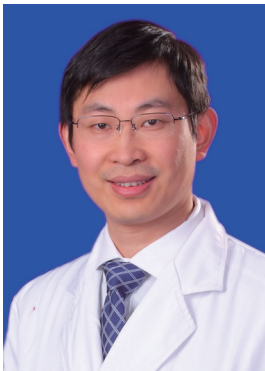


DOI: 10.13376/j.cblls/2018056

文章编号: 1004-0374(2018)04-0462-11



张令强, 军事科学院军事医学研究院生命组学研究所副所长、研究员、博士生导师, 专业技术大校, 蛋白质组学国家重点实验室副主任。国家杰出青年基金、国防科技卓越青年人才基金、中国青年科技奖、中国科协求是杰出青年奖、谈家桢生命科学创新奖、树兰医学青年奖、贝时璋青年生物物理学家奖获得者, 入选国家“万人计划”、国家百千万人才工程、国家科技部中青年领军人才、全军学科拔尖人才、北京市高创人才计划、科技北京百名领军人才、总后勤部科技银星。主要研究方向为蛋白质泛素化修饰与疾病的发生机理与治疗。近年来围绕 HECT 类泛素连接酶的激活与灭活机制、靶向泛素化系统进行骨质疏松治疗、抑癌蛋白 PTEN 与 p53 的稳定性与活性调控等科学与技术问题, 开展了系列研究, 取得重要进展。作为通讯和共同通讯作者在 *Nat Cell Biol*、*Nat Med*、*Nat Commun*、*Cell Rep*、*PNAS*、*EMBO J*、*Cell Res* 等著名学术刊物发表论文 60 余篇。获得北京市科学技术奖一等奖(2013 年、2017 年, 署名第一)、中华医学科技奖二等奖(2014 年, 署名第一)、国家自然科学基金二等奖(2005 年、署名第五)、国家科技进步奖创新团队奖(2013 年、署名第七), 获得 10 项中国发明专利授权(署名第一)。

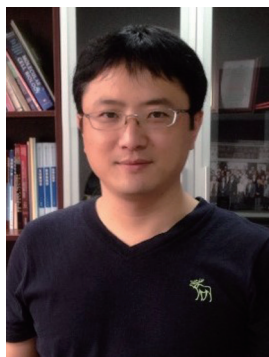


王平, 同济大学医学院副院长、研究员、博士生导师, 国家自然科学基金函评专家、生命科学部专家评审组成员, 中国细胞生物学学会肿瘤细胞生物学分会秘书长, 上海细胞生物学学会副理事长。先后入选上海市“曙光学术”人才计划、上海市“青年科技启明星”追踪人才计划、国家杰出青年。近年来集中研究肿瘤微环境的调控机制, 发现泛素化修饰在肿瘤细胞与微环境中起重要作用, 发表了一系列的原创性学术成果: (1) 发现动态泛素化修饰是外界营养调控 mTORC1 信号通路的关键分子开关, 阐明了营养匮乏导致 RagA 的多泛素化修饰是调控 mTORC1 的重要分子刹车, 揭示了 SUMO 化调控 AKT1 活化以及泛素化调控 c-Myc 蛋白稳定性的多重机制; (2) 发现了泛素依赖及非依赖的蛋白质降解调控炎症关键通路的新机制; (3) 揭示了泛素依赖的 KLF2 降解对血管新生的关键作用。作为通讯和共同通讯作者在 *Mol Cell*、*J Exp Med*、*Nat Commun*、*Cell Res*、*Cell Rep*、*Cancer Res* 等国际知名期刊上发表多篇学术论文。此外, 多次被 *Cell Res*、*Cell Discov*、*J Biol Chem*、*Oncotarget*、*PLoS One* 等期刊邀请为审稿人, 并于 2013 年受邀在亚洲冷泉港“Cell Signaling in Metabolism, Inflammation and Cancer”、2014 年在第七届“SUMO、Ubiquitin 和 UBL 蛋白对人类疾病的影响”以及 2015 年在“第四届广州国际肿瘤学会议”等高水平学术会议作报告。

收稿日期: 2017-11-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(31330021, 81521064); 北京市科委生命科学领域前沿技术培育项目(Z151100003915083)

*通信作者: E-mail: zhanglq@nic.bmi.ac.cn (张令强); pwangecnu@163.com (王平); coryhu@sibcb.ac.cn (胡荣贵)



