

自噬系统和蛋白酶体系统之间的相互联系*

陈季武** 王帮正 高秀霞 张园园

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要 在真核细胞中已发现两条主要降解途径, 即自噬系统和蛋白酶体系统。长期以来, 这两条降解途径一直被认作是完全独立的路径, 然而最近的证据强烈提示, 这两条主要降解途径之间相互联系。其中, 发现干扰这两条途径的任一条可影响另一条途径的活性, 抑制蛋白酶体可刺激自噬活性。同时发现泛素的作用比先前想象更广泛, 不仅具有标记蛋白酶体降解蛋白质这一“经典作用”, 还涉及自噬-溶酶体途径降解底物泛素化, 是这些主要降解途径的共同标签。这些降解系统分享某些底物和调节分子, 显示协同作用, 在某些背景下, 显示补偿功能。降解系统之间的协同和补偿作用在许多细胞过程中显得至关重要。因此这些降解系统异常或联系失常不仅导致细胞功能的异常, 而且也与多种重要疾病的发生和发展密切相关。对这些降解途径功能及其联系的深入了解可拓展人们对这些降解途径的认识, 有助于对多种细胞分解代谢过程的深入理解, 也有助于相关新药的研发。

关键词 自噬-溶酶体系统, 泛素-蛋白酶体系统, 泛素, 降解, 相互联系

学科分类号 Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00289

自噬系统和蛋白酶体系统是细胞内蛋白质降解的两种最主要系统。但在几十年前, 蛋白质编码和翻译一直是研究焦点, 其如何被降解却是被忽视的领域。1955年, 比利时科学家德·迪夫等在鼠肝细胞中发现了溶酶体, 揭开了蛋白质和细胞器降解研究的序幕, 并因此于1974年获得诺贝尔生理学或医学奖。1962年, Ashford 和 Porter 发现细胞内有“自食”现象后提出自噬(autophagy)概念, 以后科学家又发现各种自噬通路交汇于溶酶体, 构成自噬-溶酶体途径。1980年前后, 科学家 Ciechanover, Hershko 和 Rose 发现了泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS), 因此于2004年获得诺贝尔化学奖。这些重大发现使细胞内的降解系统研究成为长期热点, 并发现这些降解系统的功能远非限于降解蛋白质, 还有其他许多重要功能, 因此广受关注, 其中自噬的研究在近几年尤其受重视。长期以来自噬-溶酶体系统和 UPS 一直被认作是完全独立的系统。然而这一观点近年来受到有力挑战, 越来越多的证据显示 UPS 和自噬-溶酶体途径是功能相关的分解代谢过程, 相互之间活跃地联系。例如, 这些降解系统分享某些底物和

调节分子, 显示协同作用, 在某些背景下, 显示补偿功能^[1-8]。本文对这一研究领域的进展作了较系统的综述, 突显了自噬-溶酶体系统和 UPS 之间相互联系的重要发现。

1 同样的泛素, 不同的途径: 泛素可作为各种降解途径降解底物的普遍标签

先前认为, 自噬-溶酶体系统和 UPS 因各自机理、机器、降解底物、亚细胞定位不同, 没有相关性。这种观点受到了单泛素化可作为胞吞关键信号发现的初步挑战, 随后一系列证据显示泛素可作为选择性自噬的特异信号, 表明泛素可作为细胞内这些降解途径的普遍标签^[1, 7](图1), 有力地撼动了自噬-溶酶体系统和 UPS 各自完全独立行使功能的传统观念。

* 国家自然科学基金资助项目(31071875)。

** 通讯联系人。

Tel: 021-24206741, E-mail: jwchen@bio.ecnu.edu.cn

收稿日期: 2012-06-12, 接受日期: 2012-12-21

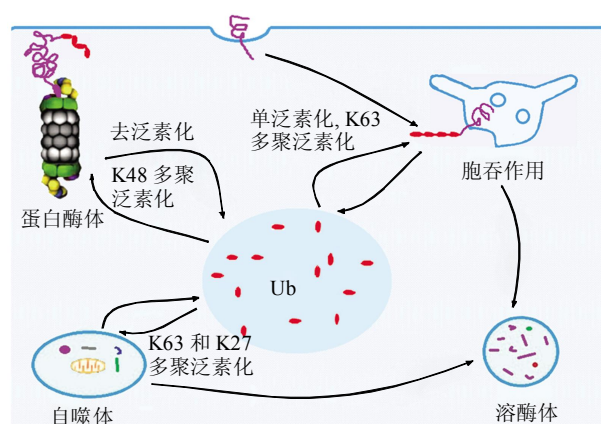


Fig. 1 Ubiquitin is a common tag for the degradation substrates of autophagy- lysosome systems and UPS

图 1 泛素可作为靶标自噬-溶酶体系统和 UPS 降解底物的普遍标签

1.1 UPS 与泛素化

有酶促活性的蛋白酶体是由圆柱形的 20 S 核心颗粒和蛋白酶体激活因子 PA700、PA28 和 PA200 构成^[9]。蛋白酶体与泛素构成 UPS。UPS 经泛素激活酶(E1)、泛素结合酶(E2)和泛素连接酶(E3)级联酶促反应降解泛素标记的蛋白质。E1 利用水解 ATP 释放的能量以其胱氨酸残基的巯基与泛素 C 端的甘氨酸残基形成高能硫酯键,使泛素活化。E2 是多个成员组成的蛋白质家族,可接受 E1 传递来的泛素,在 E3 的参与下将泛素转移到底物上。E3 约有 1 000 种,分为三大类:含 HECT 结构域的 E3、含 RING 结构域的 E3 和含 U-box 结构域的 E3。它们直接或间接与底物结合,促进泛素从 E2 的硫酯键中间产物转移到底物上,作为底物被蛋白酶体识别和降解的靶向性信号,使底物蛋白进入并在蛋白酶体内降解成寡聚肽。泛素分子最后被去泛素化酶从底物上水解下来,再次被利用。而寡聚肽被释放入细胞质或细胞核质并被可溶性肽酶消化成氨基酸。UPS 因通过 E1、E2 和 E3 的组合获得泛素化过程的特异性和选择性,所以 UPS 降解底物具有高度选择性。

