

体外重构 STUB1 介导 α -1 抗胰蛋白酶突变体 Z 蛋白泛素化修饰反应体系

凌雪^{1,2}, 代艳^{2,3}, 叶晓², 张肖雅², 林佳雨^{2,3}, 饶朗^{2*}, 田朝光^{2*}

1 中国科学技术大学生命科学与医学部, 安徽 合肥 230026

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 国家合成生物技术创新中心 低碳合成工程生物学重点实验室, 天津 300308

3 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

凌雪, 代艳, 叶晓, 张肖雅, 林佳雨, 饶朗, 田朝光. 体外重构 STUB1 介导 α -1 抗胰蛋白酶突变体 Z 蛋白泛素化修饰反应体系[J]. 生物工程学报, 2024, 40(2): 517-528.

LING Xue, DAI Yan, YE Xiao, ZHANG Xiaoya, LIN Jiayu, RAO Lang, TIAN Chaoguang. Reconstitution of the *in vitro* STUB1-mediated ubiquitination reaction system for α -1 antitrypsin mutant Z protein[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(2): 517-528.

摘要: α -1 抗胰蛋白酶 Z 型突变体蛋白(α -1 antitrypsin Z-mutant protein, ATZ)是引发 α -1 抗胰蛋白酶缺陷症(α -1 antitrypsin deficiency, AATD)的主要原因, 研究 ATZ 蛋白的泛素化修饰和降解对于治疗 AATD 具有重要意义。STUB1 是一种重要的 E3 泛素连接酶, 参与调节多种蛋白质的泛素化修饰。然而, STUB1 是否参与 ATZ 的泛素化修饰尚未明确。本研究首先将 ATZ 和 STUB1 的编码基因克隆到 pET28a 质粒, 构建了这 2 个蛋白的表达质粒。随后, 将重组质粒转入大肠杆菌表达系统, 在优化诱导条件实现了重组蛋白的异源表达。通过金属螯合亲和层析技术纯化得到目的蛋白, 并通过蛋白质谱分析验证了其氨基酸序列的准确性。利用纯化的 ATZ 和 STUB1 重组蛋白, 构建了一个体外泛素化修饰反应体系。实验结果显示, 在 ATP、E1 泛素激活酶和 E2 泛素结合酶的协同作用下, STUB1 成功催化了 ATZ 的泛素化修饰。本研究提供了一种体外获得 Z 型突变体 ATZ 纯化蛋白的方法, 并确认了 STUB1 介导 ATZ 的泛素化修饰功能, 推进了对 α -1 抗胰蛋白酶 Z 型突变体蛋白在细胞内降解过程的调控机制的理解。

关键词: α -1 抗胰蛋白酶; 泛素化; E3 泛素连接酶; 蛋白纯化; 蛋白酶体

资助项目: 天津市合成生物技术创新能力提升行动(TSBICIP-CXRC-048)

This work was supported by the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-CXRC-048).

*Corresponding authors. E-mail: RAO Lang, raolang@tib.cas.cn; TIAN Chaoguang, tian_cg@tib.cas.cn

Received: 2023-07-21; Accepted: 2023-10-07

Reconstitution of the *in vitro* STUB1-mediated ubiquitination reaction system for α -1 antitrypsin mutant Z protein

LING Xue^{1,2}, DAI Yan^{2,3}, YE Xiao², ZHANG Xiaoya², LIN Jiayu^{2,3}, RAO Lang^{2*},
TIAN Chaoguang^{2*}

1 College of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, Anhui, China

2 Key Laboratory of Engineering Biology for Low-Carbon Manufacturing, National Technology Innovation Centre for Synthetic Biology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 School of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: The α -1 antitrypsin Z-mutant protein (ATZ) is the primary cause of α -1 antitrypsin deficiency (AATD). Studying the ubiquitination modification and degradation of ATZ protein is importance for developing treatments for AATD. STUB1 is an important E3 ubiquitin ligase that regulates ubiquitination modification of various proteins. However, whether STUB1 is involved in the ubiquitination modification of ATZ has not been fully elucidated. In this study, the ATZ and STUB1 coding genes were first cloned into the pET28a plasmid, constructing 2 protein expression plasmids. The recombinant plasmids were then transferred into the *Escherichia coli* for expression. With the optimization of induction temperature and IPTG dosage, the recombinant proteins were successfully expressed. The target proteins were then efficiently purified from cell lysates using metal-chelating affinity chromatography, and the accuracy of the amino acid sequence was verified through protein mass spectrometry analysis. Using the purified ATZ and STUB1, we established an *in vitro* ubiquitination reaction system. Experimental results showed that, in the presence of ATP, E1 ubiquitin-activating enzyme, and E2 ubiquitin-conjugating enzyme, STUB1 catalyzed the ubiquitination modification of ATZ. This study provides a method for obtaining the ATZ protein *in vitro*, elucidates the mechanism of STUB1 mediating ATZ ubiquitination, thereby advancing our understanding of the intracellular degradation mechanism of the α -1 antitrypsin Z-mutant.

Keywords: α -1 antitrypsin; ubiquitination; E3 ubiquitin ligase; protein purification; proteasome

α -1 抗胰蛋白酶(α -1 antitrypsin, AAT)是一种由 *SERPINA1* 基因编码的重要蛋白酶抑制剂,它主要在肝脏细胞中合成,并迅速从肝脏分泌到血液中,然后传输到肺部。在肺部,AAT 的主要功能是通过抑制肺中性粒细胞弹性蛋白酶的破坏作用,保护肺组织^[1-2]。AAT 蛋白的全长由 418 个氨基酸组成,其中 N 端含有 1 个由 24 个氨基酸组成的信号肽序列,用于在蛋白合成时将其引导到正确的位置。该蛋白的抑制功

能主要依赖于其 C 端的中心环松散结构域 (central ring loose domain, RCL) (图 1)。在催化过程中,RCL 会插入到蛋白酶活性中心,从而抑制其水解活性^[3]。

α -1 抗胰蛋白酶缺乏症(α -1 antitrypsin deficiency, AATD)是由于 *SERPINA1* 基因的突变导致的遗传性疾病,这些突变会引起 AAT 蛋白的表达水平和功能改变,进而导致与肺部和肝脏相关的疾病。其中,AAT 的 Z 型突变(ATZ)是

