

的潜在新机制可能就蕴藏在其中。本研究结果应值得临床医生及实验室检测人员高度关注。

#### 参考文献:

- [1] Gorska K, Krenke R, Domagala-Kulawik J, et al. Comparison of cellular and biochemical markers of airway inflammation in patients with mild-to-moderate asthma and chronic obstructive pulmonary disease: an induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid study[J]. J Physiol Pharmacol, 2008, 59(Suppl 6): 271-283.
- [2] 阿不都苏甫尔·米吉提, 海热萨·阿布力米提, 田刚. 尿酸和一氧化氮联合检测在慢性阻塞性肺疾病中的意义[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(3): 106-108.
- [3] Nishio K, Suzuki K, Ito Y, et al. Possible interactions of the endothelial constitutive nitric oxide synthase genotype with alcohol drinking and walking time for high serum uric acid levels among Japanese[J]. Metabolism, 2009, 54(10): 1302-1308.
- [4] 周明华. 慢性阻塞性肺疾病治疗进展[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17(2): 124-125.
- [5] 蒋萍. COPD 急发期患者血清尿酸水平的相关性研究[J]. 临床肺科杂志, 2008, 13(12): 1565-1567.
- [6] Caiazza F, Harvey BJ, Thomas W. Cytosolic phospholipase A2 activation correlates with HER2 overexpression and mediates estrogen dependent breast cancer cell growth[J]. Mol Endocrinol, 2010, 24(5): 953-968.

收稿日期: 2015-01-19

修回日期: 2015-02-04

## 泛素结合结构域与泛素化信号的识别\*

王京伟 (武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

**摘要:** 泛素化(Ubiquitylation, UB)是目前最为复杂最为多元的翻译后修饰,几乎参与胞内所有的生物学过程。其通过改变底物的分子景观(landscape)、三维结构、位置、活性、影响底物蛋白与其他蛋白的相互作用等方法,从时间和空间上调节底物所参与的生物学过程。而泛素化底物功能的发挥依赖于特异性的泛素结合结构域(Ubiquitin binding domains, UBDs)。UBDs的表面功能基团特异性识别具有不同修饰类型的泛素化底物,并决定其功能的特异性。已知的20多种UBDs超家族对泛素化信号网络的有序调节是人们开启泛素化网络的一把钥匙,同时了解UBD-ubiquitin的特异性识别是认识泛素化蛋白质组学“ubiquitome”的基础。

**关键词:** 泛素; 泛素结合结构域; 识别; 调节机制

中图分类号: R446 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)02-099-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.02.031

## Recognition of Ubiquitination Signal with Ubiquitin-binding Domains

WANG Jing-wei (Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

**Abstract:** Ubiquitylation is a highly versatile post-translation modification that controls virtually all types of cellular events by changing the molecular landscape, the three-dimensional structure, the location or activity of the substrate, influencing the interactions of substrate with other proteins. Many cellular activities of ubiquitin and its functions are deciphered by specific ubiquitin binding domains (UBDs). UBD interacts with the different type of Ubiquitylation with a variety of lengths and linkage patterns based on the specific functional surfaces. So far over twenty distinct UBD families have been identified, and the known members of this group have expanded rapidly. The UBD families, the decoder of ubiquitylation network, are building a foundation for in-depth understanding the ubiquitination proteomics “ubiquitome”.

**Keywords:** ubiquitin; ubiquitin binding domain; recognition; regulatory mechanism

泛素化修饰已成为一个几乎涉及所有重要细胞生物过程的翻译后修饰类型,其可以改变底物蛋白的分子景观

(landscape)、三维结构、位置、活性、影响底物蛋白与其他蛋白的相互作用,从时间和空间上调节底物所参与的生物学

\* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目: 低密度脂蛋白主动氧化的识别机制及其氧化环境的建立, 编号: 81170273。

作者简介: 王京伟(1986-), 女, 博士, 医师, 主要从事分子生物和泛素化蛋白质组学研究, E-mail: sophia\_\_wang03@hotmail.com。

过程。泛素化修饰对底物蛋白的调节取决于泛素链修饰的长度及类型<sup>[1,2]</sup>。泛素化参与的生命活动依赖于对不同长度以及不同类型的多聚泛素链的特异性识别,即依赖于特异性泛素结合结构域分子(UBPs)家族介导,这些受体蛋白往往包含一个或多个 UBDs<sup>[3,4]</sup>,UBDs 通过特异性识别底物蛋白上所修饰的泛素分子或泛素链来决定底物蛋白功能的特异度<sup>[5]</sup>。

**1 UBDs 家族及其结构特征** UBDs 是一类可以通过非共价键结合泛素分子或泛素化底物的蛋白结构域,可以独立折叠形成稳定结构并且直接结合单泛素化或聚泛素化底物。这些结构域被认为以一种半自治的形式赋予 UBPs 与泛素化信号识别的能力。根据已知 UBDs 的结构可以将其分为以下 5 种类型。 $\alpha$ 螺旋结构( $\alpha$ -Helix);锌指结构(Zinc finger, ZnF);泛素结合酶类似结构域(Ubiquitin-conjugating, Ubc-like domain);普列克底物蛋白同源结构域(Plekstrin homology, PH domain);其他类型:SH3, PFU, Jab1/MPN, OTU 结构域。其中泛素相关结构域(ubiquitin-associated domains, UBAs)和泛素蛋白相互作用基序(ubiquitin-interacting motifs, UIMs)研究最为普遍。尽管 UBDs 在蛋白酶体定向运输、底物泛素化、蛋白与蛋白相互作用等生物过程的调节作用已得到人们的广泛认可,然而 UBDs 的调节机制至今未知,因此了解 UBD 与泛素化信号的识别特点对我们了解作用机制具有重要意义。

