

文章编号:2095-7386(2016)03-0001-12

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2016.03.001

去泛素化酶研究进展

刘文斌

(武汉轻工大学 医学技术与护理学院,湖北 武汉 430023)

摘 要:泛素化和去泛素化是两种广泛存在的蛋白质翻译后修饰方式。阐述了其影响了目标蛋白在细胞内的定位、稳定性和功能。其中,去泛素化过程涉及组蛋白的修饰,细胞周期,细胞分化,细胞凋亡,内吞和自噬的调控及 DNA 损伤修复,也参与机体的肿瘤发生,肌肉萎缩,组织发育及抗病毒感染。

关键词:泛素;去泛素化;酶

中图分类号:Q 7

文献标识码:A

Proceeding of deubiquitinase study

LIU Wen-bin

(School of Health Sciences and Nursing, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: Ubiquitination and deubiquitination are two popular styles of post-translation modification of protein. These two modifications affect intracellular localization, stability and functions of target proteins. And the process of deubiquitination is involved in the modification of histone, cell cycle, cell differentiation, cell apoptosis, endocytosis, autophagy and DNA repair after damage, and it is also involved in the procedures of carcinogenesis, muscle dystrophy, development and anti-virus-infection.

Key words: ubiquitin; deubiquitination; enzyme

1 前言

泛素(ubiquitin)是一个由 76 个氨基酸组成的小分子蛋白质,广泛存在于真核细胞中,它能够与细胞内的许多蛋白质共价结合,从而使之“泛素化”,由此影响蛋白质的行为及细胞的功能,如生长、分裂、运动、分化、凋亡等^[1-2]。

泛素化是一种蛋白质翻译后修饰方式,也是一种细胞内信号。泛素化由一系列酶促反应来完成,如泛素活化酶 E1、泛素耦合蛋白 E2 及泛素连接酶 E3 催化的反应。E1 在 ATP 的帮助下催化泛素末端的甘氨酸,与自身的一个半胱氨酸之间形成一个硫

酯键。通过转酰基作用,活化的泛素再转移到泛素耦合蛋白 E2 的一个半胱氨酸上,形成 E2-Ub;然后在泛素连接酶 E3 的作用下,将 E2-Ub 上的 Ub 连接到需要降解蛋白的赖氨酸上。E3 连接酶具有底物特异性。这样,可以有单个或多个泛素被连接到目标蛋白质上,从而形成泛素多聚体。各个泛素单体之间主要是通过第 48 位的赖氨酸(K48)来连接。泛素化的目标蛋白在细胞质内被蛋白酶体(proteasome)降解。E3 分为两大类,包括 RING 结构域 E3(可以直接将 E2-Ub 连接到底物赖氨酸上)和 HECT 结构域 E3(与 E6AP 的 C 端)或 RBR 结构域 E3(RING-between-RING),这种 E3 含有一个活性的硫

收稿日期:2016-03-30.

作者简介:刘文斌(1970-),男,博士. E-mail:liuwenbin_1@yeah.net.

基,会额外形成一个 E3-Ub 硫酯中间物,然后再催化 Ub 和底物的连接^[1,3]。

泛素化可以有多种共价连接方式。将单个的泛素连接到底物蛋白上称为单泛素化,例如组蛋白 H2A 在 119 位赖氨酸处(K119)的单泛素化。这是一种表观遗传学修饰,以调节染色质的结构和基因转录。而细胞表面受体的单泛素化是一个分选信号,用来指导内吞的蛋白进入溶酶体降解。当更多的泛素通过 Ub 上 7 个赖氨酸之一连接到已经单泛素化的蛋白上时就是多泛素化。不同泛素化方式处理的蛋白,其命运是不同的。以 K48 和 K11 泛素链方式连接的蛋白会被 26S 蛋白酶体降解。而以 K63 泛素链方式连接的蛋白则可以参与信号传导,溶酶体指导的蛋白分选和 DNA 损伤反应。因此,泛素化是一种类似于磷酸化和糖基化的蛋白翻译后修饰方式,用以调节蛋白的稳定性、定位和活性^[3,4]。

蛋白的泛素化是可逆的。去泛素化酶(deubiquitinating enzyme, DUB)是一些将目标蛋白上的泛素或泛素类似蛋白切下来的蛋白酶。去泛素化酶参与泛素原的激活。泛素刚表达时是以无活性的蛋白原形式存在,它要么与核糖体蛋白融合存在,要么形成线性的多泛素体,当其羧基端的一个氨基酸被切除后泛素才能激活。另外,去泛素化酶还通过破坏硫酯键的形成,影响蛋白的泛素化,从而参与泛素的再循环^[1,3]。不同的 DUB 针对泛素链的专一性不一样,例如只针对 K48 泛素链的 DUB 或只针对 K63 泛素链的 DUB。而另一些 DUB 则专一性稍差,可以切割不同的泛素链。DUB 一般是无活性的或自我抑制的,只有当转移到细胞的某个区域或结合了适当的底物蛋白时才表现出活性。为了正确定位和保证催化专一性,DUB 需要其它蛋白如脚手架蛋白和底物接头蛋白的辅助^[3]。

人类基因组编码大约 100 个去泛素化酶,分为五个家族。它们是泛素 C 末端水解酶(UCH)家族,泛素特异性蛋白酶(USP/UBP)家族, Otubaim (OTU)家族, Josephin 结构域蛋白家族及 JAMN 家族。另有一个小的蛋白家族,但其泛素的特异性差。

去泛素化是受严格调控的,就像蛋白的泛素化一样。去泛素化涉及到细胞周期调控,依赖于蛋白酶体和溶酶体的蛋白降解、基因表达、DNA 修复、激酶活化、微生物致病性等。有些病原微生物已获得编码去泛素化酶的基因,这意味着影响宿主细胞蛋白的泛素化对这些微生物是有选择性优势的。

去泛素化酶的活性是受到精细调控的,以避免

偶然切割了不正确的底物。去泛素化酶可以被磷酸化、泛素化或 SUMO 化,这些修饰影响了它们的活性,定位或半衰期。

去泛素化酶一般都有一个催化结构域和一个泛素结合结构域以及不同的蛋白-蛋白相互作用结构域。这些结构域有利于结合、识别不同的蛋白及指导蛋白复合体的装配,从而有利于去泛素化酶的定位和选择底物,发挥生理功能。去泛素化酶与底物接头蛋白、脚手架蛋白及抑制蛋白的联系是非常特异的^[5]。

2 泛素特异的去泛素化家族

2.1 UCH 去泛素化酶家族

UCH 去泛素化酶家族成员是巯基蛋白酶,主要是对泛素链起修饰作用^[1],其催化核心区包含 230 个氨基酸,如 UCH-L1 和 UCH-L3。人类有 4 个 UCH 去泛素化酶,酿酒酵母有一个。UCH-L1 和 UCH-L3 有可能参与泛素前体的加工以及拯救。UCH37 在其 C 端有个 100 氨基酸的区域可以引导 UCH37 到达蛋白酶体并将蛋白上的泛素多聚体切下。BAP1 则有个 500 个氨基酸的区域,它含有核定位信号,并可以结合一个叫 N-terminal ring finger of BRCA1 的泛素连接酶^[1-7]。

2.2 USP 去泛素化酶家族

USP 去泛素化酶家族是最大的 DUB 家族。在酵母中 USP 称为 UBP。UBP 家族具有种属和组织特异性,不同的生物其 UBP 或 USP 的种类数量是不一样的^[1]。酵母有 16 个 USP 家族蛋白,而人可能含有 56 个 USP 家族蛋白。6 个 USP 去泛素化酶的结构显示 USP 结构域是高度保守的,它包括三个亚区域: finger、palm 和 thumb。CYLD 是一个与肿瘤综合症相关的去泛素化酶,它缺乏 finger 亚结构域。USP 的结构研究显示泛素的 C 端插入到介于 thumb 亚结构域和 palm 亚结构域之中,而泛素的球状部分则与 finger 亚结构域相互作用。绝大多数 USP 蛋白含有一个催化区域以及与其它蛋白相互作用的结构域^[1-7]。

