

细菌中的去泛素化酶及其生物学功能研究进展

王焕楠^{1,2} 甄向凯¹ 张丹丹¹ 欧阳松应^{1,2*}

(¹福建师范大学生命科学学院, 福州 350117; ²福建师范大学南方生物医学研究中心, 福州 350117)

摘要 在细菌感染过程中, 宿主细胞可以利用自身泛素系统对其进行免疫应答。研究发现, 在宿主与细菌协同进化过程中, 细菌可以编码去泛素化酶靶向宿主泛素系统, 降低宿主炎症信号反应, 这有利于细菌的生存与繁殖。该文综合介绍了目前在细菌中已发现的去泛素化酶并将其分类总结, 此外, 该文详细阐述了OTU家族去泛素化酶、CE家族去泛素化酶的切割特异性和生物学功能, 还介绍了具有特殊催化活性的去泛素化酶。深入研究去泛素化酶的分子机制将有助于理解其生物学功能, 同时可为开发新的治疗药物和抗感染疫苗提供信息。

关键词 细菌; 去泛素化酶; 分类; 切割特异性; 生物学功能

Research Progress on Deubiquitinases in Bacteria and Their Biological Functions

WANG Huannan^{1,2}, ZHEN Xiangkai¹, ZHANG Dandan¹, OUYANG Songying^{1,2*}

(¹College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China;

²FJNU Biomedical Research Center of South, Fuzhou 350117, China)

Abstract In the process of bacterial infection, the host cells can make use of their own ubiquitin system for immune responses. In the co-evolution of host and bacteria, bacteria can encode deubiquitinases to target the host ubiquitin system and reduce the host inflammatory signal response, which is conducive to the survival and reproduction of bacteria. This article comprehensively introduced the bacterial deubiquitinases that had been discovered so far and summarized the bacterial deubiquitinases according to the classification. The cleavage specificities and biological function of OTU family deubiquitinases and CE family deubiquitinases were described in detail. In addition, deubiquitinases with special catalytic activity were also introduced. In-depth study of the molecular mechanism of deubiquitinases will help to understand their biological functions, which can provide information for the development of new therapeutic drugs and anti-infection vaccines.

Keywords bacteria; deubiquitinases; classification; cleavage specificity; biological functions

泛素化(ubiquitylation)是一种广泛存在的蛋白质翻译后修饰方式, 在诸多生物学途径(包括DNA损伤修复、信号转导、蛋白质降解、跨膜蛋白的转运以及对病原体的识别和对炎症的反应等)中发挥着重要作用^[1-3]。泛素化是将一个或多个泛素(ubiquitin,

Ub)与底物蛋白共价连接的过程, 这种连接通常发生在泛素的C末端甘氨酸残基与底物蛋白的赖氨酸残基之间, 有时也发生在非赖氨酸位点包括半胱氨酸、苏氨酸和丝氨酸残基以及N末端游离氨基上^[4]。蛋白质泛素化是一个连续的多级酶联反应过程, 涉

收稿日期: 2021-12-03

接受日期: 2021-12-28

科技部国家重点研发项目(批准号: 2021YFC2301403)、国家自然科学基金(批准号: 31770948、82172287)、福建省科技厅项目(批准号: 2020Y4007)和福建省海洋经济发展补助项目(批准号: FJHJF-L-2020-2)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0591-22868199, E-mail: ouyangsy@fjnu.edu.cn

Received: December 3, 2021

Accepted: December 28, 2021

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2021YFC2301403), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31770948, 82172287), the Fujian Science and Technology Department Project (Grant No.2020Y4007), and the Marine Economic Development Subsidy Project of Fujian Province (Grant No.FJHJF-L-2020-2)

*Corresponding author. Tel: +86-591-22868199, E-mail: ouyangsy@fjnu.edu.cn

及E1泛素激活酶、E2泛素结合酶和E3泛素连接酶。在蛋白质泛素化过程中, 泛素首先由E1泛素激活酶激活, E1利用ATP水解产生的能量在泛素的羧基末端甘氨酸和E1的特定半胱氨酸残基之间形成硫醇酯。活化的泛素随后被转移到E2中的半胱氨酸残基上, 接着E3介导泛素从E2转移到底物蛋白的赖氨酸残基上, 最终泛素的羧基末端甘氨酸残基通过形成异肽键共价偶联到底物蛋白的赖氨酸残基上^[5]。

底物蛋白既可以被单个泛素修饰, 也可以被由多个泛素分子组装而成的多聚泛素链修饰。单泛素化是单个泛素分子通过其C末端甘氨酸(G76)与底物蛋白赖氨酸残基连接^[6]。多聚泛素化是多个泛素分子在同一目标蛋白相同赖氨酸残基上以泛素链的形式结合。研究发现泛素可以通过分子内部的7个赖氨酸残基(K6、K11、K27、K29、K33、K48和K63)和N末端甲硫氨酸(Met1)形成不同类型的多聚泛素链。多聚泛素化连接类型是根据用于形成泛素链的赖氨酸来确定的^[7], 不同类型的泛素连接或多聚泛素链的产生导致了被修饰蛋白的功能多样性。K48或K11连接的多聚泛素通常导致蛋白酶体对底物的降解^[8]。K63连接的多聚泛素在多个细胞过程(包括DNA损伤修复、信号转导、囊泡运输等)中具有调节功能^[9]。K33连接的多聚泛素参与细胞内蛋白质转运, 并与K6连接的多聚泛素一起参与DNA损伤修复过程^[10-11]。一些研究表明, K6连接的多聚泛素与自噬过程、有丝分裂和异种分裂有关^[12-14]。K29连接的多聚泛素具有蛋白酶体的调控作用^[15], 并参与其他表观遗传调控^[16]。Met1连接的线性泛素化是NF- κ B(nuclear factor-kappaB)激活的一种重要修饰^[15]。虽然已有大量关于泛素系统的研究, 但多聚泛素化的相关研究还不够全面, 可能原因是不同的连接替代方式产生了大量复杂的聚泛素链结构。

