事脑血管病的研究。Email: zhangzhibozb@yahoo.com.cn。

从而抑制自身活性^[13]。在细胞水平,MLK3 能被细胞应激和新陈代谢应激激活,包括活性氧、神经酰胺、肿瘤坏死因子- α 和缺血缺氧等^[3,14]。

1.3 MLK3 的生物学效应

MLK3 广泛表达于人体组织中,在不同的细胞类型中,MLK3 可以激活不同的 MAPK 途径来调控细胞的增殖、分化、迁移和凋亡,并且还参与肿瘤细胞的增殖、转移和侵袭。在细胞的迁移过程中,MLK3 可以通过激活 JNK 和 ERK 途径,促进肠溃疡上皮细胞迁移,从而促进溃疡愈合^[15]。在肿瘤细胞的增殖、转移和侵袭过程中,MLK3 通过调节相关蛋白的磷酸化水平促进肿瘤的形成和转移。MLK3 可以磷酸化 Pin1 的 Ser138 位点来增加 Pin1 的催化活性和核转运,进而驱动细胞周期、促进细胞周期蛋白 D1 稳定、中心体扩增和肿瘤形成^[16];同样 MLK3 可以通过磷酸化 JNK 进而调控桩蛋白(为细胞迁移所必需) Ser178 位点的磷酸化(即 MLK3-JNK-桩蛋白轴)从而促进乳腺癌细胞转移^[17];亦可通过 MLK3-JNK-AP1(核转录因子激活蛋白 1)信号轴诱导多种乳腺癌侵袭基因的表达从而导致人类乳腺基底上皮和乳腺癌细胞的迁移和转移^[18],或 MLK3-p38/JNK-AP1 信号轴诱导皮肤癌或炎症^[19]。另外,MLK3 可以通过多种途径促进细胞凋亡,如可以通过激活 p38MAPK 途径进而激活凋亡相关蛋白半胱天冬酶 3(caspase3)而介导细胞凋亡^[20],也可以通过激活 JNK 途径进而激活 Fas/FasL 信号通路介导凋亡^[21],或诱导 Bax 或 Bad 的转位,促进细胞色素 C 的释放而诱导细胞凋亡^[22,23]。

2 MLK3 与神经细胞凋亡

2.1 MLK3 与帕金森病中多巴胺能神经细胞凋亡

帕金森病的特征性病理改变是黑质多巴胺能神经细胞大量变性凋亡丢失^[24,25],残留神经细胞胞浆中有 Lewy 小体形成。大量研究证实 MLK3 参与帕金森病的发病,介导黑质多巴胺能神经细胞的凋亡。肿瘤坏死因子- α (TGF- α) 和神经酰胺是 MLK3 的激活剂,可以激活 MLK3 及其下游靶物 JNK^[26-28],从而促进多巴胺能神经细胞凋亡。运用 6-羟基多巴胺建立的帕金森病模型,可检测到 MLK3、JNK3 的磷酸化水平增加,而 K252a (MLK3 抑制剂)的运用可以减少 MLK3、JNK3 的磷酸化水平,并保护多巴胺能神经元免于 6-羟基多巴胺诱导的细胞凋亡^[29]。CEP-1347 (K252a 的衍生物)曾经用于早期帕金森病的临床研究,虽然该实验因为中

期评估分析显示 CEP-1347 对早期帕金森病患者无效而提早结束,但并没否定 MLK3 介导帕金森病中黑质多巴胺能神经细胞的凋亡作用^[30,31]。以上说明 MLK3 与帕金森病密切相关,且可能是通过 MLK3-JNK3 信号途径调节多巴胺能神经细胞凋亡。