2.3 OTU 去泛素化酶家族

由于属于 OTU 结构域家族的去泛素化酶,其结构与果蝇卵巢发育相关的蛋白同源而得名。OTU 家族成员在氨基酸序列上与 UBP/USP 和 UCH 完全不同,不存在同源性,对不同的泛素链具有不同的专一性,如 OTUB1 只针对 K48 连接的泛素链,而 OTUB2 却能针对 K63 和 K48 连接的泛素链,A20 只

针对 K48 连接的泛素链, Cezanne DUB 更倾向于 K11 连接的泛素链, TRABID 则可以切割 K29 和 K33 连接的泛素链^[3,5]。酵母编码 2 个 OTU 去泛素化酶, 斑马鱼也有一编码 OTU 蛋白的基因 Z-otu^[1], 人类编码 15 个 OTU 去泛素化酶, 分为 OTU, OTUB 和 A20 类似 OTU。不是所有具有类似结构域的蛋白都具有去泛素的功能。例如, 果蝇的卵巢肿瘤相关蛋白在活性位点有个丝氨酸, 从而不能被激活。OTU 核心区域由两个螺旋结构中夹有 5 个 β -折叠, 不同的 OTU 家族成员只是结构域大小不同而已^[1-7]。

2.4 MJD 去泛素化酶家族

Machado-Joseph 疾病相关蛋白 Ataxin-3 被研究得较为清楚, 它是个与神经退化紊乱相关的蛋白。人类的 Josephin 家族蛋白有 4 个, 它们的结构类似于 UCH 去泛素化酶家族, 分别是 Ataxin-3、Ataxin-3L、Josephin-1 和 Josephin-2。其中的 Ataxin-3 是个半胱氨酸蛋白酶, 它可以结合 K48、K63 方式连接的泛素链, 但是对 K63 方式连接的泛素链更特异。Ataxin-3 和 Ataxin-3L 在氨基酸序列上是 85% 同源的, 以相似的方式折叠, 但结合 Ub 的方式却大不同^[1-7]。

2.5 JAMM 去泛素化酶家族

至少有 4 个不同的含有 JAMM 结构域的去泛素化酶, 它们属于金属蛋白酶。其中 3 个是以泛素化的蛋白为底物的, 另一个是以泛素类似多肽-Nedd8 修饰过的蛋白为底物。一种具有 AMSH 类似结构的蛋白 AMSH-LP 也是一种去泛素化酶, 可以特异性地切割 K63 连接的泛素多聚物。AMSH-LP 蛋白结合两个锌离子, 其中一个位于活性中心, 另一个与 AMSH 结构形成一个泛素识别区。AMSH-LP 蛋白的 JAMM 结构域可以和远处的泛素及一个邻近的泛素的三肽序列 Gln62-Lys63-Glu64 相互作用。这个三肽序列只存在于 K63 连接的多聚泛素链上。JAMM 家族对一些去泛素化酶抑制剂不敏感, 但却被金属螯合剂 TPEN 所抑制^[1-7]。

3 去泛素化酶的活性调节

既然 DUB 是蛋白酶, 它们的酶活调节就显得很重要, 以免错误地切割了非底物蛋白, 另外, 对底物蛋白切割的时空调节也很重要^[5,7]。

3.1 底物诱导的构型变化

每一个 DUB 家族的代表成员的分子结构都已经知道。结构研究表明当结合泛素时, DUB 分子的

活性部位的结构会发生重排, 以促进分子间结合与催化水解。这避免了在 Gly-Gly 序列处错误切割并提高了特异性。

人类的 UCH-L1 和 UCH-L3 及酿酒酵母的 YUH1 的晶体结构研究表明, 这些分子发生了催化所需要的分子结构的变化。在 UCH-L3 的活性部位有一个环状结构发生了变化并横穿活性位点。当结合基于泛素的抑制剂(泛素的乙烯-甲基酯)时, 这个 UCH-L3 的横穿的环以一种 α -螺旋-S 形状环的方式被固定了, 以便接触泛素的 C 末端。这个构型在酵母的 YUH1 结合另一个抑制剂—泛素—乙醛时也发生类似变化。这表明这个横穿环在具有 UCH 结构域的去泛素化酶中是保守的。这个结构可能避免了 UCH 结构域过分紧密地结合泛素的 C 末端^[3,5]。

USP7 含有三个亚结构域, 包括拇指、手掌和手指部分。在手掌和拇指间形成一个缝隙而称为催化中心。而手指部分则与泛素相互作用。在与泛素结合之后, USP7 在催化区域发生构型的变化, 如具有催化活性的半胱氨酸和组氨酸的移动。当存在 DTT 时, USP7 的活性增强^[3]。

结合了基于泛素的抑制剂的酵母的 OTU1 分子的结构清楚地表明 OTU 结构域在结合泛素时也发生了活性位点重排。Otubain-2 的活性位点只是部分地发生结构变化, 以便参与结合泛素。OTU1 分子中的环成为 β 折叠形式而结合泛素^[5]。

正如 UCH 家族, USP 结构域去泛素化酶在结合泛素时也发生构型变化^[4]。

3.2 由脚手架蛋白或接头蛋白诱导的活性

DUB 在变更细胞内位点前是无活性的, 这需要调控。在结合蛋白酶体前, USP14、UCH37 和 POH1 是没有活性的。这些去泛素化酶在细胞内可以自由单体或与蛋白酶体结合的方式存在, 因此, 当它们与蛋白酶体结合时其活性就受到了调节。

去泛素化酶遇到的另一个挑战是底物的专一性。它们的核心催化区域只结合泛素, 为了选择正确的泛素化的蛋白底物, 就需要它们与目标蛋白的额外的相互作用。一些去泛素化酶具有很好的催化能力, 但对泛素的亲和性却较低, 因此需要其它的相互作用以获得底物。与脚手架蛋白的相互作用可以让去泛素化酶正确定位到底物区域。与底物接头蛋白的相互作用可以在去泛素化酶/脚手架蛋白和目标蛋白之间架起一座桥梁。这样, 正确的底物可以在恰当的时机被传递到去泛素化酶的恰当位置, 以便催化反应发生^[3,5]。

3.3 去泛素化酶的转录调控

去泛素化酶活性的专一性可以通过恰当的时机来调控,特别是当特定的 DUB 累积时,例如细胞因子诱导的小鼠淋巴细胞 DUB。使用不同的细胞因子来刺激淋巴细胞会导致一种分子量为 60 kDa 的类似于人 USP17 的 DUB 产生,DUB-1 可以被白介素-3、白介素-5 和集落刺激因子 GM-CSF 诱导产生,而 DUB-2 则由白介素-2 刺激产生。这些 DUB 是即时转录基因,它们在 DUB 基因中的细胞因子反应元件控制下迅速被诱导和转录。当细胞因子反应被抑制时它们又会迅速降解,它们通过多聚泛素化而被转移到蛋白酶体上降解。这种时空的调控表明 DUB-1 和 DUB-2 在调控细胞因子反应中起一定作用。其它的 DUB 也以类似的方式调控,例如 CYLD 的转录是由 NF- κ B 和 MKK3/6-p38 信号通路来调控的^[5]。

