



泛素蛋白磷酸化修饰的功能与解析*

季 然^{1,2)**} 陈祎霖^{1)**} 钱程民³⁾ 金建平^{1,4,5)***}⁽¹⁾ 浙江大学生命科学研究院, 杭州 310058; ⁽²⁾ 浙江大学生命科学学院, 杭州 310058; ⁽³⁾ 香港大学生物医学学院, 中国香港 999077;⁽⁴⁾ 浙江大学绍兴研究院生命科学分中心, 绍兴 321000; ⁽⁵⁾ 浙江大学癌症中心, 杭州 310058)

摘要 泛素化是存在于真核生物中一种重要的翻译后修饰过程, 参与调控包括蛋白质降解在内的多种生命活动。实现这一调控过程需要将一个由 76 个氨基酸组成的泛素蛋白共价连接到底物蛋白上。同时, 泛素本身也存在多种翻译后修饰, 包括泛素化、磷酸化、乙酰化等, 进一步丰富了泛素的修饰类型, 决定了底物蛋白不同的命运。近年来, 伴随着第 65 位丝氨酸磷酸化泛素蛋白参与调控线粒体自噬这一突破性进展, 泛素蛋白其余磷酸化位点的功能研究也获得越来越多的关注。本文根据目前已有的国内外研究和报道, 总结了泛素蛋白已知的磷酸化修饰位点, 梳理了泛素蛋白第 12 位和 66 位苏氨酸、第 57 位和 65 位丝氨酸等位点的磷酸化修饰对其生物物理特性带来的改变, 并对相应修饰位点所涉及的生物学功能调控进行了综述。

关键词 泛素, 泛素化, 泛素密码, 磷酸化, 线粒体自噬, DNA 损伤修复

中图分类号 Q51, Q71

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0079

1 泛素及泛素化修饰

泛素 (ubiquitin, Ub) 是一个由 76 个氨基酸组成的小型信号蛋白, 广泛存在于真核生物中^[1]。泛素蛋白通过三步酶促反应被连接到底物蛋白上, 被称为泛素化^[2]。泛素化既可作为一种降解信号, 将受损伤的、有害的或不需要的蛋白质送达 26S 蛋白酶体降解, 也可以作为非蛋白降解信号, 参与调控包括胞吞作用、DNA 损伤修复和转录等在内的许多重要生命过程^[1]。泛素信号极其复杂, 可以被含有泛素识别结构域 (ubiquitin-binding domain, UBD) 的受体蛋白分类识别, 从而将信号进一步传递到下游不同的生物学途径^[3]。在其功能发挥结束后, 这些泛素化修饰又需要专门的去泛素化酶 (deubiquitinase, DUB) 将其清除, 从而实现这一调控过程的终止。

泛素化的调节作用是多方面的, 涵盖了几乎所有的细胞生命活动, 因为它在蛋白质降解及细胞信号传导中起着不可替代的作用。同时, 泛素化或去泛素化过程的异常也和多种疾病的发生发展有关, 如肿瘤、自身免疫性疾病及神经退行性疾病。目

前, 蛋白质组学分析已在 9 200 种人类蛋白质上发现了至少 63 000 个泛素化修饰位点^[4]。从生物化学的角度来讲, 泛素化是由一种包括泛素活化酶 (E1)、泛素缀合酶 (E2) 和泛素连接酶 (E3) 在内的三种酶级联作用下实现底物的共价修饰过程。在这一系列酶促反应的催化下, 泛素蛋白羧基端 76 位甘氨酸 (glycine) 与底物蛋白的赖氨酸 (lysine) 残基之间形成肽键而共价相连^[5-6]。人类基因组上一共含有: 2 个 E1 基因, 包括 *Uba1* 和 *Uba6*; 约 30 个 E2; 超过 600 个 E3。其中, E3 泛素连接酶在底物蛋白识别中起主要作用, 因此, 泛素化过程的特异性主要由泛素连接酶所决定。

泛素蛋白表面的 7 个赖氨酸及其氨基端甲硫氨酸 (methionine) 位点都可以被泛素化, 从而形成包含单个、多个单泛素化, 以及同质、混合、分支等多种类型具有复杂拓扑结构的多聚泛素链^[7]

* 国家自然科学基金 (31970734, 32150014), 科技部国家重点研发计划 (2022YFC3401500) 和中央高校基本业务费资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 15168487596, E-mail: jianping_jin@zju.edu.cn

收稿日期: 2023-03-09, 接受日期: 2023-03-29

(图1)。第48位赖氨酸连接类型(K48)的多聚泛素链是细胞中最主要的泛素类型(占比通常>50%)^[8],其作用是将底物蛋白质靶向蛋白酶体进行降解^[1]。相比之下,通过第63位赖氨酸连接的

泛素链(K63)作为第二丰富的类型,调控多种非降解功能^[9]。另外还有包括M1、K6、K11、K27、K29以及K33在内的多种“非经典”多聚泛素链,分别参与调控不同的生命过程。

