植物学通报 2005, 22 (3): 357~365
Chinese Bulletin of Botany

研 究 简 报

MAPK 级联途径在植物信号转导中的研究进展①

[1]陈娅斐 [1,2]冯 斌 [1]赵小明 [1]白雪芳 [1]杜昱光②

[1](中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023) [2](辽宁师范大学生命科学学院 大连 116029)

摘要 促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)在植物的胁迫反应应答方面占有重要地位。本文就MAPK的基本组成、分类、激发子和两种可能的机理的最新进展作了综述。并介绍了近年来此领域中的研究方法,包括MAPK活性测定的方法、免疫沉淀法、酵母双杂交、基因突变、RNA干涉和网络模式法。

关键词 MAPK, 信号转导, 研究方法

Progress of Study on MAPK Cascades of Plant Signal Transduction

[1]CHEN Ya-Fei [1,2]FENG Bin [1]ZHAO Xiao-Ming [1]BAI Xue-Fang [1]DU Yu-Guang②

[1](*Dalian Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences*, Dalian 116023)
[2](*College of Life Science, Liaoning Normal University*, Dalian 116029)

Abstract Mitogen-activated protein kinase (MAPK) play an essential role in response to a variety of stresses in plants. This paper reviews the recent progresses in the basic constitutions, categories, elicitors and two possible mechanisms of plant MAPKs. It also introduces several important experimental methods developed in this field, including kinase activity measurement, immune-precipitation, yeast two-hybrid, gene mutant, RNA interference and a new method-networks modules.

Key words MAPK, Signal transduction, Experimental methods

蛋白质激酶是一类可以使特定的蛋白质侧链中的丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基共价磷酸化的酶,蛋白质磷酸化可以控制酶的活性及其与其他分子的相互作用(Johnson and Lapadat, 2002)。促分裂原活化蛋白质激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是丝/苏氨酸蛋白质激酶的一个大家族,包含11个保守的亚结构域,现已于真核生物(酵母、哺乳动物、人及植物)中广泛发现(Widmann *et al*.,1999)。真核生物中的MAPK在将外源刺激信号转入胞内应答受体/感应器的下游的过程中起着枢纽的作用(Bogre *et al*., 2000)。在植物中, MAPK级联途径与不同的生物及非生物胁迫反应、激素反应、细胞分化和发育过程有关。

①国家863计划项目(2001AA625010, 2002AA245131)资助。
②通讯作者。Author for correspondence. E-mail: cyf800205@hotmail.com
收稿日期: 2004-02-17 接受日期: 2004-04-12 责任编辑: 崔郁英, 于昕

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-020

MAPK级联途径在酵母和动物中的研究起步比较早, 植物方面的研究虽然从20世纪90年代才发展起来, 但已经取得了相当大的进步。本文将就MAPK级联途径的最新进展和研究方法作一概述。

1 MAPK级联途径的基本组成

真核生物(酵母、动物和植物)中与MAPK级联途径有关的激酶均为丝/苏氨酸磷酸酶, 其基本组成为三级激酶模式, 即上游的促分裂原活化蛋白质激酶激酶激酶(MAPKKK, 如哺乳动物中的Raf和Mos蛋白质家族)通过将促分裂原活化蛋白质激酶激酶(MAPKK)中保守区域中丝/苏氨酸残基磷酸化而激活MAPKK, 再由MAPKK通过磷酸化MAPK第七和第八亚结构域之间的丝/苏氨酸和酪氨酸残基激活MAPK (Camps *et al*., 1999), 每种MAPKK只可以磷酸化其特异的MAPK, 功能上不能取代同类其他的MAPKK, 一套特异的功能上相连的三级激酶形成一个MAPK通路的基本模块。MAPK的活性调节是可逆的(Chang and Karin, 2001), MAPK磷酸酶(MAPK phosphatase, MKP)可以通过对MAPK的去磷酸化而使其失活。MAPK既可以作为信号转导的一个环节继续磷酸化下游的成分, 又可以进入细胞核激活转录因子进而调节基因表达。