3.4 翻译后共价修饰

一些关键的调节性酶是被一系列信号通路和 DUB 调控的。大多数调控蛋白被一种或多种激酶进行磷酸化修饰。绝大多数 DUB 在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸位置发生磷酸化,最近的蛋白质组学发现大量的泛素-蛋白酶体成分,包括 USP15, USP19, USP28 和 USP34,是被应对 DNA 损伤的 ATM/ATR 激酶所磷酸化的。一些成分调节 DNA 损伤检验点,例如,在离子照射时,由 ATM/ATR 激酶介导的 USP34 可以让细胞迅速停留在 G1 期。USP28 也被 ATM/ATR 激酶磷酸化,从而参与 DNA 损伤反应,它能够去泛素化并稳定其蛋白水平,FBW7 是一个参与 myc 转录因子降解的泛素连接酶。USP15 也被 ATM/ATR 激酶磷酸化,并将 I κ B 上的泛素切下,从而抑制 NF- κ B 反应。另外 A20 也调节 NF- κ B 通路。首先,将通路中 K63 连接的泛素链从 RIP1、TRAF2、TRAF6 或 NEMO 上切下,然后,A20 分子上的泛素连接酶结构域促进了这些蛋白的 K48 泛素化,从而促进了它们的降解并下调 NF- κ B 通路。由 I κ B 激酶 β 激活的 A20 蛋白的 381 位丝氨酸(S381)磷酸化,促进了 A20 抑制 NF- κ B 信号通路的能力。现在还不知道 DUB 的活性提高或者连接酶活性降低是否由 A20 的磷酸化导致,但最终结果都是反馈抑制 NF- κ B 信号通路^[1,5]。

泛素化也是一种调节性修饰。有些 DUB 本身也被泛素化,以便降解。除了上述小鼠细胞因子诱导的 DUB,USP4 也被多聚泛素化。USP4 可以将 Rho52 去泛素化,Rho52 是一个癌蛋白和 E3 连接

酶。反过来 Rho52 可以将 USP4 泛素化。在 USP4-Rho52 复合物中,USP4 是被抑制的,这表明在有底物蛋白的时候,异源二聚体可以作为一个连接酶。当没有底物蛋白时,Rho52 可以自身泛素化,而 USP4 则可以逆转这种泛素化。然而,当 Rho52 将 USP4 泛素化时,这个 DUB 就会降解。因此,USP4 和 Rho52 是相互调节的。另一个癌蛋白,TRE17 则是一个依赖于钙/钙调蛋白信号通路的蛋白,它可以被单泛素化。这些都表明,蛋白的泛素化调节是受信号通路调节的。另外,USP7、USP36 和 DUB-1 也可以被泛素化,但其重要性尚不清楚。USP25 可以被 SUMO 化,使得其结合与水解多聚泛素链的能力降低^[5]。许多 DUB 与 E3 结合在一起,有时调节 E3 的泛素化,但有时却被 E3 泛素化,从而调节 DUB 蛋白的稳定性^[4]。

另外,DUB 可以被其它蛋白酶切割降解而调节,如 A20 被 MALT1 切割而灭活^[4]。当有紫外照射时,USP1 还可以切割自身,导致 PCNA 的积累^[4]。

4 DUB 的模块化

除了核心的活性结构域,大多数去泛素化酶含有 N 端、C 端和其它间隔部分,它们参与了底物蛋白的识别,去泛素化蛋白在细胞内的定位、催化活性以及蛋白-蛋白相互作用。这些分子结构域包括蛋白-蛋白相互作用结构域,它与底物、脚手架蛋白或底物接头蛋白相互作用;泛素结合结构域,它参与泛素单体或多聚体的识别^[5]。

4.1 多聚泛素结合结构域

不同的多聚泛素链连接方式导致了底物蛋白在细胞内的不同命运,这表明细胞受体及参与泛素化的酶是能够区分这些不同的泛素链的。一个模型表明受体/酶能够识别一条泛素链中的几个泛素。在泛素系统中一些蛋白有多个泛素结合区域,从而能够保证这种相互作用。USP5 也叫 IsoT,是最先鉴定的 DUB 之一。IsoT 在酵母、霉菌、植物、果蝇及其它真核生物中都有同源结构。功能分析表明,这些模式生物中,IsoT 负责游离的多聚泛素链的体内装配。游离多聚泛素链的水平是由酵母的异肽酶 T 的去泛素化酶活性调节的。游离多聚泛素链的积累是有害的,因为它可以作为一个底物蛋白竞争性抑制剂,使得底物蛋白不能结合蛋白酶体或其它泛素受体。游离多聚泛素链可以由泛素连接系统产生,也可以由泛素化的靶蛋白被蛋白酶体相关的去泛素化酶切割而得到。

酵母 IsoT 的同源物 UBP14 的缺失突变导致的缺陷类似于其它泛素-蛋白酶体系统蛋白的突变,例如孢子产生缺陷,刀豆氨酸过敏,两种典型泛素-蛋白酶体系统底物降解效率的降低。然而,UBP14 缺失会导致游离泛素链以及泛素连接物的累积。虽然,Ub_{pA} 不是 *D. discoideum* 的生长所必需,但是它对这个生物的聚集、趋化和细胞粘附活动是关键的。这种缺陷会导致由过量游离多聚泛素引发的蛋白酶体功能抑制。

IsoT 在多聚泛素链中识别多个泛素分子,并在 K29、K48 和 K63 处切割多聚泛素链。切割机制研究表明,IsoT 是依次切割邻近的泛素,依次担当一个外切异构酰胺酶。IsoT 有至少 4 个 K48 连接的多聚泛素链的结合位点,这些位点由 4 个泛素结合结构域形成,它们是 N 末端 ZnF UBP 结构域、USP/UBP 结构域和两个 UBA 结构域。在邻近的泛素具有一个自由的 C 末端时,ZnF UBP 结构域可以诱导分子构型变化以产生活性。当这个 C 末端被截短或延伸时,ZnF UBP 结构域的结合泛素的能力大大降低。当 IsoT 分子还没有被其它 DUB 分子切割而从靶蛋白上释放时,底物诱导的分子构型变化使得 IsoT 不能够将多聚泛素链解聚。

虽然不同的多聚泛素链采用了不同的三维结构,IsoT 采用同样的一套结构域与相应的泛素单体相互作用,而不管连接方式。这就要求 IsoT 分子是柔软的以便结合靶蛋白结构域的运动,从而采用类似的三维定向,以适应不同的链结构或不同的多聚泛素链中的泛素。

4.2 底物的直接识别

除了识别多聚泛素链中的特殊连接方式,一些 DUB 呈现出直接的泛素化蛋白亲和性。USP7 也叫 HAUSP,能够将 p53 和 Mdm2 去泛素化,并被 EB 病毒的 EBNA1 蛋白抑制。USP7 的 N 端结构域可以结合在 p53 和 Mdm2 分子中的 4 个空间上紧密相连的氨基酸残基。对于 p53,是 359—367 位氨基酸;对于 Mdm2,是 147—159 位氨基酸。结合了 EBNA1 多肽的 USP7 的 p53 结合结构域晶体结构的研究表明,EBNA1 多肽和 p53 结合在 USP7 的同一个位点,但是 p53 结合得略微松散。功能研究表明,当 EBNA1 结合 USP7 后,抑制了它的 p53 去泛素化能力,使得细胞降低 p53 水平从而不会凋亡^[5]。

4.3 蛋白—蛋白相互作用结构域

DUB 的另一个特征是它们都含有蛋白—蛋白相互作用结构域,所以,许多 DUB 可以结合底物蛋

白、接头蛋白和脚手架蛋白。这些相互作用使得许多 DUB 可以与泛素连接酶形成大分子复合物。

蛋白酶体是一个大的多蛋白复合物,它催化依赖于泛素的蛋白降解。26S 蛋白酶体含有至少 30 个蛋白,它们形成两个主要的亚单位:20S 核心颗粒和 19S 调节颗粒。4 个堆积的七聚体形成了 20S 核心颗粒。两个内环由 β 亚单位形成,它含有蛋白酶的活性位点,以便降解蛋白质。外环由 7 个 α 亚单位构成,它们形成一个门控的孔,那些未折叠的多肽必需通过它。因为结合在蛋白上的多聚泛素链会妨碍底物蛋白转位到蛋白酶体的腔道中,因此必须被除掉。

