

DOI: 10.13376/j.cbls/2016031

文章编号: 1004-0374(2016)02-0231-08



肖意传, 研究员, 博士生导师。先后在 *Nature*、*Nature Medicine*、*Nature Immunology*、*Immunity*、*J Exp Med* 等杂志发表论文 29 篇, 获得了一系列重大发现, 并荣获多项奖励。2015 年入选中组部“青年千人计划”, 并获得优先支持。实验室主要从事三个方面的研究: (1) 炎症与自身免疫病免疫调节的相关分子机制与信号通路; (2) 中枢神经系统免疫调节及其炎症反应过程中的病理与分子机制研究; (3) 肿瘤病理过程中免疫学特征、分子机制与免疫干预策略研究。

## 蛋白质泛素化在免疫调节中的作用与研究进展

王 艳, 肖意传\*

(上海交通大学医学院/中国科学院上海生命科学研究院健康科学研究所, 上海 200031)

**摘 要:** 蛋白质泛素化是一种广泛存在于真核细胞内的蛋白质翻译后修饰作用, 其最初是通过研究细胞内蛋白质降解的机制而被发现。越来越多的证据表明, 泛素化及其逆过程——去泛素化作用, 通过调节免疫系统中不同种类细胞的功能, 在固有免疫和适应性免疫应答过程中发挥了关键性调控作用, 从而影响人类多种重大疾病, 如自身免疫性疾病、感染性疾病和恶性肿瘤的发生发展。综述将着重讨论蛋白质泛素化作用对不同免疫细胞功能的调控以及在重大疾病病理调控中的作用的最新研究进展。

**关键词:** 泛素化; 去泛素化; NF- $\kappa$ B; 炎症信号通路

中图分类号: Q7; R392 文献标志码: A

## The role of protein ubiquitination in the immune regulation

WANG Yan, XIAO Yi-Chuan\*

(Institute of Health Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences/Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200031, China)

**Abstract:** Protein ubiquitylation is a post-translational modification that existed widely in eukaryotic cells. This phenomenon was initially described in the studies of the mechanism of cytosol protein degradation. There is increasing evidence that both ubiquitination and its reversal process, deubiquitination, play crucial roles in innate and adaptive immune response by regulating the function of the different immune cells, consequently controlling occurrence and development of a variety of human diseases, including autoimmune diseases, infectious diseases and malignant tumors. In this review, we focus on the latest research progresses on the role of ubiquitylation in the regulation of immune cell function and the development of multiple human diseases.

**Key words:** ubiquitylation; deubiquitination; NF- $\kappa$ B; inflammatory signaling pathway

泛素 (ubiquitin) 是由 76 个氨基酸组成的高度保守、在真核细胞中广泛存在的多肽。不同长度的泛素链通过共价作用结合到靶蛋白赖氨酸残基的过程即为蛋白质泛素化 (protein ubiquitination)。蛋白

质泛素化介导的能量依赖性胞内蛋白降解机制由 Aaron Ciechanover、Avram Hershko 和 Irwin Rose 于

收稿日期: 2015-12-30

\*通信作者: E-mail: ycxiao@sibs.ac.cn

1980年首次报道,并因此获得2004年诺贝尔化学奖<sup>[1]</sup>。泛素化是由E1、E2、E3三种不同类型的酶依次通过活化、结合、连接三步级联反应将泛素连接到底物上的过程:第一步,由E1泛素活化酶(E1 ubiquitin activating enzyme)以ATP依赖的方式催化泛素C端甘氨酸残基与E1活性位点半胱氨酸残基之间形成硫酯键;第二步,活化的泛素从E1转移到E2泛素结合酶(E2 ubiquitin conjugating enzyme)的活性位点半胱氨酸上;最后一步,由E3泛素连接酶(E3 ubiquitin ligase)催化泛素通过其C端甘氨酸与底物靶蛋白赖氨酸残基之间形成的异肽键与之共价结合<sup>[2-3]</sup>。

人类基因组仅编码2种E1,但预测至少有38种E2和600种E3存在<sup>[4]</sup>,不同的E2和E3联合催化不同类型的泛素链结合到特定蛋白底物上,其中E2决定泛素链的长度和连接类型,对泛素链的组装起重要的调控作用<sup>[5]</sup>。例如,E2酶Ubc13对白介素1(interleukin-1,IL-1)和脂多糖(lipopoly-saccharide,LPS)诱导的丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)活化是必需的,却对这些配基引发的核因子 $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B,NF- $\kappa$ B)信号通路影响甚微。研究发现,Ubc13优先催化形成K63(泛素分子的第63位赖氨酸)连接的泛素链,促进MAPK信号转导<sup>[6]</sup>。E3泛素连接酶通过识别目标底物,并调控泛素从E2泛素结合酶转移到靶蛋白,从而赋予泛素化反应底物特异性<sup>[7]</sup>。根据E3用于识别底物的蛋白结构域类型的不同,可将其分为两类:RING(really interesting new gene)类和HECT(homologous to E6-associated protein carboxyl terminus)类。目前,人类基因组编码的大多数E3属于RING类E3连接酶,这类E3的特征是具有RING-指(RING-finger)结构域,或者是结构上与RING相关的UFD2-同源结构域(U-box)或植物同源结构域(plant homeodomain,PHD)<sup>[8]</sup>。

