

DOI: 10.13376/j.cbls/2022113

文章编号: 1004-0374(2022)08-1018-09

泛素特异性蛋白酶2的生理功能及调控机制

马天天^{1,2}, 马白荣^{1,2}, 靳亚平^{1,2}, 陈华涛^{1,2*}

(1 西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100; 2 西北农林科技大学农业农村部动物生物技术重点实验室, 杨凌 712100)

摘要: 泛素特异性蛋白酶 2 (ubiquitin specific peptidase 2, USP2) 是去泛素化酶家族 (deubiquitylating enzymes, DUBs) 的重要成员, 通过特异性去除靶蛋白的泛素化修饰, 阻碍靶蛋白的降解, 从而调控机体各项生理过程。USP2 通过可变剪切产生 USP2-45 和 USP2-69, 这两种变体在各种生理过程中发挥的作用不尽相同。该文详细梳理了 USP2-45 和 USP2-69 在肿瘤发生、葡萄糖代谢、神经性疾病、骨骼肌分化、细胞凋亡以及雄性生殖等多种病理/生理过程中的作用, 并进一步探讨了 USP2 与生物钟系统之间的互作机制, 为深入解析 USP2 的生理功能以及生物钟调控 *Usp2* 转录的分子机制提供参考借鉴。

关键词: 泛素特异性蛋白酶 2; 选择性剪切; 去泛素化; 生物钟

中图分类号: Q291 **文献标志码:** A

Physiological functions and regulatory mechanisms of ubiquitin specific protease 2

MA Tian-Tian^{1,2}, MA Bai-Rong^{1,2}, JIN Ya-Ping^{1,2}, CHEN Hua-Tao^{1,2*}

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest Agriculture & Forestry University, Yangling 712100, China;

2 Key Laboratory of Animal Biotechnology of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Northwest Agriculture & Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract: Ubiquitin specific peptidase 2 (USP2) is an important member of deubiquitylating enzymes (DUBs) family. USP2 impedes the degradation of its target proteins by specifically removing the ubiquitin modification, thereby regulating various physiological processes of living organisms. There are two main variants of USP2 formed by alternative splicing, namely USP2-45 and USP2-69, which play different roles in various physiological processes. This article summarizes the roles of USP2-45 and USP2-69 in diverse pathological/physiological processes, including tumorigenesis, glucose metabolism, neurological diseases, skeletal muscle differentiation, cell apoptosis, and male reproduction. In addition, the interaction mechanisms between USP2 and circadian clock system are further discussed. Collectively, this paper provides a reference for in-depth analysis of the physiological functions of USP2 and the molecular mechanisms on circadian clock regulating *Usp2* transcription.

Key words: ubiquitin specific protease 2; alternative splicing; deubiquitinating; circadian clock

泛素化是蛋白质翻译后修饰的一种重要调控机制, 参与调节蛋白质的稳定性^[1]和亚细胞定位^[2], 在蛋白酶体介导的蛋白质降解过程中发挥重要作用。蛋白质泛素化修饰可在去泛素化酶家族 (deubiquitylating enzymes, DUBs) 的作用下发生逆转, 即去泛素化。去泛素化修饰对维持细胞内稳态至关重要 (图 1)。泛素特异性蛋白酶 2 (ubiquitin specific peptidase 2, USP2) 作为 DUBs 的重要成员,

通过特异性识别泛素化修饰的靶蛋白使其去泛素化, 从而阻碍靶蛋白降解^[3]。USP2 作为 DUBs 家

收稿日期: 2021-12-08; 修回日期: 2022-01-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31771301, 31602125); 中国博士后科学基金项目 (2018T111112, 2017M610658)

*通信作者: E-mail: htchen@nwfufu.edu.cn; chtchjcht@163.com

族的重要一员, 在昼夜节律维持、细胞凋亡、雄性生殖、肿瘤的发生与转移以及能量代谢等过程中均发挥重要调控作用^[4-5]。本文对 USP2 在各项病理/生理过程中的作用机制及其与生物钟的互作机制进行了详细阐述, 为进一步深入解析 USP2 的生理功能以及生物钟调控 *Usp2* 转录的分子机制提供参考借鉴。

1 USP2的功能和结构特征

蛋白质的泛素化和去泛素化是调控靶蛋白稳定性的可逆过程。DUBs 可分为半胱氨酸蛋白酶家族和金属蛋白酶家族。其中, 半胱氨酸蛋白酶家族包括泛素特异型加工蛋白酶家族 (USPs)、泛素羧基末端水解酶家族 (UCHs)、Machado-Josephin 结构域蛋白酶 (MJDS) 和卵巢肿瘤相关蛋白酶 (OUT)^[6]。金属蛋白酶家族包含 MPN(+)/JAMM 蛋白酶。USPs 是 DUBs 中数量最多的家族, 主要通过水解泛素羧基末端的酯键、肽键或异肽键, 特异性地将已泛素化修饰的蛋白质去泛素化^[7]。USP2 是 USPs 的重要成员, 1997年首次在鸡肌中被发现并命名为 UBP41^[8], 并于 2000 年被证明表达于小鼠睾丸组织^[9]。人 *Usp2* 位于染色体 11q23.3, 小鼠 *Usp2* 位于染色体 9A5.1。小鼠 *Usp2* 通过选择性剪切产生 9 个转录本, 其中 7 个转录本可以编码蛋白质^[10]。

