

## 二、泛素化途径与人体免疫系统调节

蛋白质泛素化修饰过程在人体免疫系统调节过程中也起到了关键性的作用。与磷酸化修饰过程一样，泛素化修饰过程也是一种可逆的共价修饰过程，它能够调节被修饰蛋白的稳定性、功能活性状态以及细胞内定位等情况。因此，泛素化修饰作用也在人体免疫系统的发育以及免疫反应的各个阶段，比如免疫反应的起始、发展和结束等过程中发挥了重要作用。最近的研究结果显示，有好几种泛素连接酶都参与了防止免疫系统攻击自体组织的过程。这些泛素连接酶的功能失调都与自身免疫性疾病有关。

一个安全、有效的机体免疫系统应该是能够在有效的清除或限制各种入侵机体的病原微生物的同时又不会对自身组织发动攻击。要达到这一目标就必须对免疫系统进行非常精细的调控。作为生物体内非常重要的一种调控手段——泛素化修饰途径，毫无疑问地也在免疫系统调控过程中起到了重要作用。早期对这一课题的研究主要都集中在NF- $\kappa$ B途径上。最近几年的研究发现，泛素化修饰途径能够通过好几条信号通路激活NF- $\kappa$ B途径，它在NF- $\kappa$ B激活过程中起到了调控中枢的作用。NF- $\kappa$ B途径在先天免疫和获得性免疫中都起到了关键性作用，因此我们也开始逐渐认识到泛素化修饰途径对于免疫系统的调控作用。

泛素蛋白是一个由76个氨基酸残基组成的非常保守的多肽，它能在E1、E2、E3酶等一系列酶促反应催化下与细胞内靶蛋白上的一个或多个赖氨酸残基发生共价连接。泛素蛋白本身也含有7个赖氨酸残基，因此它们之间也可以通过这些位点互相连接，形成多泛素蛋白链（polyubiquitin chain）。目前研究显示，如果多泛素蛋白链与被修饰蛋白上的第48位赖氨酸残基相连，会介导靶蛋白进入蛋白酶体而被降解；如果与被修饰蛋白上其它位点，比如第63位赖氨酸残基相连，则靶蛋白可以发挥信号通路功能而不会被降解。此外，还有一些蛋白质，比如组蛋白H2A和H2B等经单泛素蛋白修饰后也可以发挥调控作用而不会被降解。

与磷酸化修饰途径一样，泛素化修饰途径也是可逆的，即可以通过去泛素化酶（DUB）将泛素蛋白修饰物去除掉，这种可逆的修饰途径就非常适合作为免疫系统的调控机制。靶蛋白经泛素化途径修饰之后，连接在靶蛋白上的泛素蛋白单体或多聚体可以被各种泛素蛋白结合结构域（UBD）所识别和结合。人类蛋白质组中含有两种E1酶、50种E2酶、600种E3酶、90种DUB酶和20种UBD，这说明泛素修饰途径在细胞调控中起到了多么重要的作用。E3酶是泛素修饰途径中决定底物特异性的关键酶，它可以分为两大类，即含有HECT结构域的E3酶和其它含有RING结构域或RING样结构域（比如U-box或PHD结构域）的E3酶。这两种E3酶都在免疫调控过程中起到了关键性的作用。

本文将主要介绍泛素修饰系统在NF- $\kappa$ B途径中的调控作用，还将向读者介绍最近泛素修饰系统在先天免疫及获得性免疫中的相关研究进展。在文章最后，还将介绍几种能阻止自身免疫性疾病发生的泛素连接酶。由于文章篇幅所限，我们没有在本文中详细介绍泛素修饰途径在抗原呈递（antigen presentation）过程中的作用、病原体“绑架”（hijacking）泛素修饰途径以及逃避机体免疫系统的机制。读者可以参阅相关综述，了解更多上述两个方面的信息。

# 1. 泛素修饰途径与NF- $\kappa$ B信号通路的关系



NF- $\kappa$ B信号通路发现至今已经20年了。该通路参与了许多生理过程，比如炎症反应、免疫反应以及细胞存活等等。NF- $\kappa$ B信号通路也是我们研究细胞信号通路非常好的一个模型，因为它的活性是受到非常精细的调控的。虽然NF- $\kappa$ B信号通路广泛存在，但是在大部分细胞中它都处于失活状态，这是因为NF- $\kappa$ B信号通路被I $\kappa$ B家族蛋白“禁锢”在胞质中，抑制了其活性。在包括来自微生物等的各种刺激因子的作用之下，I $\kappa$ B家族蛋白会迅速经由泛素蛋白酶体途径被降解，令NF- $\kappa$ B得以进入核内，激活一系列基因的转录。

NF- $\kappa$ B家族由5种蛋白组成，它们分别是p65 (REL-A)、c-REL、REL-B、p50和p52。这5种蛋白都含有REL同源结构域 (REL-homology domain, RHD)。有了它，这些蛋白就可以发挥与DNA分子相结合、形成二聚体、入核、与I $\kappa$ B蛋白结合等各种功能了。此外，p65 (REL-A)、c-REL和REL-B蛋白都含有一反式激活结构域 (transactivation domain, TAD)。该结构域在基因激活过程中可以起到关键作用。p50和p52蛋白分别由其前体蛋白p105和p100降解而来，它们必须与含有TAD结构域的其他蛋白形成二聚体才能行使转录激活的作用。p105和p100蛋白都含有C末端锚蛋白重复序列 (ankyrin repeats)，I $\kappa$ B- $\alpha$ 、I $\kappa$ B- $\beta$ 、I $\kappa$ B- $\epsilon$ 等I $\kappa$ B家族蛋白也含有该重复序列。锚蛋白重复序列可以与NF- $\kappa$ B蛋白的RHD结构域相结合，遮盖其核定位信号，使其滞留在胞质中。

## 1.1 I $\kappa$ B蛋白降解与NF- $\kappa$ B前体蛋白处理过程

NF- $\kappa$ B蛋白活化过程可以大致分为两种情况，即经典活化途径与非经典活化途径。在被大多数细胞所采用的经典活化途径里，细胞在刺激信号的作用之下，I $\kappa$ B蛋白会在I $\kappa$ B激酶复合体 (I $\kappa$ B kinase, IKK) 的作用之下快速发生磷酸化修饰。IKK含有两个催化亚单位——IKK- $\alpha$ 和IKK- $\beta$ ，以及一个调节亚单位IKK- $\gamma$ ，也被称为NEMO亚单位 (图1)。I $\kappa$ B蛋白磷酸化修饰之后会经由含有F-box结构域的蛋白 $\beta$  TrCP被招募至泛素连接酶复合体当中。 $\beta$  TrCP蛋白含有WD40重复结构域 (WD40-repeat domain)，它可以特异性地与I $\kappa$ B蛋白N末端两个被磷酸化修饰的丝氨酸位点相结合。 $\beta$  TrCP蛋白通过F-box结构域与SKP1蛋白相结合，而SKP1蛋白参与了E3泛素连接酶复合体SCF的集合组装过程。该SCF复合体还含有CUL1蛋白和ROC1蛋白 (也被称为Rbx1蛋白)。ROC1蛋白含有的RING结构域可以招募E2泛素结合酶，使已被磷酸化修饰的I $\kappa$ B蛋白发生多泛素化修饰。这种被泛素化修饰后的I $\kappa$ B蛋白虽然仍然与NF- $\kappa$ B蛋白结合在一起，但是很快就会被26S蛋白酶体降解掉，从而“释放”NF- $\kappa$ B蛋白。