MAPK是该级联途径中最后一个激酶, 包括一个三肽基序TXY, 即ATP磷酸化位点, 也叫活性片段, 此基序位于激酶催化结构域的第七和第八亚结构域之间的活化环(T-loop)中。MAPKK可通过保守的S/T-X_{3-5}-S/T(S代表丝氨酸, T代表苏氨酸)模块上的2个丝/苏氨酸残基磷酸化而被活化, 在酵母和哺乳动物中, 中间X (X代表氨基酸)的个数为3, 而在植物中为5。植物中已经发现的MAPKKK有CTR1、EDR1、NPK1/ANP和MEKK1-4(Favata *et al*., 1998), 其中CTR1和EDR1与动物中的Raf家族相关(MAPK group, 2002)。MAPKKK自身可通过中介桥梁因子(intermediate bridging factors)或者互联MAPKKKK之后通过生理反应或/和受体自身的磷酸化而活化(Jonak *et al*., 2002)。

G蛋白质(如Ras家族或异三聚体复合物)也可以作为感受胞外刺激的膜受体和胞内MAPK通路的偶联剂(Lee *et al*.,2001)。此级联途径的每一级都包括多个成员, 此种多样性决定于信号转导的特异性。在同一细胞中存在着多条MAPK通路, 每条通路中的三级激酶与不同的上游受体和下游目标物连接, 纵横交错, 形成错综复杂的信号转导网络。

2 MAPK的分类

2.1 哺乳动物MAPK的分类

哺乳动物中的蛋白质激酶分为两大家族, 一族可磷酸化丝氨酸和/或苏氨酸, 另一族可磷酸化酪氨酸。这些激酶在整个动物界中表现出高度的进化保守性, 行使着很多重要的功能。其中, 丝/苏氨酸促分裂原活化激酶可以被许多刺激物所活化。根据生理遗传特性和氨基酸保守的TXY基序序列比较, MAPK可分为4类: 胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK), 其中X为E(谷氨酸); c-jun-氨基末端激酶(c-jun N-terminal kinase, JNK) 或称为胁迫激活蛋白质激酶(stress-activated protein kinase, SAPK), 其中X为P(脯氨酸); p38, 其中X为G(甘氨酸) (Camps *et al*.,1999; Berman *et al*., 2001)。

2.2 植物MAPK的分类

植物中, 拟南芥全基因组序列测定发现存在21种MAPK, 10种MAPKK, 60种MAPKKK (MAPK group, 2002)。他们将以上发现的激酶与已经鉴定的其他植物(苜蓿、烟草、水稻和大麦等)中的MAPK相关激酶放在一起, 制订了一套分类命名法。目前已从高等植物中分离出50余种MAPK基因, 根据其中保守的TXY基序内氨基酸序列比较, 将其分成TEY和TDY 2个亚型, 其中前者又包括A、B和C 3个组, 后

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-020

者为 D 组。A 组的 MAPK 参与多种生物和非生物胁迫以及激素反应, 如 AtSIPK 可被损伤、盐、渗透压和病原物衍生的激发子所诱导(Jonak *et al*., 2002); B 组的 MAPK 研究的较少, 但已证明了它们参与环境胁迫反应和细胞分裂, 比如拟南芥的 AtMPK4 可参加生物和非生物胁迫应答; 关于 C 组和 D 组的信息很有限, 仅在微型分析中检测到控制 24 小时生理节律的 AtMPK7 表达。根据 MAPKK 氨基酸线性排列顺序比较, 这 10 种 MAPKK 可以分在 4 个组(A、B、C 和 D)中, 其数量约为 MAPK 的一半, 所以不同的信号转导通路之间的“交谈”(crosstalk)可能会集中在这个水平。MAPKKK 的成员较多, 共分成 3 组(A、B 和 C)。A 组含有典型的 MAPKKK (如 MEKK1/STE11/BCK1)激酶结构域, B 组和 C 组的氨基酸序列与 Raf 激酶有关。Jonak 等(1999)的综述中列表详细总结了 MAPK 级联途径中一些有代表性的激酶的生物功能, 在此不再赘述。

