

泛素 C 末端水解酶 L1 对神经元的保护作用 *

谢 敏 陈其才 廖晓梅 **

(华中师范大学生命科学学院, 遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室, 武汉 430079)

摘要 泛素 C 末端水解酶 L1(UCH-L1)是一种在脑内高度表达, 具有泛素水解酶、泛素连接酶和稳定泛素单体功能的去泛素化酶. UCH-L1 参与维持神经元突触的正常形态及功能, 并能够缓解 β -淀粉样蛋白诱导的长时程增强(LTP)缺失及记忆障碍; 此外, UCH-L1 的突变体 I93M 与家族性帕金森氏病相关, 而 UCH-L1 的 S18Y 多态性则对神经元具有保护作用. 通过研究 UCH-L1 的结构、功能及其在神经系统的作用机制, 可以为阿尔茨海默病、帕金森氏病等神经退行性疾病的治疗提供相关思路和借鉴.

关键词 泛素 C 末端水解酶 L1, 阿尔茨海默病, 帕金森氏病
学科分类号 Q42, Q51

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00253

泛素-蛋白酶体途径可调节细胞内正常蛋白的代谢并降解和循环利用错误折叠的蛋白质, 此途径由泛素化靶蛋白的酶(泛素激活酶 E1、泛素载体蛋白 E2 和泛素-蛋白连接酶 E3)以及降解靶蛋白所必需的蛋白酶体所组成. 泛素化是选择性地降解蛋白质的关键性步骤, 而泛素则是泛素-蛋白酶体系统识别靶蛋白的标志^[1]. 在泛素-蛋白酶体系统中, 能够逆转泛素化过程, 水解泛素 C 末端甘氨酸 76 (Gly76)和底物之间的异肽键的酶被称为去泛素化酶. 泛素 C 末端水解酶(ubiquitin C-terminal hydrolase, UCHs)是去泛素化酶中的一类, 其中一个重要成员是泛素 C 末端水解酶 L1(ubiquitin C-terminal hydrolase L1, UCH-L1), 它具有泛素水解酶、泛素连接酶活性以及不依赖于其自身酶活性的稳定泛素单体的功能^[1-3]. 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)患者的大脑中聚集有大量被氧化的蛋白质, 这种过氧化修饰可抑制蛋白酶体的活性, 对早期 AD 患者的研究也发现, UCH-L1 在病变脑区表达下调且被过氧化修饰^[4]. 此外, UCH-L1 的突变型 I93M 与家族性帕金森氏病(Parkinson's disease, PD)的发病相关, 而 UCH-L1 的多态性 S18Y 具有抗氧化作用^[5], 这说明 UCH-L1 在 AD、PD 等神经退行性疾病的发病中起重要作用. 本文主要介绍 UCH-L1 的结构、功能以及

UCH-L1 在 AD、PD 发病中的作用, 以期为进一步认识和研究 UCH-L1 与神经系统退行性病变的关系提供某些参考和借鉴.

1 去泛素化酶

哺乳动物基因组编码超过 90 种去泛素化酶, 这些蛋白酶通过控制泛素链的长度、加工处理泛素融合蛋白以及从蛋白酶体的靶蛋白中回收再利用泛素等方式来调节泛素信号途径^[6]. 去泛素化酶参与了细胞生长和肿瘤的生成、分化和发育, 以及记忆和神经退行性疾病的发生等许多重要的生物学过程^[7]. 根据去泛素化酶催化结构域的结构可以将其分为 5 类: UCHs 家族、特异性加工泛素的蛋白酶家族(ubiquitin-specific processing enzymes, UBPs or ubiquitin-specific proteases, USPs)、MJD 家族(Machado-Joseph disease protein domain proteases, MJDs)、卵巢肿瘤相关蛋白酶家族(ovarian tumor proteases, OTUs)以及 JAMM 家族(JAMM Motif Proteases)^[8].