AATD 症状最为严重的一种突变类型。它涉及该蛋白质第 342 位点的谷氨酸-赖氨酸替代^[4], 这种变化会使 AAT 蛋白的结构改变, 导致其在肝细胞内聚集^[4-6]。在肝脏细胞中突变体蛋白 ATZ 的聚集可能导致细胞的不可逆损伤, 最终引发肝硬化, 这也是 AATD 肝脏疾病的典型特征。

针对 AATD 的治疗策略之一是通过促进 ATZ 蛋白的细胞内降解来减轻病症。在 ATZ 降解过程中, 细胞内的两个主要降解系统发挥重要作用: 蛋白酶体和自噬溶酶体。一般认为蛋白酶体主要负责可溶性的 ATZ 蛋白的降解, 而自噬溶酶体参与对不可溶的 ATZ 蛋白聚集体的清除。泛素化修饰是 ATZ 有效降解的先决条件, 现已证明有多种泛素连接酶参与了 ATZ 的泛素化修饰和降解调控, 其中包括 E3 泛素连接酶 gp78^[7]和跨膜 E3 泛素连接酶 SYVN1/HRD1^[8]。

STIP1 同源性和 U-Box 结构蛋白 1 (STIP1 homology and U-Box structural protein 1, STUB1) 是一个高度保守的蛋白质, 包含 3 个结构域: N 端的 3 个 TPR (triple tandem tetrapeptide repeat) 结构域、高电荷中间线圈(coiled-coil)结构域和 C 末端的 U-Box 结构域(图 1)^[9]。已有实验证实 STUB1 具有 E3 泛素连接酶活性, 并能催化多种蛋白质的泛素化修饰, 包括内切酶微管相关

蛋白 Tau、自噬转录因子 TFEB、信号转导和转录激活子 SMAD3 等, 从而促进它们的降解, 并影响多种细胞生物学过程^[10-14]。最近的研究表明, 过量表达 STUB1 会显著降低 ATZ 蛋白水平, 而降低 STUB1 则导致 ATZ 蛋白过量积累。这提示 STUB1 可能参与 ATZ 的泛素化修饰和蛋白质水平调控。然而, 由于缺乏 ATZ 的体外表达和泛素化修饰体系的建立, 目前尚不能确认 STUB1 是否直接参与以及如何催化 ATZ 的泛素化修饰。

本研究将编码 ATZ 和 STUB1 基因的片段克隆至原核表达质粒中, 并将这些质粒转化至大肠杆菌中构建异源表达系统。通过优化 IPTG 浓度和温度, 成功实现了蛋白的可溶性表达。随后, 利用镍离子亲和层析技术纯化得到了高纯度的 ATZ 和 STUB1 蛋白样品。利用这些样品, 构建了 ATZ 在 STUB1 协助下进行泛素化修饰的反应体系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和载体

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、*Escherichia coli* strain BL21(DE3)、原核表达载体 pET28a 均为本实验室保存。

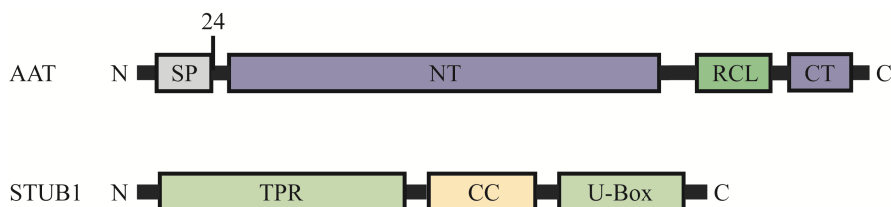


图 1 α -1 抗胰蛋白酶 AAT 和 E3 泛素连接酶 STUB1 的蛋白结构示意图

Figure 1 Schematic diagram of the protein structure of α -1 antitrypsin (AAT) and E3 ubiquitin ligase STUB1. AAT consists of signal peptide (SP), N-terminal domain (NT), and C-terminal domain (CT). The reaction center ring (RCL) is close to the C-terminal of the protein. The STUB1 protein consists of N-terminal 3 tetrapeptide repeat (TPR) domain, a highly charged middle coiled-coil domain (CC), and a carboxy-terminal U-box domain (U-box).

1.1.2 主要试剂和仪器

试剂：胰蛋白脲[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]、酵母提取物[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]、氯化钠(上海麦克林生化科技有限公司)、胶回收试剂盒[凯杰生物工程(深圳)有限公司]、 α -1 抗胰蛋白酶抗体(上海碧云天生物技术有限公司)、His tag 抗体(上海碧云天生物技术有限公司)、泛素抗体(上海碧云天生物技术有限公司)、二抗羊抗兔[艾比玛特生物医药(上海)有限公司]、蛋白 Marker (北京索莱宝科技有限公司)、考马斯亮蓝染色液(北京索莱宝科技有限公司)、限制性内切酶[赛默飞世尔科技(中国)公司]、PCR 试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)、质粒提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]、IPTG (上海阿拉丁生化科技股份有限公司)、E1 激活酶 UBE1 (上海碧云天生物技术有限公司)、E2 结合酶 UBE2B (北京索莱宝科技有限公司)、DM5000 DNA Ladder (北京吉普赛生物技术有限公司)、ATP (北京索莱宝科技有限公司)、泛素(上海源叶生物技术有限公司)。

仪器：水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司)、PCR 仪(艾本德股份公司)、水平脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)、超净工作台(苏州泰安科技有限公司)、离心机(艾本德股份公司)、纯水仪[密理博(中国)有限公司]、37 °C 恒温培养箱(上海福玛实验设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建及转化

PCR 扩增：分别设计 ATZ 和 STUB1 包含酶

切位点的引物从表达载体上扩增 ATZ 和 STUB1 片段。设计上下游引物，见表 1。

质粒转化：构建 pET28a-STUB1-His 和 pET28a-ATZ-His 质粒，转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 菌株。将目的片段与载体按照 5:1 的比例混合，然后加入 5 μ L Gibson 组装酶，混匀后在 PCR 仪中以 50 °C 进行连接催化反应 1 h。接着，取出感受态细胞并在冰上解冻，将连接产物全部转移到感受态细胞中，轻轻混匀。随后，在冰上孵育 30 min，然后在 42 °C 水浴中热激 90 s，最后在冰上放置 2 min。在超净工作台上，将 500 μ L 不含氨苄青霉素的液体培养基加入感受态细胞中。将培养基置于摇床上，以 37 °C、220 r/min 的转速复苏 1 h。复苏后，3 000 r/min 离心 2 min，去除 300 μ L 上清。将余下的液体混匀后，取 60 μ L 均匀涂布在培养板上，然后静置片刻。将培养板倒置放入 37 °C 恒温培养箱中，进行过夜培养，时长为 15 h。第 2 天，挑选单个克隆菌落，将其放在摇床上，以 37 °C、220 r/min 的速度培养。从每个管中取出 2 μ L 菌液进行 PCR 鉴定。将 PCR 产物与核酸上样缓冲液混合后进行电泳鉴定，最后挑选连接成功的菌株，送样进行测序。

