

泛素化介导的非蛋白质降解功能*

陈季武** 郑丽娜 王帮正 李晓涛

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要 泛素因标记被 26 S 蛋白酶体降解的蛋白质而著名。然而近几年发现, 泛素作用远不止此, 不仅具有参与蛋白质降解这一重要“传统作用”, 还起着比先前想象更多变的、更精美的细胞调控作用, 是非常重要的细胞过程的多层面调节因子, 具有许多重要的非蛋白质降解功能, 包括 DNA 损伤修复、DNA 复制、信号传导、转录调节、膜运输、胞吞、蛋白激酶活化、染色质重塑和病毒芽殖。这些功能涉及多聚泛素化和单泛素化及多泛素化。因此, 泛素化异常可能涉及疾病的发生和发展。对这些功能的了解可以拓展人们对泛素的认识, 有助于对多种细胞过程的深入理解, 也有助于相关新药的研发。

关键词 泛素, 非蛋白质降解, 多聚泛素化, 单泛素化, 多泛素化

学科分类号 Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00398

泛素(Ub)是一种由 76 个氨基酸组成的高度保守的多肽, 因其广泛分布于从酵母到人类各类细胞而得名。Ub 的“传统作用”是其 C 端 Gly 残基通过酰胺键与被 26 S 蛋白酶体降解的靶蛋白 Lys 残基的 ϵ 氨基结合, 由 Ub 激活酶(E1)、Ub 结合酶(E2)和 Ub 连接酶(E3)级联催化而完成。人基因组编码 2 种 E1s、约 50 种 E2s 和 1 000 多种 E3s, 突显了 Ub 系统的极其复杂性。此外, 已鉴别出 20 多种 Ub 结合域(UBD), UBD 可嵌入具有各种细胞功能的多种蛋白质内。因此可形成多种 Ub 修饰类型, 最简单的形式是靶蛋白结合单个 Ub 分子, 称为单泛素化。靶蛋白的多个 Lys(赖氨酸)残基同时被单个 Ub 分子标记称为多泛素化。靶蛋白的单个 Lys 残基被多个 Ub 分子标记称为多聚泛素化。多聚泛素化需要 E1、E2 和 E3 三种酶级联催化, 而单泛素化一般仅需 E1 和 E2 催化。Ub 本身也含有 7 个 Lys 残基(K6、K11、K27、K29、K33、K48 和 K63), 这些 Lys 都能与另一个 Ub 进一步偶联形成特异的多聚泛素链。通常 Ub K48 连接的多聚泛素链标记被蛋白酶体降解的蛋白质, 这一发现获得了 2004 年诺贝尔化学奖。而其他 Lys 连接的多聚泛素链具有非泛素降解和泛素降解功能, 其中 K63 连接多聚泛素化具有非泛素降解功能。此外, 通过

泛素的 N 端氨基酸可构成线性泛素链, 也具有非泛素降解功能。已发现泛素化介导的非蛋白降解功能包括 DNA 损伤修复、信号传导、转录调节、胞吞作用和蛋白激酶活化^[1-12], 因此泛素化异常可能涉及疾病的发生和发展。

1 参与 DNA 损伤修复

基因组频繁地受到外部的(如辐射)和内部的(如复制错误)各种损伤因子作用, 引起损伤, 因此 DNA 修复是保持基因组完整性所必需的。1987 年发现 DNA 修复基因 RAD6 编码 Ub 结合酶(E2), 第一次揭示了 Ub 在 DNA 修复中的作用。自此, 泛素化被看作调节各种 DNA 修复过程的中心机制。DNA 损伤反应(DDR)是由若干蛋白质构成的信号级联反应, 这些蛋白质充当 DNA 损伤的传感器、DNA 损伤信号转导器、协调 DNA 修复的效应器。显然, 许多 DDR 途径信号转导器是酶, 这些酶催化泛素化或催化蛋白质聚集 UBD^[5]。已发现

* 国家自然科学基金资助项目(30870503, 31071875, 81071657)。

** 通讯联系人。

Tel: 021-62233547, E-mail: jwchen@bio.ecnu.edu.cn

收稿日期: 2011-08-30, 接受日期: 2011-11-21

Ub 在 3 种 DDR 途径中起作用: DNA 跨损伤合成、范可尼贫血症和 DNA 双链断裂修复^[4-5, 13]. 这些 DNA 损伤耐受机制在避免破坏 DNA 复制叉或在避免更具危害性的 DNA 双链断裂中发挥着至关重要的作用.

1.1 细胞核增殖抗原修饰和 DNA 跨损伤合成修复

细胞核增殖抗原(PCNA)是三聚体复制滑动夹, 该夹绕着 DNA, 为招募其他涉及 DNA 复制和修复的蛋白质提供一个平台. 当 DNA 受到紫外线或烷化剂损伤时, RING 域 E3(RAD 18)被 RPA(一种单股结合 DNA 的蛋白质)招募至失速的复制叉, 然后 RAD 18 和 RAD 6(一种 E2)使失速复制叉上的 PCNA 在 K164 处单泛素化, 单泛素化 PCNA 招募跨损伤合成(TLS)聚合酶以置换高保真复制聚合酶. TLS 聚合酶一般显示低持续合成能力和低保真度. 所以 TLS 聚合酶可越过 DNA 损伤位点使复制继续. 之后, TLS 聚合酶被复制聚合酶置换, 恢复正常的 DNA 复制. 控制聚合酶开关的机制尚不清楚, 但 PCNA 泛素化和去泛素化可能在这开关中起关键作用. 已发现, PCNA 上的 Ub 被 Ub 特异性蛋白酶 1(USP 1)切除^[4, 5, 13].