MAPK group(2002)提出的分类命名法给其他物种中与 MAPK 有关的各种分子的分类和命名提供了基础, 即可以通过参考拟南芥中激酶序列来推测相关植物中类似分子的作用, 这为进一步的研究提供了指导。

3 MAPK级联反应的激发子

由于植物的固定性, 它们必须通过调整自身的代谢功能来适应逆境。MAPK 级联途径的激活与微生物病原体感染、损伤、低温、干旱、过高或过低的渗透压、盐、碰触和活性氧等刺激性处理有关(Widmann *et al*., 1999; Dangl and Jones, 2001; Yang *et al*., 2001; Zhang and Klessig, 2001), 以上因素都可以称为激发子(elicitors), 其中微生物产生的病原体激发子可分为种族特异性的和非种族特异性的两种。非种族特异性激发子包括入侵微生物自身的各种化合物, 如真菌细胞壁碎片、细菌鞭毛蛋白质(Gómez-Gómez *et al*., 2001)、寡糖、脂类、肽类和蛋白质等(Montesano *et al*., 2003), 以上激发子已知的受体均位于质膜上; 种族特异性激发子多是由病原体无毒基因(*avirulence*, *Avr*)编码的蛋白质产物, 受体为 cf-9。这些产物或者被分泌入胞间空隙, 或者通过第 III 类型分泌系统直接注入细胞。以下介绍两例最近鉴定的激发子。

3.1 Harpin

harpin 是由一群植物病原菌欧氏杆菌属和假单胞杆菌属等的第 III 类型途径分泌的效应蛋白质组成的。harpin 可导致感病植物的致病和对非宿主植物和宿主植物抗性品种的过敏反应(hypersensitive reaction, HR)。研究发现, 有些效应蛋白质可以与植物胞内蛋白质相互作用, 从而活化植物体内的防御系统。Lee 等(2001)在豆类中发现 halo-blight 病原菌丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae* pv. *phaselicola*)产生的 harpin(harpin $_{Psph}$)可结合于质膜上, 这种结合具有特异性、可逆性和饱和性。它可以引起 48 kD 水杨酸响应的 SIPK(salicylic acid-inducible MAPK)的活化和与病程相关蛋白质 HIN1 的转录积累。他们发现包括 SIPK 在内的 MAPK 活性对于 harpin $_{Psph}$ 引发的 HIN1 表达是必需的。

3.2 鞭毛蛋白质(flagellin)

除了对于特殊病原物的识别系统外, 植物也发展出能识别相对于普遍微生物类群特征的微生物成分识别系统。不同的微生物结构可以作为激发子而起作用。对于一部分普遍的激发子, 已经鉴定出其存在于细胞质膜上的特定结合位点。特异的、高亲和性的结合位点的鉴定和表征为理解植物识别这些微生物诱导物的过程提供了重要信息。Meindl 等(2000)已经鉴定出含有 22 个氨基酸残基的鞭毛蛋白质 FLG22, 它在不同的植物细胞中都可作为抗性相关反应的激发子。Peck 等(2001)发现经过 FLG22 处理后, 拟南芥中的识别蛋白质激酶 FLS2 是一个编码富含亮氨酸重复结构(leucine-rich repeat, LRR)的丝/苏氨酸激酶, 同时 Gómez-Gómez 等(2001)发现 FLS2 的磷酸化对于鞭毛蛋白质受

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-020

体复合物正确的结合和信号传递是必要的。

植物识别到激发子之后, 就开始启动一系列信号转导事件, 比如Ca^{2+}等离子的内流, 活性氧生成, 激酶活化以及转录水平的一系列变化, 这些防卫机制在感知刺激几分钟之内就能发生作用。随后,在数小时内, 病程相关(PR)蛋白(如β-1,3-葡聚糖酶和几丁质酶等)、植保素和细胞壁加固有关化合物(如富含羟脯氨酸的糖蛋白和木质素等)的合成都会发生; 同时, 第二信使分子如乙烯、茉莉酸和水杨酸也相继生成。这些抗性反应或是杀死病原物或是将其控制在一定范围内(Samuel and Ellis, 2002; Yang *et al*., 2003)。

