

# 神经退行性疾病相关蛋白的翻译后修饰

费尔康, 范 骏, 王洪枫, 章 涛, 王光辉

(中国科学技术大学生命科学学院分子神经病理学实验室, 安徽合肥 230027)

**摘要:** 特定靶蛋白的翻译后修饰对其执行细胞功能有重要作用, 是细胞对生长、分化和应激等信号刺激所产生的调节功能的一种反应。翻译后修饰包括磷酸化修饰、乙酰化、甲基化、泛素化、类泛素化等不同的修饰。在神经退行性疾病的研究中, 翻译后修饰对疾病的发生和病理影响日益受到人们的重视, 我们对磷酸化、泛素化和类泛素化(SUMO化)修饰与神经退行性疾病的关系及本实验室的工作进行介绍。

**关键词:** 神经退行性疾病; 蛋白质翻译后修饰

**中图分类号:** Q593+2      **文献标识码:** A

## Post-translational modifications of neurodegenerative disease proteins

FEI Er-kang, FAN Jun, WANG Hong-feng, ZHANG Tao, WANG Guang-hui

(Laboratory of Molecular Neuropathology, School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

**Abstract:** Post-translational modifications of target proteins are important for these proteins to execute their cellular functions and enable cells to respond to stimuli. There are phosphorylation, acetylation, methylation, ubiquitination, SUMOylation and other modifications to modify target proteins. In the research of neurodegenerative diseases, post-translational modifications participate in the process and pathogenesis of the diseases attracting increasing attention. In this review, we discuss the relationship between neurodegenerative diseases and phosphorylation, ubiquitination or SUMOylation and introduce our laboratory's work.

**Key words:** neurodegenerative diseases; post-translational modifications

## 0 引言

蛋白质是生物体结构与功能的基本单位, 蛋白质翻译后, 常常经过翻译后修饰执行其正常的功能。当参与蛋白质翻译后修饰异常或缺乏修饰的蛋白质便会在体内积累, 引起疾病的发生。正常蛋白翻译后

修饰在细胞生物学上已得到广泛的研究, 对其功能意义也有了很深刻的认识。目前, 神经退行性疾病与翻译后修饰的关联性也开始得到人们的重视, 但翻译后修饰对神经退行性疾病的影响及作用机制研究尚属起步阶段, 滞后于细胞生物学的功能研究。神经退行性疾病是危害人类健康的重大疾病, 对其机制

收稿日期: 2008-06-28; 修回日期: 2008-07-05

基金项目: 国家自然科学基金(30770664)资助。

作者简介: 费尔康, 男, 1980年生, 博士后。研究方向: 分子神经病理学。E-mail: ericfee@ustc.edu.cn

通讯作者: 王光辉(通讯作者), 博士/教授。1987年本科、1990年硕士毕业于上海医科大学, 2001年博士毕业于日本东京大学, 2001~2003于美国依阿华大学博士后, 2003年9月进入中国科学技术大学生命科学学院, 2004年获得中国科学院“百人计划”择优支持。主要研究神经退行性疾病相关蛋白的翻译后修饰与疾病的关联, 回国后于JBC等杂志发表研究论文多篇。

E-mail: wghui@ustc.edu.cn

的研究和认识有利于对疾病的了解和治疗上的指导. 本实验室主要进行神经退行性疾病翻译后修饰的研究, 力图加深对疾病机制的了解.

## 1 磷酸化与神经退行性疾病的关联

磷酸化是一种很普遍的蛋白质翻译后修饰, 它通过激酶的催化使得底物被修饰的氨基酸残基(丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸)上共价结合一个磷酸基团, 从而调节这些蛋白的功能以及特性. 它是细胞活动中极为重要的生理过程, 各种各样的激酶在不同的途径中表现出磷酸化活性以调节胞内各项生理活动. 在很多神经退行性疾病中, 致病或相关蛋白的磷酸化对于调节蛋白的特性功能以及疾病的发病过程有着紧密的联系. 致病或相关蛋白的异常聚集是很多神经退行性疾病共有的病理特征, 例如在阿尔茨海默氏病(AD)中 tau 蛋白会聚集形成原纤维缠结这样的聚集体; 在帕金森病(PD)中,  $\alpha$ -synuclein 会在细胞质中聚集形成路易小体这种神经元内的包涵体; 在多聚谷氨酰胺病中扩展突变的多聚谷氨酰胺蛋白会聚集形成包涵体. 这些异常聚集通常与蛋白质的翻译后修饰有很大关系, 磷酸化则是其中一种. Tau 原纤维缠结的形成是由于 tau 蛋白的过度磷酸化所造成的<sup>[1]</sup>, tau 蛋白被激酶 GSK 3 $\beta$  或 Cdk5 过度磷酸化可以导致 tau 原纤维缠结的形成并且加速 tau 介导的神经退行性病变<sup>[2,3]</sup>. 路易小体的形成则与  $\alpha$ -synuclein 的磷酸化有关,  $\alpha$ -synuclein 第 129 位丝氨酸可以被 CK2 磷酸化, 该位点的磷酸化对于路易小体的形成以及所引起的神经毒性有重要的影响, 从而参与了 PD 的发病过程<sup>[4~7]</sup>. 在一些多聚谷氨酰胺病中, 磷酸化也扮演了重要的角色. 在脊髓小脑共济失调 I 型(SCA1)中, ataxin-1 的第 776 位丝氨酸可以被 Akt 磷酸化, 该位点的磷酸化对于突变 ataxin-1 核内包涵体的形成和神经元毒性有重要的影响. 当 S776 被突变为丙氨酸不能被磷酸化后, 突变的 ataxin-1 在 CHO 细胞内核内的聚集减少, 而且 ataxin-1-Q80-S776A 转基因鼠在 36 周时还不表现出该病的症状<sup>[8,9]</sup>. 亨廷顿舞蹈症(HD)的致病蛋白 huntingtin 的第 421 位和第 434 位的丝氨酸分别可以被激酶 Akt 和 Cdk5 磷酸化, 这两个位点的磷酸化均可以减少突变 huntingtin 所引起的神经元毒性<sup>[10~12]</sup>. 在齿状核红核苍白球下部核萎缩症(DRPLA)中, DRPLA 蛋白可以被激酶 JNK 磷酸化, 而且突变的 DRPLA 蛋白同 JNK 结合较弱<sup>[13]</sup>.