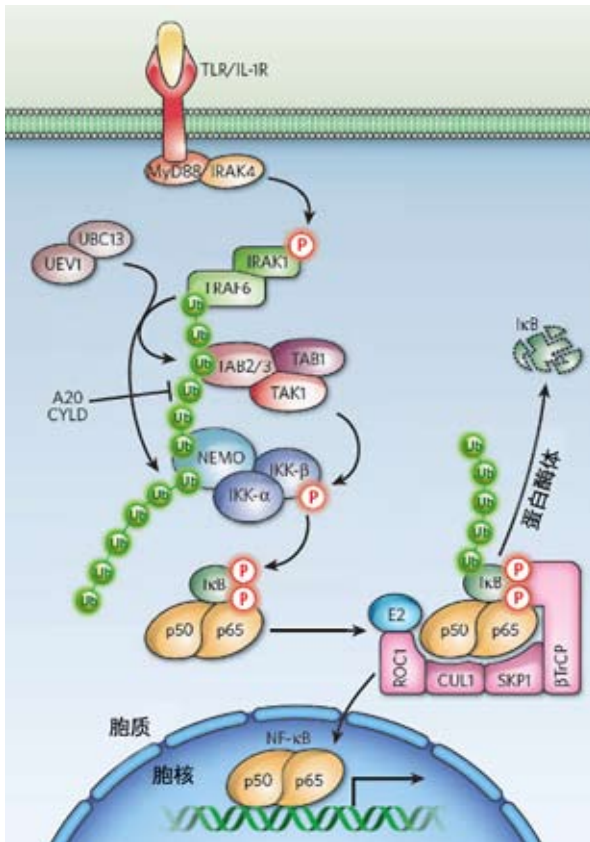


图1 泛素化途径介导的经由TLR受体 and IL-1R受体的NF- $\kappa$ B活化过程。配体与TLR受体和IL-1R受体结合之后会招募MyD88蛋白，然后会招募激酶IRAK1蛋白和IRAK4蛋白。IRAK4蛋白继而磷酸化并激活IRAK1蛋白。磷酸化的IRAK1蛋白再与TRAF6蛋白相结合，激活TRAF6蛋白。然后TRAF6蛋白与UBC13/UEV1 E2复合体一起催化形成多泛素蛋白聚合体。该多泛素蛋白聚合体会通过TAK1蛋白和IKK蛋白的泛素蛋白结合亚基TAB2/3和NEMO招募TAK1蛋白和IKK蛋白复合体。TAK1蛋白与IKK蛋白复合体结合之后TAK1蛋白会磷酸化IKK- $\beta$ 蛋白，然后IKK- $\beta$ 蛋白再磷酸化修饰I $\kappa$ B蛋白。 $\beta$  TrCP这个SCF E3连接酶复合体能特异地与磷酸化修饰的I $\kappa$ B蛋白相结合，再在E2酶的作用下多泛素化修饰I $\kappa$ B蛋白。就这样，I $\kappa$ B蛋白被蛋白酶体降解，使NF- $\kappa$ B蛋白进入核内，发挥其转录因子作用。

NF- $\kappa$ B蛋白的非经典活化途径主要发生在B细胞当中。整个过程主要包括将NF- $\kappa$ B蛋白的前体蛋白p100处理成成熟的p52亚单位。刺激肿瘤坏死因子受体（tumour necrosis factor receptor, TNFR）超家族的部分蛋白，比如CD40蛋白和BAFF受体，会激活蛋白激酶NIK，然后NIK蛋白使IKK- $\alpha$ 蛋白磷酸化并激活。继而活化的IKK- $\alpha$ 蛋白催化p100前体蛋白C末端的两个丝氨酸位点磷酸化，经磷酸化修饰的p100蛋白就可以被SCF- $\beta$  TrCP E3复合体识别了。不过p100蛋白经多泛素化途径修饰后并不会被蛋白酶体完全降解，蛋白酶体只会降解其含有锚蛋白重复序列的C末端，而不会影响含有RHD结构域的N末端（即p52亚单位）。这样，p52蛋白就可以与REL-B结合形成二聚体，促使能够使B细胞成熟及活化的目的基因表达。这种泛素—蛋白酶体途径同样也在将p105前体蛋白处理成为p50蛋白的过程中发挥了作用。虽然有报道称佛波酯（phorbol ester）等物质能够增强p105前体蛋白的成熟过程，但这种泛素—蛋白酶体处理方式仍然是一种起决定性作用的、稳定的组成型处理方式。

## 1.2 泛素介导的蛋白激酶活化过程

I $\kappa$ B蛋白的磷酸化过程以及IKK蛋白介导的p100蛋白的磷酸化过程都只是后续泛素化修饰过程以及蛋白酶体降解或处理过程所需要的一个先决条件。因此我们有必要了解一下IKK蛋白是如何受到其上游信号因子调控的。令人惊奇的是，泛素化修饰过程居然也在IKK蛋白的活化过程中起到了主要作用，不过此时泛素化修饰过程并没有与蛋白酶体降解过程相偶联。我们之所以发现这一点（泛素化修饰途径对IKK蛋白的活化作用）是因为在逐步寻找I $\kappa$ B激酶的生化试验中发

现了一些蛛丝马迹。在体外试验中我们发现， $\text{I}\kappa\text{B}$ 激酶经多泛素蛋白修饰后，其激酶活性会大为升高，而且这是在没有蛋白酶体存在的情况下或是在存在蛋白酶体抑制剂的情况下得到的实验结果。

后来，我们又通过对TRAF6蛋白的生化研究对泛素介导的IKK蛋白激活途径有了更进一步的了解。TRAF6蛋白也含有RING结构域，可以借此通过白介素1 (interleukin-1, IL-1) 和TOLL样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 激活IKK蛋白 (图1)。TRAF6蛋白就是一种E3连接酶，它与由UBC13蛋白和UEV1A蛋白组成的E2结合酶复合体一起催化泛素蛋白之间通过第63位赖氨酸位点形成多泛素蛋白聚合物。这种多泛素蛋白可以激活由TAK1、TAB1、TAB2 (或TAB3) 蛋白组成的蛋白激酶复合体，其中TAB2蛋白和TAB3蛋白尤其容易与多泛素蛋白相结合。这种多泛素修饰作用可能是通过自身磷酸化作用 (autophosphorylation) 激活TAK1蛋白的。TAK1蛋白被激活后可以使IKK- $\beta$  蛋白活性loop中的两个丝氨酸位点发生硫酸化修饰，从而激活IKK- $\beta$  蛋白。TAK1蛋白也能够磷酸化MAPK激酶，比如MKK6蛋白和MKK7蛋白，继而激活JNK和p38激酶信号通路。