2.2 MLK3 与阿尔茨海默病中的神经细胞凋亡

阿尔茨海默病的发病机制与 β 淀粉样蛋白密切相关^[32]。研究发现在培养的皮质神经细胞中加入 β 淀粉样蛋白可导致神经细胞凋亡^[33],并且增加 MLK3、JNK3 的磷酸化水平。运用 MLK3 的抑制剂 K252a 可以阻止 β 淀粉样蛋白诱导的神经细胞凋亡及 MLK3-MKK7-JNK3 信号级联的激活,且 K252a 对 β 淀粉样蛋白诱导的神经保护作用部分依赖于 AKT 的激活^[22]。因此,说明 MLK3 可能被 β 淀粉样蛋白应激激活而参与阿尔茨海默病中的神经细胞凋亡。

2.3 MLK3 与脑缺血性神经细胞凋亡

在大鼠脑缺血后,MLK3 的磷酸化水平显著增高,同时其下游 MKK7 和 JNK3 也被激活,说明脑缺血可诱导持续性的 MLK3/MKK7/JNK3 级联激活,而且 MLK3 强有力的抑制剂 K252a 进行干预后,脑缺血诱导的 MLK3、MKK7 和 JNK3 的磷酸化水平明显降低,且海马 CA1 区神经细胞的存活率明显提高^[34],同时抑制 Bcl-2 的磷酸化,减少 Bax 的移位和细胞色素 C 的释放^[23]。Zhang 等^[35]提出在脑缺血后 MLK3 的激活过程中存在 PSD-95 与 JNK 相互作用蛋白 1 (JIP1) 调节信号分子之间的对话。在一般情况下,MLK3 以单体催化失活形式与 JIP1 结合,一旦有适当的刺激,MLK3 从 JIP1 处分离,并与 PSD-95 相互作用,然后二聚化,自磷酸化,成为催化活跃状态,继而磷酸化的 MLK3 进一步激活 MKK7,然后磷酸化 JNK,诱导 JNK 级联的活性。Zhu 等^[36]还发现短暂性全脑缺血增加大鼠海马 CA1 区 GluR6 的泛素化,促进其与 MLK3 的结合和随后的 MLK3-JNK3 下游途径的激活。MLK3 与 GluR6 的相互作用说明 MLK3-GluR6 复合体可以作为脑缺血卒中的一种潜在治疗靶点。Savinainen 等^[37]证明 GluR6-PSD95-MLK3 信号分子可以促进 MLK3 和 JNK 磷酸化和激活,并且进一步研究证实大鼠脑缺血/再灌注诱导的 GluR6-PSD95-MLK3 信号分子聚集增加,随后促进 MLK3 和 JNK 磷酸化作用和激活,并最终导致海马 CA1 区的神经细胞凋亡^[38]。脑缺血不仅可以通过 MLK3 激活 JNK 通路,也可以激活 p38MAPK 通路。研究发现在大鼠

短暂性脑缺血/再灌注中海马 CA1 区 GluR6 可能通过 MLK3 的激活调节 p38MAPK 的磷酸化,从而诱导 CA1 区神经细胞凋亡^[39]。

2.4 MLK3 与其他疾病中的神经细胞凋亡

MLK3 在神经系统中可以被人类免疫缺陷病毒 1 (HIV-1) 神经毒素病理性激活,导致下游的信号事件引起神经细胞凋亡,并参与 HIV-1 相关神经认知缺陷的神经变性疾病病理学改变,而运用 CEP-1347 (MLK 家族的特异性抑制剂) 可以减少大鼠神经元中 MLK3 的自磷酸化并增强大鼠神经细胞的存活,且显性负性 MLK3 突变体的表达保护神经细胞免受 HIV-1 神经毒素的影响,而运用 P38MAPK 和 JNK 抑制剂可以保护神经细胞免受 HIV-1 诱导的神经细胞凋亡^[40-41]。Monica 等^[42]证实 MLK3 在神经细胞中表达并且介导交感神经细胞中 JNK 信号通路的激活和神经细胞凋亡,且其活性影响促凋亡效应。他们通过在神经生长因子 (NGF) 培养的老鼠交感神经细胞中加入野生型 MLK3 和各种 MLK3 突变体证实 MLK3 介导神经细胞凋亡。而撤离其中的 NGF 后 MLK3 的活性增加,意味着 MLK3 可能是神经细胞凋亡的生理性调节者。

