



**WIE-biotech**

立效生物

# 衰老相关翻译内容

基础版

方案组

2022/3/31

## 目录

## ABSTRACT

衰老随着细胞蛋白稳态下降,导致年龄相关蛋白错误折叠疾病。但衰老如何损害蛋白稳定仍不清楚。

本文发现衰老酵母和蠕虫的多碱区,核糖体停顿加剧,碰撞增加。衰老的酵母细胞表现出 RQC 底物(折叠错误蛋白)的清除受损和聚集增加。线虫中呈现依赖年龄的核糖体停顿,新生(截短)多肽富集。

## BACKGROUND

### 一、衰老的九个特征

衰老有多个特征,一篇综述(Manuel Serrano et al, 2013)总结了主要有九个特征构成:

1. 基因组不稳定(DNA 的完整性和稳定性不断受到外源性物理、化学和生物介质、内源性如 ROS 威胁的挑战);
2. 端粒磨损(大多数哺乳动物体细胞不表达端粒酶;复制型 DNA 聚合酶缺乏完全复制线性 DNA 分子末端的能力);
3. 表观遗传学改变(DNA 甲基化模式的改变、组蛋白的翻译后修饰和染色质重塑);
4. **蛋白稳态丧失(维持正确折叠蛋白,降解错误折叠蛋白);**
5. 营养感知失调(胰岛素信号通路、饮食限制(DR)延长了所有被研究的真核生物物种的寿命或健康时间)
6. 线粒体功能障碍(随着细胞和生物体的老化,呼吸链的效力趋于减弱,从而增加电子泄漏并减少 ATP 的生成);
7. 细胞衰老(细胞周期的稳定停滞,固有表型改变);
8. 干细胞耗竭(组织再生能力的下降,如造血功能下降,导致适应性免疫细胞产生减少)
9. 细胞间通讯改变(神经激素信号(如肾素-血管紧张素、肾上腺素能、胰岛素-IGF1 信号)在衰老过程中随着炎症反应的增加、对病原体和癌前细胞的免疫监视的减弱以及细胞周围和细胞外环境的组成的改变)。

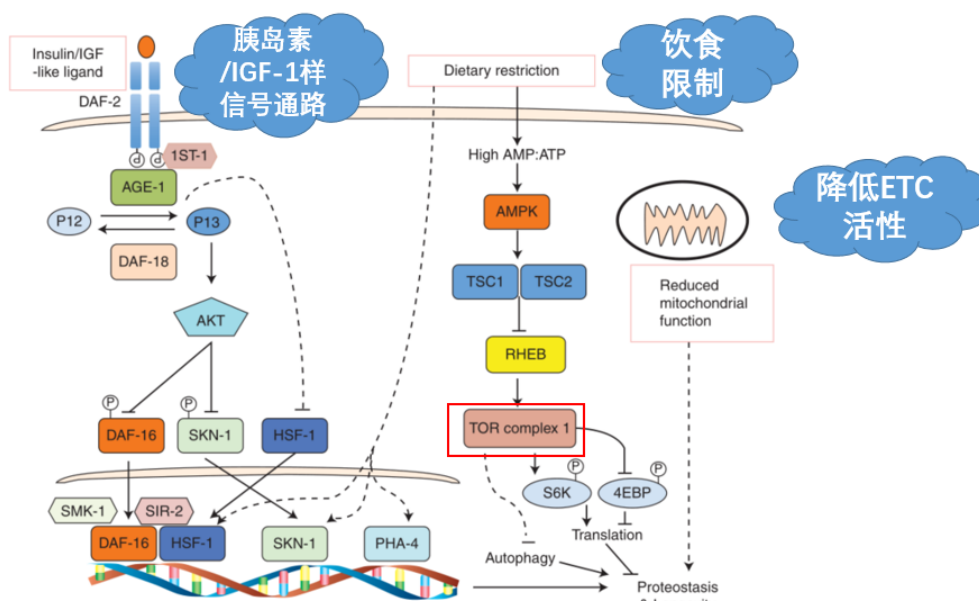


## 二、衰老的三种主要信号通路

1. 饮食限制 (DR): 通常约为随意食物摄入量的 60%。能量状态依赖性激酶 AMPK 和丝氨酸/苏氨酸激酶 mTOR 和参与 DR 信号传导; 秀丽隐杆线虫研究表明, PHA-4 和 SKN-1 这两种转录因子对这一过程至关重要, 并在 DR 的寿命延长中发挥了特殊作用。SCH9 是 TOR 通路的一员, 文章中将会提到。

2. 胰岛素/IGF-1 样信号通路, 秀丽隐杆线虫中 DAF-2 募集胰岛素受体底物同源物 1ST-1 和 AGE-1, 活化 P13, 激活 AKT 激酶, 使转录因子 DAF-16 磷酸化进入细胞核, 激活促进延长寿命;