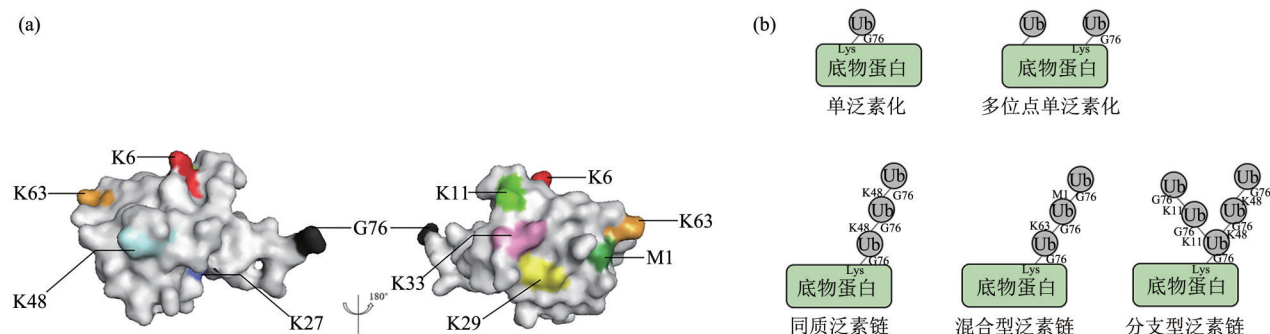


Fig. 1 Ubiquitin structure and ubiquitylation types

图1 泛素蛋白及泛素化修饰类型

(a) 泛素蛋白表面的7个赖氨酸位点, 1个N端甲硫氨酸位点及其C端甘氨酸位点的分布情况; (b) 多种泛素化修饰类型, 包括单位点、多位点的单泛素化, 以及同质、混合、分支等多种泛素链。

除了底物及泛素蛋白的赖氨酸和泛素的氨基端的甲硫氨酸残基之外, 近年来的研究发现丝氨酸 (serine)、苏氨酸 (threonine) 及半胱氨酸 (cysteine) 残基也可以和泛素羧基端的甘氨酸共价结合, 形成以酯键相连的泛素化修饰。McCrory 等^[10]发现, 在小鼠 RAW264.7 细胞内, R848 诱导的 TLR7/8 信号通路中, Myddosome 复合物内多个成员上的若干丝氨酸和苏氨酸残基都可以检测到与泛素蛋白羧基端的甘氨酸残基之间形成的酯键连接, 这些位点包括泛素的第12、14、22位苏氨酸和第20位丝氨酸残基, IRAK4 的第175位丝氨酸; IRAK2 的第136、168位丝氨酸和第163位苏氨酸, 以及 MyD88 的第141位苏氨酸残基。已经发现若干泛素连接酶具备通过酯键进行泛素化修饰的能力, 如 E3 泛素连接酶 HOIL-1 可以催化泛素蛋白羧基端甘氨酸残基与另一个泛素蛋白的第12位苏氨酸、第20位丝氨酸、第22位苏氨酸残基之间形成酯键^[11], 另外, LUBAC 复合体泛素连接酶能催化泛素蛋白之间通过羧基端甘氨酸和第55位苏氨酸之间形成酯键^[12], 猜测也是复合体中的 HOIL-1 所为^[13]。MycBP2 是一个新型泛素连接酶, 仅含有一个环指结构域 (RING finger domain), 但是具有酶催化活性, 能直接将泛素通过酯键连接到底物蛋白的苏氨酸上^[14]。此外, E2 泛素缀合酶 UBE2J2 也能通过酯键进行泛素化修饰^[15]。综上所述, 近年

来的新发现将蛋白质上的泛素化位点从赖氨酸及泛素氨基端的甲硫氨酸扩展到了丝氨酸、苏氨酸, 甚至半胱氨酸残基上^[16]。

泛素蛋白自身的进一步修饰可以产生更复杂的调控信号, 参与调控更多样的生命过程, 最终导致多种不同的调控结果, 这也与真核生物复杂的细胞内外环境和精细严密的调控过程是一致的。这些多样多层次的泛素修饰类型统称为泛素密码 (ubiquitin code)^[17]。

2 泛素的翻译后修饰

除了修饰底物蛋白及形成泛素链之外, 泛素本身也具有许多种类的翻译后修饰位点。目前的研究表明, 泛素蛋白本身的翻译后修饰可分为三大类, 包括泛素及类泛素化修饰, 乙酰化修饰以及磷酸化修饰 (表1)。

泛素蛋白的赖氨酸残基可以被类泛素蛋白 (ubiquitin-like protein, UBL) 修饰^[18], 例如 SUMO 或 NEDD8^[5]。热休克和蛋白酶体的抑制能促进泛素的 SUMO 化修饰, 表明 SUMO 化泛素蛋白在应激反应中的作用, 但尚不清楚这种修饰对泛素活性, 以及对底物蛋白功能的影响^[19]。

此外, 泛素蛋白还可以被化学基团所修饰, 如其部分赖氨酸位点可以发生乙酰化修饰, 通过空间位阻或表面特性 (如电荷) 的变化影响泛素的功

能。有研究发现,细胞中可以检测到泛素蛋白第6、48位赖氨酸位点的乙酰化,这种修饰并不影响E1对泛素的激活和向底物的转移,但这两个位点的乙酰化明显影响包括K11、K48和K63等多聚泛素链的形成^[20]。

除了乙酰化修饰,泛素蛋白的丝氨酸、苏氨

酸,以及酪氨酸(tyrosine)残基可被磷酸基团修饰,从而形成多种不同的泛素密码。被修饰的底物蛋白可以参与到不同的生命过程,最终走向不同的结局。

接下来,本文将针对泛素蛋白磷酸化修饰的国内外研究现状进行分析总结。

Table 1 Modification sites on ubiquitin

表1 泛素上的修饰位点

修饰类型	修饰位点	生物学功能
泛素及类泛素化	M1、K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63、T12、T14、S20、T22	蛋白质降解、DNA损伤修复、免疫信号转导、内吞等
泛素蛋白磷酸化	T7、T12、T14、S20、T22、T55、S57、Y59、S65、T66	线粒体自噬、DNA损伤修复、应激反应等
泛素蛋白乙酰化	K6、K11、K27、K33、K48、K63	生物学功能未知,但会抑制泛素链的生成

