

K6 非典型泛素化修饰研究进展

王永红^{1,2}, 黄帅², 徐平^{1,2,3}, 李衍常²

1 贵州大学 医学院, 贵州 贵阳 550025

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) 北京蛋白质组研究中心
蛋白质组学国家重点实验室, 北京 102206

3 中国医学科学院蛋白组学与新药研发创新单元, 北京 102206

王永红, 黄帅, 徐平, 李衍常. K6 非典型泛素化修饰研究进展. 2022, 38(9): 3215-3227.

WANG YH, HUANG S, XU P, LI YC. Progress in atypical ubiquitination via K6-linkages. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3215-3227.

摘要: 泛素化是一种存在于真核生物内的蛋白质翻译后修饰, 介导了蛋白质的特异性降解与信号转导, 参与了诸多生命过程的调控进而影响着机体方方面面的功能。泛素化网络的紊乱和失衡是导致人类严重疾病的重要原因。泛素分子可以形成 8 种不同拓扑结构的同质泛素链, 其丰度和功能差别巨大。目前, 丰度较高的 K48 及 K63 经典泛素链的修饰底物较多、功能研究相对充分, 而其他非典型泛素链的含量低、研究相对较少, 但是诸多证据表明非典型泛素链在细胞内发挥着重要的调节功能。K6 泛素链是一种重要的非典型泛素链, 与 K48 链相似, 具有紧密的空间结构。目前研究发现 K6 泛素链在 DNA 损伤修复、线粒体质量控制等过程中发挥重要调节功能, 在肿瘤发生、发展以及帕金森疾病的致病过程中有着重要的作用。目前, 由于缺乏特异性的 K6 泛素链抗体和有效的富集手段, 导致 K6 泛素链修饰的底物、调控机制研究相对较少, 诸多调控过程和功能有待进一步深入研究。本文系统综述了 K6 非典型泛素链的结构特征、调控机制以及相关的生物学功能与疾病, 为 K6 泛素链的功能研究提供参考。

关键词: 泛素; 非典型泛素链; K6 泛素链; 蛋白质组学; BRCA1/BARD1

Received: January 19, 2022; **Accepted:** March 28, 2022; **Published online:** March 31, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32071431, 31700723); National Key Research and Development Program of China (2017YFC0906600, 2017YFA0505000)

Corresponding authors: XU Ping. Tel: +86-10-83147777-1314; E-mail: xuping@mail.ncpsb.org
LI Yanchang. E-mail: liyanchang1017@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (32071431, 31700723); 国家重点研发计划 (2017YFC0906600, 2017YFA0505000)

Progress in atypical ubiquitination via K6-linkages

WANG Yonghong^{1,2}, HUANG Shuai², XU Ping^{1,2,3}, LI Yanchang²

1 Medical College, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

2 State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences (Beijing), Beijing Institute of Lifeomics, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 102206, China

3 Research Unit of Proteomics & Research and Development of New Drug, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 102206, China

Abstract: Ubiquitination is a post-translational modification of proteins in eukaryotes, which mediates the specific degradation and signal transduction of proteins to regulate a variety of life processes and thus affects functions of the body. The disorder and imbalance of ubiquitination network is a major cause of serious human diseases. Ubiquitin molecules can form eight homogeneous ubiquitin chains with different topological structures, which vary greatly in abundance and function. At present, the classical ubiquitin chains K48 and K63 with high abundance and rich substrates have been intensively studied, while other atypical ubiquitin chains with low content remain to be studied. However, it has been proved that atypical ubiquitin chains play a key role in intracellular regulation. K6 is an important atypical ubiquitin chain, which is similar to K48 chain and has a tight spatial structure. It plays a role in DNA damage repair, mitochondrial quality control, the occurrence and development of tumor, and the pathogenesis of Parkinson's disease. Due to the lack of specific antibodies and effective enrichment methods for K6, little is known about its substrate and regulatory mechanism. This paper systematically reviews the structural characteristics, regulatory mechanism, biological functions, and relevant diseases of atypical K6 linkages, aiming to provide reference for the functional study of K6.

Keywords: ubiquitin; atypical ubiquitin chain; K6 ubiquitin chain; proteomics; BRCA1/BARD1

泛素 (ubiquitin)^[1]是一种由 76 个氨基酸构成、在真核生物中广泛存在的小分子蛋白。泛素分子序列高度保守, 酵母和人的泛素分子只存在 3 个氨基酸差别。泛素空间结构是由 1 个 α 螺旋和 5 个 β 折叠构成的 SSHSS 结构^[2]。其中, K27、K29 和 K33 处于 α 螺旋中, K6、K48 处于 β 折叠中, 而 K11、K63 处于中间区域。泛素在泛素激活酶 E1、泛素结合酶 E2 以及泛素连接酶 E3 的级联酶促作用下, 将泛素分子共价修饰到底物蛋白的赖氨酸残基上发生单泛素化修饰 (mono-ubiquitination); 修饰底物的泛素分子可以进一步被泛素分子修饰形成

多泛素化修饰 (poly-ubiquitination), 使底物蛋白“标签化”。蛋白质发生泛素化修饰后可能影响修饰底物的稳定性、构象、活性、相互作用蛋白或者细胞定位, 从而发挥新的调控功能^[3]。此外, 泛素化修饰为动态可逆的翻译后修饰, 可以通过去泛素化酶的作用使得泛素化修饰维持动态平衡^[4]。

泛素链拓扑结构的复杂性是其功能多样性的结构基础。泛素分子的 7 个赖氨酸位点和 N 端的甲硫氨酸可以继续被泛素修饰进而形成 8 种不同拓扑结构的泛素链, 包含 K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63 及 M1 线性链^[5]。

泛素分子的疏水表面 (比如 Ile44 和 Ile36 两个疏水表面) 是泛素化信号被识别的结构基础。不同泛素链具有不同的空间结构进而暴露不同的疏水表面, 可以被特异性的泛素结合结构域 (ubiquitin-binding domain, UBD) 所识别。含有特定 UBD 的蛋白会识别并传递泛素链所代表的功能信号^[6]。K48、K6 与 K11 链采用结构紧凑的空间构象^[7-8], 这种构象会将以 Ile44 为中心, Leu8、Val70 和 His68 组合成的疏水表面暴露在外, 有利于相应的泛素结合结构域 (UBD) 的识别以快速启动下游效应信号, 而 K29、K33 则采用相对开放且疏松的结构^[9]。