## 2 UBDs 结合泛素链的特点

**2.1 UBD 与泛素的结合能力** UBDs 通常存在于泛素催化相关的酶类以及泛素化底物的受体蛋白中,如催化泛素合成的酶、去泛素化酶以及泛素化受体等。UBDs 多位于 UBPs 的功能集团内使 UBPs 可以识别并解读泛素化底物,进而调节底物下游分子。同源序列比对可以预测某蛋白内是否有 UBDs 的存在,包含 UBDs 类似序列的蛋白有参与调节泛素化底物的潜能。对多样化的泛素化信号的识别和转导主要依赖于不同 UBDs 与泛素分子或者泛素链的短暂非共价结合,这种结合力较磷酸化修饰而言要弱的多,一般在  $10\sim 500\ \mu\text{M Kd}$ 。然而正是这种高特异性,低亲和力的结合方式构成了一个可以快速组装和解离的动态信号网络,该网络往往只有在形成结构域-肽段作用复合体后处于短暂的稳定状态,保证后续反应可以特异性的有序进行,完成功能后复合体可以随时解离,形成所谓的“动态不稳定性”(dynamic instability)。信号网络中任何一个结合单位的破坏都会导致网络瘫痪,因此网络的稳定性必须由这种较弱的结合方式来保证,同时也为网络的调节提供了靶标。体内点突变证实这种较弱的结合方式与生理功能有关,一旦结合能力丧失,则会导致生理功能紊乱。UBD-ubiquitin 之间这种较弱的结合方式可能有以下两个方面原因:一、这种高度可逆的蛋白质瞬时相互作用可以作为信号网络有序调节的一个“开关”,例如许多内吞蛋白含有 UBDs 或者被单泛素化,因此 UBD-ubiquitin 的这种弱的结合力对于质膜的囊泡运输显得极为重要。二、由于哺乳动物体内预计有  $10\ \mu\text{M}$  游离泛素,如此高浓度的游离泛素,一旦与 UBD 具有较高的亲和力,会造成体内游离泛素池的耗竭而影响正常的泛素化反应发生。为了维持机体正常的生命活动,机体往往会根据外界环境的刺激而采取不同的

策略来调节性增强 UBD-ubiquitin 的结合能力,如:①含有多个 UBDs 拷贝的泛素识别受体、泛素识别受体复合体、泛素识别受体多聚化等通过多个 UBD-ubiquitin 的结合而增强结合能力。②泛素结合受体同时识别底物蛋白及其修饰的泛素(链),协同增强结合力。膜病毒即通过该方法增强宿主与泛素化的病毒蛋白之间的结合力,从而加速病毒发芽繁殖。肿瘤易感基因-101(TSG101)内含有一个低亲和力 UEV 结构域(约  $500\ \mu\text{M Kd}$ ),但其可以同时识别病毒蛋白 GAG 以及其修饰的泛素(链),从而增加了结合能力。通常泛素催化相关酶的催化中心内的泛素识别结构域不称作 UBDs,但是去泛素化酶 DUB 可同时识别泛素化底物以及底物上修饰的泛素分子,虽然这两种结合方式都比较弱,但是两种结合的协同作用不但增加了结合能力也提高了结合的特异度。③泛素识别受体自身发生泛素化,受体自身通构象改变而形成稳定又牢固的分子内结合,导致 UBD 局部高泛素分子浓度,因此即使结合力较弱也可以保持稳定的结合。④UBPs 可以通过其表面的 UBD 以及非 UBD 区域同时识别泛素化底物而增强结合力。

**2.2 UBD 结合的选择性以及亲和性** UBDs 对泛素信号的识别具有选择性和亲和力两个特点:选择性(selectivity)或专一性是指对不同长度、不同类型的泛素链中的某一类泛素链的特殊偏好,而对其他泛素链则形成明显的歧视。亲和力(avidity)是指协同一个泛素链上的多个低亲和力的泛素结合位点而达到较高亲和能力。原则上这两个特征相互独立,但实际上良好的专一性往往是通过多个临近泛素识别位点的协同作用提高亲和力后才得以形成。但是也存在高亲和力却无泛素链的选择性的情况,如一个蛋白含有多个被柔性 linker 隔开的不同类型 UBDs,或者一个蛋白只含有一种 UBD 但形成了二聚体(dimer)。