3 泛素磷酸化的国内外研究现状

根据国内外已有的质谱数据,目前已知的泛素蛋白表面磷酸化位点包括第7、12、14、22、55、66位苏氨酸,第20、57、65位丝氨酸和第59位酪氨酸^[5]。已有研究证明上述部分磷酸化位点参与调控真核生物重要的生命过程。

3.1 第65位丝氨酸磷酸化泛素(pS65-Ub)

已有的研究表明,泛素蛋白第65位丝氨酸的磷酸化调节PINK1-Parkin介导的线粒体自噬^[21]。这是磷酸化对泛素进行功能调节的第一个证据,激发了人们研究泛素磷酸化生物学功能的热情。泛素蛋白第65位丝氨酸位点的磷酸化修饰也是到目前为止研究最深入、最广泛的位点。PINK1(PTEN induced putative kinase1)和Parkin是调控线粒体自噬极为关键的蛋白质。PINK1作为一种丝氨酸/苏氨酸激酶,可以磷酸化泛素蛋白的第65位丝氨酸和Parkin Ubl结构域中的第65位丝氨酸^[22]。Parkin是一个E3泛素连接酶,可催化线粒体外膜蛋白的泛素化。Parkin分布于细胞质内^[23],且高表达于脑、骨骼肌、心肌以及肝脏等组织中^[24]。当线粒体受损时,PINK1在线粒体外膜上积累,从而将该区域的泛素蛋白磷酸化。定量质谱结果显示,pS65-Ub在正常的人类细胞中占总泛素蛋白<0.1%,但在线粒体损伤剂处理的细胞中增加到2%^[25],晶体结构分析显示PINK1的198位酪氨酸与泛素蛋白的第47位甘氨酸形成氢键,并与第44位异亮氨酸形成疏水相互作用。PINK1激酶结构域的C叶激活片段与泛素蛋白构象中的柔性第65位丝氨酸相接触,有助于将第65位丝氨酸放置在磷酸盐接受位

置^[26]。同时,受损的线粒体附近被磷酸化的泛素蛋白会通过相互作用以纳摩尔亲和力和募集自抑制状态的Parkin,随后,PINK1进一步介导Parkin Ubl结构域中第65位丝氨酸残基磷酸化,从而激活Parkin潜在的E3泛素连接酶活性。当处于自抑制状态下,Parkin的E2结合位点及其半胱氨酸活性位点分别被其Ubl结构域和RING2结构域所掩盖;第65位丝氨酸磷酸化的泛素蛋白与Parkin的结合会促进Parkin结构改变从而释放Ubl结构域,暴露E2结合位点;而PINK1介导其Ubl第65位丝氨酸位点的磷酸化会促进Parkin进一步构象改变,暴露其半胱氨酸活性位点,完全激活其E3泛素连接酶活性(图2),从而通过泛素化受损线粒体外膜蛋白,招募自噬受体,促进受损线粒体的自噬降解过程^[27]。深入的结构研究发现,pS65-Ub在溶液中具有两种构象,即松弛态和收缩态:主要构象(松弛态)的晶体结构类似于普通泛素;次要构象(收缩态)的 $\beta 5$ 链滑移,从而稳定了第73位亮氨酸和第74位精氨酸残基,并改变了核心处 β 折叠结构 $\beta 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 的相互作用,导致泛素的羧基端向核心缩回。这种三级结构的变化将进一步影响泛素亚基在多聚泛素链中的四级排列^[28]。

泛素的磷酸化修饰带来的构象变化明显影响其结构和生物物理特性。pS65-Ub主要构象的生物物理特性与普通泛素无较大差异,而次要构象的特性则有较大变化。这种pS65-Ub能抑制E2/E3的功能:pS65-Ub会影响E2的激活以至于对多聚泛素链的形成产生影响。例如,人UBE2R1(cdc34)、UBE2E1(UbcH6)等介导的多聚泛素链组装被pS65-Ub抑制。除了对E2激活的影响外,pS65-Ub

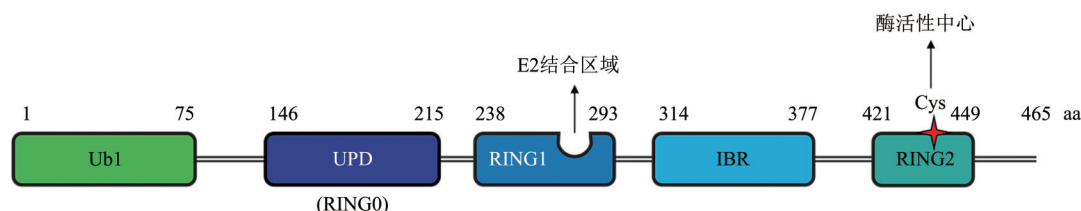


Fig. 2 Functional domains of the full-length Parkin

图2 Parkin 全长蛋白结构域示意图

全长Parkin的结构域分布情况, Parkin作为一种RBR型E3泛素连接酶, 其发挥功能一方面需要RING1结构域与E2相互作用, 另一方面需要其RING2结构域上的半胱氨酸活性位点发挥其酶活; 在静息状态下, Parkin的E2结合位点及其半胱氨酸活性位点分别被其Ub1结构域和RING2结构域掩盖在结构内部; 磷酸化泛素蛋白与Parkin的结合及其Ub1第65位丝氨酸位点的磷酸化会导致Parkin构象改变, 将其E2结合区域和含有半胱氨酸的活性中心暴露出来, 得以充分发挥其E3泛素连接酶的活性。