选择性剪切, 也被称为可变剪切, 指由基因转录后得到的前体 mRNA 以不同外显子排列方式剪切, 拼接产生多个成熟 mRNA 并进而产生不同结构和功能蛋白变体的过程^[11-12]。选择性剪切大体可分为五类, 即外显子跳跃、内含子保留、可变 3' 或 5' 剪切位点、外显子互斥、可变启动子 (图 2)。前四种是由基因转录为前体 mRNA, 并经过相应的可变剪切而形成; 而可变启动子是由于启动子不同, 导致转录产生的 mRNA 在第一个外显子存在差异。选择性剪切在多细胞生物蛋白质组和生物功能多样性方面发挥着重要作用^[13]。生物钟、营养和激素对特定信号分子或细胞因子的调节均可影响 *Usp2* 的选择性剪接^[14]。小鼠 *Usp2* 通过选择性剪切产生以下两种主要转录本: *Usp2-69* (*Usp2a*) mRNA, 由 13 个外显子组成, 包含 3 867 个碱基, 可编码 619 个氨基酸, 即 USP2-69, 是 USP2 最长的蛋白质亚型; *Usp2-45* (*Usp2b*) mRNA, 由 12 个外显子组成, 包含 2 057 个碱基, 可编码 396 个氨基酸, 即 USP2-45。在基因外显子结构上, *Usp2-45* 与 *Usp2-69* 在 3' 端的 11 个外显子序列完全一致, 而在 5' 端的外显

子序列存在差异, 这两种变体结构符合可变剪切中可变启动子特征 (图 3)。*Usp2-45* 和 *Usp2-69* 编码的蛋白质亚型在 N 端的长度和氨基酸组成上存在差异, 但它们的 C 端结构完全相同, 均含有催化活性所需的 Cys 和 His 残基^[10]。

2 USP2的生理功能

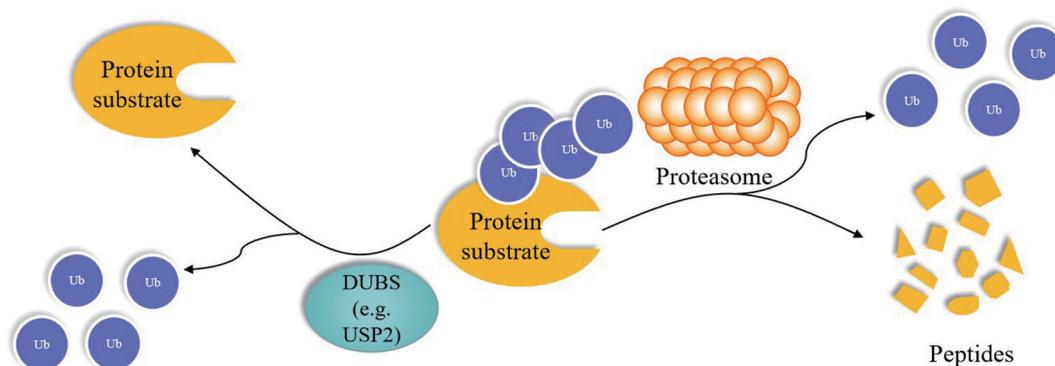
2.1 USP2在肿瘤发生与转移中的作用

越来越多的研究证据表明, USP2 参与调控肿瘤的发生与转移^[15]。USP2-69 过表达于膀胱癌细胞中, 可显著促进肿瘤的增殖、侵袭、迁移以及化疗的耐药性^[16]。脂肪酸合酶 (fatty acid synthase, FASN) 作为 USP2-69 的底物, 在癌细胞中的过表达可显著抑制癌细胞凋亡。研究发现, USP2-69 可通过影响前列腺癌细胞^[17]、肝癌细胞^[18] 和神经胶质瘤^[19] 中 FASN 的泛素-蛋白酶体降解途径, 稳定 FASN, 从而维持肿瘤细胞的存活。此外, Zhao 等^[20] 研究发现, USP2-69 通过 TGF- β 信号通路促进肿瘤的转移, 表明 USP2-69 可作为防治肿瘤转移的靶点。

肿瘤抑制因子 p53 是 USP2 的另一个底物蛋白, p53 功能丧失是目前肿瘤发生的常见事件之一^[21]。在细胞应激或 DNA 损伤的情况下, p53 在细胞中积累可引发各种抗肿瘤反应, 如 DNA 修复、诱导细胞凋亡或细胞周期停滞等^[22-23]。USP2-69 通过去泛素化途径, 提高瘦素刺激后肝癌细胞系 (HepG2) 和乳腺癌细胞系 (MCF7) 中的 p53 水平^[24]。此外, USP2-69 也可通过去泛素化修饰肺癌细胞 (H1299) 和睾丸癌细胞 (NTERA-2) 中 p53 的抑制因子 MDM2^[15]、MDMX (也称为 MDM4)^[25-26], 增加 MDM2 和 MDMX 的积累水平, 从而降低 p53 在肿瘤中的积累, 提高顺铂处理后肿瘤细胞的生存率。上述证据说明, USP2-69 在肿瘤细胞中对 p53 的影响具有细胞系特异性。