研究显示, PCNA 被 RAD 18 和 RAD 6 单泛素化后, 通过 Ubc 13 / Mms 2 和 RAD 5, 使 PCNA 上的 Ub 进一步延伸至 K63 多聚泛素链. K63 多聚泛素化激活一条称为模板开关的跨损伤途径, 该途径招募 DNA 双链的未损伤链作为指导 DNA 合成的模板^[5]. 研究发现, K164 上的 PCNA 单泛素化便于易错 DNA 修复, 而结合在同一位点的多聚泛素化介导无错 DNA 修复^[4, 5]. S 期内, 结合 PCNA 的 SUMO 涉及正常 DNA 合成. 因此, PCNA 的同一 Lys 残基可经历 3 种不同且相互排斥的修饰.

1.2 范可尼贫血症途径

范可尼贫血症(FA)是一种常染色体隐性遗传性疾病, 可增大患癌症如白血病和鳞状细胞癌的可能性. 为应答引起链间交联的 DNA 损伤剂, 两种 FA 蛋白(FANCD 2 和 FANCI)经历单泛素化. FANCD 2 和 FANCI 形成一种复合物(ID), ID 的每一亚基泛素化都需一种泛素化 E3 复合物, 这 E3 复合物的催化亚基是 RING 域蛋白 FANCL. FANCL 的功能是与 UBE2T(一种 E2)一起催化 ID 单泛素化. 单泛素化 ID 进一步将 BRCA 2 和 RAD 51 招募到 DNA 损伤位点以通过同源重组修复 DNA 损伤. 因此 FANCD 2 和 FANCI 单泛素化成为 FA 途径 DNA 修复的关键. 单泛素化 ID 也招募 TLS 聚

合酶以跨越 DNA 损伤, 进行易错 DNA 修复^[5].

FANCD 2 和 FANCI 泛素化成为 DDR 中的关键事件提示, 这种修饰被严密调节. 而 ID 泛素化需要一种大的多亚基 E3 复合物也提示, 有一种精密水平调节. FA 核心复合物含识别 DNA 结构的亚基(如含有一个解旋酶结构域的 FANCM)以及与 FANCD 2 相互作用的亚基(如 FANCE). FANCD 2 被 ATM 和 ATR 磷酸化. 对 DT40 细胞的最新研究显示, FANCI 在各种 S/TQ 基序处磷酸化是 FANCD 2 和 FANCI 单泛素化所需的. 如同 PCNA, FANCD 2 泛素化可被 USP 1 逆转. 为应答 DNA 损伤, UPS 1 在转录水平和翻译水平上迅速下调, 导致增加 FANCD 2 单泛素化^[5].

1.3 DNA 双链断裂修复

最近研究发现, K63 多聚泛素化在同源重组修复 DNA 双链断裂(DSB)中起关键作用. 如删除鸡 DT40 细胞中 Ub 结合酶 13(Ubc 13)或用 RNAi 干扰人细胞中 Ubc 13 引发对大范围的 DNA 损伤剂超敏感, 包括对那些诱导 DSBs 的 DNA 损伤剂超敏感. 检测显示, 将 RPA、BRCA 1 和 RAD 51 招募到 DSB 位点必需 Ubc13. 而且, 在 Ubc13 缺失的细胞内, 是破坏组蛋白突变体 H2AX 的泛素化而不是破坏其磷酸化. 这些结果提示, K63 多聚泛素化对 DSB 修复非常重要^[5].

最近的许多研究为 K63 多聚泛素化如何招募各种 DNA 修复蛋白质到 DSB 位点提供了更深刻的见解. 如应用 MRN 复合物检测 DSBs, MRN 复合物可在 DNA 损伤位点招募和激活蛋白激酶 ATM, ATM 磷酸化 γ H2AX, 磷酸化的 γ H2AX 进而招募 MDC 1, MDC 1 是一种含两个 BRCT 域的适配器蛋白. 然后 MDC 1 被 ATM 磷酸化, RNF 8(一种 E3)的 FHA 域识别磷酸化 MDC 1, RNF 8 和 Ubc 13 一起催化包括 H2AX 和 H2A 在内的靶蛋白 K63 多聚泛素化. 该多聚泛素链然后被 RAP 80 UIM(Ub 相互作用基序)结构域所识别, 该结构域进一步招募包括 Brcc 36 和 BARD 1 在内的 BRC 1 效应器复合物. 因此, RNF 8 与 Ubc 13 的功能是在损伤位点构建一条多聚泛素链以招募 BRCA 1 编辑 Ub 的复合物. 利用 K63 多聚泛素链招募另一个编辑 Ub 的复合物是细胞信号中的通常主题. 如 K63 多聚泛素链招募 A20 编辑 Ub 的复合物以下行调节 NF- κ B 途径, 招募 BRCA 1 复合物至 DSBs 是同源重组修复 DNA 所必需的^[5].

2 Ub 结合域

Ub 结合域(UBD)是非共价结合蛋白修饰因子 Ub 的结构域. 迄今已发现了 20 多种 UBD, 这些 UBD 虽然结构独特, 但大多数都是围绕 Ub 的 Ile (异亮氨酸)-44 的疏水区域与 Ub 结合. 如最大类 UBD 利用一个 α 螺旋接触 Ub 的 Ile-44 表面, 这些表面包括 UIM(Ub 相互作用基序)、MIU(与 Ub 相互作用的基序)、DUIM(UIM)和 UBA(Ub 偶联). 第二大类 UBD 形成锌指, 这些结构包括 NZF(新颖锌指)、ZnF-UBP(UBP 型锌指)、ZnF-A20(A20 型锌指)和 UBZ. 这些锌指适合不同结构, 并结合独特表面 Ub. 如 ZnF-A20 结合围绕 Ub 的 Asp-58 表面, 而 UBZ 利用一个 MIU 样 α 螺旋接触 Ub 的 Ile-44 疏水区域.