1.2.2 蛋白表达与纯化

准备 1 L 摇瓶洗净备用，每瓶中加入 400 mL 培养基高温灭菌。取 40 μ L 菌液放入 50 mL 离心管加卡那霉素(kanamycin)培养基 10 mL 过夜摇菌 16 h。次日加 4 mL 菌液到 400 mL 含有卡那霉素培养基中，混匀。37 °C、220 r/min 摇床上孵育

表 1 本文研究所用到的引物

Table 1 Primers used in this work

Plasmid	Inserted gene	Primer	Sequences (5'→3')
pET28a-ATZ-His	ATZ	ATZ-F	CAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAGGATCCC
		ATZ-R	CCGCAAGCTTGTCTGTTTTGGGTGGGATTCAC
pET28a-STUB1-His	STUB1	STUB1-F	AACAACCTCGGGGAATTCTGGAAATTTATGGGC
		STUB1-R	GGTGGTGGTGCTCGAGTTAGCCATCCGCGCGCATCTGAC

2.5 h。此时菌液浑浊,往摇瓶中加 0.6 mmol/L IPTG 诱导蛋白表达,16 °C、220 r/min 过夜培养 12–16 h 离心收集菌体并超声破碎。细胞裂解液用 His-tag 亲和纯化方法纯化上清,用低浓度咪唑缓冲液清除杂蛋白,高浓度 500 mmol/L 咪唑洗脱目的蛋白。分别取 20 μ L 过柱前上清、过柱后上清与纯化浓缩后的目的蛋白进行 SDS-PAGE 分析,鉴定目的蛋白的纯化情况。

1.2.3 考马斯亮蓝染色

电泳结束后将蛋白胶取出放入容器中,加入 50 mL 双蒸水/去离子水高温加热 3 min 至沸腾停止,弃去水溶液。倒去废液,加入配制好的 25 mL 快速工作染色液混匀,高温加热至沸腾状态 30–60 s。停止加热后继续在脱色摇床上摇动 5–10 min,弃去染色液,此时蛋白条带可见。加入 50 mL 双蒸水进行脱色,高温加热至沸腾状态 30–60 s。倒去废液,重新加入 ddH₂O 洗脱煮沸,如条带不清晰可多洗脱几次。继续在脱色摇床上摇动 5–10 min,换水即可完成脱色。取出蛋白胶置于干净白色底盘观察条带并拍照。

1.2.4 蛋白质 Western blotting 分析

将蛋白样品和分子量标记物加入 8%或 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶的孔中,使用 80 V 电泳分离胶 30 min,然后使用 120 V 电泳浓缩胶 70 min。接着,将蛋白胶转移到经甲醇激活的 PVDF 膜上,使用 200 mA 电泳转膜 120 min。5%脱脂奶粉封闭膜,封闭时间为 2 h。加入不同的一抗抗体后,将其在 4 °C 孵育过夜,然后使用 TBST 缓冲液洗脱 3 次,每次 10 min。加入二抗抗体后,在室温下孵育 1 h,二抗均按 1:5 000 稀释比例稀释。然后,使用 TBST 洗脱液洗脱 3 次,每次 10 min。滴加显影液后,使用化学发光成像仪显影,并使用 ImageJ 软件对图像进行灰度分析。

1.2.5 质谱分析

从 SDS-PAGE 凝胶中切下目的条带,放入 1.5 mL 离心管中。加入 10 mmol/L DTT 在 97 °C 下还原 10 min,加入 40 mmol/L 2-氯乙酰胺室温下烷基化半胱氨酸上的巯基,反应 30 min,后加入乙腈真空干燥 20 min。丢弃上清液,加入适量 30 ng/L 胰蛋白酶消化蛋白,再补加碳酸氢盐缓冲液 37 °C 过夜孵育。消化后的肽段加入 0.1% (FA) 溶液,超声 10 min,真空浓缩样品。移动 A 相含 0.1% (体积分数) 甲酸和水,流动相 B 含 0.1% (体积分数) 甲酸和 100% 乙腈,流动相 B 以 5%–95% 梯度分离多肽,30 min 内肽在色谱柱(75 μ m \times 25 cm, 1.9 μ m C18-AQ particles) 上以 350 nL/min 的流速分离。质谱仪在 DDA-PASEF 模式下工作。利用 MaxQuant v1.6.2.0 软件对质谱数据进行处理,并将质谱结果与目的蛋白的理论氨基酸序列进行比较。

1.2.6 体外泛素化试验

反应在 50 μ L 混合物中进行,其中含有 2 μ g His 标记的 STUB1 和 2 μ g 的 ATZ 蛋白、50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、2.5 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L DTT、5 mmol/L ATP、10 mg 泛素、500 ng 激活酶 UBE1 和 200 ng 结合酶 UBE2B。反应在 37 °C 下进行 2 h,之后取出样品进行蛋白质印迹分析。

2 结果与分析

2.1 pET28a-ATZ-His 和 pET28a-STUB1-His 重组质粒的构建

获得高纯度 ATZ 和 STUB1 蛋白是实现 ATZ 的蛋白体外泛素化体系的前提条件。为了获得 ATZ 的重组表达质粒,首先以前期工作构建的 ATZ 表达载体(未发表工作)为模板,使用特异性引物(表 1)进行 PCR 扩增以获得相应的 DNA 片段。扩增产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳

后,发现条带大小在1 500 bp左右(图2A泳道1),与ATZ序列理论分子量1 257 bp大小相符合,表明扩增的条带为目的基因条带。同样以 STUB1的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增获得其 DNA 片段(909 bp) (图2A泳道2)。将以上 DNA 片段克隆连接到 pET28a 载体上构成重组质粒 pET28a-ATZ-His 和 pET28a-STUB1-His (图2B-2D),并经过 DNA 测序验证其正确性。