与大多数翻译后修饰一样, 泛素化是一个可逆过程, 泛素的去除是由去泛素化酶(deubiquitinase, DUB)通过去泛素化的过程实现的, 研究发现细菌病原体可以编码具有DUB活性的相关效应蛋白^[17-18]。在细菌感染过程中, 宿主细胞可以利用自身泛素系统对其进行免疫应答, 同时研究发现细菌病原体编码的具有DUB活性的效应蛋白通过靶向宿主的泛素化系统而改变宿主NF- κ B信号通路^[19-20], 从而有助于细菌在宿主细胞内存活。因此, 细菌病原体编码的DUB或许可以作为药物靶点。本文根据已报道的有

关细菌中DUB结构与作用机制的研究, 总结了近年来最新鉴定的细菌中具有去泛素化功能的效应蛋白及其相关生物学功能, 以为后续相关疾病治疗、药物开发提供信息。

1 去泛素化酶及其分类

去泛素化是指被泛素化修饰的底物蛋白在DUB的蛋白水解作用下去除泛素标记的过程。一些DUB可以直接结合到底物蛋白上, 通过切断泛素C末端与底物蛋白赖氨酸之间的异肽键, 从底物蛋白中去除泛素, 防止蛋白被降解。DUB还可以识别泛素链并切割泛素分子之间的联系, 将泛素分子从其C末端延伸的前体中释放出来。DUB与E3泛素连接酶的作用相反, 它们在细胞内的动态平衡对于蛋白质稳态和细胞发挥正确功能至关重要。哺乳动物基因组编码大约100种不同的DUB, 真核生物中的DUB根据其序列关系、结构特征和催化机理不同, 通常被分为7个不同的家族。其中6个家族属于半胱氨酸蛋白酶类, 分别为UCHs(ubiquitin-C-terminal hydrolases)、USPs(ubiquitin-specific proteases)、OTUs(ovarian tumor proteases)、MJDs(machado-Joseph domain papain-like cysteine proteases)、MINDY(motif interacting with ubiquitin-containing novel DUB family)和ZUFSP/ZUP1(Zinc finger-containing ubiquitin peptidase 1)家族, 而JAMM(Jad1/Mov34/Mpr1 Pad1 N-terminal domain proteases)家族属于金属蛋白酶类^[21]。不同家族DUB具有不同的特点: OTU家族成员具有底物特异性, 通常切割一种或少数几种被特定泛素连接修饰的底物^[22-23]; JAMMs在其活性位点上含有1个锌原子^[24-25]; UCHs的底物通常是短多肽或小的蛋白质结构域^[26-27]。

鉴于泛素化在真核生物中的重要作用, 病原微生物在与宿主长期的协同进化过程中, 可以利用宿主泛素化途径来促进其高效感染, 现已发现许多致病菌可以编码DUB(表1), 致病菌分泌DUB到宿主细胞中, 以干扰宿主的泛素化系统。在细菌中研究最多的DUB是CE家族去泛素化酶(CE clan deubiquitinase, CE DUB), 这类被MEROPS数据库定义为CE家族的去泛素化酶是具有His-Asp/Asn-Cys催化三联体的酶家族^[28], 可水解底物蛋白中的泛素或泛素样修饰[ubiquitin-like (Ubl) modification, 如SUMO1、NEDD8、ISG15]。除CE DUB外, 最近研究发现在

表1 细菌中具有去泛素化活性的蛋白

Table 1 The protein with the deubiquitination activity in bacteria

名称 Name	细菌 Bacteria	泛素链特异性 Ub chain specificity	功能 Function	蛋白质编号 PDB entry	参考文献 References
SedA	<i>L. pneumophila</i>	K63>K11, K48	Regulation of ubiquitin associated with LCVs	5CRB	[30]
LotA	<i>L. pneumophila</i>	K6	Suppression of phagosome maturation	7F9X	[31]
LotB	<i>L. pneumophila</i>	K63	Suppression of NF- κ B pathway	6KS5	[20]
LotC	<i>L. pneumophila</i>	K48, K6, K11>K33, K63	Deubiquitination of Rab10 in LCV	6YK8	[32]
RavD	<i>L. pneumophila</i>	Met1	Suppression of NF- κ B pathway	6NJD	[33-34]
RavZ	<i>L. pneumophila</i>	-	Inhibition of autophagy	5CQC	[35]
LupA	<i>L. pneumophila</i>	-	Inactivation of its cognate effector LegC3	5DGG	[36]
DupA	<i>L. pneumophila</i>	PR-ubiquitin	Regulation of phosphoribosyl ubiquitination	6RYA	[37]
DupB	<i>L. pneumophila</i>	PR-ubiquitin	Regulation of phosphoribosyl ubiquitination	6B7M	[38]
MvcA	<i>L. pneumophila</i>	UBE2N-Ub	Activation of NF- κ B pathway	6K11	[39]
ChlaOTU	<i>C. trachomatis</i>	K48, K63	Suppression of NF- κ B pathway	-	[40-41]
ChlaDUB1	<i>C. trachomatis</i>	K63>K11, K48	Stabilization of the apoptosis regulator Mcl-1	5HAG	[42-43]
ChlaDUB2	<i>C. trachomatis</i>	K63>K11, K48	Induction of Golgi fragmentation	6MRN	[42]
ElaD	<i>E. coli</i>	K63>K11, K48	Suppression of NF- κ B pathway	-	[44]
SseL	<i>S. Typhimurium</i>	K63>K11, K48	Cytotoxicity, inhibition of selective autophagy	5HAF	[45]
AvrA	<i>S. Typhimurium</i>	-	Suppression of NF- κ B pathway	-	[46]
XopD	<i>X. euvesicatoria</i>	K11, K29, K48>K63, K6	SUMO and ubiquitin isopeptidase	2OIV	[47-48]
CidB	<i>Wolbachia</i>	K63	Nuclease toxin and DNase activity	-	[49]
RickCE	<i>R. bellii</i>	K63>K11, K48	-	5HAM	[44]
YopJ	<i>Y. pestis</i>	K48, K63	Suppression of MAPK and NF- κ B pathway	5JP3	[50]
TssM	<i>B. mallei</i>	K48, K63	Suppression of NF- κ B and ISRE pathway	-	[51]
SpvD	<i>Salmonella</i>	-	Suppression of NF- κ B pathway	5LQ7	[52-53]
SchiCE	<i>S. flexneri</i>	K63>K11, K48	Suppression of NF- κ B pathway	-	[44,54]

-: 未有相关文献报道。

-: this phage has not related literature report.