3. 降低线粒体电子传递链 (ETC) 的活性来发挥作用。

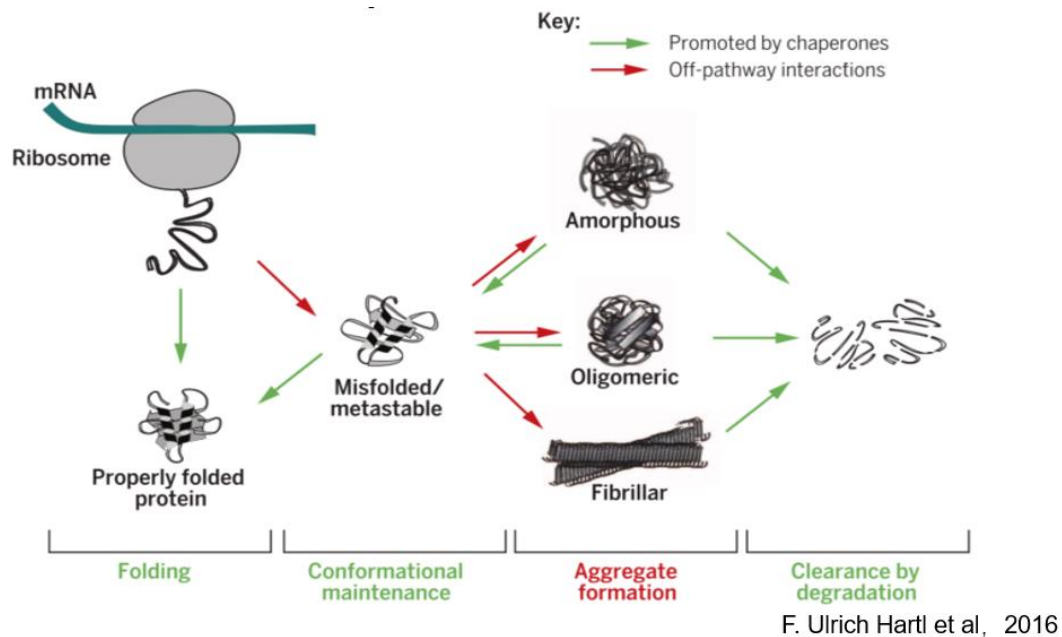


Rebecca C. Taylor and Andrew Dillin. 2011

### 三、蛋白质稳定网络（proteostasis networks, PN）

真核细胞中大约  $10^6 - 10^7$  个核糖体连续制造的，细胞不仅必须要准确折叠，而且还必须防止因**折叠效率低下**、**翻译错误**和**异常 mRNA** 引起的**错误折叠产物**的积累。为了解决这些问题，所有细胞会表达称为分子伴侣的一些蛋白质，引导新生肽链其沿着正确折叠方向前进。通过分子伴侣和蛋白质降解机制（**正确折叠+降解错误折叠**）的集成网络对蛋白质组进行**持续监控**，叫做**蛋白质稳定网络（PN）**。

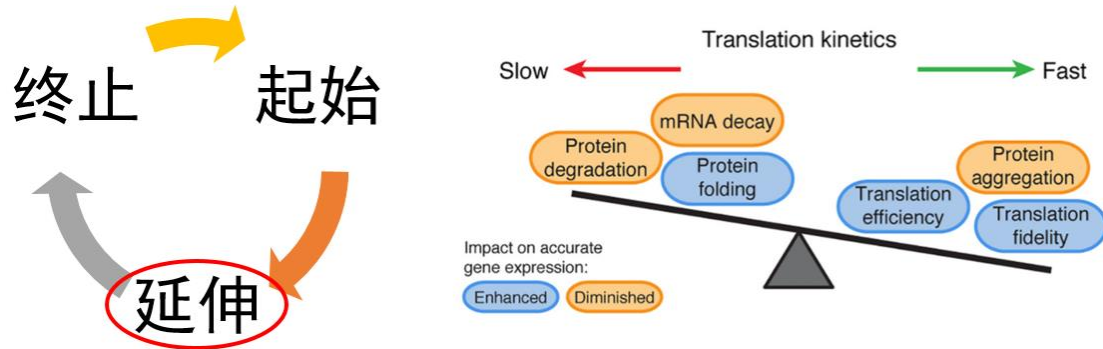
PN 的能力在衰老过程中会下降，部分折叠的新生多肽是亚稳态的，更容易发生错误折叠，产生**无定形、低聚物、纤维状**（如下图）形式聚集体。这会导致特定细胞类型和组织的功能障碍，使机体容易患上慢性病。那什么可以调节翻译的稳态呢？



### 四、翻译动力学（Translation Kinetics）调控蛋白稳态

翻译的三个主要阶段（起始、延伸、终止，有些说法也包括核糖体循环）中，翻译起始是翻译控制的限速步骤。随着核糖体分析的出现，翻译的三个阶段对于维持蛋白质稳态很重要，翻译延伸是决定蛋白质命运的核心。

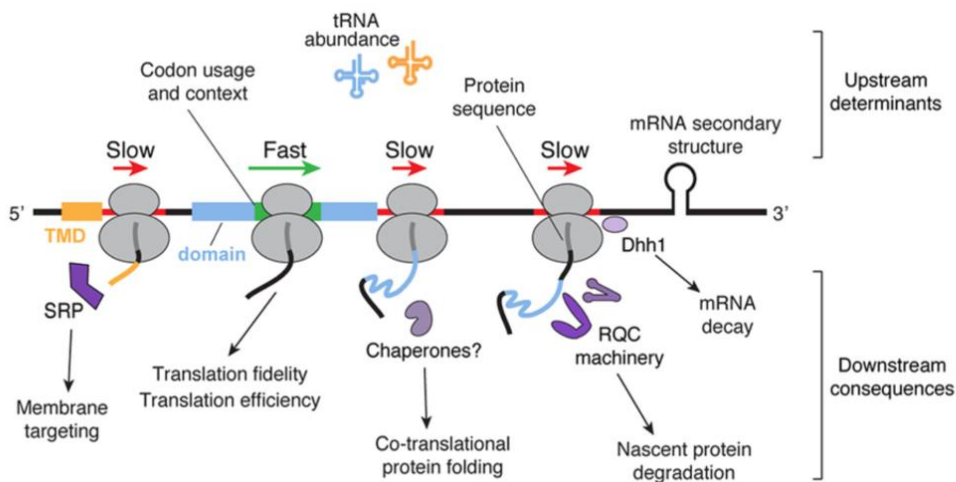
真核生物中仅为 4-6 个氨基酸/秒，中位数为 400 个氨基酸，核糖体在延伸过程中经常加速和减速：快速翻译可以有效地合成大量蛋白质，还通过提高蛋白质合成的保真度和效率来权衡准确的基因表达，但也增加了蛋白质错误折叠和聚集的可能性。而缓慢的延伸会通过促进适当的蛋白质折叠来增强准确的基因表达，降低翻译的保真度，导致移码或氨基酸误结合，启动 mRNA 和蛋白质降解途径。更慢的延伸会导致核糖体停滞，新生蛋白质和 mRNA 更新缓慢而降低基因表达。