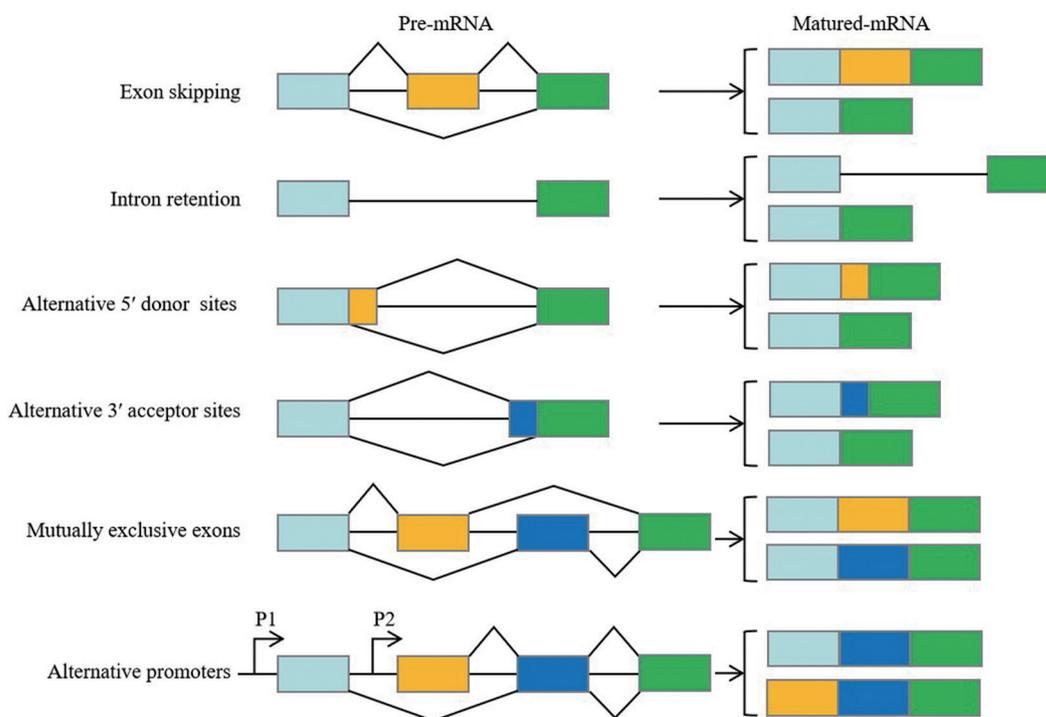
2.2 USP2在糖脂代谢中的作用

诸多证据表明, FASN 是哺乳动物机体在多种病理生理条件下能量代谢的关键调节酶。USP2-69 对癌细胞内的 FASN 存在翻译后调控, 提示 USP2 在能量代谢过程中也发挥着重要作用^[17]。肝脏是脂质代谢的主要器官, 其可将甘油三酯合成低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 并释放到循环系统中, 而 LDL 受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 可识别载脂蛋白以吸收 LDL。LDLR 可被 E3-泛素酶-LDLR 的诱导降解物 (LDOL) 泛素化修饰, 并由泛素-蛋白酶体途径降解^[27]。USP2-69 和



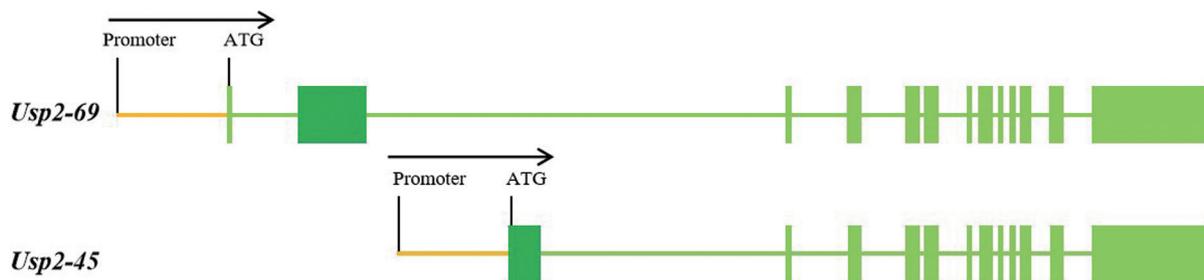
Ub: 泛素小分子; Protein substrate: 蛋白质底物; DUBs: 去泛素化酶家族; USP2: 泛素特异性蛋白酶2; Proteasome: 蛋白酶。

图1 蛋白质的泛素化和去泛素化过程



Pre-mRNA: 前体mRNA; Matured-mRNA: 成熟mRNA; Exon-skipping: 外显子跨越; Intron retention: 内含子保留; Alternative 5' donor sites: 可变5'供体位点; Alternative 3' acceptor sites: 可变3'受体位点; Mutually exclusive exons: 外显子互斥; Alternative promoters: 可变启动子。

图2 选择性剪切的类型



Promoter: 启动子; ATG: 起始密码子。

图3 可变启动子产生Usp2-45、Usp2-69两种变体

USP2-45 均能去泛素化并稳定 LDOL 促进 LDLR 的降解, 以抑制肝脏对 LDL 的吸收^[1]。同时, USP2-69 和 USP2-45 对 LDLR 也存在更强的去泛素化作用, 从而促进肝细胞对 LDL 的吸收。

研究表明, 肝脏生物钟可从多种层面参与调控肝脏能量代谢。作为重要的生物钟控制基因, *Usp2* 在受生物钟系统调控的同时也受营养刺激物的影响^[28]。在空腹条件下, 肝糖异生是维持血糖水平所必需的。胰高血糖素和肾上腺皮质激素可通过激活肝脏糖异生酶, 如磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 和葡萄糖-6-磷酸酶 (G-6-Pase) 的表达提高血糖水平^[29-30]。利用氢化可的松处理原代肝细胞, *Usp2-45* mRNA 的表达水平显著升高, 氢化可的松与胰高血糖素联合处理, *Usp2-45* mRNA 的表达量进一步升高。添加胰岛素后, *Usp2-45* mRNA 的表达水平显著下降。利用尾静脉注射腺病毒方法过表达 USP2-45, 小鼠肝脏血糖、血清胰岛素含量以及 PEPCK 活性明显增加。而干扰小鼠肝脏中 *Usp2-45* 的表达, 小鼠出现低血糖反应, 且其血糖水平节律性波动消失。此外, 高脂饲喂 USP2-45 过表达小鼠, 加剧小鼠胰岛素抵抗和葡萄糖不耐受。*Usp2-45* 敲除可显著缓解小鼠胰岛素抵抗和葡萄糖不耐受反应。进一步研究发现, USP2-45 可使 C/EBP α 去泛素化, 上调肝细胞中皮质醇合成酶 HSD1 的表达, 诱导糖异生基因的表达和糖皮质激素信号的转导, 从而维持肝脏正常糖异生水平^[28]。上述研究证据提示, *Usp2-45* 可能是连接生物钟系统与糖脂代谢的重要枢纽。

