



LUBAC 介导 RabGEF1 的线性泛素化修饰*

黄彬^{1,2)} 张令强^{2)**} 张学利^{1)**}⁽¹⁾ 安徽理工大学附属上海市奉贤区中心医院, 上海 201499;⁽²⁾ 军事科学院军事医学研究院生命组学研究所, 国家蛋白质科学中心(北京), 北京 102200)

摘要 目的 验证 RabGEF1 (Rab guanine nucleotide exchange factor 1) 为线性泛素化修饰的新底物。方法 在 pEF6/Myc-His C 载体中克隆人 RabGEF1 基因。通过免疫共沉淀 (Co-IP) 实验验证 RabGEF1 和 HOIP 的相互作用。利用 GST-pulldown 实验探索 RabGEF1 与 HOIP 相互作用结构域。通过免疫荧光实验验证 RabGEF1 和 HOIP 的相互作用与亚细胞定位。应用体内泛素化实验检测 RabGEF1 的线性泛素化修饰。通过 NTA-His 泛素化实验进一步明确 RabGEF1 能够发生线性泛素化修饰。将 RabGEF1 的泛素化蛋白质样品进行质谱分析, 根据质谱结果提示的 RabGEF1 泛素化位点构建赖氨酸位点突变质粒, 进一步在体内泛素化实验中验证 RabGEF1 的线性泛素化修饰位点。结果 RabGEF1 与 HOIP 存在相互作用, 且 HOIP 通过 ZF-NEF 结构域与 RabGEF1 发生直接相互作用。RabGEF1 与 HOIP 共同定位于细胞质。LUBAC 介导 RabGEF1 发生线性泛素化修饰依赖于 LUBAC 酶活性, RabGEF1 泛素化修饰位点为 K158。结论 RabGEF1 为线性泛素化修饰的新底物, 且 K158 是其发生线性泛素化修饰的位点。

关键词 RabGEF1, 线性泛素化修饰, LUBAC, 免疫共沉淀
中图分类号 Q7, R392

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0089

泛素 (ubiquitin) 是一种广泛存在于真核生物体内且序列高度保守的小分子蛋白质, 含有 76 个氨基酸 (约 8.5 ku)^[1]。泛素化 (ubiquitination) 修饰是一种重要的翻译后修饰, 参与多种细胞生物学活动如蛋白质降解^[2]、内吞、细胞周期进程^[3]、免疫反应^[4]、DNA 损伤修复、信号转导^[1] 等。泛素化修饰过程是在泛素活化酶 (ubiquitin-activating enzymes, E1)、泛素缀合酶 (ubiquitin-conjugating enzyme, E2)、泛素连接酶 (ubiquitin ligase, E3) 的作用下使泛素分子发生一系列的酶促反应, 最终使泛素分子的羧端甘氨酸共价连接到相应底物蛋白的赖氨酸位点上^[1-2]。泛素化修饰包括单泛素化修饰与多聚泛素化修饰^[2]。单个泛素连接到底物蛋白上称为单泛素化修饰; 在此基础上, 泛素分子继续结合到前一个泛素分子的赖氨酸残基上形成长链称为多聚泛素化修饰。泛素分子本身含有 7 个赖氨酸残基和 1 个氨基端起始的甲硫氨酸残基, 泛素之间通过这 8 个不同的氨基酸位点连

接形成的 8 种泛素链, 其中 7 种为泛素分子羧基端的甘氨酸 (G) 与底物蛋白的赖氨酸 (K) 相连接的方式, 包括 K6、K11、K27、K29、K33、K48 和 K63 位的多聚泛素化修饰^[5]。目前多聚泛素化修饰的研究多集中于 K48 和 K63 型^[6], K48 型的多聚泛素链最具特征, 已被证明是 26S 蛋白酶体识别的降解信号。K63 型的多聚泛素化修饰在信号传导^[7] 和 DNA 修复中起作用, 而不会引起降解^[8]。日本科学家 Kirisako 等^[9] 报道了一种由 E3 酶复合体决定的全新的泛素化修饰方式, 由远端泛素的羧基基团 76 位甘氨酸连接在近端泛素氨基端的甲硫氨酸 (M) 上, 这种修饰类型被称为线性泛素化 (linear ubiquitin)。

* 国家自然科学基金 (81772959) 和奉贤区科委社会类科技发展基金 (20191101) 资助项目。

** 通讯联系人。

张学利 Tel: 021-57524800, E-mail: lejing1996@aliyun.com

张令强 Tel: 010-66931216, E-mail: zhanglq@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2022-03-15, 接受日期: 2022-05-05

线性泛素化修饰由线性泛素链组装复合体 (linear ubiquitination assembly complex, LUBAC) 在 E1 和 E2 的辅助下催化形成^[9]。目前研究认为, 线性泛素链组装复合体主要包括 3 个组分: HOIL-1L (heme-oxidized IRP2 ubiquitin ligase-1, 又名 RBCK1)、HOIP (HOIL1L interacting protein, 又名 RNF310) 和 SHARPIN (SHANK-associated RH domain interactor)^[9-11]。HOIP 是 LUBAC 的催化亚单位, 其中心泛素相关结构域 UBA (ubiquitin-associated domain) 与 HOIL1L 和 SHARPIN 相互作用, 发挥线性泛素化 E3 酶功能^[9]。OTULIN (OTU deubiquitinase with linear linkage specificity) 是去泛素化酶 OTU 家族的成员之一, 能够特异性去除底物上的线性泛素链^[12]。LUBAC 是唯一可以催化线性泛素化的 E3 复合体, 能够在 TNF- α 、IL-1 β 或 TLR 等配体刺激下, 识别 NEMO (NF- κ B essential modulator) 并对其进行线性泛素化修饰, 从而诱导 I κ B (inhibitor of nuclear factor κ B kinase) 的磷酸化和随后的 I κ B α 降解, I κ B α 被降解后释放 NF- κ B, 游离的 NF- κ B 易位到细胞核, 激活靶基因的转录, 在 NF- κ B 通路的激活中发挥作用^[13]。线性泛素化修饰有非常重要的生物学功能, LUBAC 介导的线性泛素化途径的失调会诱发癌症和炎症、自身免疫性疾病、神经退行性疾病^[14]。目前所鉴定到的 LUBAC 底物主要有 RIP1、NEMO^[15]、ALK1^[16]、ASC^[17]、IRAK1/2/4^[18]、MyD88^[18] 和 TNFR1^[19] 等。尽管如此, 目前鉴定到的 LUBAC 底物仍旧十分有限, 相关线性泛素化更加深入的研究也受到限制。因此寻找 LUBAC 的新底物, 对研究线性泛素化的功能具有重要意义。