## 1 蛋白质泛素化的分类及其功能

泛素分子含有7个赖氨酸残基(K6、K11、K27、K29、K33、K48和K63),通常一个泛素分子的C末端甘氨酸可与另一个泛素分子中任意一个赖氨酸的 $\epsilon$ -氨基结合形成多聚泛素化(poly-ubiquitination),因此,可以产生7种不同结构的泛素链,多样的泛素链连接方式可引导底物蛋白走向不同的命运,发生不同的细胞反应<sup>[9]</sup>。此外,泛素分子还可以通过单个分子或线性化的方式连接到底物靶蛋白上形成

单泛素化(mono ubiquitination)或线性泛素化(linear ubiquitination),以发挥不同的调控功能<sup>[10]</sup>。

目前研究较多的是K48和K63连接的蛋白质泛素化作用。K48连接的泛素链(K48-linked ubiquitin chains)通过靶向错误折叠或衰老蛋白使之被招募到26S蛋白酶体降解<sup>[11]</sup>。在细胞信号转导过程中,K48泛素化(K48 ubiquitination)可通过调控信号蛋白(如信号转导的激动剂和抑制剂)的降解,进而促进或阻断信号的传导。E3泛素连接酶通过识别蛋白活化过程中发生的修饰(如磷酸化残基)准确靶向信号蛋白。例如,NF- $\kappa$ B的抑制物I $\kappa$ B与NF- $\kappa$ B二聚体结合掩盖NF- $\kappa$ B上的核定位信号(nuclear localization signals,NLS),使其滞留在细胞质中。活化的I $\kappa$ B激酶(I $\kappa$ B kinase,IKK)复合体磷酸化I $\kappa$ B $\alpha$ (I $\kappa$ B家族成员,主要调节经典RelA:p50异二聚体)的第32位和第36位的丝氨酸残基(Ser32和Ser36),导致其被 $\beta$ TRCP(F-box protein  $\beta$  transducin repeat-containing protein)SCF<sup>I $\kappa$ B</sup>E3泛素连接酶复合体识别并催化形成K48泛素链,促使I $\kappa$ B $\alpha$ 被蛋白酶体识别、降解,从而暴露出NF- $\kappa$ B上的NLS,NF- $\kappa$ B得以转位入核调控靶基因表达<sup>[12]</sup>。因此,K48泛素化调控信号抑制物I $\kappa$ B的降解促进NF- $\kappa$ B经典信号通路的转导。

K63连接的蛋白质泛素化则发挥非蛋白降解功能,主要通过活化蛋白激酶(protein kinase)调控细胞信号转导。IKK复合体的调节性亚基IKK $\gamma$ (也称为NEMO)和肿瘤坏死因子受体相关因子(tumor necrosis factor receptor(TNFR) associated factors,TRAFs)的K63泛素化对IKK,乃至NF- $\kappa$ B的活化非常重要。在白介素1受体(IL-1R)和Toll样受体(Toll-like receptor,TLR)介导的信号通路中,TRAF6作为一种E3泛素连接酶,与E2复合体Ubc13/Uev1A结合,催化包括NEMO和TRAF6自身在内的靶蛋白发生K63连接的泛素化,进而活化一种由TAK1、TAB1和TAB2(或TAB3)组成的蛋白激酶复合体。TAB2和TAB3结合到K63连接的泛素链上,导致TAK1活化。活化的TAK1又可进一步磷酸化IKK $\beta$ ,使得IKK介导的下游NF- $\kappa$ B信号通路得以活化<sup>[13]</sup>。

## 2 泛素化对免疫细胞功能的调控

### 2.1 泛素化调控巨噬细胞的存活/凋亡与自噬

巨噬细胞(macrophage,M $\Phi$ )表达多种模式识别受体(pattern recognition receptors,PRRs),如Toll

样受体、甘露糖受体、清道夫受体等。当病原微生物入侵机体时, M $\Phi$  通过识别病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 吞噬病原体, 分泌细胞因子以及释放抗菌肽, 从而调节抗感染免疫应答, 清除入侵病原体。当感染部位病原体难以控制时, 巨噬细胞会发生细胞凋亡, 产生杀菌活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS)<sup>[14]</sup>, 这是一种战略上的牺牲, 象征细胞抵御微生物入侵已进入严重的终末期。然而, 在感染早期, 泛素-蛋白酶系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 通过 K48 连接的多聚泛素化作用介导 Bcl-2 家族中促凋亡蛋白 (如 Bax) 的降解以抑制 M $\Phi$  凋亡, 维持抗感染免疫应答。研究发现, 凋亡敏感蛋白 (sensitive to apoptosis gene, SAG) 是 UPS 的关键组分, 当受到 PAMPs 的刺激时, M $\Phi$  中促凋亡和抗凋亡因子都有相应的表达以维持正常的生理功能, 而当通过 knock down 的方式下调 SAG 的表达则会抑制泛素化介导的凋亡相关蛋白的降解作用, 导致促凋亡蛋白 Bax 和 SARM (sterile  $\alpha$ - and HEAT/armadillo-motif-containing protein) 的累积, 促使线粒体中 Bcl-2/Bax 失衡, 诱导细胞色素 C 的释放和 caspase-9 与 caspase-3 的激活, 从而促进 M $\Phi$  发生凋亡<sup>[15]</sup>。因此, SAG-UPS 通过泛素化作用介导关键相关蛋白的降解, 以促进感染的 M $\Phi$  存活并使其在感染早期及时启动适度的免疫应答。