按照丰度和研究程度, 多聚泛素链分为“经典 (classical)”泛素链和“非典型 (atypical)”泛素链。经典泛素链主要是丰度较高的 K48 泛素链和 K63 泛素链, 也是目前已知功能最多、研究最深入的泛素链。其中, K48 链主要起到介导降解和调控蛋白稳定性的作用^[10-11]; K63 链主要发挥非降解功能, 包括信号转导、DNA 损伤修复、线粒体遗传和调控蛋白活性等过程^[12]。截至目前, “非典型”泛素链 (K6、K11、K27、K29、K33 和 M1 链) 的已知修饰底物和功能相对较少^[13]。研究显示, K11 链参与内质网相关降解 (endoplasmic reticulum-associated protein degradation, ERAD) 和细胞周期调控因子的周期性降解; 另外 K11 泛素链还具有非降解功能, 比如参与甲硫氨酸转录因子 Met4 的转录激活调控^[14-15]; K29 泛素链能介导底物分别参与蛋白酶体和溶酶体降解途径; K29 和 K33 位的混合泛素链参与 AMPK 活化的相关激酶系统的调节^[16]; 其他形式的泛素链与细胞周期、溶酶体降解、激酶识别等一系列过程相关。越来越多的研究表明非典型泛素链对机体具有重要的调控作用。

K6 泛素链是迄今为止研究最少的非典型

泛素链之一。由于 K6 泛素链已知的修饰底物相对较少, 且调控 K6 链合成及连接的特异性酶尚不清楚, 因此很大程度地限制了对 K6 泛素链的调控机制、底物筛选以及功能的研究。前期研究发现, K6 泛素链可以通过调节机体因子进而影响某些疾病的发生与发展, 比如肿瘤抑制因子 BRCA1 可以自体泛素化形成 K6 泛素链, 从而调控众多生命过程; 另外, K6 泛素链可以参与线粒体质量控制进而影响帕金森疾病的发生与发展^[17]。K6 泛素链功能的逐渐发掘以及与人类疾病关系密切, 表明其功能与机制研究具有重要的学术价值和临床意义。本文就 K6 泛素链的结构、生成、识别、移除以及生物学功能等研究进展进行综述。

1 K6 泛素链的结构解析

泛素链结构的解析是功能研究的重要前提。由于特异性生成非典型泛素链的 E2 和 E3 不明确, 因此无法通过体外酶促反应合成相应的泛素链。目前 K6 泛素链的结构信息主要是基于计算机建模或化学合成法合成后, 采用核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR)、质谱或是 X 晶体衍射来解析^[18-19]。与 K48、K11 泛素链一样, 在溶液中 K6 泛素链同样采用紧凑的空间构象, 其二聚体暴露的疏水表面由 Ile44 和 Ile36 表面构成^[20-22]。

由于 K48 泛素链的结构解析比较明确^[23], 在探究泛素链的结构时, 研究者通常会选择以 K48 链作为标准进行结构比对。Fushman 等^[13]使用分子建模来预测是否有其他泛素链具有类似于 K48 链的闭合构象。结果表明, 8 种泛素链 (二聚链) 可以分为两类: K6、K11、K27 或 K48 链具有闭合构象 (图 1); K29、K33、K63 或 M1 线性链由于空间位阻无法形成紧密接触, 因此采用了相对开放松散的空间构象。

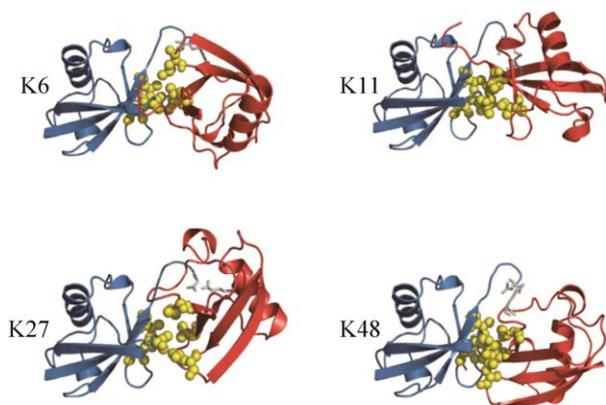


图1 紧密联系的二聚链的结构示意图^[13]

Figure 1 Schematic diagrams of the structures of closely linked dimer chains^[13].

除了建模预测空间结构,研究者还通过实验手段检测 K6 泛素链的构象。Virdee 等^[18]开发了一种合成均相连接泛素链的新方法——基因编码正交保护和活化连接 (genetically encoded orthogonal protection and activated ligation, GOPAL), 它结合了遗传密码扩张和化学选择性蛋白质化学 (genetic code expansion and chemoselective protein chemistry) 标记技术, 允许在没有细胞合成机制的情况下合成特定的泛素链。他们用这种方法合成了 K6 连接的二聚体, 并使用了胰蛋白酶消化、质谱检测的方式证实了纯化的 K6 连接的二聚体是通过遗传导向位点的异肽键连接。随后, 他们通过 X 射线晶体学确定 K6 链二聚体的结构, 揭示了 K6 链二聚体的晶体结构为不对称紧密构象。然而, 溶液中的泛素链具有动态性质, 与晶体中的结构可能有所差别, 他们进一步在核磁共振及单分子水平上研究 K6 链的结构。结果表明 K6 链与 K48 链^[23]一样在溶液中可能采用动态变化的构象。随后, Shahul Hameed 等^[19]使用核磁共振证实了二聚体分子的确以不同的构象存在于溶液中。另外, 结构信息显示 K6 泛素链存在不对称界面, 是以 Ile44 和 Ile36 为中心

的泛素疏水表面相互作用形成的紧凑结构, 该结构还具有泛素本身的特征, 且疏水相互作用在 K6 的功能区中占主导地位^[24]。这种非共价二聚体排列使每个晶体学独立单体的 K6 与另一单体的 C 末端紧密接触^[25]。在溶液中含有动态结构的泛素链会因为结构发生改变导致疏水结构区域位点或是折叠方式等发生一定的变化, 导致与其结合的物质等随之改变从而影响功能。因此, 有可能通过这些物质在溶液中动态结构的信息发现一些新的作用机制。Shekhawat 等^[26]使用细菌蛋白 NleL 的 E3 连接酶活性, 通过 19F 核磁共振发现了形成 K6 连接的 diUb-CF3 (-83.10 pm)。

2 K6 泛素链检测技术的研究

泛素化作为一种重要的蛋白质翻译后修饰, 参与调控诸多生物学过程。精准检测底物蛋白上的泛素链信号是功能研究的前提和基础。目前, 泛素化信号的检测与鉴定主要依赖抗体法和质谱法。