研究表明, 不同的激发子可以引起共同的MAPK应答。Holley等(2003)研究了秘鲁番茄(*Lycopersicon peruvianum*)悬浮细胞在多肽信号分子系统素(systemin)、寡糖诱导子(ologosaccharide elicitors)和紫外线B的作用下, 被诱导出3个MAPK类似物, LeMAPK1~3, 其中LeMAPK1/2可以被以上3种激发子独立诱导, LeMAPK3只能被紫外线B诱导。

激发子受体的鉴定是此类研究中的一项巨大挑战,目前只鉴定出了少数特异性识别受体。生物化学研究已经得到一些结合蛋白质的激发子的特征, 结合蛋白质可能是识别复合体的一部分。病原识别中最为可能的受体种类是跨膜的受体样蛋白质激酶(receptor-like protein kinases, RLKs) (Montesano *et al*., 2003)。

4 MAPK级联途径特异性的几种可能机理

为实现正常的信号功能, MAPK级联途径应该以高效性和高忠实性来进行信号传递。然而, 这种特异性的机理一直未被充分阐明。最近有研究揭示了两种可能的机制调节信号传递, 即锚定反应(docking interaction)和搭架(scaffolding)过程。

4.1 锚定反应

此方面的研究结果在酵母和哺乳动物中较为完整。MAPK与其相应的MAPKK、底物和磷酸酶共同构成一个复合体, 这个复合体的形成过程称为锚定反应(Montesano *et al*., 2003)。以下是一些对酶的晶体结构和序列分析得到的结果, 这些结构为推测MAPK级联途径的作用机理提供了证据。在与MAPK相互作用的分子(如MAPKK、MKP和MAPKAPK)的一级结构上发现了保守的MAPK锚定模体(docking motif), 它由疏水性氨基酸围绕的一个带正电的氨基酸簇形成, 但不在其催化反应结构域。在MAPK调节的转录因子(如Elk1、Sap1和Mef2)中存在一个类似的区域称为D结构域。MAPK中的锚定位点称为通用锚定结构域(common docking domain, CD domain), 它定位于MAPK一级结构的C末端, 由一簇带负电的氨基酸残基组成,由于此位点在与激发子、抑制子和下游底物的锚定反应中共用, 故得名。由于与MAPK相互作用分子上的锚定模体带正电, 而MAPK中的通用锚定结构域带负电, 所以推测锚定反应实质为静电相互作用。通用锚定结构域与附近的ED位点及其临近氨基酸一起叫做锚定沟。MAPK与其他分子相互作用的特异性不只是与通用锚定结构域有关,还有可能是由这个锚定沟决定的。使MAPK发生去磷酸化而失活的MAPK磷酸酶(MKP)存在一个锚定表面与MAPK的锚定沟相对应。在MAPK的底物(主要是指转录因子如Elk-1和Sap-1)上存在着另一个保守模体FXFP(F代表苯丙氨酸, X代表任意氨基酸, P代表脯氨酸), 此模块的特点是苯丙氨酸被一个氨基酸(X)所分隔, 后面是一个脯氨酸(Tanoue and Nishida, 2003)。

对烟草中伤诱导蛋白激酶(wound-induced protein kinase, WIPK)的研究表明, WIPK与NtMEK2作用的通用锚定结构域位于C-末端, 并且此结构域对于NtMEK2和WIPK的活化是起关键作用的(Yang *et al*., 2003)。

4.2 搭架过程

Xu等(1995)观察到即使在细胞中过表达

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-020

MEKK1, 使之组成性的活化, 它也只能磷酸化并激活MEKs, 而不能将信号转导至下游的ERK。根据类似的结果人们猜测在信号转导过程中, 一定有某种机制在调节酶-底物的亲和性方面起作用。作者认为所谓支架蛋白质或者接头蛋白质(adaptor)是一类可以与酶和底物相互作用, 但不直接参加磷酸化反应的第三方分子, 它可以使酶-底物复合物的形成更加便利。在酵母中, 蛋白质STE5通过将信息素应答的上游激发子和 MAPK 级联的三组分组织成为一种特殊的模式, 起到了支架的作用, 这种模式调节了两种不同信号途径的特异性(Herskowitz, 1995)。对哺乳动物中支架蛋白质类似物的研究表明(Schaeffer, 1998), 哺乳动物中与JIP无关的一种支架蛋白质MP1(MEK partner 1)能特异地结合到ERK1和MEK1上, 并且使二者更易活化。在悬浮细胞中过表达(overexpression)MP1, 能提高ERK的活性, 同时活化一个由转录因子Elk-1驱动的报告基因。此过程中, MP1 能促使 ERK1 结合到 MEK1 上, 使其活性潜能发挥出来。