研究已发现多种泛素修饰类型,其中, K48 连接的多聚泛素链是细胞内丰度最高的泛素链,通常标记被蛋白酶体降解的蛋白质,而单泛素化或非 K48 连接的多聚泛素化介导蛋白酶体的非蛋白质降

解功能,这些非蛋白质降解功能包括 DNA 损伤修复、信号传导、转录调节和染色质重组^[10-11]。

1.2 胞吞与泛素化

溶酶体降解途径是细胞转化过多细胞质膜蛋白(如受体或通道)的主要手段,通过胞吞来降解。胞吞的蛋白质或重循环用于质膜,或在源自分选内体的多囊泡体(MVB)成熟时将胞吞蛋白包裹入 MVB。一些受体以泛素作为内化信号^[12]。对酵母的研究表明,泛素化可作为胞吞信号,该过程的单泛素化足以作为一种胞吞内化信号,而泛素 K63 分支结构利于胞吞作用。泛素化使内化蛋白直接面向溶酶体降解。证据提示 K63 可作为涉及胞吞分选的主要泛素链类型。对哺乳动物 TrkA 和 MHC I 型蛋白的研究也一致地揭示,它们的 K63 连接的多聚泛素化都归途于溶酶体^[1, 12]。

虽然单泛素化有时足以促使胞吞内化,但研究提示, K63 多聚泛素化或许特别适合作为一种有效的胞吞信号。K63 多聚泛素链的延伸结构具有线性拓扑结构,对准邻接泛素链,使它们的疏水表面利于结合,大大增强了结合泛素结合域的亲和力,这种较高亲和力能促使偶联 K63 多聚泛素链的蛋白质富有成效地内化,尤其是对那些胞质 Lys 残基数量有限而难于多聚泛素化的受体, K63 多聚泛素化提供了一种替代机制^[12]。

研究表明, MVB 的形成和成熟必需泛素化^[13-14]。MVB 的形成对膜蛋白如生长因子受体的重循环和转化至关重要,这些生长因子受体泛素化后被送入 MVB 腔内泡。

1.3 自噬-溶酶体系统与泛素化

自噬是包括人在内的真核生物共有的一种高度进化保守机制。根据底物进入溶酶体途径的不同,可将自噬分为三种类型: a. 巨自噬。以形成吞噬泡为特征,吞噬泡扩展形成双层膜自噬体,能够与溶酶体融合。巨自噬受自噬相关基因(Atg)调控,涉及降解线粒体、内质网、过氧化物酶体、核糖体,也降解包括聚集蛋白质、脂类、rRNA、碳水化合物在内的生物大分子。 b. 微自噬。溶酶体直接通过溶酶体膜的突出、隔膜或 / 和内陷吞噬细胞质。 c. 伴侣分子介导的自噬(CMA)。是一种具有高度选择性的蛋白质降解的溶酶体途径,其特点是由分子伴侣 Hsp70 识别带有 KFERQ 序列的可溶性胞质蛋白底物。与巨自噬(以后称为自噬)降解细胞器相反, CMA 通过溶酶体偶联的膜蛋白 2A 直接结合溶酶体膜,只降解底物蛋白,而不能降解细胞

器^[4, 15-16]。这些自噬过程的一个共同点是在溶酶体内实现降解, 所以是溶酶体介导的降解途径。虽然每一种形式的自噬具有独特的特征, 但也与其余形式的自噬分享共同的步骤和组分, 这种自噬途径的相互依赖性赋予溶酶体对底物降解的特异性和灵活性^[15]。

早期, 自噬常被认作一种非特异过程。但最近发现了选择性自噬, 选择性自噬底物像 UPS 那样泛素化, 泛素化充当选择性自噬的信号^[3-4]。因此, 自噬根据其降解底物的特异性可以分为两类, 即选择性自噬和非选择性自噬。非选择性自噬能够大量地降解多余的细胞质成分和细胞器, 为细胞在饥饿时进行新陈代谢提供物质。选择性自噬降解蛋白质或者一些细胞器, 涉及泛素化^[4]。在哺乳动物细胞中, 不管是 UPS 降解还是自噬途径降解, 蛋白质的降解信号都是泛素化。因此, 蛋白质泛素化和自噬、UPS 都存在着密切联系。

增长的证据提示, 线粒体、核糖体和过氧化物酶体等细胞器都可经泛素化而被选择性自噬降解。如单泛素和多聚泛素链偶联于线粒体膜蛋白构成一种直接标记自噬体形成的信号, 定位于线粒体膜内或膜上的 E3 泛素连接酶可调节这一过程。又如在哺乳动物细胞中, 去极化线粒体的自噬能够保护细胞免受由活性氧造成的损伤, 这个过程由 Pink-1 促使 E3 泛素连接酶蛋白易位到线粒体上, 从而促进线粒体蛋白 VDAC1 的 K27 多聚泛素化, 随后泛素化的 VDAC1 被 p62 招募并送入自噬体内降解。泛素也涉及过氧化物酶体自噬, 通过胞质和过氧化物酶体的泛素偶联机制, Pex5、Pex18 和 Pex20 这几种过氧化物酶体标记信号受体易被单泛素化和多聚泛素化, 诱导自噬降解过氧化物酶体。多聚泛素链也可充当靶标降解核糖体的信号^[4]。

值得注意的是, 自噬受体为泛素和自噬之间提供了一种分子联系, 如 p62/SQSTM1(简称 p62)和 NBR1 这些自噬受体刺激结合泛素和自噬特异的泛素样修饰因子 LC3/GABARAP。

资料表明, 泛素协同自噬 - 溶酶体系统和 UPS 降解底物。已知许多蛋白质是这两种降解系统的分享底物, 在某些条件下可被 UPS 正常地降解, 也可被自噬 - 溶酶体系统消化, 反之亦然^[3, 7]。然而, 自噬 - 溶酶体系统对细胞泛素化蛋白总量降解的总贡献依然不明, 所以有多少泛素化重要蛋白是被自噬单独降解、有多少泛素化重要蛋白是自噬和 UPS 的分享底物还远未研究清楚。

