

多聚谷氨酰胺延伸蛋白募集细胞内正常蛋白质 或 RNA 的分子机制*

岳宏伟 胡红雨**

(中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 多聚谷氨酰胺(PolyQ)疾病, 是一类由编码蛋白质的基因中 CAG 三核苷酸重复序列的异常延伸所引发的神经退行性疾病。CAG 三核苷酸重复序列导致所编码蛋白质的 PolyQ 序列的异常延伸, 使蛋白质发生错误折叠和积聚, 并在细胞内形成包涵体。包涵体的形成是神经退行性疾病的一个重要特征。PolyQ 蛋白在积聚过程中, 可以将细胞内与其特异相互作用的蛋白质或 RNA 募集到包涵体中。被募集的其他蛋白质或 RNA 不仅自身的可溶性组分减少, 而且由于被“挟持”到包涵体中其在细胞内的有效组分也相应地减少, 从而影响其正常的生物功能。根据特异相互作用的模式, 我们将募集作用分为以下几种类型: 蛋白质(含 PolyQ 蛋白)的共积聚; 特定结构域或模体介导的募集作用(包括泛素等修饰介导的募集作用); RNA 介导的募集作用; 以及对分子伴侣蛋白的募集作用。PolyQ 延伸蛋白的积聚和对其他组分的募集可能是引发细胞毒性和神经退行性病变的重要原因。

关键词 PolyQ 疾病, 积聚, 包涵体, 募集作用, 功能损伤, 细胞毒性, 神经退行性

学科分类号 Q5, Q2

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0141

人类编码蛋白质的基因中三核苷酸重复序列的异常延伸是引发多种神经系统疾病的重要原因^[1], 其中 CAG 三核苷酸重复序列的异常延伸所引发的神经退行性疾病是重要的一类。CAG 所编码的氨基酸是谷氨酰胺 (glutamine, Gln, Q), 这种突变会导致其产物蛋白质中含有一段异常延伸的多聚谷氨酰胺 (polyglutamine, polyQ) 重复序列即 PolyQ 序列, 因此, 通常将这种类型的疾病称为 PolyQ 疾病。目前为止, 已经鉴定出的 PolyQ 疾病大约有 9 种, 包括亨廷顿病 (HD)、脊髓小脑共济失调 (SCA1、2、3、6、7 和 17)、脊髓延髓性肌肉萎缩 (SBMA) 和齿状核红核苍白球丘脑下部肌肉萎缩 (DRPLA) 等^[2]。这 9 种 PolyQ 疾病分别由不同致病基因的 CAG 序列异常延伸突变导致 (表 1), 这些基因所编码的蛋白质的结构和功能也各不相同。不同类型的 PolyQ 疾病中, 受到影响的神经元类群有所差异, 所引发的神经退行性病变的临床症状也不尽相同^[3]。

虽然不同 PolyQ 疾病的突变基因以及受影响的神经元类群等有所差异, 但是这些 PolyQ 疾病在致病机理上具有一些相同的特征。在细胞水平上, 疾病都能够引起泛素-蛋白酶体功能的损伤、转录调控紊乱、神经细胞轴突运输受损以及线粒体功能损伤等等^[4]。而在分子水平上, PolyQ 序列的异常延伸使蛋白质容易发生积聚, 形成不可溶的淀粉样沉淀^[5]。在细胞内可以观察到突变的 PolyQ 蛋白大量积聚并且形成微米级别大小的包涵体结构。包涵体的形成是大部分神经退行性疾病的一个共同特征。除了 PolyQ 蛋白形成的包涵体以外, 在其他类型的神经退行性疾病中也都检测到了类似结构, 如帕金森病 (PD) 中的路易氏小体 (Lewy bodies)^[6]、肌萎缩

* 国家自然科学基金面上项目(31470758)资助。

** 通讯联系人。

Tel: 021-54921121, E-mail: hyhu@sibcb.ac.cn

收稿日期: 2018-05-07, 接受日期: 2018-08-15

Table 1 Nine PolyQ diseases and their pathogenic proteins

表 1 9 种 PolyQ 疾病和致病蛋白质

疾病类型	致病基因	致病蛋白质	蛋白质功能	受影响神经元类群
亨廷顿病(HD)	<i>HD</i>	Huntingtin(Htt)	膜泡转运; 转录	纹状体; 小脑皮层
脊髓小脑共济失调(SCA1)	<i>ATXN1</i>	Ataxin-1(Atx1)	参与转录	大脑皮层; 齿状核; 脑皮质; 脑干
脊髓小脑共济失调(SCA2)	<i>ATXN2</i>	Ataxin-2(Atx2)	RNA 代谢	小脑皮质; 大脑皮层; 脑干
脊髓小脑共济失调(SCA3)	<i>ATXN3</i>	Ataxin-3(Atx3)	去泛素化酶	小脑; 基底核; 脑干; 脊髓
脊髓小脑共济失调(SCA6)	<i>ATXN6</i>	CACNA1A	钙离子通道亚基	小脑
脊髓小脑共济失调(SCA7)	<i>ATXN7</i>	Ataxin-7(Atx7)	SAGA 复合物组分	小脑; 视网膜; 脑干; 视觉皮层
脊髓小脑共济失调(SCA17)	<i>ATXN17</i>	TATA-Box binding protein (TBP)	转录因子	小脑; 纹状体
脊髓延髓性肌肉萎缩 (SBMA)	<i>AR</i>	Androgen receptor(AR)	核受体	脊髓; 脑干
齿状核红核苍白球丘脑下部 肌肉萎缩 (DRPLA)	<i>ATN1</i>	Antrophin-1	核受体抑制因子	小脑; 大脑皮层; 基底神经节; 丘脑底核

侧索硬化 (ALS) 中的 TDP-43 包涵体^[7]等。关于包涵体在神经退行性病变中的作用, 目前还存在争议。有观点认为包涵体的形成是对神经细胞的保护作用的体现^[8]; 而另外一种观点则认为, 包涵体的形成会引起神经细胞毒性, 对细胞造成损伤。