细菌中也存在 OTU 家族去泛素化酶 (ovarian tumor domain deubiquitinase, OTU DUB), OTU DUB 利用催化三联体 Cys-His-Asp (Asp 有时被 Gly、Glu、Asn 或 Phe 取代) 或二联体 (Cys 和 His) 进行催化^[29]。此外, 还有一些具有其他特异性特征的 DUB。总结近年来鉴定的细菌 DUB 发现, 不同 DUB 的结构特异性使它们具有不同的催化活性, 靶向底物的不同使它们发挥不同的生物学功能。

2 细菌中的两大家族去泛素化酶及其生物学功能

2.1 CE 家族去泛素化酶

细菌中研究最多的 DUB 是 CE 家族蛋白酶。CE 家族是一类具有去 SUMO 化酶、去泛素化酶甚至乙酰转移酶活性的多功能蛋白。沙门氏菌、大肠杆菌、志贺氏杆菌和衣原体等普遍具有 CE 家族蛋白酶^[44], 例如耶尔森氏菌中的 YopJ 和 AvrA

具有丝/苏氨酸乙酰转移酶活性^[46,50], 沙门氏菌中的 SseL、大肠杆菌中的 ElaD 和弗氏链球菌中的 SchiCE 是 Ub 特异性蛋白酶^[44-45], XopD 是具有 Ub 和 SUMO 双特异性的异肽酶, 沙眼衣原体中的 ChlaDUB1 和立克次氏体中的 RickCE 可以水解被 Ub 和 NEDD8 修饰的底物蛋白^[42,44]。CE DUB 的多功能性进化有助于细菌病原体在宿主内的生存, 研究发现 CE DUB 可以阻断泛素依赖的炎症信号过程^[55], 如 SseL 和 ChlaDUB1 已被证明可以介导细胞自噬过程、NF- κ B 信号通路或细胞调亡的抑制^[16,45,56]。AvrA 可以通过去除 I κ B α 和 β -catenin 的泛素化修饰以下调 NF- κ B 信号^[46]。YopJ 具有去泛素化酶活性, 通过去除 TRAF2、TRAF6 和 I κ B α 中的泛素化修饰来负调控 NF- κ B 信号。YopJ 还具有乙酰转移酶活性, 可利用乙酰辅酶 A 修饰 MAPK-KK6 上的丝氨酸和苏氨酸残基而阻止 MAPKK6 被磷酸化, 从而抑制先天免疫应答中的 MAPK 和

NF- κ B信号通路^[46,50]。

细菌中的CE DUB与真核生物中的CE蛋白酶具有结构相似的Cys蛋白酶折叠(CE折叠)^[30,54,57], CE折叠一般由His-Asp/Asn-Cys催化三联体组成, 值得注意的是, 大多数CE DUB对K63连接泛素链具有特异性^[44]。同时对目前已解析的细菌CE DUB进行结构对比发现, 在其底物结合(S1)位点附近存在3个可变区(variable regions, VRs), VRs通常围绕在1个结构保守的螺旋区域(constant region, CR)周围: 第一个可变区VR-1通常位于CE折叠的开始处, 第二个可变区VR-2通常位于前两条 β 折叠之间, 第三个可变区VR-3位于催化碱基His之前, 通常在第二条和第三条 β 折叠之间^[44]。VRs位于CE折叠内, 在CE DUB底物识别中具有重要作用, 将ChlaDUB1的VR-3可变区和RickCE的VR-1可变区删除后发现其无法结合底物。XopD是第一个被报道的具有Ub和SUMO双特异性的异肽酶, 将其复合物结构进行对比发现, XopD与Ub的结合主要在VR-1, 而与SUMO的相互作用主要发生在VR-2^[44]。

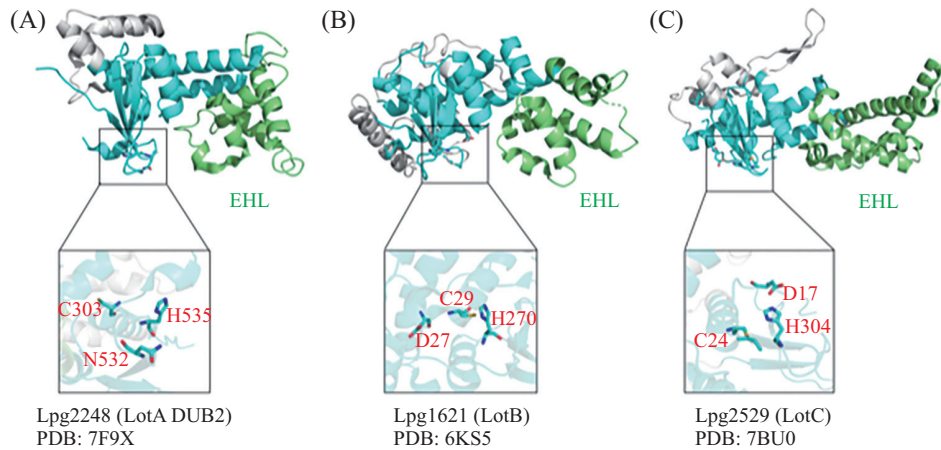
沙眼衣原体可以引起具有传染性的泌尿生殖系统感染和眼部沙眼, 进入宿主细胞后被包裹在吞噬泡中, 通过释放细菌效应物来满足自身的代谢需求和逃避宿主的免疫反应。ChlaDUB1和ChlaDUB2是在沙眼衣原体中发现的DUB, 其C末端区域包含1个DUB结构域^[42]。ChlaDUB1在沙眼衣原体感染宿主细胞的过程中表现出去泛素化和去乙酰化活性^[58], 能够对I κ B α 进行去泛素化修饰而阻止NF- κ B的激活, ChlaDUB1还能对细胞凋亡因子Mcl-1进行去泛素化修饰使其免受蛋白酶体降解^[59], 而ChlaDUB2仅表现出去泛素化酶活性^[59]。通过对已解析的ChlaDUB1和ChlaDUB2单体及其与Ub的复合物的结构进行分析发现, ChlaDUB1由Cys345、His275和Asp292组成催化三联体^[56], ChlaDUB2由Cys282、His203和Asp220组成催化三联体^[42]。有趣的是, 与其他CE DUB不同, 它们的S1结合位点附近的VR-3可变区均形成一条螺旋结构。在ChlaDUB1中VR-3螺旋的一面与Ub结合, 其相反面与乙酰辅酶A的腺苷和磷酸基结合, 而在ChlaDUB2中缺少乙酰辅酶A结合残基而缺乏乙酰转移酶活性, 因此ChlaDUB2仅表现出去泛素化酶活性^[59]。此外, ChlaDUB1催化结构域的N末端插入了一条长的 α 螺旋, 该结构域可能与ChlaDUB1具有更广泛的

