



Pup-蛋白酶体系统的作用机制和生物学功能*

戴 炜¹⁾ 李梦森²⁾ 张俊杰^{1)**}⁽¹⁾ 北京师范大学生命科学院, 细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室, 北京 100875; ⁽²⁾ 辽宁师范大学生命科学院, 大连 116081)

摘要 Pup-蛋白酶体系统 (Pup-proteasome system, PPS) 是原核生物的一种翻译后蛋白质修饰降解体系, 在去酰胺酶 (deamidase of Pup, Dop) 和蛋白酶体辅助因子 A (proteasome accessory factor A, PafA) 两种酶的作用下, 原核生物类泛素蛋白 (prokaryotic ubiquitin-like protein, Pup) 可以标记靶蛋白, 并介导靶蛋白经蛋白酶体降解。在分枝杆菌中 PPS 参与氧化应激、营养缺乏、热激、DNA 损伤等多种应激反应, 并在金属离子稳态调控、毒素-抗毒素系统 (toxin-antitoxin system, TA system) 的调节以及抵抗宿主免疫等过程中发挥作用。PPS 与结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mtb*) 的持留性和致病性直接相关, 因此 PPS 中的 PafA、Dop 和蛋白酶体均是抗结核药物开发的新靶点, 筛选针对 PPS 的小分子抑制剂将成为新型抗结核药物研发的一个新途径。此外, PafA 催化的蛋白质 Pup 化被应用于生物技术的研发, 形成了一种新的邻近标记技术——基于 Pup 化的邻近标记技术 (pupylation-based interaction tagging, PUP-IT), 应用于蛋白质相互作用的研究。本文综述了 Pup-蛋白酶体系统的作用机制及其生物学功能研究的进展, 并探讨了该系统在抗结核药物和生物技术研发中的应用前景。

关键词 Pup-蛋白酶体系统, Dop, PafA, Pup, 蛋白酶体, 结核分枝杆菌

中图分类号 Q5, Q7, Q81

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0025

泛素-蛋白酶体通路是真核生物中一种重要的蛋白质修饰降解途径, 在一些原核生物中则存在原核类泛素蛋白 (prokaryotic ubiquitin-like protein, Pup), 通过 Pup 共价标记靶蛋白可以介导靶蛋白经蛋白酶体降解, 这种原核蛋白修饰降解系统被称为 Pup-蛋白酶体系统 (Pup-proteasome system, PPS)^[1]。PPS 广泛存在于分枝杆菌和其他放线菌属, 参与调控许多重要的代谢途径和生理功能。结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mtb*) 是危害人类健康的传染性病原体, 在 *Mtb* 对抗宿主的免疫防御、维持在宿主细胞内的生存与持留过程中, PPS 起着重要的作用^[2]。随着 *Mtb* 耐药菌株的产生和传播, 人们迫切需要开发新的抗结核靶向药物。鉴于 PPS 中的一些关键成员是 *Mtb* 和相关菌属特有的, 并在 *Mtb* 感染和致病过程中发挥重要的作用, 该系统是一个有价值的抗结核新药研发靶标。目前已发表的中英文综述着重关注于 PPS 关键成员的蛋白质结构和作用机制, 除了 PPS 的作用机制, 本文还对 PPS 的调控机制、生物学功能及其在生物

技术研发中的应用等方面的研究进展进行了综述。

1 Pup-蛋白酶体系统

在 2000 年左右, 人们先后发现在红串红球菌 (*Rhodococcus erythropolis*)^[3]、耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*, *Msm*)^[4]、*Mtb*^[5]、天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*)^[6] 和弗兰克氏菌 (*Frankia*)^[7] 等存在蛋白酶体, 直到 2008 年研究人员才发现了类似泛素的标签蛋白——原核类泛素蛋白 Pup^[8]。通过 Pup 标记靶蛋白可以介导靶蛋白经蛋白酶体降解, 形成了一种原核蛋白质翻译后修饰降解系统——PPS^[1]。在该系统中主要发生以下 4 步反应 (图 1)。a. Pup 的活化: 由去酰胺酶 (deamidase of Pup, Dop) 将 C 端为谷氨酰胺的 Pup

* 国家自然科学基金 (32171138, 81972604) 和细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室开放课题资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-58802137, E-mail: jjzhang@bnu.edu.cn

收稿日期: 2023-01-18, 接受日期: 2023-03-26

(PupQ) 转化为C端为谷氨酸的Pup (PupE), 从而使Pup活化^[9]; b. 靶蛋白的Pup化: 由连接酶——蛋白酶体辅助因子A (proteasome accessory factor A, PafA) 催化PupE C端的谷氨酸侧链与靶蛋白赖氨酸的ε氨基之间形成一个异肽键, 使靶蛋白Pup化^[9-10]; c. Pup化蛋白质的降解: Pup标签被分枝杆菌蛋白酶体ATP酶 (mycobacterial

proteasomal ATPase, Mpa) 的N端卷曲螺旋结构域识别, 驱动Pup化的靶蛋白解折叠, 然后经由蛋白酶体降解^[11-12]; d. 去Pup化: Dop发挥去Pup化酶的活性, 从Pup化的靶蛋白或其降解片段中解离释放出PupE, 解离出的PupE可以再参与蛋白质Pup化^[13]。

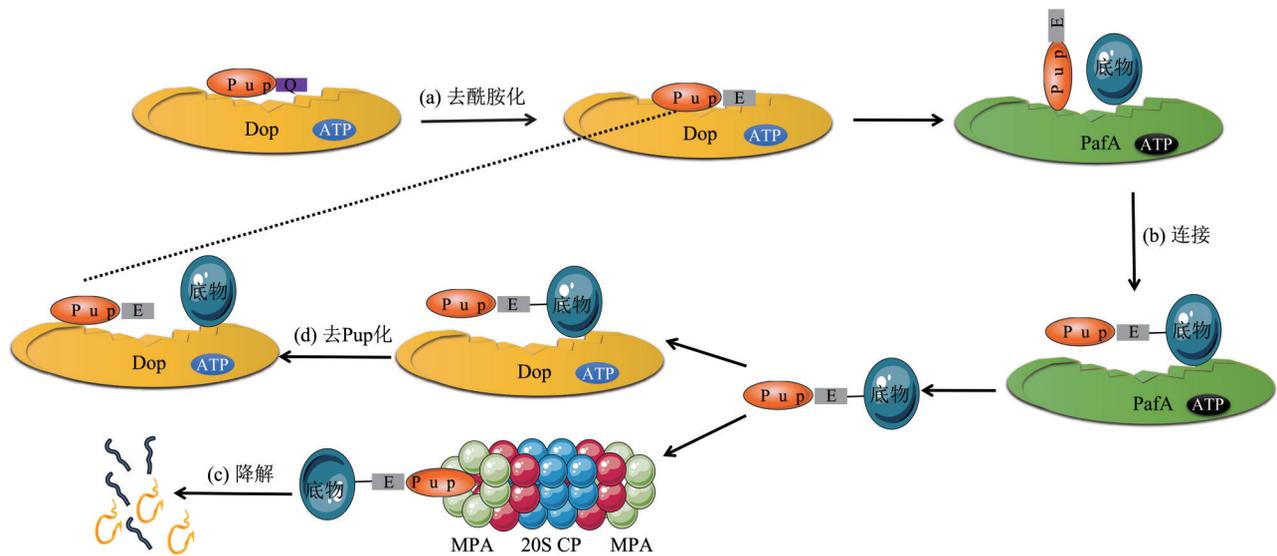


Fig. 1 Mycobacterial Pup-proteasome system

图1 分枝杆菌Pup-蛋白酶体系统

(a) Pup的活化: 由去酰胺酶Dop将PupQ转化为PupE; (b) 靶蛋白的Pup化: 由连接酶PafA催化PupE与靶蛋白形成一个异肽键使靶蛋白Pup化; (c) Pup化蛋白的降解: Pup标签被蛋白酶体ATP酶Mpa识别, 驱动Pup化的靶蛋白解折叠后经由蛋白酶体降解; (d) 去Pup化: Dop发挥去Pup化酶的活性, 从Pup化的靶蛋白或其降解片段中解离释放出PupE。

PPS主要存在于放线菌门和硝化螺旋菌门的细菌谱系中, 包括人类病原体Mtb和天然抗生素的主要来源天蓝色链霉菌等^[14]。在大多数放线菌中, Pup-蛋白酶体相关基因在基因组上的编码顺序通常

为mpa-dop-pup-prcB-prcA-pafA (图2)。Pup编码基因Pup与蛋白酶体编码基因prcB-prcA在同一个操纵子上, 位于蛋白酶体编码基因prcB-prcA上游; 有的物种中mpa和dop之间以及prcA和pafA之间被

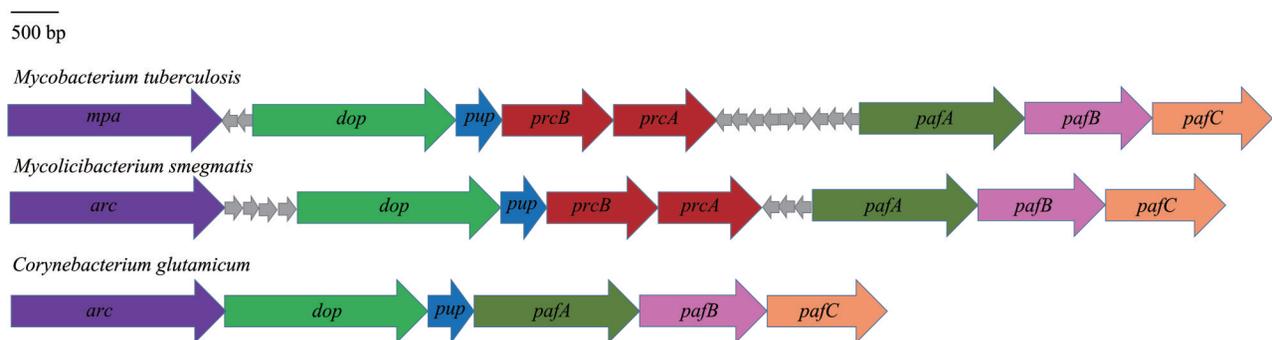


Fig. 2 Genomic organization of Pup-proteasome system genes in Mycobacterium

图2 分枝杆菌中Pup-蛋白酶体系统的基因排布

Mycobacterium tuberculosis: 结核分枝杆菌; Mycobacterium smegmatis: 耻垢分枝杆菌; Corynebacterium glutamicum: 谷氨酸棒状杆菌。