由以上我们可以看到磷酸化修饰不仅调节了神经退行性疾病致病或相关蛋白的特性和功能, 而且对疾病的发病过程也具有重要的影响, 因此研究神经退行性疾病致病或相关蛋白的磷酸化修饰对于更进一步认识神经退行性疾病的发病机理有重要意义.

下面将我们实验室磷酸化研究相关工作做个介绍.

### 1.1 脊髓小脑变性 3 型蛋白(ataxin-3)的磷酸化与其聚集特性<sup>[18]</sup>

脊髓小脑共济失调 III 型(SCA3)/马查多-约瑟夫病(MJD)是一种常染色体显性遗传的脊髓小脑共济失调, 它主要是由于 MJD1 基因产物 ataxin-3 的 C 端多聚谷氨酰胺的数目发生异常的扩展突变而引起的一种神经退行性疾病<sup>[14]</sup>. 在正常个体中, ataxin-3 的 C 端多聚谷氨酰胺通常为 12~40 个谷氨酰胺, 而在发病的病人中, 该数目可突变至 55~84 个<sup>[15]</sup>. 该病的主要病理特征为扩展突变的 ataxin-3 由于错误折叠成异常构象而在患者易感脑区内的神经元胞核内聚集形成包涵体<sup>[16,17]</sup>. 但是扩展突变 ataxin-3 形成聚集以及致病的机制仍不清楚. 最近很多研究表明多聚谷氨酰胺疾病蛋白如 huntingtin<sup>[10~12]</sup>、ataxin-1<sup>[8,9]</sup> 和 DRPLA<sup>[13]</sup> 的磷酸化对于蛋白的聚集特性、功能以及疾病的发生有很重要的影响. 但是对于 ataxin-3 的磷酸化在本研究之前尚无报道. 为了探索 ataxin-3 的磷酸化, 我们运用 GST Pull-down 和免疫共沉淀实验证实激酶 GSK 3 $\beta$  与 ataxin-3 能够结合, 并且通过  $\gamma$ -<sup>32</sup>P 标记的 ATP 进行体外磷酸化实验证明正常和扩展的 ataxin-3 均能被激酶 GSK 3 $\beta$  磷酸化. 通过磷酸化位点的点突变实验, 我们发现磷酸化的位点是在 ataxin-3 的第 256 位丝氨酸上. 我们进一步构建了第 256 位丝氨酸丧失磷酸化的突变体 S256A 以及模拟磷酸化的突变体 S256D, 采用细胞转染和免疫印迹检测发现, 扩展的 ataxin-3 的 S256A 突变体会形成高分子量的多聚体从而形成聚集, 而没有突变的扩展的 ataxin-3 和其 S256D 突变体则只是单体. 更进一步与分子伴侣 Hsp40 或 Hsp70 分别共转染后发现, Hsp70 能够抑制扩展的 ataxin-3 的 S256A 突变体形成聚集. 这些结果表明激酶 GSK 3 $\beta$  对 ataxin-3 第 256 位丝氨酸的磷酸化能够调节 ataxin-3 的聚集, 该特性可能对 SCA3/MJD 的发病产生影响.

## 1.2 帕金森病相关蛋白 Nurr1 磷酸化对酪氨酸羟化酶(TH)表达调控<sup>[19]</sup>

多巴胺是儿茶酚胺类神经递质之一,它对哺乳动物中枢神经系统的许多基本生理功能(例如运动的整合、神经内分泌激素释放的调节)和脑高级功能(认知、情感和意识)至关重要.在成熟的脑中,大多数的多巴胺能神经元都定位在中脑的腹侧部,并且有文献报道,中脑黑质致密部的多巴胺神经元的丧失直接与帕金森病的发病相关<sup>[20]</sup>.最近研究发现,Nurr1 这种转录因子的突变与帕金森病相关<sup>[21~23]</sup>.