切割活性有关, 而ChlaDUB2缺乏该螺旋结构, 对长链泛素链具有切割活性^[42]。

2.2 OTU家族去泛素化酶

自2002年在真核生物中发现OTU DUB以来, 研究发现典型的OTU结构域大约有250个氨基酸, 一般具有保守的Cys-His-Asp基序作为催化三联体, 其中Cys和His对其催化功能至关重要, 而Asp有时被Gly、Glu、Asn或Phe取代^[29]。OTU家族与其他DUB家族不同, 它们表现出泛素链特异性, 通常切割特定泛素连接的泛素链。有关OTU DUB的大量生化和结构研究阐明了OTU DUB在结构上如何保证其对泛素链表现出特异性的机制, 目前总共有4种机制: (1) 存在额外的泛素结合域(Ub binding domain, UBD); (2) 存在特异识别泛素的序列; (3) 存在识别近端泛素的S1'泛素结合位点; (4) 存在S2位点使DUB特异性切割多聚泛素链^[60]。近年来在细菌中也发现了大量效应蛋白具有OTU DUB^[61], 可以特异性切割NF- κ B信号所需的多聚泛素链, 有助于细菌在宿主内的生存。目前被广泛报道的细菌OTU DUB主要有肺炎衣原体的ChlaOTU和嗜肺军团菌的4个OTU DUB。ChlaOTU可以切割K48和K63连接的多聚泛素链, 并抑制NF- κ B信号通路^[3,62-64]。

在嗜肺军团菌中发现的4个OTU DUB, 依次被命名为LotA(Lpg2248; em21)、LotB(Lpg1621; Ceg23)、LotC(Lpg2529; Lem27)和Lem7(Lpg0227), 我们已成功解析了LotB结构(PDB: 6K55)^[20]、LotC与Ub-PA的复合物结构(PDB: 7BU0)^[32], 通过分析发现它们都具有OTU DUB中典型的催化三联体, LotB由C29、H270和D27组成催化三联体^[20](图1B), LotC由C24、H304和D17组成催化三联体^[32](图1C), 且它们是DUB中的核心催化位点。在军团菌感染的早期阶段, 位于内质网的vSNARE复合体中的Sec22b被泛素化, 去泛素化酶LotB可以去除Sec22b的泛素分子, 使Stx3(t-SNARE syntaxin 3)脱离LCV(Legionella-containing vacuole), 进而破坏感染引起的Sec22b与Stx3的相互作用^[19]。而去泛素酶LotC被证实可以与E3泛素连接酶SidC和SdcA共同调控LCV中Rab10的泛素化^[32]。根据已解析的LotB和LotC的结构发现, 与真核细胞经典的OTU DUB不同, LotB和LotC在催化Cys环和可变环之间包含相对较长的螺旋束[被称为EHL(extended helix lob)], LotB和LotC的结构表明EHL紧挨着DUB的S1结合



A: Lpg2248(LotA DUB2)的三维结构及其催化三联体; B: Lpg1621(LotB)的三维结构及其催化三联体; C: Lpg2529(LotC)的三维结构及其催化三联体。蓝色部分表示保守OTU结构域;绿色部分表示EHL(extended helix lob);方框中为催化三联体。

A: the three-dimensional structure of Lpg2248 (LotA DUB2) and its catalytic triad; B: the three-dimensional structure of Lpg1621 (LotB) and its catalytic triad; C: the three-dimensional structure of Lpg2529 (LotC) and its catalytic triad. The blue part indicates the conserved OTU domain; the green part represents EHL (extended helix lob); the catalytic triad is in the box.

图1 Lot-DUB的三维结构及催化三联体

Fig.1 Three-dimensional structure and catalytic triad of Lot-DUB

位点, 对于其结合远端泛素具有重要作用, 当突变位于LotB EHL上疏水的F143、L149和F154时, LotB不再切割K63连接的泛素链^[32]。此外, LotB和LotC都有1个识别远端泛素的泛素结合位点S1, 其中LotC只包含S1位点, 这与它表现出较广泛的去泛素化活性有关^[32], 而LotB还含有1个独特的S1'泛素结合位点, 这有助于LotB特异性切割K63连接的泛素链^[20,65]。