抗体法检测底物的泛素链类型通常分为两种策略: (1) 依赖于泛素链特异性的抗体直接检测底物上存在的泛素链类型。目前商业化泛素链的抗体主要为 K48/K63/K11 和 M1 链抗体, 缺乏其他非典型泛素链的抗体, 且抗体的特异性和效价不高, 使用范围不广; (2) 结合分子遗传学手段进行检测, 通过细胞内过表达单 K 保留或者单 K 突变的人工泛素, 通过检测人工泛素分子上的标签, 来正向、反向证明底物蛋白的泛素链类型。该策略依赖于标签抗体, 检测特异性强, 但是操作复杂、操作流程长。

另外, 研究显示不同的泛素抗体对不同的泛素链的亲合力和识别效率不尽相同^[27]。例如, 来自 Dako 的抗泛素抗体不识别 M1 线性链以及 K48 和 K63 链, 相比之下, FK1 抗体

优先结合 K48 连接的寡聚体, 而 FK2 抗体优先结合 M1 线性链而非 K48 或 K63 泛素链。因此, 选择使用哪种抗泛素抗体对于检测结果至关重要。目前, 由于缺乏针对 K6 泛素链的检测与富集的有效抗体, 验证底物是否发生 K6 泛素链修饰, 主要是通过细胞内表达 K6 单保留 (其他 K 突变为 R) 和 K6 单突变 (其他 K 保留) 的人工泛素分子, 通过检测人工泛素 N 端的标签 (如 Myc、Flag 或者 HA 标签), 确定底物是否发生了 K6 泛素链修饰。这种策略的验证过程复杂且不稳定, 假阳性和假阴性偏高都限制了该方法的应用范围。

质谱法是一种可以大规模检测蛋白质信号以及位点等的方法, 在靶向鉴定与定量泛素链类型、大规模表征泛素化修饰位点等方面发挥着重要的作用。泛素化蛋白经过胰蛋白酶消化处理后, 会产生 K- ϵ -GG 特征肽段, 提供泛素化修饰位点的信息; 泛素链同样会产生特征肽段代表不同的泛素链信息, 利用该方法可以实现对 K6 泛素链的鉴定与定量。由于经过胰蛋白酶酶切, 将底物与泛素链切开, 失去了空间对应关系。只能判断底物的修饰位点, 存在哪些泛素链类型, 但是无法确定两者的对应关系。另外, 有的类泛素化修饰, 比如 ISG15 和 Nedd8 修饰经胰蛋白酶处理后同样会产生 K- ϵ -GG 肽段, 通过质谱法无法区分这种假阳性干扰。

Middle-down 质谱法, 包括在自然条件下限制性酶切消化泛素链, 特别是在 Arg74 之后进行切割, 这个方法到目前为止已被证明适用于支链检测, 且已经被用来估计细胞中支链的丰度, 并检测特定的链构型, 包括那些由分支的 K6/K48、K11/K48 和 K29/K48 连接组成的链^[28]。在最近的一项研究中, 一种基于工程病毒蛋白酶 (LbPro) 活性的中下游法被用来检测体外和细胞内的支链, 该酶具有高度特异性

切割泛素 Arg74 的能力。这种方法被称为 Ub-Clip 的方法, 它能够量化细胞中的支链, 且使用此方法检测到多达 20% 的聚合泛素是以分支链形式存在^[29]。将这些方法应用于 K6 非典型泛素链的鉴定与定量, 可能为解析 K6 泛素链的功能研究提供技术支撑。

除了抗体法与质谱法以外, 泛素结合结构域 (UBD) 也可用于识别和结合泛素修饰。目前已确定了 20 多种不同的 UBD 家族^[30], 但是, 不同的 UBD 对不同类型的泛素链有不同的偏好^[31]。例如: Hhr23A 和 MUD1 的泛素相关结合域偏好 K48 链^[32]; 而 NPI4 锌指结构域偏好 K63 链^[33]。由于 UBD 偏好链的特性, 使得人工构建的 UBD 用于泛素链的检测富集出现了偏差。本实验团队发明了一种可以结合多聚泛素链进行检测的新技术-人工串联杂交 UBD (tandem hybridization of UBD, ThUBD)^[34]。相较于天然 UBD, ThUBD 与泛素化蛋白结合的亲和力强。此外, 它对所有 7 个赖氨酸连接的链显示出几乎无偏差的高亲和力。然而目前仍然无法特异性地识别 K6 非典型的泛素链, 未来发展能够针对 K6 泛素链特异性的泛素结合材料对于 K6 泛素链的研究具有重要意义。

此外, Michel MA 等证明了 K6 Affimer 的技术可以在内源水平上检测细胞中 K6 链的丰度信号^[35]。他们建立了一个稳定的 T-REx 293 细胞系, 在细胞系中诱导表达全长血凝素 (hemagglutinin, HA) 标记的细菌效应器 NleL。与未诱导表达的细胞系相比, 他们发现诱导表达 NleL 时整体泛素化信号没有显著变化, 但利用 K6 Affimer 检测样本的信号会增强, 证明了 K6 Affimer 可以用于检测细胞中 K6 链修饰的底物。

在鉴定 K6 链的技术中, 除了 Affimer 技术以外, 本实验室发展了一种基于内源表达

人工泛素的策略,实现对 K6 泛素链修饰底物的正向筛选。其核心的原理是细胞内除了野生型的泛素分子外,还表达一种 N 端带有亲和纯化的标签(比如多聚组氨酸或者生物素标签)的人工泛素分子,该分子的其他赖氨酸都突变为精氨酸,只保留 K6 位点,该分子只能生成 K6 泛素链而不能生成其他泛素链。通过亲和纯化并结合定量蛋白质组学策略实现正向筛选带有 K6 链的底物蛋白。我们证明了表达人工泛素的菌株生长与代谢等特征与野生型细胞无显著差异,为筛选正常生理条件下的修饰底物提供了前提;另外证明了人工泛素可以有效地掺入泛素链并生成 K6 泛素链。诸多数据表明该筛选方法高效特异,为修饰底物的筛选和功能研究提供了候选蛋白(数据未发表),为进一步开展 K6 非典型泛素链的功能研究提供了重要参考。

3 K6 泛素链的生成与识别

早期, Lam 等^[36]在研究牛 26S 蛋白酶体 PA700 调控复合物中泛素异肽酶的特异性试验中发现, PA700 除了可拆卸 K48 链以外还可拆卸 K6 和 K11 多聚泛素链。Baboshina 等^[37]在酵母蛋白 Rad6 (Ubc2) 的催化反应中观察到了 K6 链的产生且该过程不依赖 E3。随着研究的深入, K6 泛素链的生物学功能被逐步揭开。