和 PupE C 端谷氨酸之间形成异肽键，从而使靶蛋白 Pup 化，此过程需要 ATP 的结合和水解，产生 ADP 和磷酸化的 PupE 中间产物^[25]。对 Pup-PafA 复合物的研究表明，Pup 通过疏水相互作用和盐桥作用结合到 PafA 的保守凹槽上（长度为 40~50 Å）^[20]。在与 PafA 结合后，Pup 的 C 端经历了一个过渡状态，从基本无序的自由状态过渡到两个解析良好的正交螺旋 H1（S38-L47）和 H2（A51-Y58）^[20-21]。螺旋 H1 与 PafA 的螺旋 α_8 、 α_9 和 α_{10} 一起形成了一个四螺旋束，将 Pup 固定在 Pup 结合凹槽的较低部分^[20]。Ofer 等^[26]认为二聚体是 PafA 的活性形式，PafA 是变构酶，底物能诱导 PafA 发生变构反应，二聚体中的两个 PafA 能同时结合底物，一分子底物与 PafA 结合后能增强另一

分子底物的结合，因此底物蛋白的 Pup 化可以通过 PafA 的变构机制在酶活水平上进行调节。Dop 具有去酰胺活性，能够将 PupQ 转化为 PupE，从而使 Pup 具有连接能力。Dop 还能有去 Pup 化的活性，能够去除共价连接在靶蛋白赖氨酸残基上的 PupE，从而使 PupE 能够再循环利用。Dop 在去酰胺/去 Pup 化过程中也需要 ATP 作为辅助因子。与 Dop 结合后，Pup 由无序状态转变为具有两个螺旋（H1：D44-V53；H2：N57-S64）的有序状态。Dop-Pup 复合物结构表明，Dop 链 β_7 链前的 Loop 结构（F208-K220）通过与 T217 形成强氢键参与和 Pup C 端残基（Q71）的结合^[27]。Pup 与 PafA 和 Dop 相互作用，通过 PafA 和 Dop 的催化来完成靶蛋白的 Pup 化和去 Pup 化过程（图 4）。

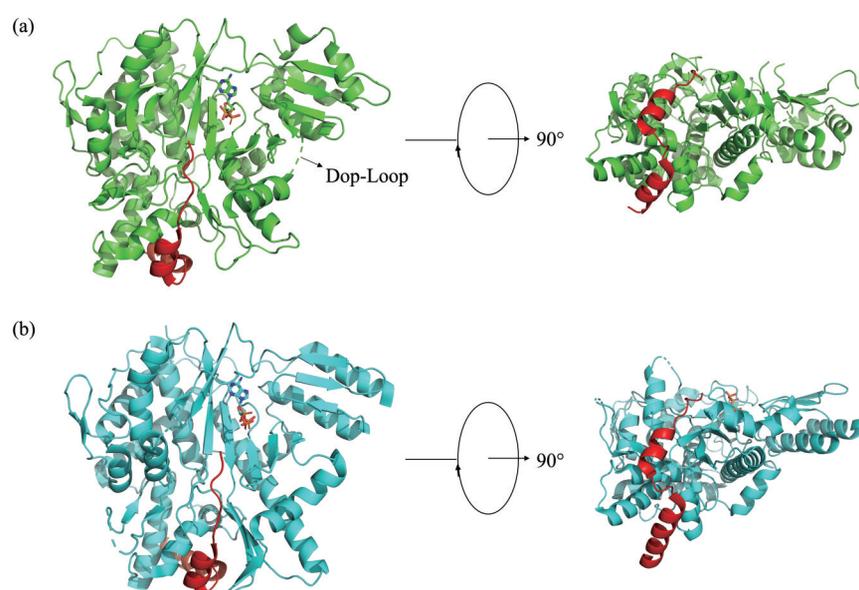


Fig. 4 Crystal structures of the Dop-PupQ and PafA-PupE complexes

图4 Dop-PupQ和PafA-PupE复合物的晶体结构

(a) Dop结合ADP和PupQ (37~64)的晶体结构图(绿色为Dop, 红色为PupQ₃₇₋₆₄, 球棍结构为ADP), PDB ID: 7OYH; (b) PafA结合ATP和PupE (32~64)的晶体结构图(青色为PafA, 红色为PupE₃₂₋₆₄, 球棍结构为ATP), PDB ID: 4BJR。

1.2 Pup化蛋白质的降解

真核生物 26S 蛋白酶体是一个多亚基复合体，负责胞浆和细胞核中的蛋白质降解。26S 蛋白酶体可分为两个亚复合物：19S 调控粒子（regulatory particle, RP）和 20S 核心粒子（core particle, CP）^[28]。20S CP 是由 4 个堆叠的七聚环（ $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ ）组成的桶形复合体，其中 α 亚基和 β 亚基均是 7 种不同的类型^[29]。原核生物的蛋白酶体 20S 核心颗粒与真核生物相似，也是由四个堆叠环组成的桶状

结构^[30]。两个外环是由 7 个相同的 α 亚基组成的复合体，提供了底物传递的入口；两个内环是由 7 个相同的 β 亚基组成的复合体，形成了蛋白酶体的活性位点^[5]。在组装的过程中， α 亚基和 β 亚基先组成半蛋白酶体，两个半蛋白酶体之间的 β 亚基和 β 亚基再相互连接，同时进行自催化加工^[15, 31]， β 亚基的 N 端前肽通过自我裂解，暴露出具有催化作用的亲核攻击位点苏氨酸（threonine, Thr），Thr 在全蛋白酶体中为催化残基^[32]。大部分原核生物的

20S CP 只有糜蛋白酶活性, 但 *Mtb* 20S CP 同时具有酸性蛋白酶、胰蛋白酶和糜蛋白酶活性^[33]。分枝杆菌 20S CP 的 α 亚基 N 端延伸部分由几个疏水残基组成, 在七倍体对称轴的中心相互堆叠, 以封闭 20S CP 入口从而形成了有序的门控通道, 阻止底物自由进入蛋白酶体中心区域^[15, 33]。

原核生物的蛋白酶体中不存在 19S RP, 在分枝杆菌中 Mpa 作为蛋白酶体 ATP 酶, 发挥类似于真核生物中 19S RP 的功能^[12, 34]。Mpa 负责将 Pup 化的靶蛋白解折叠成无序结构并协助其进入蛋白酶体中降解。Mpa 由以下 4 个结构域组成——N 端卷曲螺旋结构域 (N-terminal coiled-coil domain)、结构域间结构域 (interdomain)、ATP 酶结构域 (ATPase domain) 和 C 端结构域 (C-terminal domain), 这些结构域在组装的六聚体中形成通道^[12]。在通道入口的顶部, Mpa 六聚体 N 端的六个 α 螺旋形成了三对卷曲螺旋结构域, 此结构域的主要功能是识别及结合 Pup^[12]。Pup 序列中负责与 Mpa 结合的部分位于其 21~58 位氨基酸 (图 3)^[19, 35]。Pup-Mpa 复合物的晶体结构表明, Pup 与从 Mpa 表面延伸的 N 端卷曲螺旋结构域结合后获得螺旋构象, 两者共同形成一个盘绕线圈环^[11]。Pup 螺旋与 Mpa 螺旋线圈对齐, 使 Pup 的柔性 N 端向下定位到 Mpa 的中心通道, 促使底物进入 Mpa 中解折叠并进而被蛋白酶体降解^[36]。Mpa 的结构域间含有两个寡糖/寡核苷酸结合折叠 (oligosaccharide/olionucleotide binding fold, OB) 的子域, OB 的功能是促进六聚体的组装和稳定性^[12]。Mpa 的 ATP 酶结构域负责 Pup 化底物的解折叠, 该结构域包含一个保守的芳香族疏水甘氨酸的 Loop 结构, 延伸到 Mpa 的通道中并与底物直接接触^[12, 37-38], 通过上下移动的拉力导致底物解折叠^[2, 12], 这一过程是由 ATP 水解驱动的。C 端结构域的甘氨酸-谷氨酸-酪氨酸-亮氨酸 (glycine-glutamine-tyrosine-leucine, GQYL) 基序能够堆叠到蛋白酶体 20S CP 的主环结构上, 与 20S CP 中的 α 亚基相互作用, 使门控通道得以开放, 蛋白酶体得以激活从而进一步完成靶蛋白的降解^[39]。

细菌 Pup 化蛋白质降解过程中 Pup 是否被回收仍然存在争议。由于 Pup 介导靶蛋白进入 20S CP, 因此普遍认为 Pup 标签被降解而不是再循环利用。蛋白酶体的生化分析实验中能够鉴定出 Pup 衍生降解片段, 这一现象支持了上面的假设^[18]。然而对 *Mtb* 和 *Msm* 中 Pup 化蛋白质的体内降解研究表明,

Pup 可以逃脱降解并通过 Dop 的去 Pup 化活性进入下一轮循环^[40]。同时 PPS 的动力学模拟实验表明, 细菌体内确实发生了 Pup 的回收, 以维持 PPS 的稳定和可控运行^[40]。Zerbib 等^[41]的研究发现, Pup 可以被细菌的蛋白酶体降解, 但它缺乏有利的 20S CP 切割位点, 因此蛋白酶体对游离 Pup 的降解能力比对 Pup 化蛋白质的降解能力差。Zerbib 等^[41]还证明, 在 Pup 化蛋白降解的过程中, Pup 可以逃脱被降解的命运并保持与降解片段的结合, 通过 Dop 的去 Pup 化作用使降解片段上的 Pup 解离并再循环利用。Pup 再循环使得 PPS 受到蛋白酶体的反馈调控, 从而使靶蛋白 Pup 化和降解的这一过程维持在稳态水平^[40]。