2.3 USP2对神经系统的调控

泛素化、去泛素化修饰与多种行为及神经精神性疾病相关, 如双相障碍^[31-32]、神经发育障碍^[31, 33-34]和帕金森综合征^[35]等。Lein 等^[36]在 Allen 小鼠脑图谱库中分析小鼠大脑组织基因表达图谱, 发现 *Usp2* 在脑区的广泛性表达。而 *Usp2*^{-/-} 小鼠表现为运动协调和平衡受损、焦虑类行为减少、工作记忆和感觉运动门控缺陷等症状^[37]。同时, 有研究证据进一步表明, USP2 对神经系统存在调控作用, USP2 可通过调节生物钟核心转录因子 BMAL1 的稳定性来影响哺乳动物中枢生物钟下丘脑视交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN), 引起其神经内分泌活性的改变^[38]。微阵列数据显示, 低血糖小鼠的下丘脑和大脑皮层的 *Usp2* mRNA 表达量显著升高^[39]。由于大脑主要以葡萄糖作为能量底物^[40], 故猜测 USP2 可能在低血糖状态下对小鼠起到神经

保护作用。

众所周知, 压力会引起认知和情感缺陷^[41], 而应激性认知缺陷可归因于海马通道或受体的功能障碍^[41-42]。Li 等^[43]研究发现, 小鼠的急性应激会导致认知功能衰竭, 并伴随着海马区域的 AMPA 受体表达量下降, 以及过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α)、 β -连环蛋白 (β -catenin)、E4 启动子结合蛋白 4 (E4BP4) 和 USP2 的表达量显著降低。研究表明 PGC1- α 、 β -连环蛋白和 E4BP4 是 USP2 的上游调控因子, 应激诱导的 PGC1- α 、 β -连环蛋白和 E4BP4 表达量下降可减少海马区 USP2 积累。作为一种可恢复应激导致认知缺陷障碍的临床药物, 瑞替加滨 (retigabine) 可恢复 PGC1- α 、 β -连环蛋白、E4BP4 和 USP2 的正常表达, 缓解磷酸化 mTOR 和自噬组分的增加^[44]。据此, 推测 USP2 的缺失导致 AMPA 受体异常表达和 mTOR 诱发的自噬增强, 从而损害记忆检索系统。

2.4 USP2对肌肉组织的调控

USP2-69 和 USP2-45 在大鼠 L6 肌细胞中表达存在差异, Park 等^[45]进一步发现了 USP2 在骨骼肌分化中的作用。USP2-69 在分化的早期暂时增加, 而 USP2-45 的蛋白质表达在分化期逐渐升高, USP2-69 的组成性表达促进肌球细胞融合, 诱导肌球蛋白重链的积累, 从而促进骨骼肌的分化, 而 USP2-45 的过表达抑制肌管样分化。上述结果表明, USP2 在肌肉发育中存在潜在调控作用^[45]。然而, *Usp2* 的敲除并没有导致小鼠骨骼肌发育表型异常, 这表明 *Usp2* 不是体内胚胎肌肉发育的关键基因^[45]。因此, USP2 影响肌肉发育的调控机制尚需进一步的研究, 以期阐明 USP2 在肌肉重塑的具体作用^[46]。

研究发现, *Usp2* 敲除导致小鼠 C2C12 肌母细胞增殖和分化缺陷^[47]。在 *Usp2* 缺失的成肌细胞中, 氧消耗和细胞内 ATP 显著减少, *Usp2* 敲除的 C2C12 成肌细胞也表现出线粒体碎片的增加, 同时伴有活性氧 (ROS) 的积累^[47]。USP2 的小分子抑制剂能引起细胞周期停滞、细胞周期蛋白 D1 降解和抑制同源重组介导的 DNA 修复^[4, 48]。作为 USP2 小分子抑制剂的一种, ML364 刺激 C2C12 成肌细胞, 也会引起 ROS 诱导线粒体损伤, 细胞内 ATP 减少^[4]。因此, USP2 是保护成肌细胞线粒体对抗 ROS 的重要因子, 但其内在分子机制仍需进一步探究^[47]。

2.5 USP2在细胞凋亡过程中的作用

过表达 UBP41 (据氨基酸序列推断其为 USP2-

45) 可使其特定底物去泛素化, 从而显著诱导 HeLa 细胞凋亡; 然而, 过表达已突变且无酶活性的 UBP41 未能引起 HeLa 细胞凋亡的发生; 该研究首次证实了 USP2-45 的促凋亡功能^[49]。另外, Haimerl 等^[50] 研究证明, 作为肝脏中的主要蛋白质亚型, USP2-45 参与促进肿瘤坏死因子 TNF- α 诱导的肝细胞凋亡。低剂量 TNF- α 可引起肝细胞 TNF 抵抗, 并导致 USP2-45 显著下调, USP2-45 的过表达可减少 TNF 抵抗, 提高 TNF- α 引起的细胞凋亡, 说明 TNF- α 诱导的 USP2-45 下调是肝细胞的一种有效的细胞保护机制。该研究为应用 USP2-45 特异性抑制剂治疗细胞凋亡引起的肝损伤提供了一种新思路。与之相反, Tao 等^[19] 研究发现, *Usp2-69* 的干扰显著增加了前列腺癌细胞系、结肠癌细胞系、乳腺癌细胞系和肉瘤细胞系的凋亡率, 表明 *Usp2-69* 具有抗凋亡功能。