Nurr1 是核受体家族成员之一,核受体又以其能否与配体相结合分为两大类,一类是配体依赖的核受体,其配体主要是一些激素,如类维生素 A、甲状腺素和维生素 D;而另一类是配体不依赖的核受体,被称为孤核受体<sup>[24]</sup>.Nurr1 作为转录因子可调节多种基因的表达,例如,酪氨酸羟化酶(TH)、多巴胺转运体(DAT)、氨基酸脱羧酶(AADC)等.Nurr1 通过直接结合在 TH 基因的启动子上调节 TH 的表达.酪氨酸羟化酶是多巴胺生成过程中的限速酶,它负责将酪氨酸羟化,使其转变成为左旋多巴,左旋多巴又在脱羧酶的作用下转化为多巴胺.在老年人和帕金森病人的脑中,酪氨酸羟化酶免疫反应阳性的神经元数量有所降低,与此同时也检测到中脑黑质致密部的 Nurr1 免疫反应阳性的神经元的丢失,这也说明了 Nurr1 与 TH 有着直接的关联.

ERK2 是一种重要的裂原激活蛋白激酶(MAPK),当行使其激酶的活性时,首先要与底物结合,才能够磷酸化其底物蛋白.底物蛋白通过它的停泊位点(docking domain)与 ERK2 结合,Docking domain 有一些保守序列,如  $(K/R)_{1-3} - X_{1-5} - \Phi X\Phi, L - X_{1-2} - (R/K)_{2-5}$ ,其中  $\Phi$  为疏水氨基酸,X 为任意氨基酸.底物蛋白通过 Docking domain 与 ERK2 结合后,继而被 ERK2 磷酸化,保守的磷酸化位点是 PX(S/T)P.通过生物信息学软件分析,在 Nurr1 序列上有 6 个潜在的磷酸化位点符合 PX(S/T)P,它们分别是 PSS<sup>126</sup>P, PPT<sup>129</sup>P, PTT<sup>132</sup>P, PGT<sup>185</sup>P, PKS<sup>352</sup>P, PPS<sup>359</sup>P,同样在其序列上也存在着 4 个潜在的 Docking domain,它们分别是处在 Nurr1 的氨基端的 K<sup>41</sup>FSMDL, K<sup>92</sup>VEDIQM, R<sup>166</sup>KTPVSRLSL 和处在 Nurr1 DNA 结合域的 L<sup>338</sup>KGRR.我们通过体外的 GST pull-down 实验发现,在大肠杆菌中表达的 GST-Nurr1 可以与 HEK293

cells 中的内源性的 ERK2 相结合,并且通过使用免疫共沉淀的实验方法发现,在真核细胞(HEK293 cells)中过度表达的 Flag-Nurr1 也可以与 ERK2 特异性结合.在确定了二者相互结合的情况下,我们运用体外磷酸化实验确定了 Nurr1 的确是 ERK2 的底物.由于 Nurr1 序列当中有 4 个潜在的与 ERK2 相结合的位点,进一步的实验证明了 Nurr1 的氨基端可以与 ERK2 特异性结合,并且处在 Nurr1 DNA 结合域的 L<sup>338</sup>KGRR 也是一个结合位点.在 Nurr1 序列中的 6 个预测的磷酸化位点并不都是真实的磷酸化位点.通过使用 Nurr1 的各种缺失突变的体外磷酸化实验明确了 Nurr1 序列当中的 PSS<sup>126</sup>P 和 PTT<sup>132</sup>P 是主要的磷酸化位点,将这两个位点的 S<sup>126</sup>或者 T<sup>132</sup>突变成不被磷酸化的 A(丙氨酸)时,Nurr1 被磷酸化的效应明显减弱.而 PPT<sup>129</sup>P 和 PGT<sup>185</sup>P 也是磷酸化位点,但并不是一个主要的位点,因为 T<sup>129</sup>或者 T<sup>185</sup>突变成 A 后,它们磷酸化的削弱程度明显低于 S<sup>126</sup>或者 T<sup>132</sup>突变成 A. PKS<sup>352</sup>P、PPS<sup>359</sup>P 则不具备被 ERK2 磷酸化的能力.同时我们发现,Nurr1 作为一个转录因子,磷酸化对它的转录活性有重要影响.Nurr1 能够调节酪氨酸羟化酶的表达,在有活化的 ERK2 存在的情况下,Nurr1 被磷酸化,能促进酪氨酸羟化酶的表达,而 Nurr1 被 ERK2 磷酸化的位点均缺失或者突变后,在同样有活化的 ERK2 存在的情况下,却丧失了促进酪氨酸羟化酶表达的能力.

总而言之,Nurr1 作为转录因子能够调节酪氨酸羟化酶的活性,进而在多巴胺的生成和多巴胺能神经元的发育过程中起重要作用,其转录活性受到磷酸化的调控.

## 2 神经退行性疾病相关蛋白的类泛素化(SUMO 化)修饰

SUMO 化是一种蛋白质翻译后修饰,通过 SUMO(small ubiquitin-like modifier,小的泛素样修饰分子)共价结合到底物蛋白的赖氨酸残基上来调节底物蛋白的稳定性、亚细胞器定位、生物活性和与其他蛋白的结合,从而调控蛋白质功能.SUMO 化于 1996 年第一次被报道作为一种共价修饰作用来调节 RanGTPase 活化蛋白(RanGTPase activating protein, RanGAP)的核孔定位<sup>[25,26]</sup>.SUMO 广泛存在于所有真核生物中,而且从酵母到人都是高度保守的.在脊椎动物中,SUMO 家族包括 SUMO-1、