此外, 自噬也是巨噬细胞抵御入侵微生物的一种重要的先天防御机制, 而泛素化在调控细胞自噬中也发挥了重要功能。Parkin 蛋白是一种 E3 泛素连接酶, 催化 M $\Phi$  内含有结核分枝杆菌的吞噬性囊泡发生 K63 连接的泛素化, 从而促进细胞自噬, 清除胞内病原体。Parkin 缺陷的小鼠和果蝇都对各种胞内细菌感染敏感<sup>[16]</sup>, 表明 Parkin 在固有免疫防御机制中具有进化保守性的作用。除此之外, TRAF6 也可通过催化 Beclin-1 发生 K63 连接的泛素化, 促进 TLR4 (Toll-like receptor 4) 介导的巨噬细胞自噬, 而 A20 是 Beclin-1 的去泛素化酶, 可抑制 LPS 诱导的自噬。A20 基因缺失的小鼠多个器官都表现出严重的组织损伤, 对 LPS 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 极为敏感且易在新生时期死亡<sup>[17]</sup>。

除了通过直接吞噬杀伤病原体外, 在微生物 PAMPs 的刺激下, M $\Phi$  可通过泛素化作用激活下游的炎症信号通路 (如 NF- $\kappa$ B、MAPK), 并进一步促进了机体的炎症反应。本课题组近期发现, 当受到

LPS 和 poly I:C 刺激后, M $\Phi$  可通过一种 E3 泛素连接酶 Peli1 诱导下游 RIP1 的 K63 连接的泛素化, 进而激活下游的 NF- $\kappa$ B 信号通路, 并促进了促炎症基因的转录, Peli1 基因缺失可显著抑制 LPS 和 poly I:C 介导的急性炎症反应。

## 2.2 泛素化调控树突状细胞 MHC II 类分子的表达与免疫活化

树突状细胞 (dendritic cell, DC) 是一类能够识别、摄取和加工抗原并将抗原肽提呈给初始 T 细胞 (naïve T cells), 诱导 T 细胞活化、增殖的功能最强的抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC)。DC 是连接固有免疫和适应性免疫的桥梁, 是机体适应性免疫应答的始动者, 其最重要的功能就是抗原提呈和免疫激活。摄取和加工抗原肽后, DC 将抗原肽以抗原肽-主要组织相容性复合体 (peptide-major histocompatibility complex, pMHC) 的形式表达在细胞膜上, 并提呈给 CD4<sup>+</sup> 或 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 提供初始 T 细胞活化的启动信号。成熟 DC 还高表达 CD80、CD86、CD40 等共刺激分子, 为 T 细胞充分活化提供第二信号。DC 是唯一能直接激活初始 T 细胞的专职性 APC。

近年来的研究发现, 转录抑制因子 BLIMP1 (B lymphocyte induced maturation protein 1) 通过抑制 MHC II 类反式激活因子 (MHC class II transactivator, CIITA) 的转录阻断 MHC II 的表达, BLIMP1 缺陷的 DC 中 MHC II 表达增加且 CD4<sup>+</sup> T 细胞免疫增强<sup>[18]</sup>。进一步研究发现, TLR 刺激诱导 E3 泛素连接酶 Hrd1 表达, Hrd1 催化 DC 中的 BLIMP1 发生泛素化并降解, 从而促进 DC 中 MHC II 的表达。DC 特异性 Hrd1 敲除小鼠通过下调 MHC II 表达, 抑制 MOG 特异性 CD4<sup>+</sup> T 提呈, 缓解 MOG 诱导的自身免疫性疾病 EAE (experimental autoimmune encephalo-myelitis, 实验性自身免疫性脑脊髓炎) 的发展<sup>[19]</sup>。

除间接调控 MHC II 的表达, 泛素系统还可直接催化 DC 上 MHC II 类分子的  $\beta$  链胞内区 (cytoplasmic tail) 发生泛素化<sup>[20]</sup>。泛素化通过促进 MHC II 内吞 (MHC II endocytosis) 和溶酶体分选 (lysosomal sorting) 调节 MHC II 的胞内转运, 进而导致细胞表面 MHC II 表达水平的下调<sup>[21]</sup>。因而起初认为, MHC II 泛素化只是 DC 受调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 和免疫调节性细胞因子 IL-10 等的调控时, 抑制 MHC II 表达从而下调抗原提呈的一种方式<sup>[22]</sup>。体外实验发现, 在酪氨酸激酶受体 3 配体 (fms-like tyrosine kinase 3 ligand, Flt3L)

诱导产生的 BM-DCs (bone marrow-derived conventional DCs) 中抑制 MHC II 泛素化, 虽然使得细胞表面表达更高水平的 MHC II, 然而, 增加的抗原提呈并没有使抗原特异性初始  $CD4^+$  T 细胞的活化增强, 反而导致  $IFN-\gamma^+$  或  $IL-17^+CD4^+$  T 细胞比例降低以及效应性细胞因子 IL-2、 $IFN-\gamma$  和 IL-17 产生减少<sup>[23]</sup>。这表明 MHC II 泛素化对 DC 介导的 T 细胞活化十分关键。

### 2.3 泛素化调控T细胞的TCR信号转导和免疫耐受

T 细胞通过抗原识别受体 TCR (T cell receptor) 识别 DC、M $\Phi$  等 APC 或靶细胞表面提呈的 pMHC。初始 T 细胞的完全活化需要抗原刺激信号 (TCR 识别 APC 提呈的 pMHC) 和共刺激信号 (由 APC 或靶细胞与 T 细胞表面共刺激分子的相互作用)。胞外刺激信号可引起下游胞内信号通路的活化, 一般通过诱导 TCR 邻近酪氨酸激酶活化, 促进信号转导复合物组装, 活化下游 NF- $\kappa$ B、MAPK 以及钙离子等信号通路, 最终导致相应的转录因子 NF- $\kappa$ B、AP-1 以及 NFAT (nuclear factor of activated T cell) 等活化入核, 从而调控效应蛋白分子的表达, 引起细胞的增殖, 并促使 T 细胞完成活化<sup>[24]</sup>。