2.6 USP2对雄性生殖功能的调控

Usp2 表达于哺乳动物睾丸组织中, 在精子发育过程中发挥重要作用^[51-52]。Bedard 等^[51] 研究发现, *Usp2*^{-/-} 小鼠附睾精子的数量和形态与野生型 (wild type, WT) 小鼠无明显差异, 但由于其睾丸中细长精子和附睾中多核体的异常聚集, 导致 *Usp2*^{-/-} 小鼠表现出严重的生殖障碍。相较于 WT 小鼠, *Usp2*^{-/-} 小鼠体外受精率明显下降。*Usp2*^{-/-} 小鼠精子在 M199 培养基中表现为与 WT 小鼠一致的高活性运动, 而在 PBS 缓冲液中则完全失去运动能力, 表明 USP2 可使精子在营养和离子供应不足的情况下维持运动, 以保证精子的正常受精能力。

3 USP2与哺乳动物生物钟系统的互作

哺乳动物的大量行为活动和生理功能都遵从一定的昼夜变化规律, 而这种昼夜节律性变化是由内源性生物钟控制的^[53-54]。生物钟节律性振荡是由生物钟核心基因及其编码蛋白组成的正负反馈转录、翻译环路相互作用形成^[55]。同时, 生物钟系统通过一些关键的顺式作用元件 E-box (5'-CACGTG-3') 或 E'-box (5'-CACGTT-3') 调控大量下游钟控基因的节律性表达。USP2 作为重要的去泛素化酶, 其通过翻译后修饰参与调控机体多项生理过程^[56-57]。研究表明, USP2 与生物钟系统存在相互调控作用: 一方面, *Usp2* 的表达受生物钟系统调控^[38], 另一方面, USP2 参与的泛素-蛋白酶体途径对核心生物钟蛋白存在翻译后调控作用, 在维持生物钟系统的正常运行过程中发挥着重要作用^[2, 58-59]。

3.1 哺乳动物生物钟调控*Usp2*的节律性表达

研究表明, 哺乳动物生物钟调控 *Usp2* 的节律性表达^[60]。早在 2002 年, Panda 等^[61] 利用基因芯片技术在小鼠肝脏和 SCN 组织中发现, *Usp2* 的表达在小鼠肝脏中存在节律性变化, 在 SCN 中却未检测到节律性变化。另一项研究用 qPCR 和原位杂交技术检测却发现, *Usp2* 不仅节律性表达于小鼠肝脏中, 也节律性表达于小鼠 SCN 组织, 且 *Clock* 基因敲除小鼠肝脏中 *Usp2* 表达失去节律性变化, 提示生物钟系统可能参与调控 *Usp2* 的节律性表达^[57]。上述研究结果的不一致可能是由于采用的检测技术灵敏度不同所导致的。Zhang 等^[62] 通过对小鼠 12 个器官进行转录组检测分析, 发现仅 10 个基因共同存在节律性表达, 而 *Usp2* 便是其中之一。众所周知, 大部分生物钟控制基因具有组织特异性, 仅少部分基因在多种器官组织中同时存在节律性表达, 这部分基因大多为核心生物钟控制基因^[63-65]。据此推测, *Usp2* 可能为核心钟控基因。

Molusky 等^[28] 进一步研究发现, 小鼠肝脏中存在 *Usp2-45*、*Usp2-69* 两种主要转录本。该项研究以 *Usp2-69* 和 *Usp2-45* 的 mRNA 为模板设计特异性引物, 利用 qPCR 检测不同时间点小鼠肝脏组织中两种转录本 mRNA 的表达变化。结果表明, 小鼠肝脏中 *Usp2-45* 的 mRNA 存在节律性表达, 但 *Usp2-69* mRNA 的表达无明显节律性变化。*Usp2-45* 的 mRNA 表达量从 ZT0 至 ZT9 逐渐增加, 在 ZT9 时达到峰值。紧接着, *Usp2-45* 的 mRNA 表达量从 ZT9 至 ZT21 逐渐下降。同时, 生物钟核心基因 *Bmal1* 的 mRNA 表达量在 ZT0 至 ZT9 时期逐渐下降, 在 ZT12 至 ZT21 时期逐渐上升。*Bmal1* mRNA 的表达变化与 *Usp2-45* mRNA 的表达变化相位完全相反。小鼠肝脏 *Bmal1* 特异性敲除后, *Usp2-45* 的 mRNA 表达几乎完全丧失节律性变化, 进一步提示生物钟对 *Usp2-45* 的节律性表达存在重要调控作用。Molusky 等^[44] 构建了 *Usp2-45* 启动子荧光素酶报告载体, 通过双荧光素酶报告实验, 进一步从分子层面证实 BMAL1 对 *Usp2-45* 转录本启动子存在正向调控作用。然而, 生物钟对 *Usp2-45*、*Usp2-69* 两个转录本的选择性调控以及调控 *Usp2-45* 节律性表达的分子机制尚未完全阐明, 亟需进一步的深入研究。

Pouly 等^[66] 通过采集 ZT2、ZT6、ZT10、ZT14、ZT18、ZT22 六个时间点的小鼠肾脏样品检测 USP2-45 的表达, 结果发现, USP2-45 在小鼠肾脏组织中同样存在节律性变化。肾脏组织中 USP2-45

的表达在 ZT2 至 ZT14 时期持续增加, 在 ZT14 时表达量达到峰值。随后, USP2-45 的表达量从 ZT14 到 ZT22 逐渐下降。该研究证明肾脏生物钟系统同样对 USP2-45 表达变化具有节律性调控作用^[66]。该团队进一步研究发现, *Usp2-45* 的 mRNA 及蛋白质在 WT 小鼠小肠组织中也存在相似相位的节律性表达, 而 *Cry1/Cry2* 双基因敲除使 *Usp2-45* mRNA 及蛋白质表达的节律性显著降低^[56]。以上研究进一步证明生物钟系统调控 *Usp2-45* 的节律性表达, 但具体的分子机制尚需进一步的深入探究。