Judith Frydman et al, 2018

## 五、翻译动力学调节共翻译（Co-Translational）

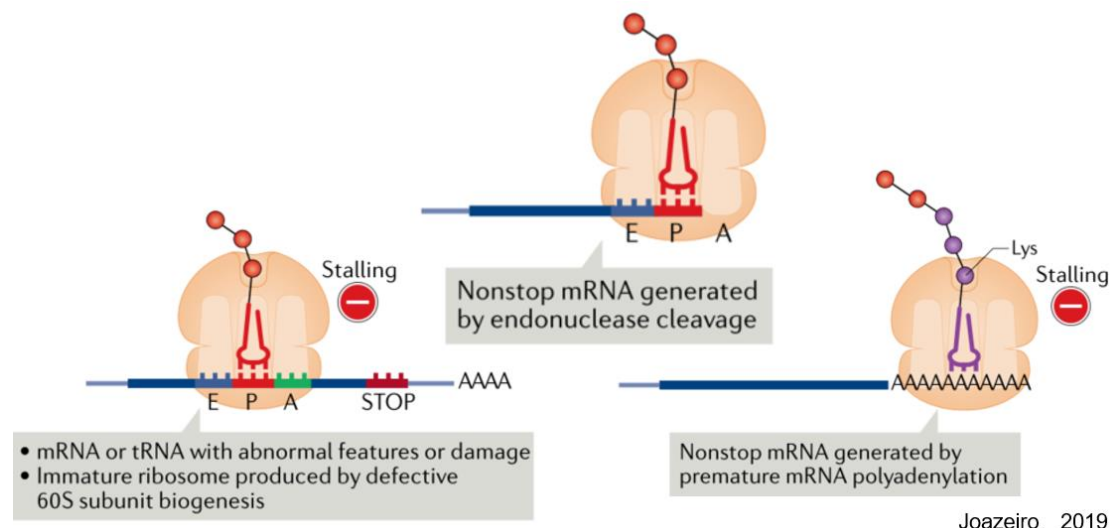
共翻译过程：蛋白翻译时还会转运、折叠等过程。核糖体是一个平台，暴露靶向信号（如跨膜结构 TMD），减缓翻译，促进信号识别粒子（SRP）招募，以共翻译方式将分泌蛋白靶向定位在内质网；最佳的密码子（非同义突变的密码子）提高翻译速度和保真度；增加原核生物中 tRNA 的丰度通过提高延伸率；减缓翻译允许核糖体有更多时间来限制新生多肽的折叠途径，供分子伴侣进行折叠。折叠错误的蛋白会启动 RQC（接下来会介绍），招募 RQC 机器，降解蛋白。



Judith Frydman et al, 2018

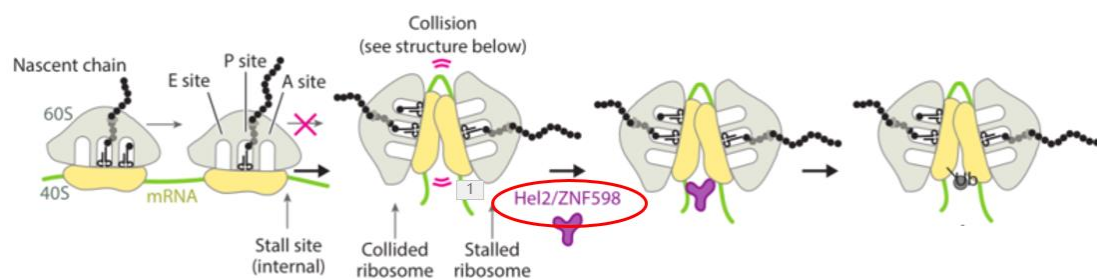
## 六、核糖体停滞（Ribosome Stalling/Pause）降低基因表达

核糖体停滞有许多触发因素，包括损伤的 mRNA、tRNA，60S 亚基发生缺陷；内切酶切割、过早 mRNA 多聚腺苷酸化产生不终止的 mRNA，可触发蛋白质、mRNA 降解途径。



## 七、核糖体碰撞 (Ribosome Collision)

类似追尾。蛋白质合成停滞会产生有缺陷的新生肽链,这可能会损害细胞。作为回应,细胞通过 RQC 的过程降解这些新生的链。如下图,发生核糖体碰撞后,酵母中 E3 连接酶 Hel2 (哺乳动物中的 ZNF598),使 40S 核糖体蛋白 ES10 和 US10 泛素化并降解。