SUMO-2、SUMO-3 以及新近发现的 SUMO-4 四个成员<sup>[27~29]</sup>,而在无脊椎动物和酵母中都只有单个的 SUMO 基因. 人源 SUMO-1 是一个分子量为 11.6 kD、含有 101 个氨基酸的多肽,在一级序列上与 SUMO-2/3 有 50% 的相似性,与泛素有 18% 的相似性. 结合形式的 SUMO-2 与 SUMO-3 之间则仅有 N 端的三个氨基酸不同. SUMO 家族成员尽管同泛素在一级序列上仅有 18% 的相似性,但是它们的三维结构却非常相似, SUMO-1 仅比泛素多了一段 N 端柔性的伸展结构,而它们的折叠螺旋部分是非常相似的. SUMO 与泛素不仅在结构上非常相似,它们与底物的结合与去结合的方式与泛素化也非常相似. 泛素首先被合成的是无活性的前体蛋白,它需要经 Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 剪切 C 末端而暴露出两个甘氨酸成为活性形式. 接下来的泛素化连接过程需要三个步骤,涉及三种酶:泛素激活酶(ubiquitin activating enzyme, E1)、泛素结合酶(ubiquitin conjugating enzyme or Ubc, E2)和特有的泛素连接酶(ubiquitin-protein ligase, E3). 在 E1、E2 和 E3 的作用下多聚泛素链结合到底物蛋白上,使得底物经 26S 蛋白酶体降解. SUMO 的修饰过程与泛素化过程相似,但是所需的酶是特异性的. SUMO 首先被合成的也是一个无活性的前体形式,经过 Ulp1 (ubiquitin-like protein-processing enzyme)或 SUMO 特异性蛋白酶剪切 C 末端后暴露出两个甘氨酸而成为活性形式,接着在 SUMO 特异性的 E1、E2 和 E3 的参与下发挥作用. SUMO 激活酶 E1 是一个二聚体,包括 SAE1 和 SAE2 两个亚基(酵母中为 Aos1 和 Uba2),在消耗 ATP 的条件下, SUMO 其 C 端的甘氨酸经 SAE1/2 结合到 SAE2 的半胱氨酸上形成硫酯键. 然后, SUMO 从 E1 被转移到 SUMO 结合酶 E2(Ubc9)的半胱氨酸上形成硫酯键. Ubc9 是迄今发现的唯一的 SUMO 结合酶,它不同于泛素化的 E2,它对泛素不起作用,而且对于 SUMO 它具有直接识别底物蛋白的能力,在没有 E3 存在的情况下仍可以将 SUMO 结合到底物上. 因此 Ubc9 可以催化 SUMO 其 C 末端甘氨酸的羧基与底物赖氨酸的  $\epsilon$ -氨基形成异肽键. 但是 SUMO 也可以存在连接酶 E3, SUMO 的 E3 也能使得 SUMO 从 Ubc9 结合到底物上,它们促进了 SUMO 从 Ubc9 向底物的转移,增加了 SUMO 的结合效率.  $\Psi$ -K-X-D/E 是底物上 SUMO 结合的保守序列,其中  $\Psi$  是大的疏水性氨基酸残基, X 是任意

氨基酸残基, K 是 SUMO 结合的赖氨酸残基, D/E 是酸性氨基酸. 但并不是所有具有该保守序列的蛋白均可被 SUMO 修饰,可能还有其他因素参与 SUMO 化修饰过程<sup>[30,31]</sup>. SUMO-2 和 SUMO-3 对底物的修饰过程与 SUMO-1 相同.

虽然 SUMO 与泛素在结构和作用过程上非常相似,但是它们的作用结果却常常相反. 泛素化的蛋白通常被送到蛋白酶体降解,而 SUMO 化的蛋白却常常更稳定不易降解. 可能因为 SUMO 化修饰的赖氨酸残基不仅仅是 SUMO 修饰的位点,也是泛素等其他 Ub1s 的修饰位点,同时也可能是甲基化和乙酰化修饰的位点,而 SUMO 的结合则阻碍了其他分子的修饰. 如 PCNA、Smad4、I $\kappa$ B $\alpha$  和 NEMO 都是同一个赖氨酸残基,既可以被 SUMO 修饰也可以被泛素修饰<sup>[32,33]</sup>,从而使得 SUMO 化有拮抗泛素化的作用. SUMO 化作用还能够调节底物与其他大分子之间的结合,并可能通过下述三种方式实现:(I) SUMO 化修饰干扰了底物蛋白同其他蛋白的结合;(II) SUMO 化为其他蛋白的结合提供了位点;(III) SUMO 化导致了底物蛋白的构象发生变化从而暴露或隐藏了同其他蛋白的结合位点.