还可以影响E2酶UBE2D1、UBE2D3与E3连接酶TRAF6的结合反应。此外, 掺入pS65-Ub的多聚泛素链不易被部分DUB水解^[29]。第65位丝氨酸磷酸化还抑制UBE2D1催化的K11连接, UBE2N与UBE2V1组装成游离K63泛素链, 以及HOIP催化的M1泛素链形成^[30]。

研究泛素第65位丝氨酸的磷酸化修饰对于不同DUB对不同连接类型泛素二聚体的水解活性发现, 第65位丝氨酸磷酸化增加了OTUB2介导的K48泛素二聚体的水解, 减少了K63泛素二聚体的水解; 增加了USP4介导的K11和K48泛素二聚体的水解, 减少了K6、K29和K33泛素二聚体的水解。综合来看, pS65-Ub对于大部分DUB水解泛素二聚体起着明显的抑制作用(其抑制效应强于pS57-Ub), 除去对USP2催化的M1泛素二聚体的水解有明显抑制, pS65-Ub对于其他DUB介导的M1泛素二聚体水解几乎没有影响, 而对于USP5对K11连接的水解、USP16对K33连接的水解、OTUB1和USP21对K48连接的水解起着显著的促进作用^[31]。

3.2 第57位丝氨酸磷酸化泛素 (pS57-Ub)

静息状态下, pS57-Ub是真核生物细胞内含量最高的一类磷酸化泛素蛋白。泛素第57位丝氨酸位点的磷酸化最早是在酵母中发现的^[32], 随后在人类乳腺癌组织、黑色素瘤细胞和肺腺癌细胞中也有发现^[30]。第57位丝氨酸磷酸化不影响E2/E3合成多种泛素链; 而在不同DUB对不同连接类型的泛素二聚体的水解活性研究中发现, 第57位丝氨酸磷酸化增加USP2介导的K29泛素链及USP4介导的K11泛素链的水解。但是, 泛素第57位丝氨酸位点的磷酸化修饰对于大部分DUB的活性起着

抑制作用, 虽然总体抑制强度不如pS65-Ub^[31]。

pS65-Ub是细胞中公认的Parkin激活剂, 但实验发现Parkin对pS57-Ub有更高的选择性。与pS65-Ub刺激相比, pS57-Ub激活的Parkin自泛素化活性高出约2倍。这项研究提出了一个有趣的可能性, 即pS57-Ub可能独立于PINK1和pS65-Ub驱动Parkin介导的线粒体自噬^[22], 尽管这一假设尚未在细胞环境中得到检验。该研究还表明pS57-Ub是天然Parkin靶标Miro-1(一种线粒体GTP酶, 参与许多生化过程)泛素化的首选底物^[33]。

同期的另一项研究发现, 泛素在第57位丝氨酸位点的磷酸化水平受酵母中Ppz磷酸酶的调节。Ppz突变体中泛素蛋白的降解速度更快、周转率更高。已知囊泡降解是酵母细胞中泛素循环的主要途径。泛素的循环由蛋白质降解机制相关的DUB介导, 这些DUB的突变会导致泛素循环受阻。Doa4是一种与ESCRT机制相关并在膜蛋白降解前回收泛素的酵母内体DUB, 被认为是在内体上进行多囊泡体分选之前负责回收泛素的主要去泛素化酶, 对液泡转运及泛素循环调节至关重要。模拟磷酸化泛素蛋白S57D-Ub能够抑制去泛素酶Doa4的活性, 从而阻止泛素通过内吞途径再循环。但是, 模拟磷酸化的突变体泛素蛋白在细胞内能促进内吞运输速率及泛素再循环, 说明泛素的第57位丝氨酸位点被磷酸化后, 可能通过内体上的其他DUB来促进泛素在液泡腔里再循环。基于这些发现, 该研究提出, 泛素的第57位丝氨酸磷酸化可以作为调节开关来控制泛素沿内吞途径的循环^[34]。

最近的研究表明, 泛素第57位丝氨酸位点磷酸化在酿酒酵母的应激反应中发挥作用, 包括氧化应激反应。Snf1相关酵母激酶家族中的Vhs1和

Sks1, 是除了PINK1之外唯一已知的泛素磷酸化激酶。通过在大肠杆菌中共表达泛素和酵母激酶, 并使用对pS57-Ub特异抗体对裂解物进行免疫印迹, 观察到Snf1相关酵母激酶家族中的Vhs1和Sks1的过表达增加了泛素蛋白第57位丝氨酸位点的磷酸化水平, 表明Vhs1和Sks1作为泛素激酶的活性。与酵母Snf1相关激酶家族同源的人类AMPK相关激酶家族中的MARK1~4、SIK1、SIK2在体外激酶活性测定中同样表现出明显的S57-Ub磷酸化活性。质谱实验进一步证明了MARK2体外磷酸化反应的产物中包含泛素蛋白S57位点的磷酸化^[35]。在生物学功能方面, 该研究通过构建表达磷酸化失活突变体S57A以及模拟磷酸化突变体S57D-Ub的酵母菌株, 发现S57D-Ub的表达赋予了酵母对羟基脲的敏感性和对刀豆氨酸、硫代赖氨酸的抗性。此外, S57D-Ub的表达还增强了对热应激的长期和急性耐受性。这些发现表明泛素的第57位丝氨酸磷酸化促进了细胞对各种蛋白质毒性应激源的耐受性。