3 参与信号传导

E1、E2 和 E3 级联催化可使靶蛋白泛素化, 靶蛋白上泛素和多聚泛素链也可被去泛素酶解离. 因此, 泛素化是动态、可逆、共价的修饰, 很像磷酸化^[9].

磷酸化和去磷酸化由激酶和磷酸化酶大家族催化. 与磷酸化和去磷酸化相似, 泛素化和去泛素化由泛素化酶和去泛素化酶大家族催化.

3.1 Ub 信号的识别

一般而言, 偶联 Ub 对靶蛋白构象改变不大, 主要是调节靶蛋白的表面性质, 这种调节大部分是通过提供一个额外的相互作用位点来实现. 因此, 单体或多聚体形式的 Ub 信号常通过 Ub 受体来传递, 这些 Ub 受体是识别特异标记的调节因子. 在迄今发现的 20 多种 UBD 中, 许多 UBD 没有识别能力, 只有与其他识别底物蛋白质的结构域一起才能获得对特异 Ub 信号的识别能力. 然而, 某些 UBD 对特殊类型的多聚泛素连接有高度选择性, 甚至能区分结构相似的 K63 连接链和线性链, 也就是说, 能区分不同 Ub 修饰, 使 Ub 成为多功能信号^[1,4].

3.2 作为可诱导信号和可逆信号

许多刺激和细胞内上游信号事件可诱导蛋白质泛素化. 例如, 应用细胞外配基刺激时, 各种细胞表面受体泛素化. 又如许多细胞质蛋白和细胞核蛋白磷酸化后被泛素化. 此外, Ub 连接酶的功能被诸如区域化、降解、低聚和翻译后修饰那样的信号诱导机制严密调节, 这一水平调节尤为重要, 因为

Ub 连接酶在特异识别底物中起核心作用. 泛素化系统第二个关键特征是去泛素化酶(DUB)可迅速移除 Ub. DUB 充当关闭 Ub 信号或在同一 Lys 残基的不同修饰之间移动. 显然泛素化与磷酸化相似. 而且, 这两种修饰都被特异蛋白结构域所识别, 为 Ub 或磷酸信号转移至下游效应器提供了一种机制. 有趣的是, 磷酸化虽不被普遍需要, 但磷酸化有时是一种先于蛋白质泛素化的信号. 如 Ub 连接酶(如 Cb 1)的磷酸化或底物蛋白(如 Eps 15, I κ B)的磷酸化^[2]. 研究也发现, K63 连接的泛素化也可调节磷酸化酶定位和活性^[14]. 这表明磷酸化和泛素化在细胞内紧密联系. 这两种系统之间的主要差异在于 Ub 是化学上比磷酸复杂得多的分子, 因为 Ub 具有与其他蛋白质相互作用的较大表面. 此外, Ub 能形成不同链的事实进一步增大了其复杂性. 如 Ub^{K63} 链和 Ub^{K48} 链具有不同构象, Ub^{K63} 链比 Ub^{K48} 链长得多, 表明这两种链在细胞内各有独特的标记和功能. 所有这些特征允许泛素化系统整合和同步化从细胞膜到核的各种通路的蛋白质网络^[2]. 如各种细胞表面受体单泛素化起着胞吞信号的作用. 泛素化是指导亚细胞定位、受体细胞内运输以及通过调节信号的质量、强度和持续时间来调节受体信号的重要信号. 又如 p53 蛋白受 REG γ 介导被单泛素化而出核, p53 蛋白单泛素化可作为进一步加强 p53 蛋白多聚泛素化的信号, 也将显著加强 p53 与负调节因子 HDM2 间的相互作用^[15]. 许多研究表明, 通过修饰组蛋白和转录因子, 单泛素化对转录调节起关键作用. 还发现可逆 SUMO 和 Ub 修饰之间的相互作用是核 Ub 网络的共同调节机制^[2].

Ub 信号传导作用的最典型例子是 Ub 在调节 NF- κ B 途径的信号传导中起关键作用. NF- κ B 是转录因子家族, 这些因子调节涉及免疫、炎症和细胞生存的大量基因表达. NF- κ B 激活必需降解抑制剂 I κ B. 由活化 I κ B 激酶(IKK)磷酸化 I κ B, 由 Ub 连接酶多聚泛素化标记磷酸化 I κ B, 泛素化 I κ B 被 26 S 蛋白酶体降解而使 NF- κ B 进入核内而启动靶基因的表达^[9]. 值得注意的是, 涉及调节 IKK 的许多蛋白质具有 Ub 相关的功能, 包括 Ub 结合(如 TRAFs, cIAPs 和 Ubcs)、解离(如 A20 和 CYLD)和识别(如 NEMO 和 TAB2). NF- κ B 信号通路的大量研究不仅揭示泛素化在调节不同途径 IKK 的核心作用, 而且也显示这些通路的信号机制极其复杂. 如 IL-1 β 途径的 IKK 活化必需 K63 泛素化.

