

自噬蛋白NDP52与细菌感染研究进展

王芬芬 张吉翔*

(南昌大学第二附属医院消化科, 江西省分子医学重点实验室, 南昌 330006)

摘要 自噬(autophagy)是哺乳动物清除入侵细菌的主要途径,可保卫宿主细胞免受细菌的损伤。核点蛋白52(nuclear dot protein 52, NDP52)——核点家族成员之一,是除p62/SQSTM1和NBR1等之外最新发现的自噬关键蛋白。它连接自噬体表面的微管相关蛋白1轻链3(microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3),将披上“泛素大衣”的病原菌(如沙门氏菌和化脓性链球菌)递送至自噬体内加以清除。这一发现有助于人们深入了解自噬抵抗病原微生物感染的具体分子机制,为预防和治疗细菌感染提供了新靶点。

关键词 NDP52; 自噬; 泛素; 沙门氏菌

1 引言

自噬(autophagy)是真核细胞内主要的降解系统,可选择性地移除蛋白质的聚合物和损坏或过剩的细胞器,以维持生命体内蛋白质代谢平衡及细胞内环境稳定。近来发现,自噬反应能够清除入侵细胞的病原微生物,在免疫反应中发挥作用。泛素蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)是宿主细胞内的另一个主要降解系统。入侵病原菌只有披上“泛素大衣(ubiquitin coat)”[即泛素化(ubiquitination)后]才能被宿主细胞通过自噬而清除。人们把自噬和UPS参与的降解通路称为以泛素参与为特征的选择性自噬(selective autophagy)^[1-2]。自噬相关蛋白,又称泛素结合蛋白,它们可以将泛素蛋白酶体系统和自噬这两条降解途径紧密联系起来,故在选择性自噬中扮演着至关重要的角色:如p62/SQSTM1(sequestosome 1)^[3]和NBR1(neighbor of BRCA1 gene 1)^[4]是较早发现的与自噬相关的宿主蛋白,并共有两个相似的结构域,包括一个氨基端PB1结构域(Phox and Bem1 domain)和一个羧基端UBA结构域(ubiquitin-proteasome-related domain),它们通过结合自噬体膜上的LC3相互作用域(LC3 interaction region, LIR)^[5],促进泛素化细菌靶向自噬体并加以清除。最新研究发现,核点蛋白52(nuclear dot protein 52, NDP52)参与高度致病性细菌(如沙门氏菌)在宿主细胞内的自噬清除过程,成为自噬相关蛋白家族成员之一。沙门氏菌感染引起的全球高发病率和伤寒沙门氏菌多重耐药菌株的不断出现,成为威胁公众健康的重要问题,急需寻求治疗和预防的新

方法。NDP52的发现及其介导病原菌清除的信号通路为预防和治疗沙门氏菌感染提供了新的思路。本文就NDP52控制沙门氏菌感染的具体机制作一简要论述。

2 NDP52简介

核点(nuclear dots, NDs)蛋白最早被认为是一类自身免疫性靶标,在大量原发性胆汁肝硬化和自身免疫性肝病患者体内被发现^[6-8]。它由Sp100、Sp140、PML、Int-6、PIC以及NDP52等蛋白组成,各组成蛋白行使不同的功能^[9]。NDP52,又称CALCOCO2(calcium binding and coiled-coil domain 2),是核点家族中的一员,在胞质和胞核中均有分布。其氨基端为SKICH30结构域,中央区为卷曲螺旋结构域,羧基端由一个LIM结构域和两个锌指结构组成^[10]。NDP52与T6BP一样,都是肌球蛋白VI的绑定伙伴,它们通过绑定肌球蛋白VI,参与细胞因子信号转导及细胞黏连的调节^[9]。不仅如此,NDP52还参与了免疫防御过程,如介导细菌在宿主细胞内的自噬清除过程。病原菌(如导致伤寒和肠胃炎的沙门氏菌)侵入宿主细胞时一般会隐蔽在一个隔间中以限制其在胞内大量繁殖释放。然而,这些细菌也会偶尔逃离这个隔间并侵入宿主细胞,逃离的细菌通常会披