本论文通过 BioGRID 数据库筛选, 从中选取 LUBAC 的催化中心 HOIP 的相互作用蛋白——RabGEF1 蛋白, 并在 pEF6/Myc-His C 载体中克隆了人 RabGEF1 基因, 通过免疫共沉淀 (Co-IP) 实验验证了 RabGEF1 和 HOIP 的相互作用。GST-pulldown 实验明确了 HOIP 通过 ZF-NEF 结构域与 RabGEF1 发生直接相互作用。免疫荧光实验发现 RabGEF1 和 HOIP 共同定位于细胞质。进一步利用体内泛素化实验验证了 RabGEF1 的线性泛素化修饰。并且根据质谱结果及后续体内泛素化实验验证了 RabGEF1 的线性泛素化修饰位点为 K158。本研究完成了对 RabGEF1 发生线性泛素化修饰的验证及初步探索, 为更加深入理解线性泛素化提供了一定线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 抗体

anti-DDDDK、anti-Myc (MBL 公司); anti-His (中杉金桥公司); anti-linear ubiquitin (Lifesensor 公司); 山羊抗兔 IgG、羊抗鼠 IgG (Jackson 公司); 山羊抗鼠 IgG LCS (Abbkine 公司); 山羊抗兔 IgG Alexa Fluor594, 山羊抗鼠 IgG Alexa Fluor488 (中杉金桥公司)。

1.1.2 细胞系

人胚肾细胞系 HEK293T, 人宫颈癌细胞系 HeLa (购于美国菌种保藏中心)。

1.1.3 质粒

将人类 RabGEF1 全长序列克隆入 pEF6/Myc-His C 载体中, 在克隆好的 pEF6 Myc-RabGEF1 质粒基础上构建点突变质粒 pEF6 Myc-RabGEF1 (K49R、K85R、K89R、K158R、K408R), 其余 Flag-HOIP、Flag-HOIL-1L、Flag-SHARPIN、His-OTULIN 和 Myc-Vector 质粒由国家蛋白质科学中心分子医学课题组付业胜博士构建, Flag-HOIP-CS (C885S) 由国家蛋白质科学中心分子医学课题组李磊助理研究员构建。

1.1.4 菌株

克隆用 *E. coli* 感受态 (DH5 α) 和表达用 *E. coli* 感受态 (BL21 (DE3)) 购于北京擎科生物公司。

1.2 细胞培养

将冻存的 HEK293T 细胞及 HeLa 细胞置于 37°C 水浴锅中水浴复苏, 500 r/min, 3 min 离心后去上清, 加入含 10% 胎牛血清、1% 青霉素链霉素混合液的 DMEM 高糖培养基, “十字法” 摇晃匀细胞, 放置于含 5% CO₂、37°C 的培养箱中培养。

1.3 重组质粒构建

待细胞生长状态稳定且良好时, TRIzol 法提取 mRNA。测定提取的 RNA 浓度, 反转录获得 cDNA。根据 NCBI 数据库中所获得的载体和目的基因序列, 设计 RabGEF1 的上下游引物, 并在上下游引物中分别引入 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切位点。以 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分离, 使用 Thermo GeneJET 试剂盒回收目的基因。采用限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切 pEF6/myc-His C 载体, 琼脂糖凝胶电泳分离并回收载体。用无缝连接体系 Gibson assembly mix

连接回收后的目的基因与载体。取连接产物 10 μ l, 加入 50 μ l DH5 α 混匀的感受态, 冰上静置 30 min, 42 $^{\circ}$ C 水浴 45 s 后, 冰上静置 2 min, 加入 400 μ l 无抗性 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C, 220 r/min 复苏 1 h, 涂布于 LB/Amp 平板上, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。第 2 天挑取多个单克隆菌落分别接种于 1 ml LB/Amp 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 220 r/min 培养并测序。

1.4 Co-IP

在 6 cm 皿 50%~60% 细胞密度时分别按下述方式转染 HEK293T 细胞: a. Flag-HOIP+Myc-Vector; b. Flag-HOIP+Myc-RabGEF1; c. Myc-Vector+Myc-RabGEF1; d. Flag-HOIP+Myc-RabGEF1。转染完成 6~8 h 后细胞换液, 36~48 h 可收集细胞, 用预冷的 1 $\times$ PBS 轻轻漂洗细胞 2 次。每皿加入现配裂解工作液 800 μ l (50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、1% NP-40、1% cocktail 蛋白酶抑制剂)。冰上裂解 30 min 转移至 EP 管, 冰上超声 3 min (15% 功率, 超声时间 1 s, 间隔时间 1 s)。离心取上清至新 EP 管, 每管加入 15 μ l Protein A/G PLUS-Agarose, 4 $^{\circ}$ C 混悬仪孵育 1 h, 离心取上清至新 EP 管, 取 60 μ l 作裂解液, 添加 5 $\times$ 上样缓冲液 15 μ l, 1 000 W 煮样 10 min。将抗体 (1.5 μ g/管) 加入其余裂解液样品中, 置于 4 $^{\circ}$ C 混悬仪孵育 1 h。添加 Protein A/G PLUS-Agarose (40 μ l/管) 与抗体及裂解液样品混合液体中, 置于 4 $^{\circ}$ C 混悬仪孵育过夜。裂解液清洗珠子 (beads) 4 次。吸尽后每管加入 40 μ l 裂解液, 添加 40 μ l 2 $\times$ 上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 煮样品 10 min。进行蛋白质免疫印迹 (Western blot) 分析检测。

1.5 GST pull-down assay

目的片段接入 pGEX-4T-1 载体, 转化 BL21 感受态, 涂板, 挑取单克隆, 摇菌。各取 GST-Vector、GST-PUB、GST-ZF-NZF、GST-UBA、GST-RBR-LDD 30 μ l 菌液加入 5 ml 新鲜 LB/Amp 培养基, 37 $^{\circ}$ C 摇床过夜。按 1:100 转接至 100 ml 2YT/Amp 培养基, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养至菌液吸光度 (A) 值在 0.6 时, 按 1:1 000 加入异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导蛋白表达, 接入 GST-PUB 培养基置于 27 $^{\circ}$ C 摇床诱导 4 h, 其余置于 22 $^{\circ}$ C 摇床诱导 8 h。50 ml 离心管分装后 6 000 g 离心 15 min 收集菌体, 每管加入现配裂解液 2 ml (PBS、1% Triton X-100、1% β 巯基乙醇、PMSF (终浓度 1 mmol/L)), 冰上超声 5 min (20% 功率, 超声时间 5 s, 间隔时间 5 s)。13 600 r/min 离心 10 min, 取上清, 加入