2.2 ATZ 蛋白诱导与表达条件的摸索

将重组蛋白表达质粒 pET28a-ATZ-His 转化进入 *E. coli* BL21(DE3)细胞中。通过调整诱导条件,发现在当温度为 16 °C、IPTG 浓度为

0.6 mmol/L 时,能够获得目的蛋白 ATZ-His 的最大可溶性表达。对比诱导前后细胞裂解物中的蛋白成分,发现添加 IPTG 能够诱导产生分子量约为 50 kDa 的蛋白(图3A)。值得注意的是,在细胞裂解物的不可溶性组分中也发现了相应的蛋白条带,表明该蛋白表达后部分可形成包涵体(图3B),这可能与 ATZ 蛋白本身易于聚集的构象特征相关^[4-6]。通过对细胞裂解物上清组分使用 His-tag 抗体进行免疫印迹实验分析,同样在分子量约为 50 kDa 的位置发现了一个特异性条带,此结果进一步证实了重组蛋白 ATZ-His 的表达成功(图3C)。

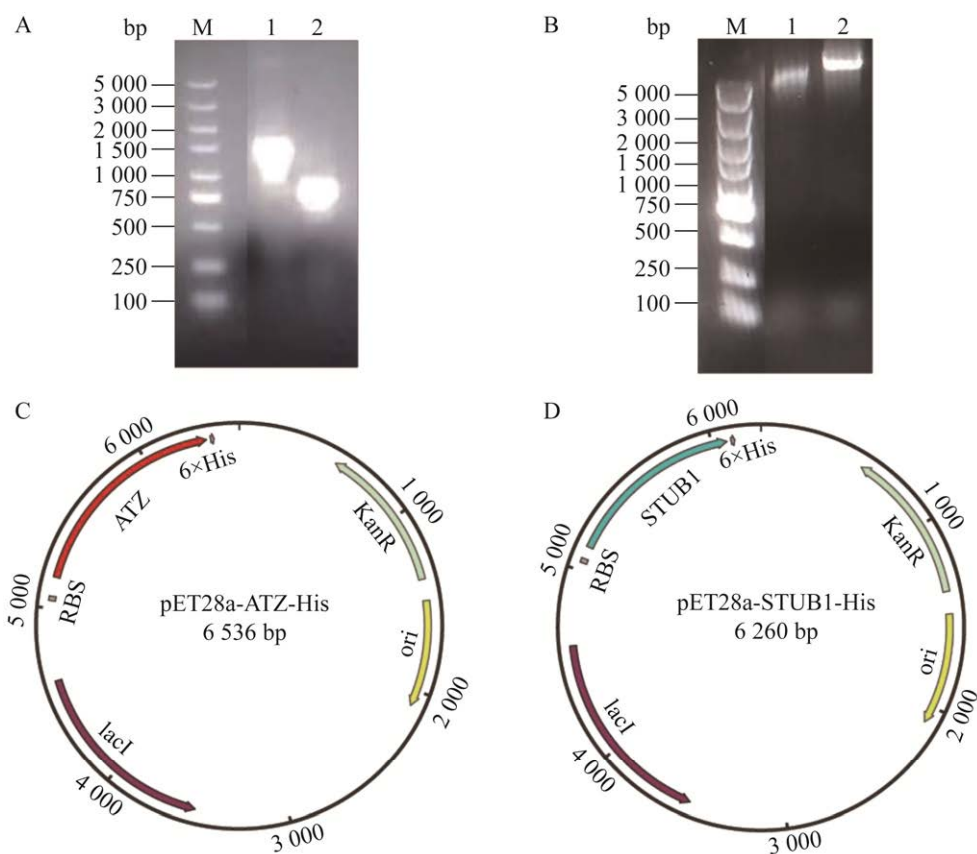


图2 重组质粒的构建

Figure 2 Construction of recombinant plasmids. A: PCR amplification of ATZ coding DNA. M: DM5000 DNA marker; Lane 1: ATZ PCR amplification product; Lane 2: STUB1 amplification product. B: PCR amplification of STUB1 coding DNA. Lane 1: Plasmid expressing STUB1-His protein; Lane 2: Plasmid expressing ATZ-His protein. C: Schematic of the recombinant pET28a-ATZ-His plasmid. D: Schematic of the recombinant pET28a-STUB1-His plasmid.

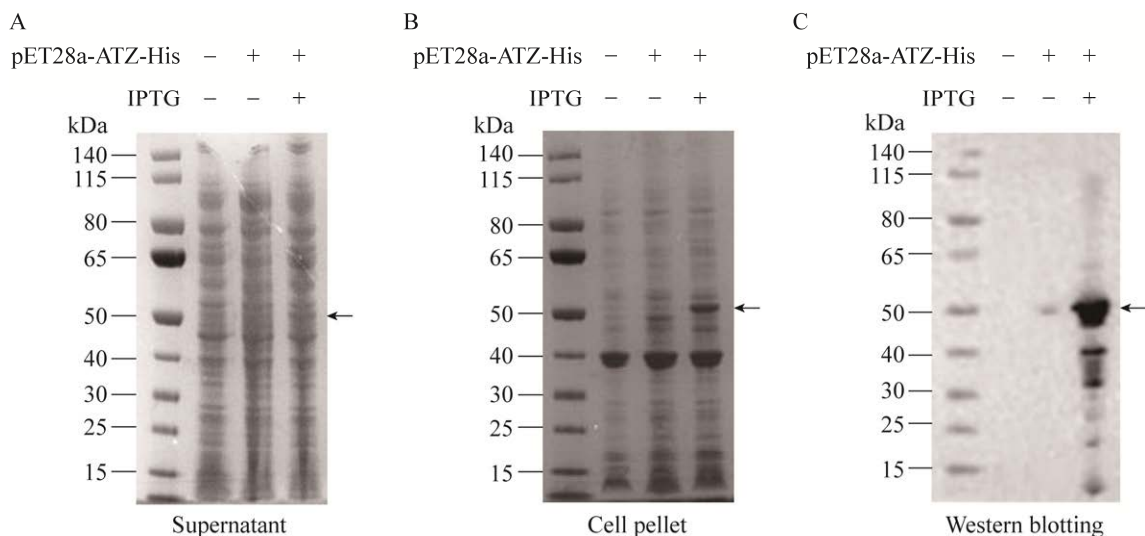


图3 ATZ-His 重组蛋白的诱导表达

Figure 3 ATZ-His expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). *E. coli* BL21(DE3) was transformed with pET28a-ATZ-His and induced for 16 h with 0.6 mmol/L IPTG at 16 °C. The cellular extract was separated into soluble supernatant (A) and insoluble pellet fraction (B) and analyzed via SDS-PAGE. C: Soluble cell extract was analyzed by immunoblotting with anti-His antibody. The black arrow indicates the recombinant protein ATZ-His.