有研究显示多聚谷氨酰胺病人的患病脑区的神经元对 SUMO-1 抗体有强烈的免疫活性<sup>[34]</sup>. 在 DRPLA 病人脑组织中以及 PC12 细胞系中, SUMO-1 与突变的 atrophin-1 形成的核内包涵体有很好的共定位,而且在 PC12 细胞系中 SUMO 化作用能够促进突变的 atrophin-1 形成核内包涵体并且导致细胞死亡. 一段能够导致 HD 的 huntingtin 片段被证明 SUMO 化和泛素化是在其同一个赖氨酸残基上发生的,在神经细胞系中 SUMO 化修饰能够稳定该片段而减少核内的聚集,但是同时也增加了胞浆内该片段的浓度,在果蝇中,该片段的 SUMO 化修饰加重了神经退行性病变. SCA1 病人和转基因鼠的患病脑部神经元对 SUMO-1 均有很强的免疫活性<sup>[34]</sup>,而其相关蛋白 ataxin-1 被证明至少在 5 个赖氨酸残基上发生 SUMO 化作用,而且 SUMO 化水平在扩展突变的 ataxin-1 中是降低的. SCA3/MJD 的致病蛋白 ataxin-3 被证明在 SH-SY5Y 细胞系中可以被 SUMO-1 修饰,另外在脊髓延髓肌肉萎缩症(SBMA)的果蝇模型中,破坏其 SUMO 化会导致神经退行性病变加重<sup>[35,36]</sup>. 帕金森病(PD)的相关蛋白 DJ-1 也是被 SUMO-1 修饰的. DJ-1 是参与基因转录调控以及细胞内氧化应激调节的多功能蛋

白,其功能的丧失会导致 PD 的发病. DJ-1 的一种与 PD 相关的病理突变体 L166P 较野生型 SUMO 化程度会增加,从而造成突变体的不可溶性且易于降解<sup>[37]</sup>. 阿尔茨海默氏病(AD)的相关蛋白 tau 是能被 SUMO-1 修饰的,被 SUMO-2/3 修饰的程度较 SUMO-1 弱,而且 tau 的 SUMO 化位点 K340 是在其微管结合结构域. Tau 不仅能被 SUMO 修饰也可以被泛素化,两者之间存在着竞争性,从而调节 tau 的稳定性.

下面将我们实验室 SUMO 化研究相关工作做个介绍.

## 2.1 PD 相关蛋白 DJ-1 的 SUMO 化对 p53 信号通路的影响<sup>[38,39]</sup>

在全球范围内,帕金森病(Parkinson's Disease PD)是发病率仅次于阿尔茨海默病的神经退行性疾病,帕金森病的主要病理特征包括位于中脑黑质致密部的多巴胺能神经元的丧失,及在残存的神经元中发现的被称为“路易小体”的病理性聚集. 该病能导致患者出现肌强直、运动徐缓、静止性震颤等临床症状. 帕金森病的确切病因目前还不完全清楚,但诱因主要包括环境因素和遗传因素. 研究显示氧化应激、线粒体功能损伤、蛋白酶体系统障碍和细胞凋亡等在帕金森病发生发展过程中发挥着重要的作用.

DJ-1 最初是作为原癌基因产物被发现的,在荷兰和意大利的两个遗传型帕金森病家族中发现 DJ-1 的突变与常染色体隐性遗传性帕金森病发病相关. 虽然众多的研究显示 DJ-1 是一个功能多样的蛋白,能够抗氧化应激,调节转录并在一定条件下具有分子伴侣样作用. 但到目前为止, DJ-1 的功能及其在帕金森病发病过程中所发挥的作用还不完全清楚.

我们的研究发现, DJ-1 具有抗凋亡作用而 DJ-1 的 SUMO 化修饰是其执行抗凋亡功能的前提条件. 在凋亡诱导剂的刺激下,过表达 DJ-1 的细胞能够在细胞形态上保持完整并抑制凋亡下游因子半胱天冬酶 Caspase-3 和 Caspase-9 的激活. 进一步研究发现,凋亡通路上的重要因子 Bax 蛋白在过表达 DJ-1 细胞中的表达水平减少,而这一现象在含有 p53 蛋白的细胞中可以很好的重现,但在 p53 缺失型的细胞中丧失,提示 DJ-1 能够下调 Bax 水平并且这种能力与 p53 密切相关. 我们又用基因敲减技术,下调 DJ-1 的表达,结果我们观察到随着 DJ-1 的下调,

Bax 表达也随之上升,而且这种现象也依赖于 p53 的存在. 利用体外 Pulldown 实验和体内的免疫共沉淀实验,我们发现 DJ-1 能够在细胞核内与 p53 的 DNA 结合区域及 C 末端相互结合. 接下来的报告基因实验结果显示 DJ-1 能够抑制 p53 针对 Bax 的转录活性. 这些结果提示, DJ-1 在细胞核内通过与 p53 结合,可能影响到 p53 与 Bax 启动子的结合,干扰 p53 对 Bax 的转录,抑制下游凋亡通路,从而发挥其抗凋亡作用. 有趣的是,丧失 SUMO 化位点的突变体 DJ-1 (K130R),从细胞核内转位到细胞质,并丧失了下调 Bax、阻断半胱天冬酶激活及抑制 p53 转录活性等抗凋亡的能力. 这些结果提示, SUMO 化修饰是 DJ-1 执行抗凋亡及抑制 p53 功能的必要前提条件,而 DJ-1 的细胞核定位在其抗凋亡机制中也具有重要的意义.

综合以上结果我们可以看出, SUMO 化的 DJ-1 能够进入细胞核,与 p53 结合后,可能干扰了 p53 与 Bax 启动子的结合,抑制了 p53 对 Bax 的转录,表现为 Bax 蛋白水平的降低和下游凋亡通路的阻断. 一旦 DJ-1 不能被正常 SUMO 化,则被滞留在细胞质中,无法进入细胞核去和 p53 结合,不能发挥对 Bax 的转录抑制作用,继而丧失抗凋亡的能力.