50 μ l 预先用 PBS 清洗过的 GST-beads, 置于 4 $^{\circ}$ C 混悬仪孵育 1 h 结合蛋白。2 000 g 离心 3 min 弃上清, 每管加入 1 ml 洗涤缓冲液 (PBS, 1% Triton X-100, 150 mmol/L NaCl) 清洗 beads 4 次。取部分 beads, 加上样缓冲液煮沸, SDS-PAGE 胶分离蛋白质, 考马斯亮蓝染色, 判断蛋白质纯化效果及蛋白质量。5 皿 HEK293T 细胞转染 Myc-RabGEF1 质粒, 6~8 h 后换液, 36~48 h 收细胞, 预冷的 1 $\times$ PBS 轻轻漂洗细胞 2 次, 每皿加入现配裂解工作液 1 ml (50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、1% NP-40、1% cocktail 蛋白酶抑制剂、1% 磷酸酶抑制剂、0.1% DTT)。冰上裂解 30 min 转移至 EP 管, 冰上超声 3 min (15% 功率, 超声时间 1 s, 间隔时间 1 s)。离心取上清至新 EP 管, 每管加入分别加入适量结合蛋白的 GST-beads, 置于 4 $^{\circ}$ C 混悬仪孵育过夜。裂解液清洗 beads 4 次。吸尽后每管加入 40 μ l 裂解液, 添加 40 μ l 2 $\times$ 上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 煮样品 10 min。进行 Western blot 分析检测。

1.6 免疫荧光 (immunofluorescence, IF) 实验

在 50%~60% 细胞密度时分别按下列方式转染 HeLa 细胞: a. Myc-RabGEF1+Myc-Vector; b. Flag-HOIP+Myc-Vector; c. Flag-HOIP+Myc-RabGEF1。转染完成 6~8 h 后细胞换液, 24 h 后传入共聚焦培养皿继续培养至合适密度可收细胞。用预冷 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。4% 多聚甲醛固定 15 min, 预冷 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。0.5% Triton X-100 室温通透 20 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。0.8% BSA 室温封闭 30 min, 吸干, 滴入配置好的一抗, 4 $^{\circ}$ C 湿盒过夜孵育。预冷 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。吸干滴入配好的荧光二抗, 避光湿盒中室温孵育 1 h。预冷 PBS 洗 3 次, 每次 10 min。复染 DAPI, 避光湿盒中室温孵育 10 min。预冷 PBS 洗 4 次, 每次 10 min。共聚焦显微镜观察细胞免疫荧光。

1.7 线性泛素化验证

在 10 cm 皿 50%~60% 细胞密度时分别按下列方式转染 HEK293T 细胞: a. Myc-RabGEF1+Myc-Vector; b. Myc-RabGEF1+Flag-HOIP+Flag-HOIL-1L+Flag-SHARPIN; c. Myc-RabGEF1+Flag-HOIP+Flag-HOIL-1L+Flag-SHARPIN+His-OTULIN。转染完成 6~8 h 后细胞换液, 36~48 h 可收集细胞, 用预冷的 1 $\times$ PBS 轻轻漂洗细胞 2 次。每皿加入现配裂解工作液 1 ml (0.5% 去氧胆酸钠、1% 磷酸酶抑制

剂、1% cocktail 蛋白酶抑制剂、1% N-乙基马来酰亚胺 (N-Ethylmaleimide, NEM)、0.1% DTT)。然后参照 Co-IP 流程, 进行 Western blot 分析检测, 样品经 SDS-PAGE 分离, 考马斯亮蓝染色, 脱色液脱色后用无菌刀片切下胶条后送质谱分析。

1.8 NTA-His 泛素化实验

在 10 cm 皿 50%~60% 细胞密度时分别按下列方式转染 HEK293T 细胞: a. Myc-RabGEF1+Myc-Vector; b. Myc-RabGEF1+Flag-HOIP (WT) +Flag-HOIL-1L+Flag-SHARPIN; c. Myc-RabGEF1+Flag-HOIP-CS (C885S) +Flag-HOIL-1L+Flag-SHARPIN。转染完成 6~8 h 后细胞换液, 36~48 h 可收集细胞, 用预冷的 1×PBS 轻轻漂洗细胞 2 次。每皿加入 1 ml 预冷的 1×PBS, 用干净刮板刮下细胞转移至 EP 管中, 取 100 μ l 作裂解液, 900 μ l 作免疫沉淀 (IP) 样品, 离心得到细胞沉淀。于裂解液的沉淀中加入 100 μ l RIPA 裂解液, 于 IP 沉淀中加入 1 ml His₆-Ub 泛素化修饰裂解液 (缓冲液 A: 6 mol/L 盐酸胍、0.1 mol/L Na₂HPO₄、10 mmol/L 咪唑 (pH 8.0))。冰上超声 3 min (15% 功率, 超声时间 1 s, 间隔时间 1 s)。离心取上清至新 EP 管, 取 60 μ l 作裂解液, 添加 5×上样缓冲液 15 μ l, 100°C 煮样 10 min。IP 样品每管加入 50 μ l His-NTA beads, 4°C 混悬仪孵育 5~8 h。用 His₆-Ub 泛素化修饰裂解液 (缓冲液 A) 洗 beads 一次, 混合洗液 (His₆-Ub 泛素化修饰裂解液:T1 缓冲液=1:3) 洗 beads 两次, 最后再用 T1 缓冲液洗 1 次。清洗时 4°C 离心机转速为 1 000 r/min, 离心时间为 3 min。吸尽液体后每管加入 40 μ l His-Ub 泛素化修饰洗脱液, 每隔 5 min 用小枪头搅拌混匀, 共混匀 6 次, 最后添加 40 μ l 2×上样缓冲液, 100°C 煮样 10 min。进行 Western blot 分析检测。T1 缓冲液: 25 mmol/L Tris-HCl、20 mmol/L 咪唑 (pH 6.8); His₆-Ub 泛素化修饰洗脱液: 200 mmol/L 咪唑、0.15 mol/L Tris-HCl (pH 6.7)、30% 甘油、0.72 mol/L β 巯基乙醇、5% SDS)。

1.9 线性泛素化位点验证

在 10 cm 皿 50%~60% 细胞密度时分别按下列方式转染 HEK293T 细胞: a. Myc-RabGEF1+Myc-Vector; b. Myc-RabGEF1+Flag-HOIP+Flag-HOIL-1L+Flag-SHARPIN; c. Myc-RabGEF1+Flag-HOIP-CS (C885S) +Flag-HOIL-1L+Flag-SHARPIN; d. Myc-RabGEF1 (K49R) +Flag-HOIP+Flag-HOIL-1L+Flag-SHARPIN; e. Myc-RabGEF1 (K85R) +