虽然泛素化可作为靶标自噬 - 溶酶体途径和 UPS 降解底物的普遍标签, 但每种途径其修饰识别的确切类型是不同的。由什么决定特定泛素标记的底物进入一条降解途径或另一条降解途径是值得关注的问题。如 UPS 降解的底物常被 K48 连接的多聚泛素链修饰, 自噬 - 溶酶体途径降解的底物常被 K63 连接的多聚泛素链修饰, 或者仅被单泛素化^[4]。因此, 尽管自噬 - 溶酶体途径和 UPS 都使用泛素, 但不同多聚泛素链的结构复杂性足以维持自噬 - 溶酶体途径和 UPS 对各自底物的选择性和特异性^[3], 这也提示, 不同类型的底物可被不同拓扑结构的多聚泛素链所识别, 为一种蛋白质降解途径或另一种蛋白质降解途径提供降解信号。的确, 可想象存在一种“泛素密码”翻译行使与特异泛素结合蛋白相互作用的功能, 这些相互作用继而决定特定底物的命运^[7]。

这些主要降解途径对泛素化的依赖性提示, 特异抑制任何一条降解途径会扰乱细胞内的泛素多功能性, 因此间接影响其他降解事件^[4]。

去泛素化也是 UPS 降解多聚泛素化蛋白中的一个重要步骤。在底物蛋白挤入蛋白酶体的狭窄入口之前, 需从底物蛋白上除去泛素分子。去泛素化也涉及自噬以减少庞大的复合底物和 / 或允许泛素重循环。例如, p62 依赖性的自噬降解泛素化中等体积的环形结构, 在细胞质移动期间, 该环形结构物理性分离 2 个后代细胞, 涉及逐渐丧失泛素信号^[4]。

泛素化和去泛素化也成为调节降解途径的重要信号。如单泛素化的 α - 突触核蛋白优先被 UPS 降解, 而去泛素化的 α - 突触核蛋白主要被自噬降解。而且, 单泛素化促进 α - 突触核蛋白降解, 而去泛素化导致 α - 突触核蛋白积累, 提示自噬途径降解去泛素化的 α - 突触核蛋白效率不如 UPS 降解单泛素化的 α - 突触核蛋白效率高^[7]。

自噬 - 溶酶体系统与 UPS 对泛素化和去泛素化的依赖性是他们之间相互联系的重要体现, 它们之间相互影响和补偿也是它们之间相互联系的典型表现。

2 自噬-溶酶体系统与 UPS 之间的相互联系

2.1 自噬-溶酶体系统和 UPS 之间联系活跃

近年来已发现自噬 - 溶酶体系统和 UPS 之间广泛联系的证据。典型证据如 BAG (Bcl-2 相关的永生基因) 蛋白家族的 Hsc/Hsp70 共伴侣——BAG1

和 BAG3 在蛋白质降解中的作用. BAG1 在年轻的细胞中高表达并促进 UPS 降解多聚泛素化蛋白, 而 BAG3 在衰老细胞内被上调并促进自噬降解多聚泛素化蛋白. 衰老细胞中由 BAG1 向 BAG3 的共伴侣表达转换表明衰老细胞更强烈地使用自噬机制降解多聚泛素化蛋白, 这提示 BAG1/BAG3 比例决定选择 UPS 降解还是选择自噬降解^[2, 4, 6]. 研究还发现 BAG3 参与 CMA. 更令人惊奇的是, 因参与 UPS 降解而著名的泛素连接酶 CHIP 也参与 CMA, 并与 BAG3 伴侣复合物相互作用, 因此 CHIP 既可参与 UPS 降解又可参与 CMA 降解^[2]. 例如 CHIP 可作为双功能泛素连接酶, 为自噬降解或 UPS 降解标记错误折叠蛋白^[2].

自噬 - 溶酶体系统和 UPS 之间相互联系还体现在底物水平上. 如 Parkin 基因编码的泊蛋白具有 E3 泛素 - 蛋白连接酶活性, 既可标记 UPS 降解底物又可标记自噬降解底物, 其中, 泊蛋白主要通过 K48 连接的泛素链标记 UPS 底物, 促使 UPS 选择性降解错误折叠蛋白, 通过 K63 和 K27 连接的泛素链标记自噬降解底物, 促使自噬选择性降解错误折叠蛋白和非功能线粒体. 这些结果表明泊蛋白可经不同类型的泛素化标记 UPS 降解底物和自噬降解底物^[2]. 泊蛋白如何转化它的泛素化有待深入研究. 这也提出了区别这些降解通路的信号和识别问题. 又如鼠 NTE 相关的酯酶也可被 UPS 和自噬降解^[18].

简言之, 自噬 - 溶酶体系统和 UPS 之间联系活跃.

2.2 不同降解途径的相互依赖性

不同细胞类型之间, 降解途径的相对贡献变化很大. 在大多数无应激条件下培育的细胞中, UPS 降解占优势. 但是在肌肉细胞中, 溶酶体途径(主要是自噬)负责 40% 长寿命蛋白的降解. 在萎缩(atrophiying)的肌肉细胞中, 在转录控制 FoxO3 条件下, 显示 UPS 和自噬 - 溶酶体系统协同上调. 然而, 蛋白酶体本身又可被饥饿诱导的自噬所降解^[1].

自噬 - 溶酶体系统与 UPS 之间在功能上有某些重叠, 如错误折叠蛋白是这两种降解途径分享的最典型底物, 这两种降解途径都能降解可溶性错误折叠蛋白, 多数情况下可溶性错误折叠蛋白被泛素化, 从而被 UPS 降解. 值得注意的是, UPS 介导错误折叠蛋白降解中的一个重要 E3 连接酶是 Hsp70 偶联的共伴侣 CHIP. 如果 Hsp70 不能折叠

一个错误折叠蛋白, 则该 Hsp70- 底物复合物被 CHIP 识别, 诱导该底物多聚泛素化, 使该底物被 UPS 降解^[2]. 降解错误折叠蛋白的另一个重要体系是 CMA. 在 CMA 中, 底物蛋白的特定序列 KFERQ(或相关序列)首先被 Hsp70 识别, 再与 Hsp40、Hip 和 Hop 复合, 然后该底物经溶酶体偶联的膜蛋白 2A 转入溶酶体而被降解. 作为第三种可能, 错误折叠蛋白可被自噬降解. 自噬对聚集的错误折叠蛋白降解非常重要, 因为蛋白质被 UPS 或 CMA 降解之前需要成单体并去折叠, 所以 UPS 或 CMA 不降解聚集的错误折叠蛋白. 如果产生的错误折叠蛋白过多, 超出 UPS 清除能力, 错误折叠的单体和小的可溶性聚集蛋白会活跃地形成较大聚集体, 该聚集体最终可被自噬降解. 所以一个特定的错误折叠蛋白也许有几种不同的结果.