有趣的是, LotA具有2个OTU结构域(OTU1和OTU2), 且其C末端含有1个磷脂酰肌醇3-磷酸(phosphatidylinositol 3-phosphate, PI3P)结合结构域。LotA通过Dot/Icm系统进入到感染的宿主细胞中并利用其DUB活性从LCV中去除泛素。PI3P结合域的脂质结合能力对LotA从LCV中去除泛素至关重要。此外, LotA与嗜肺军团菌SidE家族蛋白协同作用, 也有助于嗜肺军团菌在宿主细胞中增殖^[38]。研究发现LotA的这2个OTU结构域可以独立发挥功能, 具有双催化活性, 其中依赖于C13的DUB1具有专一性切割K6连接泛素链的活性, 而DUB2可以去除LCV上的K48连接和K63连接多聚泛素链^[24]。值得注意的是, 在已知的DUB中, 专一性识别K6连接泛素链的DUB相对较少, 目前只有USP家族DUB的USP30被证明可以去除线粒体上的K6连接多聚泛素链, 拮抗PARK2泛素连接酶介导的泛素化; 而LotA是第一个被发现的可以专一性切割K6连接泛素链的OTU DUB, 但是, 其催化机制还不清楚。不过最近的研究解析

了LotA DUB2的结构(PDB: 7F9X), 发现C303-H535-S531/N532是LotA DUB2的催化三联体^[64](图1A), LotA DUB2的整体结构和真核生物的OTU DUB类似, 此外, LotA DUB2的Cys环和可变环之间也包含1个EHL。研究发现, 3个军团菌OTU DUB均含有EHL结构域, 表明EHL结构域可作为Lot-DUB的独特特征^[65](图1)。

3 具有特殊催化活性的细菌去泛素化酶

3.1 特异性切割线性泛素链的去泛素化酶RavD

Met1连接的线性泛素链是由线性泛素链组装复合物(linear ubiquitin chain assembly complex, LUBAC)以肽键头尾串联的方式连接而成。卵巢肿瘤去泛素化酶(OTU LIN)是真核细胞中唯一能够特异性切割线性泛素链的去泛素化酶^[59], 由于线性泛素链参与宿主免疫防御过程, 抑制细菌侵染, 因而病原菌领域的科研人员一直在寻找可以特异性切割线性泛素链的效应蛋白。最近在细菌中研究发现, RavD是存在于嗜肺军团菌属中可以特异性切割线性泛素链的DUB^[33]。其C末端结构域能够结合PI3P和磷脂酰肌醇4-磷酸(phosphatidylinositol 4-phosphate, PI4P), 从而使RavD定位于LCV上^[66]。此外, RavD的去泛素化酶结构域位于N末端。RavD具有Cys-His-Ser催化三联体基序, 能够水解泛素分子Met1与Gly76之间的肽键, 避免LCV上线性泛素链的累积,

达到抑制宿主NF- κ B免疫信号的目的^[57]。目前已经解析了嗜肺乳杆菌菌株(*Legionella pneumophila*)中RavD蛋白RavDlc的结构,该结构具有经典的木瓜蛋白酶样折叠,由8条 β 链和6个 α 螺旋组成。其核心结构由 α 螺旋和3条中心 β 链组成。在RavDlc中,近端Ub结合在一个开放口袋(S1'结合位点)上,而远端Ub结合在一个大的开放表面(S1结合位点)上,S1'和S1位点分别与近端Ub和远端Ub的结合确保了RavDlc的催化中心精确地作用于G76-Met1,这表明RavD中的Ub结合表面和相互作用残基决定了其对Met1连接泛素链的特异性^[34]。

3.2 调控磷酸核糖泛素化的去泛素化酶DupA与DupB

嗜肺军团菌中SidE家族效应蛋白催化非经典的磷酸核糖基连接(phosphoribosyl-linked PR)丝氨酸泛素化,通过PR泛素化高尔基体中的Rab33b蛋白而干扰细胞凋亡及囊泡运输等细胞过程,增强嗜肺军团菌的传染性。最近研究发现,军团菌效应蛋白Lpg2154(DupA、LaiE)和Lpg2509(DupB、LaiF或SdeD)作为调控PR泛素化的去泛素酶,在军团菌感染早期开始发挥作用,通过催化PR-Ub的磷酸基团与磷酸核糖泛素化的底物如Rab33b的丝氨酸之间的磷酸酯键断裂,从磷酸核糖泛素化底物的丝氨酸中水解释放PR-Ub,从而将宿主细胞中的磷酸核糖泛素化底物水平维持在一个可控范围内^[59]。有趣的是,DupA/DupB和SidE家族SdeA具有高度同源的磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)催化结构域^[67-68],且SdeA PDE结构域的催化残基(H277、E340和H407)在含有PDE的军团菌蛋白中均高度保守,实验证明DupA和DupB的核心催化残基为H67、E126和H189^[37-38],它们利用和SdeA相同的催化残基来介导相反的反应^[37],与SidE泛素连接酶不同的是,DupA/DupB对PR泛素化底物表现出更强的亲和力,这使得DupA/DupB能够从底物中切割出PR-Ub,因此PDE结构域和泛素之间的相互作用程度决定着酶活性的方向性。

3.3 特异性催化UBE2N-Ub去泛素化修饰的MavC

最近研究发现,嗜肺军团菌效应因子MavC(Lpg2147)和MvcA(Lpg2148)通过非经典泛素化和去泛素化途径对宿主细胞内的E2泛素结合酶(UBE2N)进行调控^[69]。在军团菌侵染宿主细胞早期,MavC可以通过转谷氨