研究发现, 在包涵体中除了能够检测到致病蛋白质以外, 还发现了细胞内许多其他重要的组分, 包括泛素 - 蛋白酶体和分子伴侣系统的成分^[9]、转录因子^[10]以及 RNA^[11-12]等。因此有学者认为疾病相关蛋白质可以与其相互作用的其他蛋白质募集到包涵体中, 从而引起细胞毒性和神经退行性病变^[13]。这些不同功能的蛋白质或 RNA 在细胞的稳态以及各方面功能的行使和调节中扮演着十分重要的角色。包涵体对这些相关蛋白质或者 RNA 的募集势必会引起细胞相关功能的紊乱, 从而引起神经细胞损伤和死亡, 导致神经退行性病变。例如, 病理研究表明, PolyQ 疾病中蛋白质的降解功能受损, 包括泛素 - 蛋白酶体或自噬两大蛋白质降解系统功能损伤等^[14]。而蛋白质降解功能的损伤不利于对细胞中错误折叠或积聚蛋白的及时和有效地清除, 会加剧错误折叠或积聚蛋白的积累, 从而加速神经退行性病变。细胞和分子生物学研究表明包涵体可以募集泛素 - 蛋白酶体组分、分子伴侣蛋白以及一些自噬蛋白等^[9]。这些组分是细胞内蛋白质质量控制系统中的重要组分, 其功能的损伤将直接导致蛋白质清除功能的破坏。积聚蛋白在分子水平上对这些组分的募集, 破坏了其正常功能, 进而影响整个蛋白质清除机器的正常运转, 进一步加剧积聚蛋白的积累, 加剧神经退行性病变。同样, 积聚蛋白或包涵

体也将以同样的方式通过募集细胞内的转录因子、RNA 以及线粒体相关组分, 引起神经细胞转录调控紊乱以及线粒体功能损伤等。由此可知, PolyQ 积聚蛋白的募集作用可以广泛地影响神经细胞在各方面的功能, 破坏细胞的内稳态 (homeostasis), 引起神经细胞毒性, 加剧疾病发展。所以, 研究积聚蛋白对这些细胞内相关蛋白质或 RNA 的募集作用及其分子机制对于认识神经退行性疾病的病理机制十分重要, 并且有可能为疾病的治疗和药物的研发提供分子靶标。

我们实验室研究了多种积聚蛋白对细胞内其他组分的募集作用, 并且对募集作用分子机制和相关蛋白质功能的变化以及细胞效应做了详细的阐释。我们发现特异的分子间相互作用在蛋白质的募集过程中具有重要的作用, 并且提出了挟持模型^[15-16]。当疾病相关蛋白质在细胞中发生错误折叠和积聚时, 其积聚物会将细胞中其他与之相互作用的蛋白质或 RNA 募集到沉淀物中。这种募集作用不仅改变了这些被“挟持”的蛋白质的细胞定位, 还使它们处于可溶状态下的量减少, 从而引起其功能活性的损伤 (图 1)。

蛋白质积聚物对细胞内其他组分的募集作用有些是非特异性的; 也有一些募集作用具有特异性, 需要分子之间的特异相互作用来介导。根据具体的相互作用模式的特征, 我们将蛋白质积聚的募集作用分为 4 种不同的类型 (图 2)。具有不同结构域特性的 PolyQ 蛋白通过一些共同的或者特异的募集作用方式, 募集细胞内与其密切相关的蛋白质或 RNA。

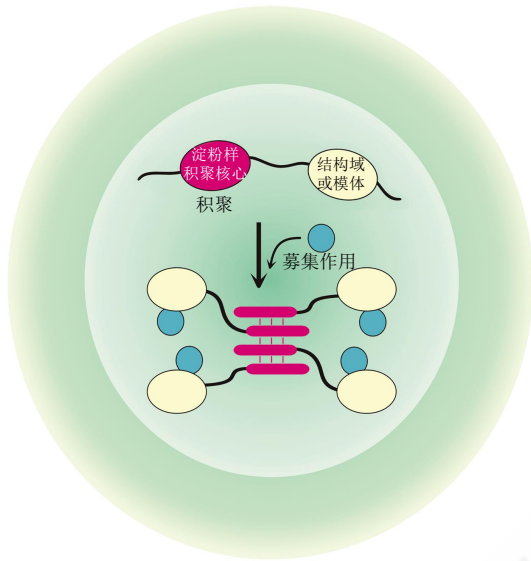


Fig. 1 Hijacking model
图 1 挟持模型

神经退行性疾病相关蛋白质通过其淀粉样聚集核心会发生积聚，积聚物可以通过结构域或模体介导的特异性相互作用募集细胞内其他的蛋白质或 RNA 成分，从而将其挟持到包涵体中。红色：蛋白质聚集核心；黄色：蛋白质结构域或模体；蓝色：细胞内被募集的蛋白质或 RNA。

1 PolyQ 蛋白质的共积聚

共积聚指的是容易积聚的蛋白质之间通过淀粉样结构域或序列相互形成富含 β 折叠的积聚物 (图 2a)。PolyQ 蛋白由于都含有 PolyQ 序列而容易相互共积聚。当一种蛋白质的 PolyQ 延伸而发生积聚时，很有可能与和他相关联的正常或突变的 PolyQ 蛋白共积聚。例如，PolyQ 延伸的亨廷顿蛋白 (huntingtin, Htt) 能够将正常 Htt 蛋白募集到包涵体中，这很有可能是通过 PolyQ 序列之间的共积聚效应实现的^[17]。PolyQ 延伸的 Htt、Ataxin-3 (Atx3) 以及 Ataxin-1 (Atx1) 等都可以与含有 PolyQ 序列的转录因子 CBP (CREB-binding protein) 共积聚，从而将 CBP 蛋白募集到包涵体中^[18-19]。此外，PolyQ 蛋白还可以与含有其他类型的淀粉样序列的蛋白质发生共积聚。有文献报道，PolyQ 延伸的 Htt 蛋白可以与普里朊 (prion) 样蛋白 Sup35 发生共积聚^[20-21]。