**2.3 UBD 结合的协同效应** 含有多个 UBDs 的泛素受体或含单个 UBD 的泛素结合蛋白复合体往往协同发挥作用,形成对泛素链的特异性高亲和力。某些 UBD 本身具有多个泛素识别表面,可以同时识别泛素链的两个泛素分子或者两个底物上的泛素链。III 型脊髓小脑共济失调症相关蛋白 3(ataxin-3, AT3)是一种含多聚谷氨酰胺(polyQ)的蛋白质,其 polyQ 附近有两个串联的 UIM 序列(UIM1-2)<sup>[6]</sup>,这种串联 UBDs 通过构象改变识别泛素化底物发挥着重要的生物学作用。核磁共振光谱(NMR)技术解析 UIM1-2 游离状态以及泛素结合状态的结构,发现每一个 UIM 都由一个  $\alpha$ -螺旋构成。当 UIM1-2 处于游离状态时,这两个  $\alpha$ -螺旋没有固定的方向,一旦与泛素化底物结合,两个螺旋便形成典型的螺旋-环-螺旋(helix-loop-helix)的折叠构象,核磁共振光谱(NMR)动力学数据显示此时两个螺旋间的连接部分变得更为刚性。通过核磁共振化学位移干扰(CSP)和等温滴定量热(ITC)实验发现 UIM1-2 比单独的 UIM1, UIM2 与泛素的结合力都要强;同时 UIM1-2 更倾向于结合 K48 或 K63 位二聚泛素链,两个 UIM 之间的连接部分对于 UIM1-2 与二聚泛素链的结合有重要作用。这些证据表明,UIM1-2 的连接区域通过构象和动态变化,使两个 UIM 协同发挥作用与单泛素或二聚泛素链结合,这也许与泛素结合蛋白对不同泛素链或泛素化底物偏好性有关。

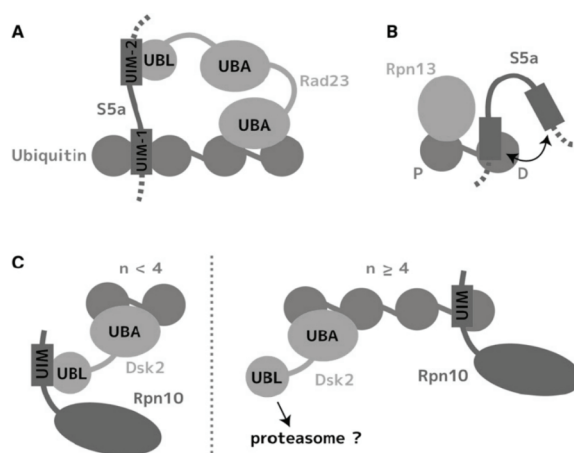
同时 Peter Kaisera 研究小组在酵母调节转录因子

MET4 中发现一个新的 UBD, 命名为 UIM 类似结构域 (UIM-like domain), 该结构域协同 MET4 上另外一个 UIM 结构域在环境依赖的作用下调节 MET4 的功能。当体内营养丰富, 胺类代谢物充足时, MET4 上的 K48 位聚泛素链由于 UBD 的限制而不能继续延长, 形成短泛素链修饰的 MET4, 此时由于串联 UBD 的掩护使 MET4 处于稳定的抑制状态而逃避蛋白酶体的识别与降解。当体内营养缺陷, 胺类代谢物贫乏, 或重金属刺激的情况下, MET4 去泛素化后活化并发挥下游调节功能。这种被 UBD 保护处于抑制状态的 MET4 在 UBD 失活后可以形成较长的多聚泛素链修饰, 促使其迅速被蛋白酶体信号识别并降解<sup>[7]</sup>。多个包含多聚 UBL/UBD 的泛素受体蛋白同时与某一聚泛素链结合时会形成三元复合体 (ternary complexes), 该复合体由于局域环境优势可以明显增强结合力, 如蛋白酶体泛素识别复合体。人蛋白酶体亚基 S5a 和 Rad23A 复合体可以结合四聚泛素链 (图 1A), 但是两个 Rad23A 却达不到相同效果。这两个蛋白与其他辅助因子 (如 DSK2) 一起共同决定蛋白酶体底物的定向与识别。S5a 是蛋白酶体完整所必须的蛋白, 含有 2 个 UIMs。Rad23A 是一个可以暂时与蛋白酶体识别的配体蛋白, 含有 2 个 UBAs 和一个 UBL 结构域。在这个三元复合体中, Rad23A 通过其 UBL 结构域与 S5a 的 UIM2 协同发挥作用。这一有杂合泛素识别结构域构成的复合体由于其局部配体浓度较高而表现出较高的结合能力。

蛋白酶体内的另一三元复合体是由蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 13 (Rpn13) 和 S5a 识别泛素链构成, Rpn13 通过其 Pru 结构域代替 S5a 中的一个 UIM 识别近端泛素分子。而“游离”出来的 UIM 与 S5a 上另一个 UIM 竞争性结合 K48 二聚泛素链上的远端泛素分子 (图 1B)。这种选择性的偏好对于泛素底物向蛋白酶体的运输以及 DUB 的识别都有重要作用。

酵母体内检测到的三元复合体是由 Rpn10, DSK2 与泛素链或者单泛素构成, 该复合体可以计数泛素化底物上泛素单体的个数, 众所周知, 泛素链的长度对蛋白酶体降解至关重要, 当泛素链长度  $n \geq 4$  时, 底物蛋白才会被蛋白酶体识别并降解。由于 Rpn10 上 UIM 结构域与 DSK2 上 UBL 结构域的亲和力远高于其与泛素分子的亲和力, 因此当单泛素修饰或者泛素链的长度  $n < 4$  时, Rpn10 与 DSK2 结合, 而 DSK2 上的 UBA 识别泛素分子 (图 1C, 左图)。当泛素链长度  $n \geq 4$  时, 力的平衡改变, Rpn10 从 DSK2 上分离出去去识别泛素分子 (图 1C, 右图)。UBDs 的协同效应使其对泛素化底物的亲和力具有较大的动态范围, 以及多个 UBD 瞬时协同作用对泛素介导的信号转导以及泛素底物的转归有重要意义。