3.2 USP2对生物钟蛋白的翻译后调控

生物钟的分子机制是基于核心生物钟基因构成的转录、翻译反馈回路以及生物钟蛋白的翻译后修饰而形成的^[55]。翻译后修饰, 如泛素化, 在生物钟负反馈调控机制中发挥重要作用^[67]。生物钟蛋白的半衰期很短, 这是它们维持生物钟节律性振荡所必备的特征, 而泛素-蛋白酶体系统在这些蛋白质的快速转换中发挥重要调控作用^[68]。在此过程中, 泛素与泛素激活酶 (E1s)、泛素结合酶 (E2s) 和泛素蛋白连接酶 (E3s) 逐一结合后与底物蛋白结合, 从而实现底物蛋白的泛素化。蛋白酶体识别已泛素化蛋白并将其降解。去泛素化酶通过去除已泛素化蛋白的泛素小分子, 逆转蛋白质的泛素化降解。

作为一种重要的去泛素化酶, USP2 节律性表达于哺乳动物绝大多数器官中^[62]。诸多证据表明, USP2 可调控哺乳动物生物钟系统。哺乳动物可根据光照强度调整昼夜节律活动。将 *Usp2^{-/-}* 小鼠及其 WT 对照组小鼠置于低辐照强度 (5~20 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) 的恒定光照下, 与 WT 小鼠相比, *Usp2^{-/-}* 小鼠的活动期出现明显的延迟, 表明 *Usp2^{-/-}* 小鼠对低辐照性光的敏感性较高。进一步研究发现, USP2 靶向作用于 BMAL1, 从而延长 BMAL1 的半衰期。在生物钟系统中, 生物钟蛋白的快速周转是维持昼夜节律性振荡的必备特征, *Usp2^{-/-}* 小鼠中 BMAL1 半衰期缩短, 蛋白质周转速度加快, 可能是 *Usp2^{-/-}* 小鼠对低辐照敏感的内在机制^[38]。与之不同的是, Yang 等^[69]发现 *Usp2^{-/-}* 小鼠较 WT 小鼠需要更长的时间调整昼夜节律以适应光暗周期的变化, 表明 USP2 参与了 SCN 中光依赖性信号通路。由此推测, 这两个研究结果完全相反的原因可能是对 *Usp2* 中不同部位的碱基序列进行了敲除或突变。Scoma 等^[38]所使用的 *Usp2^{-/-}* 小鼠, 保留了 *Usp2-45* 转录本, 而 Yang 等^[69]使用的 *Usp2^{-/-}* 小鼠的 *Usp2* 功能完全丧失。因此, 这从另一个侧面说明, *Usp2-45* 转录

本参与了小鼠对于光照的敏感性调控。

同时, 免疫共沉淀试验结果表明 USP2 可直接作用于 PER1 并使其去泛素化, 但并未改变其稳定性, 而 *Usp2* 的敲除显著增加了小鼠胎儿成纤维细胞中 PER1 的积累^[2]。为探究 USP2 是否可以非降解的方式调节 PER1, Yang 等^[2]在另一个研究中, 利用免疫荧光和激光共聚焦技术, 发现 USP2 可通过促进肝脏与 SCN 组织中 PER1 的入核过程, 抑制 BMAL1/CLOCK 的转录活性, 发挥对生物钟系统的负调控作用。另外, 还有研究表明, 在炎症反应中, USP2-69 通过去泛素化抑制 CRY1 降解来纠正昼夜节律紊乱^[70]。上述研究结果表明, USP2 在生物钟节律性振荡维持过程中发挥重要作用。

4 问题与展望

USP2 作为一种重要的去泛素化酶, 在蛋白质的翻译后修饰过程中发挥着复杂且重要的作用。本文总结了 USP2 两种变体的结构特征, 并梳理了其在肿瘤发生与转移、能量代谢、神经系统、肌肉组织、细胞凋亡、雄性生殖等诸多生理病理过程中的功能及相关研究进展, 阐述了 USP2 与生物钟系统的互作机制。*Usp2* 主要存在两种变体, 即 *Usp2-45* 和 *Usp2-69*。这两种转录本具有不同的碱基序列及蛋白质结构, 从而决定了它们不同的生理功能。前期研究证据表明, *Usp2-45* 节律性表达于小鼠肝脏中, 而 *Usp2-69* 的表达不存在明显的节律性变化, 这提示生物钟对 *Usp2* 不同转录本的表达存在选择性调控, 但其内在分子机制仍未阐明。此外, 是否存在调控 *Usp2* 转录的其他信号通路, 目前仍不清楚。进一步深入探究 *Usp2* 转录的上游调控机制, 并利用泛素化组学技术在翻译后水平探究 USP2 的下游靶蛋白, 发现 USP2 的新功能, 将为从生物钟角度解析 *Usp2* 在各项生理病理过程中的作用机制提供新的见解和前期研究基础。

[参 考 文 献]

- [1] Nelson JK, Sorrentino V, Avagliano Trezza R, et al. The deubiquitylase USP2 regulates the LDLR pathway by counteracting the E3-ubiquitin ligase IDOL. *Circ Res*, 2016, 118: 410-9
- [2] Yang Y, Duguay D, Fahrenkrug J, et al. USP2 regulates the intracellular localization of PER1 and circadian gene expression. *J Biol Rhythms*, 2014, 29: 243-56
- [3] Renatus M, Parrado SG, D'Arcy A, et al. Structural basis of ubiquitin recognition by the deubiquitinating protease USP2. *Structure*, 2006, 14: 1293-302