5 MAPK的研究方法

近年来在蛋白质激酶的研究过程中, 研究者们逐渐发展出一些比较成熟的方法。

5.1 用MBP测定MAPK活性

近年来, 多数测定动物或植物中MAPK活性的方法都以髓磷脂碱性蛋白质MBP作为底物(myelin basic protein, MBP)。MBP是一族携带正电荷、能促进髓鞘形成和折叠的蛋白质(Atkins *et al*., 1999)。Miyamoto 和 Kakiuchi (1975)在鼠脑中发现MBP, 并且是磷蛋白磷酸酶(phosphoprotein phosphatases)的底物。Shanker和Pieringer(1987)在从鼠脑胚胎细胞中分离得到的髓磷脂样膜组分中发现。研究表明, MBP 是几种蛋白质激酶(蛋白质激酶 C、蛋白质激酶 A、钙 / 钙调蛋白质依赖的蛋白质激酶 II 和 MAPK 等)的最适底物。

以 MBP 为底物的胶酶活性分析(ingel MAPk activity assay)的实验策略如下: 将MBP与放射性标记的[r-^{32}P]ATP加入MAPK(或蛋白质提取物)中, 用SDS loading buffer中止反应后进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 然后用放射自显影技术定量磷酸化的 MBP(Gupta and Luan, 2003; Yang *et al*., 2001)。基于类似的原理, 可以测定MEK的自磷酸化和磷酸化活性。

5.2 激酶抑制剂(inhibitors)

MAPK级联途径的研究方法之一是使用其抑制剂进行分析。植物中应用较多的抑制剂是PD98059和U0126。通常证明某种代谢通路或中间产物是否与MAPK级联途径相关的方法是用特异性的抑制剂与MAPK或MEK等发生作用, 再检测其他代谢产物受到的影响, 结果可作为复杂信号转导网络信号之间相关性的证据。

在动物中, 当前此方面的研究热点是 p38 和 MEK1/2 蛋白质激酶的小分子抑制剂特性。在动物疾病模型中, 其中的一些抑制剂已经显示出效果, 并且已经发展到治疗炎症和癌症的临床试验阶段(English and Cobb , 2002)。研究发现, 多数蛋白酶抑制剂与ATP有竞争性, 人们相信它们与ATP结合位点有相互作用。但有研究表明, MEK1/2 的抑制剂不与底物 ATP 发生竞争(Favata *et al*.,1998), 这表明抑制机制并不单一依赖激酶, 它们只是把 ATP 作为磷酰基提供者。

因为蛋白质激酶的种类繁多, 其抑制剂的特异性成为该领域研究的一个热点。抑制剂结合结构分析设计阻断剂的发展表明, 其特异性将通过模型化和以结构为基础的设计得到提高。抗炎剂吡啶异咪哒唑类(pyridinylimidazole)化合物(Wilson *et al*.,1996), 比如VK19911及SB 类化合物(smithkline beecham, SB)(Shanker and Pieringer, 1987), 都是p38的高效和高选择性抑制剂, 它们对于与之紧密相关的ERK2或其他丝/苏氨酸激酶无此作用。晶体结构数据表明, SB类化合物可与p38低活性形式的开放区域结构互补, 并结合于其活性位点的伸展口袋(extended pocket)上, 而相对关闭的ERK2结合