TNF α 途径的 IKK 活化机制显得更复杂, 不仅 Ubc13 和 K63 多泛素化是肿瘤坏死因子 α (TNF α) 激活 IKK 非必需的, 而且删除信号蛋白如 TRAF2、RIP1 或 TAK1 仅导致部分抑制 IKK. 而必需调节亚基 NEMO 的泛素化对活化 IKK 极其重要, NEMO 可以单泛素化或 K6、K63 泛素化标记或线性泛素链标记^[6]. 而几种 DUB 通过切除 K63 多聚泛素链或阻止多聚泛素链合成而抑制 TAK1 和 IKK 的发现, 进一步强化了泛素化调节 NF- κ B 信号通路的作用. 例如, 家族圆柱瘤的肿瘤抑制蛋白 (CYLD) 是一种特异切除 K63 多聚泛素链的 DUB^[16-17]. A20 是另一种具有强力抗炎活性的 DUB, 不仅解离多聚泛素链, 而且通过阻抑 TRAF6 和 Ubc13 之间的相互作用而阻止多聚泛素链合成^[18-19]. 积累的证据也显示, DUB 在调控天然免疫受体信号中起着至关重要的作用^[20]. 这些新颖和有趣的发现为 Ub 调节多种重要细胞功能的信号传导通路开辟了新途径.

4 参与转录调节

泛素化修饰是转录后的修饰方式之一. 组蛋白泛素化可参与基因的转录、异染色质的基因沉默、DNA 修复等许多核过程. 在芽殖酵母内, Ub 结合酶 RAD6 (Ubc2) 单泛素化组蛋白 H2B 的 K123, 泛素化 H2B 又介导组蛋白 H3 的 K4 甲基化. 含组蛋白乙酰化转移酶的 SAGA/SLIK 复合物乙酰化组蛋白 H3 和 H2B, 又利用去泛素化酶 Ubp8 去除 H2B 的泛素化. 最近已表明这些复合物包括蛋白 Chd 1, Chd 1 识别 H3 的甲基化 K4 以调控转录. 而 E3 复合 Polycomb 抑制复合物 1 促使组蛋白 H2A 泛素化, 使 H2A 泛素化与 Polycomb 基因沉默联系起来^[12].

研究还发现, 泛素化的组蛋白 H2B 优先富集于染色质的转录激活域, 组蛋白 H2B 的泛素化还与聚合酶的延伸有关^[9], 由此可以推测组蛋白 H2B 的泛素化能够促进基因的转录.

转录因子翻译后修饰也是基因功能复杂调节的方式之一. 例如, F-box 蛋白 Dsg1/Mdm30 需要芽殖酵母转录因子 Gal4 泛素化. Dsg1/Mdm30 刺激 Gal4 转化, 因此影响 Gal4 转录活性. 哺乳动物转录因子翻译后修饰的经典例子是肿瘤抑制因子 p53, p53 C 端的 Lys 残基泛素化、SUMO 化调控 p53 的稳定性和生物学活性^[12].

Kurosu 等报道了激活因子泛素化便于转录延伸的证据. 他们构建了 VP16 的激活域(野生型或突变型)与 LexA DNA 结合域结合的嵌合基因 (LexA-VP16), 或与 HIV Rev 蛋白的 RNA 结合域结合的嵌合基因(Rev-VP16). 当哺乳动物细胞内表达含有野生型 VP16 激活域的融合蛋白时, 这些融合蛋白被泛素化并刺激同源报告基因表达. 这些实验从三方面提示促进转录延伸. 首先, 应用基于 DNA 的富集(结合一个启动子序列的 LexA)或基于 RNA 的富集(结合报告基因转录的启动部分 Rex)观察到激活转录; 第二, 应用显性失活形式的 Cdk9 蛋白阻止刺激, 表明转录活性依赖 P-TEFb; 第三, 利用突变 VP16 结构域导致报告基因远端区域表达丰度比近端区域低, 提示暂时或永久终止转录^[9], 这显示了 Ub 在这种转录延伸活性中的作用. 在体外, 显示 LexA-VP16 结合 P-TEFb 的 CycT1 亚基, 而 Ub-LexA-VP16 甚至更急切地与 CycT1 结合. 实际上, VP16 和 Ub 与 CycT1 的不同区域结合, 所以当 VP16 和 Ub 都存在时, 其相互作用更强. 提出的模型是激活因子蛋白标记 Ub 导致增强招募 P-TEFb, 因此增强转录延伸^[9].

5 参与胞吞作用

泛素化的非蛋白质降解功能之一涉及酵母的胞吞过程, 该过程的单泛素化足以作为一种胞吞内化信号, 而 Ub^{K63} 分支结构便于胞吞作用. 酵母中许多质膜蛋白依赖于内化的泛素化, 但这种情况在动物细胞中还不是很清楚. 研究已表明, 单泛素化是受体胞吞的几个步骤中的重要信号. 各种细胞表面受体单泛素化起着胞吞信号的作用^[9], 早期的证据清楚地显示了生长素受体内化的泛素化过程, 但该受体本身不需泛素化. 关于转化生长因子 β (TGF- β) 的研究提示, 受体泛素化可以决定胞吞内化途径. 当 TGF- β 受体与 Smad 7-Smurf 2 E3 Ub 连接酶偶联时, 该受体定位于胞膜窝, 内化后被迅速降解. 当 TGF- β 受体与 Smad 锚偶联以激活受体时, 该受体可经由网格蛋白被小窝而内化. 因此, Ub 调节的胞吞内化路线在决定信号转导或受体下调中起着至关重要的作用.

胞吞内化受体泛素化的研究多数集中于该泛素化在活化哺乳动物受体酪氨酸激酶下调中的潜在作用, 因为这一机制还没完全搞清楚. 在 HeLa 细胞中, 用低浓度表皮生长因子(EGF)刺激表皮生长因

子受体(EGFR)时, 没检测出 EGFR 泛素化, 该 EGFR 定位于网格蛋白. 然而, 用高浓度 EGF 刺激时, 检测出 EGFR 泛素化, 泛素化 EGFR 定位于胞膜窝和网格蛋白. 有网格蛋白时, 底物蛋白 (epsin) 不能与泛素化货物(cargo)相互作用. Epsin 被认作是泛素化货物与网格蛋白之间的胞吞衔接器. 在动物细胞中, 单个 Ub 可作为内化信号, 但是受体泛素化或许不需要网格蛋白介导 EGFR 内化^[1].