Flag-HOIP+Flag-HOIL-1L+Flag-SHARPIN; f. Myc-RabGEF1 (K89) +Flag-HOIP+Flag-HOIL-1L+Flag-SHARPIN; g. Myc-RabGEF1 (K158R) +Flag-HOIP+Flag-HOIL-1L+Flag-SHARPIN; h. Myc-RabGEF1 (K408R) +Flag-HOIP+Flag-HOIL-1L+Flag-SHARPIN。转染完成 6~8 h 后细胞换液, 36~48 h 可收集细胞, 用预冷的 1×PBS 轻轻漂洗细胞 2 次。每皿加入现配裂解工作液 1 ml (0.5% 去氧胆酸钠、1% 磷酸酶抑制剂、1% cocktail 蛋白酶抑制剂、1% NEM、0.1% DTT)。然后参照 Co-IP 流程, 进行 Western blot 分析检测。

2 结 果

2.1 pEF6 Myc-RabGEF1 重组质粒的构建

为了探索 LUBAC 的新底物, 本文通过 BioGRID 数据库筛选, 得到了 HOIP 的潜在相互作用蛋白 RabGEF1 (图 1)。BioGRID 是一个生物学交互存储库, 包含通过综合管理工作编译后的数据。当前的索引是 4.4.207 版, 搜索 79 460 份出版物, 搜索来自主要模式生物物种的 2 412 071 种蛋白质和遗传相互作用、29 417 种化学相互作用和 1 128 339 种翻译后修饰。RabGEF1, 又名 RabEX-5, 是 Rab5 的鸟嘌呤-核苷酸交换因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF), 属于小 G 蛋白家族, 是 *ras* 基因的产物^[20]。Rab5 是一种小 GTP 酶, 定位于早期内体和质膜, 负责调节内吞小泡和早期内体之间的融合以及肌动蛋白重塑^[21-22]。为了在膜上发挥作用, RabGEF1 负责用 GTP 替换下与 Rab5 结合的 GDP, 从而激活 Rab5^[23-24]。为了获取

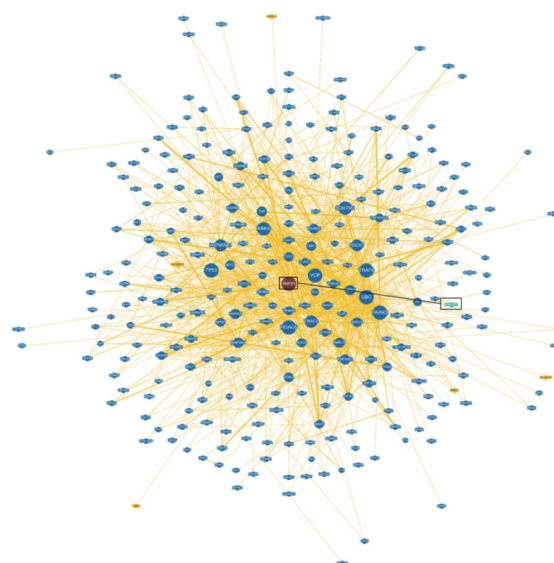


Fig. 1 Results of BioGRID database filtering

人源 RabGEF1 的全长表达质粒, 本文用 TRIzol 法提取 HEK293T 细胞的总 RNA, 反转录获得 cDNA, 以其为模板扩增得到了 RabGEF1 基因, 回收 RabGEF1 的 PCR 产物, 与酶切后的 pEF6/Myc-His C 载体连接, 最后将连接产物转化并挑取单克隆测序。测序结果表明, 构建在 pEF6/Myc-His C 载体中的 RabGEF1 基因与 NCBI 数据库中的序列相符, 人源 RabGEF1 表达载体构建成功。

2.2 RabGEF1与HOIP存在相互作用

为了探究 RabGEF1 是否是 LUBAC 的底物, 首

先对 RabGEF1 与 HOIP 的相互作用进行检测。在 HEK293T 细胞中分别单独或与 RabGEF1 共同转染 Flag-HOIP, 然后用 Myc 抗体对细胞裂解液进行 IP, 可检测到 Flag-HOIP 与 Myc-RabGEF1 存在相互作用 (图 2a)。在 HEK293T 细胞中分别单独或与 Flag-HOIP 共同转染 RabGEF1, 然后用 Flag 抗体对细胞裂解液进行 IP, 同样可检测到 Myc-RabGEF1 (图 2b)。实验结果表明 RabGEF1 与 HOIP 存在相互作用。

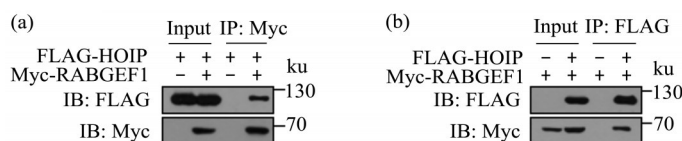


Fig. 2 Interaction between RabGEF1 and HOIP

(a) HEK293T cells were transfected with Flag-HOIP and Myc-RabGEF1, while the transfection of Flag-HOIP alone was used as the control. Immunoprecipitation (IP) was performed with the anti-Myc antibody, and immunoprecipitated samples were analyzed by immunoblotting using indicated antibodies. (b) HEK293T cells were transfected with Flag-HOIP and Myc-RabGEF1, while the transfection of Myc-RabGEF1 alone was used as the control. Immunoprecipitation was performed with the anti-Flag antibody, and immunoprecipitated samples were analyzed by immunoblotting using indicated antibodies.

2.3 RabGEF1与HOIP的ZF-NZF段存在直接相互作用

HOIP 蛋白全长 1 072 个氨基酸, 由 *RNF31* 基因编码^[25]。HOIP 包含两个环结构域 (real interesting new gene RING), 由构成 E3 泛素连接酶核心的中间环结构域 IBR (in-between-RING domain) 分隔, 这种 RING between RING 的结构称为 RBR 结构域, 具有催化活性, 负责底物线性泛素化的催化^[26-27]。此外, HOIP 在 C 端包含一个独特的区域, 称为线性泛素链决定域 LDD (linear ubiquitin chain determining domain), 在 N 端含有一个 PUB (peptide: N-glycanase/UBA or UBX 包含蛋白) 结构域, 一个锌指结构域 NZF (zinc finger) 和一个泛素相关结构域 UBA^[26-27] (图 3a)。为了检测 HOIP 和 RabGEF1 相互作用的区域, 分别在体外诱导 BL21 大肠杆菌表达 HOIP 的 4 段截断体: GST-PUB、GST-ZF-NZF、GST-UBA、GST-RBR-LDD。将转染 Myc-RabGEF1 的细胞裂解液分别与结合好空载体或者 HOIP 4 种截短体蛋白的 GST-beads 孵育, 最终用 Western blot 检测与 RabGEF1 存在相互作用的 HOIP 截短体。实验结果发现 RabGEF1 仅与 HOIP 的 ZF-NZF 段存在直接相互作用 (图 3b)。