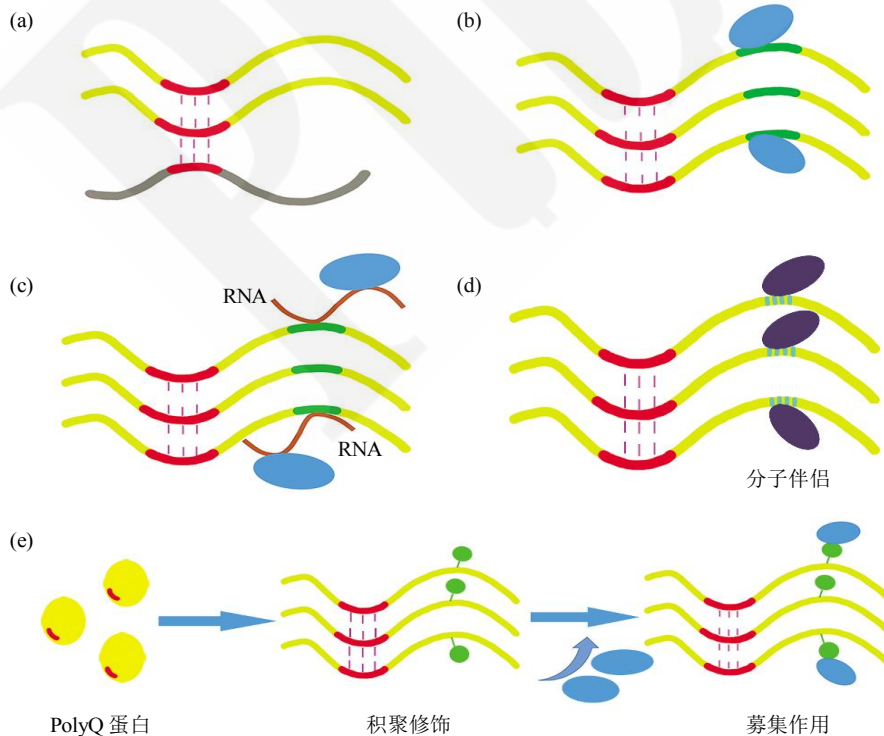


Fig. 2 Four distinct types of sequestration effect
图 2 PolyQ 积聚蛋白的 4 种募集作用方式

(a) PolyQ 蛋白通过 PolyQ 核心序列形成共积聚效应。(b) 结构域或模体介导的特异性募集作用。(c) RNA 介导的募集作用。(d) 对分子伴侣的募集作用。(e) 通过泛素等修饰所介导的募集作用过程。黄色：PolyQ 蛋白；灰色：参与共积聚的另一 PolyQ 蛋白；红色：PolyQ 序列聚集核心；墨绿色：PolyQ 蛋白中的结构域或模体；蓝色：被 PolyQ 积聚蛋白募集的相互作用蛋白质；棕色：被募集的 RNA 或介导募集作用的 RNA；紫色：分子伴侣；绿色：泛素等修饰蛋白。

2 特定结构域或模体介导的募集作用

PolyQ 蛋白发生积聚时, 可以通过自身特定结构域将与其相互作用的其他蛋白质或 RNA 募集到包涵体中. 我们将此类募集称为特定结构域的相互作用介导的募集作用^[22](图 2b). 引发 9 种 PolyQ 疾病的蛋白质功能和结构域组成各不相同, 因此其细胞内的相互作用网络有很大差异(图 3). Htt 蛋白是一个由 3 144 个氨基酸组成的相对分子质量较大的蛋白质, 目前关于其结构和功能的了解比较少. 在 Htt 蛋白的 PolyQ 序列前面有一段脯氨酸丰富区(proline-rich region, PRR)序列, 该序列可以与 HYPA 或 HYPB 蛋白的 WW 结构域相互作用, 这一相互作用介导了 PolyQ 延伸的 Htt 蛋白对 HYPA 或 HYPB 的募集, 且结构域的突变会破坏蛋白质的相互作用和募集效果^[23-24]. Ataxin-7 (Atx7)蛋白是细胞核内 SAGA 复合物的重要组分, 参与基因转录的激活过程. 与 Htt 蛋白类似, Atx7 蛋白的 N 端 PolyQ 序列之后也含有一段 PRR 序列, 该序列可以与 SH3 结构域相互作用, 从而介导相关蛋白质的募集作用^[25]. 我们还发现, Atx7 的 N 端锌指

结构域可以与 USP22 的 N 端相互作用^[16]. 当 PolyQ 延伸突变的 Atx7 蛋白形成包涵体时, Atx7 可以通过与 USP22 蛋白锌指结构域之间的相互作用将 USP22 募集到包涵体中. 由于 Atx7 蛋白是 SAGA 复合物的组分, 该积聚蛋白募集复合物中的其他组分将导致该复合物的功能活性受到损伤. 我们的研究发现, 这种募集作用导致 USP22 对组蛋白的去泛素化功能受到损伤^[16]. 此外, 含有 PolyQ 序列的 Atx3 蛋白是一种去泛素化酶, 其 C 端 UIM 结构域可以识别泛素链, 负责结合泛素化的底物蛋白. PolyQ 延伸的 Atx3 可以通过 UIM 结构域将细胞内的泛素化蛋白募集到沉淀中^[15]. Atx3 蛋白的 C 端还含有一个 VBM 结构域, 该结构域介导 Atx3 与 P97 的相互作用^[26]. PolyQ 延伸的 Atx3 蛋白在积聚过程中也会通过这种相互作用将 P97 募集到沉淀中^[15]. Atx3 积聚物对 P97/VCP 蛋白的募集作用影响了 P97 对细胞内 NEDD8 修饰水平的下调功能. 由此, 我们认为, 不同的 PolyQ 蛋白都可以通过其各自特定的结构域或模体所介导的相互作用, 将细胞内与其密切联系的其他蛋白质募集到包涵体中.