2 Pup 化的靶蛋白及其识别机制

鉴定 Pup 化的靶蛋白对认识 PPS 的生物学功能具有重要的意义。目前人们通过质谱方法已经对 *Msm* 和 *Mtb* 中的 Pup 化蛋白质进行了鉴定, 称之为 Pup 化蛋白质组 (PUPylome), 同时采用多种方法识别和预测蛋白质的 Pup 化位点^[42-45]。Festa 等^[46]分析了 *Mtb* 中蛋白质的 Pup 化, 使用串联质谱 (MS/MS) 技术鉴定了 604 种蛋白质, 占 *Mtb* H37Rv 菌株总预测蛋白质组的 15%, 其中检测到存在 Pup 化修饰的蛋白质共 55 个, 并确认了 Pup 化位点。在 55 个具有可识别 Pup 化位点的蛋白质中, 大多数只有一个 Pup 化位点。仅有 3 个蛋白质是例外, 其中 3-酮酰载体蛋白还原酶 (3-ketoacyl carrier protein reductase, FabG4) 和细菌铁蛋白共迁移蛋白 (bacterioferritin co-migratory protein, Bcp) 有两个 Pup 化位点, 晶体蛋白同源物 (α crystallin homologue, HspX) 的 8 个 Lys 中的 4 个可以被 Pup 化。Pup 化过程发生在靶蛋白的 Lys, 靶蛋白中 Lys 的修饰位置没有表现出偏好的特定区域 (例如 N 或 C 端), 并且在修饰的 Lys 附近没有发现明显的保守基序。

Watrous 等^[47]分析了 *Msm* 的 Pup 化蛋白, 使用液相色谱-质谱/质谱联用 (LC-MS/MS) 技术共鉴定了 245 种蛋白质, 其中 52 种蛋白质被证实具有与 Pup 化相对应的特征性 +243 u 修饰的赖氨酸, 同时发现 103 个候选 Pup 化靶点和 52 个确认的 Pup 化靶点。在 52 个已确认的 Pup 化蛋白质中, 只有一种 [Mn] 超氧化物歧化酶具有多个 Pup 化位点, 其他蛋白质均具有一个 Pup 化位点。对这些靶点的进一步分析显示, 在 Pup 化位点处既没有一级序列

中特定的识别基序,也没有二级结构相似性^[47]。在另一项研究中,Poulsen等^[48]在*Msm*中确定了41个Pup蛋白靶点。在确定的41个靶点中,MSMEG_0643、MSMEG_5258和MSMEG_5335被发现是*Msm*独有的,在*Mtb*中没有相应的同源蛋白。

上述对分枝杆菌中Pup化蛋白组的研究,都是在正常培养条件下进行的。在正常条件下,发生Pup化修饰的蛋白质主要分为中间代谢、脂质代谢、信息通路、细胞壁和细胞膜相关、解毒/毒力、调节因子等7类^[49]。其中“中间代谢”、“脂质代谢”和“解毒/毒力”三类蛋白质的成员较多。解毒/毒力蛋白包括伴侣蛋白GroES、GroEL1和GroEL2,其中GroES和GroEL2的Pup化位点已经被确定^[46]。Pup化的靶蛋白参与许多对细胞快速生长至关重要的途径,如糖酵解、糖异生、氨基酸和分枝菌酸合成以及翻译。PPS中的关键成员PafA、Dop、Mpa也可以被Pup化^[8, 46, 50-51],表明PPS具有自我反馈抑制的调节机制。

已经鉴定的Pup化主要形式是连接在底物Lys ϵ -NH₂上的单Pup化,到目前为止没有关于除Lys以外其他Pup化位点的报道。有的底物能在多个位点发生单Pup化,例如*Mtb*中的FabG4和Bcp都有两个Pup化位点,HspX中8个Lys中的4个可以被Pup化^[46]。Pup含有几个保守的赖氨酸残基(K7、K31和K61),这些位点的Pup化可以形成多聚Pup化链^[52]。Regev等^[53]发现,在体外Pup可以以单体形式或多聚Pup链的形式与PafA相互作用,然而相较于单体形式而言,PafA对带有多聚Pup链的亲和力低得多,这为体内Pup主要以单体而非以多聚Pup链的形式修饰靶蛋白提供了依据。本课题组的研究发现,PafA可以利用其特有的自催化方式发生多Pup化,这也是目前关于蛋白质多Pup化的唯一例证(详见下文)。大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)中没有PPS,Cerda-Maira等^[54]通过在*E. coli*中共表达PafA和PupE重建Pup化系统,蛋白质组学分析*E. coli*的Pup化蛋白组,鉴定了400多种蛋白质,其中51种蛋白质检测到有Pup化修饰位点,靶蛋白中有一个或多个赖氨酸位点被Pup化。一些在*Mtb*中具有同源物的*E. coli*蛋白质如AdhC、Adk、ProS、GroL和SodB是Pup化的靶蛋白^[51],但是在*E. coli*和分枝杆菌中的Pup化位点并不一致^[46]。此外,对这些蛋白质比对分析没有发现赖氨酸修饰位点附近存在一致的识别序列。

在真核生物中,有600多种泛素连接酶E3决定底物特异性,而分枝杆菌中只有一种连接酶PafA,通过其保守凹槽中的活性位点催化Pup与目标蛋白质的赖氨酸侧链形成异肽链。分枝杆菌的PUPylome研究表明,PafA能够使多种靶蛋白Pup化,同时Pup-蛋白酶体通路又具有一定的底物特异性。虽然在分枝杆菌中尚未发现显著的Pup化位点识别序列^[2],但这种底物特异性可能与三维结构对底物位点的识别有关。底物蛋白可能需要某些额外的化学特征,例如电荷的局部变化、磷酸化、氧化、错误折叠,甚至其他蛋白伴侣,来协助它们进行Pup化。*E. coli*不具有PPS,在*E. coli*中重建该系统时,PafA仍然具有识别多种底物蛋白的能力,因此PafA对底物的选择并不依赖于某种分枝杆菌中特殊的辅助因素。Regev等^[55]的研究认为,在催化蛋白Pup化时位于PafA活性位点边缘由A196~E209构成的延伸环在与底物蛋白结合中起着重要作用。Yoo等^[56]的研究发现,Dop N端结构域中存在而在PafA N端结构域缺失的无序环——Dop Loop与去Pup化的底物选择有关。目前,对于蛋白质Pup化和去Pup化的底物特异性,特别是其时空选择机制尚缺乏深入的了解,有待进一步的研究。

3 Pup-蛋白酶体系统的调控机制

Pearce等^[57]发现*Mtb*体内Mpa的水平受到PPS的调控,其后Festa等^[46]在*Mtb*的Pup化蛋白组学研究中证明Mpa确实是体内Pup化底物。Delley等^[58]进一步研究了Mpa的Pup化机制,发现Mpa的Pup化为单Pup化形式,Pup化位点为Mpa中保守的K591。Pup化修饰的Mpa不能再形成六聚体,解折叠及介导底物降解的活性都丧失,但是Pup化的Mpa可以被Dop去Pup化后恢复活性,说明Pup化能可逆地调控Mpa,这是一种控制细胞内蛋白酶体降解速率、维持蛋白质稳态的重要机制。

Pup含有几个保守的赖氨酸残基(K7、K31和K61),以Pup自身的赖氨酸为靶点,在PafA作用下可以形成多聚Pup化链^[53]。Alhuwaidar等^[52]发现多聚Pup链无论是以游离的形式还是附着于靶蛋白上均可以抑制蛋白酶体的功能。这种抑制是由多聚Pup化链直接与Mpa的N端螺旋卷曲结构域相互作用引起的。多聚Pup链交叉连接Mpa六聚体的两个或多个N端螺旋卷曲结构域,阻止底物通过Mpa

孔进入蛋白酶体 20S CP 中, 从而阻止底物降解。因此, 多聚 Pup 化底物以及多聚 Pup 链可以反馈抑制蛋白酶体活性。本课题组^[59]的研究发现, PafA 以一种特有的机制发生多 Pup 化。首先, 一个 PafA 以分子间方式催化另一个 PafA 的单 Pup 化, 然后已经 Pup 化的 PafA 以分子内方式催化与自身连接的 Pup 发生 Pup 化, 从而形成多聚 Pup 链。在 *Msm* Pup 中的三个赖氨酸残基 K7、K31 和 K61 中, K7 和 K31 参与 PafA 多聚 Pup 化过程。Alhuwaider 等^[52]发现 PafA 的自 Pup 化仅在缺乏底物的情况下发生, 从而抑制 PafA 的连接酶活性。在缺乏靶蛋白的情况下, PafA 通过自 Pup 化抑制其连接酶活性; 当靶蛋白变得充足时, 多 Pup 化的 PafA 通过 Dop 被去 Pup 化, 产生游离 PupE 和连接酶 PafA。因此, PafA 的自 Pup 化是一种 PPS 的反馈调控机制, 参与维持胞内蛋白质的稳态。

Dop 和 PafA 蛋白同源性非常高, 同属羧基连接酶超家族。PafA 能发生自 Pup 化, Dop 与 PafA 结构类似, 也可能是 Pup 化的底物。Elharar 等^[60]报道, 在营养缺陷时 Dop 与 PafA 和 Mpa 一致, 也会发生蛋白质水平的动态变化, 因此认为 Dop 也是经由蛋白酶体降解的。Dop 的 Pup 化主要是单 Pup 化的方式, 但因为 Dop 有去 Pup 化酶活性, 可能使单 Pup 化形式的 Dop 去 Pup 化, 因此在体外很难检测到 Dop 的 Pup 化。本课题组使用活性中心突变的 Dop (E8A), 在体外 Pup 化系统中与 PupE、PafA 和 ATP 共同孵育, 发现 Dop (E8A) 可以被 Pup 化, 质谱检测发现 Pup 化的位点在 K445 位^[61]。