与 UPS 和自噬分别为降解短寿命蛋白和长寿命蛋白的独立途径的传统观念相反, 在某些情况下被 UPS 正常降解的短寿命蛋白也可被自噬选择性降解, 而被自噬正常降解的较长寿命蛋白也可被 UPS 降解. 例如, 神经元蛋白 α -突触核蛋白(突变可引起帕金森症)可被 UPS 或自噬或 CMA 降解^[6-7, 19]. 一个错误折叠蛋白的降解途径部分地由每种降解体系的相对活性所决定. 抑制 UPS 可诱导自噬^[6, 20]. 错误折叠蛋白产生过多时, UPS 不堪重负, 此时诱导自噬可作为一种补偿机制^[6].

2.2.1 通过上调自噬补偿 UPS 损伤.

UPS 和自噬之间相互联系的典型表现之一是: UPS 损伤导致增强自噬功能, 这通常被认作是一种补偿机制, 该机制可减轻 UPS 底物堆积的负担. 确实, 已证明用自噬诱导剂雷帕霉素处理细胞和小鼠可上调自噬以阻止由 UPS 抑制所引起的细胞死亡, 也显示自噬上调可防止果蝇的蛋白酶体活性的遗传性丢失. 应用蛋白酶体抑制剂 MG-132 和硼替佐米的实验则显示了抑制蛋白酶体后转录因子 ATF4 对上调自噬基因的重要性, 也显示出激酶 Jnk 1 介导上调补偿性自噬^[3]. Zhou 等^[21]则发现, 在神经细胞中抑制 UPS 可诱导自噬, 由自噬降解阿尔茨海默病的主要病源蛋白淀粉样 β 前体蛋白 (APP), 它的相似物淀粉样 β 前体样蛋白 1 (APLP1) 的降解也主要由自噬 - 溶酶体系统介导.

有研究表明, 在多巴胺能神经元中抑制 UPS 后可通过一种独立于未折叠蛋白反应但需 p53 的机制诱导自噬. 在抑制 UPS 之后, p53 水平增高. 已有研究提示, 通过多条通路增高 p53 都可上调自

噬, 包括 p53 激活 APMK(腺苷酸活化蛋白激酶)随后抑制 mTOR(哺乳动物雷帕霉素靶蛋白)可诱导自噬^[22].

2.2.2 自噬与 UPS 的相互影响.

研究显示, UPS 损伤导致增强自噬功能. 反之, 慢性抑制自噬可阻碍 UPS 降解泛素化底物, 这一现象在心肌细胞内也得到证实^[23]. 研究还显示, 长期抑制自噬可减慢 UPS 降解短寿命底物^[2]. 对小鼠的遗传学研究则证明, 敲除自噬必需基因 Atg5 或 Atg7 可使自噬失活, 导致泛素化蛋白的堆积和聚集, 对此现象有几种解释: 一是泛素化蛋白可被自噬降解; 二是自噬体的成员(clients)起初没被泛素化, 但在自噬缺陷细胞中逗留时间长得足以被泛素修饰, 最终, 自噬损伤可对 UPS 潮(flux)施加影响. 有实验也证实损伤自噬导致 UPS 的特异成员损伤降解. 实验也提示, 自噬损伤使细胞内 UPS 潮减少并非因蛋白酶体活性受损, 而是 p62 的积累介导阻碍了 UPS 功能. Korolchuk 等^[3, 24]也证实, 自噬抑制可增加 UPS 底物水平, 这主要是由于自噬抑制后 p62 积累, 过量 p62 通过延迟泛素化蛋白运送给蛋白酶体来抑制泛素化蛋白被 UPS 降解. 所以抑制自噬可危害 UPS 功能.

令人感兴趣的是, 已发现蛋白酶体亚基也可被溶酶体降解, 这提供了自噬 - 溶酶体系统可通过调控蛋白酶体数量来影响 UPS 活性的可能性^[3].

研究显示, 在多种哺乳动物细胞中药理性地抑制蛋白酶体可诱导自噬, 在果蝇中遗传性地损伤蛋白酶体也可诱导自噬. 蛋白酶体损伤诱导自噬很可能是保护性的, 这种保护作用可用下列事实予以解释: 在自噬缺陷背景下蛋白酶体损伤促进退行性表型, 而在果蝇中诱导自噬可明显减缓这种退行性表型. 该结果与一项体外实验结果一致, 该实验表明, 应用一种自噬诱导剂雷帕霉素预处理可减少蛋白酶体抑制剂乳胞素诱导的凋亡和泛素化蛋白聚集, 而用自噬抑制剂 3-MA 抑制自噬或者沉默 Atg 可增强蛋白酶体抑制剂诱导细胞死亡. 反过来, 多组证据提示减少自噬可增强蛋白酶体依赖的蛋白质降解. 应用 3-MA 抑制自噬可导致蛋白酶体活性增高, 敲除 Atg5 的心脏增高了多聚泛素化蛋白的水平, 增强了蛋白酶体活性. 总之, UPS 和自噬在蛋白质的量控制中起补偿作用^[25]. 但也有报道, 许多蛋白质在自噬缺陷性细胞内聚集, 这说明自噬在控制细胞内蛋白质代谢上具有重要的作用, 并且表明 UPS 介导的蛋白质降解不能非常有效地弥补自噬的

缺陷.

CMA 也涉及蛋白质降解途径的协同功能. CMA 可选择性地降解蛋白酶体的某些亚基, 突显了 CMA 和 UPS 之间的相关性. 此外, 急性抑制 CMA 可导致 UPS 和自噬短期损伤, 继续持续抑制 CMA, UPS 和自噬可恢复. 慢性抑制 CMA 导致结构性活化自噬, 这显然是一种补偿机制^[7].

值得注意的是, 在一种降解系统损伤情况下, 由一种替代途径增强降解对维持细胞内物质循环利用至关重要, 并可防止有毒物质积累^[7].