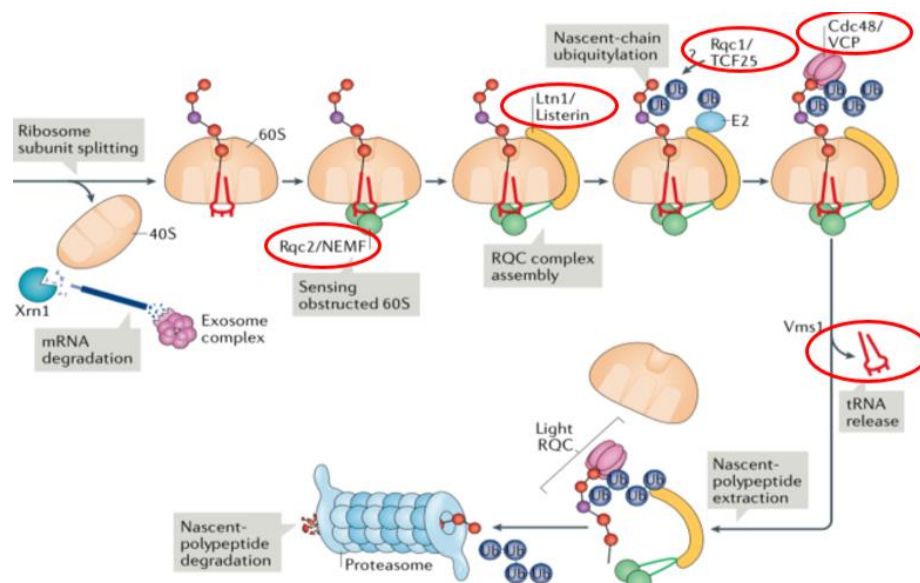


碰撞后形成双核糖体 (Disomes)、三核糖体 (Trisomes)

## 八、核糖体相关质量控制 (Ribosome-Associated Quality Control, RQC) 对翻译停滞的反应

(接上) 40S 降解后,外切核酸酶 Xrn1p,使 mRNA 降解,启动 RQC。RQC 由 Rqc2 (哺乳动物 NEMF) 亚基启动,合成羧基末端的丙氨酸和苏氨酸(CAT)尾巴,以帮助埋藏在核糖体出口隧道中的赖氨酸残基暴露出来,募集 E3 连接酶 Ltn1/listerin 的结合,使核糖体出口处赖氨酸残基泛素化。RQC 复合体 Rqc1 (哺乳动物 TCF25) 结合,机制未知。ATP 酶 Cdc48 (哺乳动物 VCP) 和辅因子招募来,通过 Vms1 使 tRNA 释放,60S 中的多肽被蛋白酶体降解。RQC 的缺陷导致蛋白质无法降解而聚集。





Joazeiro, 2019

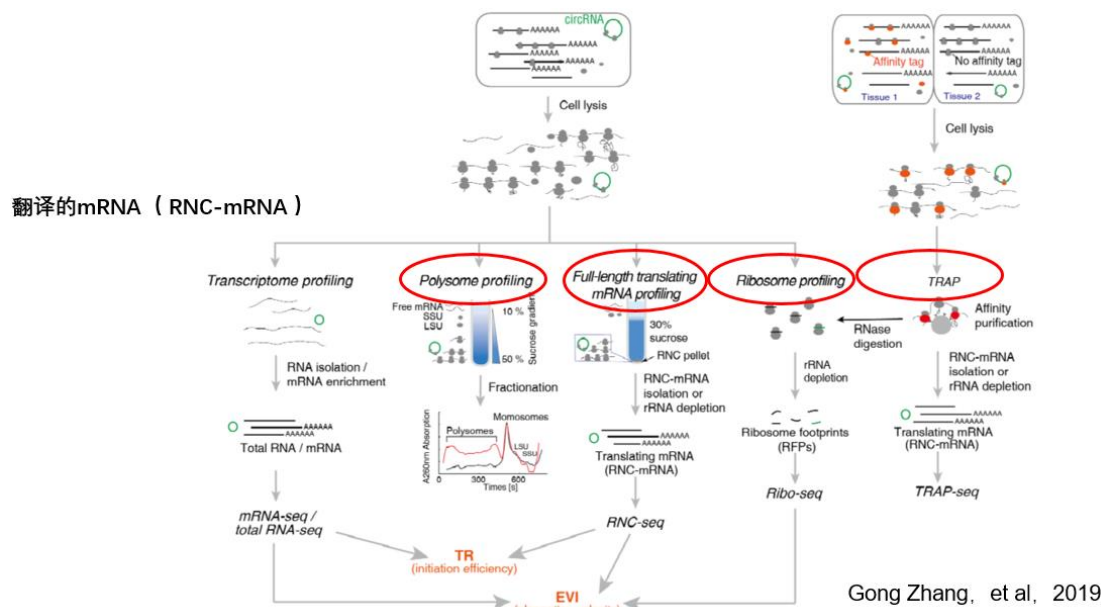
## 九、翻译组研究方法

多核糖体图谱 (Polysome profiling) 是在 20 世纪 60 年代基于蔗糖梯度超速离心的基础上发展起来的。核糖体结合越多的 mRNA 分子，在蔗糖梯度中沉降越快，游离的 RNA 和蛋白质漂浮在蔗糖密度梯度的顶部，从底部缓慢抽出蔗糖溶液，可以分离出与不同数量的核糖体结合的 mRNA，再利用 northern 杂交、芯片或 RT-PCR 分析这些组分中的 mRNA，以反映转录物翻译的分布。主要缺点是难以对所有翻译的 mRNA(RNC-mRNA)进行深入分析。由于蔗糖梯度的体积很大，RNC-mRNA 在每个组分中的浓度都很低。

全长翻译 mRNA 测序，Full-length translating mRNA sequencing, RNC-seq: 细胞裂解物被装载到 30%的蔗糖缓冲液中，并进行超速离心，以将所有与核糖体相关的翻译 mRNA 从游离 mRNA 和其他细胞成分中分离出来。RNC mRNA 可以很容易地从颗粒化 RNC 中回收，并有效避免高浓度蔗糖对下游研究的干扰。缺点是 RNC 的脆弱性导致核糖体离解和 mRNA 断裂/降解，从而导致 RNC mRNA 的偏倚。