TAK1蛋白磷酸化修饰IKK- $\beta$  蛋白需要NEMO蛋白的参与。NEMO蛋白含有一独特的泛素蛋白结合结构域 (ubiquitin-binding domain)。如果用点突变技术突变破坏掉NEMO蛋白的泛素蛋白结合结构域，正如那些在外胚层发育不良的免疫缺陷个体中见到的那样，则会破坏掉其激活IKK蛋白的功能。用各种不同的NF- $\kappa\text{B}$  激活因子刺激细胞之后我们可以发现，NEMO蛋白的多个位点都会被多泛素蛋白修饰，这可能就与IKK蛋白的活化有关。研究发现，参与IL-1途径的其它蛋白，比如IRAK1蛋白和TRAF6蛋白也会被多泛素蛋白所修饰，不过我们还需要进行更深入的研究来了解这种泛素化修饰作用对于IKK蛋白的活化是否会起到重要的作用。

### 1.3 DUB蛋白能阻止蛋白激酶的活化

在后来的研究当中我们又发现有好几种DUB蛋白能够负向调控NF- $\kappa\text{B}$  的上游因子IKK蛋白，这更加说明多泛素化修饰作用对于IKK蛋白的活化具有重要作用。这些DUB蛋白既包括CYLD蛋白这种在诸如圆柱瘤病 (cylindromatosis)、多发性骨髓瘤 (multiple myeloma) 等多种人类疾病当中常见的肿瘤抑制因子，也包括A20蛋白这种NF- $\kappa\text{B}$  抑制剂。CYLD蛋白含有3个细胞骨架相关蛋白 (cytoskeleton-associated protein, CAP)-甘氨酸结构域以及一个C末端泛素蛋白特异性蛋白酶 (ubiquitin-specific protease, USP) 催化结构域。因此，CYLD蛋白能高度特异性地水解63位赖氨酸连接的多泛素蛋白复合体，阻止好几条信号通路中的TAK1蛋白、JNK蛋白和IKK蛋白的活化 (图1)。目前，世界各地几个实验室已经成功构建了几种CYLD突变小鼠动物模型。虽然已有报道称这些小鼠表型各不相同，但它们都表现出了与IKK过度激活有关的炎症反应过度症状。

A20蛋白含有N末端卵巢癌型 (ovarian tumour, OTU) DUB结构域，以及C末端的7个锌指结构域。该OTU结构域能水解泛素化修饰靶蛋白，比如RIP1蛋白这种经由TNF- $\alpha$  激活的IKK蛋白活化过程中的关键信号蛋白上的63位赖氨酸连接泛素修饰蛋白 (图2)。另外，A20蛋白C末端的锌指结构域具有泛素连接酶活性，能够催化RIP1蛋白通过第48位赖氨酸位点被多泛素蛋白修饰，继而被蛋白酶体所降解。不过在体外试验中我们发现A20蛋白能够同时水解63位赖氨酸连接泛素修饰蛋白和48位赖氨酸连接泛素修饰蛋白。这说明在细胞内，可能会有其它细胞蛋白帮助



A20蛋白获得泛素水解酶底物特异性和泛素连接酶底物特异性。实际上，与A20蛋白有关的NF- $\kappa$ B A20蛋白结合抑制剂（A20-binding inhibitors of NF- $\kappa$ B, ABIN）和TAX1结合蛋白1（TAX1-binding protein 1, TAX1BP1）都含有泛素蛋白结合结构域。在缺乏TAX1BP1蛋白的细胞中A20蛋白就无法水解掉TRAF6和RIP1靶蛋白上的泛素蛋白，结果导致NF- $\kappa$ B信号通路过度活化。A20蛋白还能与ITCH蛋白相结合，ITCH蛋白是含有HECT结构域的E3泛素连接酶，它在阻止自身免疫性疾病的发生发展过程中起到了非常重要的作用。由于ITCH蛋白参与了TNF $\alpha$ 介导的RIP1蛋白的降解过程，于是就出现了一个问题，ITCH蛋白和（或）A20蛋白是否直接参与了RIP1蛋白的泛素化修饰过程及降解过程？无论如何，A20蛋白可能就是通过泛素修饰途径来抑制NF- $\kappa$ B信号通路的。

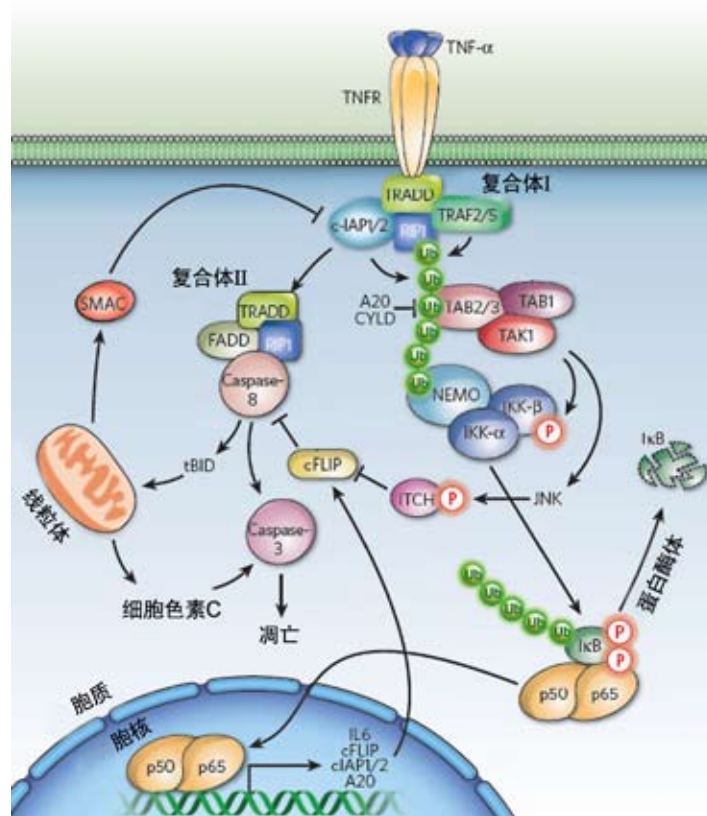
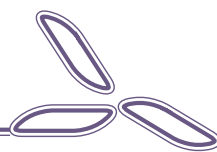