**2.4 UBD 结合的排他性** 由于 Ile44 疏水补丁的识别表面的通用性导致 UBDs 对单泛素化底物的结合存在相互排斥性, 这一现象说明大多数情况下一个 UBD 只能识别一个泛素分子, 这种相互排斥性是泛素化信号有效传导的重要组成部分, 可以避免一个泛素信号同时刺激多个信号通路而导致细胞内信号传导的失调<sup>[9]</sup>。Rpn13 与二聚泛素链中的近端泛素单体结合后, S5a 内的两个 UIM 结构域竞争性结合远端泛素单体 (图 1B)。



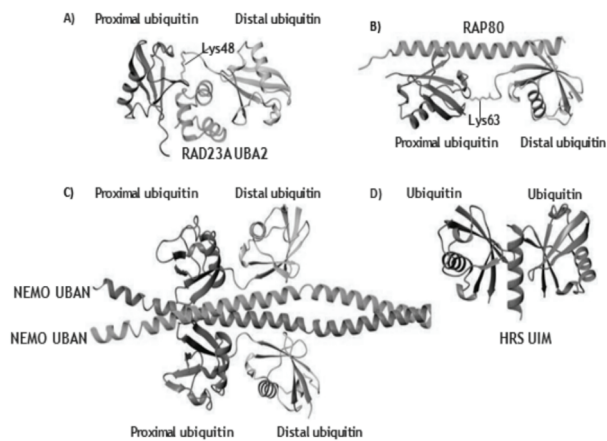
A. Rad23A 内的 UBA 结构域和 S5a 内一个 UIM 结构域可同时对四聚泛素链形成三元复合体。同时 S5a 内的另一个 UIM 结构域则与 Rad23A 内的 UBL 结构域直接结合使三元复合体更加稳固。B. Rpn13 与二聚泛素链中的近端泛素单体结合, 导致 S5a 内的两个 UIM 结构域竞争性结合远端泛素单体。C. 当底物蛋白上的多聚泛素链较短或泛素单体  $n < 4$  时, Rpn10 上的 UIM 结构域与 DSK2 上的 UBL 结构域结合, 而 DSK2 上的 UBA 结构域则选择性识别短的多聚泛素链。当底物蛋白上的多聚泛素链较长或泛素单体  $n \geq 4$  时, Rpn10 上的 UIM 结构域与 DSK2 上的 UBA 结构域同时与多聚泛素链结合, 从而将 DSK2 上的 UBL 结构域游离出来将三元复合体定向运输至蛋白酶体进行降解。图片来自文献<sup>[8]</sup>。

图 1 泛素结构域-泛素三元复合体的作用模式

**2.5 UBD 的多维结合特点** 尽管 UBDs 对泛素化信号的识别存在排他性, 但也存在例外, 部分 UBDs 具有多维结合特点, 如 ZnF 结构域可以同时识别单泛素化底物的三个不同表面。多维泛素-UBD 结合的一个典型例子就是通过  $\alpha$ -helical (可以是一个或者多个 helical) 的两个对立的表面作为泛素识别表面。肝细胞生长因子调节的酪氨酸激酶底物 (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate, HRS) 是 ESCRT-0 的一个亚基, 该亚基内单螺旋结构的 UIM 结构域的两面可以同时以相同的结合方式识别并结合不同的泛素分子, 并且具有相同的亲和力。晶体结构分析表明两个泛素分子分别通过其 Ile44 疏水区识别 UIM 螺旋结构上对称的两个表面, 该结合方式需要 HRS 上 2 个氨基酸在空间上接近 UIM 从而形成  $\alpha$ -helix 的两个表面形成等效的泛素识别表面 (图 2D)。还有其他一些双面结合能力的 UIMs, 如人类共同的伴侣热休克蛋白 (human co-chaperone heat-shock protein DnaJ homologue, HsJ1)、MAP 激酶激酶激酶激酶 1 (MAP kinase kinase kinase kinase1, MAP3K1)、表皮生长因子受体底物 15 (endocytic regulators epidermal growth factor receptor substrate 15, EPs15) 以及 EPs15 相关蛋白 (EPs15-related, EPs15R)。但是 HRS 的酵母同源蛋白 Vps27 含有 2 个只有单面结合特性的 UIMs。鼠同源的 EPS15 也含有 2 个 UIMs, 但是只有其中一个 UIM 是双面结合的。

**3 泛素识别结构域的泛素识别表面** 泛素化底物与特定 UBDs 的特异性识别调控着细胞内的多种生物学功能, ubiquitin-UBDs 之间低亲和力以及动态变换特点往往涉及

底物蛋白的多个识别表面。泛素与 UBDs 的结合表面往往比较宽阔且平坦,定点诱变研究表明泛素与 UBDs 的结合往往取决于少数几个氨基酸残基,人们称之为“热点”。目前已知的泛素表面识别位点包括(图3):①Ile44 为中心的疏水补丁;②以 C 末端和 Asp58 为中心的极性表面;③类泛素结构域(UBL)以及  $\alpha/\beta$  沟识别位点;④UBDs 间的 linker 的识别;⑤潜在的其他结合位点。