值得一提的是, 自噬 - 溶酶体系统和 UPS 之间相互联系的发现也开辟了研究这些降解途径及其细胞效应的新方向.

3 自噬-溶酶体系统和 UPS 之间相互联系的机制

虽然目前对自噬 - 溶酶体系统和 UPS 之间相互联系的机制知之不多, 但也取得了不少重要进展, 除了发现泛素化在这些联系中起重要作用和自噬 - 溶酶体系统与 UPS 相互影响外, 也发现几种调节因子可作为介导自噬 - 溶酶体系统和 UPS 之间相互联系的重要角色, 这些调节因子包括 HDAC6、p62、FoxO3 和 Alfy, 其中 HDAC6、p62 和 Alfy 具有直接或间接与泛素和自噬机器相互作用的能力^[3].

3.1 HDAC6

HDAC6 含有一个泛素结合锌指(BUZ)结构域^[4], 可通过该结构域结合泛素, 该结构域显示偏爱 K63 连接的多聚泛素链, 所以 HDAC6 具固有的泛素结合活性. HDAC6 也与微管和 F-肌动蛋白细胞骨架偶联. HDAC6 与微管网络、泛素化蛋白的偶联导致惊人的发现: HDAC6 是聚集体(微管组织中心定位的包涵体)的一种调节组分, 包涵体储存超量蛋白质聚集体. 蛋白质聚集体是一种通过浓缩有毒聚集体送入微管组织中心(MTOC)以保护细胞的机制, MTOC 富含溶酶体, 在 MTOC 内蛋白质聚集体被自噬降解. 进一步研究表明, HDAC6 通过泛素结合 BUZ, 经微管网络结合并促进运送泛素化错误折叠蛋白以形成聚集体, HDAC6 已成为细胞管理蛋白质聚集体的重要角色. 研究表明, HDAC6 在自噬中是作为标记蛋白聚集体和损伤线粒体的一种核心组分. 令人惊奇的是, HDAC6 不是自噬活性所需的, 相反, 它调控自噬体与溶酶体融合. HDAC6 通过招募一种皮肌动蛋白依赖性的

肌动蛋白重塑机器促进自噬, 该机器继而装配 F-肌动蛋白网络, 该网络刺激自噬体与溶酶体融合, 促使底物降解^[4, 26].

如前所述, 所形成的聚集体通过将毒性的、活化的错误折叠蛋白的寡聚体包裹入大包涵体有助于错误折叠蛋白的去毒化. 聚集体前体经微管和马达蛋白输送到 MTOC 临近处是聚集体形成的关键, 随后聚集体被自噬降解.

在 UPS 被抑制期间, 自噬降解成熟蛋白必需 HDAC6. 这时, HDAC6 影响招募自噬特异蛋白至聚集体, 也影响溶酶体动力学. 此外, 聚集体形成和聚集体自噬降解依赖于 HDAC6 的去乙酰化酶活性, 该酶活性影响微管动力学^[26]. 这些结果提示, 自噬在抑制 UPS 细胞中的补偿上调保护作用依赖于 HDAC6. 应用 UPS 已被瓦解的一种神经退行性疾病果蝇模型所作的研究表明, 在 UPS 损伤时自噬可充当补偿降解系统, 这两条降解通路在体内是联系在一起的, 与泛素化蛋白相互作用的 HDAC6 是联系这种补偿相互作用的一种必需机制. 在脊髓肌萎缩症的退行性疾病的果蝇模型中自噬补偿是应答蛋白酶体突变和 UPS 损伤, 自噬是以 HDAC6 依赖方式补偿 UPS 损伤. 而且, 在体内 HDAC6 的表达足以诱发自噬作用, 挽救了果蝇与 UPS 功能失调相关的神经退行性, HDAC6 的这一挽救作用被发现是自噬依赖性的, 这一结果与 HDAC6 在 UPS 和补偿自噬中的作用相符^[7, 27]. 这些发现解释了自噬与 UPS 之间的补偿相关性, 并对于了解与蛋白质有关的神经退行性疾病的发病机理及可能的治疗方法具有参考意义.

3.2 p62

p62 是联系泛素化蛋白与自噬机器的一种衔接分子, 具有一个锌指结构域和一个泛素结合结构域 (UBA). p62 的 C 端部分通过它的 UBA 结构域结合多聚泛素化底物, 通过微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) 相互作用基序直接结合 LC3. p62 也能经它的 N 端 PB1 结构域多聚化, 经 N 端泛素样 (UBL) 结构域与蛋白酶体相互作用. 这就提示 p62 通过利于泛素化蛋白自噬降解为自噬和 UPS 之间提供了关键联系^[7, 25].

UPS 降解的穿梭底物涉及 p62 UBL 结构域与蛋白酶体之间的相互作用. 为了应答由蛋白酶体抑制、前细胞凋亡 (proapoptotic) 处理、氧自由基诱导的应激, p62 的转录水平和蛋白质水平都增高, 提示 p62 可被 UPS 降解^[25].

研究发现, p62 的 UBA 结构域能结合 K48 连接的多聚泛素链和 K63 连接的多聚泛素链, 但对 K63 连接的多聚泛素链亲和性更高. 这一方面提示了自噬对 K63 连接的多聚泛素链标记底物的偏爱, 另一方面也提示 K48 连接的多聚泛素链标记的底物依然可被招募进入自噬体, 在 UPS 被损伤的情况下和在 K48 多聚泛素化蛋白的浓度足以允许 K48 连接的多聚泛素链与 p62 有效地相互作用的情况下尤其如此^[9]. p62 是自噬受体, 可与偶联靶点的泛素相互作用, 也与自噬体上的 LC3/GABARAP 相互作用, 因此促进泛素化靶点的自噬^[4]. 研究也显示, p62 的积累介导阻止 UPS 功能, 因为沉默 p62 可营救自噬缺陷细胞内的 UPS 底物水平. p62 单独过表达也足以抑制 UPS, 其部分作用依赖于 p62 的 UBA 结构域. p62 不仅结合泛素化蛋白, 也与称为 p97 的泛素结合蛋白竞争结合泛素化蛋白, 而 p97 的已知功能之一是利于输送泛素化底物到蛋白酶体. 据此推测, 提高 p62 水平可阻止如 p97 那样的穿梭蛋白接近泛素化 UPS 底物^[3, 28]. 因此 p62 涉及 UPS 和自噬之间对话的两种不同机制. 在生理状态下 (以正常速率进行自噬), p62 运送被自噬降解的泛素化蛋白. 反之, 在自噬受损情况下 (在各种病理条件包括神经退行性), p62 积累并结合泛素化蛋白, 阻止了泛素化蛋白运送给蛋白酶体, 从而阻抑了泛素化蛋白被 UPS 降解. UPS 缺失对自噬功能失调的补偿与下列事实相符: p62 积累、寡聚化时, p62 因体积太庞大而难以成为只有狭窄催化孔的蛋白酶体的降解底物^[9].