## 2.2 SUMO 化修饰对肌萎缩侧索硬化症相关蛋白 SOD1 稳定性的影响<sup>[40]</sup>

肌萎缩侧索硬化症(ALS)是一种常见的以脊髓、脑干和运动皮层的上下运动神经元发生选择性退变为特征的神经退行性疾病. 有 5%~10% 的 ALS 病例是由于家族遗传因素造成的,被称为家族遗传型肌肉萎缩侧索硬化症(FALS),其中,约有 20% 的 FALS 是由于编码铜-锌过氧化物歧化酶(SOD1)的基因发生突变而引起的,迄今至少发现了 114 种 SOD1 基因的突变与 FALS 相关<sup>[41]</sup>. 这些突变是功能获得性突变,它们使得突变的 SOD1 具有毒性作用. 突变的 SOD1 通常在发病患者的脑组织中通过聚集而形成包涵体,但其致病机制以及突变蛋白的聚集机制至今尚未能明确阐述.

为了探索与 FALS 发病相关的人源 SOD1 的 SUMO 化修饰,我们运用免疫共沉淀方法和体外 SUMO 化反应,发现 SOD1 能够被 SUMO-1 修饰,但是却不能被 SUMO-2 和 SUMO-3 修饰. 将 SOD1 中第 75 位赖氨酸这个保守的 SUMO 修饰位点突变为精氨酸后, SOD1 则完全不能够被 SUMO-1 修饰. 通过进一步的细胞共转染技术,并用荧光显微镜

观察发现,经 SUMO-1 修饰后,野生型和突变型 SOD1 所形成的胞浆内聚集均会增加,而且 SUMO-1 能够被招募至 SOD1 所形成的聚集上,与 SOD1 在细胞内聚集体上有共定位现象.更进一步通过加入放线菌酮(CHX)以抑制新生蛋白的合成来检测已合成蛋白的降解速度,证实 SUMO-1 可以稳定野生型和突变型 SOD1 而不易降解.这些结果提示,SUMO-1 对 SOD1 在第 75 位赖氨酸的修饰可能参与调控 SOD1 的稳定性以及聚集的形成,进而可能对由 SOD1 突变所引起的 FALS 的发病产生影响.

### 3 泛素化修饰与脊髓小脑 3 型变性

细胞中主要有两种需要降解的蛋白质:错误折叠的蛋白和需要进行数量调控的蛋白.在真核细胞中,蛋白酶体存在于细胞核和细胞质中,是细胞内除溶酶体外的蛋白水解体系,正常情况下维持着细胞内蛋白质含量的平衡.蛋白酶体是由 10~20 个不同的亚基组成的中空圆桶形结构的复合物,具有多种肽酶的活性.

泛素-蛋白酶体系统与神经退行性疾病密切相关,详细的研究表明几乎每一种神经退行性疾病相关蛋白都有特定的 E3 连接酶,通过 E3 标记上泛素标签并通过蛋白酶体系统降解,比如 E6-AP 是 SCA1 相关蛋白 ataxin-1 的 E3,dorfin 是 ALS 相关蛋白 SOD1 的 E3 等<sup>[42]</sup>.各种神经退行性疾病尽管表象不尽相同,但是都有一个共同的现象,就是由一种或多种相关蛋白的突变引起.由于这些蛋白构象改变,从而引起错误的折叠,形成  $\beta$ -sheet 结构的聚集,这些错误折叠引起的聚集体本身可能具有细胞毒性,并往往是被泛素化的<sup>[43]</sup>,并且可以直接或间接与蛋白酶体结合,聚集体引发蛋白酶体的损伤也是引起细胞死亡的原因之一.在亨廷顿病人的脑,鼠及培养细胞中,聚集体和泛素及蛋白酶体共定位在一起.在帕金森氏症中,蛋白酶体系统不能正常清除错误折叠的蛋白被认为是引起多巴胺能神经元死亡的原因之一.

Machado-Joseph 疾病(MJD),又叫做脊髓小脑变性 3 型,是一种常染色体显性遗传疾病,也是一种进行性神经退行疾病.这种疾病的相关蛋白 ataxin-3 具有 C 末端多聚谷氨酰胺(polyQ)的特征.野生型 ataxin-3 的谷氨酰胺数目在 13~36 个之间,突变的 ataxin-3 的谷氨酰胺数目会增多,达到 40 个以上.突变的 ataxin-3 会形成构象上的改变,更容易形成

聚集,聚集体往往和其他一些蛋白,如热休克蛋白,蛋白酶体的亚基,以及其他神经退行性疾病致病蛋白共定位在一起,形成大的复合物.这些聚集被认为对蛋白酶体有损伤,可以引起细胞毒性,导致神经细胞的死亡.在病人的脑切片染色中 ataxin-3 所形成的聚集往往是和泛素及蛋白酶体共定位在一起的,这说明 ataxin-3 很可能是通过蛋白酶体降解的,但具体的降解途径还不明确.26S 蛋白酶体分为核心区(20S)和调节亚基(19S),调节亚基上有很多的亚单位,它们与蛋白酶体对底物的识别和加工密切相关,其中有六个具有 ATP 酶活性的蛋白,p45 就是其中的一个.