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-020

区域只能容得下较小的分子olomoucine[一种较好的ERK2抑制剂(Wang *et al*., 1998)]。

MEK1/2的第一个合成的抑制剂是PD98059,它是在有ERK活性的抑制剂的体外筛选中被鉴定出的(Dudley *et al*., 1995)。不久在佛波酯诱导的细胞活性蛋白质1(AP-1)的活性筛选中发现了第二个抑制剂U0126。这两个抑制剂都与ATP无竞争性,似乎都结合于MEK1上相似的位点(Favata *et al*.,1998)。但目前对于如何设计真正基于此种类型的抑制剂的策略还知之甚少,所以大量化合物的高通量筛选仍是最有希望的方法之一(Halazy, 2003)。

5.3 免疫沉淀法

大分子蛋白质是一种完全抗原,具有免疫原性和特异反应性,即它不仅能免疫机体并促使机体产生抗体,还能与抗体产生特异性结合。抗原-抗体反应可能是生物体中已知的最特异的反应(于善谦 等, 1999)。在确定MAPK级联途径中有关激酶的种类时,特别是在与其余相似的激酶进行区分时,免疫沉淀法是一种微量、灵敏和特异性强的检测方法,得到了广泛的应用。

MAPK特异性抗体是通过识别双磷酸化的苏氨酸-谷氨酸-酪氨酸三肽模体$_{p}$TE$_{p}$Y而发生免疫结合的。使用某种MAPK的一段特异性序列制备的单一特异性抗血清(mono-specific antiserum)可以直接鉴定这种特定的MAPK(Lee *et al*., 2001)。Zhang和Klessig(1998)证明了WIPK和SIPK对各自的抗体Ab-p44N和Ab-p48N有高度的免疫特异性,水渗入和损伤诱导的蛋白质激酶是SIPK而非WIPK。

5.4 酵母双杂交

酵母双杂交体系(yeast two-hybrid system),也叫相互作用陷阱(interaction trap),是90年代初期发展起来的一种敏感的体内鉴定基因的方法(吴乃虎, 1998)。它可以用来分离能与靶蛋白质(target protein)相互作用的蛋白质的编码基因。

在MAPK级联途径的研究中,人们常用这种方法来分离能与一种激酶相互作用的蛋白质或其他因子。比如, Yang等(2001)在烟草中找到了与SIPK相互作用的上游激酶SIPKK。Moon等(2003)在拟南芥中用酵母双杂交及其他方法找到了与2个MAPK(MPK3和AtMPK6)发生特异性相互作用的上游激酶AtNDPK2,并第一次发现其在H_2O_2介导的MAPK信号通路中发挥调节作用。

5.5 基因突变

在对基因结构和功能的分析中,突变是一种最基本的手段。近年来,在MAPK的基因功能研究中,应用较多的是点突变和基因敲除等。突变体的构建是基因功能研究中的一个难点,现举几例。

Yang 等(2001)在烟草中把一种MAPKK-NtMEK2上保守的S/TXXXXXS/T模体中的S/T用谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)代替时,突变体表现出组成性的活性,比野生型的NtMEK2的活性有很大提高。在酵母和动物中也有类似的结果。而将烟草中的MAPK、SIPK或WIPK催化中心上的赖氨酸用精氨酸取代后,它们就失去了自磷酸化活性。

对线虫(*Caenorhabditis elegans*)的p38类似基因*PMK-1/3*做敲除实验时发现,突变体未见生长缺陷或,也未见对几种已知胁迫的过敏反应,但是*pmk-2*突变却使突变体在幼虫期就停止生长并死亡(Berman, 2001)。

对拟南芥基因*MPK4*敲除突变的逆向遗传分析表明它在获得性抗性(systematic acquired resistance, SAR)上很重要,包括积累水杨酸的能力(Petersen, 2000)。

5.6 RNA干涉(RNA interference, RNAi)

RNAi是近年来发展起来的一项基因工程技术,它是指用双链RNA诱发内源的同源基因沉默(gene silencing)。RNAi是在转录后水平上对特定序列的封闭,可用于动植物基因功能的研究,现已成为敲除生物体内特定基因,制止其表达的有力工具(Hammond *et al*., 2001)。