3 结语

综上所述,MLK3 的激活或过度表达在神经细胞的凋亡中发挥关键作用,并且主要通过激活 JNK 信号通路和 p38MAPK 信号通路介导神经细胞凋亡,但具体机制仍需进一步探索,且 MLK3 激活的两条通路在神经细胞凋亡中谁占主导地位或两者同样重要仍然未知。而在其他细胞类型中 MLK3 还可以激活细胞外信号调节激酶 (ERK) 以及 PI3K-Akt 信号通路。JNK 和 P38MAPK 信号通路主要与细胞凋亡相关,而 ERK 和 PI3K-Akt 信号通路主要与细胞生存、增殖、分化相关。那么在神经系统疾病中这几条通路是否均参与神经细胞的凋亡,是否是有的被激活,有的被抑制,使各通路之间的平衡被打破而出现神经细胞凋亡和相应的脑损害仍然未知。因此在神经细胞凋亡中这几条信号通路的变化,及其是否与 MLK3 相关仍有待于进一步研究。深入、系统的研究 MLK3 在神经细胞凋亡的作用机制,以及研发特异性的 MLK3 抑制剂,可能为神经系统疾病中神经细胞的凋亡提供新的靶点。

参 考 文 献

- [1] Ing Y, Leung IW, Heng HH, et al. MLK-3: identification of a widely-expressed protein kinase bearing an SH3 domain and a leucine zipper-basic region domain. *Oncogene*, 1994, 9(6): 1745-1750.
- [2] Maroney AC, Finn JP, Connors TJ, et al. Cep-1347 (KT7515), a semisynthetic inhibitor of the mixed lineage kinase family. *J Biol Chem*, 2001, 276(27): 25302-25308.
- [3] Handley ME, Rasaiyaah J, Chain BM, et al. Mixed lineage kinases (MLKs): a role in dendritic cells, inflammation and immunity? *Int J Exp Pathol*, 2007, 88(2): 111-126.
- [4] Handley ME, Rasaiyaah J, Barnett J, et al. Expression and function of mixed lineage kinases in dendritic cells. *Int Immunol*, 2007, 19(8): 923-933.
- [5] Gallo KA, Johnson GL. Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(9): 663-672.
- [6] Silva RM, Kuan CY, Rakic P, et al. Mixed lineage kinase-c-jun N-terminal kinase signaling pathway: a new therapeutic target in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 2005, 20(6): 653-664.
- [7] Handley ME, Rasaiyaah J, Chain BM, et al. Mixed lineage kinases (MLKs): a role in dendritic cells, inflammation and immunity? *Int J Exp Pathol*, 2007, 88(2): 111-126.
- [8] Vacratsis PO, Phinney BS, Gage DA, et al. Identification of in vivo phosphorylation sites of MLK3 by mass spectrometry and phosphopeptide mapping. *Biochemistry*, 2002, 41(17): 5613-5624.
- [9] Leung IW, Lassam N. The kinase activation loop is the key to mixed lineage kinase-3 activation via both autophosphorylation and hematopoietic progenitor kinase 1 phosphorylation. *J Biol Chem*, 2001, 276(3): 1961-1967.
- [10] Kant S, Swat W, Zhang S, et al. TNF-stimulated MAP kinase activation mediated by a Rho family GTPase signaling pathway. *Genes Dev*, 2011, 25(19): 2069-2078.
- [11] Leung IW, Lassam N. Dimerization via tandem leucine zippers is essential for the activation of the mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MLK-3. *J Biol Chem*, 1998, 273(49): 32408-32415.
- [12] Vacratsis PO, Gallo KA. Zipper-mediated oligomerization of the mixed lineage kinase SPRK/MLK-3 is not required for its activation by the GTPase cdc42 but is necessary for its activation of the JNK pathway. Monomeric SPRK L410P does not catalyze the activating phosphorylation of Thr258 of murine MITOGEN-ACTIVATED protein kinase kinase 4. *J Biol Chem*, 2000, 275(36): 27893-27900.
- [13] Zhang H, Gallo KA. Autoinhibition of mixed lineage kinase 3 through its Src homology 3 domain. *J Biol Chem*, 2001, 276(49): 45598-45603.
- [14] Jaeschke A, Davis RJ. Metabolic stress signaling mediated by mixed-lineage kinases. *Mol Cell*, 2007, 27(3): 498-508.
- [15] Pavlo L, Kovalenko PL, Kunovska L, et al. Loss of MLK3 signaling impedes ulcer healing by modulating MAPK signaling in mouse intestinal mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver*