在高等真核生物中,三个分属不同 DUB 家族的 USP14、UCH37 和 POH1 是和蛋白酶体相关的。酿酒酵母缺乏 UCH37 蛋白,而其它生物则有这个酶的同源物。在蛋白酶体降解蛋白过程中,这些 DUB 将底物蛋白上的多聚泛素链切掉。这三个 DUB 都需要与蛋白酶体联系并发生分子的变化构型,以便发挥明显的催化活性。其中,POH1 和 UCH37 是 19S 调节颗粒中的组成成分。UCH37 含有一个与 19S 调节颗粒中的亚单位 Admr1 相互作用的 C 端突出。不同的截短突变表明,酵母同源蛋白 POH1 (人类是 RPN11) 的 N 端 JAMM 结构域必需与蛋白酶体盖子亚单位蛋白相联系,但是,不知道这些截短的蛋白是否正确折叠。因此,其它的蛋白-蛋白相互作用也参与了。第三种 DUB, Usp14 通过一个 N 端泛素类似结构域,与 19S 颗粒基底的一个亚单位蛋白 Rpn1 (人类则是 PSMD2) 相联系^[5]。

5 DUB 在细胞中的功能

去泛素化酶 DUB 由于其自身的特点,从而在调节蛋白酶体的活性、细胞的生长和分化、器官的发生、肿瘤的形成方面都有着重要的作用^[1]。直接的证据表明 DUB 必需与多蛋白复合物相联系以体现其生理功能。这种相互作用有利于底物蛋白与 DUB 共定位,但也容许一个泛素化—去泛素化循环指导信号通路的激活与否。

5.1 与蛋白酶体相关的 DUB 影响蛋白多聚泛素化

蛋白酶体中的三个 DUB 是与 19S 调节亚单位相联系的。19S 调节颗粒可以使得泛素化的蛋白解开并去泛素化。19S 调节颗粒可以再细分为两个小的复合体:基底和盖子。盖子中含有多个多聚泛素化的受体,其中 S5a 和 Amrml 是 19S 颗粒的整合成

分,而其它的多聚泛素受体则是与蛋白酶体相关的。其它受体蛋白通过一个泛素类似结构域与 19S 蛋白酶体的 Rpn1 亚单位(人类则是 PSMD2)相联系,它们还含有一个属于泛素相关结构域(UBA)家族的泛素结合结构域。它们作为一个接头蛋白将多聚泛素化的底物与蛋白酶体相联系。基底复合物中含有六个 AAA 结构的 ATP 酶,可能用于解开底物蛋白并将其转位到蛋白酶体的腔道中。因此,19S 调节亚单位结合多聚泛素,而基底复合物可能解开靶蛋白并将其转位到 20S 蛋白酶的门孔处。

功能研究表明 UCH37 通过蛋白酶体将多聚泛素链远端的泛素移除,从而抑制了多聚蛋白的降解。UCH37 的缺失体会加速底物蛋白的水解,相应地,细胞多聚泛素化的蛋白水平也出现下降。UCH37 的 C 端结构域与盖子亚单位 Adrm1 的 C 末端相联系。这种联系增加了底物蛋白水解的有效性。UCH37 的 C 末端会抑制自身的催化活性,而当它与 Adrm1 结合后就解除了自身抑制。除了结合并激活 UCH37,Adrm1 也可以通过 N 端结构域的不同表面区域与 Rnp2/PSM1D 和泛素相互作用。虽然,Adrm1 的 N 端泛素结合域与多聚泛素相互作用,它可以结合酶和底物的一端。UCH37 的催化中心结合多聚泛素链的远端亚单位,并将它从链上水解下来。然而,只有当 UCH37 与整个 19S 调节颗粒相联系时,两个泛素的水解才会发生。这表明其它蛋白也参与了 UCH37 的激活^[1,5]。

正如 UCH37,Usp14 也只有与 19S 调节颗粒相联系时才被激活。在人细胞中的 USP14 蛋白缺失或将酵母的类似物 UBP6 敲除,会加速蛋白的降解。这种由 UBP6 介导的蛋白降解抑制,是不依赖于它的去泛素化活性,但是依赖于它通过 UBL 结构域与 19S 调节颗粒的基底相联系。Usp6 与一个蛋白酶体相关 E3 连接酶 Hul5 合作,从而发挥催化作用,以调节靶蛋白上的多聚泛素链的长度。Usp6 可以从远端将多聚泛素链拆开。这种动态的多聚泛素链的延长和缩短代表了一种蛋白酶体相关底物和多聚泛素链移除的必要性之间的平衡。除了调节泛素链长度的功能外,Usp6 通过将泛素在蛋白酶体处进行循环利用而调节泛素水平。如果缺失小鼠类似物 Usp14,则会导致自由泛素单体的缺失。

第三种去泛素化酶,Rpn11/POH1 是个 19S 调节颗粒的组成部分。Rpn11 属于金属蛋白酶 JAMM 结构域家族。Rpn11 对酵母的成活非常重要。如果通过 RNA 干扰,将人的类似物 POH1 缺失将会抑制

细胞生长。将 POH1 敲低会导致多聚泛素化的蛋白水平增高,细胞蛋白降解缺陷,蛋白酶体的活性受到影响,因为 26S 蛋白酶体不能成熟并且不稳定。因此,不像其它两个蛋白酶体相关 DUB,POH1 对蛋白酶体的完整性是必需的。已有报道认为 Rpn11 活性位点的突变会导致果蝇、人类细胞和酵母的死亡。然而酵母 Rpn11 的 D121A 活性位点突变会导致蛋白降解缺陷,但不会导致细胞死亡。Rpn11 与 19S 调节颗粒的盖子及 ATP 水解的相互联系是 Rpn11 依赖的去泛素化过程所必需的。这表明去泛素化是与基底复合物 ATP 酶完成的蛋白去折叠相偶联的。不像 Usp14 和 UCH37,Rpn11 是在链的近端将底物蛋白上的多聚泛素切除^[4-5,8]。

5.2 内质网相关的蛋白降解

在细胞中,内质网参与蛋白的产生与折叠,同时也参与蛋白的质量控制。内质网上锚定的泛素连接酶对蛋白的泛素化非常重要。这种 E3 连接酶共有 24 个。这些 Ub 连接酶与 E2 Ubc7/UBE2G2 一起负责错误折叠的蛋白泛素化并降解,如 Hrd1/synoviolin 和 gp78/Doa10 的降解。这个降解过程又由 p97 蛋白以及接头蛋白 Ufd1 和 Np14 介导。DUB 与 p97 的相互作用对于蛋白从内质网到细胞质被降解的转位是非常必要的^[6]。USP19 能够抑制内质网相关的蛋白降解,并通过这种机制抑制肌细胞的分化和融合^[4]。

5.3 组蛋白的去泛素化

在高等真核生物中,单泛素化的组蛋白 H2A 和 H2B 在多种细胞核相关过程中是非常关键的,例如有丝分裂、转录起始和延长、mRNA 的向外运输和沉默。相反,组蛋白 H2A 在酿酒酵母中是不被泛素化的。去泛素化酶可以将 H2A 和 H2B 同时去泛素化,或仅仅将 H2B 去泛素化,或仅仅将 H2A 去泛素化。许多组蛋白的去泛素化酶也只在多蛋白复合物中起作用。在活跃染色质上的泛素化的组蛋白数量可能与沉默染色质上的不同,因为还有其它的相关蛋白和表观遗传学修饰^[4-5,7,8]。