Xiong和Yang (2003)从水稻中分离和表征

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-020

了胁迫应答的一个MAPK基因*OsMAPK5*,它是一个单拷贝基因,但是可以产生至少两个差异剪切的转录产物。此基因可以被脱落酸和各种生物(病原菌侵染)和非生物(损伤、干旱、盐和寒冷)胁迫所诱导。有趣的是, 在构建的两种转基因水稻植株中, *OsMAPK5* 的抑制型(双链RNA干涉)植株表现出病程相关蛋白质PR1和PR10的组成型表达, 同时对真菌和细菌病原抵抗能力增加, 但对于干旱、盐、和寒冷的耐受能力却大幅度减小; 而过表达(overexpres-sion)该基因的转基因植株却表现出OsMAPK5酶活性增加, 同时增强了对干旱、盐和寒冷的耐受力。这表明了该基因可以正向调节对于干旱、盐和寒冷的耐受力, 而负向调节 PR 基因的表达和抗病能力。

5.7 网络模式法

最近, Rives和Galitaki(2003)通过研究相互作用的蛋白质之间的组织关系和蛋白质复合体形成的模式网络来建立分子网络模式。MAPK及其支架蛋白质和各种调节子和效应子形成的信号放大模式是他们研究的较早的例子。他们发展并评价了使用酵母信号蛋白质网络模式的网络集簇方法。这种方法通过使用功能性富集的高通量数据组(data sets)进行工作。酵母庞大复杂的 mfMAPK 模式结构进一步说明生物可以通过复制和分化过程以及增长和连接模式来进化。

6 结语

过去的十几年中, 植物中MAPK信号转导领域的研究发展迅速。酵母和哺乳动物中对MAPK的研究更加成熟, 这为植物领域的研究提供了很多有价值的方法和思路。尽管现有的生物化学、遗传学和分析化学的方法已经有很大发展, 但由于信号转导网络错综复杂, 很多情况下得到的都是间接证据, 所以发展更为有效的研究方法来鉴定响应特定刺激的蛋白质及其对应基因成为本领域中的一大挑战。

参 考 文 献

吴乃虎 (1998) 基因工程原理(上册). 科学出版社, 北京, 365-369

于善谦, 王洪海, 朱乃硕, 叶荣 (1999) 免疫学导论. 高等教育出版社, 北京, 13

Atkins C, Yon M, Groome N, Sweatt J (1999) Regulation of myelin basic protein phosphorylation by mitogen-activated protein kinase during increased action protein firing in the *Hippocampus*. *Journal of Neurochemistry*, **73:** 1090-1097

Berman K, McKay J, Avery L, Cobb M (2001) Isolation and characterization of *pmk-(1-3)*: three p38 homologs in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Cell Biology Research Communications*, **4:** 337-344

Bogre L, Meskiene I, Heberle-Bors E, Hirt H (2000) Stressing the role of the MAP kinases in mitogenic stimulation. *Plant Molecular Biology*, **43:** 705-718

Camps M, Nichols A, Arkinstall S (1999) Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase funtion. *The FASEB Journal*, **14:** 6-16

Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410:** 37-40

Dangl J, Jones J (2001) Plant pathogens and integrated defense responses to pathogens. *Nature*, **411:** 826-833

Dudley D, Pang L, Decker S, Bridges A, Saltiel A (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **92:** 7686-7689

English J, Cobb M (2002) Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends in Pharmacological Sciences*, **23:** 40-45

Favata M, Horiuchi K, Manos E, Daulerio A, Stradley D, Feeser W, van Dyk D, Pitts W, Earl R, Hobbs F, Copeland R, Magolda R, Scherle P, Trzaskos J (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **273:** 18623-18632

Gupta R, Luan S (2003) Redox control of protein

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-020

Tyrosine phosphatases and mitogen-activated protein kinases in plants. *Plant Physiology*, **132:** 1149-1152

Gómez-Gómez L, Bauer Z, Boller T (2001) Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **13:** 1155-1163

Halazy S (2003) Signal transduction: an exciting field of investigation for small molecule drug discovery. *Molecules*, **8:** 349-358

Hammond S, Caudy A, Hannon G (2001) Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Reviews Genetics*, **2:** 110-119

Herskowitz I (1995) MAP kinase pathways in yeast**:** for mating and more. *Cell*, **80:** 187-197