酰胺酶活性催化Ub的谷氨酰胺残基(Q40)与UBE2N的赖氨酸残基(K92和K94)形成异肽键,对宿主UBE2N进行非典型的泛素化修饰^[70]。这个过程可以阻止UBE2N参与宿主细胞蛋白形成K63连接多聚泛素链从而抑制UBE2N的活性,进而抑制NF- κ B信号通路的激活^[71]。在军团菌侵染宿主细胞后期,MvcA靶向作用于MavC催化的谷氨酰胺产物UBE2N-Ub,发挥去泛素化活性催化UBE2N-Ub之间的异肽键断裂,从而逆转由MavC催化的UBE2N泛素化修饰^[39]。该过程可以恢复UBE2N的酶活性,从而激活NF- κ B信号通路,使细胞维持正常的生长水平,有利于细菌在细胞内的复制增殖。尽管MavC与MvcA的酶活性相反,但它们具有约50%的同源性且结构高度相似。它们都由1个插入域(insertin domain, INS)、1个球状中心结构域(core globular domain, CG)及1个尾部 α 螺旋延伸区域(tail domain)组成,整体呈现1个C形结构^[39,71]。在MvcA对由MavC催化的泛素化途径进行逆转的过程中,MvcA的INS结构域特异性识别UBE2N-Ub底物,并在其CG结构域中的Cys83-His244-Gln265催化三联体的催化作用下,特异性地水解Ub和UBE2N之间的Q40-K92异肽键,MvcA与UBE2N的亲和力较低且带正电荷的Tail结构域对Ub具有排斥作用,有利于Ub和UBE2N从MvcA上分离,最终完成去泛素化过程^[39]。通过对我们实验室已解析的MvcA-UBE2N-Ub复合物结构与MvcA单体结构进行对比发现,在复合物结构中,UBE2N-Ub之间的异肽键固定在CG结构域的催化口袋中且INS结构域发生逆时针旋转而有利于酶活位点的暴露^[39]。总之,MvcA自身结构及其构象变化都有利于其完成去泛素化过程。

4 展望

本文介绍并描述了细菌中不同类型DUB的催化调控机制。越来越多的证据表明,许多致病菌可以编码具有DUB活性的效应蛋白。比较前面讨论的不同细菌DUB发现,大多数细菌DUB是由具有细胞内生活方式的细菌编码的,细菌侵染宿主细胞后被包裹在吞噬泡中。这些吞噬泡首先被宿主细胞泛素化,最终通过直接融合或异种吞噬的方式进入溶酶体被降解,而细菌编码的去泛素化酶可以靶向宿主泛素系统以减弱宿主的炎症信号反应。已报道的细菌中DUB主要分为两大类,OTU DUB在诱导保护性免疫反应中发挥重要作用,通过控制NF- κ B和促

炎趋化因子或细胞因子,抑制宿主免疫反应,但对于 OTU DUB如何精确地干扰细胞调控网络等相关问题还有待进一步研究。OTU DUB具有泛素链特异性,但需要解析细菌病原体的OTU DUB与相关泛素化底物的复合物结构才能了解相关信息。通过对OTU DUB结构的研究发现,到目前为止尚未对近端泛素结合位点进行广泛的结构比较分析,同时远端泛素结合位点的结构具有多样性和构象灵活性,这需要利用先进的生物物理和计算技术解决相关问题。CE DUB是细菌在感染过程中分泌的效应蛋白,可以阻断炎症信号级联,促进细菌生长。研究表明大多数CE DUB存在一个具有连锁特异性的S1'位点且对K63连接泛素链具有特异性。然而有研究发现CE DUB中XopD不具有泛素链特异性,这有利于细菌的感染^[44]。值得注意的是,细菌还可以编码一些具有特殊催化活性的DUB。如RavD可以切割线性泛素链^[56],由于线性泛素链存在于含有细菌的囊泡中,并且在NF- κ B激活中发挥作用,这种活性可能有利于细菌在宿主细胞中的生存和繁殖。此外,DupA、DupB和MvcA还可以调控非经典的去泛素化修饰,细菌病原体通过其效应蛋白控制宿主免疫的过程有待进一步探索。DUB在很多生命过程中发挥重要作用,许多疾病的发生与之直接相关,深入研究DUB的分子机制将有助于我们理解其生物学功能并治疗相关疾病,同时为开发新的治疗药物和抗感染疫苗提供信息。

参考文献 (References)

- [1] ROTIN D, KUMAR S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(6): 398-409.
- [2] RAPE M. Ubiquitylation at the crossroads of development and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(1): 59-70.
- [3] KERSCHER O, FELBERBAUM R, HOCHSTRASSER M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, 22: 159-80.
- [4] ABDUL REHMAN S A, KRISTARIYANTO Y A, CHOI S Y, et al. MINDY-1 is a member of an evolutionarily conserved and structurally distinct new family of deubiquitinating enzymes [J]. *Mol Cell*, 2016, 63(1): 146-55.
- [5] PICKART C M, EDDINS M J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1695(1/3): 55-72.
- [6] JURA N, SCOTTO-LAVINO E, SOBCZYK A, et al. Differential modification of Ras proteins by ubiquitination [J]. *Mol Cell*, 2006, 21(5): 679-87.
- [7] IKEDA F, DIKIC I. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. Protein modifications: beyond the usual suspects review series [J]. *EMBO Rep*, 2008, 9(6): 536-42.
- [8] XU P, DUONG D M, SEYFRIED N T, et al. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation [J]. *Cell*, 2009, 137(1): 133-45.
- [9] ERPAPAZOGLU Z, WALKER O, HAGUENAUER-TSAPIS R. Versatile roles of k63-linked ubiquitin chains in trafficking [J]. *Cells*, 2014, 3(4): 1027-88.
- [10] ELIA A E, BOARDMAN A P, WANG D C, et al. Quantitative proteomic atlas of ubiquitination and acetylation in the DNA damage response [J]. *Mol Cell*, 2015, 59(5): 867-81.
- [11] MORRIS J R, SOLOMON E. BRCA1: BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair [J]. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(8): 807-17.
- [12] SUN L, CHEN Z J. The novel functions of ubiquitination in signaling [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(2): 119-26.
- [13] ORDUREAU A, SARRAF S A, DUDA D M, et al. Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis [J]. *Mol Cell*, 2014, 56(3): 360-75.
- [14] MANZANILLO P S, AYRES J S, WATSON R O, et al. The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens [J]. *Nature*, 2013, 501(7468): 512-6.
- [15] BESCHE H C, SHA Z, KUKUSHKIN N V, et al. Autoubiquitination of the 26S proteasome on Rpn13 regulates breakdown of ubiquitin conjugates [J]. *EMBO J*, 2014, 33(10): 1159-76.
- [16] MICHEL M A, ELLIOTT P R, SWATEK K N, et al. Assembly and specific recognition of k29- and k33-linked polyubiquitin [J]. *Mol Cell*, 2015, 58(1): 95-109.
- [17] PROULX J, BORGMANN K, PARK I W. Role of virally-encoded deubiquitinating enzymes in regulation of the virus life cycle [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4438.
- [18] PASSALACQUA K D, CHARBONNEAU M E, DONATO N J, et al. Anti-infective activity of 2-cyano-3-acrylamide inhibitors with improved drug-like properties against two intracellular pathogens [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(7): 4183-96.
- [19] KITAO T, TAGUCHI K, SETO S, et al. Legionella manipulates non-canonical SNARE pairing using a bacterial deubiquitinase [J]. *Cell Rep*, 2020, 32(10): 108107.
- [20] MA K, ZHEN X, ZHOU B, et al. The bacterial deubiquitinase Ceg23 regulates the association of Lys-63-linked polyubiquitin molecules on the *Legionella* phagosome [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(6): 1646-57.
- [21] CLAGUE M J, BARSUKOV I, COULSON J M, et al. Deubiquitylases from genes to organism [J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(3): 1289-315.
- [22] BARD J A M, GOODALL E A, GREENE E R, et al. Structure and function of the 26S proteasome [J]. *Annu Rev Biochem*, 2018, 87: 697-724.
- [23] RATHORE A, IKETANI S, WANG P, et al. CRISPR-based gene knockout screens reveal deubiquitinases involved in HIV-1 latency in two Jurkat cell models [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 5350.
- [24] LUO G, HU N, XIA X, et al. RPN11 deubiquitinase promotes proliferation and migration of breast cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(1): 331-8.
- [25] ZHANG X, CHOI P S, FRANCIS J M, et al. Identification of