5.3.1 H2B 的依次泛素化与去泛素化调节转录和沉默

特异的 E2 和 E3 催化 H2B 的单泛素化,在酵母中是 K123,在人是 K120。酵母中,Rad6 和 Bre1 催化 H1b 的泛素化,而人的相应的酶是 UbcH6 和 RNF20。这种修饰在转录激活过程中的很多基因的启动子区和 5' 末端很多。H2B 泛素化是 H3 组蛋白在 K4 (H3K4me) 和 K79 (H3K79me) 的二甲基化

和三甲基化所必需的,这是一个与转录激活染色质相关的修饰,帮助招募 SAGA 共激活复合物以及进行进一步的染色质修饰。

将一些基因的启动子区和编码区的组蛋白 H2B 上的泛素切除对于基因的正确转录是必需的。酿酒酵母 Ubp8 和人类类似物 USP22 是 Spt-Ada-Gcn5-乙酰转移酶(SAGA)的一部分。SAGA 是一个共激活复合物,它调节几个基因的转录激活,延长及 mRNA 输出。部分通过组蛋白的翻译后修饰状态来调节,例如组蛋白的乙酰化和 H2B 的泛素化。因此,组蛋白 H3 的 K4 和 K79 被甲基化后,招募 SAGA 复合物会导致 RNA 延长过程中 H2B 的去泛素化,从而有利于 RNA 聚合酶 II 的 C 末端结构域的 2 位丝氨酸(S2)磷酸化。H2B 的泛素化阻挠了 RNA 聚合酶 II 激酶 Ctk1 的招募,因此防止了 RNA 聚合酶 II C 末端结构域(CTD)S2 磷酸化。由 Ubp8/ USP22 完成的 H2B 去泛素化会导致 Ctk1 的招募以及 S2 的磷酸化,这与 RNA 延长相关^[2,5]。

Ubp8 通过一个 SAGA 内的蛋白质模块而与 mRNA 输出相关,这个 SAGA 模块包括 Sgf73(酵母是 Ataxin7),Sus1(这是一个 TREX-2 mRNA 输出复合物成员)及 Sgf11。这个模块介导了 SAGA 与其它 TREX-2 mRNA 输出复合物成员的结合,如 Sac3 和 Thp1,它们与核孔复合物相互作用,帮助输出 mRNA,并有利于基因转录。一些基因的转录被 SAGA 调控,这包括 GAL1 基因。在转录过程中,这些基因定位于核周边并依赖于 Sus1 蛋白。如果没有 Sgf73 蛋白(可以激活 Ubp8 的去泛素化活性),会导致 GAL1 基因的 mRNA 出核运输缺陷。这表明 SAGA,组蛋白 H2B 去泛素化和 mRNA 输出在基因调控上是有联系的。

除了基因的转录起始,延伸和 mRNA 输出,H2B 的去泛素化对基因沉默也是必需的。缺失 Ubp8 和 Ubp10 会导致泛素化的 H2B 增高。Ubp8 参与了基因的激活,而 Ubp10 通过将泛素化的 H2B 去泛素化而导致基因沉默。Ubp10 定位于两个沉默区,即端粒和 rDNA 处,并与一个沉默蛋白相关。Sir4 是个 Sir 复合物成员,这个复合物还包括 Sir3 和 Sir2。缺失 Ubp10 会增加泛素化的 H2B 水平及 H3K4me 和 H3K79me 的水平而影响端粒沉默,从而抑制了 Sir 蛋白与沉默位点的联系。过表达 Ubp10 也会导致泛素化的 H2B、H3K4me 和 H3K79me 水平降低,Sir 复合物转移至非沉默区,从而不发生端粒沉默。Sir 复合物转位是因为 Sir3 蛋白在非沉默区结合了非

甲基化的组蛋白上的 K4,从而不能结合到沉默区。Ubp10 的一个导致不发生端粒沉默的突变体不会增加 H2B 的泛素化或 H3K4me^[5-8]。

5.3.2 高等生物 H2A 的泛素化与去泛素化

H2A 的泛素化与发育相关基因沉默、X 染色体的失活、基因转录起始和延伸有关。在有些基因中是因为抑制了 H3 的 K4 甲基化造成的,这与泛素化的 H2B 功能相反。而另一些基因中,泛素化的 H2A 降低了转录的延伸。不同的组蛋白的表观修饰依赖于基因的不同而不同,因此,组蛋白泛素化效果也会不同。

三个去泛素化酶,Usp16、Usp21 和 2A-DUB 会特异地将泛素化的 H2A 去泛素化。H2A 去泛素化酶 2A-DUB 属于 JAMM 结构域家族。2A-DUB 是个雄激素受体(AR)的共激活因子,通过 H2A 的去泛素化而充分激活 AR 依赖的基因表达。2A-DUB 与组蛋白乙酰转移酶 p300/CBP 相关因子(p/CAF)相关,这个复合物介导转录激活区组蛋白 H3 和 H4 的乙酰化。2A-DUB 优先将高度乙酰化的核小体中的 H2A 去泛素化。然而,泛素化的 H2A 发生去泛素化不会影响 pCAF 的乙酰转移酶活性。这意味着这些表观修饰是通过一系列步骤来完成的。敲低 2A-DUB 导致的 H2A 泛素化增加可部分地由敲低 p/CAF 来拮抗。组蛋白的乙酰化可以控制 H2A 的去泛素化。2A-DUB 的去泛素化活性也会导致组蛋白 H1 的不稳定,这个过程要求组蛋白的乙酰化并激活基因的表达。Usp16 参与基因表达和细胞周期的调控。野生型的 Usp16 定位于细胞质,然而这个酶的活性位点突变与有丝分裂中的染色体相关,而有丝分裂之后它则滞留在细胞核中。Usp16 能够在体内将 H2A 去泛素化,而过表达的 Usp16 则会降低泛素化的 H2A 的水平。Usp16 将核小体内 H2A 的泛素移除。敲低 Usp16 会导致泛素化的 H2A 的水平增加,分裂的细胞减少。有丝分裂时,泛素化的 H2A 的水平是降低的,结束时是增加的。H2A 的泛素化反过来与 Aurora B 激酶介导的 H3 的 10 位丝氨酸磷酸化相关。H2A 的泛素化抑制 Aurora B 激酶结合到核小体上,从而影响了染色质的浓缩,染色体的分离以及有丝分裂进程。在爪蟾中,Usp16 调节 Hox 基因的表达。H2A 的泛素化调节 Hox 基因的沉默,可能是 Usp16 通过在启动子区以及 Hox 基因调节区的 5' 端调节泛素化 H2A 的水平而抑制了 Hox 基因的表达。

泛素化的 H2A 也控制了转录起始。Usp21 是

人类中第三种将 H2A 去泛素化的酶。在肝细胞再生中, Usp21 调节基因转录^[5-8]。

5.4 SCF E3 的活性调节

E3 连接酶 Skp、cullin、F-box 即 SCF 的催化活性是高度依赖于一个 DUB 的。在这个 DUB 的 cullin 亚单位上的一个位点是和 Nedd8 相连接的。它的活性则由 CSN5 亚单位提供的。cullin 亚单位的 Neddy 化和去 Neddy 也对 SCF 的活性是必需的。CSN 参与许多细胞活性, 如细胞周期调控, 转录调控和 DNA 损伤反应, 也与肿瘤发生相关^[3]。在缺乏底物蛋白时, E3 可以发生自身泛素化, 然后被蛋白酶体降解。这些 E3 也可以被其它的 E3 所泛素化, 而 DUB 则可以逆转这个过程。USP7 可以将自身泛素化的 Mdm2 和 RING2 连接酶去泛素化^[3]。