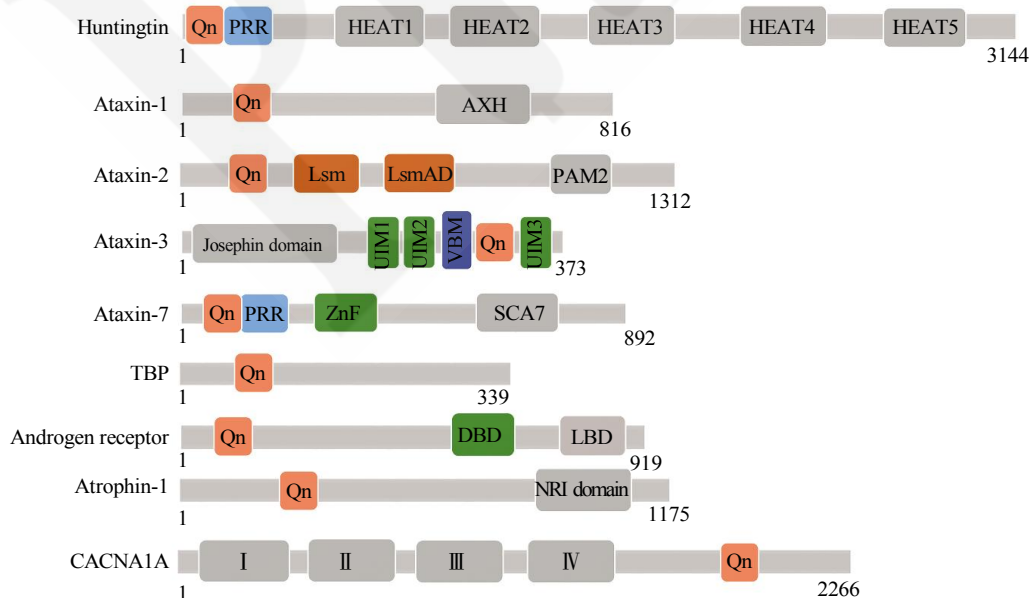


Fig. 3 Domain architectures of different polyQ proteins

图 3 不同 PolyQ 蛋白的结构域组成

Qn: 多聚谷氨酰胺序列; PRR: 脯氨酸丰富区; HEAT1~5: HEAT 重复序列; AXH: AXH 结构域; Lsm: 类似 RNA 剪切结构域 Sm1 和 Sm2 的结构域; LsmAD: 类 Sm 结合结构域; PAM2: 多聚腺嘌呤结合蛋白相互作用模体; Josephin domain: 去泛素化酶催化结构域; UIM1~3: 泛素相互作用模体; VBM: P97 结合模体; ZnF: 锌指结构域; SCA7: SCA7 结构域; DBD: DNA 结合结构域; LBD: 配体结合结构域; NRI domain: 核受体相互作用结构域; I~IV: 4 个同源结构域, 各含有 6 个跨膜区域.

我们知道, PolyQ 蛋白能够发生多种不同的翻译后修饰, 包括泛素化修饰、SUMO 化修饰和乙酰化修饰等等. 这些修饰会影响蛋白质的积聚、包涵体形成及降解等过程. 而这些通过共价连接修饰到 PolyQ 蛋白上的小分子蛋白质或基团, 可以作为特异的分子信号, 被细胞内特定的结构域识别, 从而介导蛋白质之间的相互作用. 例如, 泛素可以被 UBA 和 UIM 等结构域所识别^[27], 含有这一类结构域的蛋白质都可能结合泛素. 因此, 发生共价修饰的 PolyQ 蛋白在积聚过程中, 除了利用自身特异的结构域募集相互作用的蛋白质以外, 也可能通过这种小分子蛋白质或基团介导的特定形式的相互作用募集细胞内相关成分(图 2e).

2.1 泛素介导的募集作用

在不同的 PolyQ 蛋白所形成的包涵体中往往可以检测到泛素、蛋白酶体组分, 以及泛素接头蛋白(adaptor) UBQLN1/2 和自噬受体 P62、OPTN 等泛素相关成分^[28-30]. 为什么在不同的突变体蛋白质形成的包涵体中都能检测到这些泛素相关组分一直是个未解之谜. 根据我们所提出的募集挟持模型, 这些泛素相关的成分很有可能是通过共同的机制, 即泛素介导的相互作用而被募集到包涵体中的.

大量的实验证据都表明, PolyQ 延伸的蛋白质会被泛素连接酶识别并发生泛素化修饰^[31], 从而将这些错误折叠的蛋白质打上标签, 被泛素-蛋白酶体和自噬-溶酶体等蛋白质质量控制系统所识别和清除, 以维持细胞中的蛋白质稳态^[32]. 例如, 泛素连接酶 CHIP 能够促进多种 PolyQ 蛋白质包括 AR、Htt、Atx1 和 Atx3 的泛素化, 抑制突变蛋白的积聚, 缓解神经毒性. 而打上泛素标签的 PolyQ 蛋白可以被细胞内泛素识别结构域所识别, 例如含有 UBA 结构域的泛素接头蛋白 hHR23A/B 和 UBQLN1/2, 以及自噬途径中的受体蛋白 P62 和 OPTN 等等^[33-34]. 为了揭示泛素修饰在募集这些接头蛋白中的作用, 我们实验室研究了 PolyQ 延伸的 Atx3 和 Htt 所形成的包涵体对泛素接头蛋白 hHR23B 和 UBQLN2 的募集作用以及分子机制. 我们发现, 正常细胞内源的 hHR23B 和 UBQLN2 蛋白是弥散分布于细胞中的, 而当细胞内形成 PolyQ 蛋白的包涵体时, 这两种接头蛋白都能够被募集到包涵体结构中. 并且, 这两种 PolyQ 蛋白所形成的包涵体对 hHR23B 和 UBQLN2 的募集作用依赖于接头蛋白 UBA 结构域以及 PolyQ 蛋白自身

的泛素化修饰^[35]. 我们利用 hHR23 和 UBQLN2 蛋白的 UBA 结构域缺失突变以及泛素结合位点突变体研究发现, 破坏泛素结合结构域可以影响 PolyQ 包涵体对这些蛋白质的募集作用. 根据相关文献报道, Htt 蛋白 N 端 (Htt-N90) 的 3 个赖氨酸可以发生泛素化修饰, 而 C 端 Atx3 蛋白 (Atx3-C) 也能够被泛素化^[36-37]. PolyQ 蛋白序列的赖氨酸突变显著抑制了其泛素化修饰, 同时也下调了 PolyQ 包涵体对 hHR23B 和 UBQLN2 蛋白的募集作用. 这就说明, 这两种泛素接头蛋白可以通过结合 PolyQ 蛋白的泛素化修饰而被募集到包涵体中.

自噬受体蛋白 P62 和 OPTN (optineurin) 也常常被检测到存在于包涵体结构中^[28, 38], 并且这两种蛋白质与神经退行性疾病的发生发展有密切的联系. P62 和 OPTN 蛋白都含有 UBA 结构域, 可以结合泛素化的底物, 从而介导底物蛋白通过自噬途径降解. 因此, 自噬受体蛋白 P62 和 OPTN 也可能通过泛素介导的相互作用被募集到了包涵体中. 而包涵体对自噬组分包括受体蛋白的募集作用将可能导致细胞质中可溶性受体蛋白的量减少, 从而影响到自噬功能的正常进行^[35, 39]. 除了泛素接头蛋白以外, 蛋白酶体的 19S 小亚基中含有许多能够结合泛素的结构域, 如 S5 α 蛋白上具有能够识别泛素和泛素链的 UIM 结构域, 该结构域与泛素的相互作用很可能参与了包涵体对蛋白酶体的募集作用. 这也在一定程度上解释了为什么经常在包涵体中检测到蛋白酶体组分.