泛素化在 TCR 下游胞内信号转导过程中发挥重要的调节作用, 如 TCR 信号活化蛋白激酶 PKC $\theta$ , 进而诱导一个由 CARMA1、BCL-10 和 MALT1 组成的蛋白质复合体 CBM 的形成。MALT1 包含 TRAF2 和 TRAF6 的结合位点, 可将 TRAF6 招募到这个复合体上, 并通过促使其寡聚化, 诱导 TRAF6 的 E3 泛素连接酶活性<sup>[25]</sup>。据报道, TRAF6 可催化 BCL10、MALT1、NEMO 以及 TRAF6 自身等发生 K63 泛素化, 进而招募并活化 TAK1 和 IKK 复合体, 导致 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 通路活化以及随后 T 细胞增殖、存活, 并分泌细胞因子<sup>[9]</sup>。

当缺乏共刺激信号时, TCR 刺激诱导 T 细胞失能 (anergy)。多种 E3 泛素连接酶, 如 GRAIL (gene related to anergy in lymphocytes)、Cbl-b 和 Itch 等, 调节 T 细胞产生免疫耐受。GRAIL 促进  $CD4^+$  T 细胞中共刺激分子 CD40L 的泛素化及降解诱导 T 细胞失能<sup>[26]</sup>。Cbl-b 和 Itch 协同促使 TCR $\zeta$  发生 K33 连接的泛素化, 这种修饰抑制 TCR $\zeta$  的磷酸化, 从而阻断 TCR $\zeta$  与酪氨酸激酶 Zap-70 的相互作用, 最终限制 TCR 信号转导<sup>[27]</sup>。另一个 E3 泛素连接酶家族 Peli (Pellino) 的成员 Peli1 缺陷转基因小鼠 (Peli1<sup>-/-</sup>) 中, T 细胞过度活化且难以被 Treg 和转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 抑

制, 最终自发地发生自身免疫应答, 说明 Peli1 对维持外周 T 细胞耐受也有重要作用<sup>[28]</sup>。

除了通过诱导自身反应性 T 细胞失能维持外周免疫耐受 (peripheral immune tolerance) 外, 机体中还存在一种维持免疫稳态 (immune homeostasis) 的机制, 即调节性 T 细胞 (Treg) 通过抑制效应 T 细胞过度反应, 从而保护机体免受自身免疫和慢性炎症的伤害。调节性 T 细胞是  $CD4^+$  T 细胞中的一类表达 CD25 及转录因子 FoxP3 的重要细胞亚群。通过研究在 Treg 中特异性敲除 *Ube2n* 基因的小鼠 (*Ube2n*<sup>fl/fl</sup>Foxp3<sup>GFP-Cre</sup>) 发现, *Ube2n* 编码的蛋白质 Ubc13——一种 K63 特异性 E2 泛素结合酶——在 Treg 中的缺失导致 T 细胞异常活化和自身免疫应答。尽管 *Ube2n* 不影响 Treg 的存活和 Foxp3 的表达, 却显著下调 Treg 在体内的免疫抑制功能并使 Treg 获得效应 T 细胞表型。深入研究发现, Ubc13 和下游靶标 IKK 组成的信号轴 Ubc13-IKK 通过调控 Treg 特异性效应分子, 包括 IL-10 和 SOCS1, 从而维持 Treg 的稳定和免疫抑制功能<sup>[29]</sup>。

### 2.4 泛素化调控B细胞的发育和活化

哺乳动物的 B 细胞在骨髓中的发育经历祖 B 细胞 (pro-B cell)、前 B 细胞 (pre-B cell) 和未成熟 B 细胞 (immature B cell), 然后离开骨髓到外周免疫器官中经历最终的成熟。B 细胞激活因子 (B-cell-activating factor belonging to TNF family receptor, BAFF) 活化的非经典 NF- $\kappa$ B 信号通路 (non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway) 主要影响后期 B 细胞在脾脏中的发育成熟<sup>[30]</sup>。非经典 NF- $\kappa$ B 信号通路是 NF- $\kappa$ B 信号通路中一个重要分支, 参与介导了多种重要的生物学功能, 如淋巴器官发生、免疫细胞发育与分化、细胞的生长与存活等<sup>[31]</sup>。TRAF3 是非经典 NF- $\kappa$ B 信号通路中的负调控分子, 通过与 NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase) 的 N 端结构域相互作用催化 NIK 发生 K48 连接的泛素化, 并被蛋白酶体降解<sup>[32]</sup>。在 B 细胞条件性 *Traf3*<sup>-/-</sup> 小鼠中, B 细胞的增生和抗体的异常产生都是 B 细胞中 NF- $\kappa$ B 非经典信号通路过度活化的结果。

近年来的研究又揭示了 NF- $\kappa$ B 非经典信号通路中另一个关键的调控分子——OTUD7B。OTUD7B 是一种 K48 特异性去泛素化酶, 与 TRAF3 结合并介导 TRAF3 的去泛素化, 从而抑制 TRAF3 被蛋白酶体降解, 最终抑制非经典 NF- $\kappa$ B 信号通路的异常活化。在体外刺激下, *Otud7b*<sup>-/-</sup> B 细胞的增殖和存活能力显著高于野生型 (wild type, WT) 对照。体内

注射低剂量的重组 BAFF 时, *Otud7b*<sup>-/-</sup> 小鼠脾脏中 B 细胞比例显著增高, 血清中抗体浓度也随之增高, 进一步证实 OTUD7B 负向调控 B 细胞应答<sup>[33]</sup>。