最初,研究者发现肿瘤相关因子 BRCA1/BARD1 异二聚体与 K6 泛素链存在关联。Wu-Baer 等^[38]通过突变泛素的第 6 位赖氨酸为精氨酸 (K6R),发现催化生成泛素链的含量降低,证明了 BRCA1/BARD1 催化形成 K6 连接的泛素聚合物。Morris 和 Solomon^[39]证明了 K6 泛素链的形成是在 BRCA1/BARD1 异二聚体催化作用下形成的,且参与了 DNA 复制和修复过程(图 2)。而后, Hiroyuki Nishikawa 等^[40]

用质谱分析再次证实了 BRCA1-BARD1 催化 K6 连接的多泛素链的形成,且证明了 K6 泛素链具有稳定 BRCA1/BARD1 异二聚体,抑制其蛋白质降解的作用(图 2)。

另外,越来越多研究发现能够生成 K6 泛素链的关键酶。比如, Ben-Saadon 等^[41]研究发现 Ring1B 会生成 K6、K27 和 K48 的混合多聚泛素链; Lin 等^[42]发现一种来自肠出血性大肠杆菌 (EHEC) O157:H7 的细菌效应子 E3 连接酶 NleL (非 Lee 编码的效应子连接酶) 可以催化 K6 和 K48 链的形成(图 2); Hospenthal 等^[43]使用 NleL 体外生成大量 K6 连接的 polyUb,从而能够对这种非典型的泛素链类型进行详细的生化和结构分析,且证明它可以同时利用 K6 和 K48 进行泛素链的延伸; Nguyen 等^[44]研究发现泛素连接酶 UbcM2 会促进少量 K6 链的生成,由于 UbcM2 高度保守且参与了细胞增殖、发育和细胞抗氧化等生物学过程,因此暗示 K6 泛素链可能参与了上述过程的调控(图 2)。

4 K6 泛素链的移除

泛素化修饰是一种可逆的翻译后修饰,但参与 K6 泛素链移除的关键酶和机制的研究尚浅。有研究从 K6 泛素链形成因子以及参与的生物学过程寻找线索,来发现哪些蛋白可能参与 K6 泛素链的移除。Wu-Baer 等^[45]在筛选特异性结合自体泛素化 BRCA1 的蛋白质时,发现 UBXXN1 蛋白可以结合自泛素化的 BRCA1/BARD1 异二聚体,UBXXN1 的 N 端的 UBA 结构域结合 BRCA1 上的 K6 链,而其 C 端序列以泛素非依赖的方式与 BRCA1/BARD1 相互作用,与 UBXXN1 结合显著抑制 BRCA1/BARD1 的 E3 连接酶活性,降低了 K6 泛素链的形成效率(图 2)。

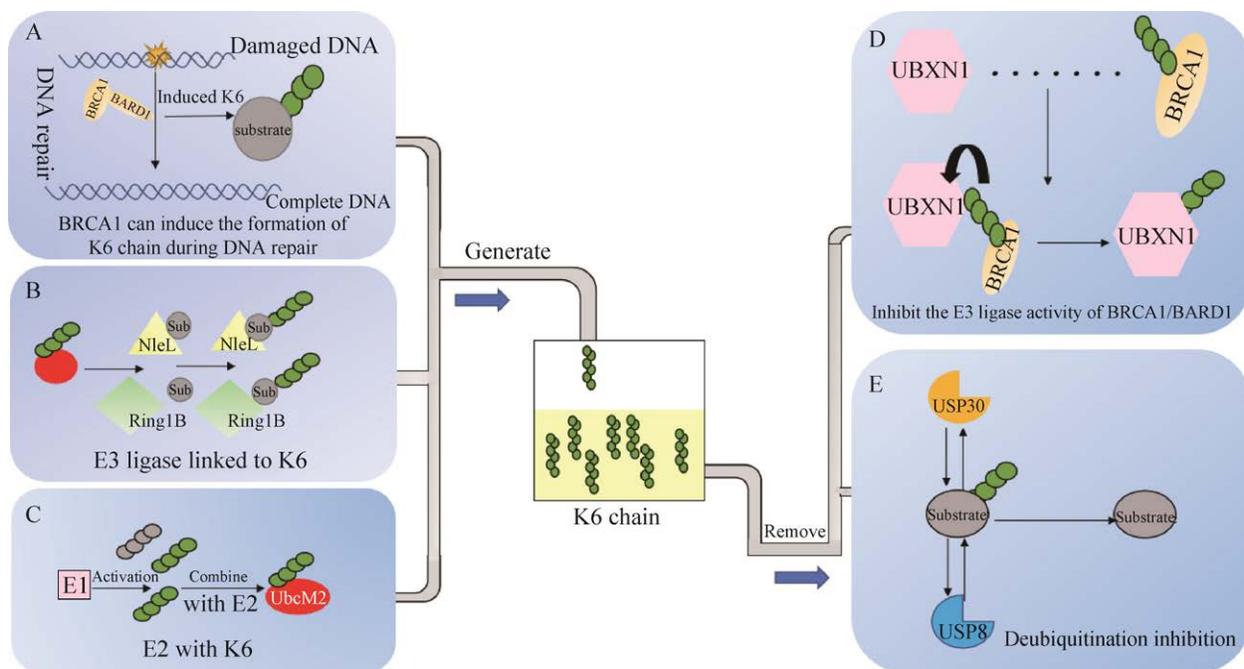


图2 K6 泛素链的生成与移除 A: DNA 损伤修复; B: 促进 K6 形成的 E3; C: 与 K6 结合的 E2; D: UBAXN1 的 N 端的 UBA 结构域结合 BRCA1 上的 K6 链; E: 可移除 K6 链的两种去泛素化酶

Figure 2 Generation and removal of K6 ubiquitin chain. (A) DNA damage repair. (B) E3 that promotes the formation of K6. (C) E2 that binds to K6. (D) The N-terminal UBA domain of UBAXN1 binds to the K6 chain on BRCA1. (E) Two types of deubiquitination enzyme that can remove the K6 chain.