5.5 E2 活性的调节

DUB 可以干扰 E2-Ub 中间复合物的形成, 从而抑制泛素化。Parkin 是个帕金森症相关的 E3, 含有一个 RING-between-RING (RBR) 结构域。Parkin、UbcH7 (Parkin 的 E2) 和 Ataxin-3 可以形成一个紧密的复合物, 以防止 Parkin 蛋白的自身泛素化, 从而释放出 UbcH7 蛋白。这个复合物的形成需要 DUB 结构域中的巯基。但 Ataxin-3 对已经泛素化的 Parkin 蛋白或已经形成的 E2-Ub 复合物无作用。RBR 连接酶首先将 Ub 从 E2-Ub 复合物中转移至活性位点巯基处, 然后再转移到一个蛋白氨基群处。UbcH7 与 Parkin 相互作用, 但不能直接转移 Ub, 因此, Ataxin-3 可能通过利用自身的活性巯基从 E2-Ub 处截取 Ub, 从而抑制 Parkin 的自身泛素化^[3]。

OTUB1 是 K48 泛素链特异的去泛素化酶。它可以结合 Ubc13 (一种在 DNA 损伤反应时可以产生 K63 泛素链的 E2) 或 UbcH5b 与 Ub 的中间体, 从而抑制了 Ubc13 或 UbcH5b 的功能^[3]。

5.6 DUB 在细胞周期、分化和凋亡中的作用

细胞周期调控要求对许多检验点和信号分子进行有序降解, 从而有序地进行复制、生长和有丝分裂。这些检验点参与了对基因组完整性以及影响细胞周期突变的监督。

Usp3 作用于泛素化的 H2A 和 H2B, 它定位于细胞核并与染色质相互作用。半胱氨酸位点的突变会稳定 Usp3 和染色质之间的相互作用。除了催化核心区, Usp3 在 N 端还有一个 ZnF Ubp 结构域。这个假定的泛素结合区对结合泛素化的 H2A 调节是必需的。在人细胞中, Usp3 能够将 H2A 和 H2B 都去泛素化。在 HeLa 细胞中过表达 Usp3 会导致泛

素化的 H2A 和 H2B 减少, 但并不改变总的蛋白的泛素化水平。使用 RNA 干扰导致的 Usp3 缺失会导致泛素化的 H2A 增加, 而 H2B 则略微增加, 细胞周期的 S 期延迟, DNA 复制受影响, DNA 缺口增加, 从而诱导表达 Ataxia-Telangiectasia 突变 (ATM) 和 ATM/Rad3 相关 (ATR) 检验点激酶, 并调节 DNA 损伤应答。

UBP41 是个 UBP 家族成员中已知最小的分子。它能够特异性地催化某些蛋白酶的底物, 使之去泛素化, 从而影响细胞凋亡相关通路。一些骨骼形成因子, 如甲状旁腺激素 PTH, 甲状旁腺激素相关蛋白 PTHrP 及前列腺素 PGE2 可以共同提高细胞内的 cAMP 水平, 从而促进骨骼形成。在体外培养时, 如果仅有 PTHrP 和 PGE2 而无 PTH, 则细胞内 cAMP 量不增加, 如果导入 UB41, 则可以增加 cAMP 含量, 从而促进骨骼生长^[1]。

USP29 是个在氧化压力下由 JTV1 和 FBP 驱动转录的去泛素化酶, 它对于从分激活 PUMA 及促进凋亡非常重要^[7,9-10]。

5.7 DUB 在 DNA 修复中的角色

当机体的遗传物质受到侵害时, DNA 损伤检验点通过延迟细胞周期进展并进行 DNA 修复, 以维持基因组的完整性。转录因子 DEC1 由于 SCF 泛素连接酶和 CK1 的作用而不稳定。在 DNA 损伤时, DEC1 迅速被 ATM/ATR 复合物诱导表达, 并被去泛素化酶 USP17 稳定。DNA 修复后, DEC1 的蛋白降解又得以恢复^[11]。

在 DNA 损伤诱导的凋亡研究中发现, Usp28 参与检验点激酶 2 (Chk2)-p53-PUMA 信号通路, 这个信号通路调节体内应对双链 DNA 断裂导致的 DNA 损伤。Usp28 与检验点调节因子 53BP1、Claspin 和 Mdc1 相互作用。这些脚手架蛋白介导了离子辐射导致的 DNA 损伤反应。将 Usp28 敲低会引起这三种蛋白及 Chk2 的降低, 因此 Usp28 对这三种蛋白有稳定作用。Usp28 也调节了 G2 期的 DNA 损伤反应检验。此时, Claspin 被 APC 泛素化并被蛋白酶体降解。Usp28 可以通过将 Claspin 去泛素化而逆转这个过程, 并激活 Chk2 以应对 DNA 损伤。

Usp28 也控制了细胞内转录因子 MYC 的水平。MYC 是原癌基因, 它调节细胞生长、凋亡和细胞增殖。MYC 被 E3 连接酶 FBW7 以泛素依赖的方式降解。FBW7 是 SCF 的一个成分。MYC 的泛素化可以被 Usp28 的 DUB 活性拮抗。将 Usp28 敲低会导致 MYC 蛋白水平的降低, 过表达 Usp28 则会稳定该

蛋白^[5]。

PCNA 是一种 DNA 复制促进因子,能够通过泛素结合酶而发生单个的泛素化,然后激活一种跨损伤合成聚合物如 pol η ,催化 DNA 的合成,从而完成 DNA 链的修复^[1]。而 Usp1 通过对 FANCD2 蛋白和 PCNA 的去泛素化而参与 DNA 修复。Usp1 与 FANCD2 相互作用并共定位于 DNA 损伤后的染色质。敲低 Usp1 会导致单泛素化的 FANCD2 过度积累。当细胞离开 S 期时,Usp1 将 FANCD2 去泛素化,或者在 DNA 损伤后 Usp1 使细胞周期重新开始。Usp1 存在于一个含有 80kDaWD40 重复序列的 USP1 相关因子 1(UAF1)的大分子复合物中。这个异源二聚体的形成激活了 Usp1,因此 UAF1 是个脚手架蛋白。当 DNA 损伤时,USP1 的转录被终止,或者 USP1 通过肿瘤坏死因子受体 p75 的介导被蛋白酶降解,其蛋白很快消失,对 DNA 修复的抑制被解除,然后细胞修复损伤的 DNA 的能力提高^[1,5]。

Usp11 是个应对 DNA 损伤并促生存的去泛素化酶。当 Mitomycin C (MMC) 诱导 DNA 损伤时,Usp11 通过 BRCA2 信号通路参与 DNA 损伤修复,但并不需要 BRCA2 的去泛素化。BRCA2 的泛素化和降解与前列腺癌细胞的增殖相关。BRCA2 水平的下调则需要 PI3K 信号通路并上调 Skp1-Cul1-F-box 蛋白复合物成员 Skp2 蛋白^[5,7,10]。

5.8 DUB 调节信号传导通路的激酶

泛素化通过两种机制调节信号传导通路。首先,K63 方式连接的多聚泛素链作为一个识别信号招募接头蛋白和激酶来扩大信号。然后,去泛素化又通过调节信号复合物和成分的半衰期来调节这些通路,例如 NF- κ B 通路。它参与放大 TNF、IL-1/TLR 和 T/B 细胞抗原受体引发的信号,以便控制免疫、炎症和抗微生物反应。去泛素化则下调这些反应^[5]。

干扰素信号通路在机体抗病毒感染方面非常重要。USP13 通过结合 STAT1 并将其去泛素化,从而稳定它,由此增强了 I 型和 II 型干扰素信号通路^[12]。

5.9 DUB 与内吞的关系

哺乳动物蛋白单泛素化或与寡聚泛素相连在受体内吞及内吞的蛋白分选中很重要。去泛素化酶也参与这些过程并参与其它细胞内物质传输。为了调节几个 NF- κ B 激酶的活性,去泛素化酶 CYLD 参与调控了不同的细胞生理过程,包括 NGF 受体 (TrkA) 内吞。