2.4 RabGEF1与HOIP存在共定位

为了进一步验证 RabGEF1 与 HOIP 在细胞内的相互作用并明确 RabGEF1 与 HOIP 在细胞内的亚细胞定位, 在 HEK293T 细胞中分别单独或者同时转染 RabGEF1 和 HOIP 后, 利用间接免疫荧光对 RabGEF1 和 HOIP 在细胞内的表达情况进行检测。结果显示, RabGEF1 主要存在细胞质, HOIP 在细胞质与细胞核内弥散性分布, 二者在细胞质内存在共定位现象 (图 4)。

2.5 RabGEF1可发生线性泛素化修饰

为了研究 RabGEF1 能否发生线性泛素化修饰, 将 HEK293T 细胞共转 Myc-RabGEF1 和 LUBAC 3 个亚单位 (Flag-HOIP、Flag-HOIL-1L 和 Flag-SHARPIN) 后, 可检测到 RabGEF1 的线性泛素化修饰, 而在此基础上转入去线性泛素化酶 His-OTULIN 则不能检测到 RabGEF1 的线性泛素化 (图 5a)。表明 RabGEF1 可以被线性泛素链修饰, 并且这种修饰可被去线性泛素化酶 OTULIN 去除。为了排除非特异结合, 进一步确认 RabGEF1 为线性泛素化修饰的新底物, 进行了 NTA-His 泛素化实验, 在 RabGEF1 和 LUBAC 复合体共同转染时, 可检测到 RabGEF1 的线性泛素化修饰, 而将 HOIP 替换为 HOIP C88S 酶活突变体时^[28], 作为阴性对照

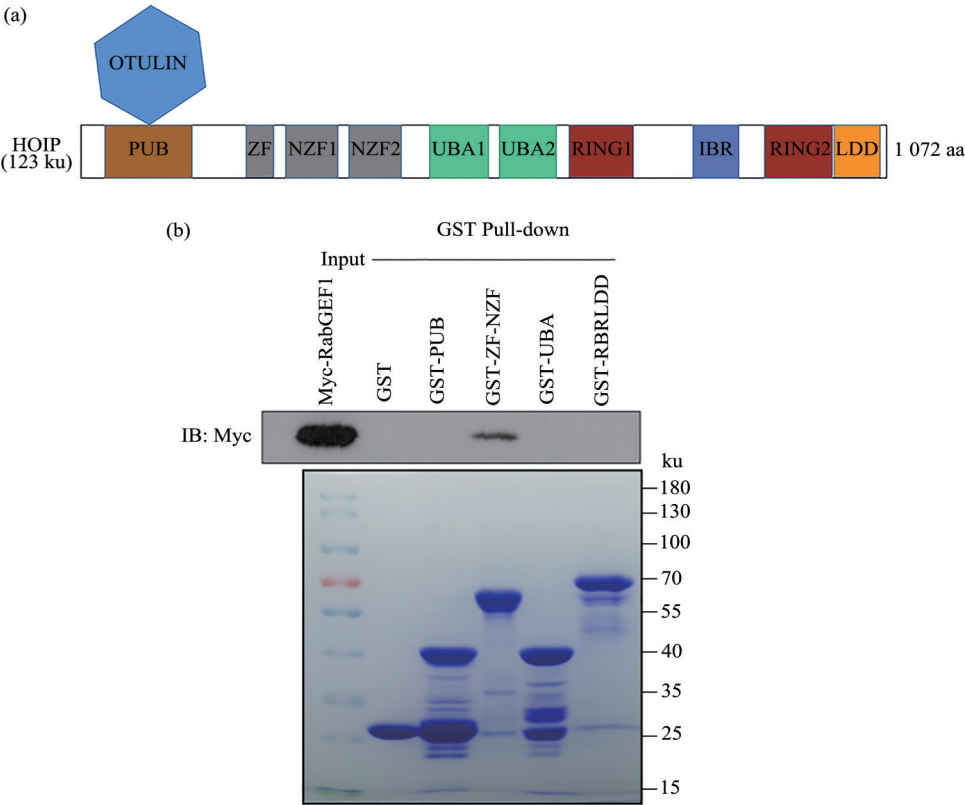


Fig. 3 The direct interaction between RabGEF1 and ZF–NZF domain of HOIP

(a) Schematic illustration of HOIP structure: PUB domain (69–151), NZF domain (302–435), UBA domain (483–628), RBR domain (699–916) and LDD domain (910–1 062); (b) immunoprecipitated Myc-RabGEF1 from HEK293T cells transfected with Myc-RabGEF1 were incubated with GST-Vector, GST-PUB, GST-ZF-NZF, GST-UBA and GST-RBR-LDD purified from engineered bacteria for the *in vitro* binding assay, followed by immunoblotting (IB) analysis.