另外, 细胞内存在大量的去泛素化酶, 可以识别泛素化的 PolyQ 蛋白并且介导底物蛋白的去泛素化反应^[40], 例如 USP14 可以促进野生型和突变的 Atx3 蛋白的稳定, USP26 和 USP7 都可以调节催化 AR 蛋白的去泛素化. 那么, 相关的去泛素化酶是否也会由于对 PolyQ 蛋白的泛素化识别而被募集到包涵体中去呢? 有研究发现, 在多种包涵体中都能够检测到 Atx3 蛋白^[40-41], 而 Atx3 既是一种去泛素化酶, 又含有 PolyQ 序列. 包涵体对 Atx3 的募集可能是由 PolyQ 序列所介导的共积聚效应. 但是, 作为一种去泛素化酶, Atx3 蛋白的 N 端催化结构域可以识别泛素化底物^[37], 而其 C 端含有串联的 UIM 结构域, 也可以识别结合泛素链^[42]. 因此, Atx3-泛素相互作用也可能参与包涵体对 Atx3 蛋白的募集作用. 最近也有研究表明, Htt 包涵体可以募集去泛素化酶 USP5 和泛素连接酶 NEDD4 等^[43].

但是, 由于该研究利用的是过表达外源蛋白质的方法进行分析, 所观察到的募集效果很可能是由于过表达所导致. 因此, PolyQ 包涵体对去泛素化酶的募集作用还需要更多的实验证据.

2.2 其他修饰所介导的募集作用

除了泛素化修饰以外, PolyQ 蛋白还可以发生其他的翻译后修饰, 例如类泛素 SUMO 修饰^[36, 44]以及乙酰化修饰^[45]等等. 与泛素化一样, PolyQ 蛋白也可能通过 SUMO 化修饰募集细胞内能够识别 SUMO 的蛋白质到包涵体中. 因此, 在 PolyQ 蛋白形成的包涵体中能够检测到 SUMO 化的蛋白质成分^[46]. 目前鉴定出能够特异性识别 SUMO 化修饰的序列包括一些蛋白质中的 SIM 模体、HERC2 蛋白的 ZZ 锌指结构域^[47]、以及二肽基肽酶 9 蛋白上的 SUMO1 特异结合序列^[48]. 我们推测, 含有 SIM 等结构域特征的 SUMO 结合蛋白可能会被募集到 PolyQ 包涵体中. 已有研究发现, PolyQ 延伸的 Atx1 和 Atx7 蛋白可以在细胞核内形成包涵体, 并与 PML 小体相关蛋白共定位^[49-50]. 我们知道, PML 小体是通过 SUMO 与 SIM 蛋白的相互作用而实现了 PML 小体对 SIM 蛋白的招募, 从而促进 PML 小体的形成^[51]. 那么, PolyQ 延伸的 Atx1 和 Atx7 等是否会通过 SUMO 化修饰促进包涵体对这些 PML 小体相关蛋白的募集, 从而使我们能够在包涵体中检测到这些蛋白质呢? 这些设想还需要进一步的实验验证.

同样地, 其他翻译后修饰 (如乙酰基团) 也可能作为 PolyQ 蛋白募集其他蛋白质的分子识别基础. 有研究发现, 在 PolyQ 蛋白的包涵体中可以检测到一些去乙酰化酶, 例如 HDAC3. HDAC3 可以与 Htt、Atx1、Atx3 以及 Atx3 等 PolyQ 蛋白相互作用, 并且被募集到 PolyQ 蛋白所形成的包涵体中^[52], 而 PolyQ 蛋白的积聚削弱了 HDAC3 的去乙酰化酶活性. 因此, PolyQ 蛋白在积聚过程中, 可能募集去乙酰化酶 HDAC3 到包涵体, 从而影响了细胞内乙酰化过程和功能.

3 RNA 介导的募集作用

有些蛋白质含有与 RNA 相互作用的结构域, 可以参与细胞内 RNA 相关的调控过程. 当这些蛋白质发生积聚时, 可以将与之相互结合的 RNA 募集到积聚物中. 我们实验室在对 ALS 致病蛋白 TDP-43 的研究过程中发现, TDP-43 的 C 端片段 TDP-35 能够发生积聚, 形成细胞质包涵体^[53]. 该

片段除了含有淀粉样积聚核心之外, 还含有 RRM 结构域, 能够与细胞内的 RNA 结合^[54]. 细胞质中的 TDP-35 包涵体能够将含 Poly(A) 序列 RNA (如 mRNA) 成分募集到包涵体中^[12]. 另外, 细胞内源的 TDP-43 也会由于含有 RRM 结构域并与 RNA 相互作用而被间接地募集到 TDP-35 所形成的包涵体中. 我们将这种通过与 RNA 相互作用介导的募集作用定义为 RNA 介导的募集^[22](图 2c).

而 RNA 介导的募集作用也可能是某些 PolyQ 疾病的致病分子机制. 引发 SCA2 以及 ALS 等神经退行性疾病的 Ataxin-2 (Atx2) 蛋白是 Lsm 蛋白家族中的一员, 在细胞内 RNA 加工以及代谢过程中具有重要的作用^[55]. Atx2 蛋白的 N 端 PolyQ 序列下游接续 Lsm 结构域以及 Lsm 相关结构域 (LSmAD), 该结构域进化上比较保守, 可以结合 RNA^[56]. Atx2 蛋白可以识别 mRNA 的 3'-UTR 区域中富含 AU 的序列, 并且促进底物 mRNA 的稳定性, 促进蛋白质的翻译合成^[57]. 而其 C 端的 PAM2 结构域能够和多聚腺苷酸结合蛋白 PABP1 相互作用, 参与 Poly(A)RNA 的加工调控过程. 我们推测, 与 TDP-35 一样, PolyQ 延伸的 Atx2 蛋白在积聚过程中可能将与之结合的 mRNA 募集到包涵体中, 从而使这些底物 mRNA 不能正常的表达. 通过 RNA 介导的相互作用, 突变的 Atx2 蛋白还可能将细胞内能够识别 RNA 的野生型的 Atx2 或其他 RNA 结合蛋白募集到包涵体中. 据文献报道, Atx2 可以和突变的 TDP-43 以及 FUS 共定位于包涵体中^[58-59], 并且这种联系是通过 RNA 介导的, 突变 RNA 结合位点则可以破坏这种共定位现象. 也就是说, 突变的 TDP-43 或 FUS 形成的包涵体可以对细胞内源的 Atx2 蛋白产生募集作用, 并且这种募集作用同样也是通过 RNA 介导的相互作用.