A. 蛋白 RAD23A 内的 UBA2 结构域(绿色)像三明治一样夹在 K48 位二聚泛素链的两个泛素单体(灰色)之间(PDB ID: 1ZO6)。UBA2 结构域的结构也解释了其对 Lys48 位聚泛素链的偏好性的原因,因为其可以通过识别二聚泛素链的连接区域增大结合面积,从而增强亲和力,同时拉近两个泛素单体的空间位置,使 K48 位多聚泛素链的结构更加紧凑。B. 蛋白 RAP80 内串联的 UIMs 结构域与 K63 位二聚泛素链形成的复合体的结构显示串联的 UIMs 结构域形成连续的螺旋结构可以使其同时识别二聚泛素链的两个泛素单体,增大亲和力的同时使两个泛素单体的空间位置相对松散。C. The UBA2 结构域以及 NEMO 结构域形成卷曲螺旋,使其与线性泛素链的两个泛素单体结合面积增加,亲和力增强,从而使其特异性的识别线性泛素链。D. 肝细胞生长因子调控的酪氨酸激酶底物 HRS 内的单螺旋结构的 UIM 结构域的两面可以同时以相同的结合方式识别并结合不同的泛素分子,并且具有相同的亲和力,(PDB ID: 2D3G)。图片来自文献<sup>[9]</sup>。

图2 泛素和 UBDs 之间的多维结合可以增加 UBD 识别的特异性以及亲和力

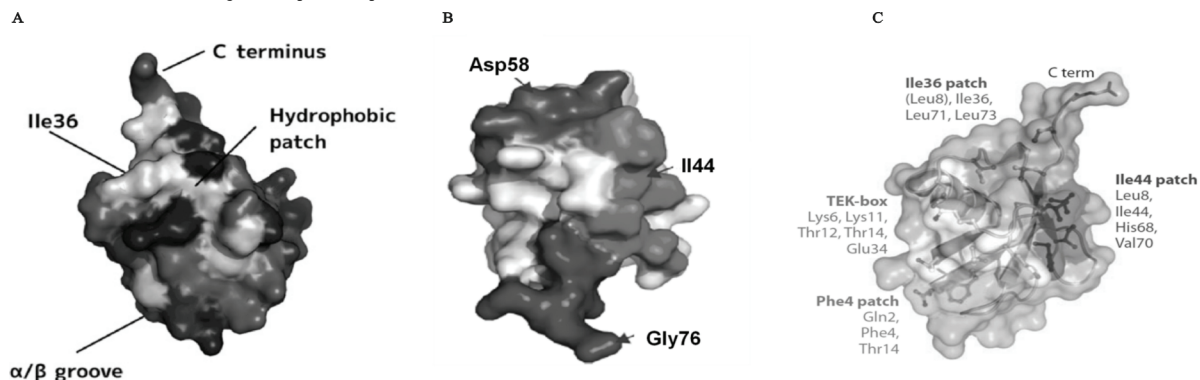
**3.1 Ile44 为中心的疏水补丁** 大多数 UBDs 都仅能识别位于泛素分子  $\beta$  折叠上的疏水补丁(图3A)。以 Leu8, Ile44 和 val70 为中心的疏水补丁对 UBDs 的亲和力较弱<sup>[12]</sup>。例如 UBA 结构域,有 3 个 helix 束构成,主要识别 Ile44 疏水补丁。UIM 结构域,只有一个 helix 构成,识别  $\beta 5$  折叠上的广泛区域, $\beta 5$  折叠上的基因突变会影响 UIM 的识别,但对 UBA 的识别没有影响,暗示 Ile44 疏水补丁周围的氨基酸残基对某些 UBDs 家族成员的特异性识别至关重要。尽管  $\alpha$  螺旋的 UBD 结构域(UBA, UIM, MIU, UMI, DUIM, UBM, UBAN, CUE, GAT, VHS, UIM-like domain)对疏水补丁的识别占绝对优势,但是仍然有其他结构的 UBDs 家族成员(SH3, Pru, NZF, UEV 等)也可以识别疏水区。相同或者相似结构的 UBDs 家族成员却识别不同的位点,进一步证明 UBDs 识别泛素位点的特异性。