- focally amplified lineage-specific super-enhancers in human epithelial cancers [J]. *Nat Genet*, 2016, 48(2): 176-82.
- [26] ARON R, PELLEGRINI P, GREEN E W, et al. Deubiquitinase Usp12 functions noncatalytically to induce autophagy and confer neuroprotection in models of Huntington's disease [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3191.
- [27] SCHAUER N J, MAGIN R S, LIU X, et al. Advances in discovering deubiquitinating enzyme (DUB) inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2020, 63(6): 2731-50.
- [28] RAWLINGS N D, BARRETT A J, THOMAS P D, et al. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D624-32.
- [29] SCHLUTER D, SCHULZE-NIEMAND E, STEIN M, et al. Ovarian tumor domain proteases in pathogen infection [J]. *Trends Microbiol*, 2022, 30(1): 22-33.
- [30] SHEEDLO M J, QIU J, TAN Y, et al. Structural basis of substrate recognition by a bacterial deubiquitinase important for dynamics of phagosome ubiquitination [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(49): 15090-5.
- [31] KUBORI T, KITAO T, ANDO H, et al. LotA, a Legionella deubiquitinase, has dual catalytic activity and contributes to intracellular growth [J]. *Cell Microbiol*, 2018, 20(7): e12840.
- [32] LIU S, LUO J, ZHEN X, et al. Interplay between bacterial deubiquitinase and ubiquitin E3 ligase regulates ubiquitin dynamics on Legionella phagosomes [J]. *eLife*, 2020, 9: e58114.
- [33] PIKE C M, BOYER-ANDERSEN R, KINCH L N, et al. The Legionella effector RavD binds phosphatidylinositol-3-phosphate and helps suppress endolysosomal maturation of the Legionella-containing vacuole [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(16): 6405-15.
- [34] WAN M, WANG X, HUANG C, et al. A bacterial effector deubiquitinase specifically hydrolyses linear ubiquitin chains to inhibit host inflammatory signalling [J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4(8): 1282-93.
- [35] KUBORI T, BUI X T, HUBBER A, et al. Legionella RavZ plays a role in preventing ubiquitin recruitment to bacteria-containing vacuoles [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 384.
- [36] URBANUS M L, QUAILE A T, STOGIOS P J, et al. Diverse mechanisms of metaeffector activity in an intracellular bacterial pathogen, *Legionella pneumophila* [J]. *Mol Syst Biol*, 2016, 12(12): 893.
- [37] SHIN D, MUKHERJEE R, LIU Y, et al. Regulation of phosphoribosyl-linked serine ubiquitination by deubiquitinases DupA and DupB [J]. *Mol Cell*, 2020, 77(1): 164-79, e6.
- [38] AKTURK A, WASILKO D J, WU X, et al. Mechanism of phosphoribosyl-ubiquitination mediated by a single Legionella effector [J]. *Nature*, 2018, 557(7707): 729-33.
- [39] GAN N, GUAN H, HUANG Y, et al. *Legionella pneumophila* regulates the activity of UBE2N by deamidase-mediated deubiquitination [J]. *EMBO J*, 2020, 39(4): e102806.
- [40] FURTADO A R, ESSID M, PERRINET S, et al. The chlamydial OTU domain-containing protein ChlaOTU is an early type III secretion effector targeting ubiquitin and NDP52 [J]. *Cell Microbiol*, 2013, 15(12): 2064-79.
- [41] BETTS H J, WOLF K, FIELDS K A. Effector protein modulation of host cells: examples in the *Chlamydia* spp. arsenal [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2009, 12(1): 81-7.
- [42] HAUSMAN J M, KENNY S, IYER S, et al. The two deubiquitinating enzymes from chlamydia trachomatis have distinct ubiquitin recognition properties [J]. *Biochemistry*, 2020, 59(16): 1604-17.
- [43] PRUNEDA J N, BASTIDAS R J, BERTSOULAKI E, et al. A Chlamydia effector combining deubiquitination and acetylation activities induces Golgi fragmentation [J]. *Nat Microbiol*, 2018, 3(12): 1377-84.
- [44] PRUNEDA J N, DURKIN C H, GEURINK P P, et al. The molecular basis for ubiquitin and ubiquitin-like specificities in bacterial effector proteases [J]. *Mol Cell*, 2016, 63(2): 261-76.
- [45] MESQUITA F S, THOMAS M, SACHSE M, et al. The Salmonella deubiquitinase SseL inhibits selective autophagy of cytosolic aggregates [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(6): e1002743.
- [46] YE Z, PETROF E O, BOONE D, et al. Salmonella effector AvrA regulation of colonic epithelial cell inflammation by deubiquitination [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(3): 882-92.
- [47] HOTSON A, CHOSÉD R, SHU H, et al. Xanthomonas type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta [J]. *Mol Microbiol*, 2003, 50(2): 377-89.
- [48] KIM J G, TAYLOR K W, HOTSON A, et al. XopD SUMO protease affects host transcription, promotes pathogen growth, and delays symptom development in xanthomonas-infected tomato leaves [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(7): 1915-29.
- [49] BECKMANN J F, RONA U J A, HOCHSTRASSER M. A Wolbachia deubiquitylating enzyme induces cytoplasmic incompatibility [J]. *Nat Microbiol*, 2017, 2: 17007.
- [50] ZHOU H, MONACK D M, KAYAGAKI N, et al. Yersinia virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF-kappa B activation [J]. *J Exp Med*, 2005, 202(10): 1327-32.
- [51] SHANKS J, BURTNICK M N, BRETT P J, et al. Burkholderia mallei tssM encodes a putative deubiquitinase that is secreted and expressed inside infected RAW 264.7 murine macrophages [J]. *Infect Immun*, 2009, 77(4): 1636-48.
- [52] GRABE G J, ZHANG Y, PRZYDACZ M, et al. The salmonella effector SpvD is a cysteine hydrolase with a serovar-specific polymorphism influencing catalytic activity, suppression of immune responses, and bacterial virulence [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(50): 25853-63.
- [53] ROLHION N, FURNISS R C, GRABE G, et al. Inhibition of nuclear transport of NF-kappa B p65 by the salmonella type III secretion system effector SpvD [J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12(5): e1005653.
- [54] CATIC A, MISAGHI S, KORBEL G A, et al. ElaD, a deubiquitinating protease expressed by *E. coli* [J]. *PLoS One*, 2007, 2(4): e381.
- [55] CORN J E, VUCIC D. Ubiquitin in inflammation: the right linkage makes all the difference [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21(4): 297-300.
- [56] FISCHER A, HARRISON K S, RAMIREZ Y, et al. Chlamydia trachomatis-containing vacuole serves as deubiquitination platform to stabilize Mcl-1 and to interfere with host defense [J]. *eLife*, 2017, 6: e21465.
- [57] CHOSÉD R, TOMCHICK D R, BRAUTIGAM C A, et al. Structural analysis of Xanthomonas XopD provides insights into substrate specificity of ubiquitin-like protein proteases [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(9): 6773-82.
- [58] MISAGHI S, BALSARA Z R, CATIC A, et al. Chlamydia tra-