图2 泛素化途径通过TNFR受体介导的NF- $\kappa$ B活化以及细胞凋亡过程。TNFR三聚体与TNF- $\alpha$ 结合之后，与TRADD相结合，然后招募TRAF2/5、RIP1和cIAP1/2蛋白，从而形成复合体I。在复合体I内，RIP1蛋白会被多泛素化修饰，然后招募并激活TAK1和IKK复合体。在复合体I形成并激活NF- $\kappa$ B信号途径之后，在胞质中会继续形成由TRADD、FADD、RIP1和胱冬肽酶原8（procaspase-8）组成的复合体II。胱冬肽酶原8会成熟形成半胱天冬酶8（caspase-8），然后切割胱冬肽酶原3（procaspase-3）使其成熟形成半胱天冬酶3（caspase-3），启动凋亡机制。胱冬肽酶原8也能切割BID蛋白，使其成为截短体tBID蛋白。tBID蛋白能插入线粒体膜中，损伤线粒体，释放出细胞色素C，进一步激活半胱天冬酶3和SMAC。SMAC再促进cIAP降解，这就能阻止RIP1参与形成复合体II。大部分细胞在受到TNF- $\alpha$ 刺激之后都不会发生凋亡，这是因为NF- $\kappa$ B诱导表达的cFLIP能抑制半胱天冬酶8的活性。在某些情况下，活化的JNK蛋白磷酸化修饰E3连接酶ITCH，ITCH酶进而降解cFLIP蛋白，使细胞发生凋亡。

## 2. 泛素蛋白在天然免疫中的作用



天然免疫是我们与生俱来的一种非常有效的免疫机制，它是人体抵御外来侵袭的第一道防线。病原微生物突破了机体的物理屏障之后马上就会被体内的各种免疫细胞以及非免疫细胞侦测到。这种侦测作用受到与病原体相关分子模式（**pathogen-associated molecular patterns, PAMP**）相结合的受体的调控。所谓病原体相关分子模式指的是那些病原体生存所必须的、同时又是人体宿主中没有的结构恒定且进化保守的分子结构，而且是病原体中变化较少的主要部分，比如病毒的双链RNA和细菌的脂多糖。对此，病原体很难产生突变而逃脱固有免疫的作用。

### PAMP主要包括两类

- ① 以糖类和脂类为主的细菌胞壁成分，如脂多糖、肽聚糖、脂磷壁酸、甘露糖、类脂、脂阿拉伯甘露聚糖、脂蛋白和鞭毛素等。其中最为常见且具有代表性的是：革兰阴性菌产生的脂多糖（**liposachride, LPS**）、革兰阳性菌产生的肽聚糖（**proteoglycan**）、分枝杆菌产生的糖脂（**glicolipid**）和酵母菌产生的甘露糖。
- ② 病毒产物及细菌胞核成分，如非甲基化寡核苷酸CpGDNA、单链RNA以及双链RNA。需要指出的是，上述PAMP可以表达在病原体表面或游离于免疫细胞之外，也可以出现在免疫细胞的胞质溶胶，以及溶胶中各种携带病原体的胞内区室（**intracellular compartment**），如内体和吞噬溶酶体中。这些与PAMP相结合的人体受体统称为模式识别受体（**pattern recognition receptors, PRR**），它们能够激活各种与机体抵抗微生物有关的信号通路，比如细胞因子和趋化因子等。TNF- $\alpha$ 这类细胞因子可以触发强烈的免疫反应，限制病原微生物的生长，同时招募免疫细胞到机体感染部位。而另一些细胞因子，比如I型干扰素（**IFN-I**）不仅能激活抑制病毒复制、组装的信号通路，还能激活获得性免疫机制，清除感染微生物。

与体细胞基因发生重排和高度突变所产生的T细胞和B细胞上表达的抗原受体不同，PRR受体是胚系基因编码的受体，因此它们属于进化上保守的蛋白。到目前为止，我们已经对三种PRR受体进行了深入的研究，分别是TLR、NOD样受体（**NOD-like receptors, NLR**）和RIG-I样受体（**RIG-I-like receptors, RLR**）。这三种受体都可以激活相应的信号通路，导致MAP激酶和NF- $\kappa$ B蛋白活化。此外，RLR受体和一些TLR受体还能激活干扰素调节因子（**interferon regulatory factors, IRF**）。IRF与NF- $\kappa$ B蛋白以及其它一些转录因子共同发挥作用，可以刺激细胞产生IFN-I和其它一些效应因子。泛素化途径在上述三种PRR受体激活的信号通路中都起到了非常关键的作用（图3）。另外，通过对TNF信号通路进行的深入研究发现，泛素化途径还通过对NF- $\kappa$ B信号通路和凋亡的调控控制了细胞的存活与死亡（图2）。

## 2.1 TNF信号通路

TNF- $\alpha$  蛋白是PRR受体激活天然免疫系统后机体产生的主要效应分子之一。它现在正是科学研究的热点。TNF- $\alpha$  蛋白主要是通过其受体TNFR1分子来发挥作用，也可以通过另一个受体TNFR2分子来发挥作用。TNFR1分子和TNFR2分子都属于TNFR超家族，而且是重要成员。如果激活了TNFR超家族蛋白，比如TNFR1，就会导致细胞死亡。因此，TNFR1信号通路可以供我们深入研究免疫机制与细胞死亡之间的关系。

TNFR1蛋白是以三聚体的形式与同样为三聚体的TNF- $\alpha$  蛋白相结合的。TNFR1蛋白可以招募由TRADD、RIP1、TRAF2、TRAF5、cIAP1和cIAP2等蛋白组成的信号复合体I（图2）。需要提及的是，复合体I中的TRAF蛋白和cIAP蛋白都是含有RING结构域的泛素连接酶。在TNF- $\alpha$  被激活之后，RIP1蛋白也会被多泛素蛋白修饰，如果在RIP1蛋白中引入突变阻止其泛素化修饰就会抑制IKK的活化。遗传学研究表明，TRAF2蛋白是RIP1蛋白泛素化修饰所必需的，但是目前还没有体外实验能够直接证明TRAF2蛋白或TRAF5蛋白能催化RIP1蛋白的泛素化过程。最近有研究表明，cIAP1蛋白和cIAP2蛋白可以催化RIP1蛋白泛素化过程，同时它们也是IKK蛋白经由TNF- $\alpha$  蛋白活化过程所必需的。RIP1蛋白的多泛素化过程会通过多泛素蛋白复合体与TAB2或TAB3之间的结合招募TAK1激酶复合体。多泛素蛋白复合体也能与NEMO相结合，因此能够将IKK募集到膜受体复合体中的TAK1蛋白上，于是IKK蛋白得以通过TAK1蛋白被磷酸化修饰。

TNFR复合体I形成之后，含有死亡结构域（death-domain）的蛋白TRADD和RIP1会从膜受体复合体中脱离出来，然后与FADD蛋白结合，在胞质中形成复合体II（图2）。FADD蛋白能促使胱冬肽酶原8自我活化，形成半胱氨酸天冬酶8，然后半胱氨酸天冬酶8会切割胱冬肽酶原3，启动凋亡程序。不过，由TNF- $\alpha$  因子启动的凋亡程序通常都不会发生，因为NF- $\kappa$  B能诱导c-FLIP（该蛋白是半胱氨酸天冬酶8抑制剂）等抗凋亡蛋白的表达。为了使凋亡程序得以顺利进行下去，就必须去除掉c-FLIP等因子，可以采取抑制它们合成或促进它们降解的方法。c-FLIP等因子的合成可以被广谱蛋白合成抑制剂环己酰胺（cyclohexamide）抑制，也可以特异性地抑制NF- $\kappa$  B信号通路来抑制c-FLIP等因子的合成。这样就可以促使TNF $\alpha$  启动的凋亡程序顺利进行下去。c-FLIP蛋白的降解过程主要由ITCH这种泛素连接酶介导，JNK蛋白催化的磷酸化过程可以增强ITCH酶的活性。