2.3 突变体蛋白 ATZ 的纯化与鉴定

根据上述最佳诱导条件,扩大 ATZ 蛋白表达体系的培养与诱导,随后对诱导后产生的可溶性细胞裂解物进行了镍离子柱亲和层析纯化。对纯化过程中所有蛋白质样品进行 SDS-PAGE 分析,成功地获得了分子量约为 50 kDa 的目标蛋白,与重组蛋白 ATZ-His 的理论分子量 47 kDa 相吻合(图4A)。为了确认纯化所得的蛋白是 ATZ,切取目标蛋白条带,将蛋白消化成小肽,并进行质谱检测分析。质谱检测的结果显示,包括“YHSEAF TVNFGDTEEAKK”和“DTEEEDFHV DQVTTVK”(图4B)多个氨基酸肽段与 ATZ-His 蛋白的序列完全匹配(图4C)。这一结果证明重组蛋白 ATZ-His 的成功纯化。

2.4 E3 泛素连接酶 STUB1 蛋白的表达、纯化与鉴定

采用如前所述的诱导条件,对 STUB1 蛋白进行了大规模的表达和纯化。在纯化过程

中,对所有样品进行了 SDS-PAGE 分析,并进行了考马斯亮蓝染色。结果显示,经过纯化后的蛋白质样品成分单一,其蛋白质分子量约为 35 kDa,这与重组蛋白 STUB1-His 的理论分子量 35.4 kDa 基本一致(图5A)。将纯化后的蛋白样品切胶回收并结合胰蛋白酶消化之后进行蛋白质谱分析,在样品中检测到包括 HDKYMADMDLFSQVDEK 和 VGHFDPVTR (图5C)等在内的多个短肽片段,这些短肽的氨基酸序列与 STUB1 蛋白的部分氨基酸序列完全吻合,由此可以证实 STUB1 的蛋白表达与纯化取得成功。

2.5 ATZ 泛素化修饰体系的建立

前期的研究工作已经证明细胞内 STUB1 影响 ATZ 蛋白的泛素化修饰过程,并促进其随后的降解。作为一种 E3 连接酶,理论上 STUB1 具有直接催化 ATZ 泛素化修饰的能力。蛋白质泛素化修饰是一个复杂的过程,涉及 E1 泛素激

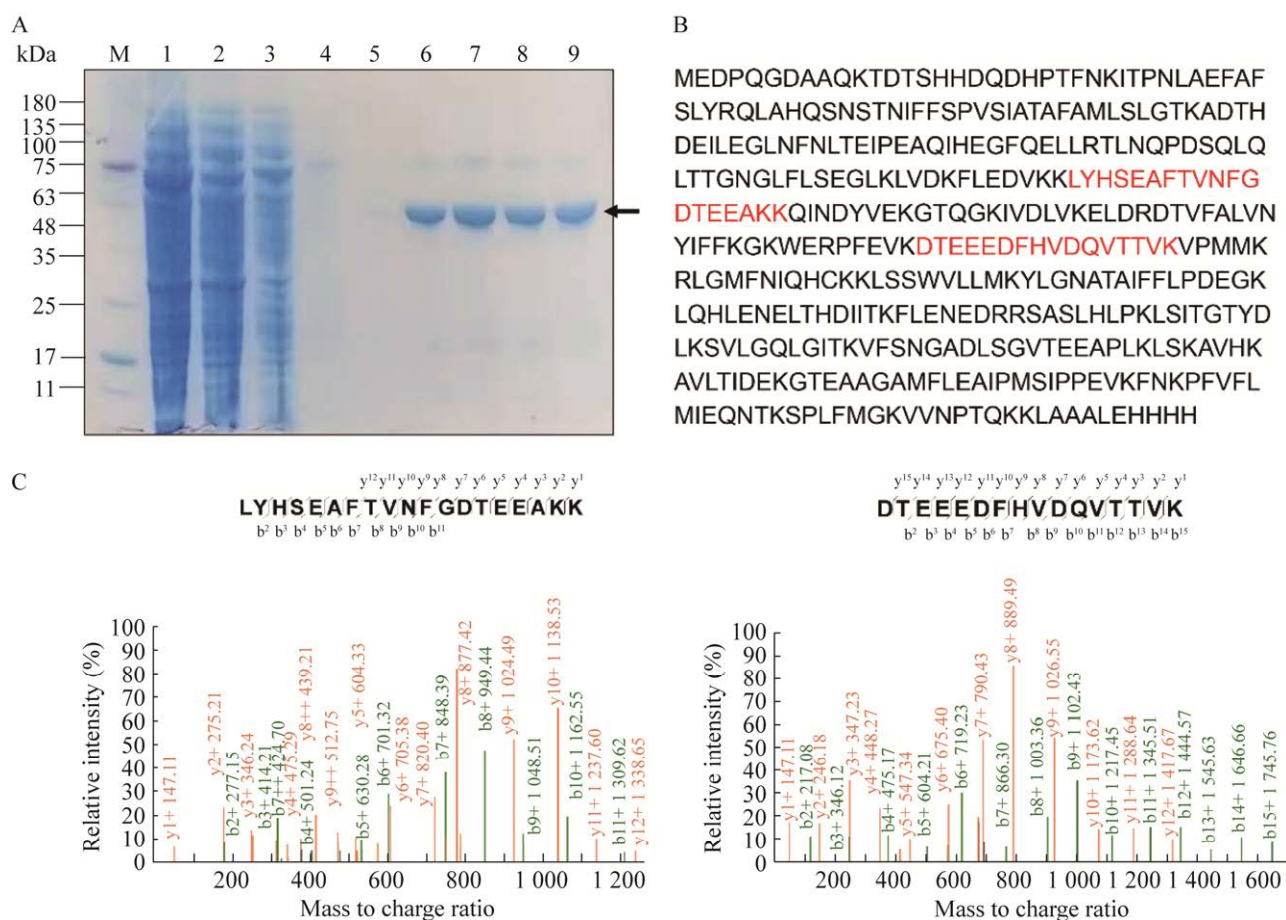


图 4 ATZ-His 重组蛋白的纯化与鉴定

Figure 4 Purification and identification of recombinant protein ATZ-His. A: SDS-PAGE analysis of different samples taken during the purification process of the recombinant protein. Lane M: Protein marker. Lane 1: Crude soluble cell lysate containing ATZ-His; Lane 2: Flow-through fraction from the Ni-NTA affinity sepharose column; Lane 3–5: Miscellaneous protein; Lane 6–9: Concentrated protein. B: Amino acid sequence of protein ATZ-His. C: MALDI-TOF peptide mass fingerprint (PMF) spectrum analysis of ATZ-His. The MS-MS spectra of the identified peptides YHSEAF TVNFGDTEEAQK and DTEEDFHVDQVTTVK from ATZ-His protein.