AMPK相关激酶家族是真核生物中极为罕见的含有UBA结构域的丝氨酸激酶家族(图3), 这一结构特性也指向了一个有趣的可能性, 即

UBA结构域通过捕捉细胞内的泛素蛋白, 从而使得泛素被该家族激酶成员磷酸化。然而2006年的一项研究发现, 体外纯化的AMPK相关激酶家族成员的UBA结构域以及全长的该家族激酶成员与线性四聚泛素链、K48多聚泛素链、K63多聚泛素链之间不存在相互作用, 也不与类泛素蛋白NEDD8、SUMO1、SUMO2以及SUMO3相互作用^[36]。从晶体结构分析, 激活的MARK2蛋白的UBA结构域与其催化结构域之间更接近, 整体的结构更加紧凑, 且体外实验证明UBA结构域缺失的激酶无法被其上游激酶激活。该项研究提出猜想, 这一家族成员的UBA结构域起到空间构象调控功能, 而非通过结合泛素蛋白来对其激酶活性产生影响。然而, 该研究并没有探究MARK2蛋白的UBA结构域是否和其他类型的泛素链或其他类泛素蛋白存在相互作用, 因此不能排除该家族成员的UBA结构域特异性识别并结合其他非典型泛素链或其他类泛素蛋白的可能性, 同时, 一些AMPK相关激酶家族成员能在离体条件下磷酸化单泛素及四聚线性泛素链^[35], 说明UBA结构域有可能参与泛素链的识别。总之, 这一激酶家族蛋白还需要进一步更为系统的研究。

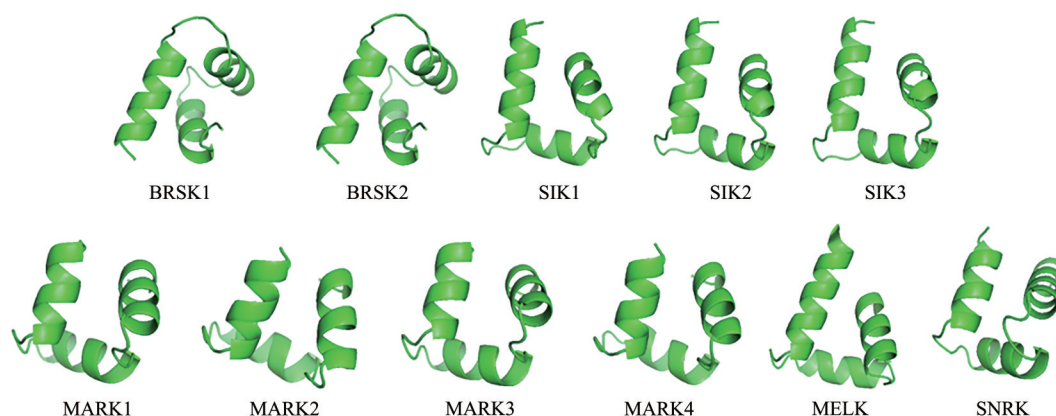


Fig. 3 Structures of UBA domains of AMPK-related kinases

图3 AMPK相关激酶家族成员的UBA结构示意图

由Phyre2模拟生成的AMPK相关激酶家族成员的UBA结构域, 都具有典型的三股 α 螺旋结构, 理论上可以与泛素相互作用。

目前尚无识别pS57-Ub的UBD的相关报道, 所以, pS57-Ub的识别机制也不清楚。由于第57位丝氨酸位于泛素蛋白上相对于第44位异亮氨酸疏水区域的另一面, 而大多数UBD通过疏水作用与

泛素蛋白的第44位异亮氨酸疏水区相互作用, 因此该位点的磷酸化不太可能对经典的Ub-UBD相互作用产生影响^[37]。

3.3 第12位苏氨酸和第66位苏氨酸磷酸化泛素

近几年来, 泛素蛋白苏氨酸位点磷酸化的功能也被逐步揭示, 包括第12位苏氨酸以及第66位苏氨酸。迄今为止, 尚未有研究鉴定出泛素蛋白第12位苏氨酸特异性激酶。早期的研究表明, 泛素第12位苏氨酸的磷酸化 (pT12-Ub) 有可能通过细胞分裂后期促进 APC 复合体泛素连接酶 (anaphase promoting complex) 催化形成 K11 多聚泛素链, 进而调节细胞周期^[38]。而近几年来, 第12位苏氨酸的磷酸化修饰因其在调节 DNA 损伤反应中的作用而受到关注^[39], 研究发现, 在组蛋白 H2A 的第15位赖氨酸位点修饰的泛素蛋白上存在着磷酸化修饰, 这一磷酸化位点位于泛素蛋白的第12位苏氨酸上。这一磷酸基团的存在通过阻碍 53BP1 与组蛋白 H2A 的相互作用, 从而抑制 53BP1 通过 NHEJ 修复损伤 DNA 的活性, 促进细胞通过同源重组的方式修复受损 DNA。从结构分析来看, 53BP1 对泛素的识别需要核小体和泛素将 53BP1 的 UDR 基序夹在中间, 然而, 位于 53BP1/NCP-H2AK15ub 复合体中的 UDR 和泛素的第12位苏氨酸磷酸化破坏了这种相互作用 (图4)。该研究还

探究了泛素第12位苏氨酸的磷酸化是否影响 E1、E2、E3 和 DUB 的功能, 结果发现 pT12-Ub 不能被去泛素化酶 USP51 切割, 同时, 这一磷酸化修饰不影响 RNF168 催化的染色质泛素化过程。