我们在研究中发现,ataxin-3 的降解和 p45 有关联.利用体外结合和体内免疫共沉淀的实验,我们证明了野生型和突变型的 ataxin-3 都可以和 p45 有直接的结合,这说明二者之间可能有一定的相互作用.接下来的细胞转染实验我们观察到当共转了 p45 的时候,表达绿色荧光蛋白的 ataxin-3 细胞的荧光明显减少,这说明 p45 可能有调节 ataxin-3 降解的功能,western-blot 结果显示的是同一结果,这一现象是可以被蛋白酶体的抑制剂 MG-132 所抑制的.体外降解实验同样证明了这一结论:在体外的孵育体系中加入细胞裂解液,ATP,以及 ataxin-3 和 p45,我们发现随着加入 p45 量的增加,ataxin-3 的量是逐渐减少的. Ataxin-3 作为一种神经退行性疾病蛋白,和其他神经退行性疾病相关蛋白有很多相似的特性,尤其是和其他多聚谷氨酰胺蛋白一样都有 polyQ 的扩展片段.我们用 alpha-synuclein, SOD1 以及含有 polyQ 的 ataxin-3 的 C 片段与 p45 共转,并没有发现被调节降解的现象,这说明 p45 对于 ataxin-3 的调节作用是特异性的.另外 ataxin-3 有两个或三个(根据不同的变型) Ubiquitin-Interaction-Motif(UIM),通过这些功能区域可以行使其正常的分子功能.我们的研究表明,在 p45 调节 ataxin-3 降解的过程中,UIM 区域起着重要的作用.当 ataxin-3 缺失了这些区域后就不能被 p45 所影响.

为了找到 ataxin-3 和 p45 的结合位点,我们构建了 N 端和 C 端的 ataxin-3,我们发现 ataxin-3 的 N 端 1~133 个氨基酸可以和 p45 结合,而 C 端却不能,因此我们认为 ataxin-3 与 p45 的结合位点在 N 端.

由于 p45 与蛋白酶体上其他几个具有 ATP 酶

活性的蛋白同源性很高,我们克隆了其他几个 ATP 酶并对 ataxin-3 的降解作用进行了研究. 我们发现只有 p45 对 ataxin-3 具有调节降解的作用,这也说明了此促进降解的作用是特异的.

综上所述我们得出结论:蛋白酶体上具有 ATP 酶活性的蛋白 p45 可以特异性地促进 ataxin-3 通过蛋白酶降解,这种作用是通过与 ataxin-3 N 端的直接结合进行并且依赖于 UIM 功能区域的. 这种调节可能会影响到 ataxin-3 生理功能,并且影响它的底物蛋白. 这一发现对于 MJD 的病理研究将会有一定的帮助.

总之,蛋白质的翻译后修饰对神经退行性疾病的发生和病理形成有重要作用,该领域的研究在世界范围内开始得到重视,但尚属起步阶段. 进一步深入探讨其作用机制将有助于人们对疾病的认识和将来的治疗探索.

## 4 研究展望

神经退行性疾病相关蛋白的翻译后修饰参与了疾病的发生发展,目前的研究结果已然显示翻译后修饰可能比蛋白突变本身对疾病的发生有着更重要的作用. 相信人们会进一步的探讨和鉴定特定位点的特定修饰,并明确这些位点修饰的病理意义. 因为这些具有病理学意义的修饰位点不仅直接导致疾病的发生发展,同时也是人们关注的治疗靶点. 针对特定位点的靶向性治疗将来会对疾病治疗提供一个很好的思路和方法.

### 参考文献(References)

- [1] Lee V M, Goedert M, Trojanowski J Q. Neurodegenerative tauopathies [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2001,24:1 121-1 159.
- [2] Lucas J J, Hernandez F, Gomez-Ramos P, et al. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice[J]. *Embo J*, 2001, 20:27-39.
- [3] Jackson G R, Wiedau-Pazos M, Sang T K, et al. Human wild-type tau interacts with wiggless pathway components and produces neurofibrillary pathology in *Drosophila*[J]. *Neuron*, 2002,34:509-519.
- [4] Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, et al. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions [J]. *Nat Cell Biol*, 2002,4:160-164.
- [5] Anderson J P, Walker D E, Goldstein J M, et al. Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease[J]. *J Biol Chem*, 2006,281:29 739-29 752.
- [6] Okochi M, Walter J, Koyama A, et al. Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein[J]. *J Biol Chem*, 2000,275:390-397.
- [7] Liu C, Fei E, Jia N, et al. Assembly of lysine 63-linked ubiquitin conjugates by phosphorylated alpha-synuclein implies Lewy body biogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2007,282:14 558-14 566.
- [8] Chen H K, Fernandez-Funez P, Acevedo S F, et al. Interaction of Akt-phosphorylated ataxin-1 with 14-3-3 mediates neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 1[J]. *Cell*, 2003,113:457-468.
- [9] Emamian E S, Kaytor M D, Duvick L A, et al. Serine 776 of ataxin-1 is critical for polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice[J]. *Neuron*, 2003, 38:375-387.
- [10] Humbert S, Bryson E A, Cordelieres F P, et al. The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt[J]. *Dev Cell*, 2002,2:831-837.
- [11] Luo S, Vacher C, Davies J E, et al. Cdk5 phosphorylation of huntingtin reduces its cleavage by caspases: implications for mutant huntingtin toxicity [J]. *J Cell Biol*, 2005,169:647-656.
- [12] Warby S C, Chan E Y, Metzler M, et al. Huntingtin phosphorylation on serine 421 is significantly reduced in the striatum and by polyglutamine expansion in vivo [J]. *Hum Mol Genet*, 2005,14:1 569-1 577.
- [13] Okamura-Oho Y, Miyashita T, Nagao K, et al. Dentatorubral-pallidolusian atrophy protein is phosphorylated by c-Jun NH2-terminal kinase [J]. *Hum Mol Genet*, 2003,12:1 535-1 542.
- [14] Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, et al. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1 [J]. *Nat Genet*, 1994, 8: 221-228.
- [15] Cummings C J, Zoghbi H Y. Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology[J]. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2000,1:281-328.
- [16] Matsumoto M, Yada M, Hatakeyama S, et al. Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4[J]. *Embo J*, 2004,23:659-669.
- [17] Paulson H L, Perez M K, Trottier Y, et al. Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3[J]. *Neuron*, 1997,19:333-344.
- [18] Fei E, Jia N, Zhang T, et al. Phosphorylation of