4 Pup-蛋白酶体系统的生物学功能

在分枝杆菌和其他放线菌中 Pup-蛋白酶体系统参与应对多种应激条件, 如一氧化氮 (nitric oxide, NO) 敏感性、氧化应激、营养缺乏、DNA 损伤、热应激等, 并在金属离子稳态调控、毒素-抗毒素 (toxin-antitoxin, TA) 系统的调节等过程中发挥作用 (表 1)。

4.1 调控 NO 敏感性和氧化应激

Mtb 侵入人体后在肺部会被巨噬细胞和树突状细胞吞噬^[62], 控制 *Mtb* 感染的一个重要途径是激活的宿主巨噬细胞通过诱导型一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 的活性产生一氧化氮, 以及通过超氧化物生成酶 (NOX2) 产生活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS)^[63]。在吞噬体内, NO 导致亚硝酸盐的产生, 亚硝酸盐可

以质子化, 并产生自由基形式的一氧化氮和其他氮中间体, 它们和活性氧一起破坏 DNA、脂质和蛋白质以抑制微生物生长^[64]。

Darwin 等^[50]利用转座子突变来筛查 *Mtb* 中活性氮中间体抗性相关的基因, 发现 PPS 相关基因在亚硝化应激存活中发挥作用。Mpa 和 PafA 的缺失会导致 *Mtb* 对酸化亚硝酸盐的敏感性增加, 减弱了 *Mtb* 的毒力。此外, *dop* 和 *prcBA* 基因敲除也会减弱 *Mtb* 的毒性^[65]。Gandotra 等^[66]发现, 蛋白酶体的活性位点 Thr 突变后, 不影响 *Mtb* 的存活能力, 但影响 *Mtb* 在宿主体内的滞留。由此可见, PPS 在 *Mtb* 的滞留性和毒力方面起着重要的作用。

PPS 也参与氧化应激过程^[67]。研究发现, 与野生型天蓝色链霉菌菌株相比, Δprc 、 $\Delta pafA$ 菌株对过氧化氢等氧化应激具有较高的敏感性^[68]。在多色链球菌中的研究也发现, ARC、Dop、Pup 和蛋白酶体敲除的突变体对过氧化氢异丙苯的抗性均降低。麦角硫醇可清除羟基自由基并解毒过氧亚硝酸盐^[69], 研究表明 PPS 可以通过调控麦角硫苷生物合成的过程在氧化应激中发挥作用, 有利于巨噬细胞中的 *Mtb* 存活。

4.2 参与营养缺乏应激

4.2.1 氮缺乏

氮代谢的调节旨在确保充足的氮供应, 并对氮限制等环境变化做出快速反应。已知在真核生物中蛋白酶体可以降解体内变性或错误折叠的蛋白质, 从而为氨基酸循环提供原材料, 有助于细胞内的营养稳态^[70-71]。在氮缺乏条件下, *Msm* 中的 PPS 也有类似的作用^[72-73]。Elharar 等^[60]发现在氮限制条件下, *pup* 和 *prcBA* 敲除的 *Msm* 菌株表现出比野生型菌株更严重的生长缺陷。他们还发现, 氮缺乏会诱导 *Msm* 中 PPS 的活性, 加速许多胞质蛋白的 Pup 标记和蛋白酶体降解^[60]。因此推测在氮缺乏期间, 当不能通过从头合成或从环境中获得氨基酸时, PPS 通过降解体内非必需的蛋白质分子, 为细菌的氨基酸循环途径提供所需的原料。此外, *Msm* 中的 PPS 还通过调节参与氮同化途径的酶水平, 在氮饥饿过程中发挥更具体的作用^[74]。PPS 基因座也能通过间接影响蛋白质量控制途径的转录来调控氮代谢网络^[75]。

4.2.2 碳饥饿

放线菌的 Cdc48 样蛋白 (Cdc48-like protein of *Actinobacteria*, Cpa) 是一种六聚体 ATP 酶, 类似 Mpa, 在体外与 20S CP 和各种辅因子协同参与多

种生物过程^[76]。*Cpa* 基因敲除的 *Msm* 菌株在碳饥饿条件下可观察到轻微的表型，这表明 *Cpa* 可能与碳限制的应激条件有关^[77]。比较蛋白质组学分析表明，在应激条件下 *Cpa* 基因敲除的 *Msm* 与野生型菌株相比参与翻译和核糖体合成的蛋白质显著积累^[77]。因此，在营养有限的条件下 *Cpa* 可能与 20S CP 结合在核糖体蛋白的分解和去除中发挥作用，为细菌提供碳循环所需的原料。然而，目前缺乏生化数据来证明这一假设，需要更多的研究来支持这个观点。

4.3 参与DNA损伤修复

PPS 在分枝杆菌的 DNA 损伤修复中起作用。分枝杆菌具有两种 DNA 损伤反应途径——依赖 LexA/RecA 的 SOS 反应和不依赖 LexA/RecA 的途径。Müller 等^[78] 发现，在 PPS 基因座中编码的蛋白酶体辅助因子 B 和 C (PafBC) 是主要的 LexA/RecA 独立途径的转录调节因子。它作为分枝杆菌 DNA 损伤反应的主要调节器，上调大多数 DNA 修复基因。Müller 等^[78] 还利用丝裂霉素 C 诱导 *Msm* 的 DNA 损伤应激，通过对 PUPylome 进行测定，发现包括 RecA 在内的 26 个受 PafBC 调控的 DNA 损伤反应蛋白为 Pup 化靶蛋白。对丝裂霉素 C 暴露期间和去除 DNA 损伤试剂后恢复阶段 RecA 蛋白水平的分析表明，缺乏 Pup 化或蛋白酶体降解的 *Msm* 菌株不能将 RecA 恢复到应激前水平^[78]。推测在恢复正常条件后，RecA 与其他几个受 PafBC 调控的 DNA 修复蛋白（如 EgtD、TopoN、IscS、RuvA 等）被 PPS 降解，得以从 DNA 损伤中完全恢复^[78]。因此 PPS 能与 PafBC 转录激活剂协同作用来去除 DNA 修复蛋白从而使 *Msm* 从 DNA 损伤中恢复到正常状态。

4.4 参与金属离子稳态调控

4.4.1 铁缺乏

铁离子是最丰富的辅因子之一，存在于多种酶中，在氨基酸和嘧啶生物合成、三羧酸循环、电子传递以及核酸合成等过程中发挥作用^[79-80]。细胞内的铁稳态受到严格调控，胞浆中多余的铁离子以氧化铁的形式储存在铁储存蛋白——细菌铁蛋白 (bacterioferritin, Ftn) 中。细菌铁蛋白是一种能容纳 4 500 个铁原子的同型 24 聚笼^[81]。当游离铁水平受到限制时，铁离子可以从细菌铁蛋白中释放出来，以确保以铁离子作为辅因子的酶的活性。研究表明，Ftn 被确定为 Pup 化靶点，铁限制下铁储备的动员与 Pup 化有关^[82]。Küberl 等^[82-83] 发现，谷

氨酸棒状杆菌 Pup、PafA 和 Dop 敲除菌株在铁限制培养基中表现出生长缺陷。由于谷氨酸棒状杆菌缺乏蛋白酶体亚单位，因此 Ftn 中铁释放不依赖于蛋白酶体的降解。Küberl 等^[82] 提出 Pup 化的 Ftn 通过 ARC 解折叠，导致 24 聚体的解体和铁的释放。然后，Pup 化的 Ftn 通过 Dop 的去 Pup 作用产生单体铁蛋白，从而进入新的铁寡聚化和储存的循环。此外，在 Pup 敲除菌株中，铁依赖性蛋白的 mRNA 水平显著降低，这表明 Ftn 的 Pup 化也通过其他方式间接参与了铁稳态的调节。

4.4.2 铜稳态

铜是生物体中另一种必需的微量元素，作为辅助因子维持酶的活性，参与电子传递、反硝化和氧化呼吸等反应过程^[84]。然而，由于活性氧的产生使得铜在高浓度下是有毒的，因此需要严格调控铜的稳态^[85]。宿主巨噬细胞防御分枝杆菌感染的机制之一是吞噬体内铜的积累^[86]。Festa 等^[87] 通过转录筛选首次将 PPS 与铜稳态联系起来。他们将 *pafA* 或 *mpa* 基因敲除的 *Mtb* 突变株与野生型进行比较，发现 *pafA* 或 *mpa* 基因的敲除使得铜感应阻遏物 RicR 转录水平下调^[87-88]。因此，PPS 通过调控铜稳态促进 *Mtb* 的毒力。

4.5 参与热应激

细菌具有复杂的调节机制，可以诱导热休克伴侣的表达，从而在热应激期间促进蛋白质正确折叠，快速适应这种应激环境^[89]。细菌胞质中的两个主要伴侣机制是 GroEL/GroES 和 DnaKJ/GrpE 伴侣系统，在 *Mtb* 中有两个 groEL 基因座 (Rv0440 和 Rv3417c)，均由阻遏子 HrcA 控制^[90]，HrcA 则是一个 Pup 化靶蛋白。还有研究表明，由细菌蛋白酶体与不依赖 ATP 的细菌蛋白酶体激活剂 (bacterial proteasome activator, Bpa) 形成的替代降解复合物参与 *Mtb* 中 DnaK 操纵子的调节^[91-92]。在分枝杆菌中，*dnaK* 基因的转录由热休克抑制因子 HspR 控制^[90]。在正常情况下，HspR 与 DnaK 结合，以抑制 DnaK、其辅伴侣 DnaJ、交换因子 GrpE 和 HspR 本身的表达^[93]。在热休克条件下，HspR 与 DnaK 分离，Pup 化的 HspR 被 Bpa 招募从而在蛋白酶体中被降解^[92]，而热休克伴侣得以表达^[94-95]，从而有利于细菌生存。Jastrab 等^[92] 也发现，当在 45°C 生长时，*bpa* 敲除的 *Mtb* 菌株表现出热敏感表型。因此 Bpa 通过介导蛋白酶体降解 HspR 来调节热休克反应，参与热应激条件下 *Mtb* 的生长调控。