虽然单泛素化有时足以胞吞内化, 但通常发生的识别和摄入泛素化货物需要通过多价 Ub-UBD 相互作用来稳定货物 - 适配器复合体. 所以推测, Ub^{K63} 多聚泛素化或许特别适合作为一种有效的胞吞信号. Ub^{K63} 链的延伸结构具有线性拓扑结构, 对准邻接 Ub 链, 使它们的疏水表面便于结合, 这就增强了结合 UBD 的亲和力. 因此较高亲和力和能促使偶联 Ub^{K63} 的蛋白富有成效地内化, 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, Ub^{K63} 多聚泛素化提供了一种替代机制.

某些膜蛋白的胞吞似乎需要多聚泛素化, 如有 β_2 - 肾上腺素受体(β_2 AR)情况下, 拮抗剂刺激导致 β_2 AR 和受体调节蛋白 β - 抑制蛋白迅速多聚泛素化. β_2 AR 内化可能需要 β - 抑制蛋白多聚泛素化. 酵母蛋白总氨基酸通透酶需要形成 Ub^{K63} 短链以便有效内化以响应介质的氮状态变化. 相似地, 神经生长受体酪氨酸受体激酶 A(TrkA)内化和信号传导需要 TrkA 的 Ub^{K63} 泛素化. 体内泛素链拓扑结构的作用现在被低估, 拥有 Ub^{K63} 链比先前想象的更为重要, 特殊的 UBD 能选择性识别 Ub^{K63} 链^[1].

6 参与蛋白激酶活化

在研究 NF- κ B 信号途径过程中揭示了 Ub 在蛋白激酶活化中的作用. 原型 NF- κ B 复合物通过结合 I κ B 家族的抑制蛋白, 被正常地隔离在细胞质内. 包括促炎反应细胞因子和微生物病原体在内的各种抗原刺激细胞导致激酶 IKK 活化, IKK 由 IKK α 、IKK β 和 NEMO 构成. IKK 磷酸化 I κ B 蛋白, 磷酸化 I κ B 蛋白被 SCF 泛素 E3 复合物泛素化. 泛素化 I κ B 蛋白被 26 S 蛋白酶体迅速降解, 使 NF- κ B 进入细胞核以调节基因表达^[5-9]. 所以 IKK 活化是激活 NF- κ B 的重要环节. 已清楚显示泛素化通过非依赖蛋白酶体的机制调节 IKK 活化.

研究发现, K63 多聚泛素化在白介素 1 和 Toll

样受体途径中起激活蛋白激酶的关键作用^[9]. 已知 TRAF6 是一种介导 IKK 活化的 E3 酶, 在白介素 1 和 Toll 样受体途径激活蛋白激酶中发挥着重要的作用, 而由 Ubc 13 和 Uev 1A 构成的 E2 复合物也负责 IKK 活化, E2 复合物与 TRAF6 一起催化靶蛋白形成 K63 多聚泛素链, 这些靶蛋白包括激酶 IRAK 1、激酶 NEMO 和 TRAF6 本身. K63 多聚泛素链结合 TAK 1 激酶复合物的关联蛋白 TAB 2 和 TAB 3 的 NIF 域, 导致 TAK 1 激酶活化. 多聚泛素化也充当脚手架以通过结合 NEMO 的 NUB 域招募 IKK, 因此使 TAK 1 激酶在其活化环内的两个丝氨酸残基处磷酸化 IKK β , 导致 IKK 活化.

近年来发现, K63 多聚泛素化激活蛋白激酶的作用不限于白介素 1 和 Toll 样受体途径, K63 多聚泛素化对多条导致 NF- κ B 活化途径中的蛋白激酶活化起关键作用, 这些途径包括源自 TNF 受体 (TNFR)、T 细胞受体(TCR)、NOD 样受体(NLR)、RIG-1 样受体(RLR)、DNA 损伤和病毒蛋白的途径. 如 DNA 双链断裂激活蛋白激酶 ATM, ATM 使核 NEMO 在 Ser85 处磷酸化, 随后 NEMO 被泛素化, 并与 ATM 一起出核. 在胞质中泛素化 NEMO 偶联 IKK α 和 IKK β , 允许 ATM 激活 IKK^[9]. 所以, 泛素化介导蛋白激酶活化是各种途径调节 NF- κ B 的共同机制.

泛素化也调节 MAP 激酶(如 TAK1、JNK 和 p38) 活化, 提示泛素化在调节免疫和炎症的蛋白激酶活化中有更普遍的作用^[9].

值得注意的是, DUB 可负调节蛋白激酶. 已发现几种 DUB 在 IKK 活化的上游水平负调节 NF- κ B. 第一个被发现抑制激酶 IKK 的 DUB 是 CYLD. A20 是另一个在 IKK 上游抑制 NF- κ B 的 DUB. CYLD 和 A20 这些 DUB 解离 K63 泛素化链以减弱信号传递的级联反应^[5, 19-21].