此外, pT12-Ub 的另一个潜在功能涉及到 HOIL-1 的活性。HOIL-1 作为一种 E3 泛素连接酶可以催化泛素与底物上的丝氨酸或苏氨酸残基之间形成氧化酯键。有趣的是, HOIL-1 在体外通过泛素的第76位甘氨酸和另一个泛素的第12位苏氨酸之间形成氧化酯键, 从而催化合成泛素二聚体^[11]。最近, 一项新的研究证实, 除了第12位苏氨酸之外, HOIL-1 也可以在体外催化泛素蛋白的第14位苏氨酸、第20位丝氨酸、第22位苏氨酸残基的泛素化^[10]。这些研究提出了一种有趣的可能性, 即泛素上这些位点磷酸化的一个潜在作用可能是阻止它们的泛素化。反过来, 这些位点的泛素化也可以阻止它们的磷酸化。由于相同氨基酸残基的泛素化和磷酸化是相互排斥的, 这可能是蛋白激酶调节 E3 泛素连接酶形成酯键的一种方式。针对这一点, 仍然需要后续的研究来证明这种拮抗作用是否成在于细胞中。

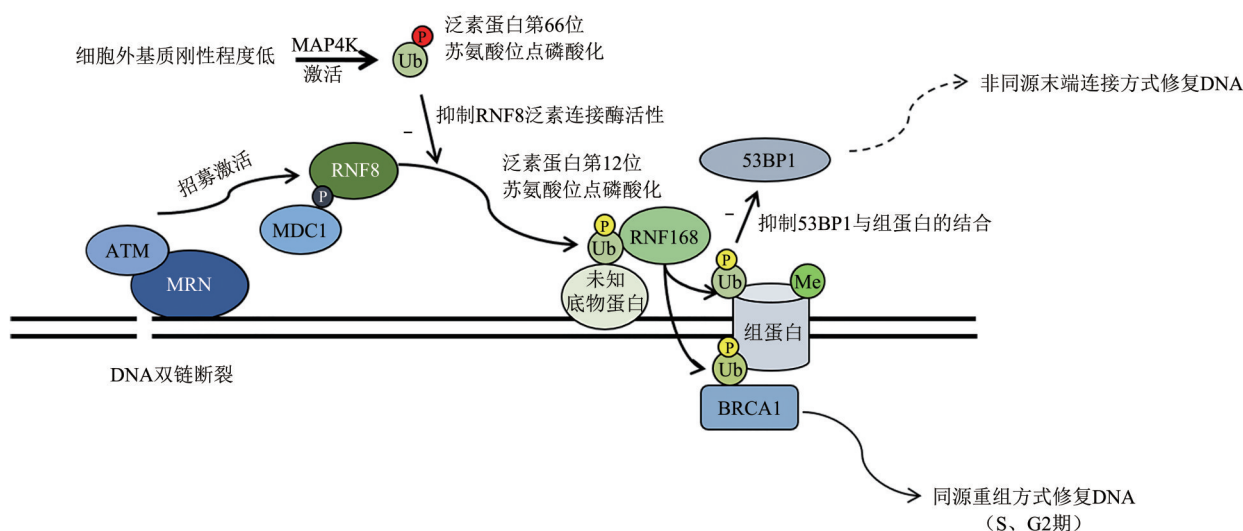


Fig. 4 The regulation of ubiquitin phosphorylation in response to DNA double strand breaks

图4 泛素蛋白磷酸化调控DNA损伤修复机制

泛素蛋白的磷酸化对受损DNA修复过程造成的影响。在细胞外基质硬度低的条件下, 激活的MAP4K激酶将泛素蛋白第66位苏氨酸磷酸化, 抑制了RNF8催化的泛素化过程, 进而抑制后续受损DNA的修复过程正常进行; 另一方面, 当泛素蛋白第12位苏氨酸被磷酸化时, RNF8和RNF168的催化过程并没有受影响, 然而53BP1不能与磷酸化泛素化的组蛋白结合, 抑制了通过非同源末端连接方式修复受损DNA的过程, 而BRCA1通过同源重组的方式修复受损DNA的过程仍可以正常进行, 因此第12位苏氨酸位点磷酸化的泛素蛋白也被认为是在细胞进入S和G2期时倾向于使用同源重组来修复受损DNA的一个转换信号。

与第12位苏氨酸同一年被报道的还有第66位苏氨酸位点的磷酸化。该研究发现,当细胞外基质硬度低的培养条件下,癌细胞的DNA损伤修复过程受到显著抑制,对化疗药物的敏感性显著升高。进一步研究发现,在细胞外基质硬度低的条件下,感知细胞内外环境变化、调控细胞内外联系的Hippo信号通路中的MAP4K4/6/7激酶的激活会促进细胞内泛素蛋白第66位苏氨酸位点的磷酸化,从而抑制DNA损伤修复信号通路中RNF8合成泛素链的泛素连接酶活性(图4),进一步抑制染色体泛素化水平来阻碍DNA损伤修复蛋白的招募^[40]。

截止到目前,人们对泛素蛋白的其他磷酸化位点的生理生化特性以及生物学功能都知之甚少。目前已有的生化实验证明,泛素第20位丝氨酸磷酸化(pS20-Ub)增加了OTUD3介导的K11泛素链的切割,但减少了K48泛素链的切割,增加了USP8介导的K6泛素链的切割,但减少了K11和K48泛素链切割。与第57、第65位丝氨酸磷酸化泛素蛋白相同,第20位丝氨酸磷酸化泛素对于大部分DUB的活性都起到抑制作用,但是对USP8介导的K6泛素链、OTUD3和USP16的介导K11泛素链降解起着微弱的促进作用。此外,pS20-Ub还可以将UBE3C从双特异性E3泛素连接酶转化为K48特异性连接酶^[31]。

