

·综述·

锌指蛋白A20调节炎症信号的作用与机制研究进展

刘毓刚^{1,2} 综述, 吴丽娟^{2△} 审校

(1. 第三军医大学研究生管理大队, 重庆, 400038; 2. 成都军区总医院检验科, 四川成都 610083)

关键词:A20; NF-κB; 炎症; 信号传导**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.04.027**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2013)04-0448-03

炎症是具有血管系统的活体组织对损伤因子的防御性反应, 炎症信号起始于模式识别受体(PRR)与病原生物表面的病原体相关分子(PAMP)相互识别和作用, 继而启动免疫应答, 在机体抵抗外来感染的过程中发挥着关键作用^[1]。由 Toll样受体、核酸寡聚化域(NOD)样受体等 PRR 接收的炎症信号将向下游传递, 并激活核因子 kappa B(NF-κB), NF-κB 则进入细胞核调控多种基因表达, 这个通路的失调将引起过度炎症及多种疾病, 如自身免疫性疾病、肿瘤、脓毒症等。锌指蛋白 A20 又名肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 3(TNFAIP3), 是炎性反应负向调节的关键分子, 它主要通过泛素化作用, 影响 PRR 到核因子 kappa B(NF-κB) 的胞内信号转导, 来对炎症、免疫应答、细胞增殖、细胞凋亡等多个生物过程进行调控。在本文中我们将 A20 蛋白炎症调节中的作用与机制进行综述, 为深入研究提供参考。

1 体内的多聚泛素化

泛素化是一个使底物蛋白与泛素(一种含 76 个氨基酸的肽)以共价键进行连接的酶促反应过程, 是一个翻译后的蛋白修饰的过程。蛋白泛素化的过程包括三步酶促级联反应, 首先, 泛素激活酶(E1)在 ATP 供能情况下以泛素硫酯键与一个泛素分子尾部半胱氨酸残基连接, 使泛素被激活; 第二步, E1 将激活的泛素分子转移到泛素结合酶(E2)上; 随后, E2 酶和一些种类不同的泛素连接酶连接(E3)共同识别靶蛋白, 使泛素分子定向与底物蛋白赖氨酸残基的 ε 氨基形成泛素异肽键, 最终导致靶蛋白泛素化^[2]。通过上述过程形成的泛素化蛋白可以通过级联酶促反应继续使其他蛋白泛素化, 继而形成一个多聚泛素链。泛素肽自身含有 7 个赖氨酸残基, 泛素肽以哪个赖氨酸残基与底物蛋白连接对多聚泛素链非常重要, 因为不同的拓扑结构关联着不同的多聚泛素链类型, 导致不同的结果。泛素分子通过 48 位赖氨酸(K48)与泛素链连接, 介导经典的底物蛋白被 26S 蛋白酶体降解过程^[3], 而其通过 63 位赖氨酸(K63)连接泛素链则可能作为信号中介, 将泛素化信号继续传递至含泛素结合结构域的靶蛋白^[4]。像许多其他翻译后修饰一样, 泛素化作用是一个可逆的过程, 因此泛素链的编辑能对一个蛋白功能进行多层次的调节。泛素化在蛋白质的定位、代谢、功能、调节和降解中都起着十分重要的作用, 参与细胞周期、增殖、凋亡、分化、转移、基因表达、转录调节、信号传递、损伤修复、炎症免疫等几乎一切生命活动的调控, 在肿瘤、炎症等疾病发病中起着十分重要作用。

2 A20 的泛素编辑功能

A20 是一种存在于体内多种细胞内的 90 kDa 大小的蛋白, 属于去泛素分子(DUBs)的卵巢肿瘤家族, 其 N 端含有半胱氨酸蛋白酶/DUB 结构域 OUT^[5], C 端含有 7 个锌指结构,

其中第 4 锌指有 E3 泛素连接酶活性, 所以它既具有去泛素化功能, 又有泛素化活性^[6]。A20 能通过 OTU 结构域阻断 K63 泛素化通路, 也能通过 7 个锌指与 K48 泛素链连接。最近有研究报道了 A20 干扰泛素化级联的各主要组分间的相互作用, 如底物与 E3、E3 与 E2 的相互作用, 使特异的 E3 激活减弱, 以此阻断底物泛素化的过程^[7-8]。A20 就是通过这种阻断 K63 多聚泛素链阻止信号传递, 而加强 K48 多聚泛素链促进关键信号分子的降解的双重特性, 来调节免疫应答。