胡荣贵, 中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所研究员、中国科学院大学特聘教授、中国科学院分子细胞科学卓越研究中心核心研究员。先后入选中国科学院“百人计划”、“浦江人才计划”、国家杰出青年。主要致力于研究蛋白质稳态调控机制及生理病理意义和新技术开发。近年主要工作:(1) 泛素信号异常导致人类孤独症谱系障碍新机制;(2) 泛素信号与细胞自噬调控细胞胁迫反应、肿瘤发生发展等的分子机制;(3) 建立定量研究蛋白质降解组学的 ProTA 方法、基于 CRISPR 的靶向 DNA 去甲基化技术、全基因组水平解析 DNA 三核苷酸重复序列多样性的 ZIPseq 技术等。

泛素链修饰类型研究进展

付业胜¹, 王平^{2*}, 胡荣贵^{3*}, 张令强^{1*}

(1 军事科学院军事医学科学院生命组学研究所蛋白质组学国家重点实验室, 北京100850; 2 同济大学医学院, 上海 200092; 3 中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所中国科学院分子细胞科学卓越中心, 上海 200031)

摘要: 泛素化修饰的蛋白质底物广泛参与蛋白质降解、胞内蛋白质转运、细胞信号转导、自噬和 DNA 损伤修复等重要的生物学过程。泛素化修饰包括单泛素化修饰和多泛素化修饰。因泛素分子含有 7 个赖氨酸残基和 1 个 N 端甲硫氨酸残基, 多泛素化修饰又可分为同型或异型的多聚泛素化修饰。此外, 泛素分子的乙酰化修饰和磷酸化修饰大大增加了泛素链的复杂性。不同泛素链的形成往往依赖泛素连接酶或者去泛素化酶。现综述不同类型的泛素链修饰类型的编辑、识别、去除机制及其生物学功能, 并讨论泛素分子自身的乙酰化和磷酸化修饰。

关键词: 泛素修饰类型; 泛素连接酶; 去泛素化酶; 磷酸化和乙酰化泛素

中图分类号: Q51 **文献标志码:** A

Research progress in ubiquitin chain linkage

FU Ye-Sheng¹, WANG Ping^{2*}, HU Rong-Gui^{3*}, ZHANG Ling-Qiang^{1*}

(1 State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Institute of Lifeomics, Beijing 100850, China;

2 School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200092, China; 3 CAS Center for Excellence in Molecular and Cell Science, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: Protein ubiquitination is widely involved in multiple cellular processes, such as protein degradation, intracellular protein trafficking, cellular signaling transduction, autophagy and DNA damage responses. Ubiquitin modification includes monoubiquitination and polyubiquitin modification. Since ubiquitin contains seven lysine residues and one N-terminal methionine residue, the ubiquitin chains are divided into homotypic or heterotypic linkages. In addition, ubiquitin acetylation and phosphorylation improve the complexity of ubiquitin chains. There are a series of ubiquitin ligases and deubiquitinases editing different ubiquitin chains. This review focuses on different ubiquitin linkage types to discuss how they are formed, recognized and erased, and what biological functions they have. The acetylated and phosphorylated ubiquitins are also discussed.

Key words: ubiquitin linkage type; ubiquitin ligase; deubiquitinase; acetylated and phosphorylated ubiquitin

泛素化修饰是一个复杂的过程, 主要由泛素活化酶 (ubiquitin-activating enzyme, E1)、泛素结合酶 (ubiquitin-conjugating enzyme, E2)、泛素连接酶 (ubiquitin