受到抗原刺激时, B 细胞除分泌抗体、启动特异性体液免疫应答外, 还能提呈抗原、发挥免疫调节功能。DC 和 B 细胞都是重要的 APC, 识别、加工抗原肽并使之与 MHC II 类分子结合, 以供 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞识别。然而, 两种 APC 泛素化调控 MHC II 的机制却大为不同。DC 通过调控 MHC II 的泛素化控制抗原肽-MHC II 的胞内运输 (intracellular traffic)。在静息或未成熟 DC 中, 泛素化的 MHC II 分子靶向溶酶体, 但当病原体诱导 DC 成熟后, 泛素化被下调且 MHC II 可在成熟 DC 胞膜上积累。与之相反, B 细胞组成性泛素化其 MHC II, 且 MHC II 分子一直留在细胞表面。研究发现, DC 和 B 细胞上 MHC II 结合的泛素链长度不同: 未成熟 DC 上有 4~6 个泛素, 而 B 细胞上仅有 2~3 个。在这两种细胞上, 通过实验增加泛素链长度导致 MHC II 向溶酶体高效转运, 而带有少于 2 个泛素的 MHC II 均不会到达溶酶体<sup>[34]</sup>。因此, 泛素链长度是决定泛素化膜蛋白命运的一个重要因素。

## 2.5 泛素化调控小胶质细胞中 I 型干扰素和促炎因子的分泌

小胶质细胞 (microglial) 是中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 固有的巨噬细胞, 在维持 CNS 正常生理功能与抗感染免疫应答中发挥重要作用。研究发现, 相比于 WT 正常小鼠, E3 泛素连接酶 Peli1 敲除小鼠的小胶质细胞在 LPS 或病毒感染的刺激下, I 型干扰素 (type I interferons, IFN-I) 的表达水平急剧上升, 且激酶 TBK1 和 IKK $\epsilon$  的磷酸化水平也显著增加, 表明 Peli1 通过抑制小胶质细胞中有关 TBK1 和 IKK $\epsilon$  活化的信号通路, 从而负向调控 TLR 介导的 IFN-I 的产生<sup>[35]</sup>。同样受 TLR 配基的刺激, Peli1 敲除小鼠的外周巨噬细胞 BMDM (bone marrow derived macrophage) I 型干扰素的表达水平和野生型小鼠相比并无明显差异, 可能是因为 BMDM 还以同等水平表达 Peli1 的其他家族成员 Peli2 和 Peli3, 而小胶质细胞则主要表达 Peli1。

小胶质细胞中 Peli1 参与的另一条重要的信号通路则介导了 CNS 炎症和自身免疫应答的发生。研究表明, MyD88 依赖性 TLRs 的多种配基都能诱导小胶质细胞产生趋化因子和促炎细胞因子, 而

Peli1 的缺失严重削弱小胶质细胞中这些基因的表达。进一步研究发现, Peli1 能够诱导 c-IAP2 发生 K63 泛素化, 从而触发 c-IAP2 的泛素连接酶活性, 接着 c-IAP2 催化 TRAF3 的 K48 泛素化并降解<sup>[36]</sup>。如前所述, TRAF3 是 TRAF 蛋白家族中的特殊分子, 不仅因为它参与多条信号通路, 而且它在各条信号通路中的作用方式不尽相同, 既有正调控也有负调控功能。在 MyD88 介导的 MAPK 活化中, TRAF3 发挥负调控作用<sup>[37]</sup>。Peli1 通过间接调控 TRAF3 的降解, 调节 TLR 信号通路, 诱导小胶质细胞分泌促炎因子, 从而促进外周免疫器官的 T 细胞被招募到中枢神经系统, 并加重中枢神经系统自身免疫性炎症的发生发展<sup>[36]</sup>。

## 3 泛素化与重大疾病的发生发展

### 3.1 泛素化与自身免疫性疾病

多发性硬化症的动物疾病模型——实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 是 T 细胞介导的中枢神经系统脱髓鞘疾病。泛素化可通过介导外周免疫耐受抑制自身免疫性疾病的发生, 也能通过诱导促炎细胞因子分泌活化 T 细胞, 进而促进自身免疫应答的发生, Peli1 就是可介导这双重作用的关键分子。

Peli1 具有 K63 和 K48 泛素连接酶活性。哺乳动物 NF- $\kappa$ B 家族主要由 5 个成员组成: RelA、RelB、c-Rel、p105/p50 和 p100/p52。它们形成不同的二聚体复合物, 通过结合到增强子原件  $\kappa$ B 上, 反式激活靶基因。c-Rel 是 NF- $\kappa$ B 家族中与 T 细胞活化相关的主要成员, 可介导细胞因子的产生和 T 细胞的增殖及分化<sup>[38]</sup>。初步研究发现, *Peli1*<sup>-/-</sup> 小鼠自发地发生以多器官炎症和产生自身抗体为特征的自身免疫性疾病。将 *Peli1*<sup>-/-</sup> T 细胞转移到重组激活基因 1 (recombination-activating gene 1) 缺失 (*Rag1*<sup>-/-</sup>) 小鼠诱导的 EAE 疾病评分远高于野生型小鼠 T 细胞, 提示 Peli1 在抑制 T 细胞活化中的关键性作用。进一步研究揭示, Peli1 是通过靶向 c-Rel 的 K48 泛素化及降解从而负向调控 T 细胞活化, 抑制自身免疫的发展<sup>[28]</sup>。因此, Peli1 在维持 T 细胞外周耐受中具有关键作用。