3 A20 抑制炎症信号的机制

NF-κB 是一种介导促炎反应的高度保守的核转录因子, 它能诱导炎性细胞因子的产生, 正常情况下, NF-κB 二聚体以非活性状态存在于细胞浆中, 而 IκB 的锚蛋白重复序列结构域能够使 NF-κB 维持这种非活性状态^[9]。经过外界的炎性细胞因子或者微生物感染的刺激, IκB 激酶(IκB kinase, IKK)复合体(包括 IKK α , IKK β 和 IKK γ)使 IκB 磷酸化, 触发 IκB 从 NF-κB 上脱落并被泛素化, 继而被蛋白酶体介导的降解, 使得 NF-κB 由非活性状态被激活, 最终 NF-κB 进入细胞核激活目的基因^[10]。A20 为 NF-κB 依赖性表达, 当 NF-κB 大量激活, A20 能通过与 IKK 复合体结合, 被 IKK β 磷酸化, 阻止 IκB 被磷酸化, 抑制 NF-κB 的进一步活化, 发挥反馈性调节作用^[11]。多个研究发现, A20 能作用于 IKK 复合体信号通路上游的关键分子, 如 RIP1、TRAF6 等, 最终起到抑制炎症信号的目的^[6,12]。最新研究表明, A20 还能通过其第 7 锌指与 IKK γ (又名 NEMO)特异性结合, 阻断 IKK 被 TAK1 磷酸化, 同样抑制 NF-κB 信号^[13]。敲除或人工突变动物的 A20 基因, 动物对 LPS 的敏感性异常增高, 体内炎性反应失控, 发生严重的多器官炎症, 死亡率大幅提高, 而正常个体 A20 则能够抑制炎症的发展^[14-15], 这更证实了 A20 基因对炎症信号传导的抑制作用。

3.1 A20 干扰 Toll/IL-1 受体及 TNF α 受体 1 信号通路 IL-1 受体和 Toll 样受体有相似的胞内结构域, 被统一称为 Toll/IL-1 受体超家族, 所以它们利用共同的信号分子与下游 IKK 复合物相连接^[16]。这些受体收到刺激后, E3 连接酶 TRAF6 迅速被 K63 泛素化以激活 IKK 复合体^[17], A20 则通过其去泛素化作用中止 K63 多聚泛素链来抑制 TRAF6 信号传导^[12]。另外, A20 也能通过阻断 TRAF6 与 E2 酶 Ubc13 及 UbcH5 的联系来减弱 TRAF6 活性^[8]; A20 也同样催化 TRAF6 的 K48 泛素化, 使其降解, 导致信号链完全终止^[8]。因为 E3 连接酶 Itch 和 RNF11 在 TRAF6 去泛素化的过程中也发挥着间接的作用, 而其在 Ubc13 和 UbcH5 降解过程中却未见作用, 所以这些 E3 连接酶在 A20 抑制 TRAF6 信号通路过程中可能不是直接的发挥反馈抑制作用, 而是作为配体促发分子, 可以快速推动 A20 促发的反馈抑制作用。

虽然许多研究已经表明 TRAF6 在 IL-1/TLR4 信号通路中将进行 K63 多聚泛素化,但 TRAF6 泛素化对 NF-κB 信号传导是否是必需的过程目前还存在争议。Lamothe 等^[18]发现 TRAF6 的泛素化发生在 124 位赖氨酸,并证明了这个络氨酸残基在 IKK 的激活以及破骨细胞分化中起着关键的作用;但另一个研究显示一种 TRAF6 赖氨酸残基突变体也能完整的发挥 TAK1 和 NF-κB 的激活作用,提示 TRAF6 的泛素化可能不是 IL-1R/TLR 通路激活 NF-κB 必需的^[19]。根据后一研究的结论,TRAF6 不是必需的,就很难解释为什么在受体受刺激后 TRAF6 会进行泛素化及去泛素化的转变。这或许可以理解为 TRAF6 的 K63 多聚泛素化可能是 TRAF6 与 A20 相互作用的信号标记,A20 需要泛素化的分子(如泛素化的 TRAF6)作为传感器,并通过中介分子 TAX1BP1 来与 K63 多聚泛素化底物联系,发挥去泛素化的作用^[20-21]。我们可以认为 A20 间接通过与 TRAF6 的作用,与 TRAF6/Ubc13/UbcH5 复合物(此复合物中只有 TRAF6 是 K63 泛素化的)连接,通过 TAX1BP1 来阻断 TRAF6 与这些 E2 酶的联系,最终使 TRAF6 的 E3 连接酶功能失活。因为 TRAF6 的 E3 连接酶活性需要依赖 Ubc13 和 UbcH5 的 E2 酶功能,所以 A20 与泛素化的 TRAF6 相互作用可能是阻断 TRAF6/Ubc13/UbcH5 联系以及接下来阻断 NF-κB 信号通路所必需的。另外,TAX1BP1 作为 A20 作用于 Ubc13 和 UbcH5 过程中的中介分子,也是阻断 NF-κB 信号通路所必需的^[8]。