* 国家自然科学基金(30700208, 30970972)和武汉市青年科技晨光计划(200850731362)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 027-67867229, E-mail: liaodebox2003@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-05-11, 接受日期: 2010-07-30

2 泛素 C 末端水解酶 L1 的结构及功能

泛素 C 末端水解酶是一组巯基蛋白酶, 属于低分子质量的去泛素化酶(20~30 ku), 它通过将一些小的肽段从多聚泛素化复合物上移除从而使得泛素得以再利用, 并在泛素基因产物的翻译过程中发挥关键作用. UCH-L1 又称蛋白基因产物 9.5 (protein gene product, PGP9.5), 是一种分子质量为 27 ku 的蛋白质, PGP9.5 在大脑中的表达浓度要远高于其他组织, 其含量占脑部可溶性蛋白总量的 1%~5%^[9-10].

2.1 UCH-L1 的结构

UCH-L1 单体由左、右两叶构成, 右叶是由 5 个 α 螺旋($\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 以及 $\alpha 6$) 所组成, 而左叶则由 2 个 α 螺旋($\alpha 2$ 和 $\alpha 7$) 和 6 个 β 折叠($\beta 1 \sim \beta 6$) 所组成, 这些二级结构一同参与构成了螺旋- β -螺旋的三明治式的折叠结构. 左、右两叶中间有一个裂缝, 催化的半胱氨酸 C90 位点就位于其中. 活性位点由 3 个二级结构元件组成, 即 $\alpha 3$ 螺旋、 $\beta 3$ 折叠和 L9 环, 而催化三联体的 C90、H161 和 D176 成分分别位于这 3 个二级结构元件上. 这 3 个二级结构元件呈三角形排列, 并在各自所在的叶形成广泛的疏水连接. 在这个三角的中间是 4 个紧密相连的水分子(W1~4), 它们分别在 $\alpha 3$ 和 L9, $\alpha 3$ 和 $\beta 3$, $\beta 3$ 和 L9 以及在 3 个结构之间形成氢键桥. UCH-L1 的活化是靠其配基的构象改变来完成的. 当其配基处于自由状态时, UCH-L1 处于非活化状态, 此时 UCH-L1 的活性位点被 L8 环所掩盖, 此环贯穿活性位点裂缝并位于 C90 的上方; 当 UCH-L1 位于活性位点的二级结构 $\alpha 6$ 螺旋解开时, 可导致 L8 环从活性位点移开, 暴露活性位点, 底物蛋白与 UCH-L1 结合, 从而形成活性酶-底物复合物, UCH-L1 被激活; 当水解作用完成和产物释放后, L8 环重回活性位点之上, 掩蔽活性位点, 对 UCH-L1 功能调节起着一种开关作用^[11].

2.2 UCH-L1 的功能

UCH-L1 具有多种功能, 在神经元中 UCH-L1 能够结合和稳定泛素单体, 此外 UCH-L1 还参与了多聚泛素的加工处理过程和泛素-肽结合物的水解作用. 当 UCH-L1 形成二聚体时, 就具有泛素连接酶的活性. UCH-L1 的这些作用对神经细胞行使正常功能或出现功能障碍时均有着重要影响^[12].

2.2.1 UCH-L1 的泛素水解酶活性和泛素连接酶活性. 体外研究分析表明, UCH-L1 能够催化泛素 C

末端的酯基及氨基的水解, 还能够分解泛素基因产物, 不论是相互衔接的泛素单体或是泛素与小的核糖体蛋白的复合体, 都可经过该酶的水解而产生泛素单体, 因此, 胞内蛋白经泛素-蛋白酶体途径的降解和泛素单体的循环利用, 都广泛地依赖于 UCH-L1 水解酶的活性^[13]. 此外, UCH-L1 还具有泛素连接酶的活性^[1], 这种活性表现出二聚体依赖性, 即当 2 个 UCH-L1 单体结合在一起形成二聚体形式时才具有泛素连接酶的活性, UCH-L1 二聚体通过泛素化赖氨酸 63, 以此为连接点形成多聚泛素链^[1](图 1).