此外, 有研究^[46]显示线粒体损伤会刺激 Parkin 在线粒体上组装 K6、K11 和 K63 链, 而 USP30 是一种位于线粒体的泛素特异性去泛素化酶, 可以高效特异地移除线粒体上的 K6 链^[47]。Gersch 等^[48]同样证实了 USP30 可以调节 K6 泛素链 (图 2)。而 Durcan 等^[49]则发现另一种去泛素化酶 USP8 可以优先从 Parkin 上去除非规范的 K6 泛素链; 在他们之后的研究^[50]中发现 PARK2 在其自身上主要形成 K6 泛素链, 而 USP8 可以优先移除 K6 泛素链, 从而调节该途径中 PARK2 的活性和功能。此外, Ordureau 等^[51]揭示了一种驱动 Parkin 募集和线粒体泛素化以响应线粒体损伤程序的反馈机制。由此, 便可了解到 K6 泛素链在线粒体质量控制中的重要性。除此之外, Ring1B 和 Bmi1

会生成 K6、K27 和 K48 的混合泛素链^[41]; 而 ARF 似乎可以选择性地阻止 Ring1B 自身泛素化^[52]。HUWE1 在全局范围内丢失会降低 K6 链的水平^[36]。Mevissen 等系统地表达了 OTUD 去泛素化酶, 通过体外反应显示 OTUD3 可以优先去除 K6 和 K11 连接的双泛素链^[53-54]。

5 K6 泛素链的生物学功能与相关疾病

5.1 癌症

据世界卫生组织国际癌症研究机构 (International Agency for Research On Cancer, IARC) 发布全球最新癌症数据, 2021 年全球新发癌症病例 1 929 万例, 死亡病例 996 万例, 其中乳腺癌新增人数达 226 万, 肺癌为

220 万, 乳腺癌正式取代肺癌成为全球第一大癌症。癌症是由各种辐射或者化学污染、环境污染等引起体内基因发生突变的疾病^[55]。BRCA1 是一种直接与遗传性乳腺癌有关的抑癌基因。在 BRCA1 发生突变的情况下, 患上乳腺癌的几率高达 85%, 许多家族性遗传乳腺癌的发生均有 BRCA1 的突变发生^[56]。内源性 BRCA1 容易形成 BRCA1/BARD1 异二聚体^[41,57], 且 BRCA1/BARD1 异二聚体主要催化 K6 泛素链的形成^[38]。同时, BRCA1 又可作为多泛素化底物在体内经历自泛素化, 自泛素化会导致大部分 K6 链与 BRCA1 共轭, 使得 BRCA1 和 BARD1 多肽在体内共表达时彼此稳定。此外, USP30 可特异降解 K6 泛素链且 USP30 是组合抗癌治疗的潜在靶标^[58]。Wang 等^[59]发现 USP22 可以去除 PD-L1 和 CSN5 的 K6、K11、K27、K29、K33 和 K63 连接的泛素链, 从而抑制癌症的发生。

5.2 帕金森疾病

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 又名震颤麻痹, 是一种常见于老年人的神经系统变性疾病。线粒体质量控制与编码帕金森疾病的基因有关^[60], 因此, 靶向精准地调控线粒体质量给帕金森病的治疗带来了希望。近年来, K6 泛素链在帕金森疾病发生、发展中的作用也逐渐被重视起来。Ordureau 等^[61]研究发现 K6 和 K63 链在线粒体质量控制中发挥重要作用。如前所述, 去泛素化酶 USP30 特异性移除线粒体上的 K6 链, 拮抗由泛素连接酶 Parkin 和蛋白激酶 PINK1 驱动的线粒体上的 K6 链。USP30 的过度表达会去除附着在与帕金森相关的受损线粒体上的泛素, 降低了线粒体质量控制的能力^[62]。Gersch 等^[48]的研究中证明靶向降低 USP30 活性则会增强神经元中线粒体的降解。他们的实验表明 Parkin 和 USP30 都分别显

示了对 K6 泛素链的组装或拆卸偏好, 证明了 K6 的特异连接可修饰线粒体底物, 且 K6 泛素链参与线粒体稳态维持^[63] (图 3)。此外, Durcan 等^[50]揭示了一种新的控制机制, 即通过去泛素酶 USP8 选择性地去除非典型的 K6 连接的泛素链来控制介导帕金森病的线粒体, 确立了去泛素化在线粒体调控中的功能性作用^[50]。

5.3 DNA 损伤修复以及其他功能

已有的许多研究证明, K6 泛素链参与了几种因子对 DNA 的调控作用。如与 K6 有关的 BRCA 基因作为 HR 修复的关键抑癌基因起到抑癌作用, 其编码的蛋白可修复 S 期产生的重组 DNA 损伤^[29] (图 3)。Morris 等^[39]通过免疫组织化学方法证明在体内伽马辐射引起损伤后, BRCA1 与泛素结合结构物共定位于复制叉和 DNA 修复位点, 且内源性 BRCA1 形成泛素结合结构物需要 K6 链的参与。因此, BRCA1 定向的泛素连接发生在 S 期, 并响应复制压力和 DNA 损伤。此外, 人们认为 K6 泛素链会影响 DNA 损伤附近修复因子的浓度, 从而在信号放大中起作用或使 DNA 缩聚和/或影响核小体和染色质组装^[39]。Jung 等^[64]用顺铂处理的 HeLa 细胞进行的细胞分离实验显示, DNA 损伤后染色质相关的 pol II 蛋白水平增加, 且体外转录抑制可促进泛素残基 K6、K48 和 K63 的 pol II 泛素化; 而 UbIA-MS 方法确定 TAB2 和 TAB3 为新型 K6 双泛素相互作用物, 显示了一类单泛素和 K6 双泛素相互作用物, 其结合作用是由 DNA 损伤诱导的^[65]。近些年的研究也证实 DNA 损伤反应 (DNA damage response or DNA damage repair, DDR) 是由 K6 连接的泛素化控制的^[66-69]。

除此之外, K6 泛素链还可以特异有效地抑制蛋白质降解^[67] (图 3); MGRN1 能通过 K6 泛素链修饰 α -tubulin 来确保适当的聚合^[68]。