TNF α 与 TNF α 受体 1 (TNF α receptor 1, TNFR1)结合后,受体相互作用蛋白 1 (RIP1)及下游的 NEMO 将被 K63 多聚泛素化,这个过程使 IKK 复合体激活,并将信号传递至下游 NF-κB^[22-23],而 A20 作为此信号通路负反馈环的重要环节,能通过其 OTU 结构域不断使 RIP1 和 NEMO 去泛素化,阻断这种信息传递^[6]。与对 TRAF6 的作用类似,A20 能通过阻断细胞凋亡抑制蛋白 1/2 (cellular inhibitor of apoptosis 1/2, cIAP1/2)、TRAF2 与 E2 酶 Ubc13 的联系,从而抑制 E3 连接酶的活性;A20 还能使 Ubc13 以及 RIP1 进行 K48 多聚泛素化,加速其降解,同样达到抑制 NF-κB 信号的目的^[6,8]。虽然 A20 的锌指结构在 RIP1 降解过程中是必需的,但现在还不清楚 A20 在 R1P1 的 K48 泛素化过程中是否起着 E3 连接酶的作用。因为 Itch 及 RNF11 同样表现出能使 RIP1 降解的能力,但它们对 TNF α 诱导的 Ubc13 降解无明显作用^[24-25],而 E3 连接酶 TRIAD3A 则能通过降解 RIP1 来抑制 NF-κB 信号^[26]。

3.2 A20 干扰 NOD2 信号通路 NOD2 是一种与细菌细胞壁酰二肽结合的细胞内受体,它与配体结合后也通过 IKK 复合物传递 NF-κB 信号^[27-28]。在 NOD2 介导的 IKK 至 NF-κB 信号时,RIP2 作为中介蛋白通过 cIAP1/2 被 K63 多聚泛素化^[29-30],多聚泛素化的 RIP2 也能被 A20 去泛素化,致使 NF-κB 的激活被终止,但体外实验未发现稳定的 RIP2-A20 联系,且未观察到 A20 触发 RIP2 的 K48 降解^[31]。因为 A20 能通过作用于 E2-E3 酶复合物来抑制 K63 多聚泛素化,在这个过程中可能 cIAP1/2-Ubc13/UbcH5 复合物最先被 A20 分离,然后 Ubc13/UbcH5 被 K48 多聚泛素化降解,进而抑制 RIP2 的 K63 多聚化和 NOD2 介导的 NF-κB 激活。有趣的是,最近有研究表明 E3 连接酶 Itch 可以作为 RIP2 介导的促分裂素原活化蛋白激酶(MAPK)激活的正向调节因子,但是其对 RIP2 介导的 NF-κB 激活却起着负向调节作用^[32]。Itch 在受体被激活后,最初作为 K63 多聚泛素链中的 E3 连接酶,使 RIP2 被 K63

多聚泛素化,继而活化包括 JNK 在内的 MAPKs,JNK 反过来使 Itch 磷酸化,磷酸化的 Itch 在 K48 多聚泛素链中发挥 E3 连接酶功能^[33],使各种中间分子降解,Itch 磷酸化的构象变化使其易于与 A20 连接,并发挥 NF-κB 的抑制功能。