TNF $\alpha$  介导的凋亡途径也可以被cIAP以一种独特的依赖泛素修饰途径的方式所抑制。cIAP1蛋白和cIAP2蛋白都能与SMAC蛋白（也被称为DIABLO蛋白）相结合，SMAC蛋白是一种线粒体蛋白，在凋亡信号的刺激下它可以从线粒体中释放到胞质中。SMAC蛋白或小分子SMAC类似物等分子与cIAP蛋白结合之后会促使这些泛素连接酶分子二聚化并自身泛素化，从而被蛋白酶体降解。在缺乏cIAP蛋白的情况下，复合体I中的受体相关RIP1蛋白会被CYLD蛋白快速去泛素化，然后RIP1蛋白会被释放进入胞质中，形成复合体II，启动凋亡程序。cIAP蛋白这种泛素连接酶能泛素化修饰NIK激酶，使其被蛋白酶体降解。在缺乏cIAP蛋白的情况下，NIK激酶非常稳定，能通过非经典途径激活NF- $\kappa$  B蛋白，诱导TNF- $\alpha$  表达，TNF- $\alpha$  可以通过自分泌的方式促使细胞凋亡。

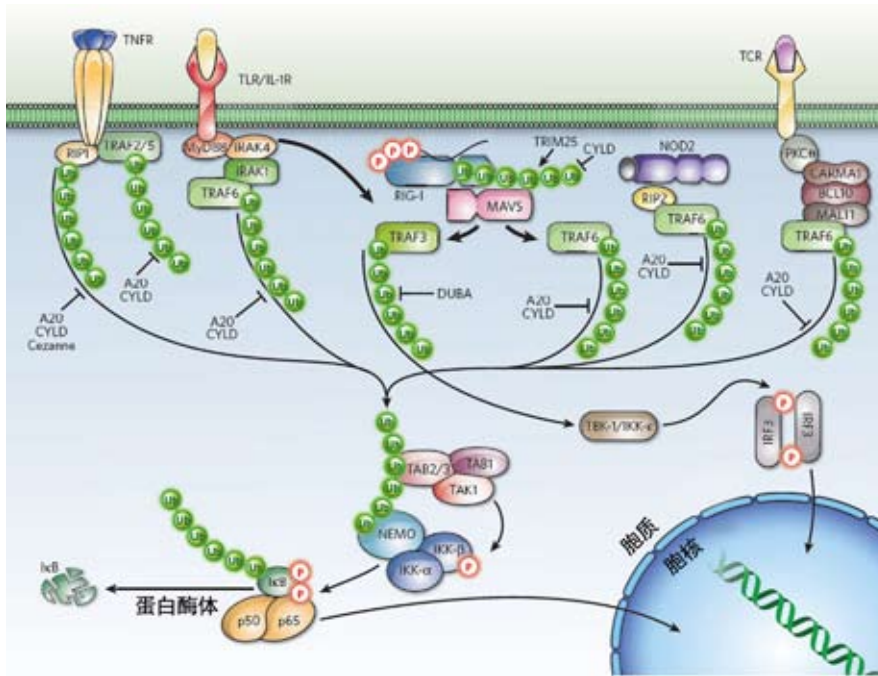


图3 第63位多泛素化修饰途径在天然免疫和获得性免疫机制中的作用。除了在前文中提及的IL-1R/TLR和TNFR受体途径之外，第63位多泛素化修饰途径还参与了其它受体，比如TCR、NLR（例如NOD2）、RLR（例如RIG-1）等介导的免疫反应途径。在上述每一条通路中，TRAF蛋白，比如TRAF6蛋白都会起到泛素连接酶的作用，来催化第63位多泛素化修饰反应，激活TAK1和IKK复合体。在RIG-1通路中，TRIM25蛋白能多泛素化修饰RIG-1蛋白，然后激活MAVS。MAVS不仅能激活NF- $\kappa$ B，还能激活IRF3，诱导细胞表达I型干扰素。IRF3的激活需要TRAF3和IKK样激酶和TBK1以及IKK- $\epsilon$ 的参与。在每一条途径中形成的多泛素蛋白可以在A20、Cezanne、CYLD、DUBA等DUB酶的作用下被降解，这就提供了一条下调免疫反应的途径。

## 2.2 TLR信号途径

TLR受体的名字源于果蝇体内的TOLL蛋白。小鼠体内共有12种TLR受体，即TLR1-9和TLR11-13；在人体内有10种，即TLR1-10。所有这些TLR受体都是膜结合受体，含有胞质Toll-IL-1受体（Toll-IL-1 receptor, TIR）结构域，它们可以和信号配体发生相互作用。这些TLR受体依据它们各自在细胞中的定位可以被分成好几类，比如TLRs 3、7、8、9属于内体小泡TLR（Endosomal TLR），它们从内质网被转移至内体小泡中。在内体小泡中这些TLR受体可以从细胞内吞微生物当中获得腔内PAMP（luminal PAMP）。这些TLR受体还可以位于细胞膜上，在细胞膜上它们可以感受胞外的PAMP信号。每一种TLR受体都可以识别一种特定的PAMP信号，因此多种TLR受体一起就可以识别出病毒、细菌、真菌、原生生物等多种病原微生物。这些受体启动的各种信号通路最终都会激活NF- $\kappa$ B信号通路，在某些情况下TLRs 3、4、7、8、9还会激活IRF通路。

TLR受体和IL-1R受体介导的信号通路实际上都是通过它们的TIR结构域和相似的作用途径来发挥作用的（图1）。这些受体（除了TLR3受体之外）的TIR结构域能够与受体的配体MyD88蛋白的TIR发生相互作用。随即，MyD88蛋白开始招募IRAK家族蛋白。被招募到受体复合体中



的IRAK4蛋白又能磷酸化激活IRAK1蛋白和IRAK2蛋白，然后会促进TRAF6蛋白的寡聚化过程，从而激活了TRAF6的泛素连接酶活性。正如我们前文提到的那样，TRAF6蛋白与E2结合酶复合体UBC13-UEV1A一起可以催化63赖氨酸位点连接的多泛素化修饰过程，激活TAK1、IKK和MAPK。