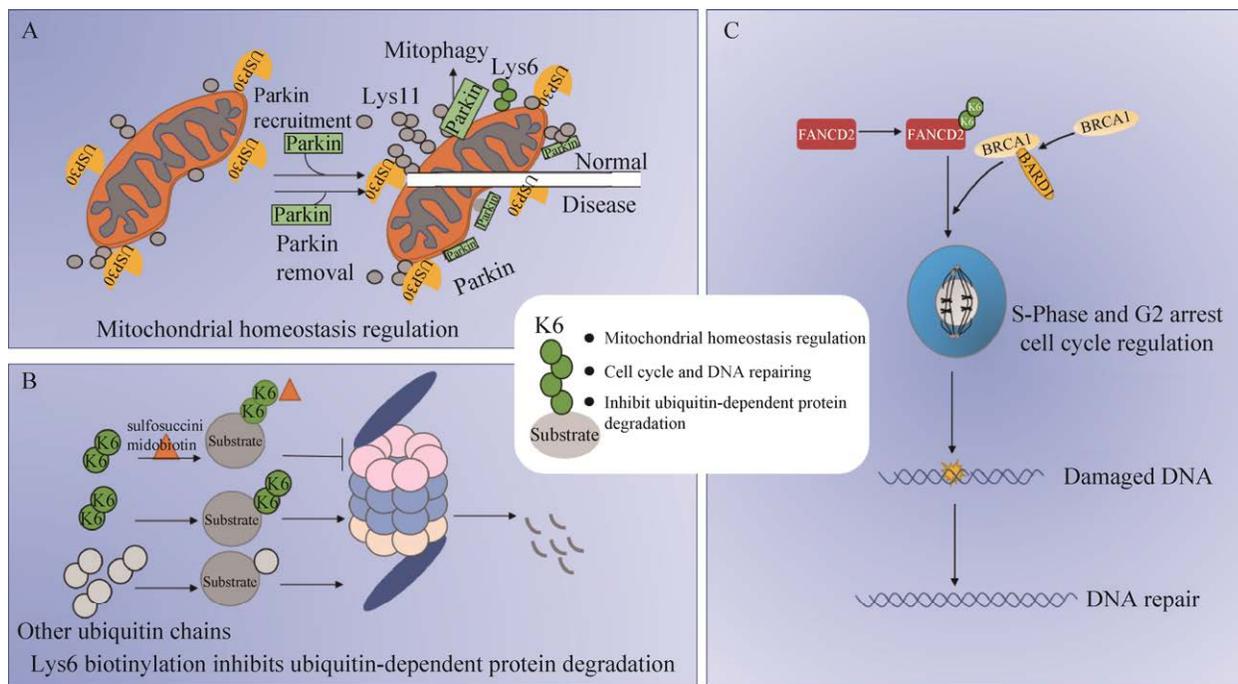


图3 K6泛素链的生物功能 A: 维持线粒体稳态; B: 抑制蛋白质降解; C: 细胞周期与DNA修复
Figure 3 Biological functions of K6 ubiquitin chain. (A) Maintain mitochondrial homeostasis. (B) Inhibit protein degradation. (C) Cell cycle and DNA repair.

泛素分子本身可以在 K6 和 K48 上发生乙酰化修饰进而抑制泛素链的形成和延长^[69-70]。这种乙酰化是通过占位泛素的赖氨酸残基,从而抑制泛素化来提高靶蛋白的稳定性。此外,本实验室还设计了反向研究 K6 链功能的策略,通过保留其他赖氨酸位点而突变 K6 位点 (K6R) 造成细胞内缺失 K6 泛素链。然后通过深度覆盖的 SILAC 定量蛋白质组学策略,比较了野生型和 K6R 突变菌株,差异蛋白功能分析显示 K6 链的缺失会引起氨基酸代谢、糖代谢以及 DNA 损伤修复等过程的紊乱 (数据未发表),为进一步探究 K6 泛素链的广泛功能提供了有价值的数据集。

6 展望

泛素以其独特而复杂的连接方式,构成

了 7 种多聚体泛素链以及 1 种线性泛素链,共同构成了生物功能繁多的泛素密码,参与着机体的疾病以及其他生物学功能。随着研究技术的提升,“非典型”泛素链的研究逐步成为泛素化研究领域的重要方向,同时也是研究热点和挑战。目前, K6 泛素链在肿瘤抑制因子 BRCA1、机体的 DNA 修复、线粒体调控及肿瘤抑制^[29]等方面的作用也日益凸显。此外,除了常规的这些功能外, K6 链也可能作为信号分子传递特定的生物学功能。目前,仍然缺乏特异性研究 K6 泛素链的方法,主要原因是缺乏针对 K6 泛素链特异性的抗体。K6 非典型泛素链在细胞内的含量相对较低,另外泛素和泛素链的序列和空间结构在不同真核生物中广泛存在且高度保守,使得目前产生特异性高且亲和力强的抗体存在挑战。因此,寻找能

够与 K6 泛素链特异性结合的材料显得尤为重要。我们认为通过系统评价不同 UBD 对 K6 泛素链的亲合特性进而构建高亲和力、高特异性的 K6 链结合材料是解决 K6 泛素链检测与富集的重要技术策略。此外,目前利用模式生物,通过遗传改造手段进行 K6 链的底物筛选与功能研究也是重要的研究策略和有效手段。

未来,随着泛素化底物富集技术及定量蛋白质组学发展的进步,探究更多非典型泛素链修饰的底物逐渐成为了可能。比如上文中提到的本实验室的研究工作,很好地揭示了 K6 泛素链功能的重要性。我们有理由相信,随着进一步开发 K6 非典型泛素链的检测与富集技术,会有越来越多的新修饰底物被发现,进而揭示其新的生物学功能。但对于 K6 链的研究,还有很多难点与挑战需要我们去解决,比如发现 K6 链在 E1、E2、E3 作用下进行组装的机制;特异性去除 K6 链的去泛素化酶的发现;特异性识别 K6 泛素链的 UBD 结构域及富集 K6 链的方法等等。在研究这些难题的基础上,我们可以探究其在不同生物学过程中的作用;探究其在不同疾病过程中的作用与调控机制,从而发展精准的临床检测与治疗策略。