收稿日期: 2012-05-20 接受日期: 2012-06-25

国家自然科学基金(No.30360037)资助项目

*通讯作者。Tel: 0791-6292706, Fax: 0791-6262262, E-mail: jixiangz@

tom.com

上宿主的蛋白质泛素, NDP52则与这些披上“泛素大衣”的细菌捆绑在一起, 通过征集其他的宿主防御蛋白, 最终消灭逃离的细菌。

3 NDP52控制沙门氏菌感染的分子机制

Thurston等^[11]通过RNA干扰技术抑制感染鼠伤寒沙门氏菌血清型(*Salmonella enterica serotype Typhimurium*)的宿主细胞中NDP52的表达后, 发现胞质中的活菌数以及泛素化的细菌数量明显增加, 这表明NDP52可能参与了宿主细胞清除沙门氏菌的过程。进一步研究证实, NDP52控制沙门氏菌感染的具体分子机制可分为两步(图1):

(1)入侵菌逃离隔间进入胞质: 鼠伤寒沙门氏菌血清型侵入宿主细胞后, 定居在“含沙门氏菌囊泡(salmonella-containing vacuoles, SCV)”内并进行自我复制, 囊泡破裂后, 便释放入细胞质中大量繁殖, 这个囊泡就是之前所说的“隔间”。然而发生破裂的SCV少之又少(原因是宿主细胞内表达多种维持SCV滤泡膜完整性的蛋白^[12], 如TANK结合激酶1(TANK binding kinase 1, TBK1)。TBK1是IκB激酶复合体(IκB kinase, IKK)的主要成员之一, 可通过抑制水通道蛋白1(aquaporin 1, AQP1)的表达维持SCV滤泡膜内外水平衡, 防止SCV滤泡肿胀破裂, 从而减少进入胞质

的细菌数量^[13], 同时, 宿主细胞也将展开一系列的自身免疫应答反应以清除这些进入胞质中的病原菌, 其中最主要的应答反应就是泛素参与的选择性自噬。

(2)NDP52介导的选择性自噬过程: TBK1的上游调控因子Nap1和Sintbad拥有一个相同的氨基端结构域, 共定位于泛素化沙门氏菌的菌体表面。Nap1和Sintbad结合TBK1后, 形成TBK1信号复合体(TBK1-Sintbad-Nap1)。一方面, TBK1诱导视神经蛋白(optineurin, OPTN)第177位丝氨酸残基磷酸化, 磷酸化的OPTN可提高泛素化菌体与自噬体膜上的微管相关蛋白1轻链3(microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3)的结合力^[14-15], 从而促进细菌的自噬清除。LC3是哺乳动物细胞中酵母ATG8(*Aut7/Ap98*)基因的同源物, 定位于前自噬泡和自噬泡膜表面, 参与自噬体的形成^[16]。LC3有I型和II型之分: 未发生自噬时, 细胞内合成的LC3经过加工, 成为胞浆可溶性的I型LC3, 常规表达; 当自噬发生时, I型LC3经泛素样加工修饰后, 与自噬膜表面的磷脂酰乙醇胺(PE)结合, 形成II型LC3, 之后结合并始终位于胞内自噬体的膜上^[17]。另一方面, NDP52羧基端的锌指结构连接菌体表面的泛素, 氨基端的SKICH30结构域则连接TBK1信号复合体(TBK1-Sintbad-