Peli1 除通过负向调控 T 细胞活化抑制自身免疫性疾病外, 还可通过正向调控中枢神经系统中小胶质细胞的活化以促进 EAE 的发生。如前所述, Peli1 在小胶质细胞中可通过诱导 TLR 介导的 c-IAP2 发生 K63 泛素化, 触发 c-IAP2 的泛素连接酶活性, 并催化 TRAF3 的 K48 泛素化以及降解,

从而活化 MAPK 信号通路, 诱导促炎细胞因子的产生和外周淋巴器官的自身免疫性 T 细胞募集到 CNS。体内实验证实, *Pelil*<sup>-/-</sup> 小鼠经 MOG<sub>35-55</sub> 免疫诱导的 EAE 疾病严重程度显著下降。尽管 *Pelil*<sup>-/-</sup> 小鼠外周淋巴器官中促炎 T 细胞诱导增加, 但小胶质细胞分泌促炎因子的减少使得 CNS 招募外周 T 细胞能力减弱, 因此, EAE 病情减轻。

### 3.2 泛素化与感染性疾病

固有免疫系统通过一系列胚系编码的模式识别受体 (PRRs), 如 TLRs (Toll-like receptors)、RLRs (RIG-I-like receptors) 和 NLRs (NOD-like receptors) 识别微生物物种间保守的结构——病原相关分子模式 (PAMPs)。PRRs 触发的胞内信号级联反应引起转录因子的激活, 进而诱导编码促炎因子、I 型干扰素、趋化因子和抗微生物蛋白的基因表达, 不仅可直接抑制微生物感染, 而且能通过激活适应性免疫彻底消灭入侵病原体<sup>[39]</sup>。泛素化在机体启动的抗病原微生物感染的固有免疫和适应性免疫应答中均发挥关键性调控作用。

*Usp15*<sup>-/-</sup> 小鼠在单核细胞增多性李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 感染时, 脾脏中能分泌 IFN- $\gamma$  的 CD4<sup>+</sup> T 细胞的比例和数量都比野生型小鼠的更高, 而且血清 IFN- $\gamma$  浓度也显著增高, 与提高的 T 细胞应答水平一致的是, *Usp15*<sup>-/-</sup> 小鼠肝脏中细菌负荷显著下降。这些表型说明, USP15 是 T 细胞活化的负向调控因子。深入的机制研究揭示, 去泛素化酶 USP15 能稳定 E3 泛素连接酶 MDM2, 而 MDM2 靶向 T 细胞转录因子 NFATc2 的 K48 泛素化降解, 因而, USP15 的缺失间接抑制 NFATc2 的降解, 促进 T 细胞活化<sup>[40]</sup>。

体外实验发现, 在 LPS 或其他 TLR 配基刺激下, 小胶质细胞中 *Pelil* 的缺失会显著上调 IFN- $\beta$  的表达。鼻内感染血管性口炎病毒 (vascular stomatitis virus, VSV) 时, *Pelil*<sup>-/-</sup> 小鼠的 CNS 中 I 型干扰素应答水平显著提高; 此外, 脑中病毒滴度随之下降, 而小鼠生存率也明显上升。因此, 体内外实验均证实, *Pelil* 作为小胶质细胞中诱导 IFN-I 产生的负向调控因子而在 CNS 抗病毒免疫应答中发挥重要的调控作用<sup>[35]</sup>。此外, 还有研究发现, 巨噬细胞中存在与 *Pelil* 角色相似的分子——凝集素家族成员 *Siglec1*, 其在病毒感染时显著上调。深入研究揭示, *Siglec1* 通过活化 E3 泛素连接酶 TRIM27, 进而诱导 TBK1 发生 K48 泛素化及降解, 从而抑制 I 型干扰素的产生和抗病毒免疫应答<sup>[41]</sup>。

### 3.3 泛素化与抗肿瘤免疫

泛素化介导的免疫调节功能, 除了调控机体自身免疫疾病发生发展和防御病原微生物感染外, 还会对机体的抗肿瘤免疫应答产生影响。免疫效应细胞, 尤其是能够分泌 IFN- $\gamma$  的 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 细胞 (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CTL) 和 CD4<sup>+</sup> Th1 细胞 (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells) 是机体攻击肿瘤细胞的利刃。

E3 泛素连接酶 MDM2 作为癌基因产物, 介导肿瘤抑制子 p53 的泛素依赖性降解和功能失活, 在多种人类癌症中 MDM2 蛋白表达上调。然而, MDM2 还具有不依赖 p53 的功能, 调控 T 细胞活化。USP15 是 MDM2 的去泛素化酶, 在多种黑色素瘤和结直肠癌细胞系中大量表达。恶性细胞中 USP15 的下调 (knockdown) 导致 MDM2 的自发性泛素化和降解, 并伴随着 p53 及其靶基因的上调和癌细胞凋亡的增加。*Usp15*<sup>-/-</sup> 小鼠 B16 黑色素瘤体积相比 WT 小鼠显著降低, 而肿瘤部位浸润的 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> 效应 T 细胞的比例则相应地增高<sup>[40]</sup>。这表明抑制 USP15 不仅促进癌细胞凋亡, 而且促进 T 细胞介导的抗肿瘤免疫。