4.6 参与毒素-抗毒素 (TA) 系统的调节

TA 系统是大多数原核基因组中的应激反应因子, 它是由两个相互邻近的基因构成的二元操纵子, 抗毒素基因位于毒素基因的上游, 毒素蛋白的表达抑制细菌的生长, 抗毒素蛋白与毒素蛋白结合, 抑制毒素蛋白的毒性作用。在一些外界应激条件下 (如环境压力、质粒丢失或噬菌体感染), 不稳定的抗毒素蛋白易被降解, 游离的毒素蛋白可以通过抑制 DNA 复制或切割 mRNA 阻断蛋白合成等作用方式抑制细菌的生长 [96]。TA 系统引起的生长抑制通常是可逆的, 随着新抗毒素的合成或毒素的降解或压力条件释放, 细菌恢复正常生长状态。

多项研究表明 PPS 参与 TA 系统的调节。Festa 等 [46] 对标准实验室培养条件下的 *Mtb* 的 PUPylome 鉴定表明, Rv2035、DarT、PhoH2、VapC17 和 VapC31 等五种毒素蛋白以及 VapB51 抗毒素蛋白可以被 Pup 化。对 *E. coli* 中共表达 PafA 和 PupE 重建 Pup 化系统的 PUPylome 检测表明, VapC4 毒素以

及 MazE9 抗毒素也可以被 Pup 化 [54]。此外, *Msm* 的抗毒素 VapB 被证明受到 PafBC 的调控, 因此推测 PafBC 与 TA 系统之间也存在着联系 [78]。除此之外, 由于生长条件会使 Pup 化蛋白的丰度发生改变, 因此在某些应激压力下可能会有更多的抗毒素被 Pup 化, 从而调节分枝杆菌生长以适应外界环境 [97]。本实验室在 *Mtb* H37Rv 染色体中发现了一个新的 TA 系统, 称为 mt PemIK, 它由抗毒素 mt PemI 和毒素 mt PemK (Rv3098A) 组成 [97]。我们的研究发现 mt-PemK 可以通过 Pup 化修饰以调节其自身的稳定性。其他几种 TA 蛋白 Rv2801a-Rv2801c TA 系统中的抗毒素蛋白 Rv2801a 也被确定为潜在的 Pup 化靶蛋白 [97]。这些结果表明, Pup 蛋白酶体系统参与 TA 系统的调节, 可能通过调控 TA 系统的剂量关系, 进而抑制或激活毒素蛋白的功能, 参与应激条件下 *Mtb* 的生长调控, 这为结核病的防治提供了新思路。

Table 1 Biological functions of the Pup-proteasome system

表1 Pup-蛋白酶体系统的生物学功能

功能	作用机制	参考文献
调控NO敏感性	PPS相关基因在活性氮中间体应激存活中发挥重要作用	[50, 55, 61-66]
调控氧化应激	PPS相关基因与对抗氧化应激有关	[67-69]
参与营养缺乏应激——氮缺乏	在氮缺乏期间, PPS可能通过降解体内无用的生物大分子为细菌的氨基酸循环途径提供所需的蛋白质构建模块	[60, 70-75]
参与营养缺乏应激——碳饥饿	Cpa与碳缺乏的应激条件有关, 可能与20S CP在核糖体蛋白的分解和去除中发挥作用	[76-77]
参与DNA损伤修复	PPS能与PafBC转录激活剂协同作用去除DNA损伤修复蛋白, 从而使 <i>Msm</i> 在完成DNA损伤修复后及时恢复到正常状态	[78]
参与金属离子稳态调控——铁缺乏	铁限制下铁储备的动员取决于Pup化, Pup化的细菌铁蛋白可能通过ARC解折叠, 导致24聚体的解体和铁的释放; Pup化的铁蛋白单体通过Dop去Pup化, 回收进入一个新的铁寡聚化和储存的循环	[79-83]
参与金属离子稳态调控——铜稳态	PPS相关基因与铜稳态的调节密切相关	[84-88]
参与热应激	Bpa通过介导蛋白酶体降解HspR调节热休克反应, 参与热应激条件下 <i>Mtb</i> 的生长调控	[89-95]
参与毒素-抗毒素 (TA) 系统的调节	PPS参与TA系统的调节, 通过调控毒素-抗毒素系统的剂量关系, 进而抑制或激活毒素蛋白的功能, 参与应激条件下 <i>Mtb</i> 的生长调控	[46, 54, 76, 96-97]

5 Pup-蛋白酶体系统在生物技术研发中的应用

5.1 Pup-蛋白酶体系统抑制剂的研发

尽管抗生素治疗显著降低了结核病对人群的影响, 但耐药菌株的存在和传播迫切需要开发靶向 *Mtb* 的新药。PPS 是 *Mtb* 和相关菌属特有的, 对

Mtb 致病性至关重要, 因此它是抗结核药物研发的一个新靶标。

作为 PPS 中唯一的 Pup 连接酶, PafA 是一个有吸引力的药物靶点。Jiang 等 [98] 发现, 当丝氨酸蛋白酶抑制剂 4-(2-氨基乙基) 苯磺酰氟与 PafA 中 119 位的丝氨酸 (serine 119, S119) 结合时, PafA 的活性被显著抑制 [98]。结构分析表明, 尽管 S119

距离 PafA 催化位点较远, 但它位于 PafA 结合 PupE C 末端的凹槽中的关键位置。因此 S119 是 PafA 抑制剂的潜在靶点。Li 等^[99] 通过建立高通量筛选技术, 发现了两种 PafA 抑制剂——ST1926 和硫双二氯酚。ST1926 通过与 *Mtb*-PafA 保守凹槽中的非保守残基结合起到抑制的作用, 硫双二氯酚能够结合 PafA 的 ATP 结合位点从而竞争性抑制 PafA 的活性。

Janssen 等^[100] 开发了一种荧光分析试剂, 用于在体外探测 Dop 的活性, 并通过高通量手段筛选靶向 Dop 的小分子抑制剂。该试剂基于制备的截短 PupE (Pup₃₃₋₆₃), 其末端 Glu 通过其 γ 羧酸盐连接 7-氨基-4-甲基香豆素 (7-amino-4-methyl coumarin, AMC)。Dop 使 Glu-AMC 酰胺键断裂并将 AMC 释放, 产生荧光信号。利用该系统已经筛选了几种有效的 Dop 抑制剂, 能够在体外抑制 Dop 的去 Pup 化活性^[100]。

Pup 和 Mpa 之间的相互作用是 PPS 的关键环节之一。DeMott 等^[101] 将细胞内核磁共振技术用于筛选阻断 Pup 和 Mpa 之间相互作用的药物。他们从 NCI Diversity set III (<http://dtp.cancer.gov>) 文库中分离出 3 个化合物——MTBA、MTBB 和 MTBC, 这 3 种化合物能够影响 Pup 与 Mpa 的相互作用, 从而抑制 Pup 化的蛋白质经由蛋白酶体降解, 导致分枝杆菌在一氧化氮胁迫条件下死亡, 而且这 3 种化合物对哺乳动物细胞的毒性低, 对分枝杆菌的作用效力与目前市场上现有的抗生素相当, 在微摩尔剂量水平就可以抑制分枝杆菌的生长^[101]。

Mtb 的蛋白酶体也是药物开发的靶点之一, 如何利用 *Mtb* 和哺乳动物蛋白酶体之间的生化和结构差异来寻找物种选择性蛋白酶体抑制剂是关键问题。Zhang 等^[102] 发现大环肽 (macrocyclic peptides) 是一种有效的选择性靶向 *Mtb* 20S 的抑制剂。大环肽能剂量依赖性抑制 *Mtb* 内的 20S 使得 Pup 化蛋白质积累, 在亚硝化应激下导致非复制性 *Mtb* 的死亡。最重要的是, 大环肽对人肝癌细胞 (HepG2) 没有明显的细胞毒性, 这表明它作为 *Mtb* 选择性蛋白酶体抑制剂具有良好的安全性, 是十分有潜力的抗结核药物开发靶点。除此之外, 补骨脂素衍生物 (psoralen derivatives)、苯基咪唑衍生物 (phenylimidazole derivatives) 等均在低微摩尔浓度下显示出对 *Mtb* 蛋白酶体的抑制效力^[103-105]。

综上所述, 作为 *Mtb* PPS 中的关键组分, PafA、Dop 和蛋白酶体均是抗结核药物研发的新靶

点, 鉴定和筛选以 PPS 系统为靶向的小分子抑制剂是研发新型抗结核药物的重要手段。

5.2 基于蛋白质 Pup 化的生物技术研发

邻近标记技术是一种用于研究蛋白质-蛋白质、蛋白质-RNA 和蛋白质-DNA 相互作用的时间和空间精度的高通量方法^[106]。对 PafA 介导蛋白质 Pup 化修饰机制的研究表明, 该反应具有邻近标记特性, 即 PafA 可以催化其邻近空间范围内蛋白质上赖氨酸 ϵ 氨基的 Pup 化修饰。Liu 等^[107] 开发了基于 Pup 化的邻近标记技术 (pupylation-based interaction tagging, PUP-IT), 用于研究蛋白质相互作用。该方法将 PafA 与诱饵蛋白进行融合, PafA 会将 PupE 连接到与诱饵相互作用靶蛋白的赖氨酸上, 结合质谱分析可以检测蛋白质之间短暂和微弱的相互作用。他们将 PUP-IT 应用于 T 淋巴细胞活化的关键共刺激受体——CD28, 验证了已知的 CD28 结合蛋白, 并发现了多种潜在的 CD28 互作蛋白^[107]。他们还进一步将 PUP-IT 应用于细胞外蛋白——细胞因子 IL-2 上, 证明该方法可以用于细胞表面受体与其配体之间的互作研究。Zheng 等^[108] 利用 PUP-IT 技术系统地鉴定了线粒体相关泛素连接酶——MARCH5 的互作蛋白, 发现 MARCH5 也可以定位于过氧化物酶体, 参与调控过氧化物酶体自噬。