活酶、E2 泛素结合酶和 E3 泛素连接酶在消耗 ATP 的条件下将泛素分子添加到蛋白质分子上。为了验证 STUB1 是否直接催化 ATZ 的泛素化修饰，将泛素、ATP、E1 泛素激活酶 UBE1、E2 泛素结合酶 UBE2B 以及 STUB1 与底物蛋白 ATZ 混合加入到一个 50 μ L 的反应体系中。37 $^{\circ}$ C 反应 2 h 后，取出反应后的样品进行蛋白质印迹检测。结果显示，在 ATP、泛素激活酶 E1 和泛素结合

酶 E2 的共同作用下，ATZ 发生了泛素化修饰，因为通过蛋白质印迹可以检测到 ATZ 蛋白分子量的增加，而这正是由于蛋白发生泛素化修饰所引起的(图 6A 泳道 2，图 6B 泳道 3)。此外，体外实验也证实，ATZ 的泛素化过程依赖于 STUB1 和泛素相关蛋白的共同作用，因为无论是单独添加 E1 和 E2 (图 6A 泳道 1)还是单独添加 STUB1 (图 6B 泳道 2)都无法实现 ATZ 的泛素化修饰。

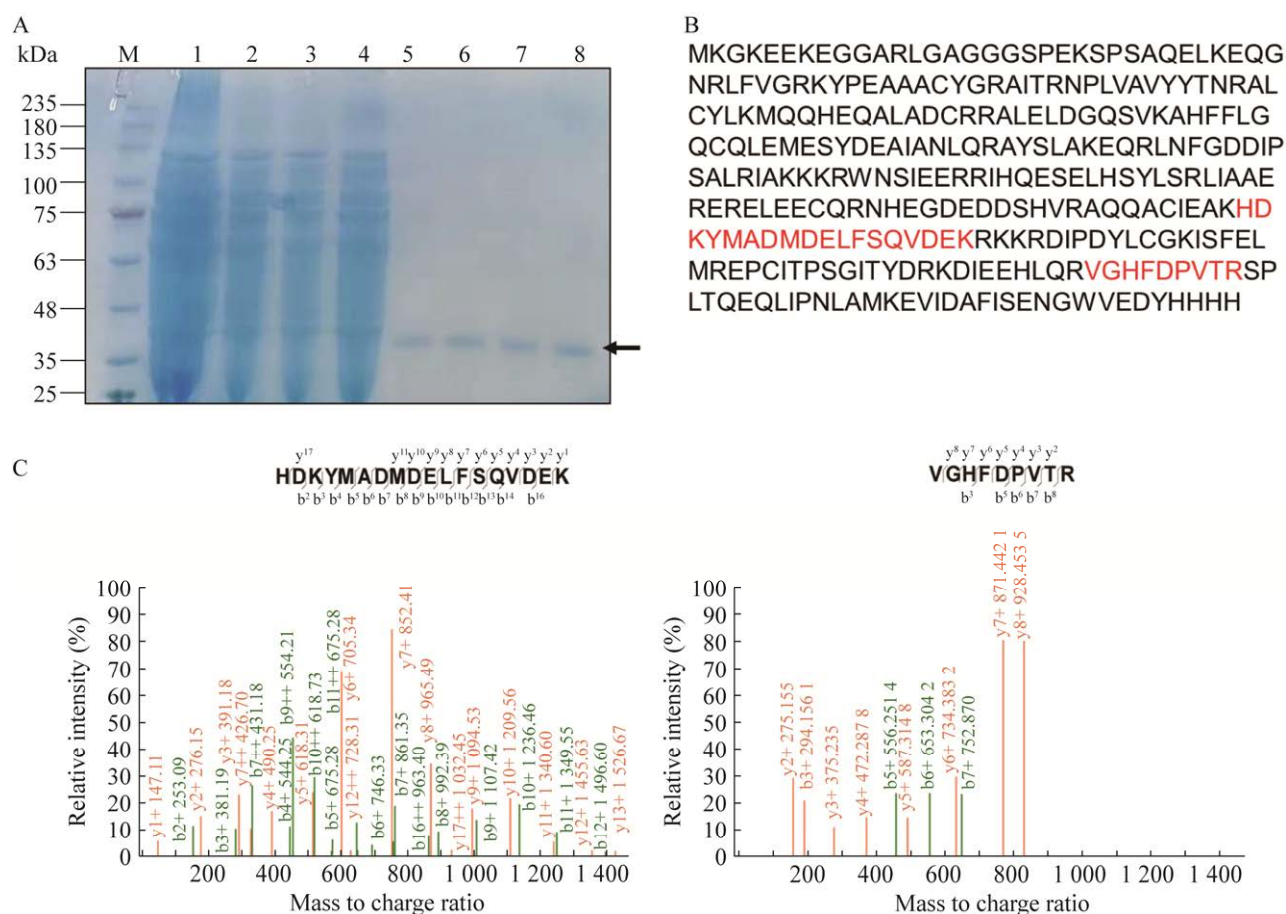


图 5 STUB1-His 蛋白的纯化与质谱鉴定

Figure 5 Purification and mass spectrometry identification of STUB1-His. A: SDS-PAGE analysis of different samples taken during the purification process of the recombinant protein. Lane M: Protein marker; Lane 1: Crude soluble cell lysate; Lane 2: Flow-through fraction; Lane 3–4: Miscellaneous protein; Lane 5–8: Purified protein. B: The amino acid sequence of protein STUB1-His. C: MALDI-TOF peptide mass fingerprint (PMF) spectrum analysis of STUB1-His. The MS-MS spectra of the identified peptides HDKYMADMDLFSQVDEK and VGHFDPVTR from STUB1-His protein.