7 泛素化与疾病

泛素化广泛参与翻译后修饰以调节细胞过程, 因此, 泛素化系统失常将导致疾病或恶性肿瘤. 研究显示, 泛素化途径的更改涉及几种疾病如癌症和神经退行性紊乱的发病机理. 如在许多人类神经退行性紊乱中积累了富含 Ub 的不溶性蛋白沉淀物和 Ub- 蛋白酶体系统的组分, 因此 Ub 与神经退行性疾病密切相关. 如泛素化缺陷被认为是帕金森疾病发生的重要原因. 人身心失调中都发现 Ub、泛素

化酶(E1s、E2s、E3s)、DUB 和泛素化底物的突变^[2]。许多 Ub 连接酶是原初致癌基因蛋白的事实^[2]强化了泛素化对人体健康的重要性。

几种病原菌和病毒已进化出破坏自身末端 Ub 系统的机制。例如,炭疽毒素触发自身受体泛素化以便有效且迅速胞吞毒素-受体复合物,毒素-受体复合物的胞吞对毒素作用非常重要,因为穿过低 pH 胞吞区域的通道使毒素有能力诱导细胞毒性。耶尔森氏鼠疫杆菌则产生一种非毒力因子 YopJ(一种 DUB),抑制 NF- κ B 活化。另一方面,许多病毒编码 E3 Ub 连接酶以便下调免疫通路的蛋白质。如 KSHV 免疫识别 1 的调节子(一种 E3)能介导 MHC 类型 I 分子的 Cys 残基泛素化。非 Lys 残基也被泛素化标记的发现,扩大了潜在底物的数目,使不含易接近 Lys 的分子或不含易接近 N 端的分子也成为潜在底物。底物会发生短暂的泛素化,且比其他形式的泛素化更难检测,因为 Ub-Cys 的硫酯键比 Ub-Lys 的异构肽键更不稳定。所以,Ub 参与的调节过程比先前想象的更复杂。

泛素化也为治疗先前难于标记的靶点提供了一个切入点。例如, Myc 是肿瘤中失调的至关重要的转录因子,但是难以化疗靶标,因为 Myc 没有酶活性。而 E3 连接酶 HectH 9 催化 Ub^{K63} 修饰 Myc 是肿瘤增殖的关键。作为一种酶, HectH 9 应该比 Myc 更适合成为化疗靶点^[1]。

8 去泛素化与疾病

积累的资料显示,不仅泛素化与疾病相关,去泛素化也与疾病相关。去泛素化的行使者是 DUB。人 DUB 大多数属于半胱氨酸蛋白酶,它们可以分成 5 大类: Ub 特异性蛋白酶(USP)、Ub 羧基端水解酶(UDH)、卵巢肿瘤样蛋白酶(OTU)、JAMM/MPN 金属蛋白酶和马-约病蛋白酶(MJD)。这些 DUB 都是致癌或抑癌 E3 连接酶的直接抑制剂。A20、CYLD、DUBA、USP9 和 USP14 就是典型的 DUB。其中, A20 最近已被鉴定为各种淋巴瘤的关键肿瘤抑制因子, A20 是一种能衰减前炎性受体近侧信号复合物活性的 Ub 编辑酶,现被认为是炎症的核心调节因子,是炎症的全局(global)负调节因子,是 NF- κ B 的抑制剂。A20 可调节炎性信号级联反应,而慢性炎症与肿瘤发生相关, A20 的这些功能提供了一种解释泛素化失调如何促进肿瘤发生的机制。A20 失活与肿瘤发生相关的新

发现也为深刻理解致癌信号途径和肿瘤微环境的复杂生物学提供了重要资料。因此,有人提出在恶性细胞内选择性恢复 A20 活性的治疗新思路^[19-21]。研究也显示,敲除 CYLD 的小鼠对由右旋糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎症更敏感,已知 DSS 引起结肠黏膜损伤,导致共生细菌入侵和结肠黏膜内的天然免疫细胞活化,这一发现显示了 CYLD 调节宿主应答感染的作用。所以敲除 CYLD 的小鼠对 DSS 诱导的炎症敏感性更高,显示了 CYLD 在结肠黏膜对微生物天然免疫应答的负调节作用。最近的遗传学证据揭示,小鼠的 CYLD 缺陷或病人的 CYLD 和 A20 基因突变导致 NF- κ B 过度活化,导致肿瘤敏感或肿瘤发生^[20,22]。研究也表明,病毒感染的天然免疫反应涉及 TBK1 和 IKK 活化以及下游转录因子 IRF3 和 IRF7 的活化。关键中间分子 TRAF3 可将 TBK1 和 IKK 与上游信号分子相连。而 DUBA 物理性地与 TRAF3 相互作用,抑制 TRAF3 自泛素化,而 TRAF3 的 K63 多聚泛素链有利于 TRAF3 TBK1 - IKK 复合物结合。同时 DUBA 也干扰 TRAF3 结合 TBK1。所以, DUBA 能调节抗病毒天然免疫^[20]。USP7 也是一种 DUB,能结合核内泛素化 PTEN,诱导 PTEN 去泛素化,并核输出 PTEN。而 PTEN 泛素化促进多发性错构瘤综合征发展。USP7 也与泛素化 p53 相互作用,促进 p53 去泛素化。这些结果提示 USP7 是促进癌症发展的致癌事件。与这一观点一致, USP7 在前列腺癌扩增,限制细胞增殖。USP28 也是一种 DUB,在癌细胞中过表达,它的沉默导致细胞增殖和转化,表明 USP28 具有致癌活性^[14]。USP14 则能通过修剪泛素链来抑制 Ub 标记蛋白的降解,即通过泛素链长度修剪机制调控蛋白酶体活性,使通过抑制 USP14 而提高蛋白酶体活性成为一种耐受蛋白毒应激而降低细胞内异常蛋白水平的策略^[24]。研究也显示,缺失 USP14 导致小鼠突触传递异常和运动失调;缺失 USP14 导致运动失调小鼠体内 Ub 水平降低,而 Ub 水平改变涉及退行性神经疾病^[25]。USP9X 则为广泛表达的一个基因,编码 DUB。USP9X 具有稳定祖细胞和干细胞多能性的重要基因 MCL1 表达、维持癌细胞稳定的功效。USP9X 能结合在 MCL1 上,并停止 K48 多聚泛素化链反应。在淋巴瘤和 B 细胞淋巴瘤中,增加 USP9X 的表达量可促进 MCL1 蛋白的表达量。研究发现 USP9X 过量表达的患者往往预后不良,敲除 USP9X