TLR3和TLR4受体通过与它们各自的配体（分别是双链RNA和脂多糖）相结合的方式能与另一含有TIR结构域的配体TRIF发生相互作用，TRIF继而与TRAF6和RIP1蛋白相结合，激活NF- $\kappa$ B信号通路。TRIF蛋白也能与IKK样激酶TBK1和IKK- $\epsilon$ 相结合，这些IKK样激酶会磷酸化其底物IRF3蛋白。被磷酸化修饰的IRF3蛋白能形成二聚体，随后进入核内，与NF- $\kappa$ B蛋白和活化的转录因子2（activating transcription factor 2, ATF2）一起形成能诱导IFN- $\beta$ 表达的增强子复合体。还有一些TLR受体也能诱导IFN-I表达，这些受体包括TLR7、TLR8和TLR9。TLR7和TLR8能与病毒单链RNA结合，而TLR9则能与未甲基化的CpG DNA相结合。它们结合之后能招募胞质中由MyD88、IRAKs和TRAF6组成的胞质信号复合体。在某些特定类型树突状细胞，比如类浆细胞树突状细胞（plasmacytoid dendritic cells, pDC）等细胞内体膜上组装形成的胞质信号复合体不仅能激活NF- $\kappa$ B，也能激活IRF7，而IRF7正是调节IFN-I，尤其是IFN- $\alpha$ 分子表达的主要调控因子。IRF7因子被激活之后会招募UBC13蛋白和含有RING结构域的TRAF6蛋白，这说明多泛素化修饰作用在IRF转录因子家族蛋白的活化过程中也起到了非常重要的作用。不过泛素化途径是如何经由内体上的TLR受体激活IRF蛋白的，我们目前还不是非常清楚。

### 2.3 NLR信号通路

NLR是一大类胞质家族蛋白，它们大部分都能形成三聚体结构。所有的NLR蛋白都含有一中心核酸结合结构域（nucleotide-binding domain, NBD），该结构域也被称为NACHT结构域，它能够与ATP相结合调控其寡聚化过程。NLR蛋白还含有C末端LRR结构域，该结构域能侦测PAMP信号，也能参与蛋白自身抑制过程。在NLR蛋白的N末端还具有半胱天冬酶活化结构域（caspase activation domain）和半胱天冬酶招募结构域（caspase recruitment domain）、热蛋白结构域（pyrin domain, PYD）、杆状病毒IAP重复结构域（baculovirus IAP repeat domain, BIR）或酸性活化结构域（acidic activation domain），上述结构域与NLR蛋白招募下游信号因子有关。NOD1和NOD2这两种发现于消化道上皮细胞中的、目前研究得最为深入的NLR蛋白能探测到消化道中是否有来源于细菌细胞壁的肽聚糖分子。NOD2蛋白发生突变与人体罹患克隆氏病这种免疫性肠道紊乱疾病有关。

最近，通过对能激活NF- $\kappa$ B和MAPK通路的NOD1和NOD2蛋白的研究表明，泛素化与NLR受体介导的信号转导过程有关（图3）。细菌感染能促进NOD蛋白形成同源寡聚体，从而能招募RIP2蛋白（又名RICK蛋白，是一种含有CARD结构域的蛋白激酶）。与RIP1蛋白一样，RIP2蛋白能通过依赖TAK1蛋白和63位赖氨酸多泛素化修饰的途径激活IKK蛋白。这种多泛素化修饰途径的靶蛋白是RIP2蛋白和NEMO蛋白，这种修饰过程需要UBC13和TRAF家族蛋白TRAF2、TRAF5和TRAF6的参与。另外，RIP2蛋白的泛素化修饰过程会受到A20蛋白的限制，在缺乏A20蛋白的巨噬细胞中NF- $\kappa$ B信号通路的活性会增强，因此会促使炎症因子表达，以应对NOD2蛋白的刺激。在NOD2蛋白发生突变的克隆氏患者体内，突变的NOD2蛋白激活NEMO泛素化的能力以及激活IKK蛋白的能力会被削弱。综上所述，多泛素化修饰途径在NOD信号通路中起到了至关重要的作用。

## 2.4 RLR信号通路

在细胞内共有三种RLR蛋白，它们是RIG-I、MDA5和LGP2，三者皆含有RNA解旋酶结构域，能够识别胞质中的病毒双链RNA。而且RIG-I蛋白和LGP2蛋白还都含有C末端调节结构域，该结构域能特异性地与5'端未加帽的病毒单链RNA分子相结合。与病毒RNA不同的是，细胞RNA分子通常都是5'端加帽的RNA。RIG-I蛋白和MDA5蛋白的N末端还都含有CARD结构域，它们能够与下游配体分子MAVS（又名IPS-1、VISA或CARDIF）的CARD结构域相互作用。不过由于LGP2蛋白缺乏这种N末端CARD结构域，因此认为它能起到调控RIG-I和MDA5信号通路的作用。MAVS蛋白含有一跨膜结构域，使得该蛋白部分能位于线粒体外膜上，这种定位机制对于激活胞质中的IKK和TBK1/IKK- $\epsilon$ 非常重要。MAVS使这些激酶活化之后能进一步激活NF- $\kappa$ B和IRF3，最终导致细胞内IFN-I和其它抗病毒效应分子大量表达。

最近的研究表明，这种第63位赖氨酸位点的多泛素化修饰途径是RIG-I信号通路中非常关键的一种调控机制（图3）。细胞受到病毒感染之后，RIG-I蛋白中的第二个CARD结构域会受到多泛素蛋白的修饰，于是增强了RIG-I蛋白与MAVS蛋白的结合能力。这种泛素化修饰过程是由TRIM25这种含有RING结构域的泛素连接酶催化的。如果细胞缺乏TRIM25酶就不会在受到病毒感染之后表达I型干扰素分子了。另外，如果突变掉RIG-I蛋白中的泛素化修饰位点，也能影响到细胞表达IFN-I的能力。后来我们又发现CYLD分子能逆转RIG-I蛋白的泛素化修饰过程，从而抑制病毒诱导的IFN-I分子表达，这更进一步表明泛素化修饰途径在RIG-I活化途径中所发挥的重要作用。

在由MAVS介导的RIG-I蛋白下游信号途径中，泛素化修饰作用仍然起到了重要作用。MAVS蛋白含有两个保守的TRAF6结合位点以及一个能与TRAF2蛋白或TRAF3蛋白相结合的基序。MAVS招募TRAF2和TRAF6的过程对于NF- $\kappa$ B的活化非常重要，但是MAVS招募TRAF3之后就只能激活IRF3。与TRAF2和TRAF6一样，TRAF3分子也含有N端RING结构域，因此它能激活IRF3蛋白。正如TRAF3多泛素化修饰之后能够激活MAVS信号通路一样，DUBA这种新近发现的DUB酶也能够抑制TBK1蛋白和IRF3蛋白。

## 3. 泛素化修饰途径在获得性免疫机制中的作用



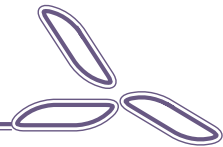
获得性免疫机制是受到能表达各种抗原受体的T细胞和B细胞调控的一种机体免疫机制。T细胞受体（T-cell receptors, TCR）能识别人体树突状细胞等抗原呈递细胞（antigen-presenting cells, APC）上表达的外来多肽与机体主要组织相容性复合物结合形成的复合物。当树突状细胞被PAMP激活之后，它就会在细胞表面上表达外来多肽与机体主要组织相容性复合物结合形成的复合物，以及其它各种T细胞共刺激因子。T细胞最初的活化或称为引发过程需要MHC分子与TCR受体之间发生相互作用，同时也需要上述各种T细胞共刺激因子与其各自受体之间的相互作用来配合。T细胞活化之后机体就会进入免疫反应的适应性阶段。因为就是说，T细胞在接受了足够的MHC和共刺激因子的刺激之后开始进入克隆性扩增阶段，并表现出相应的功能。CD8<sup>+</sup> T细胞