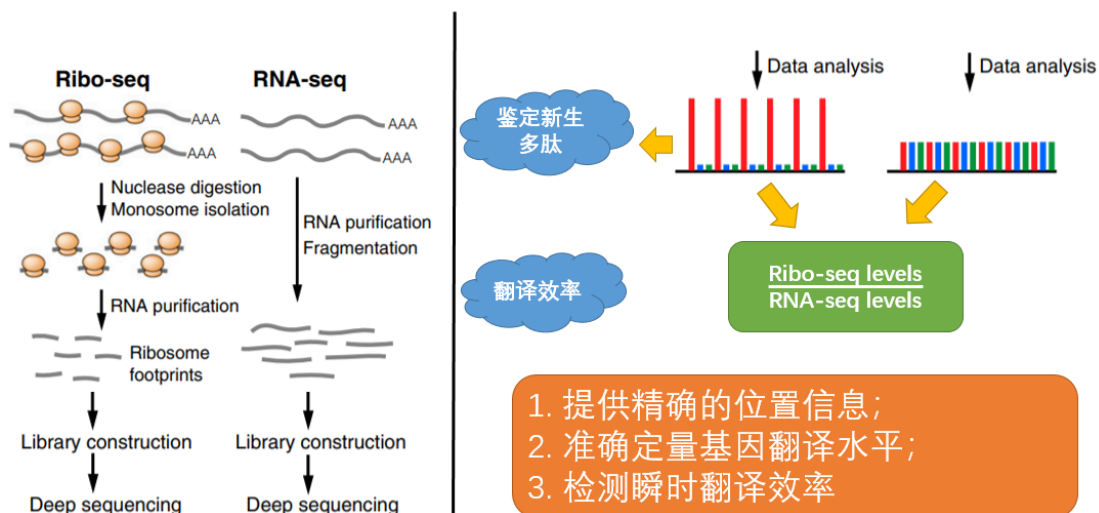
翻译核糖体亲和纯化，Translating Ribosome affinity purification, TRAP: 大核糖体亚基蛋白 Rpl25p, C 端与亲和标签 (GFP 等) 融合。转到细胞、动物中，再通过抗体将含有标签的核糖体进行分离，进一步得到标签核糖体上结合的 mRNA，利用柱子等提纯这些核糖体，采用 microarray 或 RNA-Seq 技术进一步对其进行测序分析。特定细胞类型中分离翻译 mRNA 方面有其独特的优势，缺点: 不使用超速离心, 可能造成非核糖体 mRNP(mRNA+RBP) 污染。





**Ribo-seq:** 需要大量细胞作为起始材料，mRNA 分子上结合数目不等的核糖体，加入翻译抑制剂终止翻译，再加入低浓度核糖核酸酶，消化除核糖体保护以外区域。同时做 mRNA 进行片段化，最后建库和测序。可以通过结果鉴定出新生肽链，也可以计算翻译效率。**RPF**（核糖体保护片段）在某个 mRNA 富集越多，停滞越多，翻译活性越低。

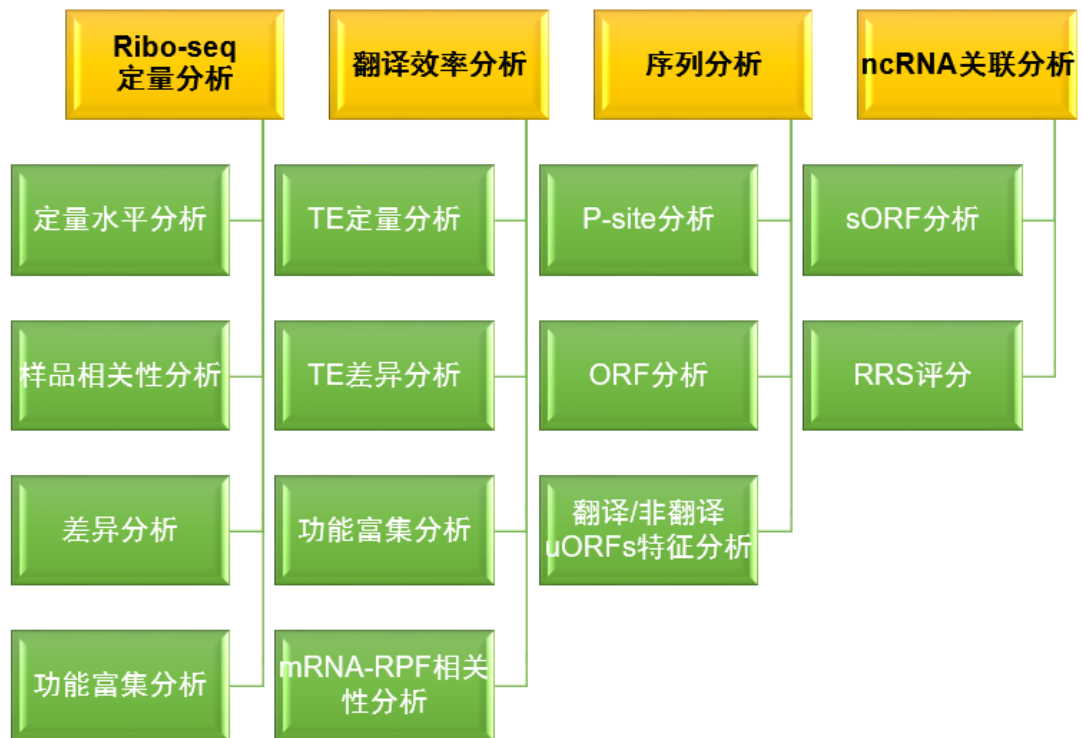
为什么既测转录组又测蛋白组？① 转录不翻译，或翻译效率低时，出现转录组有差异，蛋白组无差异；② 只检测蛋白组，仅能粗略定位到基因区域，无法明确样品转录本及转录本中编码性 ORF。