REFERENCES

- [1] Akimov V, Barrio-Hernandez I, Hansen SVF, et al. UbiSite approach for comprehensive mapping of lysine and N-terminal ubiquitination sites. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25(7): 631-640.
- [2] Liu WG, Tang X, Qi XH, et al. The ubiquitin conjugating enzyme: an important ubiquitin transfer platform in ubiquitin-proteasome system. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8): 2894.
- [3] Dougherty SE, Maduka AO, Inada T, et al. Expanding role of ubiquitin in translational control. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 1151.
- [4] Hausman JM, Kenny S, Iyer S, et al. The two deubiquitinating enzymes from *Chlamydia trachomatis* have distinct ubiquitin recognition properties. *Biochemistry*, 2020, 59(16): 1604-1617.
- [5] Van Tilburg GB, Elhebieshy AF, Ovaas H. Synthetic and semi-synthetic strategies to study ubiquitin signaling. *Curr Opin Struct Biol*, 2016, 38: 92-101.
- [6] Buetow L, Huang DT. Structural insights into the catalysis and regulation of E3 ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(10): 626-642.
- [7] Meza Gutierrez F, Simsek D, Mizrak A, et al. Genetic analysis reveals functions of atypical polyubiquitin chains. *eLife*, 2018, 7: e42955.
- [8] Yau RG, Doerner K, Castellanos ER, et al. Assembly and function of heterotypic ubiquitin chains in cell-cycle and protein quality control. *Cell*, 2017, 171(4): 918-933.e20.
- [9] Kristariyanto YA, Abdul Rehman SA, Campbell DG, et al. K29-selective ubiquitin binding domain reveals structural basis of specificity and heterotypic nature of k29 polyubiquitin. *Mol Cell*, 2015, 58(1): 83-94.
- [10] 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.
- [11] Qian GH, Hu XH, Li G, et al. Smurf1 restricts the antiviral function mediated by USP25 through promoting its ubiquitination and degradation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498(3): 537-543.
- [12] Cundiff MD, Hurley CM, Wong JD, et al. Ubiquitin receptors are required for substrate-mediated activation of the proteasome's unfolding ability. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 14506.
- [13] Fushman D, Walker O. Exploring the linkage dependence of polyubiquitin conformations using molecular modeling. *J Mol Biol*, 2010, 395(4): 803-814.
- [14] Pacheco D, Warfield L, Brajcich M, et al. Transcription activation domains of the yeast factors Met4 and Ino2: tandem activation domains with properties similar to the yeast Gcn4 activator. *Mol Cell Biol*, 2018, 38(10): e00038-e00018.
- [15] Li YC, Dammer EB, Gao Y, et al. Proteomics links ubiquitin chain topology change to transcription factor activation. *Mol Cell*, 2019, 76(1): 126-137.e7.

- [16] Michel MA, Elliott PR, Swatek KN, et al. Assembly and specific recognition of k29- and k33-linked polyubiquitin. *Mol Cell*, 2015, 58(1): 95-109.
- [17] Durcan TM, Fon EA. The three 'P's of mitophagy: PARKIN, PINK1, and post-translational modifications. *Genes Dev*, 2015, 29(10): 989-999.
- [18] Virdee S, Ye Y, Nguyen DP, et al. Engineered diubiquitin synthesis reveals Lys29-isopeptide specificity of an OTU deubiquitinase. *Nat Chem Biol*, 2010, 6(10): 750-757.
- [19] Shahul Hameed D, Van Tilburg GBA, Merckx R, et al. Diubiquitin-based NMR analysis: interactions between Lys6-linked diUb and UBA domain of UBXN1. *Front Chem*, 2020, 7: 921.
- [20] Matsumoto ML, Wickliffe KE, Dong KC, et al. K11-linked polyubiquitination in cell cycle control revealed by a K11 linkage-specific antibody. *Mol Cell*, 2010, 39(3): 477-484.
- [21] Boughton AJ, Krueger S, Fushman D. Branching via K11 and K48 bestows ubiquitin chains with a unique interdomain interface and enhanced affinity for proteasomal subunit Rpn1. *Structure*, 2020, 28(1): 29-43.e6.
- [22] Varadan R, Walker O, Pickart C, et al. Structural properties of polyubiquitin chains in solution. *J Mol Biol*, 2002, 324(4): 637-647.
- [23] Eddins MJ, Varadan R, Fushman D, et al. Crystal structure and solution NMR studies of Lys48-linked tetraubiquitin at neutral pH. *J Mol Biol*, 2007, 367(1): 204-211.
- [24] Wang Y, Tang C, Wang EK, et al. Poly-ubiquitin chain linkage topology selects the functions from the underlying binding landscape. *PLoS Comput Biol*, 2014, 10(7): e1003691.
- [25] Qureshi IA, Ferron F, Seh CC, et al. Crystallographic structure of ubiquitin in complex with cadmium ions. *BMC Res Notes*, 2009, 2: 251.
- [26] Shekhawat SS, Pham GH, Prabakaran J, et al. Simultaneous detection of distinct ubiquitin chain topologies by 19F NMR. *ACS Chem Biol*, 2014, 9(10): 2229-2236.
- [27] Emmerich CH, Cohen P. Optimising methods for the preservation, capture and identification of ubiquitin chains and ubiquitylated proteins by immunoblotting. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 466(1): 1-14.
- [28] Crowe SO, Rana ASJB, Deol KK, et al. Ubiquitin chain enrichment middle-down mass spectrometry enables characterization of branched ubiquitin chains in cellulose. *Anal Chem*, 2017, 89(8): 4428-4434.
- [29] Swatek KN, Usher JL, Kueck AF, et al. Insights into ubiquitin chain architecture using Ub-clipping. *Nature*, 2019, 572(7770): 533-537.
- [30] Hooper C, Jackson SS, Coughlin EE, et al. Covalent modification of the NF- κ B essential modulator (*NEMO*) by a chemical compound can regulate its ubiquitin binding properties *in vitro*. *J Biol Chem*, 2014, 289(48): 33161-33174.
- [31] Takahashi TS, Wollscheid HP, Lowther J, et al. Effects of chain length and geometry on the activation of DNA damage bypass by polyubiquitylated PCNA. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(6): 3042-3052.
- [32] Balasubramaniam M, Ayyadevara S, Shmookler Reis RJ. Structural insights into pro-aggregation effects of *C. elegans* CRAM-1 and its human ortholog SERF2. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14891.
- [33] Fottner M, Weyh M, Gaussmann S, et al. A modular toolbox to generate complex polymeric ubiquitin architectures using orthogonal sortase enzymes. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6515.
- [34] Gao Y, Li YC, Zhang CP, et al. Enhanced purification of ubiquitinated proteins by engineered tandem hybrid ubiquitin-binding domains (ThUBDs). *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15(4): 1381-1396.
- [35] Michel MA, Swatek KN, Hospenthal MK, et al. Ubiquitin linkage-specific affimers reveal insights into K6-linked ubiquitin signaling. *Mol Cell*, 2017, 68(1): 233-246.e5.
- [36] Lam YA, DeMartino GN, Pickart CM, et al. Specificity of the ubiquitin isopeptidase in the PA700 regulatory complex of 26S proteasomes. *J Biol Chem*, 1997, 272(45): 28438-28446.
- [37] Baboshina OV, Haas AL. Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2EPF and RAD6 are recognized by 26S proteasome subunit 5. *J Biol Chem*, 1996, 271(5): 2823-2831.
- [38] Wu-Baer F, Lagrazon K, Yuan W, et al. The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin. *J Biol Chem*, 2003, 278(37): 34743-34746.