3.3 A20 干扰 T 细胞受体信号通路 在 T 细胞中,A20 呈持续性表达,除了发挥 T 细胞受体介导的 NF-κB 反馈抑制作用外,还能起到使细胞保持稳态的作用^[34]。T 细胞受体(T cell receptor,TCR)受刺激后,PKC θ 依赖的 CARMA1 磷酸化,并形成 CARMA1-BCL10-MALT1(CMB)信号复合体^[35],接下来 CBM 与 E3 连接酶 TRAF6 和 TRAF2 连接,启动 MALT1,BCL10 及 IKK γ 的 K63 多聚泛素化^[36-38],泛素化的 MALT1 作为中介分子继续使下游 IKK γ 泛素化,促使 IKK 复合物的形成^[39]。受体接收信号的早期,MALT1 抑制 A20 的功能,A20 还受到蛋白酶体介导的降解,使信号顺利传递至 IKK 复合物^[40],但到了接受信号一段时间后,A20 经过负反馈环的诱导产生,使泛素化的 MALT1 去泛素化,阻断 IKK 形成和 NF-κB 的激活^[41]。除了使 MALT1 去泛素化,A20 还能使 MALT1-TRAF6/Ubc13 复合物,以及 TRAF6-2-Ubc13 复合物分离,继而阻断 MALT1 的 K63 多聚泛素化以及触发 Ubc13 的降解。因为 TRAF6 起着 MALT1 的 E3 连接酶作用,而 E2 酶 Ubc13 在 TCR 信号传导至 NF-κB 过程中是必需的,所以 A20 的这个功能也可以抑制 NF-κB 活化。

4 结语

炎症,尤其是脓毒症是感染引起的全身炎症反应综合征(SIRS),是众多介质参与的复杂反应,NF-κB 通过调控其靶基因参与了感染发生、发展的整个过程,而 A20 作为 NF-κB 信号的重要抑制分子,在炎症控制方面有很大的应用前景,在几乎所有自身免疫性疾病中都发现有 A20 的基因多态性更提示了 A20 在炎症保护中有重要作用。弄清楚 A20 在 NF-κB 在 NF-κB 信号传导过程中的作用机制可为临床预防治疗炎症,以及防止炎症的扩散提供新手段。

参考文献

- [1] Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition[J]. Int Immunol, 2009, 21(2): 317-337.
- [2] Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitinlike proteins[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006, 22(1): 159-180.
- [3] 俞赞临,张洁,于嘉屏.泛素-蛋白酶体途径降解蛋白质的机制及其组成成分[J].国际检验医学杂志,2008,31(10):1017-1018.
- [4] Bhoj VG, Chen ZJ. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity [J]. Nature, 2009, 458(3): 430-437.
- [5] Evans PC, Ovaa H, Hamon M, et al. Zinc-finger protein A20, a regulator of inflammation and cell survival, has de-ubiquitinating activity[J]. Biochem J, 2004, 378(5): 727-734.
- [6] Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, et al. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-κB signalling [J]. Nature, 2004, 430(5): 694-699.
- [7] Parvatiyar K, Barber GN, Harhaj EW. TAX1BP1 and A20 inhibit antiviral signaling by targeting TBK1-IKK γ kinases[J]. J Biol Chem, 2010, 285(3): 14999-15009.
- [8] Shembade N, Ma A, Harhaj EW. Inhibition of NF-κB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes[J]. Science, 2010, 327(10): 1135-1139.
- [9] Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-κB activity[J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18(5):