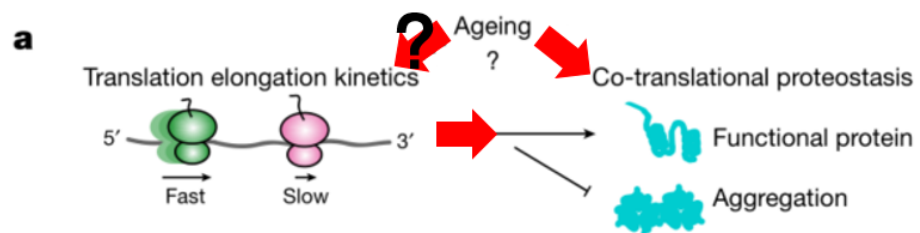
**Ribosome Protected Fragments, RPF= Ribosome Footprints**

Hsu, et al, 2016

Ribo-seq 可以进行的分析



提出问题：衰老是否通过影响翻译延伸来导致蛋白稳态失衡？



## RESULT

本文模型：年轻机体中核糖体停滞，RQC 途径将多余蛋白降解，只留下有功能的蛋白；衰老机体核糖体停滞↑，蛋白稳态崩溃，多肽聚集，一方面进一步影响核糖体停滞，另一方面抑制有功能蛋白产生，恶性循环。

## 模型

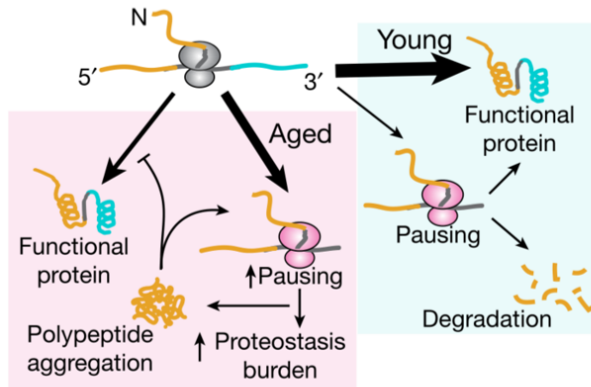


Fig.1 | Age-dependent ribosome pausing is conserved.

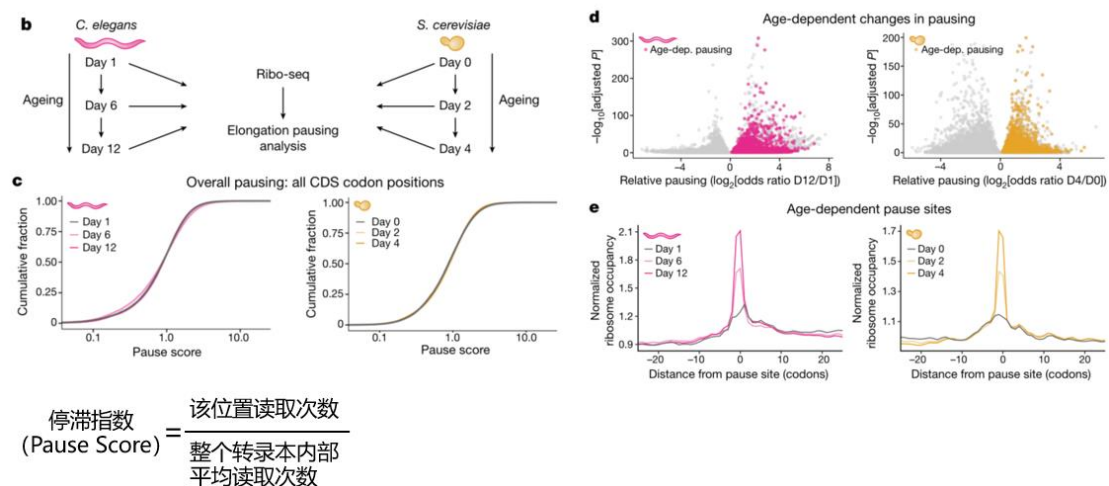
Fig.2 | Ageing exacerbates (加剧) ribosome pausing at polybasic regions in yeast.

Fig.3 | Polybasic-driven age-dependent aggregation of truncated nascent polypeptides in yeast is mitigated in lifespan extension models.

Fig.4 | Conserved mechanisms of age-dependent ribosome pausing and aggregation in worms.

## 一、衰老依赖的核糖体停滞是保守的

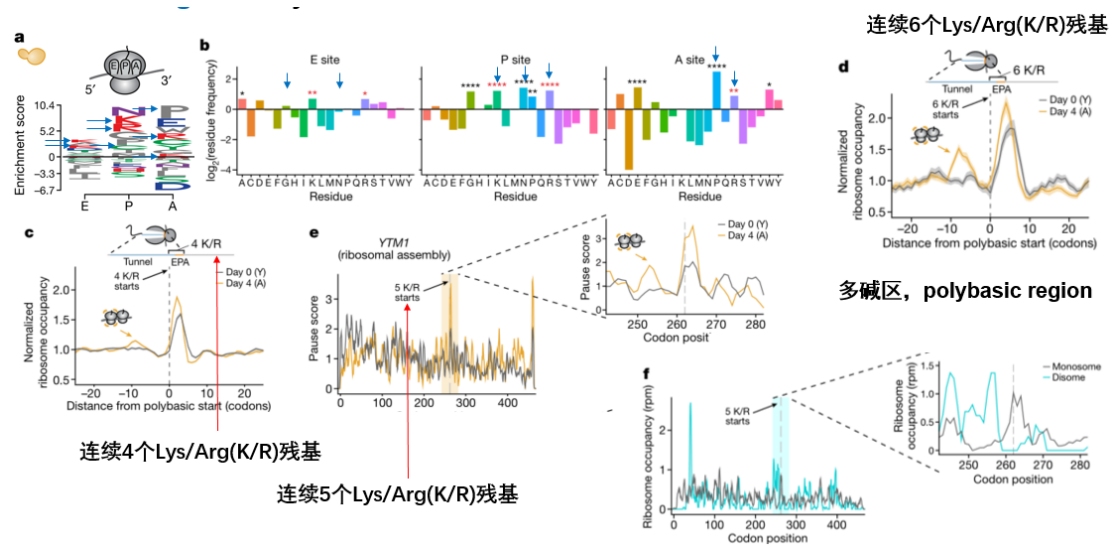
两个成熟的衰老模式生物：线虫（2-3 周）和酿酒酵母，进行不同天数 Ribo-seq 测序（Fig. 1b），计算了每个位置编码序列相对于整个转录本的停滞指数，发现停滞指数在转录组中的累积分布没有显示出与年龄相关的整体变化，表明衰老的代谢变化不会导致整体伸长停滞的系统性变化（Fig. 1c）。纵坐标越高可信度越高，横坐标越右差异越大。彩色代表 12 天线虫和 4 天酵母依赖年龄暂停显著增加的位置，灰色是其余翻译位置，说明衰老机体的核糖体停滞对于新机体增加（Fig. 1d）；随着有机体的衰老，停顿位点的核糖体占有率显著增加，即核糖体停滞增加（Fig. 1e）。