研究也显示, p62 与经典蛋白酶体受体竞争泛素化底物. 自噬抑制和 p62 积累减缓 UPS 底物的降解, 最可能是由于稳定的寡聚体 p62 和 K48 泛素偶联底物之间相互作用过度, 这也提示 p62 直接与蛋白酶体相互作用^[4]. 由此提出了下列问题: 自噬受体是否在 UPS 的蛋白质降解中有更直接的作用?

p62 除了与泛素阳性包涵体共定位之外, 也与自噬体共定位, 也能被自噬降解. p62 的积累被认为是自噬失常的信号. 自噬降解 p62 的研究表明, 自噬抑制后积累 p62, 而应用自噬诱导剂雷帕霉素处理可导致内源性 p62 减少. 在应答应激中, 多聚泛素阳性包涵体的形成和自噬降解必需 p62. 敲除 p62 可减少泛素阳性包涵体 (自噬体结构) 的实验支持 p62 在应答错误折叠蛋白应激中的保护作用^[25]. 相似地, p62 缺失鼠在自噬缺陷背景下应答错误折

叠蛋白应激时不能形成泛素阳性包涵体, 导致 tau 积累和神经退行性。总之, 应激条件下 p62 在泛素化蛋白聚集的形成和降解中起至关重要的作用, p62 是 UPS 和自噬之间信息传递的完美候选者^[25]。

细胞应激如聚谷氨酸、蛋白酶体损伤、氧化应激和增加错误折叠蛋白加重了 p62 活化转录和翻译的负担, 提示 p62 在应激情况下有宽广功能。如发现 p62 定位于各种泛素阳性神经病理性包涵体, 这些包涵体包括帕金森疾病的 Lewy 小体、tau 疾病的神经原纤维缠结、亨廷顿疾病的聚谷氨酸扩张的亨廷顿蛋白聚集和突变 SOD1 聚集。p62 在防止错误折叠蛋白应激中的作用受到下列研究结果支持: 体外 RNAi 介导 p62 沉默加重聚谷氨酸毒性, 而减弱 LC3 共沉淀泛素化蛋白的能力减少泛素阳性包涵体形成以应答错误折叠蛋白应激^[7]。

3.3 FoxO3

转录因子 FoxO3 是第三种联系自噬 - 溶酶体和 UPS 两条途径的可能因子。FoxO3 诱导基因转录, 这些基因转录的产物涉及上调 UPS 降解和自噬降解^[2]。如在萎缩肌肉中, FoxO3 同时激活和调节 UPS 和自噬降解蛋白途径。心脏 FoxO3 通过激活 E3 泛素连接酶如 atrogin 1 或 MuRF 1 引起萎缩。通过直接结合 LC3b Gabarap 1、Atg121、Bnip3 诱导骨骼肌肉内的自噬需要 FoxO3, 调控自噬相关基因转录也需要 FoxO3。相反, 在分离的肌肉纤维内沉默 FoxO3 可阻止由饥饿诱导的自噬增高。在肌肉萎缩期间, 由 FoxO3 诱导的 Bnip3 在自噬体形成中起主要作用^[5, 25]。但也有研究认为, 由 FoxO3 活化的 UPS 和自噬并非这两种系统之间直接对话介导的结果, 而是源自这两种系统的关键基因协同转录的诱导, 因为抑制这两条途径中的任一条都不改变由 FoxO3 激活剩余降解过程的速度^[25]。

3.4 Alfy

Alfy 是第四种联系自噬 - 溶酶体和 UPS 两条通路的调节因子。Alfy 是 FYVE 结构域家族蛋白的一个成员。与多数其他 FYVE 结构域蛋白不同, Alfy 不在内体中而主要定位于核膜。应用饥饿或蛋白酶体抑制剂 PSI 处理细胞导致具有胞质 Alfy 阳性结构的细胞数量强烈增多。虽然这意味 Alfy 阳性结构通常被 UPS 降解, 但也发现 Alfy 从核膜重定位于细丝状胞质结构, 该结构邻近自噬膜和泛素化蛋白包涵体甚至在自噬体内。电子显微镜观察也显示, 类似结构可在自噬体内发现。这强烈提示

Alfy 可标记被自噬降解的聚集胞质蛋白。据此推测, PSI 诱导的 Alfy 标记代表细胞质招募 Alfy 的增多, 加强了自噬作用而不是减少降解作用。研究也显示, 果蝇的 Alfy 同系物 Blue Cheese (BCHS) 突变导致果蝇缩短寿命和泛素化神经聚集体的积累, 提示 BCHS 在自噬降解中的作用涉及泛素化聚集体的清除^[7, 29]。文献报道, Alfy 通过它的磷脂酰乙醇胺 -3- 磷酸结合的 FYVE 结构域与自噬体膜相互作用, 介导自噬降解聚集蛋白^[9]。

p62、HDAC6 和 Alfy 并非都是各自独立地介入降解过程, 有时有协同作用。如 p62 和 HDAC6 协同将错误折叠蛋白包裹在一起, 便于它们与自噬泡相互作用, 因此为自噬降解提供了特异性, 并显示通过 K63 连接的多聚泛素链与 p62、HDAC6 相互作用, 因此提供了自噬降解的信号。最近一项应用模型的研究也显示, p62 和 HDAC6 功能相似地便利自噬降解特异多聚泛素拓扑化蛋白。确切地说, 提示 K63 连接的多聚泛素链招募为自噬降解提供信号的 p62 和 HDAC6^[7]。p62 也与 Alfy 相互作用, 安排泛素化的错误折叠蛋白进入自噬体而被自噬降解^[2]。虽然 p62 与 HDAC6 或 Alfy 相互作用, 但对这些调节因子在何种情况下协同作用、在何种条件下完全单独作用的了解还不完备。