在抗病毒免疫反应中起到了非常重要的作用，因为它能直接通过MHC-I和TCR与受感染细胞发生相互作用而使这些细胞裂解。CD4<sup>+</sup> T细胞则主要起辅助功能，它们可以分泌细胞因子来调控机体其它免疫细胞，比如CD8<sup>+</sup> T细胞和B细胞介导的免疫反应。B细胞是机体获得性免疫机制中的另一支“骨干力量”，它们会通过细胞上的B细胞受体与抗原的直接接触被激活。激活之后，B细胞会发生增殖、成熟变成浆细胞，然后分泌抗体。

### 3.1 TCR信号通路

TCR受体与外源性多肽-MHC分子结合之后，TCR复合体就会启动酪氨酸磷酸化级联反应，激活丝氨酸-苏氨酸激酶（serine-threonine kinase）PKC $\theta$ 。PKC $\theta$ 激酶能够诱导形成CBM复合体，该复合体含有CARMA1、BCL10和MALT1（图3）。CBM复合体形成之后最终会激活IKK蛋白。MALT1蛋白含有能与TRAF2蛋白和TRAF6蛋白相结合的结构域，因此能将TRAF6蛋白招募至CBM复合体，通过促进TRAF6蛋白的寡聚化作用激活其E3连接酶的活性。到目前为止，我们已经发现了好几个TRAF6蛋白的靶蛋白，比如BCL10、MALT1、NEMO以及TRAF6蛋白自身。在TCR信号刺激作用下，这些靶蛋白经多泛素化途径修饰之后都有可能招募并激活TAK1-IKK复合体。在这条TCR信号途径中，TAK1蛋白及其泛素化修饰的作用已经为T细胞中敲除了TAK1或UBC13基因的小鼠模型所证实了。敲除了TAK1基因或UBC13基因之后，小鼠胸腺及外周T细胞在受到TCR信号刺激之后IKK和MAPK的活化会受到严重影响。不过有一项研究表明在巨噬细胞和成纤维细胞等其它细胞系中敲除UBC13基因只能抑制MAPK的活化，而不能抑制IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 诱导的NF- $\kappa$ B活化。但另一项研究却发现如果只敲除掉UBC13等位基因中的一个基因，就能抑制多种炎症因子刺激后导致的NF- $\kappa$ B的活化。因此，UBC13蛋白与NF- $\kappa$ B信号通路的关系可能是依细胞系以及刺激信号的不同而各异。很有可能在某些细胞中或某些情况之下，会有其它的E2泛素结合酶，比如UBC5来取代UBC13，发挥调控NF- $\kappa$ B信号通路的作用。

## 4. 泛素修饰系统在自身免疫机制中的作用



骨髓里的T细胞前体细胞迁移到胸腺之后会在胸腺中经历一次复杂的筛选过程，然后才能发育成为成熟的T细胞进入外周免疫器官。这种胸腺中的T细胞选择过程主要就是为了只让那些能识别外源性多肽的T细胞发育成熟，而能识别自体多肽的T细胞会被清除掉，以防止出现自身免疫的情况。这种清除自身识别T细胞的过程被称为中心耐受（central tolerance）作用，也被称为胸腺耐受。不过该过程并非滴水不漏，有时也会出现一些漏网之鱼。在一般情况下，这些自身免疫性T细胞并不会造成多大的危害，这是因为机体还布置了第二道防线，即外周耐受（peripheral tolerance）作用。这种耐受作用是通过抗原诱导导致T细胞死亡，或者T细胞缺乏共刺激因子因而无法活化等机制来发挥作用的。这些自身反应性T细胞还可以受到调节性T细胞T<sub>reg</sub>的调控。好几种E3连接酶都参与了这种中心耐受和外周耐受的调控过程（图4）。

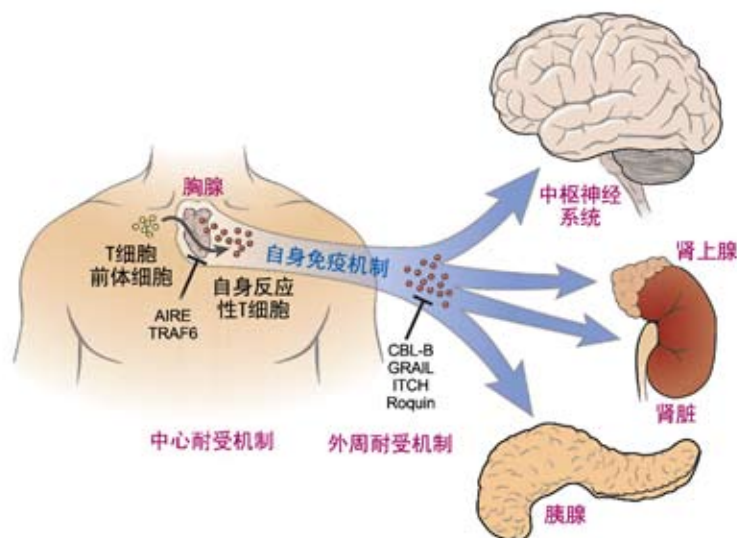


图4 泛素连接酶在抑制自身免疫反应方面的作用。在胸腺中发育的T细胞前体细胞都会经历筛选过程，因此大部分的潜在自身反应性细胞都会被清除掉，不会进入外周免疫器官。这种胸腺筛选过程又名中心耐受作用，该过程主要发生在胸腺髓状上皮细胞（medullary thymic epithelial cells）内，需要AIRE和TRAF6 E3连接酶的参与。从胸腺中“逃离出来”的自身反应性T细胞还会受到各种外周耐受作用的继续“打压”。在这些外周耐受作用中也都会有CBL-B、GRAIL、ITCH和Roquin等E3连接酶的参与。中心耐受和外周耐受途径中的E3连接酶如果发生突变，就会激活自身反应性T细胞，从而诱发各种自身免疫性疾病。

#### 4.1 泛素连接酶在中心耐受中的作用

在胸腺中，表达有能识别自身MHC抗原TCR的T细胞会在正向选择（positive selection）过程中存活下来。那么要保证这些危险的自身反应性T细胞不会进入外周免疫器官，攻击自身组织，胸腺就必须用负向选择（negative selection）过程清除掉这些结合自我肽段-MHC复合物的T细胞。胸腺树突状细胞和骨髓上皮细胞（medullary epithelial cells, mTEC）通过在其细胞表面表达大量的自体抗原在负向选择中起到了重要作用。离开胸腺的成熟T细胞已经能够耐受各种外周组织抗原（peripheral tissue antigens, PTA）了。在mTEC细胞上表达PTA的过程会受到核蛋白AIRE的调控，如果AIRE蛋白发生突变就会诱发人体自身免疫性疾病外胚层营养不良（APECED，又名APS1）。AIRE蛋白可能含有一个N末端CARD结构域和SAND结构域，以及两个PHD基序。在体外试验中发现，仅靠重组的全长AIRE蛋白或PHD1蛋白与E2酶UBC4或UBCH5b一起就足以催化泛素化修饰过程了。研究发现，在外胚层营养不良患者体内发现的PHD1突变蛋白就没有E3酶活性。不过对于该结论学界还存在一些争议，因此AIRE蛋白是否具有E3酶活性还需要进行进一步的研究加以阐明。