ligase, E3) 介导泛素分子在蛋白质底物上形成泛素链。蛋白质底物可以被单泛素化修饰, 也可以被多泛素化修饰。单泛素化修饰主要调控受体介导的内

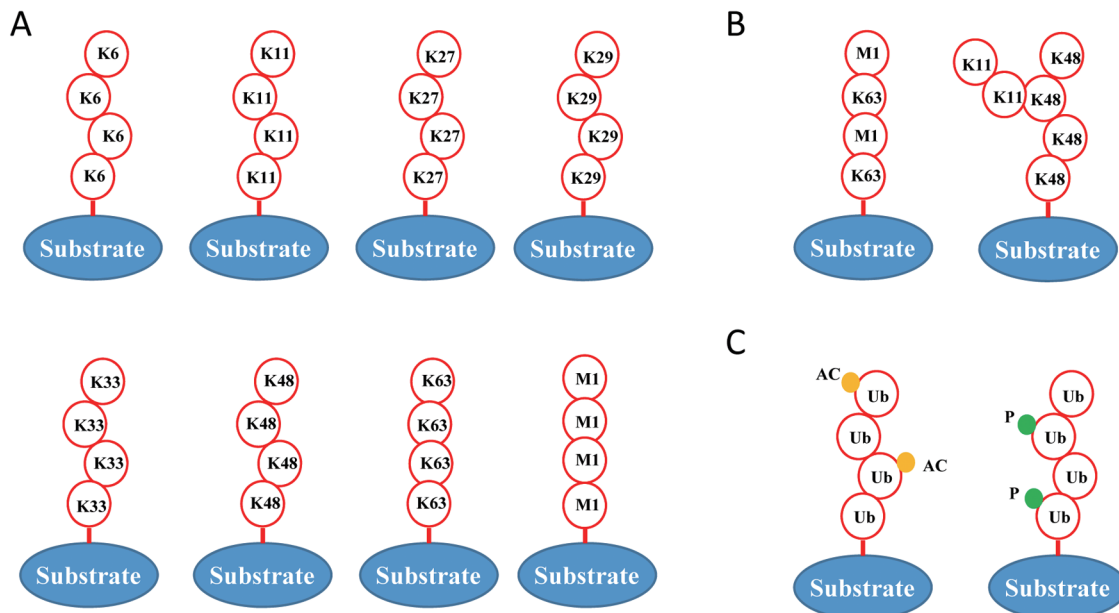
吞作用和组蛋白的修饰^[1]。多泛素化修饰由于泛素分子含有的7个赖氨酸残基(K6、K11、K27、K29、K33、K48和K63)和1个N末端甲硫氨酸残基(M1)都可以和另一个泛素分子结合,其又可以分为同型的多聚泛素化修饰(homotypic chains)(图1A)和异型的多聚泛素化修饰(heterotypic chains)(图1B)。这种多聚泛素修饰往往参与蛋白质降解、细胞信号转导等过程^[1]。泛素分子还可以被其他翻译后修饰如乙酰化^[2]和磷酸化所修饰^[3-7](图1C)。这些不同类型的泛素链往往会被一些含结合泛素结构域(ubiquitin binding domains, UBDs)的分子所识别^[8],从而参与不同生物学过程的调控。重要的是这些形成的泛素链还可以被去泛素化酶(deubiquitinases, DUB)切除。大约有100多种不同类型的去泛素化酶可以去除底物蛋白质上的泛素或泛素链,并参与调控神经退行性疾病、免疫、炎症和肿瘤等疾病的发生与进展^[9]。

多年来,因受限于技术手段,泛素领域的研究主要集中在K48和K63泛素链。直到近年来,因研究方法和技术的进步才对其他泛素连接类型有了较多的了解。组学数据表明,8种泛素连接类型(K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63和M1)广泛存在于细胞中^[10]。其中,K48泛素链是最主要的泛素修饰类型,在所有泛素修饰中占到50%以上,其功能主要是促进被修饰的蛋白质进入蛋白酶体降

解^[1]。K63泛素链是所有修饰中所占比例仅次于K48的泛素修饰类型,但其功能和蛋白质降解无关,多参与信号通路的调控^[11]。K11泛素链主要在细胞周期中作为一个替代K48泛素链的降解信号调控细胞周期进程^[12]。M1泛素链主要和K63泛素链协同参与到NF- κ B通路的信号转导^[13]。至于其他的连接类型,目前还没有精确的功能定义,功能还比较复杂。比如K33泛素链被报道在高尔基体上的蛋白质转运中发挥作用^[14],但在紫外照射的细胞内其蛋白质水平明显上升^[15],提示K33泛素链参与DNA损伤修复,且这种功能与蛋白质转运无关。生物体内各种泛素连接类型的表达水平是一定的,只有在特定的条件下才会发生改变。各种泛素连接类型的表达水平是受到泛素连接酶和去泛素化酶精确调控的。