- Physiol, 2012, 303(8): G951-G960.
- [16] Rangasamy V, Mishra R, Sondarva G, et al. Mixed-lineage kinase 3 phosphorylates prolyl-isomerase Pin1 to regulate its nuclear translocation and cellular function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(21): 8149-8154.
- [17] Chen J, Gallo KA. MLK3 regulates paxillin phosphorylation in chemokine-mediated breast cancer cell migration and invasion to drive metastasis. *Cancer Res*, 2012, 72(16): 4130-4140.
- [18] Chen J, Miller EM, Gallo KA. MLK3 is critical for breast cancer cell migration and promotes a malignant phenotype in mammary epithelial cells. *Oncogene*, 2010, 29(31): 4399-4411.
- [19] Lim TG, Kim JE, Jung SK, et al. MLK3 is a direct target of biochanin A, which plays a role in solar UV-induced COX-2 expression in human keratinocytes. *Exp Dermatol*, 2013, 22(7): 896-903.
- [20] Kim KY, Kim BC, Xu Z, et al. Mixed lineage kinase 3 (MLK3)-activated p38 MAP kinase mediates transforming growth factor-beta-induced apoptosis in hepatoma cells. *J Biol Chem*, 2004, 279(28): 29478-29484.
- [21] Tang RX, Kong FY, Fan B, et al. HBx activates FasL and mediates HepG2 cell apoptosis through MLK3-MKK7-JNKs signal module. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(13): 1485-1495.
- [22] Xu Y, Hou XY, Liu Y. Different Protection of K252a and N-acetyl-L-cysteine Against Amyloid-beta Peptide induced Cortical Neuron Apoptosis Involving Inhibition of MLK3-MKK7-JNK3 Signal Cascades. *J Neurosci Res*, 2009, 87(4): 918-927.
- [23] Wang Q, Yin XH, Liu Y, et al. K252a suppresses neuronal cells apoptosis through inhibiting the translocation of Bax to mitochondria induced by the MLK3/JNK signaling after transient global brain ischemia in rat hippocampal CA1 subregion. *J Recept Signal Transduct Res*, 2011, 31(4): 307-313.
- [24] Golden JP, Demaro JA 3rd, Knoten A, et al. Dopamine-dependent compensation maintains motor behavior in mice development anation of dopaminergic neurons. *J Neurosci*, 2013, 33(43): 17095-17107.
- [25] Janezic S, Threlfell S, Dodson PD, et al. Deficits in dopaminergic transmission precede neuron loss and dysfunction in a new Parkinson model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(42): E4016-4025.
- [26] Sathyanarayana P, Barthwal MK, Kundu CN, et al. Activation of the Drosophila MLK by ceramide reveals TNF-alpha and ceramide as agonists of mammalian MLK3. *Mol Cell*, 2002, 10(6): 1527-1533.
- [27] Tansey MG, Frank-Cannon TC, McCoy MK, et al. Neuroinflammation in Parkinson's disease: is there sufficient evidence for mechanism-based interventional therapy? *Front Biosci*, 2008, 13: 709-717.
- [28] Arboleda G, Morales LC, Benitez B, et al. Regulation of ceramide-induced neuronal death: cell metabolism meets neurodegeneration. *Brain Res Rev*, 2009, 59(2): 333-346.