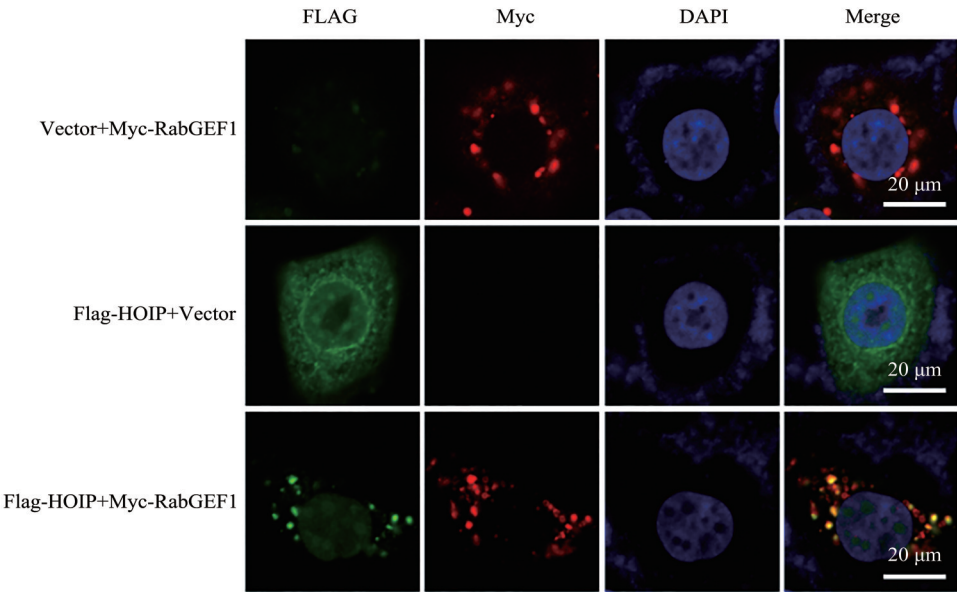
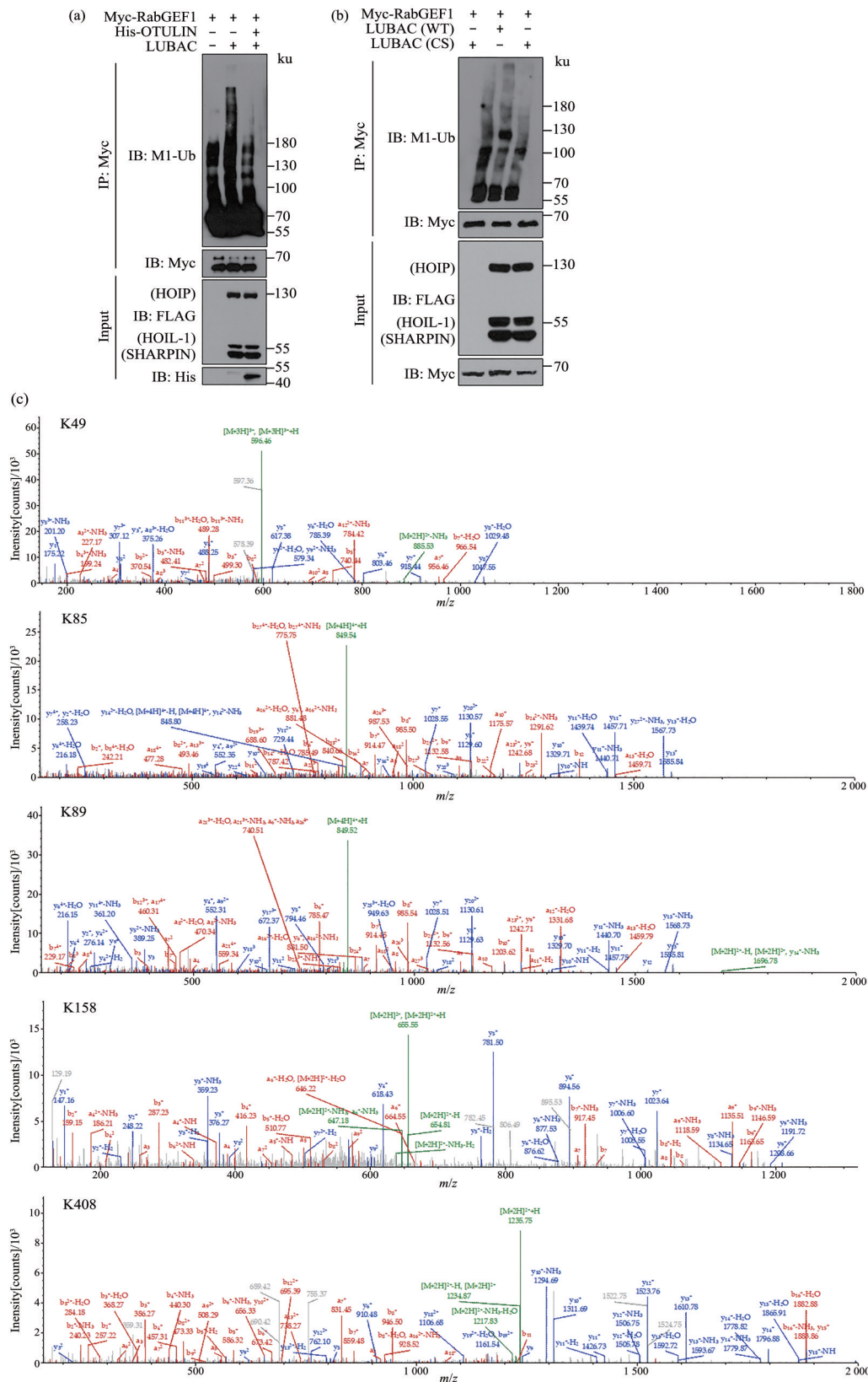


Fig. 4 Co-localization of RabGEF1 and HOIP

Myc-RabGEF1 and Flag-HOIP plasmids were transfected into HEK293T cells as indicated, indirect immunofluorescence were performed to detect Myc-RabGEF1 (red) and Flag-HOIP (green) and their co-localization (yellow).



则不能有效促进 RabGEF1 的泛素化修饰（图 5b）。上述实验证明 RabGEF1 是线性泛素化的新底物。为了进一步确定 RabGEF1 线性泛素化修饰位点，将检测出线性泛素化的样品进行 SDS-PAGE 后用考马斯亮蓝染色并进行了质谱分析。质谱鉴定到潜在的线性泛素化位点为 K48、K85、K89、K158、K408（表 1，图 5c）。

Table 1 Results of mass spectrometry identification

Linear ubiquitination modification site	Sequence	Modifications	#PSMs	Ions score Mascot	Charge state
K49	QKQIQEDWELAER	1xGG [K2]	2	46	+3
K85	LQREEEAFASSQSSQGAQSLTFSKFEEK	1xGG [K25]	1	53	+4
K89	LQREEEAFASSQSSQGAQSLTFSKFEEK	1xGG [K]	3	60	+4
K158	TGQEIYKQTK	1xGG [K7]	1	22	+2
K408	KQEAESWSPDACLGVKQMYK	1xGG [K16]; 1xCarbamidomethyl [C12]	1	19	+2

2.6 RabGEF1被线性泛素化修饰的位点在158位赖氨酸

为了进一步明确 RabGEF1 发生线性泛素化修饰的位点，根据质谱结果，在 pEF6 Myc-RabGEF1 野生型质粒基础上构建了其潜在赖氨酸修饰位点的点突变质粒 pEF6 Myc-RabGEF1（K49R、K85R、

K89R、K158R、K408R），将这些突变体质粒或者野生型 Myc-RabGEF1 分别与 LUBAC 共转染，结果发现 K158 位突变后所检测到的线性泛素化修饰相对于野生型或其他 Myc-RabGEF1 突变体减少（图 6a），说明 K158 可能是 RabGEF1 发生线性泛素化的主要位点。RabGEF1 包含 492 个氨基酸残基，