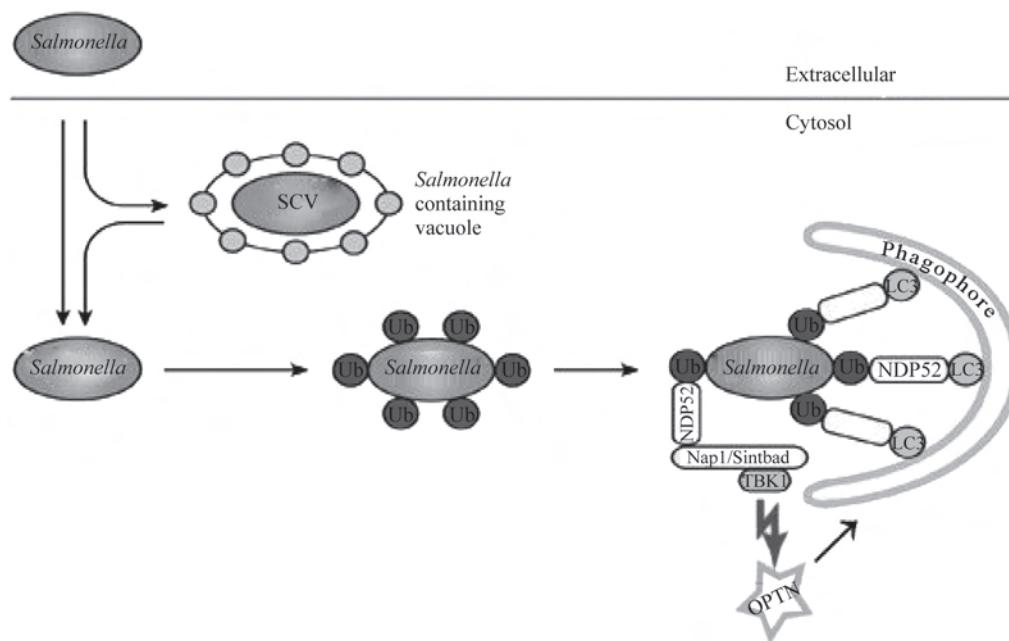


图1 NDP52控制沙门氏菌感染的分子机制(根据参考文献[19]修改)

Fig.1 The molecular mechanism of NDP52 resisting the invasion of *Salmonella*(modified from reference [19])

Nap1)。NDP52也能直接连接自噬体膜上的LC3-II,从而将沙门氏菌递送至自噬体内并加以清除^[18]。

NDP52促进沙门氏菌被自噬清除的前提是菌体必须从SCV中释放进入胞质,才能被泛素连接酶连接,进而被NDP52识别、递送,最终被吞噬清除。由此可见, TBK1是宿主细胞抵抗沙门氏菌侵袭的第一道防线,它能维持滤泡膜的完整,减少进入胞质的菌体数量,逃脱第一道防线的沙门氏菌立即被披上“泛素大衣”,然后被NDP52识别,直接或通过TBK1间接与自噬体连接进而被吞噬清除。除沙门氏菌外, NDP52还参与了宿主细胞自噬清除化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的过程。有趣的是,福氏志贺菌(*Shigella flexneri*)却能避免泛素蛋白在其表面聚集,从而逃脱宿主蛋白NDP52的识别以及被自噬体吞噬的命运^[19]。

目前,科学家还在做进一步的工作以精确确定究竟有多少致病性细菌受NDP52控制,以便为更多的细菌感染提供治疗靶点。研究还发现, NDP52能够与其它分子相互作用最终引起细胞生命效应,与病毒的感染、炎症的形成、肿瘤(如肝细胞肝癌)的发生发展有明确的相关性,这让我们更全面地认识了NDP52的功能角色不仅是介导自噬、参与病原菌清除过程的宿主蛋白。Nix是近年来发现的隶属于Bcl-2家族的BH3-only促凋亡家族成员。它不仅具有促凋亡功能,还参与了细胞自噬、线粒体自噬、肿瘤及心肌疾病的发病等过程。Nix的氨基端也存在LIR,可直接与微管相关蛋白LC3相互作用^[20-21],参与靶标的自噬过程。虽然尚无研究表明Nix能像NDP52一样,通过促进宿主细胞自噬而清除入侵细菌,但推测它也将成为自噬关键蛋白家族成员之一,参与控制病原微生物感染的防御过程。

4 小结

本文对自噬关键蛋白NDP52控制沙门氏菌感染的具体机制进行了简单的论述,为治疗沙门氏菌感染提供了新的思路。不难看出,自噬相关蛋白在抵抗病原微生物感染的免疫反应中具有重要作用,然而它们分别参与了哪些病原微生物在体内的自噬清除过程?具体调控机制及完整的信号转导途径如何?目前对这些问题仍缺乏清晰的认识,需要不断地探索和研究。最后,自噬作为一种能有效杀灭胞内微生物的细胞防御机制,研究如何特异性调节宿

主细胞中自噬关键蛋白(如NDP52)的表达水平,可以作为自噬相关药物开发的新途径,并最终运用在临床预防和细菌感染治疗中。

参考文献 (References)