- [29] Pan J, Wang G, Yang HQ, et al. K252a Prevents Nigral Dopaminergic Cell Death Induced by 6-Hydroxydopamine through Inhibition of Both Mixed-Lineage Kinase 3/c-Jun NH2-Terminal Kinase 3 (JNK3) and Apoptosis-Inducing Kinase 1/JNK3 Signaling Pathways. *Mol Pharmacol*, 2007, 72(6): 1607-1618.
- [30] Parkinson Study Group PRECEPT Investigators. Mixed lineage kinase inhibitor CEP-1347 fails to delay disability in early Parkinson disease. *Neurology*, 2007, 69(15): 1480-1490.
- [31] Wang LH, Johnson EM Jr. Mixed lineage kinase inhibitor CEP-1347 fails to delay disability in early Parkinson disease. *Neurology*, 2008, 71(6): 462-463.
- [32] 徐金静, 方力群, 赵春慧, 等. 淀粉样蛋白对阿尔茨海默病转基因果蝇认知功能的影响. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2013, 40(2): 101-104.
- [33] Ivins KJ, Bui ET, Cotman CW, et al. Beta-amyloid induces local neurite degeneration in cultured hippocampal neurons: evidence for neuritic apoptosis. *Neurobiol Dis*, 1998, 5(5): 365-378.
- [34] Pan J, Zhang QG, Zhang GY, et al. The neuroprotective effects of K252a through inhibiting MLK3/MKK7/JNK3 signaling pathway on ischemic brain injury in rat hippocampal CA1 region. *Neuroscience*, 2005, 131(1): 147-159.
- [35] Zhang QX, Pei DS, Guan QH, et al. Crosstalk between PSD-95 and JIP1-mediated signaling modules: the mechanism of MLK3 activation in cerebral ischemia. *Biochemistry*, 2007, 46(13): 4006-4016.
- [36] Zhu QJ, Xu Y, Du CP, et al. SUMOylation of the kainate receptor subunit GluK2 contributes to the activation of the MLK3-JNK3 pathway following kainate stimulation. *FEBS Lett*, 2012, 586(9): 1259-1264.
- [37] Savinainen A, Garcia EP, Dorow D, et al. Kainate receptor activation induces mixed lineage kinase-mediated cellular signaling cascades via post-synaptic density protein 95. *J Biol Chem*, 2001, 276: 11382-11386.
- [38] Yu CZ, Li C, Pei DS, et al. Neuroprotection against transient focal cerebral ischemia and oxygen-glucose deprivation by interference with GluR6-PSD95 protein interaction. *Neurochem Res*, 2009, 34(11): 2008-2021.
- [39] Chen J, Li C, Pei DS, et al. GluR6-containing KA receptor mediates the activation of p38 MAP kinase in rat hippocampal CA1 region during brain ischemia injury. *Hippocampus*, 2009, 19(1): 79-89.
- [40] Gelbard HA, Dewhurst S, Maggirwar SB, et al. Rebuilding synaptic architecture in HIV-1 associated neurocognitive disease: a therapeutic strategy based on modulation of mixed lineage kinase. *Neurotherapeutics*, 2010, 7(4): 392-398.
- [41] Sui Z, Fan S, Sniderhan L, et al. Inhibition of mixed lineage kinase 3 prevents HIV-1 Tat-mediated neurotoxicity and monocyte activation. *J Immunol*, 2006, 177(1): 702-711.
- [42] Mota M, Reeder M, Chernoff J, et al. Evidence for a role of mixed lineage kinases in neuronal apoptosis. *J Neurosci*, 2001, 21(14): 4949-4957.