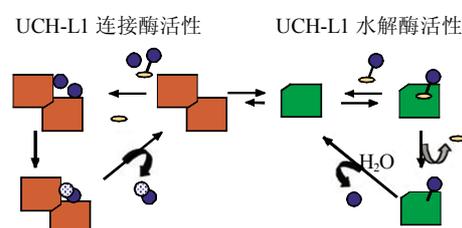


Fig.1 A model for the hydrolase and ligase activities of UCH-L1^[1]

图 1 UCH-L1 水解酶活性和连接酶活性的模式图^[1]

2.2.2 UCH-L1 稳定泛素单体的功能. UCH-L1 除了具备泛素水解酶和泛素连接酶的活性之外, 还具有不依赖于酶活性的稳定泛素单体的功能^[1]. 小鼠脑内泛素单体水平与 UCH-L1 的表达水平密切相关, UCH-L1 的缺失导致了神经元中泛素单体水平的下降, 从而降低了神经系统中总的泛素单体水平. 另外, 不论是在细胞水平还是整体水平, 神经系统中 UCH-L1 的过度表达都会增加泛素单体的水平, UCH-L1 可通过影响泛素代谢和抑制泛素的降解来延长泛素的半衰期^[2]. 通过对野生型小鼠与 *gad*(gracile axonal dystrophy)小鼠大脑溶胞产物的分析, 发现 UCH-L1 与泛素单体相连. *gad* 小鼠是第 5 号染色体上编码 *Uchl1* 基因的外显子 7 和 8 缺失而产生的一种常染色体隐性突变小鼠系, *gad* 小鼠等位基因编码的 UCH-L1 缺少包含有 42 个氨基酸的催化亚基^[2], 从而导致 UCH-L1 表达缺失. 这些结果表明, UCH-L1 具有稳定泛素单体的功能, 并且该功能主要是依赖于 UCH-L1 与泛素的结合来完成的^[12].

3 UCH-L1 与阿尔茨海默病

阿尔茨海默病是一种中枢神经系统的退行性疾

病, 患者的主要临床症状表现为进行性认知功能的减退. 该病的主要神经病理学特征表现为, 一是病变脑区神经元外由 β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein, $A\beta$)聚集形成的老年斑(senile plaques, SP), 二是病变脑区神经元内由过度磷酸化修饰的微管相关蛋白 tau 为主要构成成分的神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)^[14].

阿尔茨海默病的发病机制与神经元内的泛素蛋白酶系统功能异常有关. 有报道指出, 在 AD 病人的脑中溶解性 UCH-L1 的水平下降, 且 UCH-L1 蛋白的含量与 AD 患者脑中的神经原纤维缠结数目成负相关^[15]. 另外, gad 小鼠表现出淀粉样蛋白前体(amyloid β -protein precursor, APP)和 $A\beta$ 的聚集, 而在 AD 病人脑中 APP 和 $A\beta$ 也会出现异常聚集. 因此, 研究认为功能性 UCH-L1 水平的降低或缺失有可能参与到了 AD 的发病过程之中^[12]. $A\beta$ 和异常聚集的 tau 蛋白都会抑制蛋白酶体的活性, 从而导致 $A\beta$ 和过度磷酸化的 tau 不能被蛋白酶体降解而进一步聚集^[16-17]; 而 UCH-L1 能够增加蛋白酶体的功能^[18], 就可能使异常聚集的 $A\beta$ 和过度磷酸化的 tau 得以降解, 以缓解 $A\beta$ 对神经细胞产生的毒性作用, 使神经元的正常功能得以恢复.

UCH-L1 对神经元突触的形成和认知功能的维持是必需的. 转染外源性 UCH-L1 蛋白能使经 $A\beta$ 处理的海马脑片以及 AD 模型小鼠(转 APP/PS1 小鼠)的 UCH-L1 水解酶活性和神经细胞的突触功能得到恢复; 腹腔注射 UCH-L1 能够改善 APP/PS1 转基因小鼠的情景学习与记忆的能力^[19]. $A\beta$ 对记忆的影响是通过抑制环腺苷酸反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)的磷酸化而产生的. $A\beta$ 与可能的膜受体结合后能抑制腺苷酸环化酶的活性以及蛋白酶体对蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)调节亚基 R II α 的降解, 导致 R II α 的聚集与 PKA 的调节亚基和催化亚基形成非活性的四聚体. 转录因子 CREB 是由 PKA 激活的, PKA 的活性受到抑制导致 CREB 不能被磷酸化, 从而抑制记忆相关蛋白的转录, 导致记忆障碍. 而外源性的 UCH-L1 能重建正常的蛋白酶体活性, 恢复 R II α 的正常水平, 使得 PKA 的催化亚基被激活, 从而催化 CREB 在 Ser133 位点的磷酸化, 与学习和记忆相关的蛋白质得以进行转录和翻译, 使受损的记忆功能得到恢复^[19].