- 1 Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I. A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* 2009; 34(3): 259-69.
- 2 Kraft C, Peter M, Hofmann K. Selective autophagy: Ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat Cell Biol* 2010; 12(9): 836-41.
- 3 Zheng YT, Shahnazari S, Brech A, Lamark T, Johansen T, Bru-mell JH. The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J Immunol* 2009; 183(9): 5909-16.
- 4 D'Agostino C, Nogalska A, Cacciottolo M, Engel WK, Askanas V. Abnormalities of NBR1, a novel autophagy-associated protein, in muscle fibers of sporadic inclusion-body myositis. *Acta Neuro-pathol* 2011; 122(5): 627-36.
- 5 Kirkin V, Lamark T, Johansen T, Dikic I. NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy* 2009; 5(5): 732-3.
- 6 Brasch K, Ochs RL. Nuclear bodies (NBs): A newly "rediscovered" organelle. *Exp Cell Res* 1992; 202(2): 211-23.
- 7 Bernstein RM, Neuberger JM, Bunn CC, Callender ME, Hughes GR, Williams R. Diversity of autoantibodies in primary biliary cirrhosis and chronic active hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1984; 55(3): 553-60.
- 8 Sternsdorf T, Jensen K, Züchner D, Will H. Cellular localization, expression, and structure of the nuclear dot protein 52. *Cell Biol* 1997; 138(2): 435-48.
- 9 Gurung R, Tan A, Ooms LM, McGrath MJ, Huysmans RD, Munday AD, *et al*. Identification of a novel domain in two mammalian inositolpolyphosphate 5-phosphatases that mediates membrane ruffle localization. The inositol 5-phosphatase skip localizes to the endoplasmic reticulum and translocates to membrane ruffles following epidermal growth factor stimulation. *Biol Chem* 2003; 278(13): 11376-85.
- 10 Morriswood B, Ryzhakov G, Puri C, Arden SD, Roberts R, Dendrou C, *et al*. T6BP and NDP52 are myosin VI binding partners with potential roles in cytokine signaling and cell adhesion. *Cell Sci* 2007; 120(15): 2574-85.
- 11 Thurston TL, Ryzhakov G, Bloor S, von Muhlinen N, Randow F. The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat Immunol* 2009; 10(11): 1215-21.
- 12 Ruiz-Albert J, Yu XJ, Beuzón CR, Blakey AN, Galyov EE, Holden DW. Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the *Salmonella typhimurium* vacuolar membrane. *Mol Microbiol* 2002; 44(3): 645-61.
- 13 Radtke AL, O'Riordan MX. Homeostatic maintenance of pathogen-containing vacuoles requires TBK1-dependent regulation of aquaporin-1. *Cell Microbiol* 2008; 10(11): 2197-207.
- 14 Ivanov S, Roy CR. NDP52: the missing link between ubiquitinated bacteria and autophagy. *Nat Immunol* 2009; 10(11): 1137-9.
- 15 Wild P, Farhan H, McEwan DG, Wagner S, Rogov VV, Brady

- NR, *et al.* Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts salmonella growth. *Science* 2011; 333(6039): 228-33.
- 16 方梦蝶, 刘波, 刘伟. 自噬的分子细胞机制研究进展. *中国细胞生物学学报*(Fang Mengdie, Liu Bo, Liu Wei. *Molecular cell mechanism of autophagy. Chinese Journal of Cell Biology*) 2012; 34(4): 382-90.
- 17 Taylor MP, Kirkegaard K. Modification of cellular autophagy protein LC3 by poliovirus. *J Virol* 2007; 81(22): 12543-53.
- 18 Cemma M, Kim PK, Brumell JH. The ubiquitin-binding adaptor proteins p62/SQSTM1 and NDP52 are recruited independently to bacteria-associated micro domains to target *Salmonella* to the autophagy pathway. *Autophagy* 2011; 7(3): 341-5.
- 19 von Muhlinen N, Thurston T, Ryzhakov G, Bloor S, Randow F. NDP52, a novel autophagy receptor for ubiquitin-decorated cytosolic bacteria. *Autophagy* 2010; 6(2): 288-9.
- 20 Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, *et al.* Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep* 2010; 11(1): 45-51.
- 21 Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, *et al.* Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 2008; 27(2): 433-46.

Research Advances in Autophagy Protein NDP52 and Bacterial Infection

Wang Fenfen, Zhang Jixiang*

(Digestive Department, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Abstract Autophagy is an important pathway to eliminate intracellular bacteria in mammals and defend the host cell from bacteria damage. In addition to p62/SQSTM1 and NBR1, NDP52 (nuclear dot protein 52)—one of the members of nuclear dots, is a novel autophagy related protein has been found. NDP52 is an adaptor protein that binds to both ubiquitinated bacteria (such as *Salmonella* and *Streptococcus pyogenes*) and LC3 (microtubule associated protein 1 light chain 3), and then delivers these invaders into autophagosomes. This finding helps further understand the specific molecular mechanism of autophagy resisting pathogens infection, and provides a new target for the prevention and treatment of bacteria infection.

Key words NDP52; autophagy; ubiquitin; *Salmonella*

Received: May 20, 2012 Accepted: June 25, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30360037)

*Corresponding author. Tel: 86-791-6292706, Fax: 86-791-6262262, E-mail: jixiangz@tom.com