- 621-663.
- [10] Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- κ B[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(20):2195-2224.
- [11] Hutt JE, Turk BE, Asara JM, et al. I κ B Kinase β Phosphorylates the K63 Deubiquitinase A20 To Cause Feedback Inhibition of the NF- κ B Pathway[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(65):7451-7461.
- [12] Boone DL, Turer EE, Lee EG, et al. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses[J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(9):1052-1060.
- [13] Skaug B, Chen J, Du F, et al. Direct, noncatalytic mechanism of IKK inhibition by A20[J]. *Mol Cell*, 2011, 44(4):559-571.
- [14] Lee EG, Boone DL, Chai S, et al. Failure to regulate TNF- α -induced NF- κ B and death responses in A20 deficient mice[J]. *Science*, 2000, 289(21):2350-2354.
- [15] 吴丽娟, 陈潇, 冯建男, 等. 锌指蛋白A20突变体转基因小鼠脓毒症肺损伤的研究[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(5):435-437.
- [16] Verstrepen L, Bekaert T, Chau TL, et al. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF- κ B: variations on a common theme[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(25):2964-2978.
- [17] Deng L, Wang C, Spencer E, et al. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain[J]. *Cell*, 2000, 103(2):351-361.
- [18] Lamothe B, Besse A, Campos AD, et al. Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated Factor 6 autoubiquitination is a critical determinant of I κ B kinase activation[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(4):4102-4112.
- [19] Walsh MC, Kim GK, Maurizio PL, et al. TRAF6 autoubiquitination-independent activation of the NF κ B and MAPK pathways in response to IL-1 and RANKL[J]. *PLoS ONE*, 2008, 3(4):4064.
- [20] Iha H, Peloponese JM, Verstrepen L, et al. Inflammatory cardiac valvulitis in TAX1BP1-deficient mice through selective NF- κ B activation[J]. *EMBO J*, 2008, 27(5):629-641.
- [21] Shembade N, Harhaj NS, Liebl DJ, et al. Essential role for TAX1BP1 in the termination of TNF- α , IL-1- and LPS-mediated NF- κ B and JNK signaling[J]. *EMBO J*, 2007, 26(30):3910-3922.
- [22] Ea CK, Deng L, Xia ZP, et al. Activation of IKK by TNF α requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO[J]. *Mol Cell*, 2006, 22(2):245-257.
- [23] Legler DF, Micheau O, Doucey MA, et al. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF α -mediated NF- κ B activation[J]. *Immunity*, 2003, 18(5):655-664.
- [24] Shembade N, Harhaj NS, Parvatayar K, et al. The E3 ligase Itch negatively regulates inflammatory signaling pathways by controlling the function of the ubiquitin-editing enzyme A20[J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(3):254-262.
- [25] Shembade N, Parvatayar K, Harhaj NS, et al. The ubiquitin-editing enzyme A20 requires RNF11 to downregulate NF- κ B signaling[J]. *EMBO J*, 2009, 28(4):513-522.
- [26] Farnes C, Pan Q, Mathison JC, Chuang TH. Triad3A regulates ubiquitination and proteasomal degradation of RIP1 following disruption of Hsp90 binding[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(45):34592-34600.
- [27] Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(65):5509-5512.
- [28] Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis[J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(3):371-382.
- [29] Hasegawa M, Fujimoto Y, Lucas PC, et al. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF- κ B activation [J]. *EMBO J*, 2008, 27(2):373-383.
- [30] Bertrand MJ, Doiron K, Labbe K, et al. Cellular inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 are required for innate immunity signaling by the pattern recognition receptors NOD1 and NOD2[J]. *Immunity*, 2009, 30(7):789-801.
- [31] Hitotsumatsu O, Ahmad RC, Tavares R, et al. The ubiquitin-editing enzyme A20 restricts nucleotidebinding oligomerization domain containing 2-triggered signals[J]. *Immunity*, 2008, 28(2):381-390.
- [32] Tao M, Scacheri PC, Marinis JM, et al. ITCH K63-ubiquitinates the NOD2 binding protein, RIP2, to influence inflammatory signaling pathways[J]. *Curr Biol*, 2009, 19(11):1255-1263.
- [33] Chang L, Kamata H, Solinas G, et al. The E3 ubiquitin ligase Itch couples JNK activation to TNF α -induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover[J]. *Cell*, 2006, 124(5):601-613.
- [34] Tewari M, Wolf FW, Seldin MF, et al. Lymphoid expression and regulation of A20, an inhibitor of programmed cell death[J]. *J Immunol*, 1995, 154(15):1699-1706.
- [35] Matsumoto R, Wang D, Blonska M, et al. Phosphorylation of CARMA1 plays a critical role in T Cell receptor-mediated NF- κ B activation[J]. *Immunity*, 2005, 23(4):575-585.
- [36] Oeckinghaus A, Wegener E, Welteke V, et al. Malt1 ubiquitination triggers NF- κ B signaling upon T-cell activation[J]. *EMBO J*, 2007, 26(45):4634-4645.
- [37] Sun L, Deng L, Ea CK, et al. The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes[J]. *Mol Cell*, 2004, 14(3):289-301.
- [38] Wu CJ, Ashwell JD. NEMO recognition of ubiquitinated Bcl10 is required for T cell receptor-mediated NF- κ B activation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(17):3023-3028.
- [39] Laplantine E, Fontan E, Chiaravalli J, et al. NEMO specifically recognizes K63-linked poly-ubiquitin chains through a new bipartite ubiquitin-binding domain[J]. *EMBO J*, 2009, 28(26):2885-2895.
- [40] Coornaert B, Baens M, Heyninck K, et al. T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF- κ B inhibitor A20[J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(2):263-271.
- [41] Duwel M, Welteke V, Oeckinghaus A, et al. A20 negatively regulates T cell receptor signaling to NF- κ B by cleaving Malt1 ubiquitin chains[J]. *J Immunol*, 2009, 182(8):7718-7728.

(收稿日期:2012-10-09)