在另一项研究中, Zhang 等^[109] 将 PUP-IT 与 CRISPR-Cas13 系统相结合, 开发了一种新的工具——基于 CRISPR 的 RNA 联合相互作用系统 (CRISPR-based RNA-united interacting system, CRUIS), 用于检测活细胞中的 RNA-蛋白质相互作用。在 CRUIS 中, dCas13a 被用作靶向特定 RNA 的追踪器, 将 PafA 与 dCas13a 融合可以使邻近区域与该 RNA 结合的蛋白质被 Pup 标记, 继而通过质谱鉴定这些 RNA 结合蛋白。CRUIS 的使用有助于研究自然状态中 RNA 与蛋白质的相互作用, 为 RNA 生物学提供了新的技术手段。

最近, Xie 等^[110] 对 PUP-IT 进行了改进, 将 PafA 连接酶与连接蛋白 26 (connexin 26, CX26) 融合, 发现 Pup 可以无创、高效地映射和标记小鼠新皮质中含有 CX26-PafA 的电突触中的邻近蛋白质。他们应用 PUP-IT 标记揭示电突触的空间亚细胞定位, 并探讨其在发育过程中的生理功能。因此, PUP-IT 也是探测复杂神经系统电突触模式的有力工具, 对瞬时受体和离子通道的研究也有很大的潜力。

PUP-IT 具有独特的催化机制, 由于激活的 Pup 蛋白不能远离 PafA 进行自由扩散, 因此标记半径有限, 这也表明 PUP-IT 可能具有更干净的标签背景。尽管 PafA 及 Pup 本身不能穿过质膜, 经过特定的改造 PUP-IT 也可以成为研究细胞器内蛋白质互作的合适工具^[111-112]。PUP-IT 将是生命科学研究中具有应用发展潜力的邻近标记技术。

6 待解决的关键问题和展望

PPS 的发现开启了原核蛋白质修饰降解研究的新时期。依赖于蛋白酶体的蛋白质修饰降解以前被认为局限于真核生物中, 现在被证明以相似的方式存在于原核生物中。在过去的十几年中, 研究者们对原核生物 PPS 展开了深入的研究, 并取得了很大进展, 目前该领域还存在一些关键问题有待解决。

a. 蛋白质 Pup 化和去 Pup 化的底物识别及其时空调控机制。目前普遍认为, PafA 在体内识别底物可能不需要其他分枝杆菌特异性辅助因子, 且具有邻近标记特性, 但是已有的研究发现又表明蛋白质的 Pup 化修饰和去 Pup 化均存在一定的底物特异性。PafA 和 Dop 的底物识别机制, 特别如何具有时空特异性, 需要进一步的探究。

b. 蛋白质 Pup 化的生物学功能及其作用机制。通过介导靶蛋白的 Pup 化和经由蛋白酶体降解, PPS 参与氧化应激、营养缺乏应激、热激、DNA 损伤修复等多种应激反应过程。然而在没有蛋白酶体亚单位的谷氨酸棒状杆菌中, 铁缺乏的情况下 Pup 化的细菌铁蛋白能够通过 ARC 解折叠, 导致自身 24 聚体的解体和铁的释放, 来应对不良环境^[82]。蛋白质 Pup 化是否以这种非蛋白质降解的方式作用于其他蛋白质复合物还有待阐明。本课题组的研究发现分枝杆菌中多个 TA 系统成分可以被 Pup 化, Pup 蛋白酶体系统参与 TA 系统调节的机制和生物学意义还有待阐释。

c. 以 PPS 为靶点的抗结核药物研发。Mtb 感染导致的结核病给人类健康造成重大威胁, 而且 Mtb 对临床抗生素治疗产生了耐药性, PPS 将是一个有前景的抗结核新药开发靶点。目前已经筛选出一些以 PafA、Dop 和蛋白酶体为靶点的小分子抑制剂, 但是离临床试验还有很长的一段距离。

d. 基于 Pup-蛋白酶体系统的生物技术研发。基于 PafA 催化蛋白 Pup 化的邻近标记技术研发近期取得了一系列新的进展, 并在科研工作中得到了应用。今后将 PPS 与其他系统相结合, 在合成生物

学领域开展的新技术研发将令人关注。

参 考 文 献

- [1] Striebel F, Imkamp F, Özcelik D, *et al.* Pupylation as a signal for proteasomal degradation in bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 2014, **1843**(1):103-113
- [2] Samanovic M I, Li H, Darwin K H. The Pup-proteasome system of *Mycobacterium tuberculosis*. *Subcell Biochem*, 2013, **66**: 267-295
- [3] Tamura T, Nagy I, Lupas A, *et al.* The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*. *Curr Biol*, 1995, **5**: 766-774
- [4] Knipfer N, Shrader T E. Inactivation of the 20S proteasome in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol*, 1997, **25**: 375-383
- [5] Hu G, Lin G, Wang M, *et al.* Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome and mechanism of inhibition by a peptidyl boronate. *Mol Microbiol*, 2006, **59**(5):1417-28
- [6] Nagy I, Tamura T, Vanderleyden J, *et al.* The 20S proteasome of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 5448-5453
- [7] Pouch M N, Cournoyer B, Baumeister W. Characterization of the 20S proteasome from the actinomycete *Frankia*. *Mol Microbiol*, 2000, **35**: 368-377
- [8] Pearce M J, Mintseris J, Ferreyra J, *et al.* Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 2008, **322**(5904):1104-1107
- [9] Prathiviraj R, Chellapandi P. Deciphering molecular virulence mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* Dop isopeptidase based on its sequence-structure-function linkage. *Protein J*, 2020, **39**(1):33-45
- [10] Korman M, Schluskel S, Vishkautzan M, *et al.* Multiple layers of regulation determine the cellular levels of the Pup ligase PafA in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol*, 2019, **112**(2): 620-631
- [11] Breindel L, Burz D S, Shekhtman A. Active metabolism unmasks functional protein-protein interactions in real time in-cell NMR. *Commun Biol*, 2020, **3**(1): 249
- [12] Yin Y, Kovach A, Hsu H C, *et al.* The mycobacterial proteasomal ATPase Mpa forms a gapped ring to engage the 20S proteasome. *J Biol Chem*, 2021, **296**: 100713
- [13] Hecht N, Becher M, Korman M, *et al.* Inter- and intramolecular regulation of protein depupylation in *Mycobacterium smegmatis*. *FEBS J*, 2020, **287**(20): 4389-4400
- [14] Becker S H, Darwin K H. Bacterial proteasomes: mechanistic and functional insights. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016, **81**(1): e00036-16
- [15] Li D, Li H, Wang T, *et al.* Structural basis for the assembly and gate closure mechanisms of the *Mycobacterium tuberculosis* 20S proteasome. *EMBO J*, 2010, **29**(12): 2037-2047
- [16] Majumder P, Rudack T, Beck F, *et al.* Cryo-EM structures of the archaeal PAN-proteasome reveal an around-the-ring ATPase cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, **116**(2): 534-539
- [17] Burns K E, Pearce M J, Darwin K H. Prokaryotic ubiquitin-like protein provides a two-part degron to *Mycobacterium* proteasome substrates. *J Bacteriol*, 2010, **192**(11): 2933-2935