与AIRE基因敲除小鼠一样，缺乏TRAF6蛋白的小鼠体内的多个器官也会出现炎症浸润现象。敲除了TRAF6基因之后会破坏胸腺结构以及mTEC的成熟过程，结果胸腺细胞中的AIRE蛋白表达量也会降低。TRAF6蛋白和NIK蛋白都是REL-B蛋白表达所必需的因子，而REL-B蛋白



又是胸腺表达AIRE蛋白必需的因子。最近的研究还发现CD40和RANK蛋白能调节mTEC细胞内TRAF6蛋白、NIK蛋白和IKK- $\beta$ 蛋白的活化过程。

#### 4.2 泛素化修饰作用在T细胞外周耐受过程中的作用

Cbl-b蛋白是Casitas B淋巴瘤细胞系（Casitas B-lineage lymphoma）蛋白家族中的一员，它是一种含有RING结构域的E3连接酶，能够调节TCR信号途径。如果破坏小鼠体内的Cbl-b蛋白编码基因就会导致PCK $\theta$ 、Akt以及NF- $\kappa$ B蛋白的过度活化。缺乏Cbl-b蛋白的T细胞可以不依靠CD28共刺激因子的协同作用直接被激活，因此无法通过前述的外周耐受调控机制加以抑制。作为Cbl-b蛋白泛素化修饰的底物磷脂酶（phospholipase）C- $\gamma$ 1（PLC- $\gamma$ 1）似乎与外周耐受作用最为相关。在诱导T细胞发生外周耐受的过程当中，Cbl-b蛋白泛素化修饰PLC- $\gamma$ 1底物酶，使其失活、降解，因此能抑制T细胞的活化过程。Cbl-b蛋白可以被含有HECT结构域的泛素连接酶Nedd4所降解，因此Nedd4蛋白能促进T细胞的活化。

GRAIL蛋白是另一种含有RING结构域的E3连接酶，它也在外周耐受机制中发挥了重要作用。易位表达GRAIL蛋白的T细胞杂交瘤细胞（T-cell hybridomas）被刺激之后会在转录水平和翻译水平上降低IL-2和IL-4的表达量。该抑制作用就是依靠GRAIL蛋白的RING结构域来发挥作用的，这就说明了E3连接酶GRAIL蛋白的重要性。我们在无活性的CD4<sup>+</sup>T细胞，比如CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T<sub>reg</sub>细胞中发现GRAIL蛋白的表达水平的确是有所提高。最近我们还发现GRAIL蛋白能够催化RhoGDI蛋白的多泛素化修饰，这也能够抑制Rho A GTP酶的活性。GRAIL蛋白还能促进CD40L蛋白的泛素化修饰和降解过程，而CD40L蛋白正是一种T细胞活化的共刺激因子。

E3连接酶ITCH的HECT结构域在T细胞外周耐受过程中也起到了关键作用。在体内试验中发现ITCH蛋白受到干扰之后就会破坏T细胞的耐受诱导过程，结果形成淋巴样增生（lymphoid hyperplasia）。在耐受机制作用之下，缺乏ITCH蛋白的T细胞内表达T<sub>H</sub>2细胞因子（比如IL-4因子）的水平也会增高，因此该突变型T细胞的存活能力也要比野生型T细胞高。ITCH蛋白会受到JNK激酶的磷酸化修饰，这种磷酸化修饰作用也能增强ITCH蛋白的泛素连接酶活性，导致JunB蛋白经多泛素化修饰途径被降解。在T<sub>H</sub>2细胞中，JunB蛋白能与IL-4基因启动子相结合，促进其转录，是IL-4基因必需的转录因子。因此，如果缺乏ITCH蛋白，JunB蛋白的稳定性就会提高，增强T<sub>H</sub>2细胞反应，导致自体免疫现象出现。ITCH蛋白的另一个底物是TIEG1蛋白，该蛋白是TGF $\beta$ 诱导FoxP3蛋白表达过程中所必需的转录因子，而FoxP3蛋白是维持T<sub>reg</sub>细胞功能的重要因子。ITCH蛋白能催化TIEG1蛋白多泛素化修饰过程，不过这种泛素化修饰过程在激活TIEG1蛋白的同时却不会使其降解。鉴于此，ITCH蛋白可能就是通过诱导T<sub>reg</sub>细胞来调节T细胞外周耐受过程的。

Roquin蛋白是另一种可能含有RING结构域的E3连接酶，它可能也参与了外周耐受调控作用。Roquin基因突变的T细胞能表达高水平的IL-21因子和表面ICOS蛋白这种共刺激因子。高水平的ICOS蛋白能打破外周耐受，出现与系统性红斑狼疮（systemic lupus erythematosus）相似的症状。Roquin蛋白含有N末端RING结构域、ROQ结构域以及锌指结构域（它能够与mRNA相结合，并调节其稳定性）。因此，Roquin蛋白可能也能调节ICOS mRNA的稳定性，不过我们现在还不清楚Roquin蛋白的RING结构域是否也参与了这种调控过程。

## 5. 研究展望



我们在本文中列举的上述例子，只是初步向读者展现了泛素化修饰途径在人体免疫调节过程中所发挥的作用。很明显，多泛素化修饰作用不仅能够通过降解免疫调控蛋白的方式来抑制免疫反应，也能通过多泛素化修饰作用激活NF- $\kappa$ B和IRF途径中的激酶来启动一些免疫反应。随着我们发现越来越多的泛素系统组分（比如E3酶和DUB酶）参与了免疫调控机制，一个问题出现了，那就是我们该如何认识泛素化修饰途径在免疫调控过程中发挥的生化作用。该问题的突破口同时也是难点就在于发现泛素化途径的修饰底物。这是因为底物的去泛素化过程和降解过程都发生得非常迅速，而细胞中相对稳定的泛素化途径中间产物含量通常又很低。不过幸运的是，随着能确定蛋白类型及其修饰状况的质谱检测等高灵敏度检测技术的进步，我们会更容易发现泛素化途径的底物。

与发现泛素化途径底物具有同等重要意义的是发现识别泛素化信号的“感受器”。在过去几年中我们已经发现了将近20种UBD蛋白，这预示着我们会发现更多的“感受器”。如果我们既弄清楚了泛素化修饰途径的底物又弄清楚了它们的“感受器”，那么我们就能很容易地弄清楚泛素化修饰途径在机体免疫调控中发挥的真正作用。这将有助于我们对免疫性疾病的诊疗技术研究。

原文检索：

Vijay G. Bhoj & Zhijian J. Chen. (2009) Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature*, 458:430-437.

 YORK/编译



# 生命世界 无奇不有

# www.LifeOmic.com