1 K11/K48泛素链——调控蛋白质稳定性的泛素链

8种泛素连接类型中K48泛素链是经典的和蛋白质降解相关的修饰形式。很多泛素连接酶,包括SCF、gp78和E6AP,都能够在底物蛋白质上形成K48泛素链,从而使底物蛋白质进入蛋白酶体通路被降解^[16]。调控K48泛素链的泛素连接酶和去泛素化酶有很多综述都进行了总结^[17],这里不作赘述。和K48泛素链功能类似的泛素连接类型是K11泛素链。K11泛素链最早被认为是细胞分裂调控因子,



A: 同型的多聚泛素化修饰; B: 异型的多聚泛素化修饰; C: 泛素的乙酰化和磷酸化。

图1 泛素分子连接方式

其蛋白质丰度会随着细胞内后期促进复合物 / 细胞周期体 (anaphase-promoting complex/cyclosome, APC/C) 的活性增强而明显增加^[12]。随后, APC/C 被发现作为泛素连接酶在底物 Cyclin B1 上催化形成 K11 泛素链。形成的 K11 泛素链会介导 Cyclin B1 的降解, 推动细胞有丝分裂正常进行。这个过程中 APC/C 需要募集两个泛素结合酶 UbcH10 和 Ube2S, 前者与 APC/C 一起结合底物, 起始 K11 泛素链的形成; 后者则负责延伸 K11 泛素链^[18-20]。因此, 当细胞中缺失 UbcH10 和 Ube2S 时, 细胞的有丝分裂会被严重阻滞。另外, 有研究表明, K11 泛素链往往不易与 26S 蛋白酶体结合, 但当其与 K48 泛素链形成复合链时, 其降解效率会明显增强^[21]。

K11 泛素链对应的去泛素化酶有 Cezanne/OTUD7B 和 Cezanne2/OTUD7A^[22]。OTUD7B 最早被报道是 NF- κ B 通路的负调控因子, 进一步的研究发现, 其参与非经典的 NF- κ B 通路, 可以去除 TRAF3 的泛素链, 从而抑制 TRAF3 的降解^[23]。OTUD7B 敲除小鼠小肠中 B 细胞的过度激活和淋巴滤泡的过度增生与其对 TRAF3 的修饰密切相关^[23]。不仅如此, OTUD7B 还被证实是 TRAF6 的去泛素化酶, 调控缺氧条件下内皮细胞介导的免疫反应^[24]。另外, OTUD7B 还能去除 Zap70 的泛素链, 阻碍 Zap70 和抑制性的磷酸酶 STS1/STS2 结合, 介导 T 细胞的活化^[25], 并且 OTUD7B 还被报道是 EGFR 的去泛素化酶^[26]。值得注意的是, 关于 OTUD7B 是否是 K11 泛素链特异性的去泛素化酶还存在争议。David Komander 实验室最早在 OTU 类去泛素化酶家族中筛选出 OTUD7A 和 OTUD7B 具有特异性去除 K11 泛素链的活性^[22]; 随后还发现, 在缺氧条件下, OTUD7B 可以通过去除 HIF1 α 的 K11 泛素链, 调控 HIF1 α 的蛋白质稳定性^[28], 并且在 2016 年从 OTUD7B 的蛋白质晶体结构上分析了其 K11 泛素链特异性^[27]。但 Wenyi Wei 实验室于 2017 年发现, TRAF2 对 G β L 的泛素化修饰会阻碍 G β L 与 mTORC2 复合物中的 SIN1 结合, 促进 G β L 形成 mTORC1 复合物; OTUD7B 作为去泛素化酶去除 G β L 的 K63 泛素链, 负调控整个过程^[29]。这提示 OTUD7B 可能并不仅仅特异性去除 K11 泛素链, 还可以去除 K63 泛素链。OTUD7A 是与 OTUD7B 同源性很高的分子 (61% 相似性), 被报道也可以结合 TRAF6 来调控肝癌的发生^[30], 但目前其作为 K11 泛素链的特异性去泛素化酶还没有更多的研究支持。