在酵母中,去泛素化酶 Doa4 将晚期内吞体中的泛素进行循环。在内吞体膜上,Doa4 的 N 端与 Bro1 蛋白相互作用。Usp8 是个人的 Doa4 类似物,可被磷酸化及 14-3-3 蛋白调节。Usp8 与 ESCRT 装置相互作用才会调节内吞体物质运输,并且它抑制了 EGFR 受体内吞。

AMSH 是个含有 JAMM 结构域的去泛素化酶,但是它只将 K63 方式连接的泛素链切除。抑制 AMSH 活性加速下调 EGFR 信号通路,以便拮抗泛素依赖的溶酶体货物分选。当结合配体并迅速内吞时,EGFR 被泛素化且在溶酶体中降解。在内吞体膜上,泛素化的 RTK 被分选。其实,去泛素化酶也参与这个过程。AMSH 和 USP8 在 EGFR 下调过程中作用相反。这可能与它们特异识别不同的多聚泛素链有关。AMSH 可以通过将 K63 方式相连的多聚泛素链切下而将泛素化的货物从溶酶体降解中解救出来。USP8 的功能是多面的,可以针对 K63 方式或 K48 方式连接的多聚泛素链^[3-5,13]。

5.10 DUB 与肿瘤发生的关系

DNA 错误修复相关的蛋白 p53 是个抑癌蛋白,它的突变会诱导其它基因的产生,从而诱发肿瘤。由 E3 泛素连接酶 Mdm2 的导致的泛素化是 p53 蛋白的主要调节方式。它可以诱导 p53 出核并降解。而细胞质内的去泛素化酶 USP10 在 DNA 损伤后转位到核中,将 p53 蛋白去泛素化,从而拮抗 Mdm2 的功能,由此抑制了肿瘤细胞的生长^[14]。在受到外界压力时,另一个 DUB 分子 USP42 能够结合 p53 分子,将 p53 分子上泛素链切除后能够稳定 p53 蛋白分子,从而迅速激活 p53 信号通路,导致细胞增殖停止,以进行 DNA 错误修复,由此抑制肿瘤发生^[10]。USP15 能够稳定 Mdm2,并降解转录因子 NFATc2,以调控 T 细胞的激活。缺失 USP15 会激活 T 细胞,增强它对细菌感染和肿瘤发生的反应^[15]。

OTUD1 是个 OTU 结构域去泛素化酶家族成员,它可以直接抑制 Mdm2 介导的 p53 泛素化,它可以稳定并激活 p53,从而导致 p53 依赖的细胞增殖抑制和凋亡。DNA 损伤增强了 OTUD1 与 p53 的相互作用,因此,OTUD1 主要在细胞周期的 G2/M 和 S 期检验点起作用^[16]。OTUD1 通过抑制 Ubc13/RNF168 的活性来抑制 DNA 修复。它控制了 RNF168 影响染色质的泛素化的能力。当 DNA 损伤时,OTUD1 暂时地从 Ubc13/RNF168 复合物中解离出来,从而使得 RNF168 能够催化 DNA 损伤点的染色质泛素化。在这个位点它又和 UbcH5/MDM2 复

合物相关,从而抑制了MDM2依赖的p53泛素化,p53变得稳定并被激活^[16-17]。OTUD5也可以将p53蛋白去泛素化并稳定它,从而影响到DNA损伤诱发的细胞凋亡^[18]。

USP4是一个重要的p53调节分子,它直接与ARF-BP1结合并将其去泛素化,导致ARF-BP1复合物的稳定化以及后续的p53水平降低,而且抑制了p53相关的细胞凋亡。缺失USP4会促进细胞衰老。USP4在许多肿瘤中高表达,如膀胱癌,前列腺癌和甲状腺癌等,意味着它是个潜在的癌基因^[19]。USP7也是一个p53调节因子,它能够将p53和Mdm2去泛素化并稳定它们^[3]。

转录因子KLF5是个BAP1/HCF-1复合物中的成员,它在乳腺癌组织中表达,促进癌细胞增殖、转移以及肿瘤生长。BAP1是个去泛素化酶,可以结合KLF5并将其上的泛素链切除,从而稳定该蛋白,由此促进乳腺癌发生和转移。抑制BAP1的表达会抑制肝癌肿瘤的生长,并抑制肿瘤细胞的转移^[20]。

Cdc25A是个磷酸酶,激活细胞周期素依赖的激酶Cdk而促进细胞周期进程,有潜在的促癌性。肿瘤组织中Cdc25A是高表达的,Cdc25A可以被去泛素化酶Dub3作用并稳定。过表达Dub3,细胞将累积在S期和G2期并激活DNA损伤应答。Dub3促进了细胞的成瘤性。Dub3的高表达,促进了Cdc25A高水平地存在于乳腺癌中^[21]。

PTEN是个抑癌基因,在很多肿瘤中是缺失的。USP13能够将PTEN蛋白去泛素化并稳定它。缺失了USP13的乳腺癌细胞,其PTEN蛋白被下调,而Akt蛋白磷酸化、细胞增殖、软琼脂集落形成、糖酵解和肿瘤生长能力都明显提高^[7,22]。OTUD3结合PTEN蛋白,将其泛素链切除并稳定该蛋白。缺失OTUD3会激活Akt信号通路,细胞转化和肿瘤转移。降低OTUD3表达,会导致PTEN蛋白量降低,促进乳腺癌发生^[7-8,10,23]。

USP22参与组蛋白的去泛素化和乙酰化,从而影响到基因的转录和表达,它通过对BMI-1、MYC、FBP1和TRF1的影响而影响到肿瘤的发生和转移^[24]。

5.11 DUB与骨骼肌萎缩的关系

泛素蛋白酶系统在骨骼肌萎缩中扮演重要角色,肌肉损耗时,大量的泛素连接酶被诱导产生了。但是,几个去泛素化酶也在肌肉萎缩中被诱导表达,如USP19和USP14。而USP19、USP2和A20则参与肌肉发生。在肌肉萎缩中,USP19的表达可以通过p38/MAPK信号通路调控。在培养的肌肉细胞中,

USP19抑制了肌纤维蛋白的转录。肌肉萎缩中DUB的上调表达可能是为了维持一定浓度的自由单体泛素,以便后续肌肉相关蛋白的降解用,同时调节了肌肉损耗相关蛋白的稳定性和功能^[25-26]。

5.12 自噬相关的去泛素化酶

自噬是个进化上保守的生理过程,它将多种细胞质成分转入溶酶体以便再循环或降解。这个过程涉及蛋白聚集物的去除,细胞器的变化以及细胞内病原微生物的根除。这些目标物质必需用泛素来选择性地标记,以便被自噬受体识别,因此,泛素化就显得很重要,而去泛素化过程则可以拮抗它。巨噬细胞在细胞膜上有TLR受体,它可以结合细菌的脂多糖并启动针对病原体的吞噬过程以及由此导致的自噬。在这个过程中有E3连接酶TRAF6和去泛素化A20参与。TRAF6将吞噬和自噬相关的Beclin 1蛋白泛素化,它可被A20拮抗。除了TRAF6外,Nedd4和Rbx1/Ci14/DDB1复合物也可以修饰Beclin 1蛋白。A20也可以将TRAF6其它底物去泛素化,如Ulk1和TAK1。

USP10、USP13、USP36和AMSH等DUB也参与细胞自噬过程。USP13与Beclin 1直接作用,影响它的泛素化并影响了细胞的自噬^[10,27]。

5.13 DUB与发育

许多DUB参与了斑马鱼的发育过程。例如Otud7b、Bap1和Uchl3通过调节Notch信号通路而影响斑马鱼的发育。Otud4、Usp5、Usp15和Usp25影响了斑马鱼的背腹发育模式^[12]。