**3.2 C 末端以及 Asp58 为中心的极性表面** 泛素的 C 末端在泛素化底物的识别中有着重要的作用,它与泛素链的延长、去泛素化以及不同泛素链的识别都有着密切关系。泛素链具有一定的极性,近端是指接近底物蛋白的末端(如果是游离的泛素链,近端则指游离的 C 末端),远端是指距离底物最远的末端。DUB 是主要通过水解泛素羧基末端的硫酯键、肽键或异肽键等,将底物蛋白上的泛素分子或泛素链特异度的水解下来。几乎所有的 DUBs 都只特异性识别泛素的 C-末端,但也有少数 DUBs 家族成员与泛素其他的表面位点识别,如泛素羧基末端水解酶家族(ubiquitin C-terminal hydrolase, UCHs)特异性识别泛素的羧基末端,尤其是 Arg72 和 Arg74。另外一个比较稀少的识别位点位于泛素分 Asp58 中心的极性表面,其被 UBDs 家族中的 ZnF 结构域及其各种变体特异性识别。ZnF 家族是 UBDs 家族中的一个特例,分别识别单泛素化底物上的三个不同的位点。细胞核定位蛋白 4(NPL4)的 ZnF 结构域(the nuclear protein localization 4 ZnF domain, NZF)是内质网相关蛋白降解通路的一个泛素结合受体蛋白,DNA 跨损伤合成聚合酶中的锌指结构域(ubiquitin-binding ZnF domain, UBZ)都特异性识别泛素  $\beta 5$  折叠上的 Ile44 疏水补丁。而 G 蛋白 Rab5 鸟嘌呤核苷酸交换因子(Rabex5)可以特异性识别泛素表面的 Asp58 极性中心。另一个锌指结构域家族成员 ZnF 结构域识别泛素分子 C 末端的氨基酸残基,其广泛存在于 E3 成员异肽酶 T(IsoT)中。异肽酶 T 的这一独特性识别位点使其可以特异性的识别并催化泛素化底物释放游离泛素链,也使其可以与其他识别 Ile44 疏水补丁的 UBDs 成员一起协同识别并作用于泛素化底物。

**3.3  $\alpha/\beta$  沟识别位点** 和泛素一样,泛素样结构域(ubiquitin like domain, UBL)通过其疏水表面与 UBDs。UBL 上的 Ile44 疏水补丁像泛素分子一样高度保守,其他区域与泛素有进化上的不同。DSK2 的 UBL 结构域和蛋白酶体亚基 Rpn10 上的 UIM 结构域的结合能力要比该 UIM 与泛素的结合能力强 5~10 倍<sup>[13]</sup>。另外一个蛋白酶体的配体蛋白 Rad23 上的 UBL 结合方式与 DSK2 类似,但却识别 Ile44 疏水补丁,并且其与 Rpn10 上 UIM 的结合能力十分微弱。这可能是由于主 DSK2/Rpn10 与泛素  $\beta 5$  折叠延伸区域存在静电作用力,将 DSK2 上的 Asp64 突变成 lys(类似于泛素上的 Lys63),故将其与 Rpn10 的结合力增强。而 Rad23 上的等价区域却并未参与 UBD 的结合。UBL 的这种进化差异性扩展了信号识别的特异性。另外一个 UBL 的独特识别位点在  $\alpha$ -helix 与  $\beta 2$ -strand 形成的口袋内的小沟,即  $\alpha/\beta$  沟( $\alpha/\beta$  groove)。SUMO 家族是目前研究最为广泛的 UBL 家族,他们都有一个类似泛素的保守结构骨架,但其疏水区的保守性相对较差。SUMO 作用基序(SUMO-interacting motifs, SIMs)是一个对 SUMO 有较高的亲和力(解离常数约  $10 \mu\text{M}$ )的小蛋白,比上述的 UBD 家族的结合力都要强。SIMs 的结构可以伸展到 SUMO 蛋白的  $\alpha/\beta$  沟内,一旦结合 SIMs 就形成一个类似 SUMO 蛋白  $\beta$  折叠的结构,与 SUMO 蛋白上的其他折叠呈平行或反向平行。SIMs 的方向与 SIM 自身的氨基酸排列顺序有关,氨基酸排列颠倒就可以形成反向平行。SIM 的这种高亲和力也归功于 SIM 上的负电荷对 SUMO 蛋白  $\alpha/\beta$  沟的静电作用力。



让人吃惊的是虽然泛素与 SUMO 蛋白在  $\alpha/\beta$  沟区域都呈现相同的电荷特性,但是泛素并没有利用  $\alpha/\beta$  groove 作为识别位点。目前了解的涉及到  $\alpha/\beta$  沟区域的识别只发生在泛素特异性蛋白酶(ubiquitin-specific proteases, USP)与泛



A. 泛素分子表面的主要识别热点。非极性的区域用灰色表示,不带电荷的极性表面区域用绿色表示,酸性区域用红色表示,蓝色表示碱性区域。UBD 的不同识别表面分别标识出<sup>[8]</sup>;B. Ile44 疏水补丁(绿色)(green),Asp58 极性中心(蓝色)以及 C-末端的双甘氨酸补丁(粉色);C. 泛素分子表面的功能集团及其关键氨基酸残基<sup>[10]</sup>。Ile44 疏水补丁(蓝色)是泛素表面最主要的 UBD 识别表面;Ile36 疏水补丁(绿色)既可以介导泛素链中的泛素单体之间的相互作用,也可以被 E3s 以及 UBDs 识别;Phe4 补丁(蓝绿色)可以被 UBAN<sup>[11]</sup> 结构域以及 DUBs 上的泛素特异性蛋白酶识别;TEK-box(白色)是有丝分裂退化所必须的功能集团。