- [18] Striebel F, Hunkeler M, Summer H, *et al.* The mycobacterial Mpa-proteasome unfolds and degrades pupylated substrates by engaging Pup's N-terminus. *EMBO J*, 2010, **29**(7): 1262-1271
- [19] Sutter M, Striebel F, Damberger F F, *et al.* A distinct structural region of the prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) is recognized by the N-terminal domain of the proteasomal ATPase Mpa. *FEBS Lett*, 2009, **583**(19): 3151-3157
- [20] Barandun J, Delley C L, Ban N, *et al.* Crystal structure of the complex between prokaryotic ubiquitin-like protein and its ligase PafA. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(18): 6794-6797
- [21] Delley C L, Müller A U, Ziemski M, *et al.* Prokaryotic ubiquitin-like protein and its ligase/delignase enzymes. *J Mol Biol*, 2017, **429**(22): 3486-3499
- [22] Burns K E, McAllister F E, Schwerdtfeger C, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* prokaryotic ubiquitin-like protein-deconjugating enzyme is an unusual aspartate amidase. *J Biol Chem*, 2012, **287**(44): 37522-37529
- [23] Hecht N, Monteil C L, Perrière G, *et al.* Exploring protein space: from hydrolase to ligase by substitution. *Mol Biol Evol*, 2021, **38**(3): 761-776
- [24] Özcelik D, Barandun J, Schmitz N, *et al.* Structures of Pup ligase PafA and depupylase Dop from the prokaryotic ubiquitin-like modification pathway. *Nat Commun*, 2012, **3**: 1014
- [25] Hecht N, Regev O, Dovrat D, *et al.* Proteasome accessory factor A (PafA) transferase activity makes sense in the light of its homology with glutamine synthetase. *J Mol Biol*, 2018, **430**(5): 668-681
- [26] Ofer N, Forer N, Korman M, *et al.* Allosteric transitions direct protein tagging by PafA, the prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) ligase. *J Biol Chem*, 2013, **288**(16): 11287-11293
- [27] Cui H, Müller A U, Leibundgut M, *et al.* Structures of prokaryotic ubiquitin-like protein Pup in complex with depupylase Dop reveal the mechanism of catalytic phosphate formation. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 6635
- [28] Mendes M L, Dittmar G. Analysis of the dynamic proteasome structure by cross-linking mass spectrometry. *Biomolecules*, 2021, **11**(4): 505
- [29] Yu C, Wang X, Li W, *et al.* Developing a bimolecular affinity purification strategy to isolate 26S proteasome holocomplexes for complex-centric proteomic analysis. *Anal Chem*, 2021, **93**(39): 13407-13413
- [30] Itagi P, Kante A, Lagunes L, *et al.* Understanding the separation of timescales in bacterial proteasome core particle assembly. *Biophys J*, 2022, **121**(20): 3975-3986
- [31] Hammack L J, Panfair D, Kusmierczyk A R. A novel proteasome assembly intermediate bypasses the need to form α -rings first. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, **525**(1): 107-112
- [32] Huber E M, Heinemeyer W, Li X, *et al.* A unified mechanism for proteolysis and autocatalytic activation in the 20S proteasome. *Nat Commun*, 2016, **7**: 10900
- [33] Lin G, Hu G, Tsu C, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* *preBA* genes encode a gated proteasome with broad oligopeptide specificity. *Mol Microbiol*, 2006, **59**(5): 1405-1416
- [34] Yu Y, Smith D M, Kim H M, *et al.* Interactions of PAN's C-terminus with archaeal 20S proteasome and implications for the eukaryotic proteasome-ATPase interactions. *EMBO J*, 2010, **29**(3): 692-702
- [35] Liao S, Shang Q, Zhang X, *et al.* Pup, a prokaryotic ubiquitin-like protein, is an intrinsically disordered protein. *Biochem J*, 2009, **422**(2): 207-215
- [36] Groll M, Bajorek M, Köhler A, *et al.* A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol*, 2000, **7**(11): 1062-1067
- [37] Laederach J, Cui H, Weber-Ban E. Pupylated proteins are subject to broad proteasomal degradation specificity and differential depupylation. *PLoS One*, 2019, **14**(4): e0215439
- [38] Kavalchuk M, Jomaa A, Müller A U, *et al.* Structural basis of prokaryotic ubiquitin-like protein engagement and translocation by the mycobacterial Mpa-proteasome complex. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 276
- [39] Xiao X, Feng X, Yoo J H, *et al.* The β -grasp domain of proteasomal ATPase Mpa makes critical contacts with the *Mycobacterium tuberculosis* 20S core particle to facilitate degradation. *mSphere*, 2022, **7**(5): e0027422
- [40] Elharar Y, Schlüssel S, Hecht N, *et al.* The regulatory significance of tag recycling in the mycobacterial Pup-proteasome system. *FEBS J*, 2017, **284**(12): 1804-1814
- [41] Zerbib E, Schlüssel S, Hecht N, *et al.* The prokaryotic ubiquitin-like protein presents poor cleavage sites for proteasomal degradation. *Cell Rep*, 2021, **36**(4): 109428
- [42] Qiu W R, Guan M Y, Wang Q K, *et al.* Identifying pupylation proteins and sites by incorporating multiple methods. *Front Endocrinol*, 2022, **13**: 849549
- [43] Auliah F N, Nilamyani A N, Shoombuatong W, *et al.* PUP-Fuse: prediction of protein pupylation sites by integrating multiple sequence representations. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(4): 2120
- [44] Singh V, Sharma A, Dehzangi A, *et al.* PupStruct: prediction of pupylated lysine residues using structural properties of amino acids. *Genes*, 2020, **11**(12): 1431
- [45] Regev O, Linder H, Gur E. Pup-Click-a new chemoenzymatic method for the generation of singly pupylated targets. *Bioconjug Chem*, 2019, **30**(11): 2909-2916
- [46] Festa R A, McAllister F, Pearce M J, *et al.* Prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, 2010, **5**(1): e8589
- [47] Watrous J, Burns K, Liu W T, *et al.* Expansion of the mycobacterial "PUPylome". *Mol Biosyst*, 2010, **6**(2): 376-385
- [48] Poulsen C, Akhter Y, Jeon A H, *et al.* Proteome-wide identification of mycobacterial pupylation targets. *Mol Syst Biol*, 2010, **6**: 386
- [49] Frigui W, Bottai D, Majlessi L, *et al.* Control of *M. tuberculosis* ESAT-6 secretion and specific T cell recognition by PhoP. *PLoS Pathog*, 2008, **4**(2): e33
- [50] Darwin K H, Ehrst S, Gutierrez-Ramos J C, *et al.* The proteasome of *Mycobacterium tuberculosis* is required for resistance to nitric oxide. *Science*, 2003, **302**(5652): 1963-1966
- [51] Festa R A, Pearce M J, Darwin K H. Characterization of the proteasome accessory factor (paf) operon in *Mycobacterium*

- tuberculosis*. J Bacteriol, 2007, **189**(8): 3044-3050
- [52] Alhuwaidar AA H, Truscott K N, Dougan DA. Pupylation of PafA or Pup inhibits components of the Pup-proteasome system. FEBS Lett, 2018, **592**(1): 15-23
- [53] Regev O, Roth Z, Korman M, *et al.* A kinetic model for the prevalence of mono-over poly-pupylation. FEBS J, 2015, **282**(21): 4176-4186
- [54] Cerda-Maira F A, McAllister F, Bode N J, *et al.* Reconstitution of the *Mycobacterium tuberculosis* pupylation pathway in *Escherichia coli*. EMBO Rep, 2011, **12**(8): 863-870
- [55] Regev O, Korman M, Hecht N, *et al.* An extended loop of the Pup ligase, PafA, mediates interaction with protein targets. J Mol Biol, 2016, **428**(20): 4143-4153
- [56] Yoo J H, Kahne S C, Darwin K H. A conserved loop sequence of the proteasome system depupylase Dop regulates substrate selectivity in *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem, 2022, **298**(10): 102478
- [57] Pearce M J, Arora P, Festa R A, *et al.* Identification of substrates of the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome. EMBO J, 2006, **25**(22): 5423-5432
- [58] Delley C L, Striebel F, Heydenreich F M, *et al.* Activity of the mycobacterial proteasomal ATPase Mpa is reversibly regulated by pupylation. J Biol Chem, 2012, **287**(11): 7907-7914
- [59] Chen X, Li C, Wang L, *et al.* The mechanism of *Mycobacterium smegmatis* PafA self-pupylation. PLoS One, 2016, **11**(3): e0151021
- [60] Elharar Y, Roth Z, Hermelin I, *et al.* Survival of *mycobacteria* depends on proteasome-mediated amino acid recycling under nutrient limitation. EMBO J, 2014, **33**(16): 1802-1814
- [61] 陈雪洁. 核生物蛋白的Pup化机制研究[D]. 北京: 北京师范大学生命科学院, 2015
- Chen X J. The Protein Pupylation Mechanisms in Prokaryotes[D]. Beijing: College of Life Sciences, Beijing Normal University, 2015
- [62] Thacker V V, Dhar N, Sharma K, *et al.* A lung-on-chip model of early *Mycobacterium tuberculosis* infection reveals an essential role for alveolar epithelial cells in controlling bacterial growth. Elife, 2020, **9**: e59961
- [63] Lloberas J, Muñoz J P, Hernández-Álvarez M I, *et al.* Macrophage mitochondrial MFN2 (mitofusin 2) links immune stress and immune response through reactive oxygen species (ROS) production. Autophagy, 2020, **16**(12): 2307-2309
- [64] Pi J, Shen L, Yang E, *et al.* Macrophage-targeted isoniazid-selenium nanoparticles promote antimicrobial immunity and synergize bactericidal destruction of Tuberculosis bacilli. Angew Chem Int Ed Engl, 2020, **59**(8): 3226-3234
- [65] Gandotra S, Schnappinger D, Monteleone M, *et al.* *In vivo* gene silencing identifies the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome as essential for the bacteria to persist in mice. Nat Med, 2007, **13**(12): 1515-1520
- [66] Gandotra S, Lebron M B, Ehrst S. The *Mycobacterium tuberculosis* proteasome active site threonine is essential for persistence yet dispensable for replication and resistance to nitric oxide. PLoS Pathog, 2010, **6**(8): e1001040
- [67] Farout L, Friguet B. Proteasome function in aging and oxidative stress: implications in protein maintenance failure. Antioxid Redox Signal, 2006, **8**(1-2): 205-216
- [68] Compton C L, Fernandopulle M S, Nagari R T, *et al.* Genetic and proteomic analyses of pupylation in *Streptomyces coelicolor*. J Bacteriol, 2015, **197**(17): 2747-2753
- [69] Cumming B M, Chinta K C, Reddy V P, *et al.* Role of ergothioneine in microbial physiology and pathogenesis. Antioxid Redox Signal, 2018, **28**(6): 431-444
- [70] Uriarte M, Sen Nkwe N, Tremblay R, *et al.* Starvation-induced proteasome assemblies in the nucleus link amino acid supply to apoptosis. Nat Commun, 2021, **12**(1): 6984
- [71] Fabre B, Livneh I, Ziv T, *et al.* Modulation of the cell cycle regulating transcription factor E2F1 pathway by the proteasome following amino acid starvation. Biochem Biophys Res Commun, 2019, **513**(3): 721-725
- [72] Guzzo M B, Li Q, Nguyen H V, *et al.* The Pup-proteasome system protects *Mycobacteria* from antimicrobial antifolates. Antimicrob Agents Chemother, 2021, **65**(4): e01967-20
- [73] Becker S H, Jastrab J B, Dhabaria A, *et al.* The *Mycobacterium tuberculosis* Pup-proteasome system regulates nitrate metabolism through an essential protein quality control pathway. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, **116**(8): 3202-3210
- [74] Fascellaro G, Petrera A, Lai Z W, *et al.* Comprehensive proteomic analysis of nitrogen-starved *Mycobacterium smegmatis* Δ pup reveals the impact of pupylation on nitrogen stress response. J Proteome Res, 2016, **15**(8): 2812-2825
- [75] Becker S H, Jastrab J B, Dhabaria A, *et al.* The *Mycobacterium tuberculosis* Pup-proteasome system regulates nitrate metabolism through an essential protein quality control pathway. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, **116**(8): 3202-3210
- [76] Baek G H, Cheng H, Choe V, *et al.* Cdc48: a swiss army knife of cell biology. J Amino Acids, 2013, **2013**: 183421
- [77] Ziemski M, Jomaa A, Mayer D, *et al.* Cdc48-like protein of actinobacteria (Cpa) is a novel proteasome interactor in *mycobacteria* and related organisms. Elife, 2018, **7**: e34055
- [78] Müller A U, Imkamp F, Weber-Ban E. The mycobacterial LexA/RecA-independent DNA damage response is controlled by PafBC and the Pup-proteasome system. Cell Rep, 2018, **23**(12): 3551-3564
- [79] Zhang L, Hendrickson R C, Meikle V, *et al.* Comprehensive analysis of iron utilization by *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog, 2020, **16**(2): e1008337
- [80] Alebouyeh S, Cárdenas-Pestana J A, Vazquez L, *et al.* Iron deprivation enhances transcriptional responses to *in vitro* growth arrest of *Mycobacterium tuberculosis*. Front Microbiol, 2022, **13**: 956602
- [81] Yao H, Soldano A, Fontenot L, *et al.* Pseudomonas aeruginosa bacterioferritin is assembled from FtnA and BfB subunits with the relative proportions dependent on the environmental oxygen