另一种 PolyQ 蛋白 Atx1, 也可以结合 RNA^[60]. Atx-1 与 RNA 的结合可能是通过其 C 端的 AXH 结构域. 因此, PolyQ 延伸的 Atx1 蛋白在积聚过程中也可能通过 RNA 介导的相互作用募集细胞内其他组分. 例如, 在 PolyQ 延伸的 Atx1 所形成的细胞核内包涵体中可以检测到 RNA 和 mRNA 输出因子 TAP/NXF1 蛋白^[61]. 这些 RNA 和 TAP/NXF1 蛋白很可能是通过 RNA 介导的相互作用而被积聚的 Atx1 蛋白募集到包涵体中. 需要注意的是, 野生型的 Atx1 蛋白在细胞核内也是以点状分布, 该结构的形成依赖于 RNA^[61], 与突变的 Atx1 在细胞内

形成的包涵体在形态和组成上具有一定的相似性。一般认为,正常的 Atx1 所形成的细胞核内点状结构是动态的,为正常功能的结构;而病理性包涵体是由 PolyQ 延伸蛋白质所形成的积聚或淀粉样沉淀,不具有功能活性的结构。

4 PolyQ 蛋白对分子伴侣的募集作用

当 PolyQ 蛋白发生错误折叠时,会被细胞内分子伴侣所识别,分子伴侣帮助其折叠成正确构象。但是, PolyQ 蛋白积聚并形成包涵体时,也有可能将这些分子伴侣蛋白“挟持”到包涵体中(图 2d)。因此,在 PolyQ 包涵体中常常可以检测到分子伴侣蛋白存在。已有研究报道了多种分子伴侣可以被募集到 PolyQ 包涵体中,如 HSP70、HSP40、HSC70 和 DnaJB1 等^[22]。分子伴侣蛋白倾向于识别暴露在外的疏水残基和带有正电荷的氨基酸残基,与客户蛋白(client)的结合并无明显的特异相互作用。因此,目前普遍认为分子伴侣通过结合错误折叠的 PolyQ 蛋白暴露在外的疏水残基而被募集到包涵体中。但是,最近有研究表明, HSC70 可以特异地识别 Htt 蛋白的 N 端 17 个氨基酸残基^[62]。我们实验室的研究发现,分子伴侣 HSP90 也可以与 Htt 蛋白的 N 端序列结合^[63]。因此我们推测, PolyQ 延伸的 Htt 蛋白是通过这种特异的相互作用募集 HSC70 和 HSP90 等分子伴侣的。

5 小 结

综上所述,我们认为在 PolyQ 疾病中, PolyQ 序列的异常延伸改变了蛋白质的溶解性质,增强了蛋白质的积聚特性,使得 PolyQ 蛋白发生积聚并在细胞内形成包涵体。在积聚过程中, PolyQ 蛋白可以通过特异的相互作用募集细胞内其他蛋白质或 RNA 到包涵体中。 PolyQ 蛋白所形成的包涵体可以募集功能各异的蛋白质或 RNA 成分,包括蛋白质降解系统中的组分如蛋白酶体和自噬相关蛋白、分子伴侣蛋白、转录因子以及许多 RNA 代谢调控蛋白等等^[22]。而在这些 PolyQ 疾病中都发现蛋白质降解功能受损,基因转录失调以及 RNA 代谢活动紊乱等病理特征^[64]。包涵体的形成和募集作用不仅使得 PolyQ 蛋白自身的可溶性成分减少,影响其正常功能,同时也会减少被募集的其他成分在细胞内的可溶性组分,损伤其生物功能,最终引起细胞毒性和神经退行性病变。例如, PolyQ 延伸的 Htt 和 Atx3 蛋白通过自身泛素化募集接头蛋白 hHR23B

和 UBQLN2,从而引起细胞质中可溶性 hHR23B 蛋白减少,破坏其底物蛋白 XPC 的稳定性^[35]。因此,我们认为, PolyQ 序列的异常延伸引起蛋白质积聚和包涵体形成,包涵体对细胞中正常蛋白质的募集作用是导致神经退行性疾病的病理原因^[22]。

致谢 本文受益于实验室人员蒋蕾蕾,博士后杨慧和研究生何文天、薛伟、洪钧烨的研究成果。

参 考 文 献

- [1] Budworth H, McMurray C T. A brief history of triplet repeat diseases. *Methods Mol Biol*, 2013, **1010**: 3–17
- [2] Adegbiyuro A, Sedighi F, Pilkington A W T, *et al.* Proteins containing expanded polyglutamine tracts and neurodegenerative disease. *Biochemistry*, 2017, **56**(9): 1199–1217
- [3] He X H, Lin F, Qin Z H. Current understanding on the pathogenesis of polyglutamine diseases. *Neurosci Bull*, 2010, **26**(3): 247–256
- [4] Takahashi T, Katada S, Onodera O. Polyglutamine diseases: where does toxicity come from? what is toxicity? where are we going?. *J Mol Cell Biol*, 2010, **2**(4): 180–191
- [5] Takahashi Y. Molecular pathogenesis of polyglutamine diseases. *Brain Nerve*, 2017, **69**(8): 901–912
- [6] Wakabayashi K, Tanji K, Odagiri S, *et al.* The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol*, 2013, **47**(2): 495–508
- [7] Neumann M, Sampathu D M, Kwong L K, *et al.* Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 2006, **314**(5796): 130–133
- [8] Arrasate M, Mitra S, Schweitzer E S, *et al.* Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, 2004, **431**(7010): 805–810
- [9] Schmidt T, Lindenberg K S, Krebs A, *et al.* Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions. *Ann Neurol*, 2002, **51**(3): 302–310
- [10] Choi Y J, Kim S I, Lee J W, *et al.* Suppression of aggregate formation of mutant huntingtin potentiates CREB-binding protein sequestration and apoptotic cell death. *Mol Cell Neurosci*, 2012, **49**(2): 127–137
- [11] Cooper-Knock J, Walsh M J, Higginbottom A, *et al.* Sequestration of multiple RNA recognition motif-containing proteins by C9orf72 repeat expansions. *Brain*, 2014, **137**(Pt 7): 2040–2051
- [12] Che M X, Jiang L L, Li H Y, *et al.* TDP-35 sequesters TDP-43 into cytoplasmic inclusions through binding with RNA. *FEBS Lett*, 2015, **589**(15): 1920–1928
- [13] Olzscha H, Schermann S M, Woerner A C, *et al.* Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions. *Cell*, 2011, **144**(1): 67–78
- [14] Cortes C J, La Spada A R. The many faces of autophagy dysfunction in Huntington's disease: from mechanism to therapy.