可增加 MCL1 的泛素化活性, 可有效改变 MCL1 的表达. 这些结果都表明, USP9X 是癌症患者预后的评价标志, 也可能是一个新的癌症治疗靶位. 去泛素化可能是癌细胞维持稳定的一种机制^[26].

9 结论与展望

Ub 不仅能标记被蛋白酶体降解的蛋白质, 而且行使许多非蛋白质降解功能. 由于 Ub 的 7 个 Lys 残基都分布在分子表面, 易被进一步泛素化, 所以不同连接链具有独特的构象, 这种 Ub 结合的链接特异性为修饰靶标产生了结构可辨别且结果唯一的信号, E2 或 E3 酶介导了 Ub 结合的链接特异性. 其中, 单泛素化涉及胞吞、DNA 修复、转录调节、核内体分型、组蛋白调节、核输出、病毒出芽; 多泛素化涉及胞吞; K63 多聚泛素化涉及胞吞、DNA 修复、蛋白激酶激活; 这三类泛素化绝大多数为非蛋白质降解作用. K48 多聚泛素化通常涉及“传统”的蛋白质降解功能^[1-6]. 而 K6、K11、K27、K29 和 K33 泛素链涉及非蛋白质降解和蛋白质降解功能, 如 K27 参与激酶激活和蛋白质降解, K6、K11、K29 参与 DNA 修复和蛋白质降解, K33 参与蛋白质相互作用和蛋白质降解. 此外, 线性多聚泛素链参与信号传导途径活化^[6-10, 14].

一般而言, UBD 以低亲和、低选择性结合 Ub 和 Ub 链, 因此分选不同命运的泛素化蛋白的特异性不能仅依赖 Ub 与 UBD 之间的唯一相互作用, 泛素化蛋白的其他结构域和泛素化受体之间的附加相互作用也大大提高了分选特异性. 时间和空间也在决定泛素化信号的特异性中起重要作用. 因细胞内富含 DUB 而使泛素链非常易变, 所以特定底物上的泛素链“寿命”可能非常短暂. 这样, 泛素化蛋白和 Ub 受体之间的相互作用必须在正确的位点、正确的时间发生^[6].

上述事实表明, Ub 是非常重要的细胞过程的多层面调节因子. 为了从分子水平上理解这些过程是如何发生和发展的, 非常需要理解 Ub 修饰如何控制蛋白质功能、活性和定位, 理解 Ub 信号如何被传导并转化为调节下游细胞事件. 阐明这些问题的关键是体内 Ub 结合蛋白识别泛素化底物, 这可深刻理解由几种信号过程诱导的蛋白质泛素化是如何允许形成蛋白质与蛋白质相互作用网络, 也要鉴别调节各种细胞功能的关键泛素修饰酶. Ub 的许多基本原理和机制也有待阐明, 如众多 E2 和 E3 是如何互相选择? 它们如何构成特异类型的 Ub

链? 它们如何选择底物? 装配和调节多大 Ub 编辑的复合物? UBD 和 Ub 连接酶功能如何协调? 时间和空间是如何控制泛素化信号的特异性?

Ub 的重要非蛋白质降解功能除了涉及 DNA 损伤修复、信号传导、转录调节、胞吞作用和蛋白激酶活化外, 还涉及 DNA 复制、膜运输、基因沉默、染色质重塑和病毒芽殖以及调节蛋白质定位、蛋白质功能、蛋白质与蛋白质相互作用^[5, 9, 11, 14]. 这些功能的陆续发现提示 Ub 在调节各种细胞功能中有着更广泛的作用. 值得一提的是, Ub 参与细胞过程调节有时属于非蛋白质降解作用, 有时属于蛋白质降解作用, 有时是这两种功能协同作用.

Ub 广泛存在于细胞内. 此外, 在细胞内还发现多种 Ub 样分子, 其典型代表是小泛素相关修饰物(SUMO), SUMO 与 Ub 在氨基酸序列上虽然只有 18% 相同, 但在二级和三级结构上极其相似. SUMO 的发生机制也与泛素化相似, 由 E1、E2、E3 级联催化. 因此 SUMO 具有类似于 Ub 的修饰功能, 如调节蛋白质在细胞内的定位和分布, 调节 DNA 修复和调控转录等^[27-29]. 但 SUMO 化与泛素化又有不同, 它并不促使蛋白质降解, 反而是加强蛋白质的稳定性. 这些发现进一步突显了泛素化和类泛素化在细胞调节过程中的广泛作用, 这些泛素化和类泛素化修饰也极大地扩展了蛋白质功能的多样性.

展望未来, 预计将发现更多的 Ub 非蛋白质降解功能的事例. 随着对泛素化的非蛋白质降解功能和机理的深入理解, 将有助于深入理解泛素化如何调节细胞过程, 泛素化失调是如何引起疾病, 也将有助于筛选相关疾病的新靶点和新药.