除了上述 4 种典型调节因子之外, 新近又陆续发现了一些介导自噬和 UPS 之间相互联系的新调节因子, 如 Cdc48/p97 也是介导自噬系统和 UPS 之间相互作用的一个关键角色^[30]。又如肿瘤坏死因子受体偶联因子 6 (TRAF6) 协调萎缩的骨骼肌中自噬系统和 UPS 活化^[8]。NBR1 则与 p62 相似, 直接结合泛素和 LC3^[2], 提示 NBR1 以类似于 p62 的作用方式为自噬和 UPS 之间提供重要联系。

4 结论与展望

细胞内自噬 - 溶酶体系统和 UPS 发挥各自的独特作用, 并通过相互联系发挥补偿或协同作用, 这些功能的发挥受到复杂机制监控, 以确保细胞内物质降解的特异性, 也确保细胞内外物质合成和降解的动态平衡。这些相互关系提示, 一种特异底物偏爱特定降解通路也许是选择最高效降解该底物的系统。值得注意的是, 还不太清楚可用一条以上降解途径时, 特异底物如何在降解通路之间做出决定, 对如何在特定时间、顺序及空间范围内选择自噬 - 溶酶体系统或 UPS 的机制了解还比较有限。虽然已发现 HDAC6、p62 和 Alfy 这些调节因子为

自噬 - 溶酶体系统和 UPS 之间提供了分子联系, 但借助 HDAC6、p62 和 Alf1 识别降解靶点并影响降解的机制依然不完全清楚. 今后研究的重点是: 不仅要更深入阐明其机制, 还要鉴别出新的调节分子; 不仅要更深入阐明这些降解途径相互联系的机理, 还要厘清这些降解途径是如何整合成细胞分解代谢的要素.

基于自噬 - 溶酶体系统和 UPS 的降解底物通常由泛素标记, 提示不同种类的底物可被不同拓扑的多聚泛素链识别, 为一种降解系统或另一种降解系统降解提供信号. 更确切地说, 发现 K48 连接的多聚泛素链标记的底物主要被 UPS 降解, 而 K63 连接的多聚泛素链标记的底物常被直接自噬. 虽然在各种生理和病理状态下选择何种泛素化及精细调节泛素化的研究已取得长足进展, 但还有许多需进一步深入研究的问题, 如导致将指定 E3 连接酶招募给自噬底物或 UPS 底物的上游信号有哪些? 哪些 E3 连接酶特异地分选自噬的特定底物或 UPS 特定底物? 如何在特定时间、顺序及空间范围内精细地选择所需的泛素化类型? 如何选择一条特定底物并标记给一条特定的降解途径?

在自噬 - 溶酶体系统和 UPS 中, 如果一条途径被损伤, 另一条途径可能会发生补偿作用. 目前, 发现较多的是 UPS 损伤导致自噬上调, 在某些背景下这种自噬上调可补偿受损 UPS 的功能. 然而, 尚不清楚这种补偿关系是否都是相互的, 因为能上调 UPS 的试剂非常少. 因自噬 - 溶酶体系统和 UPS 之间相互联系及其信号转导等研究尚处于初始阶段, 许多问题需深入研究, 其中令人感兴趣并具挑战性的是系统阐明自噬和 UPS 在不同信号通路中、不同细胞过程中的独特作用和协同作用.

值得注意的是, 自噬 - 溶酶体系统和 UPS 失调或受损严重或相互之间的联系遭破坏, 不仅导致细胞功能的异常, 而且也与多种重要疾病如帕金森病等神经退行性疾病、糖尿病、癌症和免疫病的发生和发展密切相关^[31-32]. 如自噬被阻断和 / 或 UPS 被抑制将导致神经元中泛素化蛋白的积累, 造成神经退行性疾病. 因此一些药物的部分作用也与 UPS 和自噬相关, 如阳离子脂偶联雌激素衍生物 (ESC8) 治疗乳腺癌作用的分子机制之一就是干扰 mTOR 活性而诱导细胞自噬^[33]. 而一些药物的部分副作用也与 UPS 和自噬相关, 如抗肿瘤药物顺铂是通过激活 UPS 和自噬诱导骨骼 C2C12 肌管

萎缩^[34]. 尽管对这些降解系统与相关疾病之间分子机制的理解日益深入, 但对其认识还远不完备, 如哪些因素决定自噬 - 溶酶体系统和 UPS 起有益作用或有害作用? 因此进一步阐明这些降解系统在相关病中的功能和机理将有助于这些疾病的治疗, 同时减少一些药物的副作用. 阐明这些降解系统之间相互联系的机制不仅可拓展对细胞内物质降解调控机制的认识, 而且对于理解与细胞降解相关疾病的发生机理有重要指导意义, 也有望为这些疾病的诊断和治疗提供新的思路.

参 考 文 献

- [1] Clague M J, Urbe S. Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell*, 2010, **143**(5): 682-685
- [2] Kraft C, Peter M, Hofmann K. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nature Cell Biology*, 2010, **12**(9): 836-841
- [3] Korolchuk V I, Menzies F M, Rubinshtein D C. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Letters*, 2010, **584**(7): 1393-1398
- [4] Kirkin V, McEwan D G, Novak I, *et al.* A role for ubiquitin in selective autophagy. *Molecular Cell*, 2009, **34**(3): 259-269
- [5] Zhao J H, Brault E J, Schild A, *et al.* FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metabolism*, 2007, **6**(6): 472-483
- [6] Lamark T, Johansen T. Autophagy: links with the proteasome. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, **22**(2): 192-198
- [7] Nedelisky N B, Todd P K, Taylor J P. Autophagy and the ubiquitin-proteasome system: collaborators in neuroprotection. *Biochim Biophys Acta*, 2008, **1782**(12): 691-699
- [8] Paul P K, Kumar A. TRAF6 coordinates the activation of autophagy and ubiquitin-proteasome systems in atrophying skeletal muscle. *Autophagy*, 2011, **7**(5): 555-556
- [9] 陈季武, 左秋红, 计磊, 等. 非泛素依赖地降解蛋白质的研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2011, **38**(7): 593-603
Chen J W, Zuo Q H, Ji L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38**(7): 593-603
- [10] 陈季武, 郑丽娜, 王帮正, 等. 泛素化介导的非蛋白降解功能. *生物化学与生物物理进展*, 2012, **39**(7): 613-621
Chen J W, Zheng L N, Wang B Z, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2012, **39**(7): 613-621
- [11] DeMartino G N, Gillette T G. Proteasomes: machines for all reasons. *Cell*, 2007, **143**(4): 682-685
- [12] Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*, 2007, **315**(5): 201-205
- [13] Purdy G E, Russell D G. Lysosomal ubiquitin and the demise of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cellular Microbiology*, 2007, **9**(12): 2768-2774