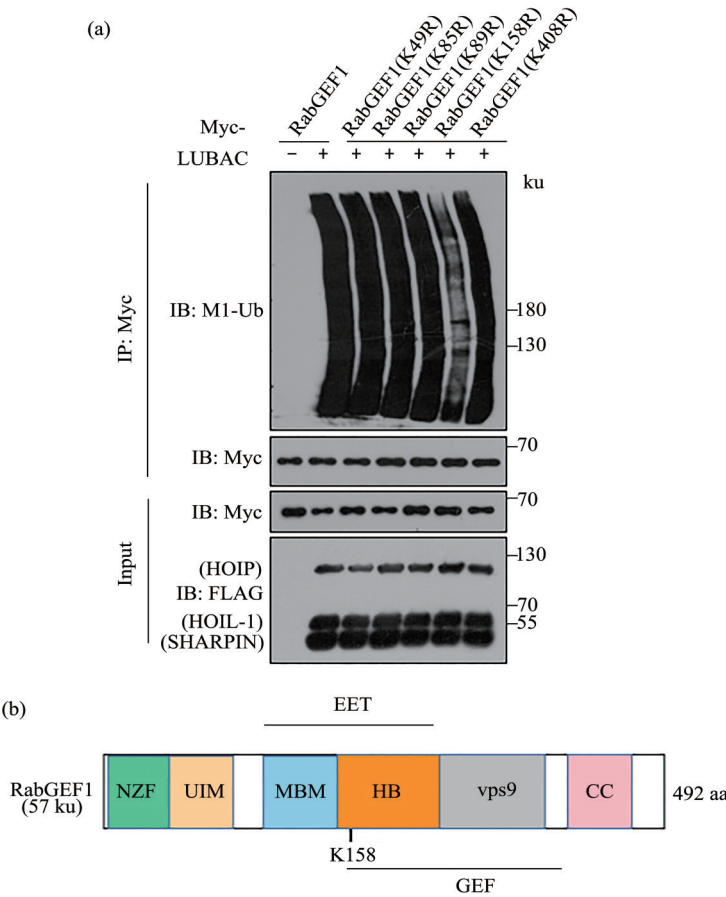


Fig. 6 Linear ubiquitination modification of RabGEF1 at K158 site of HB domain

(a) HEK293T cells were transfected with wild-type Myc-RabGEF1 and its various point mutants (K49R, K85R, K89R, K158R, K408R) and LUBAC complexes (Flag-HOIP, Flag-HOIL-1L and Flag-SHARPIN) or the enzymatic mutants of LUBAC complex (Flag-HOIP, Flag-HOIL-1L-C855S and Flag-SHARPIN), the cell lysates were detected by IP with Myc antibody and the linear ubiquitination of RabGEF1 and its mutants were detected by Western blot; (b) schematic illustration of RabGEF1 structure.

由6个结构域构成,从N端到C端,包括A20类锌指结构域NZF、泛素互作结构域UIM (ubiquitin-interaction motif)、膜结合结构域MBM (membrane binding motif)、螺旋束结构域HB (helical bundle domain)、Vps9结构域和螺旋卷曲结构域CC (coiled-coil) (图6b)^[24, 29]。其中ZnF和UIM结构域共同构成具有泛素连接酶E3活性的功能域,MBM和HB共同构成早期内体靶向结构域(EET),HB和Vps9结构域构成了具有GEF活性的催化核心,CC结构域则是RABEX5与RabGEF1结合的区域^[24, 29]。K158位于HB结构域内,该位点被线性泛素化修饰后可能进一步影响RabGEF1的GEF催化功能,进而影响Rab5的激活以及后续功能。

3 讨 论

线性泛素化是真核细胞内一种特殊的泛素化修饰类型,其通过泛素氨基端的甲硫氨酸与羧基端的甘氨酸首尾相连形成肽键^[9]。LUBAC是唯一可以催化线性泛素化的E3复合体^[12],由HOIL-1L、HOIP、SHARPIN 3个组分组成,各亚基的稳定使得LUBAC可以行使线性泛素化催化功能^[30],LUBAC成分的表达缺失在小鼠上会引起严重的疾病表型^[31]。目前只鉴定到少数的底物可发生线性泛素化修饰,多与炎症、免疫的调节有关。因此,鉴定LUBAC的底物对于了解线性泛素化的功能和机制调控非常重要。

本研究通过寻找与LUBAC核心组成部分HOIP相互作用的蛋白质,来探寻线性泛素化的新底物。根据BioGRID数据库筛选,本文将RabGEF1蛋白作为研究对象,发现RabGEF1与HOIP的ZF-NZF结构域存在相互作用,其相互作用发生在细胞质。进一步验证了RabGEF1的线性泛素化修饰,并且明确了其修饰位点为第158位赖氨酸。

RabGEF1是Rab5的鸟嘌呤-核苷酸交换因子,属于小G蛋白家族,是*ras*基因的产物^[20]。Rab5是GTPase的Ras超家族的成员,在细胞内囊泡转运中起关键调节作用^[32-33]。为了在膜上发挥作用,RabGEF1负责用GTP替换下与Rab5结合的GDP,从而允许Rab5与效应器发生相互作用^[23-24]。RabGEF1在体外与Ras结合,并负调节Ras激活、Ras依赖性信号通路的激活以及FcεRI聚集激活的肥大细胞中介质和细胞因子的分泌。近年来研究表

明,RabGEF1可以与Ras发生结合,抑制Ras的活化,参与介导炎症反应和维持皮肤稳态^[34]。本研究发现,RabGEF1是线性泛素化的新底物,且其线性泛素化位点在第158位赖氨酸,位于RabGEF1的HB结构域,而HB和Vps9结构域构成了RabGEF1具有GEF活性的催化核心。因此推测,RabGEF1的K158发生线性泛素化后可能影响其GEF催化功能,进一步影响Rab5的激活以及后续功能,此猜想值得后续进行相关的探索与验证。

4 结 论

本研究发现了线性泛素化修饰的一个新底物,验证了RabGEF1可在LUBAC的介导下发生线性泛素化修饰,并证实了K158为RabGEF1的线性泛素化修饰位点。但未进行后续的功能验证,还需进一步探索RabGEF1发生线性泛素化修饰之后对其GEF活性以及对Rab5功能的影响。本研究为更加深入理解线性泛素化提供了新的线索。

参 考 文 献

- [1] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 1998, **67**:425-479
- [2] Kornitzer D, Ciechanover A. Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J Cell Physiol*, 2000, **182**(1): 1-11
- [3] Yau R G, Doerner K, Castellanos E R, *et al.* Assembly and function of heterotypic ubiquitin chains in cell-cycle and protein quality control. *Cell*, 2017, **171**(4): 918-933. e920
- [4] Ebner P, Versteeg G A, Ikeda F. Ubiquitin enzymes in the regulation of immune responses. *Critical Rev Biochem Mol Biol*, 2017, **52**(4): 425-460
- [5] Komander D, Rape M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem*, 2012, **81**:203-229
- [6] Haglund K, Dikic I. Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J*, 2005, **24**(19): 3353-3359
- [7] Deng L, Wang C, Spencer E, *et al.* Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, 2000, **103**(2): 351-361
- [8] Hofmann R M, Pickart C M. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell*, 1999, **96**(5): 645-653
- [9] Kirisako T, Kamei K, Murata S, *et al.* A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO J*, 2006, **25**(20): 4877-4887
- [10] Tokunaga F, Nakagawa T, Nakahara M, *et al.* SHARPIN is a component of the NF-kappaB-activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature*, 2011, **471**(7340): 633-636
- [11] Ikeda F, Deribe Y L, Skanland S S, *et al.* SHARPIN forms a linear