图3 泛素表面的 UBD 识别热点

3.4 泛素链的 linker 区域 多聚泛素链在一定程度上增加了 UBDs 和其修饰底物的亲和性以及特异度。因为多聚泛素链增加 UBDs 局部的泛素分子浓度、泛素识别位点的密度和多样性<sup>[14]</sup>。UBDs 不但可以结合多聚泛素链上不同泛素单体的识别位点,也可以结合泛素链的独特 linker 区域,这大大增加了 UBDs 对泛素链选择的特异性。多聚泛素链的类型决定泛素链的伸展性以及泛素单体识别表面的暴露程度。例如 K48 位多聚泛素链在生理情况下的分子结构相对紧凑,所以一个单独的 UBA 结构域可以同时识别 K48 位二聚泛素链上的两个泛素单体(图 2A),K48 位二聚泛素链的紧凑空间构象能够暴露出最佳的识别位点。而 K63 位多聚泛素链则呈现一个相对较为灵活舒展的空间构象,锌金属蛋白酶 DUB/K63 复合物中,泛素单体间的异肽键很好的暴露出来供 DUB 进行水解。近端泛素单体内 lys63 周围的氨基酸残基与 DUB 形成氢键。远端泛素单体通过 2 个区域与 DUB 结合,一个是经典的 Ile48 疏水补丁,另一个是 Ile36 残基附近的  $\alpha 1$  和  $\beta 3$  sheet。另外一个例子发生在 NEMO 蛋白上的 UBD 与线性二聚泛素链之间<sup>[15]</sup>。NEMO 和 AMSH 两个蛋白都特异性与泛素链中不同泛素单体间的 linker 区域结合而实现泛素链的特异性识别。这些特异性识别只能在识别特定的泛素链类型时才会发生(图 2C)。我们都知道有些泛素受体蛋白往往包含多个 UBDs,这种情况下应该更容易识别泛素链中的 linker 区域。蛋白酶体亚基 S5 $\alpha$  的两个 UIM 结构域  $\alpha$  与酵母蛋白 Rpn10 同源,与 K48 位二聚泛素链具有较高的亲和力,比其中任何一个 UIM 单独识别泛素化底物的亲和力都要强的多<sup>[13]</sup>。这种强的结合力要归功于 S5 $\alpha$  与两个泛素单体间的 linker 区域的结合,该区域主要分布在远端泛素单体的 C 末端以及近端泛素单体的 Lys48 残基附近区域。更让人吃惊的是 S5 $\alpha$  对 K48 以及 K63 位多聚泛素链的识别没有任何偏向性,虽然我们都知道两种泛素链类型的 linker 区域构象完全不同,唯一的解释就是两个 UIM 之间存

素的复合体上,其与泛素的识别几乎涵盖了  $\beta$  sheet 上疏水区域的所有氨基酸残基,而 USP 上“手指状的”亚基同时识别着泛素以及  $\alpha/\beta$  groove 区域的边缘,但是其并非决定亲和力和选择性的关键。

在一个韧性较大的 linker 可以为其提供能够适合不同的泛素链类型的空间构象。这就说明串联 UBD 间的 linker 区域可以决定受体蛋白对泛素链类型的选择偏好。如受体相关蛋白(receptor associated protein 80, RAP80)的 2 个串联 UIM 间的 7 个氨基酸 linker 序列形成一个弱的  $\alpha$ -helical, 其与 UIMs 的强 helical 一起形成一个连续的 helix,将两个 UIM 的识别位点呈现在同一平面,从而增大了识别面积。这一特殊构象使 RAP80 的两个 UIM 处于最适合结合 K63 位多聚泛素链的空间构象(图 2B)。而另外一个特异性识别 K48 位多聚泛素链的脊髓小脑型共济失调 III 型蛋白(ataxin-3)也含有两个串联的 UIMs,两个 UIM 通过 2 个氨基酸的 linker 区域连接,当我们将两个蛋白 UIM 间的 linker 交换后发现其对泛素链的亲特性发生很大改变,说明串联 UBD 间的 linker 可以影响泛素受体蛋白对泛素链类型的选择偏好。与泛素识别受体蛋白不同,DUBs 只有识别泛素链中泛素单体间 linker 区域,充分暴露水解位点才能完成对泛素链的水解作用。且 DUBs 家族对不同泛素链类型有很高的特异性。例如 IsoT 以及 C 末端水解酶 2 (UsP2)可以特异性识别 K48 以及 K63 位多聚泛素链,而不能识别线性泛素链。DUB 圆柱肉瘤抑制因子是 NF-KB 通路的负性调节因子,可以特异性水解 K63 以及线性泛素链却不能识别 K48 位多聚泛素链。含有卵巢癌结构域(ovarian tumour domains, OUT)的 DUB 蛋白也具有较好的泛素链特异性。如 A20 的 OUT 结构域只对 K48 位多聚泛素链有水解作用。而 TRABID 的 OUT 结构域则偏好水解 K63 位多聚泛素链<sup>[16]</sup>。

3.5 潜在的其他结合位点 随着人们对 UBD 认识的不断加深,显微晶体结构以及质谱技术一日千里的发展,UBD 家族将会不断壮大,更多潜在的 UBD 家族将会被发掘,使我们更加了解泛素化蛋白质组<sup>[17]</sup>。例如科学家发现不同受体蛋白中的 SH3 结构域可以识别泛素的不同表面<sup>[18]</sup>。