3 讨论与结论

α -1 抗胰蛋白酶的 Z 型突变不仅导致 AAT 功能丧失和合成水平下降,从而引发肺炎和呼吸障碍等肺部疾病,同时,ATZ 蛋白的聚集还会导致肝脏细胞死亡,从而引发肝炎、肝硬化甚至肝癌等致命疾病。在针对 AATD 的肺部疾病方面,临床上已经开发了一些可行的治疗手段,例如通过静脉注射向患者体内补充正常的

活性 AAT 蛋白^[3,15]。然而,这种方法并不适用于由 ATZ 蛋白聚集引起的肝脏损伤。迄今为止,除了肝脏移植等外科手术方法,尚无有效治疗 AATD 相关肝病的方法。考虑到 ATZ 聚集体在 AATD 肝病的发病机制中的重要作用,减少折叠错误的 ATZ 合成或提高其溶解度可能是延缓聚集进展、减轻肝损伤的可行策略。因此全球范围内不同的课题组尝试了不同的策略,包括抑制突变体的合成、增加功能活性 AAT

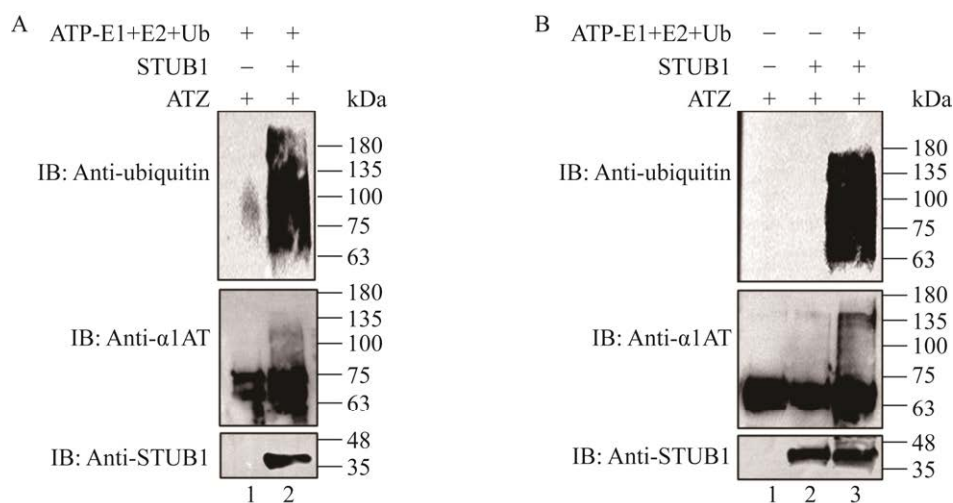


图6 STUB1 体外催化 ATZ 的泛素化修饰过程

Figure 6 STUB1-mediated ubiquitination of ATZ *in vitro*. *In vitro* ubiquitination assays were performed by mixing purified STUB1 and ATZ together with ATP, ubiquitin (Ub), E1 (UBE1), and E2 (UBE2B) in a reaction buffer containing 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) and 2.5 mmol/L MgCl₂. The reactions were carried out for 2 h at 37 °C. Subsequently, the reaction mixtures were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting analysis using the specified antibodies. A: STUB1 is required for ubiquitination of ATZ. B: STUB1 catalyzes the ubiquitination of ATZ in the presence of ATP, Ub, E1 and E2.

的分泌、阻断聚合形成，以及诱导蛋白质聚集体的降解^[6,16-17]。

显然，促进 ATZ 快速降解是治疗 AATD 的有效策略之一。蛋白酶体降解通路是真核细胞内负责蛋白质降解调控的主要通路，而泛素化修饰是蛋白质快速降解的前提。在泛素化过程中，泛素分子会在一系列的泛素修饰相关酶 (E1、E2、E3) 的加成作用下被共价地结合到目标蛋白分子上^[18]。在哺乳动物细胞中，泛素 E1 和 E2 种类有限，而 E3 连接酶却有 400 多种，这些不同的 E3 连接酶具有不同的底物偏好性，负责对不同类型的蛋白的泛素化修饰并促进其降解。因此，确认目标蛋白与其相互作用的 E3 连接酶是研究其蛋白降解机理的关键。

大量证据表明，在 ATZ 的降解过程中，多个 E3 连接酶参与了其泛素化修饰。早在 2006 年，Shen 等^[7]发现 E3 连接酶 gp78 促进了 ATZ 的泛素化修饰和降解。随后，Feng 等和 Wang 等又

发现 E3 连接酶 HRD1 参与诱导 ATZ 的泛素化修饰和自噬依赖性的降解^[8,19-20]。最近，本课题组发现 STUB1 具有促进 ATZ 的泛素化修饰的能力，因此，它也成为第三个能够调控 ATZ 降解的 E3 连接酶。这一发现进一步展示了 ATZ 在胞内降解调控方面的复杂性。

值得强调的是，目前有关 ATZ 的泛素化修饰证据都是基于对细胞内表达 ATZ 的实验得出的。由于细胞内存在众多蛋白质，且其相互作用极为复杂，这给对 ATZ 的泛素修饰过程进行精细解析的研究带来了一定的挑战。就 STUB1 而言，在细胞内，STUB1 本身拥有双重功能，既是分子伴侣又是 E3 泛素连接酶^[12-13]，因此其底物范围非常广泛。已有实验证据表明被 STUB1 催化的底物有很多种，还有数据显示许多其他潜在底物尚未被鉴定出来^[10-12]。本研究前期通过细胞内过表达或降低 STUB1 蛋白质水平的实验，证实 STUB1 参与了 ATZ 泛素化修饰的

催化过程。然而, 由于复杂的胞内环境, 这些实验无法排除 STUB1 通过催化其他分子间接影响 ATZ 泛素修饰的可能性。因此, 有必要利用纯化的蛋白质来构建体外的泛素化修饰体系。本研究使用纯化的 ATZ 蛋白和泛素修饰相关蛋白, 在体外建立泛素化修饰反应体系。在这个体外体系中, 只包含少数几种成分明确的蛋白, 如泛素激活酶 E1、泛素转移酶 E2 和泛素连接酶 STUB1。因此, 当在反应体系中观察到 ATZ 的泛素化修饰结果时, 可以明确这一催化过程是由 STUB1 介导的, 从而进一步证明了 STUB1 直接作用于 ATZ 并催化其修饰的事实。