Holley S, Yalamanchili R, Moura D, Ryan C, Stratmann J (2003) Convergence of signaling pathways induced by systemin, oligosaccharide elicitors and ultraviolet-B radiation at the level of mitogen-activated protein kinase in *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cell. *Plant Physiology*, **132:** 1728-1738

Johnson G, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinases. *Science*, **193:** 1911-1912

Jonak C, Ligterink W, Hirt H (1999) MAP kinase in plant signal transduction. *Cellular and Molecular Life Science*, **55:** 204-213

Jonak C, Okresz L, Bögre L, Hirt H (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, **5:** 415-424

Lee J, Klessig D, Nürnberger T (2001) A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene *HIN1* independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *The Plant Cell*, **13:** 1079-1093

MAPK group (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants**:** a new nomenclature. *Trends in Plant Science*, **7:** 301-308

Meindl T, Bollor T, Felix G (2000) The bacterial elicitor flagellin activates its receptor in tomato cells according to the address-message concept. *The Plant Cell*, **12:** 1783-1794

Miyamoto E, Kakiuchi S (1975) Phosphoprotein phosphatases for myelin basic protein in myelin and cytosol fractions of brain. *Biochimica et Biophysica Acta*, **384:** 458-465

Montesano M, Brader G, Palva E (2003) Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology*, **4:** 73-79

Moon H, Lee B, Choi G, Shin D, Prasad D, Lee O, Kwak S, Kim D, Nam J, Bahk J, Hong J, Lee S, Cho M, Lim C, Yun D (2003) NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **100:** 358-363

Peck S, Nühse T, Hess D, Iglesias A, Meins F, Boller T (2001) Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. *The Plant Cell*, **13:** 1467-1475

Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen H, Lacy M, Austin M, Parker J, Sharma S, Klessig D, Martienssen R, Mattsson O, Jensen A, Mundy J (2000) *Arabidopsis* MAP kinase 4 negatively regulates systematic acquired resistance. *Cell*, **103:** 1111-1120

Rives A, Galitski T (2003) Modular organization of cellular networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **100:** 1126-1133

Samuel M, Ellis B (2002) Double jeopardy: both overexpression and suppression of a redox-activated plant mitogen-activated protein kinase render tobacco plants ozone sensitive. *The Plant Cell*, **14:** 2059-2069

Schaeffer H, Catling A, Eblen S, Collier L, Krauss A, Weber M (1998) MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science*, **281:** 1625-1626

Shanker G, Pieringer R (1987) Investigations on myelinogenesis *in vitro*: I. the occurrence of endogenous protein kinase and its role in the phosphorylation of myelin basic protein in 'myelin-like membranes' isolated from cerebral cell cultures. *Bioscience Reports*, **7:**151-157

Tanoue T, Nishida E (2003) Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cellular Signalling*, **15:** 455-

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-020

462

Wang Z, Canagarajah B, Boehm J, Kassisà S, Cobb M, Young P, Meguid S, Adams J, Goldsmith E (1998) Structural basis of inhibitor selectivity in MAP kinases. *Structure*, **6:** 1117-1128

Widmann C, Gibson S, Jarpe M, Johnson G (1999) Mitogen-activated protein kinase**:** conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological Reviews*, **79:** 143-180

Wilson K, Fitzgibbon M, Caron P, Griffith J, Chen W, McCaffrey P, Chambers S, Su M (1996) Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **271:** 27696-27700

Xiong L, Yang Y (2003) Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *The Plant Cell*, **15:** 745-759

Xu S, Robbins D, Frost J, Dang A, Carter C, Cobb M (1995) MEKK1 phosphorylates MEK1 and MEK2 but does not cause activation of mitogen-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **92:** 6808-6812

Yang K, Liu Y, Zhang S (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **98:** 741-746

Yang K, Liu Y, Zhang S (2003) Interaction between two mitogen-activated protein kinases during tobacco defense signaling . *The Plant Journal*, **34:** 149-160

Zhang S, Klessig D (1998) The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **95:** 7225-7230

Zhang S, Klessig D (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science*, **6:** 520-527

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-020