4 总结与展望

泛素的泛素化、磷酸化、乙酰化等修饰在蛋白质翻译后修饰、信号转导、DNA修复等细胞进程中起着重要作用。在真核细胞中,泛素的磷酸化丰富了泛素蛋白所承载的信息量,进一步增加了泛素密码的复杂性。在多种磷酸化泛素中,pS65-Ub的结构特征、生物功能、作用机制已经得到了较为全面并深入的研究和报道,催化第65位丝氨酸位点磷酸化的特异性激酶PINK1也已经被鉴定出来,并进行了深入的研究。相对而言,pS57-Ub、pT12-Ub等磷酸化泛素的研究还需要进一步深入,这些泛素蛋白的激酶和磷酸酶以及具体调节机制还有待研究。在酵母中发现的第57位丝氨酸的激酶Vhs1是该领域的一项突破,但是pS57-Ub在人类细胞中的具体功能还未知,仍需要进一步探究。

目前仍未知磷酸化泛素蛋白是否与某些特定的重大疾病之间存在着某种联系。已研究的几个磷酸化位点的修饰还暂时停留在较为微观的层面,能否

与疾病(如癌症)之间建立起联系也是这一领域的一个探究方向。由于细胞外基质硬度在癌细胞团和正常组织之间是存在显著差异的,这一差异会导致细胞内泛素蛋白第66位苏氨酸位点磷酸化水平的改变,从而使得DNA损伤修复能力存在差异,这一差异可能会对病人接受化疗后的效果产生影响,或许能为病人的治疗效果预判提供参考意见。

参 考 文 献

- [1] Herskho A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 1998, **67**: 425-479
- [2] Pickart C M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 2001, **70**: 503-533
- [3] Husnjak K, Dikic I. Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu Rev Biochem*, 2012, **81**: 291-322
- [4] Akimov V, Barrio-Hernandez I, Hansen S V F, *et al.* UbiSite approach for comprehensive mapping of lysine and N-terminal ubiquitination sites. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, **25**(7): 631-640
- [5] Swatek K N, Komander D. Ubiquitin modifications. *Cell Res*, 2016, **26**(4): 399-422
- [6] Shi W, Ding R, Zhou P P, *et al.* Coordinated actions between p97 and cullin-RING ubiquitin ligases for protein degradation. *Adv Exp Med Biol*, 2020, **1217**: 61-78
- [7] Haakonsen D L, Rape M. Branching out: improved signaling by heterotypic ubiquitin chains. *Trends Cell Biol*, 2019, **29**(9): 704-716
- [8] Dammer E B, Na C H, Xu P, *et al.* Polyubiquitin linkage profiles in three models of proteolytic stress suggest the etiology of Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 2011, **286**(12): 10457-10465
- [9] Chen Z J, Sun L J. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell*, 2009, **33**(3): 275-286
- [10] McCrory E H, Akimov V, Cohen P, *et al.* Identification of ester-linked ubiquitylation sites during TLR7 signalling increases the number of inter-ubiquitin linkages from 8 to 12. *Biochem J*, 2022, **479**(23): 2419-2431
- [11] Kellsall I R, Zhang J, Knebel A, *et al.* The E3 ligase HOIL-1 catalyses ester bond formation between ubiquitin and components of the Myddosome in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, **116**(27): 13293-13298
- [12] Carvajal R, Grishkovskaya A, Gomez Diaz I, *et al.* The linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC) generates heterotypic ubiquitin chains. *Elife*, 2021, **10**: e60660
- [13] Pruneda J N, Damgaard R B. Ester-linked ubiquitination by HOIL-1 controls immune signalling by shaping the linear ubiquitin landscape. *FEBS J*, 2021, **288**(20): 5903-5908
- [14] Pao K C, Wood N T, Knebel A, *et al.* Activity-based E3 ligase profiling uncovers an E3 ligase with esterification activity. *Nature*, 2018, **556**(7701): 381-385
- [15] Wang X, Herr R A, Rabelink M, *et al.* Ube2j2 ubiquitinates