- ubiquitin ligase complex regulating NF-kappaB activity and apoptosis. *Nature*, 2011, **471**(7340): 637-641
- [12] Keusekotten K, Elliott P R, Glockner L, *et al.* OTULIN antagonizes LUBAC signaling by specifically hydrolyzing Met1-linked polyubiquitin. *Cell*, 2013, **153**(6): 1312-1326
- [13] Gerlach B, Cordier S M, Schmukle A C, *et al.* Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. *Nature*, 2011, **471**(7340): 591-596
- [14] Oikawa D, Sato Y, Ito H, *et al.* Linear ubiquitin code: its writer, erasers, decoders, inhibitors, and implications in disorders. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(9):3381
- [15] Tokunaga F, Sakata S I, Saeki Y, *et al.* Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappa B activation. *Nat Cell Biol*, 2009, **11**(2): 123-132
- [16] Fu Y, Wang H, Dai H, *et al.* OTULIN allies with LUBAC to govern angiogenesis by editing ALK1 linear polyubiquitin. *Mol cell*, 2021, **81**(15): 3187-3204.e3187
- [17] Rodgers M A, Bowman J W, Fujita H, *et al.* The linear ubiquitin assembly complex (LUBAC) is essential for NLRP3 inflammasome activation. *J Exp Med*, 2014, **211**(7): 1333-1347
- [18] Cohen P, Strickson S. The role of hybrid ubiquitin chains in the MyD88 and other innate immune signalling pathways. *Cell Death Differ*, 2017, **24**(7): 1153-1159
- [19] Peltzer N, Rieser E, Taraborrelli L, *et al.* HOIP deficiency causes embryonic lethality by aberrant TNFR1-mediated endothelial cell death. *Cell Rep*, 2014, **9**(1): 153-165
- [20] Lippé R, Miaczynska M, Rybin V, *et al.* Functional synergy between Rab5 effector Rabaptin-5 and exchange factor Rabex-5 when physically associated in a complex. *Mol Biol Cell*, 2001, **12**(7): 2219-2228
- [21] Stenmark H, Olkkonen V M. The Rab GTPase family. *Genome Biol*, 2001, **2**(5): Reviews3007
- [22] Bucci C, Parton R G, Mather I H, *et al.* The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell*, 1992, **70**(5): 715-728
- [23] Goody R S, Müller M P, Wu Y W. Mechanisms of action of Rab proteins, key regulators of intracellular vesicular transport. *Biol Chem*, 2017, **398**(5-6): 565-575
- [24] Delprato A, Merithew E, Lambright D G. Structure, exchange determinants, and family-wide rab specificity of the tandem helical bundle and Vps9 domains of Rabex-5. *Cell*, 2004, **118**(5): 607-617
- [25] Fennell L M, Gomez Diaz C, Deszcz L, *et al.* Site-specific ubiquitination of the E3 ligase HOIP regulates apoptosis and immune signaling. *EMBO J*, 2020, **39**(24): e103303
- [26] Yagi H, Ishimoto K, Hiromoto T, *et al.* A non-canonical UBA-UBL interaction forms the linear-ubiquitin-chain assembly complex. *EMBO Rep*, 2012, **13**(5): 462-468
- [27] Schaeffer V, Akutsu M, Olma M H, *et al.* Binding of OTULIN to the PUB domain of HOIP controls NF- κ B signaling. *Mol Cell*, 2014, **54**(3): 349-361
- [28] Rodriguez Carvajal A, Grishkovskaya I, Gomez Diaz C, *et al.* The linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC) generates heterotypic ubiquitin chains. *Elife*, 2021, **10**: e60660
- [29] Delprato A, Lambright D G. Structural basis for Rab GTPase activation by VPS9 domain exchange factors. *Nat struct Mol Biol*, 2007, **14**(5): 406-412
- [30] Stieglitz B, Morris-Davies A C, Koliopoulos M G, *et al.* LUBAC synthesizes linear ubiquitin chains *via* a thioester intermediate. *EMBO Rep*, 2012, **13**(9): 840-846
- [31] Rickard J A, Anderton H, Etemadi N, *et al.* TNFR1-dependent cell death drives inflammation in Sharpin-deficient mice. *Elife*, 2014, **3**: e03464
- [32] Barr F, Lambright D G. Rab GEFs and GAPs. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, **22**(4): 461-470
- [33] Langemeyer L, Frohlich F, Ungermann C. Rab GTPase Function in endosome and lysosome biogenesis. *Trends Cell Biol*, 2018, **28**(11): 957-970
- [34] Tam S Y, Tsai M, Snouwaert J N, *et al.* RabGEF1 is a negative regulator of mast cell activation and skin inflammation. *Nat Immunol*, 2004, **5**(8): 844-852

LUBAC Mediated Validation of RabGEF1 Linear Ubiquitination*

HUANG Bin^{1,2)}, ZHANG Ling-Qiang^{2)**}, ZHANG Xue-Li^{1)**}

(¹Shanghai Fengxian District Central Hospital Affiliated to Anhui University of Technology, Shanghai 201499, China;

²Institute of Biomimetics, Academy of Military Medicine, Academy of Military Sciences, National Center for Protein Science (Beijing), Beijing 102200, China)

Abstract Objective To verify that Rab guanine nucleotide exchange factor 1 (RabGEF1) is a novel substrate of linear ubiquitin. **Methods** Human RabGEF1 gene was cloned into pEF6/Myc-His C vector. The interaction between RabGEF1 and HOIP was verified by Co-IP experiment. The interaction domain between RabGEF1 and HOIP was analyzed by GST-pulldown. The interaction and subcellular localization were verified by immunofluorescence. The linear ubiquitination of RabGEF1 was detected by *in vivo* ubiquitination experiment. The NTA-His ubiquitination assay further confirmed that RabGEF1 can undergo linear ubiquitination modification. The ubiquitinated RabGEF1 proteinsamples were subjected to mass spectrometry to analyze the specific site modified by ubiquitin. The mutant plasmid of potential RabGEF1 ubiquitination site was constructed according to the mass spectrometry results, and the ubiquitination site of RabGEF1 was further verified with RabGEF1 KR mutant plasmids *in vivo* ubiquitination experiment. **Results** RabGEF1 interacts with HOIP *via* ZF-NEF domain. RabGEF1 co-locates with HOIP in the cytoplasm. LUBAC mediated linear ubiquitination modification of RabGEF1 depends on LUBAC enzyme activity, and the ubiquitination modification site of RabGEF1 is K158. **Conclusion** RabGEF1 is a novel substrate for linear ubiquitination modification, and the site of linear ubiquitination modification is K158.

Key words RabGEF1, linear ubiquitin modification, LUBAC, Co-IP

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0089

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81772959) and Social Science and Technology Development Fund Project of Fengxian District Science and Technology Commission (20191101).

** Corresponding author.

ZHANG Xue-Li. Tel: 86-21-57524800, E-mail: lejing1996@aliyun.com

ZHANG Ling-Qiang. Tel: 86-10-66931216, E-mail: zhanglq@nic.bmi.ac.cn

Received: March 15, 2022 Accepted: May 5, 2022