- chomatis-derived deubiquitinating enzymes in mammalian cells during infection [J]. *Mol Microbiol*, 2006, 61(1): 142-50.
- [59] CLAESSEN J H L, WITTE M D, YODER N C, et al. Catch-and-release probes applied to semi-intact cells reveal ubiquitin-specific protease expression in *Chlamydia trachomatis* infection [J]. *Chembiochem*, 2013, 14(3): 343-52.
- [60] MEVISSSEN T E, HOSPENTHAL M K, GEURINK P P, et al. OTU deubiquitinases reveal mechanisms of linkage specificity and enable ubiquitin chain restriction analysis [J]. *Cell*, 2013, 154(1): 169-84.
- [61] LIN Y H, MACHNER M P. Exploitation of the host cell ubiquitin machinery by microbial effector proteins [J]. *J Cell Sci*, 2017, 130(12): 1985-96.
- [62] AKUTSU M, YE Y, VIRDEE S, et al. Molecular basis for ubiquitin and ISG15 cross-reactivity in viral ovarian tumor domains [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(6): 2228-33.
- [63] CAPODAGLI G C, DEATON M K, BAKER E A, et al. Diversity of ubiquitin and ISG15 specificity among nairoviruses' viral ovarian tumor domain proteases [J]. *J Virol*, 2013, 87(7): 3815-27.
- [64] LOMBARDI C, AYACH M, BEAUREPAIRE L, et al. A compact viral processing proteinase/ubiquitin hydrolase from the OTU family [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(8): e1003560.
- [65] SHIN D, BHATTACHARYA A, CHENG Y L, et al. Bacterial OTU deubiquitinases regulate substrate ubiquitination upon Legionella infection [J]. *eLife*, 2020, 9: e58277.
- [66] HANEBURGER I, HILBI H. Phosphoinositide lipids and the Legionella pathogen vacuole [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013, 376: 155-73.
- [67] KALAYIL S, BHOGARAJU S, BONN F, et al. Insights into catalysis and function of phosphoribosyl-linked serine ubiquitination [J]. *Nature*, 2018, 557(7707): 734-8.
- [68] WAN M, SULPIZIO A G, AKTURK A, et al. Deubiquitination of phosphoribosyl-ubiquitin conjugates by phosphodiesterase-domain-containing Legionella effectors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(47): 23518-26.
- [69] WANG Y, ZHAN Q, WANG X, et al. Insights into catalysis and regulation of non-canonical ubiquitination and deubiquitination by bacterial deamidase effectors [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2751.
- [70] PUVAR K, IYER S, FU J, et al. Legionella effector MavC targets the Ube2N~Ub conjugate for noncanonical ubiquitination [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2365.
- [71] GUAN H, FU J, YU T, et al. Molecular basis of ubiquitination catalyzed by the bacterial transglutaminase MavC [J]. *Adv Sci*, 2020, 7(12): 2000871.