- ataxin-3 by glycogen synthase kinase 3b at serine 256 regulates the aggregation of ataxin-3 [J]. *Biochem Biophys Res Co*, 2007, 357: 487-492.
- [19] Zhang T, Jia N, Fei E, et al. Nurr1 is phosphorylated by ERK2 in vitro and its phosphorylation upregulates tyrosine hydroxylase expression in SH-SY5Y cells[J]. *Neuroscience Letters*, 2007, 423: 118-122.
- [20] Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of Parkinson's disease; dopamine, vesicles and alpha-synuclein [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3:932-942.
- [21] Xu P Y, Liang R, Jankovic J, et al. Association of homozygous 7048G7049 variant in the intron six of Nurr1 gene with Parkinson's disease[J]. *Neurology*, 2002, 58:881-884.
- [22] Zheng K, Heydari B, Simon D K. A common NURR1 polymorphism associated with Parkinson disease and diffuse Lewy body disease[J]. *Arch Neurol*, 2003, 60: 722-725.
- [23] Le W D, Xu P, Jankovic J, et al. Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease [J]. *Nat Genet*, 2003, 33: 85-89.
- [24] Jankovic J, Chen S, Le W D. The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease[J]. *Prog Neurobiol*, 2005, 77: 128-138.
- [25] Matunis M J, Coutavas E, Blobel G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex[J]. *J Cell Biol*, 1996, 135: 1 457-1 470.
- [26] Mahajan R, Delphin C, Guan T, et al. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2[J]. *Cell*, 1997, 88: 97-107.
- [27] Melchior F. SUMO—nonclassical ubiquitin[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000, 16: 591-626.
- [28] Guo D, Li M, Zhang Y, et al. A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes[J]. *Nature Genetics*, 2004, 36: 837-841.
- [29] Muller S, Ledl A, Schmidt D. SUMO: A regulator of gene expression and genome integrity[J]. *Oncogene*, 2004, 23:1 998-2 008.
- [30] Yeh E T, Gong L, Kamitani T. Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles[J]. *Gene*, 2000, 248:1-14.
- [31] Martin S, Wilkinson K A, Nishimune A, et al. Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in neuronal function and dysfunction[J]. *Nature reviews*, 2007, 8:948-959.
- [32] Gill G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: Different functions, similar mechanisms[J]. *Genes Dev*, 2004, 18:2 046-2 059.
- [33] Johnson E S. Protein modification by SUMO[J]. *Annu Rev Biochem*, 2004, 73:355-382.
- [34] Ueda H, Goto J, Hashida H, et al. Enhanced SUMOylation in polyglutamine diseases[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 293:307-313.
- [35] 汤建光, 沈璐, 唐北河, 等. SUMO-1 共价修饰 ataxin-3 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33: 1 037-1 043.
- [36] Chan H Y, Warrick J M, Andriola I, et al. Genetic modulation of polyglutamine toxicity by protein conjugation pathways in *Drosophila* [J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11:2 895-2 904.
- [37] Shinbo Y, Niki T, Taira T, et al. Proper SUMO-1 conjugation is essential to DJ-1 to exert its full activities[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13:96-108.
- [38] Fan J, Ren H, Fei E, et al. Sumoylation is critical for DJ-1 to repress p53 transcriptional activity[J]. *FEBS Lett*, 2008, 582:1 151-1 156.
- [39] Fan J, Ren H, Jia N, et al. DJ-1 Decreases Bax Expression through Repressing p53 Transcriptional Activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283:4 022-4 030.
- [40] Fei E, Jia N, Yan M, et al. SUMO-1 modification increases human SOD1 stability and aggregation[J]. *Biochem Biophys Res Co*, 2006, 347(2):406-412.
- [41] Martin S, Wilkinson K A, Nishimune A, et al. Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in neuronal function and dysfunction [J]. *Nature Reviews*, 2007, 8:948-959.
- [42] Ardley H C, Robinson P A. The role of ubiquitin-protein ligases in neurodegenerative disease [J]. *Neurodegener Dis*, 2004, 1:71-87.
- [43] Alves-Rodrigues A, Gregori L, Figueiredo-Pereira M E. Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration [J]. *Trends Neurosci*, 1998, 21 (12): 516-520.