## 4 去泛素化作用调控炎症信号和疾病

泛素化是一个可逆反应, 可通过去泛素化酶 (deubiquitinating enzymes, DUBs) 切断泛素链并将其去除。人类基因组编码约 100 种 DUB 基因。与 E3 泛素连接酶相似的是, DUBs 在一定程度上具有底物特异性且这种特性受多种因素影响。首先, 除了催化结构域, DUBs 通常还包括不同蛋白质相互作用结构域, 使其得以结合特定靶蛋白; 第二, 一些 DUBs 对特定泛素分支, 如 K48 或 K63 连接的泛素链具有偏好性, 因此可通过靶蛋白和泛素连接方式的组合特异性决定 DUBs 识别的底物; 第三, DUBs 的表达方式和亚细胞定位变化极大, 这赋予了它们在体内复杂的功能<sup>[42]</sup>。多种 E3 泛素连接酶与免疫功能紧密相连, 包括淋巴细胞发育及活化、免疫耐受形成和固有免疫功能调控等, 尤其是 K63 连接的泛素化是活化 NF- $\kappa$ B 信号通路的重要分子机制。

A20 是一个含有锌指结构域蛋白, 对终止固有免疫受体, 如 TNFR、TLRs 和胞内模式识别分子 NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain protein2) 介导的 NF- $\kappa$ B 活化信号是必需的。A20 的 N 端包含一个 OUT (ovarian tumour related proteases) 结构域, 该结构域对多种 NF- $\kappa$ B 信号因子, 包括

TRAF6、RIP1、RIP2 和 IKK $\gamma$  具有 DUB 活性<sup>[43]</sup>。然而, 近期有一项研究发现, 缺乏 A20 去泛素酶活性的 knock-in 小鼠 (103 位半胱氨酸点突变为丙氨酸, C103A) 可正常发育, 未见自发炎症, 免疫系统中的 T 细胞、B 细胞、树突状细胞和髓系细胞的发育与分化都较正常。进一步分析发现, 野生型和纯合突变体的 BMDMs 对 LPS 和 TNF 的刺激都能正常应答, 且 NF- $\kappa$ B 通路的活化相似, 说明 A20 的去泛素化酶活性不是 NF- $\kappa$ B 正常活化所必需<sup>[44]</sup>, 提示 A20 并不直接抑制 NF- $\kappa$ B 信号转导。

CYLD 最初被认为是一个肿瘤抑制因子, 因为患有毛囊癌 (圆柱瘤) 的患者中 CYLD 常发生突变, 突变经常发生于 CYLD 蛋白的 C 端, 该端包含一个 DUB 结构域。后来功能蛋白质组学揭示, CYLD 的 DUB 功能与调控 NF- $\kappa$ B 活化的信号转导相关<sup>[45]</sup>。CYLD 调控多种生物学功能, 包括机体防御感染、免疫细胞发育、活化及炎症、细胞存活、增殖和肿瘤发生等。近来研究表明, USP 家族成员 USP15 也在调控 NF- $\kappa$ B 活化中发挥作用, 不同于 A20 和 CYLD 靶向 NF- $\kappa$ B 通路上游信号分子, USP15 负向调控 I $\kappa$ B $\alpha$  的 K48 连接的泛素化<sup>[46]</sup>。I $\kappa$ B $\alpha$  的泛素化是 NF- $\kappa$ B 信号通路中一个关键的步骤, 触发 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白水解和 NF- $\kappa$ B 核转位<sup>[47]</sup>。

## 5 总结与展望

泛素化作为一种蛋白质翻译后修饰的方式, 通过调节蛋白质降解、信号通路转导等生物学过程, 对免疫细胞的功能和机体重大疾病的防治都有着深刻的影响。尽管泛素化调控炎症信号研究领域目前已取得较快的发展, 多种泛素系统的新成员被发现, 新机制被揭示, 但仍有许多重要的科学问题尚待回答, 如 E2 和 E3 是如何识别彼此、如何选择底物、如何催化特定类型的泛素链形成的等。此外, 关于 DUB 与泛素连接酶的功能又是如何协调, 使得细胞正常发挥功能的机制仍然所知甚少。未来的研究应继续鉴别调控免疫信号应答的关键性泛素修饰酶, 并揭示其调控的分子机制, 为理解人类重大疾病的发生发展提供新思路, 并为疾病的诊断与治疗提供新策略。

### [参 考 文 献]

- [1] Wilkinson KD. The discovery of ubiquitin-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 15280-2
- [2] Hershko A, Heller H, Elias S, et al. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem*, 1983, 258: 8206-14
- [3] Zinngrebe J, Montinaro A, Peltzer N, et al. Ubiquitin in the immune system. *EMBO Rep*, 2014, 15: 28-45
- [4] Wickliffe KE, Lorenz S, Wemmer DE, et al. The mechanism of linkage-specific ubiquitin chain elongation by a single-subunit E2. *Cell*, 2011, 144: 769-81
- [5] Ye Y, Rape M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 755-64
- [6] Yamamoto M, Okamoto T, Takeda K, et al. Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat Immunol*, 2006, 7: 962-70
- [7] Deshaies RJ, Joazeiro CA. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem*, 2009, 78: 399-434
- [8] Hochrainer K, Lipp J. Ubiquitylation within signaling pathways in- and outside of inflammation. *Thromb Haemost*, 2007, 97: 370-7
- [9] Malynn BA, Ma A. Ubiquitin makes its mark on immune regulation. *Immunity*, 2010, 33: 843-52
- [10] Shimizu Y, Taraborrelli L, Walczak H. Linear ubiquitination in immunity. *Immunol Rev*, 2015, 266: 190-207
- [11] Liu YC, Penninger J, Karin M. Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5: 941-52
- [12] Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18: 621-63
- [13] Chen ZJ, Sun LJ. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell*, 2009, 33: 275-86
- [14] Subramanian K, Du R, Tan NS, et al. CD163 and IgG codepend against cytotoxic hemoglobin via autocrine and paracrine mechanisms. *J Immunol*, 2013, 190: 5267-78
- [15] Chang SC, Ding JL. Ubiquitination by SAG regulates macrophage survival/death and immune response during infection. *Cell Death Differ*, 2014, 21: 1388-98
- [16] Manzanillo PS, Ayres JS, Watson RO, et al. The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens. *Nature*, 2013, 501: 512-6
- [17] Shi CS, Kehrl JH. TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy. *Sci Signal*, 2010, 3: ra42
- [18] Kim SJ, Gregersen PK, Diamond B. Regulation of dendritic cell activation by microRNA let-7c and BLIMP1. *J Clin Invest*, 2013, 123: 823-33
- [19] Yang H, Qiu Q, Gao B, et al. Hrd1-mediated BLIMP-1 ubiquitination promotes dendritic cell MHCII expression for CD4<sup>+</sup> T cell priming during inflammation. *J Exp Med*, 2014, 211: 2467-79
- [20] Shin JS, Ebersold M, Pypaert M, et al. Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature*, 2006, 444: 115-8
- [21] Oh J, Shin JS. Molecular mechanism and cellular function of MHCII ubiquitination. *Immunol Rev*, 2015, 266: 134-44
- [22] Chattopadhyay G, Shevach EM. Antigen-specific induced T regulatory cells impair dendritic cell function via an IL-