- [4] Davis MI, Pragani R, Fox JT, et al. Small molecule inhibition of the ubiquitin-specific protease USP2 accelerates cyclin D1 degradation and leads to cell cycle arrest in colorectal cancer and mantle cell lymphoma models. *J Biol Chem*, 2016, 291: 24628-40
- [5] Yang H, Seo SG, Shin SH, et al. 3,3'-Diindolylmethane suppresses high-fat diet-induced obesity through inhibiting adipogenesis of pre-adipocytes by targeting USP2 activity. *Mol Nutr Food Res*, 2017, 61: 1700119
- [6] Park J, Cho J, Song EJ. Ubiquitin-proteasome system (UPS) as a target for anticancer treatment. *Arch Pharmacol Res*, 2020, 43: 1144-61
- [7] Yuan T, Yan F, Ying M, et al. Inhibition of ubiquitin-specific proteases as a novel anticancer therapeutic strategy. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1080
- [8] Baek SH, Choi KS, Yoo YJ, et al. Molecular cloning of a novel ubiquitin-specific protease, UBP41, with isopeptidase activity in chick skeletal muscle. *J Biol Chem*, 1997, 272: 25560-5
- [9] Lin H, Keriel A, Morales CR, et al. Divergent N-terminal sequences target an inducible testis deubiquitinating enzyme to distinct subcellular structures. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 6568-78
- [10] Zhu HQ, Gao FH. The molecular mechanisms of regulation on USP2's alternative splicing and the significance of its products. *Int J Biol Sci*, 2017, 13: 1489-96
- [11] Park E, Pan Z, Zhang Z, et al. The expanding landscape of alternative splicing variation in human populations. *Am J Hum Genet*, 2018, 102: 11-26
- [12] Ule J, Blencowe BJ. Alternative splicing regulatory networks: functions, mechanisms, and evolution. *Mol Cell*, 2019, 76: 329-45
- [13] Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, et al. Function of alternative splicing. *Gene*, 2005, 344: 1-20
- [14] Gousseva N, Baker RT. Gene structure, alternate splicing, tissue distribution, cellular localization, and developmental expression pattern of mouse deubiquitinating enzyme isoforms *Usp2-45* and *Usp2-69*. *Gene Expr*, 2003, 11: 163-79
- [15] Bonacci T, Emanuele MJ. Dissenting degradation: deubiquitinases in cell cycle and cancer. *Semin Cancer Biol*, 2020, 67: 145-58
- [16] Kim J, Kim WJ, Liu Z, et al. The ubiquitin-specific protease USP2a enhances tumor progression by targeting cyclin A1 in bladder cancer. *Cell Cycle*, 2012, 11: 1123-30
- [17] Graner E, Tang D, Rossi S, et al. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell*, 2004, 5: 253-61
- [18] Calvisi DF, Wang C, Ho C, et al. Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2011, 140: 1071-83
- [19] Tao BB, He H, Shi XH, et al. Up-regulation of USP2a and FASN in gliomas correlates strongly with glioma grade. *J Clin Neurosci*, 2013, 20: 717-20
- [20] Zhao Y, Wang X, Wang Q, et al. USP2a supports metastasis by tuning TGF- β signaling. *Cell Rep*, 2018, 22: 2442-54
- [21] Zhang C, Liu J, Xu D, et al. Gain-of-function mutant p53 in cancer progression and therapy. *J Mol Cell Biol*, 2020, 12: 674-87
- [22] Carrà G, Lingua MF, Maffeo B, et al. P53 vs NF- κ B: the role of nuclear factor- κ B in the regulation of p53 activity and vice versa. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77: 4449-58
- [23] Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, et al. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20: 199-210
- [24] Shrestha M, Park PH. p53 signaling is involved in leptin-induced growth of hepatic and breast cancer cells. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2016, 20: 487-98
- [25] Allende-Vega N, Sparks A, Lane DP, et al. MdmX is a substrate for the deubiquitinating enzyme USP2a. *Oncogene*, 2010, 29: 432-41
- [26] Wang CL, Wang JY, Liu ZY, et al. Ubiquitin-specific protease 2a stabilizes MDM4 and facilitates the p53-mediated intrinsic apoptotic pathway in glioblastoma. *Carcinogenesis*, 2014, 35: 1500-9
- [27] Yang HX, Zhang M, Long SY, et al. Cholesterol in LDL receptor recycling and degradation. *Clin Chim Acta*, 2020, 500: 81-6
- [28] Molusky MM, Li S, Ma D, et al. Ubiquitin-specific protease 2 regulates hepatic gluconeogenesis and diurnal glucose metabolism through 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1. *Diabetes*, 2012, 61: 1025-35
- [29] Barthel A, Schmoll D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 285: E685-92
- [30] Hill MJ, Suzuki S, Segars JH, et al. CRTC2 is a coactivator of GR and couples GR and CREB in the regulation of hepatic gluconeogenesis. *Mol Endocrinol*, 2016, 30: 104-17
- [31] Kushima I, Aleksic B, Ito Y, et al. Association study of ubiquitin-specific peptidase 46 (USP46) with bipolar disorder and schizophrenia in a Japanese population. *J Hum Genet*, 2010, 55: 133-6
- [32] Ryan MM, Lockstone HE, Huffaker SJ, et al. Gene expression analysis of bipolar disorder reveals downregulation of the ubiquitin cycle and alterations in synaptic genes. *Mol Psychiatry*, 2006, 11: 965-78
- [33] Chen X, Wang X, Sun C, et al. FBXL21 association with schizophrenia in Irish family and case-control samples. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2008, 147b: 1231-7
- [34] Shi SQ, Bichell TJ, Ihrle RA, et al. Ube3a imprinting impairs circadian robustness in Angelman syndrome models. *Curr Biol*, 2015, 25: 537-45
- [35] McNaught KS, Olanow CW, Halliwell B, et al. Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2: 589-94
- [36] Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, et al. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 2007, 445: 168-76
- [37] Srikanta SB, Stojkovic K, Cermakian N. Behavioral