- hydroxylated amino acids on ER-associated degradation substrates. *J Cell Biol*, 2009, **187**(5): 655-668
- [16] Wang Y J, Bian Y, Luo J, *et al.* Cholesterol and fatty acids regulate cysteine ubiquitylation of ACAT2 through competitive oxidation. *Nat Cell Biol*, 2017, **19**(7): 808-819
- [17] Komander D, Rape M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem*, 2012, **81**: 203-229
- [18] Hochstrasser M. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature*, 2009, **458**(7237): 422-429
- [19] Tatham M H, Matic I, Mann M, *et al.* Comparative proteomic analysis identifies a role for SUMO in protein quality control. *Sci Signal*, 2011, **4**(178): rs4
- [20] Ohtake F, Saeki Y, Sakamoto K, *et al.* Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. *EMBO Rep*, 2015, **16**(2): 192-201
- [21] Koyano F, Okatsu K, Kosako H, *et al.* Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature*, 2014, **510**(7503): 162-166
- [22] Kazlauskaitė A, Kondapalli C, Gourlay R, *et al.* Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *Biochem J*, 2014, **460**(1): 127-139
- [23] Drew B G, Ribas V, Le J A, *et al.* HSP72 is a mitochondrial stress sensor critical for Parkin action, oxidative metabolism, and insulin sensitivity in skeletal muscle. *Diabetes*, 2014, **63**(5): 1488-1505
- [24] Youle R J, Narendra D P. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, **12**(1): 9-14
- [25] Ordureau A, Sarraf S A, Duda D M, *et al.* Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis. *Mol Cell*, 2014, **56**(3): 360-375
- [26] Schubert A F, Gladkova C, Pardon E, *et al.* Structure of PINK1 in complex with its substrate ubiquitin. *Nature*, 2017, **552**(7683): 51-56
- [27] Gladkova C, Maslen S L, Skehel J M, *et al.* Mechanism of parkin activation by PINK1. *Nature*, 2018, **559**(7714): 410-414
- [28] Dong X, Gong Z, Lu Y B, *et al.* Ubiquitin S65 phosphorylation engenders a pH-sensitive conformational switch. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(26): 6770-6775
- [29] Wauer T, Swatek K N, Wagstaff J L, *et al.* Ubiquitin Ser65 phosphorylation affects ubiquitin structure, chain assembly and hydrolysis. *EMBO J*, 2015, **34**(3): 307-325
- [30] Hepowit N L, Kolbe C C, Zelle S R, *et al.* Regulation of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers by phosphorylation. *FEBS J*, 2022, **289**(16): 4797-4810
- [31] Huguenin-Dezot N, De Cesare V, Peltier J, *et al.* Synthesis of isomeric phosphoubiquitin chains reveals that phosphorylation controls deubiquitinase activity and specificity. *Cell Rep*, 2016, **16**(4): 1180-1193
- [32] Peng J, Schwartz D, Elias JE, *et al.* A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(8): 921-926
- [33] George S, Wang S M, Bi Y, *et al.* Ubiquitin phosphorylated at Ser57 hyper-activates parkin. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2017, **1861**(11 Pt B): 3038-3046
- [34] Lee S, Tumolo J M, Ehlinger A C, *et al.* Ubiquitin turnover and endocytic trafficking in yeast are regulated by Ser57 phosphorylation of ubiquitin. *Elife*, 2017, **6**: e29176
- [35] Hepowit N L, Pereira K N, Tumolo J M, *et al.* Identification of ubiquitin Ser57 kinases regulating the oxidative stress response in yeast. *Elife*, 2020, **9**: e58155
- [36] Jaleel M, Villa F, Deak M, *et al.* The ubiquitin-associated domain of AMPK-related kinases regulates conformation and LKB1-mediated phosphorylation and activation. *Biochem J*, 2006, **394**(Pt 3): 545-555
- [37] Dikic I, Wakatsuki S, Walters K J. Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, **10**(10): 659-671
- [38] Jin L, Williamson A, Banerjee S, *et al.* Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell*, 2008, **133**(4): 653-665
- [39] Walser F, Mulder M P C, Bragantini B, *et al.* Ubiquitin phosphorylation at Thr12 modulates the DNA damage response. *Mol Cell*, 2020, **80**(3): 423-436
- [40] Deng M, Lin J, Nowsheen S, *et al.* Extracellular matrix stiffness determines DNA repair efficiency and cellular sensitivity to genotoxic agents. *Sci Adv*, 2020, **6**(37): eabb2630

Functions of Phosphorylated Ubiquitin*

JI Ran^{1,2)**}, CHEN Yilin^{1)**}, QIAN Chengmin³⁾, JIN Jianping^{1,4,5)***}

⁽¹⁾Life Sciences Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

⁽²⁾College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

⁽³⁾School of Biomedical Sciences, The University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China;

⁽⁴⁾Center for Life Sciences, Shaoxing Institute, Zhejiang University, Shaoxing 321000, China;

⁽⁵⁾Cancer Center, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Ubiquitylation, also termed ubiquitination, is one of the most important post-translational modifications in eukaryotic cells. It is a process by which a small signaling protein, called ubiquitin composed of 76 amino acids, is conjugated to protein substrates *via* an E1-E2-E3 enzymatic cascade. Ubiquitin can be attached to lysine, serine, threonine and cysteine residues of its substrates. Ubiquitin itself contains seven lysine residues, therefore, ubiquitylation can form various polyubiquitin chains to produce complex ubiquitin codes. Ubiquitylation can alter the fates of ubiquitylated proteins including kinase activation, alteration of protein localization and proteolysis *via* the 26S proteasome and is involved in nearly every aspect of biological activities in eukaryotic cells. Recent studies indicated that more complicated post-translational modifications can also be found on ubiquitin including sumoylation, ubiquitylation, phosphorylation and acetylation. These modifications largely increase the complexity of ubiquitin signals. Ser65 of ubiquitin is the first characterized phosphorylation site whose biological functions have been extensively studied in human cells. It has been shown that Ser65 phosphorylation by PINK1 kinase is critical for the activation of Parkin ubiquitin ligase during mitophagy induction. The researches on Ser65 phosphorylation of ubiquitin boosted the studies on biological significance of the rest phosphorylation sites of ubiquitin. Now it is clear that phosphorylation of Ser57 residue is involved in endocytosis and stress responses, including oxidative stress in yeast, whereas phosphorylation of Thr12 and Thr66 residues plays important roles in DNA damage response. In the case of Ser57 residue, members of the AMPK-related kinases phosphorylate it, however, mechanisms by which Ser57 phosphorylation regulates endocytosis or oxidative stress response are still unclear. Also, no experimental evidences are available in mammalian system yet. One interesting fact is that many AMPK-related kinases contain a ubiquitin-associated domain (UBA), although some studies suggested these UBA domains do not possess any binding capabilities to polyubiquitin chains. However, some of these kinases could phosphorylate the Ser57 residues on the M1 polyubiquitin chain, implying these UBA domains do recognize certain polyubiquitin chains. In this review article, we summarized the post-translational modification sites of ubiquitin, especially phosphorylation sites and highlighted the biological functions of Ser65, Ser57, Thr12, Thr66 phospho-ubiquitin proteins. We also discussed alternations of biophysical properties brought by the phosphorylation of ubiquitin. Finally, we proposed a few future research directions related to the phosphorylated ubiquitin.

Key words ubiquitin, ubiquitylation, ubiquitin code, phosphorylation, mitophagy, DNA damage repair

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0079

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31970734, 32150014), National Key Research and Development Program of China (2022YFC3401500), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities.

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-15168487596, E-mail: jianping_jin@zju.edu.cn

Received: March 9, 2023 Accepted: March 29, 2023