- [14] Piper R C, Lehner P J. Endosomal transport *via* ubiquitination. Trends Cell Biol, 2011, **21**(11): 647–655
- [15] Cuervo A M. Autophagy: many paths to the same end. Mol Cell Biochem. 2004, **263**(1–2): 55–72
- [16] Kaminskyy V, Zhivotovsky B. Proteases in autophagy. Biochim Biophys Acta, 2012, **1824**(1): 44–50
- [17] Rotta R, Szargela R, Haskin J, *et al.* α -synuclein fate is determined by USP9X-regulated monoubiquitination. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, **108**(46): 18666–18671
- [18] Chang P A, Chen Y Y, Long D X, *et al.* Degradation of mouse NTE-related esterase by macroautophagy and the proteasome. Mol Biol Rep, 2012, **39**(6): 7125–7131
- [19] Ebrahimi-Fakhari D, Cantuti-Castelvetri I, Fan Z Y, *et al.* Distinct roles *in vivo* for the ubiquitin- proteasome system and the autophagy-lysosomal pathway in the degradation of alpha-Synuclein. J Neurosci, 2011, **31**(41): 14508–14520
- [20] Yao F, Wang G N, Wei W, *et al.* An autophagy inhibitor enhances the inhibition of cell proliferation induced by a proteasome inhibitor in MCF-7 cells. Mol Med Rep, 2012, **5**(1): 84–88
- [21] Zhou F, van Laar T, Huang H, *et al.* APP and APLP1 are degraded through autophagy in response to proteasome inhibition in neuronal cells. Protein Cell, 2011, **2**(5): 377–383
- [22] Du Y, Yang D, Li L, *et al.* An insight into the mechanistic role of p53-mediated autophagy induction in response to proteasomal inhibition-induced neurotoxicity. Autophagy, 2009, **5**(5): 663–675
- [23] Su H B, Wang X J. p62 stages an interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in the heart of defense against proteotoxic stress. Trends Cardiovasc Med, 2011, **21**(8): 224–228
- [24] Korolchuk V I, Mansilla A, Menzies F M, *et al.* Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. Mol Cell, 2009, **33**(4): 517–527
- [25] Zheng Q W, Li J, Wang X J. Interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in proteinopathies. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol, 2009, **1**(2): 127–142
- [26] Lee J Y, Koga H, Kawaguchi Y, *et al.* HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. EMBO J, 2010, **29**(5): 969–980
- [27] Pandey U B, Nie Z, Batlevi Y, *et al.* HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. Nature, 2007, **447** (7146): 859–863
- [28] Korolchuk V I, Menzies F M, Rubinsztein D C. A novel link between autophagy and the ubiquitin-proteasome system. Autophagy, 2009, **5**(6): 862–863
- [29] Simonsen A, Birkeland H C G, Gillooly D J, *et al.* Alf, a novel FYVE-domain-containing protein associated with protein granules and autophagic membranes. J Cell Science, 2004, **117** (Pt 18): 4239–4251
- [30] Dargemont C, Ossareh-Nazari B. Cdc48/p97, a key actor in the interplay between autophagy and ubiquitin/proteasome catabolic pathways. Biochim Biophys Acta, 2012, **1823**(1): 138–144
- [31] Green D R, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. Science, 2011, **333** (6046): 1109–1112
- [32] Jimenez-Sanchez M, Thomson F, Zavodszky E, *et al.* Autophagy and polyglutamine diseases. Prog Neurobiol, 2012, **97** (2): 67–82
- [33] Sinha S, Roy S, Reddy B S, *et al.* A lipid-modified estrogen derivative that treats breast cancer independent of estrogen receptor expression through simultaneous induction of autophagy and apoptosis. Mol Cancer Res, 2011, **9**(3): 364–374
- [34] Fanzani A, Zanola A, Rovetta F, *et al.* Cisplatin triggers atrophy of skeletal C2C12 myotubes via impairment of Akt signalling pathway and subsequent increment activity of proteasome and autophagy systems. Toxicol Appl Pharm, 2011, **250** (3): 312–321

Crosstalk Between Autophagy and Proteasome Systems*

CHEN Ji-Wu**, WANG Bang-Zheng, GAO Xiu-Xia, ZHANG Yuan-Yuan

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract The two major degradation pathways of eukaryotic cells, autophagy- lysosome and ubiquitin-proteasome systems, have been found. The two degradation pathways were, for a long time, regarded as independent degradation pathways. However, recent evidence strongly suggest that there is crosstalk between the two degradation pathways. For example, perturbations either pathway have been reported to affect the activity of the other pathway. And inhibition of proteasome may stimulate autophagy activity. The roles of ubiquitin are also found far more than previously imagined. Ubiquitin not only has "traditional function" targeting proteins for proteasome degradation, but also is involved in ubiquitylating substrates for degradation of autophagy- lysosome system. So ubiquitin is a common tag of these main degradation pathways. These degradation systems share certain substrates and regulators, and show coordinated and, in some contexts, compensatory function. The coordinated and compensatory relationship between these degradation systems that becomes critical in many cellular processes. Therefore, abnormalities in these degradation systems involves not only aberrant cellular functions but also occurrence and development of many diseases. Understanding functions and crosstalk of these major degradation pathways will provide further insights into the repertoire of these degradation pathways, help to understand diverse cellular catabolic processes and facilitate our development of related new drugs.

Key words autophagy-lysosome system, ubiquitin-proteasome system, ubiquitin, degradation, crosstalk

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00289

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (31071875).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-24206741, E-mail: jwchen@bio.ecnu.edu.cn

Received: June 12, 2012 Accepted: December 21, 2012