- 10/MARCH1-dependent mechanism. *J Immunol*, 2013, 191: 5875-84
- [23] Ishikawa R, Kajikawa M, Ishido S. Loss of MHC II ubiquitination inhibits the activation and differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells. *Int Immunol*, 2014, 26: 283-9
- [24] Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 591-619
- [25] Bhoj VG, Chen ZJ. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature*, 2009, 458: 430-7
- [26] Lineberry NB, Su LL, Lin JT, et al. Cutting Edge: the transmembrane E3 ligase GRAIL ubiquitinates the costimulatory molecule CD40 ligand during the induction of T cell anergy. *J Immunol*, 2008, 181: 1622-6
- [27] Huang H, Jeon MS, Liao L, et al. K33-linked polyubiquitination of T cell receptor- $\zeta$  regulates proteolysis-independent T cell signaling. *Immunity*, 2010, 33: 60-70
- [28] Chang M, Jin W, Chang JH, et al. The ubiquitin ligase Peli1 negatively regulates T cell activation and prevents autoimmunity. *Nat Immunol*, 2011, 12: 1002-9
- [29] Chang JH, Xiao Y, Hu H, et al. Ubc13 maintains the suppressive function of regulatory T cells and prevents their conversion into effector-like T cells. *Nat Immunol*, 2012, 13: 481-90
- [30] Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF- $\kappa$ B transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 693-733
- [31] Sun SC. Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cell Res*, 2011, 21: 71-85
- [32] Liao G, Zhang M, Sun SC. Regulation of the NF- $\kappa$ B-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J Biol Chem*, 2004, 279: 26243-50
- [33] Hu H, Brittain GC, Chang JH, et al. OTUD7B controls non-canonical NF- $\kappa$ B activation through deubiquitination of TRAF3. *Nature*, 2013, 494: 371-4
- [34] Ma JK, Platt MY, Eastham-Anderson J, et al. MHC class II distribution in dendritic cells and B cells is determined by ubiquitin chain length. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 8820-7
- [35] Xiao Y, Jin J, Zou Q, et al. Peli1 negatively regulates type I interferon induction and antiviral immunity in the CNS. *Cell Biosci*, 2015, 5: 34
- [36] Xiao Y, Jin J, Chang M, et al. Peli1 promotes microglia-mediated CNS inflammation by regulating Traf3 degradation. *Nat Med*, 2013, 19: 595-602
- [37] Hacker H, Tseng PH, Karin M. Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11: 457-68
- [38] Hilliard BA, Mason N, Xu L, et al. Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation. *J Clin Invest*, 2002, 110: 843-50
- [39] Jiang X, Chen ZJ. The role of ubiquitylation in immune defence and pathogen evasion. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12: 35-48
- [40] Zou Q, Jin J, Hu H, et al. USP15 stabilizes MDM2 to mediate cancer-cell survival and inhibit antitumor T cell responses. *Nat Immunol*, 2014, 15: 562-70
- [41] Zheng Q, Hou J, Zhou Y, et al. Siglec1 suppresses antiviral innate immune response by inducing TBK1 degradation via the ubiquitin ligase TRIM27. *Cell Res*, 2015, 25: 1121-36
- [42] Sun SC. Deubiquitylation and regulation of the immune response. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8: 501-11
- [43] Lin SC, Chung JY, Lamothe B, et al. Molecular basis for the unique deubiquitinating activity of the NF- $\kappa$ B inhibitor A20. *J Mol Biol*, 2008, 376: 526-40
- [44] De A, Dainichi T, Rathinam CV, et al. The deubiquitinase activity of A20 is dispensable for NF- $\kappa$ B signaling. *EMBO Rep*, 2014, 15: 775-83
- [45] Brummelkamp TR, Nijman SM, Dirac AM, et al. Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF- $\kappa$ B. *Nature*, 2003, 424: 797-801
- [46] Schweitzer K, Bozko PM, Dubiel W, et al. CSN controls NF- $\kappa$ B by deubiquitylation of I $\kappa$ B $\alpha$ . *EMBO J*, 2007, 26: 1532-41
- [47] Lu X, Yarbrough WG. Negative regulation of RelA phosphorylation: emerging players and their roles in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015, 26: 7-13