- availability. *Biomolecules*, 2022, **12**(3): 366
- [82] Küberl A, Polen T, Bott M. The pupylation machinery is involved in iron homeostasis by targeting the iron storage protein ferritin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, **113**(17): 4806-4811
- [83] Küberl A, Fränzel B, Eggeling L, *et al.* Pupylated proteins in *Corynebacterium glutamicum* revealed by MudPIT analysis. *Proteomics*, 2014, **14**(12): 1531-1542
- [84] Shey-Njila O, Hikal A F, Gupta T, *et al.* CtpB facilitates *Mycobacterium tuberculosis* growth in copper-limited niches. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(10): 5713
- [85] Villegas M, Tejada C, Umaña R, *et al.* Are reactive oxygen species (ROS) the main mechanism by which copper ion treatment degrades the DNA of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis suspended in milk?. *Microorganisms*, 2022, **10**(11): 2272
- [86] Yang D, Klebl D P, Zeng S, *et al.* Interplays between copper and *Mycobacterium tuberculosis* GroEL1. *Metallomics*, 2020, **12**(8): 1267-1277
- [87] Festa R A, Jones M B, Butler-Wu S, *et al.* A novel copper-responsive regulon in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 2011, **79**(1): 133-148
- [88] Shi X, Festa R A, Ioerger T R, *et al.* The copper-responsive RicR regulon contributes to *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *mBio*, 2014, **5**(1): e00876-13
- [89] Harnagel A, Lopez Quezada L, Park S W, *et al.* Nonredundant functions of *Mycobacterium tuberculosis* chaperones promote survival under stress. *Mol Microbiol*, 2021, **115**(2): 272-289
- [90] Hakiem O R, Batra J K. Role of HrcA in stress management in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Appl Microbiol*, 2022, **132**(4): 3315-3326
- [91] Jastrab J B, Samanovic M I, Copin R, *et al.* Loss-of-function mutations in HspR rescue the growth defect of a *Mycobacterium tuberculosis* proteasome accessory factor E (*paqE*) mutant. *J Bacteriol*, 2017, **199**(7): e00850-16
- [92] Jastrab J B, Wang T, Murphy J P, *et al.* An adenosine triphosphate-independent proteasome activator contributes to the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(14): e1763-e1772
- [93] Bucca G, Hindle Z, Smith C P. Regulation of the *dnaK* operon of *Streptomyces coelicolor* A3(2) is governed by HspR, an autoregulatory repressor protein. *J Bacteriol*, 1997, **179**(19): 5999-6004
- [94] Bandyopadhyay B, Das Gupta T, Roy D, *et al.* DnaK dependence of the mycobacterial stress-responsive regulator HspR is mediated through its hydrophobic C-terminal tail. *J Bacteriol*, 2012, **194**(17): 4688-4697
- [95] Parijat P, Batra J K. Role of DnaK in HspR-HAIR interaction of *Mycobacterium tuberculosis*. *IUBMB Life*, 2015, **67**(11): 816-827
- [96] Zhang L Y, Wang C L, Yan M Y, *et al.* Toxin-antitoxin systems alter adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to environmental stress. *Microbiol Spectr*, 2022, **10**(6): e0281522
- [97] Chi X, Chang Y, Li M, *et al.* Biochemical characterization of mt-PemIK, a novel toxin-antitoxin system in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Lett*, 2018, **592**(24): 4039-4050
- [98] Jiang H W, Czajkowsky D M, Wang T, *et al.* Identification of serine 119 as an effective inhibitor binding site of *M. tuberculosis* ubiquitin-like protein ligase PafA using purified proteins and *M. smegmatis*. *EBioMedicine*, 2018, **30**: 225-236
- [99] Li C, Liu S, Dong B, *et al.* Discovery and mechanistic study of *Mycobacterium tuberculosis* PafA inhibitors. *J Med Chem*, 2022, **65**(16): 11058-11065
- [100] Janssen G V, Zhang S, Merckx R, *et al.* Development of tyrphostin analogues to study inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* Pup-proteasome system. *Chembiochem*, 2021, **22**(21): 3082-3089
- [101] DeMott C M, Girardin R, Cobbert J, *et al.* Potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* growth identified by using in-cell NMR-based screening. *ACS Chem Biol*, 2018, **13**(3): 733-741
- [102] Zhang H, Hsu H C, Kahne S C, *et al.* Macrocyclic peptides that selectively inhibit the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome. *J Med Chem*, 2021, **64**(9): 6262-6272
- [103] Rožman K, Alexander E M, Ogorevc E, *et al.* Psoralen derivatives as inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* proteasome. *Molecules*, 2020, **25**(6): 1305
- [104] Zhan W, Hsu H C, Morgan T, *et al.* Selective phenylimidazole-based inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome. *J Med Chem*, 2019, **62**(20): 9246-9253
- [105] Almeleebia T M, Shahrani M A, Alshahrani M Y, *et al.* Identification of new *Mycobacterium tuberculosis* proteasome inhibitors using a knowledge-based computational screening approach. *Molecules*, 2021, **26**(8): 2326
- [106] Kang M G, Rhee H W. Molecular spatiomics by proximity labeling. *Acc Chem Res*, 2022, **55**(10): 1411-1422
- [107] Liu Q, Zheng J, Sun W, *et al.* A proximity-tagging system to identify membrane protein-protein interactions. *Nat Methods*, 2018, **15**: 715-722
- [108] Zheng J, Chen X, Liu Q, *et al.* Ubiquitin ligase MARCH5 localizes to peroxisomes to regulate pexophagy. *J Cell Biol*, 2022, **221**(1): e202103156
- [109] Zhang Z, Sun W, Shi T, *et al.* Capturing RNA-protein interaction via CRUIS. *Nucleic Acids Res*, 2020, **48**(9): e52
- [110] Xie S, Li H, Yao F, *et al.* PUPIL enables mapping and stamping of transient electrical connectivity in developing nervous systems. *Cell Rep*, 2021, **37**(3): 109853
- [111] Sun W, Zhang Z, Liu J L, *et al.* A new method for studying RNA-binding proteins on specific RNAs. *Bio Protoc*, 2021, **11**(10): e4022
- [112] Yue S, Xu P, Cao Z, *et al.* PUP-IT2 as an alternative strategy for PUP-IT proximity labeling. *Front Mol Biosci*, 2022, **9**: 1007720

The Mechanism and Biological Functions of Pup-proteasome System*

DAI Wei¹⁾, LI Meng-Miao²⁾, ZHANG Jun-Jie^{1)**}

¹⁾Key Laboratory for Cell Proliferation and Regulation Biology of Ministry of Education, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;

²⁾College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116081, China)

Abstract The Pup-proteasome system (PPS) is a prokaryotic post-translational protein degradation pathway, in which prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) is activated by deamidase of Pup (Dop) and covalently linked to target proteins by proteasome accessory factor A (Paf A), and then the Pup-labeled target proteins are degraded by proteasome. PPS in mycobacteria is involved in the reactions to a various stress conditions, such as oxidative stress, nutritional deficiency, heat stress, and DNA damage, and participates in the regulation of metal ion homeostasis, toxin-antitoxin system, and host immune resistance. It has been reported that PPS is closely related to the retention and pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*, therefore the PPS components, PafA, Dop and proteasome, have emerged as new targets for anti-tuberculosis drug development. Several small molecule inhibitors targeting PPS have been identified as the potential novel anti-tuberculosis drugs. In addition, PafA-catalyzed protein pupylation has been applied in biotechnology research, and developed into a new proximity labeling method, named pupylation-based interaction tagging (PUP-IT), which has been successfully used in the study of protein-protein interactions. This article reviews the research progress in the mechanism of action and biological functions of PPS, as well as the research progress in PPS inhibitors and PPS biotechnology applications.

Key words Pup-proteasome system, Dop, PafA, Pup, proteasome, *Mycobacterium tuberculosis*

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0025

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (32171138, 81972604) and the Open Fund from Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulation Biology, Ministry of Education, China.

** Corresponding author.

Tel: 86-10-58802137, E-mail: jjzhang@bnu.edu.cn

Received: January 18, 2023 Accepted: March 26, 2023