- Drug Discov Today, 2014, **19**(7): 963–971
- [15] Yang H, Li J J, Liu S, *et al.* Aggregation of polyglutamine-expanded ataxin-3 sequesters its specific interacting partners into inclusions: implication in a loss-of-function pathology. *Sci Rep*, 2014, **4**: 6410
- [16] Yang H, Liu S, He W T, *et al.* Aggregation of polyglutamine-expanded Ataxin 7 protein specifically sequesters ubiquitin-specific protease 22 and deteriorates its deubiquitinating function in the Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase (SAGA) complex. *J Biol Chem*, 2015, **290**(36): 21996–22004
- [17] Huang C C, Faber P W, Persichetti F, *et al.* Amyloid formation by mutant huntingtin: threshold, progressivity and recruitment of normal polyglutamine proteins. *Somat Cell Mol Genet*, 1998, **24**(4): 217–233
- [18] Chai Y, Shao J, Miller V M, *et al.* Live-cell imaging reveals divergent intracellular dynamics of polyglutamine disease proteins and supports a sequestration model of pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(14): 9310–9315
- [19] Mccampbell A, Taylor J P, Taye A A, *et al.* CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Human Molecular Genetics*, 2000, **9**(14): 2197–2202
- [20] Zhao X, Park Y N, Todor H, *et al.* Sequestration of Sup35 by aggregates of huntingtin fragments causes toxicity of [PSI⁺] yeast. *J Biol Chem*, 2012, **287**(28): 23346–23355
- [21] Kayatekin C, Matlack K E, Hesse W R, *et al.* Prion-like proteins sequester and suppress the toxicity of huntingtin exon 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(33): 12085–12090
- [22] Yang H, Hu H Y. Sequestration of cellular interacting partners by protein aggregates: implication in a loss-of-function pathology. *FEBS J*, 2016, **283**(20): 3705–3717
- [23] Gao Y G, Yang H, Zhao J, *et al.* Autoinhibitory structure of the WW domain of HYPB/SETD2 regulates its interaction with the proline-rich region of huntingtin. *Structure*, 2014, **22**(3): 378–386
- [24] Jiang Y J, Che M X, Yuan J Q, *et al.* Interaction with polyglutamine-expanded huntingtin alters cellular distribution and RNA processing of huntingtin yeast two-hybrid protein A (HYPA). *J Biol Chem*, 2011, **286**(28): 25236–25245
- [25] Jiang Y J, Zhou C J, Zhou Z R, *et al.* Structural basis for recognition of the third SH3 domain of full-length R85 (R85FL)/ponsin by ataxin-7. *FEBS Lett*, 2013, **587**(18): 2905–2911
- [26] Boeddrich A, Gaumer S, Haacke A, *et al.* An arginine/lysine-rich motif is crucial for VCP/p97-mediated modulation of ataxin-3 fibrillogenesis. *EMBO J*, 2006, **25**(7): 1547–1558
- [27] Chang Y G, Song A X, Gao Y G, *et al.* Solution structure of the ubiquitin-associated domain of human BMSC-UbP and its complex with ubiquitin. *Protein Sci*, 2006, **15**(6): 1248–1259
- [28] Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsichler A, *et al.* p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol*, 2002, **160**(1): 255–263
- [29] Zeng L, Wang B, Merillat S A, *et al.* Differential recruitment of UBQLN2 to nuclear inclusions in the polyglutamine diseases HD and SCA3. *Neurobiol Dis*, 2015, **82**: 281–288
- [30] Chai Y, Koppenhafer S L, Shoesmith S J, *et al.* Evidence for proteasome involvement in polyglutamine disease: localization to nuclear inclusions in SCA3/MJD and suppression of polyglutamine aggregation *in vitro*. *Human Molecular Genetics*, 1999, **8**(4): 673–682
- [31] Nath S R, Lieberman A P. The ubiquitination, disaggregation and proteasomal degradation machineries in polyglutamine disease. *Front Mol Neurosci*, 2017, **10**: 78
- [32] Rusmini P, Crippa V, Cristofani R, *et al.* The role of the protein quality control system in SBMA. *J Mol Neurosci*, 2016, **58**(3): 348–364
- [33] Xu Z, Yang L, Xu S, *et al.* The receptor proteins: pivotal roles in selective autophagy. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2015, **47**(8): 571–580
- [34] Rogov V, Dotsch V, Johansen T, *et al.* Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell*, 2014, **53**(2): 167–178
- [35] Yang H, Yue H W, He W T, *et al.* PolyQ-expanded huntingtin and ataxin-3 sequester ubiquitin adaptors hHR23B and UBQLN2 into aggregates *via* conjugated ubiquitin. *Faseb J*, 2018, **32**(6): 2923–2933
- [36] Steffan J S, Agrawal N, Pallos J, *et al.* SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science*, 2004, **304**(5667): 100–104
- [37] Blount J R, Tsou W L, Ristic G, *et al.* Ubiquitin-binding site 2 of ataxin-3 prevents its proteasomal degradation by interacting with Rad23. *Nat Commun*, 2014, **5**: 4638
- [38] Schwab C, Yu S, McGeer E G, *et al.* Optineurin in Huntington's disease intranuclear inclusions. *Neurosci Lett*, 2012, **506**(1): 149–154
- [39] Martinez-Vicente M, Tallozy Z, Wong E, *et al.* Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci*, 2010, **13**(5): 567–576
- [40] Uchihara T, Fujigasaki H, Koyano S, *et al.* Non-expanded polyglutamine proteins in intranuclear inclusions of hereditary ataxias—triple-labeling immunofluorescence study. *Acta Neuropathol*, 2001, **102**(2): 149–152
- [41] Wang H, Ying Z, Wang G. Ataxin-3 regulates aggresome formation of copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) by editing K63-linked polyubiquitin chains. *J Biol Chem*, 2012, **287**(34): 28576–28585
- [42] Song A X, Zhou C J, Peng Y, *et al.* Structural transformation of the tandem ubiquitin-interacting motifs in ataxin-3 and their cooperative interactions with ubiquitin chains. *Plos One*, 2010, **5**(10): e13202
- [43] Juenemann K, Jansen A H P, Van Riel L, *et al.* Dynamic recruitment of ubiquitin to mutant huntingtin inclusion bodies. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 1405
- [44] Zhou Y F, Liao S S, Luo Y Y, *et al.* SUMO-1 modification on K166 of polyQ-expanded ataxin-3 strengthens its stability and increases its cytotoxicity. *Plos One*, 2013, **8**(1): e54214
- [45] Chaibva M, Jawahery S, Pilkington A W T, *et al.* Acetylation within the first 17 residues of huntingtin exon 1 alters aggregation