综上所述, 本研究成功地验证了在体外研究 ATZ 泛素化修饰的可行性, 并确认了 STUB1 催化 ATZ 泛素化修饰的潜力。推测这一体外催化系统还可以被扩展应用于研究包括 gp78 和 HRD1 在内的其他 E3 泛素连接酶, 为进一步解析 ATZ 蛋白的降解调控机制提供有力支持。

致谢

感谢中国科学院天津工业生物技术研究所曹琦琛和韩曼曼在质谱分析过程中的帮助。

REFERENCES

- [1] GOOPTU B, DICKENS JA, LOMAS DA. The molecular and cellular pathology of α -1 antitrypsin deficiency[J]. Trends in Molecular Medicine, 2014, 20(2): 116-127.
- [2] STOLLER JK, ABOUSSOUAN LS. A review of α -1-antitrypsin deficiency[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2012, 185(3): 246-259.
- [3] 叶晓, 凌雪, 林佳雨, 张肖雅, 张子怡, 饶朗. α -1 抗胰蛋白酶: 一种可抵抗 SARS-CoV-2 细胞侵袭的多功能蛋白的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2023, 45(3): 374-382.
YE X, LING X, LIN JY, ZHANG XY, ZHANG ZY, RAO L. Research progress of α -1 antitrypsin, a multifunctional protein that can resist the invasion of SARS-CoV-2 cells[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2023, 45(3): 374-382 (in Chinese).
- [4] LOMAS DA, LI-EVANS D, FINCH JT, CARRELL RW. The mechanism of Z α 1-antitrypsin accumulation in the liver[J]. Nature, 1992, 357(6379): 605-607.
- [5] FAIRBANKS KD, TAVILL AS. Liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency: a review[J]. The American Journal of Gastroenterology, 2008, 103(8): 2136-2141.
- [6] RAO L, XU Y, REINEKE LC, BHATTACHARYA A, TYRYSKIN A, SHIN JN, EISSA NT. Post-transcriptional regulation of alpha one antitrypsin by a proteasome inhibitor[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(12): 4318.
- [7] SHEN YX, BALLAR P, FANG SY. Ubiquitin ligase gp78 increases solubility and facilitates degradation of the Z variant of α -1 antitrypsin[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 349(4): 1285-1293.
- [8] FENG LJ, ZHANG J, ZHU N, DING Q, ZHANG XJ, YU JS, QIANG WM, ZHANG ZT, MA YY, HUANG DK, SHEN YJ, FANG SY, YU YF, WANG HP, SHEN YX. Ubiquitin ligase SYVN1/HRD1 facilitates degradation of the *SERPINA1* Z variant/ α -1-antitrypsin Z variant via SQSTM1/p62-dependent selective autophagy[J]. Autophagy, 2017, 13(4): 686-702.
- [9] BALLINGER CA, CONNELL P, WU Y, HU Z, THOMPSON LJ, YIN LY, PATTERSON C. Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions[J]. Molecular and Cellular Biology, 1999, 19(6): 4535-4545.
- [10] SISOUA C, GONOS ES. CHIP E3 ligase regulates mammalian senescence by modulating the levels of oxidized proteins[J]. Mechanisms of Ageing and Development, 2011, 132(5): 269-272.
- [11] XIN H, XU XL, LI LY, NING HX, RONG Y, SHANG Y, WANG YY, FU XY, CHANG ZJ. CHIP controls the sensitivity of transforming growth factor- β signaling by modulating the basal level of Smad3 through ubiquitin-mediated degradation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(21): 20842-20850.
- [12] 苏永南, 王玉玲, 宋斌, 段文芳, 杨帆, 张继虹. 蛋白质内稳态质控因子 CHIP 的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(6): 1174-1183.
SU YN, WANG YL, SONG B, DUAN WF, YANG F, ZHANG JH. Research progress of protein steady-state quality control factor CHIP[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2019, 41(6): 1174-1183 (in Chinese).

- [13] RAO L, SHA YB, EISSA NT. The E3 ubiquitin ligase STUB1 regulates autophagy and mitochondrial biogenesis by modulating TFEB activity[J]. *Molecular & Cellular Oncology*, 2017, 4(6): e1372867.
- [14] 高佳仪, 陈雪松. 泛素化调控肿瘤转移的分子机制研究进展[J]. *生物医学工程与临床*, 2020, 24(6): 783-786. GAO JY, CHEN XS. Research progress for molecular mechanism of ubiquitination regulating tumor metastasis[J]. *Biomedical Engineering and Clinical Medicine*, 2020, 24(6): 783-786 (in Chinese).
- [15] TONELLI AR, BRANTLY ML. Augmentation therapy in alpha-1 antitrypsin deficiency: advances and controversies[J]. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 2010, 4(5): 289-312.
- [16] HIDVEGI T, EWING M, HALE P, DIPPOLD C, BECKETT C, KEMP C, MAURICE N, MUKHERJEE A, GOLDBACH C, WATKINS S, MICHALOPOULOS G, PERLMUTTER DH. An autophagy-enhancing drug promotes degradation of mutant α 1-antitrypsin Z and reduces hepatic fibrosis[J]. *Science*, 2010, 329(5988): 229-232.
- [17] ZHANGLH, YU J, PAN HL, HU P, HAO Y, CAI WQ, ZHU H, YU AD, XIE X, MA DW, YUAN JY. Small molecule regulators of autophagy identified by an image-based high-throughput screen[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(48): 19023-19028.
- [18] NANDI D, TAHILIANI P, KUMAR A, CHANDU D. The ubiquitin-proteasome system[J]. *Journal of Biosciences*, 2006, 31(1): 137-155.
- [19] WANG HP, LI Q, SHEN YJ, SUN AM, ZHU XG, FANG SY, SHEN YX. The ubiquitin ligase Hrd1 promotes degradation of the Z variant alpha 1-antitrypsin and increases its solubility[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2011, 346(1): 137-145.
- [20] 朱娜, 冯利杰, 王海萍, 沈玉君, 沈玉先. α 1 抗胰蛋白酶突变体 ATZ 过表达增强细胞自噬水平[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(7): 921-925. ZHU N, FENG LJ, WANG HP, SHEN YJ, SHEN YX. Effect of α 1-antitrypsin Z variant overexpression on autophagy regulation[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2014, 30(7): 921-925.

(本文责编 陈宏宇)