## 二、衰老酵母在多碱区加剧核糖体停滞

研究核糖体暂停的序列，中性脯氨酸（Pro, P）、碱性残基精氨酸（Arg, R）、赖氨酸（Lys, K）位置显著富集（Fig. 2a-b）。接下来确定衰老如何影响碱性区域占有率。主要停滞位点上游约 10 个密码子处观察到一个额外的核糖体峰，这是核糖体碰撞的标志。在已有的单核糖体和二核糖体 Ribo-seq 数据发现，多碱区的延长导致核糖体停滞增加（多碱区越长，停滞越多）。发现与年轻细胞比，衰老细胞表现出更严重碰撞（Fig. 2c-d）。举例说明 YTM1（核糖体组装因子）中的多碱区，即使年轻酵母有一定的核糖体碰撞，衰老进一

步加剧了碰撞 (Fig. 2e)。文献中年轻细胞 YTM1 上单核糖体和二核糖体占有率图谱, 该位置确实单核糖体居多。(附图 3F, 检查年龄相关停顿位点的密码子频率, 给定氨基酸的大多数密码子都富集, 与密码子最优化无关。)

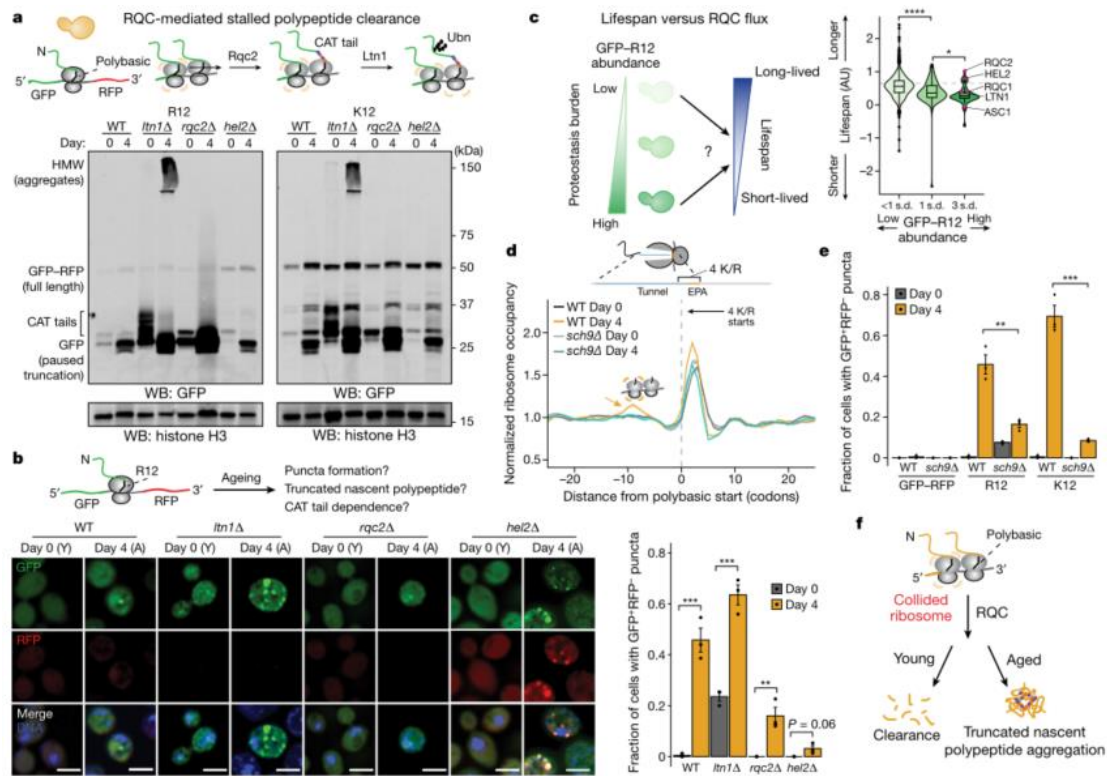


### 三、寿命延长的酵母模型中, 年龄依赖的多碱区驱动截断的新生多肽聚集

使用 reporter, 在 GFP 和 RFP 中间插入 12 个精氨酸 (Arg, R) 或赖氨酸 (Lys, K) 残基, 插入后会导致核糖体停滞, 年轻细胞有效降解中停滞的多肽。衰老细胞有截短、停滞的新生链副产物 (Fig. 3a。附图说不是培养基造成的)。核糖体碰撞引发 RQC, 敲除 RQC 成分会阻止修复途径, 截断、停滞的新生链大量积累。RQC 突变体细胞出现停滞截断产物, 衰老细胞更加剧了在 Ltn1 缺失细胞中停滞截断产物的水平 (Fig. 3a)。