- phenotyping of mice lacking the deubiquitinase USP2. *PLoS One*, 2021, 16: e0241403
- [38] Scoma HD, Humby M, Yadav G, et al. The deubiquitinating enzyme, USP2, is associated with the circadian clockwork and regulates its sensitivity to light. *PLoS One*, 2011, 6: e25382
- [39] Mastaitis JW, Wurmbach E, Cheng H, et al. Acute induction of gene expression in brain and liver by insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes*, 2005, 54: 952-8
- [40] Kapogiannis D, Avgerinos KI. Brain glucose and ketone utilization in brain aging and neurodegenerative diseases. *Int Rev Neurobiol*, 2020, 154: 79-110
- [41] Shi MM, Fan KM, Qiao YN, et al. Hippocampal μ -opioid receptors on GABAergic neurons mediate stress-induced impairment of memory retrieval. *Mol Psychiatry*, 2020, 25: 977-92
- [42] Sun DS, Zhong G, Cao HX, et al. Repeated restraint stress led to cognitive dysfunction by NMDA receptor-mediated hippocampal CA3 dendritic spine impairments in juvenile sprague-dawley rats. *Front Mol Neurosci*, 2020, 13: 552787
- [43] Li C, Zhang J, Xu H, et al. Retigabine ameliorates acute stress-induced impairment of spatial memory retrieval through regulating USP2 signaling pathways in hippocampal CA1 area. *Neuropharmacology*, 2018, 135: 151-62
- [44] Molusky MM, Ma D, Buelow K, et al. Peroxisomal localization and circadian regulation of ubiquitin-specific protease 2. *PLoS One*, 2012, 7: e47970
- [45] Park KC, Kim JH, Choi EJ, et al. Antagonistic regulation of myogenesis by two deubiquitinating enzymes, UBP45 and UBP69. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 9733-8
- [46] Gonçalves TM, de Almeida Regitano LC, Koltjes JE, et al. Gene co-expression analysis indicates potential pathways and regulators of beef tenderness in nellore cattle. *Front Genet*, 2018, 9: 441
- [47] Hashimoto M, Saito N, Ohta H, et al. Inhibition of ubiquitin-specific protease 2 causes accumulation of reactive oxygen species, mitochondria dysfunction, and intracellular ATP decrement in C2C12 myoblasts. *Physiol Rep*, 2019, 7: e14193
- [48] Ohayon S, Refua M, Hendler A, et al. Harnessing the oxidation susceptibility of deubiquitinases for inhibition with small molecules. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54: 599-603
- [49] Gewies A, Grimm S. UBP41 is a proapoptotic ubiquitin-specific protease. *Cancer Res*, 2003, 63: 682-8
- [50] Haimerl F, Erhardt A, Sass G, et al. Down-regulation of the de-ubiquitinating enzyme ubiquitin-specific protease 2 contributes to tumor necrosis factor- α -induced hepatocyte survival. *J Biol Chem*, 2009, 284: 495-504
- [51] Bedard N, Yang Y, Gregory M, et al. Mice lacking the USP2 deubiquitinating enzyme have severe male subfertility associated with defects in fertilization and sperm motility. *Biol Reprod*, 2011, 85: 594-604
- [52] Hashimoto M, Kimura S, Kanno C, et al. Macrophage ubiquitin-specific protease 2 contributes to motility, hyperactivation, capacitation, and *in vitro* fertilization activity of mouse sperm. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78: 2929-48
- [53] Takahashi JS. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat Rev Genet*, 2017, 18: 164-79
- [54] Pan X, Mota S, Zhang B. Circadian clock regulation on lipid metabolism and metabolic diseases. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1276: 53-66
- [55] Cox KH, Takahashi JS. Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism. *J Mol Endocrinol*, 2019, 63: R93-102
- [56] Pouly D, Chenaux S, Martin V, et al. USP2-45 is a circadian clock output effector regulating calcium absorption at the post-translational level. *PLoS One*, 2016, 11: e0145155
- [57] Oishi K, Miyazaki K, Kadota K, et al. Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes. *J Biol Chem*, 2003, 278: 41519-27
- [58] Srikanta SB, Cermakian N. To Ub or not to Ub: regulation of circadian clocks by ubiquitination and deubiquitination. *J Neurochem*, 2021, 157: 11-30
- [59] Tamaru T, Takamatsu K. Circadian modification network of a core clock driver BMAL1 to harmonize physiology from brain to peripheral tissues. *Neurochem Int*, 2018, 119: 11-6
- [60] Kitamura H, Hashimoto M. USP2-related cellular signaling and consequent pathophysiological outcomes. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 1209
- [61] Panda S, Antoch MP, Miller BH, et al. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, 2002, 109: 307-20
- [62] Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, et al. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 16219-24
- [63] Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, et al. Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol*, 2002, 12: 540-50
- [64] Storch KF, Lipan O, Leykin I, et al. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature*, 2002, 417: 78-83
- [65] Ueda HR, Chen W, Adachi A, et al. A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*, 2002, 418: 534-9
- [66] Pouly D, Debonneville A, Ruffieux-Daidié D, et al. Mice carrying ubiquitin-specific protease 2 (*Usp2*) gene inactivation maintain normal sodium balance and blood pressure. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 305: F21-30
- [67] Lee J, Lim C, Han TH, et al. The E3 ubiquitin ligase adaptor Tango10 links the core circadian clock to neuropeptide and behavioral rhythms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: e2110767118
- [68] Dierickx P, Van Laake LW, Geijsen N. Circadian clocks: from stem cells to tissue homeostasis and regeneration. *EMBO Rep*, 2018, 19: 18-28

- [69] Yang Y, Duguay D, Bédard N, et al. Regulation of behavioral circadian rhythms and clock protein PER1 by the deubiquitinating enzyme USP2. *Biol Open*, 2012, 1: 789-801
- [70] Tong X, Buelow K, Guha A, et al. USP2a protein deubiquitinates and stabilizes the circadian protein CRY1 in response to inflammatory signals. *J Biol Chem*, 2012, 287: 25280-91