参 考 文 献

- [1] Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*, 2007, **315**(26): 201-205
- [2] Haglund K, Dikic I. Ubiquitylation and cell signaling. *The EMBO J*, 2005, **24**(19): 3353-3359
- [3] Finley D, Ciechanover A, Varshavsky A. Ubiquitin as a central cellular regulator. *Cell*, 2004, **116**(2): 29-32
- [4] Ulrich H D, Walden H. Ubiquitin signalling in DNA replication and repair. *Molecular Cell Biology*, 2010, **11**(7): 479-489
- [5] Chen Z J, Sun L J. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Molecular Cell*, 2009, **33**(3): 275-286
- [6] Liu S Q, Chen Z J. Expanding role of ubiquitination in NF- κ B signaling. *Cell Research*, 2011, **21**(1): 6-21
- [7] Adhikari A, Chen Z J. Diversity of polyubiquitin chains.

- Developmental Cell, 2009, **16**(4): 485–486
- [8] Malynn B A, Ma A. Ubiquitin makes its mark on immune regulation. *Immunity*, 2010, **33**(6): 843–852
- [9] Herrera F J, Triezenberg S J. Molecular biology: what ubiquitin can dispatch do for transcription. *Current Biology*, 2004, **14**(15): 622–624
- [10] Sigismund S, Polo S, Di Fiore P P. Signaling through monoubiquitination. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2004, **286**: 149–185
- [11] Woelk T, Oldrini B, Maspero E, *et al.* Molecular mechanisms of coupled monoubiquitination. *Nature Cell Biology*, 2006, **8** (11): 1246–1254
- [12] Welchman R L, Gordon C, Mayer R J. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Molecular Cell Biology*, 2005, **6**(8): 599–609
- [13] 吕翎娜, 唐铁山, 郭彩霞. 哺乳动物跨损伤 DNA 聚合酶 Pol 研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2011, **38**(3): 204–209
Lü L N, Tang T S, Guo C X. *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38**(3): 204–209
- [14] Yang W L, Zhang X, Lin H K. Emerging role of Lys-63 ubiquitination in protein kinase and phosphatase activation and cancer development. *Oncogene*, 2010, **29**(32): 4493–4503
- [15] Liu J, Yu G, Li X T, *et al.* REGgamma promotes cancer development by inactivating the tumor suppressor p53. *J Cell Sci*, 2010, **123**(23): 4076–4084
- [16] Trompouki E, Hatzivassiliou E, Tschirritzis T, *et al.* CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF- κ B activation by TNFR family members. *Nature*, 2003, **424**(6950): 793–796
- [17] Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, *et al.* The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF- κ B signaling by deubiquitination. *Nature*, 2003, **424**(6950): 801–805
- [18] Wertz I E, O'Rourke K M, Zhou H, *et al.* De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- κ B signaling. *Nature*, 2004, **430**(7000): 694–699
- [19] Shembade N, Ma A, Harhaj E W. Inhibition of NF- κ B signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science*, 2010, **327**(5969): 1135–1139
- [20] Sun S C. Deubiquitylation and regulation of the immune response. *Immunology*, 2008, **8**(7): 501–511
- [21] Hymowitz S G, Wertz I E. A20: from ubiquitin editing to tumour suppression. *Cancer*, 2010, **10**(5): 332–341
- [22] Sun S C. CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF-kappaB activation and diverse biological processes. *Cell Death Differ*, 2010, **17**(1): 25–34
- [23] Kato M, Sanada M, Kato I, *et al.* Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*, 2009, **459**(7247): 712–716
- [24] Lee B H, Lee M J, Park S, *et al.* Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature*, 2010, **467**(7312): 179–184
- [25] Anderson C, Crimmins S, Wilson J A, *et al.* Loss of Usp14 results in reduced levels of ubiquitin in ataxia mice. *J Neurochemistry*, 2005, **95**(3): 724–731
- [26] Schwickart M, Huang X D, Lill J R, *et al.* Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature*, 2010, **463**(7277): 103–107
- [27] Dohmen R J. SUMO protein modification. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1695**(1–3): 113–131
- [28] 黄 海, 朱南南, 焦仁杰. SUMO 化信号途径对 JNK 信号通路活性的调控. *生物化学与生物物理进展*, 2011, **38**(6): 568–574
Huang H, Zhu N N, Jiao R J. *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38**(6): 568–574
- [29] Chen H, Qi L. SUMO modification regulates the transcriptional activity of XBP1. *Biochem J*, 2010, **429**(1): 95–102

The Nonproteolytic Functions Mediated by Ubiquitylation*

CHEN Ji-Wu**, ZHENG Li-Na, WANG Bang-Zheng, LI Xiao-Tao

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

Abstract Ubiquitin is best known for targeting protein degradation by the 26 S proteasome. In recent years, however, roles of ubiquitin are found far more than these. Ubiquitin not only has "traditional function" participating proteins degradation, but also plays a more varied and decisive role in cellular regulation than previously imagined. It is a multilayer regulator of important cellular processes and has a great many nonproteolytic functions including DNA damage repair, DNA replication, signal transduction, transcriptional regulation, membrane trafficking, endocytosis, protein kinase activation, chromatin remodeling and virus budding. These functions involve polyubiquitylation, monoubiquitylation and multiubiquitylation. Therefore, abnormalities in ubiquitylation involves occurrence and development of diseases. Understanding these functions will provide further insights into the repertoire of ubiquitin, help to understand diverse cellular processes and facilitate our development of related new drugs.

Key words ubiquitin, nonproteolysis, polyubiquitylation, monoubiquitylation, multiubiquitylation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00398

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30870503, 31071875, 81071657).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-62233547, E-mail: jwchen@bio.ecnu.edu.cn

Received: August 30, 2011 Accepted: November 21, 2011