发生碰撞使新生 GFP 聚集, RFP 一般不变。免疫荧光发现 ltn1 缺失细胞衰老使 GFP+RFP-斑点增加。Rqc2 缺失细胞不明显, 说明不是必需因素。Hel2 缺失细胞红斑也增加, 3a 中几个衰老样品都发现产物比年轻样品高, 说明导致滞后序列旁路增加 (Fig. 3b)。

将老化与核糖体停滞/碰撞和功能失调的 RQC 联系起来后, 接下来检查上述 RQC 底物的清除是否会影响寿命。两种全基因组筛选: 一种测量了包括缺失 RQC 成分的每个酵母株的时间寿命, 另一种量化 GFP-R12, 相当于间接看 RQC 底物的清除率 (RQC 突变体酵母株, 清除停滞新生肽链的能力降低, 含高 GFP 水平)。灰线是平均寿命, 发现 GFP-R12 丰度最高酵母株寿命短, 丰度低的寿命长。表明 RQC 通量影响寿命 (Fig. 3c)。进一步研究翻译延长和寿命之间的关系, SCH9 是 TOR 通路的底物, 突变可延长寿命。在衰老的 sch9 缺失细胞中, 多碱区的停顿和碰撞也明显减少 (Fig. 3d); 免疫荧光定量停滞报告基因中, sch9 缺失, 截短的多肽积累减少 (Fig. 3e, 看有斑点细胞的比例), 得出模型 (Fig. 3f, 不再赘述)。



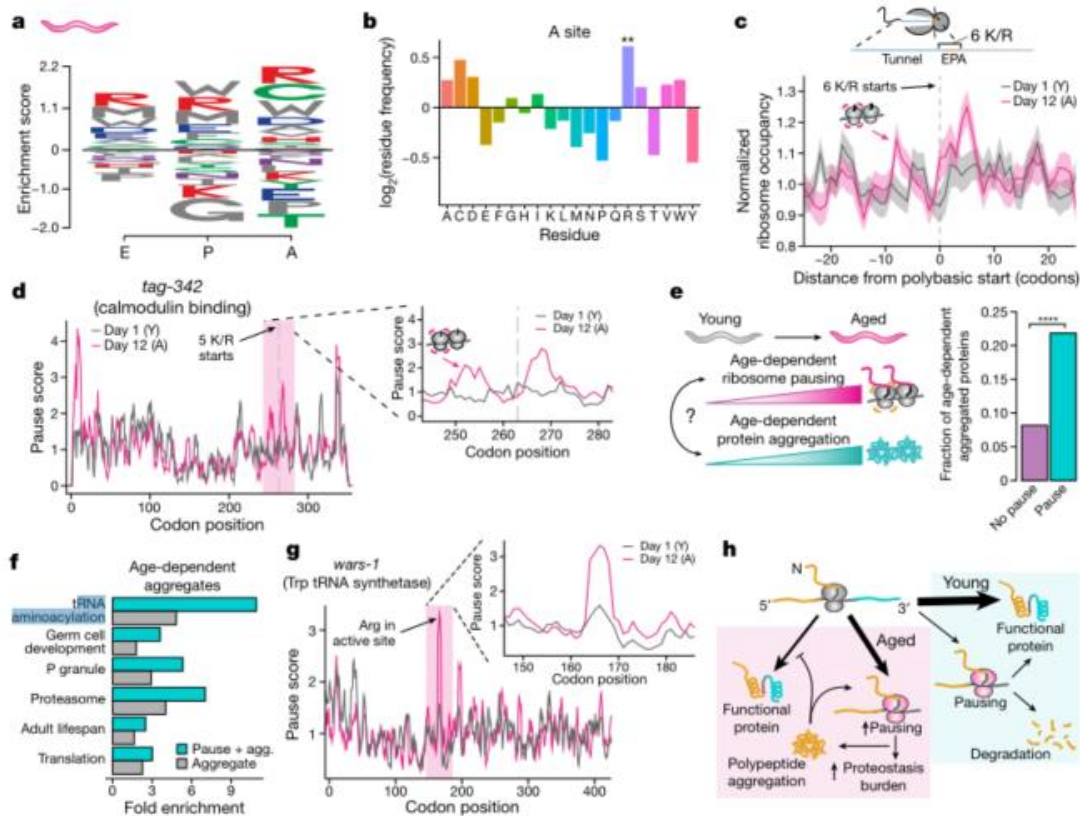
#### 四、蠕虫中依赖年龄的核糖体停滞和聚集体的保守机制。

扩展到线虫，发现在年龄相关的停滞位点有某些残基的富集，尤其是精氨酸。（Fig. 4a-b）。老年蠕虫在多碱基序长度↑，核糖体碰撞↑（附图发现在4个连续K/R残基区域停顿增加，在5个和6个连续K/R残基上甚至更高）。接着举例Tag-342中的5K/R（Fig. 4c）。研究衰老的核糖体停顿和蛋白质聚集（两个文献中的数据）之间的关系，随年龄增大，聚集的蛋白质多表达了三倍（Fig. 4e）。

衰老相关的停滞和聚集影响了许多参与翻译和稳定的蛋白质。如P颗粒granule，秀丽隐杆线虫的一类核周RNA颗粒，P颗粒成分的突变导致高温不育和部分翻译控制受损（Fig. 4f）。根据分析发现核糖体在WARS-1（色氨酸tRNA合成酶，tRNA合成酶在fig. 4f中排名靠前）上的核糖体占有率，发现衰老线虫核糖体占有率高（Fig. 4g）。

结论：年轻机体中核糖体停滞，RQC途径将多余蛋白降解，只留下有功能的蛋白；衰老机体核糖体停滞↑，蛋白稳态崩溃，多肽聚集，一方面进一步影响核糖体停滞，另一方面抑制有功能蛋白产生（Fig. 4h）。





## SUMMARY