5.14 DUB与病毒感染

机体抗病毒感染涉及到多条信号通路及众多分子的调节,例如泛素化与去泛素化。病毒感染细胞后,信号分子TBK1被激活,它能够磷酸化IRF3,使之二聚化,然后入核启动I型干扰素基因转录,发生抗病毒免疫反应。而USP2b则参与调节TBK1的活性并抑制干扰素信号通路及抗病毒免疫。USP3通过与RIG-I相互作用,减少IRF3的磷酸化,影响干扰素的抗病毒机制,USP25有类似的功能。而USP4、USP13和USP25则增强干扰素的功能。有些单纯疱疹病毒也能编码USP,如UL36基因,其产物UL36USP能够抑制干扰素的功能^[28]。

5.15 DUB与线粒体

USP30被发现存在于线粒体的外膜上,调节线粒体的动态变化。USP30通过将底物蛋白去泛素化而抑制Parkin蛋白介导的线粒体自噬,USP15和USP35也参与这个过程^[4]。

5.16 DUB 与干细胞分化

USP22 通过影响 H2A 和 H2B 的泛素化而影响干细胞分化相关的转录因子,例如 Myc 和 Sox2,从而调控相应的靶基因。Psm14 通过影响 Oct4 而影响干细胞的形态变化。USP44 和 USP7 结合在 Oct4 的启动子区,而 USP25、USP44、USP49 和 USP7 则结合在 Sox2 的启动子区,调控基因表达和干细胞的维持和分化。USP7 通过将 SCF 诱导的泛素化而稳定 REST 蛋白,以维持干细胞的状态。USP44 是个干细胞分化的负调节因子^[2]。

6 结束语

蛋白的去泛素化过程是非常重要的蛋白修饰方式,与细胞的增殖、分化及凋亡相关,也与机体的发育和疾病发生相关。但是一些 DUB 的功能并不是特别专一的。例如 p53 蛋白可以被 USP10、USP11、USP42、Otu1、OTUD5 等十几种 DUB 修饰和调控^[9,14,29-30],而 USP13 这一种 DUB 又可以调控 PTEN、STAT1、Ubl4A、MITF 等多种蛋白的功能^[12,22,31-32]。各种分子之间的泛素化和去泛素化调控形成了一个非常复杂的网络,以适应生命活动的需要。

参考文献:

- [1] 李杨,宋平. 泛素化/去泛素化系统的生物化学和生物学功能[J]. 生命的化学,2006,26(6):515-517.
- [2] Suresh B, Lee J, Kim KS, et al. The Importance of Ubiquitination and Deubiquitination in Cellular Reprogramming[J]. Stem Cells Int, 2016, 2016:6705927.
- [3] Eletr ZM, Wilkinson KD. Regulation of proteolysis by human deubiquitinating enzymes [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843 (1): 114-128.
- [4] Coyne ES, Wing SS. The business of deubiquitination - location, location, location [J]. F1000Res, 2016, 5.
- [5] Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes[J]. Annu Rev Biochem, 2009, 78:363-397.
- [6] Neutzner M, Neutzner A. Enzymes of ubiquitination and deubiquitination [J]. Essays Biochem, 2012, 52:37-50.
- [7] McClurg UL, Robson CN. Deubiquitinating enzymes as oncotargets [J]. Oncotarget, 2015, 6(12):9657-9668.
- [8] Wilkinson KD. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes [J]. FASEB J, 1997, 11(14):1245-1256.
- [9] Hock AK, Vigneron AM, Carter S, et al. Regulation of p53 stability and function by the deubiquitinating enzyme USP42 [J]. EMBO J, 2011, 30(24):4921-4930.
- [10] Bhattacharya S, Ghosh MK. Cell death and deubiquitinases: perspectives in cancer [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014:435197.
- [11] Kim J, D'Annibale S, Magliozzi R, et al. USP17- and SCF β TrCP-regulated degradation of DEC1 controls the DNA damageresponse [J]. Mol Cell Biol, 2014, 34(22):4177-4185.
- [12] Yeh HM, Yu CY, Yang HC, et al. Ubiquitin-specific protease 13 regulates IFN signaling by stabilizing STAT1 [J]. J Immunol, 2013, 191(6):3328-3336.
- [13] Piper RC, Dikic I, Lukacs GL. Ubiquitin-dependent sorting in endocytosis [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014, 6(1).
- [14] Yuan J, Luo K, Zhang L, et al. USP10 regulates p53 localization and stability by deubiquitinating p53 [J]. Cell, 2010, 140(3):384-396.
- [15] Zou Q, Jin J, Hu H, et al. USP15 stabilizes MDM2 to mediate cancer-cell survival and inhibit antitumor T cell responses [J]. Nat Immunol, 2014, 15(6):562-570.
- [16] Sun XX, Challagundla KB, Dai MS. Positive regulation of p53 stability and activity by the deubiquitinating enzyme Otubain1 [J]. EMBO J, 2012, 31(3):576-592.
- [17] Carneiro AP, Reis CF, Morari EC, et al. A putative OTU domain-containing protein 1 deubiquitinating enzyme is differentially expressed in thyroid cancer and identifies less-aggressive tumours [J]. Br J Cancer, 2014, 111(3):551-558.
- [18] Luo J, Lu Z, Lu X, et al. OTUD5 regulates p53 stability by deubiquitinating p53 [J]. PLoS

- One, 2013, 8(10):e77682.
- [19] Zhang XN, Berger FG, Yang JH, et al. USP4 inhibits p53 through deubiquitinating and stabilizing ARF-BP1 [J]. *EMBO J*, 2011, 30(11): 2177-2189.
- [20] Qin J, Zhou Z, Chen W, et al. BAP1 promotes breast cancer cell proliferation and metastasis by deubiquitinating KLF5 [J]. *Nat Commun*, 2015, 6:8471.
- [21] Pereg Y, Liu BY, O'Rourke KM, et al. Ubiquitin hydrolase Dub3 promotes oncogenic transformation by stabilizing Cdc25A [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(4):400-406.
- [22] Zhang J, Zhang P, Wei Y, et al. Deubiquitylation and stabilization of PTEN by USP13 [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(12):1486-1494.
- [23] Yuan L, Lv Y, Li H, et al. Deubiquitylase OTUD3 regulates PTEN stability and suppresses tumorigenesis [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(9):1169-1181.
- [24] 敖宁, 刘玉琴. USP22 在肿瘤发生发展中的作用研究进展 [J]. *基础医学与临床*, 2012, 32(10):1235-1238.
- [25] Wing SS. Deubiquitinases in skeletal muscle atrophy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(10):2130-2135.
- [26] Sandri M. Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(10):2121-2129.
- [27] Magraoui FE, Reidick C, Meyer HE, et al. Autophagy-Related Deubiquitinating Enzymes Involved in Health and Disease [J]. *Cells*, 2015, 4(4):596-621.
- [28] 朱惠惠, 赵西宝, 胡未伟, 等. 泛素特异性蛋白酶在抗病毒免疫中的作用研究机制 [J]. *浙江大学学报*, 2015, 44(5):578-583.
- [29] Sun XX, Dai MS. Deubiquitinating enzyme regulation of the p53 pathway: A lesson from Otub1 [J]. *World J Biol Chem*, 2014, 5(2):75-84.
- [30] Ke JY, Dai CJ, Wu WL, et al. USP11 regulates p53 stability by deubiquitinating p53 [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2014, 15(12):1032-1038.
- [31] Liu Y, Soetandyo N, Lee JG, et al. USP13 antagonizes gp78 to maintain functionality of a chaperone in ER-associated degradation [J]. *Elife*, 2014, 3:e01369.
- [32] Zhao X, Fiske B, Kawakami A, et al. Regulation of MITF stability by the USP13 deubiquitinase [J]. *Nat Commun*, 2011, 2:414.