- [39] Morris JR, Solomon E. BRCA1: BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(8): 807-817.
- [40] Nishikawa H, Ooka S, Sato K, et al. Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, 2004, 279(6): 3916-3924.
- [41] Ben-Saadon R, Zaaroor D, Ziv T, et al. The polycomb protein Ring1B generates self atypical mixed ubiquitin chains required for its *in vitro* histone H2A ligase activity. *Mol Cell*, 2006, 24(5): 701-711.
- [42] Lin DYW, Diao JB, Zhou DG, et al. Biochemical and structural studies of a HECT-like ubiquitin ligase from *Escherichia coli* O157: H7. *J Biol Chem*, 2011, 286(1): 441-449.
- [43] Hospenthal MK, Freund SMV, Komander D. Assembly, analysis and architecture of atypical ubiquitin chains. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(5): 555-565.
- [44] Nguyen L, Plafker KS, Starnes A, et al. The ubiquitin-conjugating enzyme, UbcM2, is restricted to monoubiquitylation by a two-fold mechanism that involves backside residues of E2 and Lys48 of ubiquitin. *Biochemistry*, 2014, 53(24): 4004-4014.
- [45] Wu-Baer F, Ludwig T, Baer R. The UBXN₁ protein associates with autoubiquitinated forms of the BRCA1 tumor suppressor and inhibits its enzymatic function. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(11): 2787-2798.
- [46] Cunningham CN, Baughman JM, Phu L, et al. USP30 and parkin homeostatically regulate atypical ubiquitin chains on mitochondria. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(2): 160-169.
- [47] Hou JY, Eldeeb M, Wang XD. Beyond deubiquitylation: USP30-mediated regulation of mitochondrial homeostasis. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1038: 133-148.
- [48] Gersch M, Gladkova C, Schubert AF, et al. Mechanism and regulation of the Lys6-selective deubiquitinase USP30. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24(11): 920-930.
- [49] Durcan TM, Tang MY, Pérusse JR, et al. USP8 regulates mitophagy by removing K6-linked ubiquitin conjugates from parkin. *EMBO J*, 2014, 33(21): 2473-2491.
- [50] Durcan TM, Fon EA. USP8 and PARK2/parkin-mediated mitophagy. *Autophagy*, 2015, 11(2): 428-429.
- [51] Ordureau A, Sarraf SA, Duda DM, et al. Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis. *Mol Cell*, 2014, 56(3): 360-375.
- [52] De Bie P, Ciechanover A. RING1B ubiquitination and stability are regulated by ARF. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 426(1): 49-53.
- [53] Hospenthal MK, Mevissen TET, Komander D. Deubiquitinase-based analysis of ubiquitin chain architecture using ubiquitin chain restriction (UbiCRest). *Nat Protoc*, 2015, 10(2): 349-361.
- [54] Mevissen TET, Hospenthal MK, Geurink PP, et al. OTU deubiquitinases reveal mechanisms of linkage specificity and enable ubiquitin chain restriction analysis. *Cell*, 2013, 154(1): 169-184.
- [55] Mazzucco W, Vitale F, Mazzola S, et al. Does access to care play a role in liver cancer survival? The ten-year (2006-2015) experience from a population-based cancer registry in southern Italy. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 307.
- [56] McMahon KA, Stroud DA, Gambin Y, et al. Cavin3 released from caveolae interacts with BRCA1 to regulate the cellular stress response. *eLife*, 2021, 10: e61407.
- [57] Suszynska M, Kozlowski P. Summary of BARD1 mutations and precise estimation of breast and ovarian cancer risks associated with the mutations. *Genes*, 2020, 11(7): 798.
- [58] Yuan L, Lv YR, Li HC, et al. Deubiquitylase OTUD3 regulates PTEN stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(9): 1169-1181.
- [59] Wang Y, Sun QG, Mu N, et al. The deubiquitinase USP22 regulates PD-L1 degradation in human cancer cells. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1): 112.
- [60] Pienaar IS, Elson JL, Racca C, et al. Mitochondrial abnormality associates with type-specific neuronal loss and cell morphology changes in the pedunculopontine nucleus in Parkinson disease. *Am J Pathol*, 2013, 183(6): 1826-1840.
- [61] Ordureau A, Heo JM, Duda DM, et al. Defining roles of PARKIN and ubiquitin phosphorylation by PINK₁ in mitochondrial quality control using a ubiquitin

- replacement strategy. PNAS, 2015, 112(21): 6637-6642.
- [62] Bingol B, Tea JS, Phu L, et al. The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy. Nature, 2014, 510(7505): 370-375.
- [63] Jin SM, Lazarou M, Wang CX, et al. Mitochondrial membrane potential regulates PINK₁ import and proteolytic destabilization by PARL. J Cell Biol, 2010, 191(5): 933-942.
- [64] Jung Y, Lippard SJ. RNA polymerase II blockage by cisplatin-damaged DNA: stability and polyubiquitylation of stalled polymerase. J Biol Chem, 2006, 281(3): 1361-1370.
- [65] Zhang XF, Smits AH, Van Tilburg GBA, et al. An interaction landscape of ubiquitin signaling. Mol Cell, 2017, 65(5): 941-955.e8.
- [66] Elia AEH, Boardman AP, Wang DC, et al. Quantitative proteomic atlas of ubiquitination and acetylation in the DNA damage response. Mol Cell, 2015, 59(5): 867-881.
- [67] Shang F, Deng GJ, Liu Q, et al. Lys6-modified ubiquitin inhibits ubiquitin-dependent protein degradation. J Biol Chem, 2005, 280(21): 20365-20374.
- [68] Srivastava D, Chakrabarti O. Mahogunin-mediated α -tubulin ubiquitination via noncanonical K6 linkage regulates microtubule stability and mitotic spindle orientation. Cell Death Dis, 2014, 5(2): e1064.
- [69] Ohtake F, Saeki Y, Sakamoto K, et al. Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. EMBO Rep, 2015, 16(2): 192-201.
- [70] Chiki A, DeGuire SM, Ruggeri FS, et al. Mutant Exon1 huntingtin aggregation is regulated by T3 phosphorylation-induced structural changes and crosstalk between T3 phosphorylation and acetylation at K6. Angew Chem Int Ed Engl, 2017, 56(19): 5202-5207.

(本文责编 陈宏宇)