UCH-L1 可在神经元内广泛表达, 已观察到在海马神经元胞体和树突中均有分布, 以维持海马神

经元的正常突触结构和功能^[20]. 通过检测死后 AD 病人的大脑, 发现有树突棘缺失的现象, 而这种现象同样发生在 APP/PS1 转基因小鼠的脑部以及用 $A\beta$ 处理的海马脑片中, APP/PS1 双转基因小鼠的早期亦表现出树突结构异常, 随后其树突棘的密度下降^[18]. 当用外源性的 UCH-L1 处理 APP/PS1 转基因小鼠和用 $A\beta$ 处理海马脑片后, 发现被降低的树突棘密度出现明显增加^[18], 说明不论是体外还是在整体水平, UCH-L1 对维持树突的正常结构和神经元之间突触联系的建立均具有重要作用. Cartier 等^[20]研究发现, UCH-L1 的活性上调会增加泛素单体水平, 相反, UCH-L1 的下调会显著降低泛素单体水平, 并导致突触蛋白的分布和树突棘的形态发生改变, 以及降低树突棘的密度. 在 UCH-L1 活性被抑制的神经元中, 突触结构的改变可能参与了长时程增强(long-term potentiation, LTP)的缺失; 另外, 异位表达的泛素可以使由 UCH-L1 抑制导致的神经元突触结构异常得到修复^[20].

4 UCH-L1 与帕金森氏病

帕金森氏病是以多巴胺能神经元的缺失为主要病理特征的神经退行性疾病, UCH-L1 中的 I93M 突变与家族性的帕金森氏病相关, UCH-L1^{I93M} 因构象的改变而表现出不溶性增加. UCH-L1 的羧基受到氧化损伤时, 羧基过氧化修饰的(carbonyl-modified)UCH-L1 对神经元具有毒性作用, 这也是导致弥散性 PD 的原因之一^[5]. UCH-L1 的 mRNA 和蛋白质均可在多巴胺能神经元中广泛表达, 所以 UCH-L1^{I93M} 或羧基修饰的 UCH-L1 完全有可能在多巴胺能神经元中出现过量表达, 导致多巴胺能神经元的功能障碍和数目减少^[5]. 此外, 通过研究神经元中 UCH-L1 及其突变体(包括 S18Y)的过表达效应, 发现 S18Y 而不是野生型 UCH-L1, 在人的成神经细胞瘤和初级皮层神经元中生理水平表达时, 具有特异性的抗氧化保护功能^[21].

5 小 结

UCH-L1 具有泛素水解酶、泛素连接酶的活性和维持泛素单体的功能, 这些功能是蛋白酶体系统清除错误折叠的蛋白、维持神经元正常功能的重要保障. 通过对 AD 动物模型、脑片以及细胞水平的研究发现, UCH-L1 能使神经元受损的突触得以恢复, 且还可以缓解 $A\beta$ 对神经细胞的毒性作用, 促进与学习和记忆相关的蛋白表达, 而在帕金森氏病

中, UCH-L1 的 S18Y 多态性对神经元具有抗氧化保护功能. 这些研究表明, 通过探讨 UCH-L1 表达和活性调控机制, 有望寻找到缓解或治疗阿尔茨海默病和帕金森氏病等神经退行性疾病的有效策略.