4 结论和展望 近两年我们对多聚泛素链的结构以及特

异性识别的认识已经取得了一定的成绩,对20多个已知UBDs家族的特异性识别特性及其调节的不同生物学过程的研究是我们对泛素信号网络研究的基础<sup>[5]</sup>。对不同泛素化修饰类型和特异性UBD形成复合体的结构分析说明泛素化蛋白以及UBD的构象都在识别的过程中发生了动态变化,但是目前现有的研究还缺乏更深层次的探索。随着新的UBDs的不断发现,允许更加系统的分析泛素-UBD网络,进一步帮助我们在各个方面了解泛素化网络的构成和作用方式,尤其是泛素化网络中起到关键枢纽作用的蛋白,即泛素调节的关键节点,这些会是转化医学实现的基础,这些关键节点极有可能是未来药学和医疗应用的靶标。泛素化系统中的E1, E2, E3以及UBD在未来肿瘤治疗中的作用引起专家们的注意<sup>[19]</sup>,UBDs在人类癌症和免疫缺陷性疾病等病理过程中的调节作用已得到了认可,说明UBD有可能会是临床一个很有希望的药物靶标<sup>[20]</sup>。多泛素识别位点的空间定向呈现,链特异性的亲和特性是泛素链的选择性亲和识别的主要理论模式。目前我们的首要任务就是结合先进的成像技术、纯化手段、质谱技术来发现新的泛素识别受体,探索其发挥功能的具体作用机制,以及对非典型泛素链的结构功能的探索。同时也可以探索现有的UBDs与非典型泛素链的亲和关系,并利用这一工具来探索泛素化在动脉粥样硬化中的生物学功能。同时适应当今社会基因组学、蛋白质组学、以及翻译后修饰组学等的研究趋势,泛素化蛋白质组学“ubiquitome”研究势在必行,而泛素化蛋白质组学的研究依赖于高效的泛素化蛋白富集技术以及质谱分析策略。结合UBDs对不同泛素化修饰的选择性识别,我们应该更加合理的利用UBD的这一特性,使其和当今先进的质谱技术平台完美的结合,成为我们探索更为广阔的泛素化蛋白质组学领域及其在动脉粥样硬化中的生物学功能的强有力工具。

#### 参考文献:

- [1] Woelk T, Sigismund S, Penengo L, et al. The ubiquitination code: a signalling problem[J]. Cell Division, 2007, 2(1): 11.
- [2] Suryadinata R, Roesley SN, Yang G, et al. Mechanisms of generating polyubiquitin chains of different topology[J]. Cells (Basel, Switzerland), 2014, 3(3): 674-689.
- [3] Hicke L, Schubert HL, Hill CP. Ubiquitin-binding domains[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2005, 6(8): 610-621.
- [4] Hurley JH, Lee S, Prag G. Ubiquitin-binding domains[J]. Biochemical Journal, 2006, 399(3): 361-372.
- [5] Ikeda F, Crosetto N, Dikic I. What determines the specificity and outcomes of ubiquitin signaling? [J]. Cell, 2010, 143(5): 677-681.
- [6] Song AX, Zhou CJ, Peng Y, et al. Structural transformation of the tandem ubiquitin-interacting motifs in ataxin-3 and their cooperative interactions with ubiquitin chains[J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13202.
- [7] Tyrrell A, Flick K, Kleiger G, et al. Physiologically relevant and portable tandem ubiquitin-binding domain stabilizes polyubiquitylated proteins[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(46): 19796-19801.
- [8] Winget JM, Mayor T. The diversity of ubiquitin recognition: hot spots and varied specificity[J]. Molecular Cell, 2010, 38(5): 627-635.
- [9] Dikic I, Wakatsuki S, Walters KJ. Ubiquitin-binding domains-from structures to functions[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009, 10(10): 659-671.
- [10] Komander D, Rape M. The ubiquitin code[J]. Annu Rev Biochem, 2012(81): 203-229.
- [11] Rahighi S, Ikeda F, Kawasaki M, et al. Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappa B activation[J]. Cell, 2009, 136(6): 1098-1109.
- [12] Bomar MG, D'souza S, Bienko M, et al. Unconventional ubiquitin recognition by the ubiquitin-binding motif within the Y family DNA polymerases iota and Rev1[J]. Molecular Cell, 2010, 37(3): 408-417.
- [13] Zhang DN, Chen T, Ziu I, et al. Together, Rpn10 and Dsk2 can serve as a polyubiquitin chain-length sensor[J]. Molecular Cell, 2009, 36(6): 1018-1033.
- [14] Fushman D, Walker O. Exploring the linkage dependence of polyubiquitin conformations using molecular modeling[J]. Journal of Molecular Biology, 2010, 395(4): 803-814.
- [15] Rahighi S, Ikeda F, Kawasaki M, et al. Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappa B activation[J]. Cell, 2009, 136(6): 1098-1109.
- [16] Komander D, Reyes-turcu F, Licchesi JD, et al. Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains[J]. EMBO Reports, 2009, 10(5): 466-473.
- [17] Budhidarmo R, Day CL. The ubiquitin-associated domain of cellular inhibitor of apoptosis proteins facilitates ubiquitylation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(37): 25721-25736.
- [18] Ortega Roldan JL, Casares S, Ringkjøbing Jensen M, et al. Distinct ubiquitin binding modes exhibited by SH3 domains: molecular determinants and functional implications [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e73018.
- [19] Liu J, Shaik S, Dai X, et al. Targeting the ubiquitin pathway for cancer treatment[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2015, 1855(1): 50-60.
- [20] Hoeller D, Dikic I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy[J]. Nature, 2009, 458(7237): 438-444.

收稿日期: 2014-10-27

修回日期: 2015-02-11