- and lipid binding. *Biophys J*, 2016, **111**(2): 349–362
- [46] Terashima T, Kawai H, Fujitani M, *et al.* SUMO-1 co-localized with mutant atrophin-1 with expanded polyglutamines accelerates intranuclear aggregation and cell death. *Neuroreport*, 2002, **13**(17): 2359–2364
- [47] Danielsen J R, Povlsen L K, Villumsen B H, *et al.* DNA damage-inducible SUMOylation of HERC2 promotes RNF8 binding via a novel SUMO-binding Zinc finger. *J Cell Biol*, 2012, **197**(2): 179–187
- [48] Pilla E, Moller U, Sauer G, *et al.* A novel SUMO1-specific interacting motif in dipeptidyl peptidase 9 (DPP9) that is important for enzymatic regulation. *J Biol Chem*, 2012, **287** (53): 44320–44329
- [49] Janer A, Werner A, Takahashi-Fujigasaki J, *et al.* SUMOylation attenuates the aggregation propensity and cellular toxicity of the polyglutamine expanded ataxin-7. *Human Molecular Genetics*, 2010, **19**(1): 181–195
- [50] Dovey C L, Varadaraj A, Wyllie A H, *et al.* Stress responses of PML nuclear domains are ablated by ataxin-1 and other nucleoprotein inclusions. *J Pathol*, 2004, **203**(4): 877–883
- [51] Sahin U, De The H, Lallemand-Breitenbach V. PML nuclear bodies: assembly and oxidative stress-sensitive sumoylation. *Nucleus*, 2014, **5**(6): 499–507
- [52] Thomas E A. Involvement of HDAC1 and HDAC3 in the pathology of polyglutamine disorders: therapeutic implications for selective HDAC1/HDAC3 inhibitors. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2014, **7** (6): 634–661
- [53] Che M X, Jiang Y J, Xie Y Y, *et al.* Aggregation of the 35-kDa fragment of TDP-43 causes formation of cytoplasmic inclusions and alteration of RNA processing. *FASEB J*, 2011, **25** (7): 2344–2353
- [54] Jiang L L, Che M X, Zhao J, *et al.* Structural transformation of the amyloidogenic core region of TDP-43 protein initiates its aggregation and cytoplasmic inclusion. *J Biol Chem*, 2013, **288**(27): 19614–19624
- [55] Ostrowski L A, Hall A C, Mekhail K. Ataxin-2: from RNA control to human health and disease. *Genes (Basel)*, 2017, **8**(6). pii: E157. doi: 10.3390/genes8060157
- [56] Wilusz C J, Wilusz J. Eukaryotic Lsm proteins: lessons from bacteria. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, **12**(12): 1031–1036
- [57] Yokoshi M, Li Q, Yamamoto M, *et al.* Direct binding of Ataxin-2 to distinct elements in 3' UTRs promotes mRNA stability and protein expression. *Mol Cell*, 2014, **55**(2): 186–198
- [58] Elden A C, Kim H J, Hart M P, *et al.* Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature*, 2010, **466**(7310): 1069–1075
- [59] Nihei Y, Ito D, Suzuki N. Roles of ataxin-2 in pathological cascades mediated by TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) and Fused in Sarcoma (FUS). *J Biol Chem*, 2012, **287**(49): 41310–41323
- [60] Yue S, Serra H G, Zoghbi H Y, *et al.* The spinocerebellar ataxia type 1 protein, ataxin-1, has RNA-binding activity that is inversely affected by the length of its polyglutamine tract. *Human Molecular Genetics*, 2001, **10**(1): 25–30
- [61] Irwin S, Vandelft M, Pinchev D, *et al.* RNA association and nucleocytoplasmic shuttling by ataxin-1. *J Cell Sci*, 2005, **118**(Pt 1): 233–242
- [62] Monsellier E, Redeker V, Ruiz-Arlandis G, *et al.* Molecular interaction between the chaperone Hsc70 and the N-terminal flank of huntingtin exon 1 modulates aggregation. *J Biol Chem*, 2015, **290**(5): 2560–2576
- [63] He W T, Xue W, Gao Y G, *et al.* HSP90 recognizes the N-terminus of huntingtin involved in regulation of huntingtin aggregation by USP19. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 14797
- [64] Labbadia J, Morimoto R I. Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends Biochem Sci*, 2013, **38**(8): 378–385

Sequestration of Cellular Essential Proteins or RNA by Polyglutamine-Expanded Protein Aggregates*

YUE Hong-Wei, HU Hong-Yu**

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

Abstract Polyglutamine (polyQ) diseases are a group of neurodegenerative disorders caused by aberrant expansion of CAG trinucleotide in the coding sequence of different disease proteins. This CAG trinucleotide repeats lead to the abnormal polyQ expansion in the translated proteins, which may cause protein misfolding and aggregation. Protein aggregation or inclusion formation is a common feature shared by diverse neurodegenerative diseases. Aggregation of polyQ-expanded proteins can sequester other interacting proteins or RNA into the insoluble aggregates or inclusions, which may result in decrease in the soluble pools of both polyQ proteins and other sequestered proteins or RNA, leading to the loss of biological function. According to the interaction modes, we classified the sequestration effects of protein aggregates into four distinct types: protein (including polyQ protein) co-aggregation; specific domain/motif-mediated sequestration (including modified ubiquitin and others); RNA-mediated sequestration; and sequestration of molecular chaperones. Thus, aggregation of the polyQ-expanded proteins and sequestration of cellular essential proteins may be the major causes for cytotoxicity and neurodegeneration.

Key words PolyQ diseases, aggregation, sequestration, inclusion body, loss of function, cytotoxicity, neurodegeneration

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0141

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (31470758).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-54921121, E-mail: hyhu@sibcb.ac.cn

Received: May 7, 2018 Accepted: August 15, 2018