参 考 文 献

- [1] Amerik A Y, Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1695**(1-3): 189-207
- [2] Osaka H, Wang Y L, Takada K, *et al.* Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum Mol Genet*, 2003, **12**(16): 1945-1958
- [3] Liu Y, Fallon L, Lashuel H A, *et al.* The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell*, 2002, **111**(2): 209-218
- [4] Oddo S. The ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*, 2008, **12**(2): 363-373
- [5] Kabuta T, Setsuie R, Mitsui T, *et al.* Aberrant molecular properties shared by familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and carbonyl-modified UCH-L1. *Hum Mol Genet*, 2008, **17**(10): 1482-1496
- [6] Walters B J, Campbell S L, Chen P C, *et al.* Differential effects of Usp14 and Uch-L1 on the ubiquitin proteasome system and synaptic activity. *Mol Cell Neurosci*, 2008, **39**(4): 539-548
- [7] Chung C H, Baek S H. Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **266**(3): 633-640
- [8] Nijman S M, Luna-Vargas M P, Velds A, *et al.* A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*, 2005, **123**(5): 773-786
- [9] Wilkinson K D, Lee K, Deshpande S, *et al.* The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science*, 1989, **246**(4930): 670-673
- [10] Campbell L K, Thomas J R, Lamps L W, *et al.* Protein gene product 9.5 (PGP 9.5) is not a specific marker of neural and nerve sheath tumors: an immunohistochemical study of 95 mesenchymal neoplasms. *Mod Pathol*, 2003, **16**(10): 963-969
- [11] Das C, Hoang Q Q, Kreinbring C A, *et al.* Structural basis for conformational plasticity of the Parkinson's disease-associated ubiquitin hydrolase UCH-L1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(12): 4675-4680
- [12] Setsuie R, Wada K. The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases. *Neurochem Int*, 2007, **51**(2-4): 105-111
- [13] Larsen C N, Krantz B A, Wilkinson K D. Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochemistry*, 1998, **37**(10): 3358-3368
- [14] Upadhyaya S C, Hegde A N. Role of the ubiquitin proteasome system in Alzheimer's disease. *BMC Biochem*, 2007, **8**(Suppl 1): S12: 1-8
- [15] Choi J, Levey A I, Weintraub S T, *et al.* Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Biol Chem*, 2004, **279**(13): 13256-13264
- [16] Tseng B P, Green K N, Chan J L, *et al.* A β inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. *Neurobiol Aging*, 2008, **29**(11): 1607-1618
- [17] Ren Q G, Liao X M, Chen X Q, *et al.* Effects of tau phosphorylation on proteasome activity. *FEBS Lett*, 2007, **581**(7): 1521-1528
- [18] Smith D L, Pozueta J, Gong B, *et al.* Reversal of long-term dendritic spine alterations in Alzheimer disease models. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(39): 16877-16882
- [19] Gong B, Cao Z, Zheng P, *et al.* Ubiquitin hydrolase Uch-L1 rescues β -amyloid-induced decreases in synaptic function and contextual memory. *Cell*, 2006, **126**(4): 775-788
- [20] Cartier A E, Djakovic S N, Salehi A, *et al.* Regulation of synaptic structure by ubiquitin C-terminal hydrolase L1. *J Neurosci*, 2009, **29**(24): 7857-7868
- [21] Kyratzi E, Pavlaki M, Stefanis L. The S18Y polymorphic variant of UCH-L1 confers an antioxidant function to neuronal cells. *Hum Mol Genet*, 2008, **17**(14): 2160-2171

The Protective Effects of Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 on Neurons*

XIE Min, CHEN Qi-Cai, LIAO Xiao-Mei**

(College of Life Science and Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation of Integrative Biology,
Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract UCH-L1 is abundantly expressed in brain which possesses ubiquitin hydrolase activity, ubiquitin ligase activity and the effect of monomeric ubiquitin stabilizing. UCH-L1 is critical for the normal morphology and function of the synapses, which can rescue the LTP deficit and impaired memory induced by β -amyloid protein (A β). In addition, the I93M mutation in UCH-L1 is associated with familial Parkinson's disease (PD) while the S18Y polymorphic variant of UCH-L1 is associated with a specific antioxidant protective function in neurons. By researching the structure, function and the mechanism in the nervous system of UCH-L1, hopes to provide a concept or a method to treat neurodegenerative diseases such as AD and PD.

Key words ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1), Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD)

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00253

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30700208, 30970972) and Wuhan Chenguang Project For Youth Scholar (200850731362).

**Corresponding author.

Tel: 86-27-67867229, E-mail: liaodebox2003@yahoo.com.cn

Received: May 11, 2010 Accepted: July 30, 2010