2 K63/M1泛素链——两个类似的泛素链

K63 泛素链是酵母和哺乳动物细胞中第二大蛋白质修饰类型。K63 泛素链的功能和线粒体遗传、激酶依赖的信号通路激活以及内吞作用相关^[16-17], 其形成相关的泛素连接酶和去泛素化酶已有很多综述报道, 这里不再赘述。本文关注的是类似 K63 泛素链的另一种泛素连接类型——M1 泛素链, 即直链泛素链。催化直链泛素链的泛素连接酶为 LUBAC (linear ubiquitination assembly complex), 由 Kazuhiro Iwai 实验室发现。早期他们发现 HOIL 存在一个长形式的异构体 HOIL1L (long isoform of heme-oxidized IRP2 ubiquitin ligase-1, 也叫 RBCK1) 可以催化 IRP2 形成多聚泛素链, 并发现 HOIL1L 在细胞内形成 600 kDa 的复合体; 而质谱鉴定发现, 上述复合体是由 HOIL1L 和 HOIP (HOIL-1 interacting protein, 也叫 RNF31) 组成的异源二聚体, 且这种复合体可以催化 Ub-GFP 形成多聚 M1 泛素链^[31-32]。随后, Kazuhiro Iwai 实验室发现, NEMO 可以被 M1 泛素链修饰, 并证实 M1 泛素链激活 NF- κ B 通路, 而 HOIL1L 敲除小鼠及其来源细胞中 NF- κ B 通路激活异常也证实了前面的研究^[33]。同年, Ivan Dikic 实验室也发现 NEMO 可以结合 M1 泛素链并解析了其结构, 且证实了 Kazuhiro Iwai 实验室的结论^[34]。而当年 NF- κ B 通路研究中 K63 泛素链是最常见的泛素修饰链型。TRAF2/6 催化 NEMO 形成 K63 泛素链激活 NF- κ B 通路的研究被认为是该通路激活的关键, 但 K63 泛素链对应的特异性的泛素结合酶 Ubc13 敲除小鼠正常出生, NF- κ B 通路并未激活^[35], 提示 NF- κ B 通路中除了 K63 泛素链外, 可能存在其他的泛素链型参与调控整个通路。恰在此时, Henning Wakzak、Kazuhiro Iwai 和 Ivan Dikic 实验室同时发现, LUBAC 复合体中除了 HOIL1L-HIOP 二元复合体外还存在 SHARPIN (SHANK-associated RH domain interacting protein) 亚基, 三者形成一个复合体共同调控 NF- κ B 通路。这点也在 cpdm 小鼠 (慢性增殖性皮炎小鼠, SHARPIN 缺失小鼠) 模型中得到验证^[36-38]。值得注意的是, Ivan Dikic 实验室在发现 SHARPIN 亚基的同时也指出 M1 泛素链参与调控细胞凋亡^[36], Henning Wakzak 实验室则发现 M1 泛素链调控免疫信号通路^[37]。其后, HOIP 敲除小鼠被报道胚胎致死, 并且其死亡和内皮细胞死亡相关。TNFR 和 TNF 敲除可部分挽救 HOIP 敲除小鼠表型, 表明内皮细胞死亡可能与

NF- κ B 通路相关，但不是唯一的原因^[39]。后续在免疫信号通路和细胞死亡方向有了更多关于 LUBAC 的研究，LUBAC 被报道参与调控 B 细胞或者巨噬细胞中不同配体如 PGN、CD40L、IL1 β 、LPS 激活的 NF- κ B 通路；此外，LUBAC 还被报道参与 TLR 通路、IRF3 介导的细胞凋亡、NLRP3/ASC 相关的免疫信号通路和 LMP1 信号通路^[40]。

M1 泛素链的去泛素化酶有 OTULIN 和 CYLD。OTULIN 和 CYLD 都可以和 HOIP 的 PUB 结构域结合，负调控 NF- κ B 通路。其中，CYLD 倾向去除 K63 和 M1 泛素链，但也具有部分去除 K11 和 K48 泛素链的能力^[41-42]。最新研究表明，CYLD 与 HOIP 的相互作用依赖于 SPATA2。SPATA2 的 N 端 PUB 结构域和 CYLD 的 USP 结构域相互作用，其 C 端 PIM 结构域和 HOIP 的 PUB 结构域相互作用^[43-46]。静息状态下，SPATA2 就已经结合 HOIP 和 CYLD；当细胞受刺激后，SPATA2 会协助 CYLD 募集到 TNFR1 和 NOD2 受体上，并激活 CYLD 的去泛素化酶活性，介导 CYLD 去除 M1 和 K63 泛素链。与之相对应的，SPATA2 缺失会导致 NF- κ B 通路激活和 TNF α 介导的细胞程序性坏死通路被抑制^[43-46]。OTULIN 则特异性去除 M1 泛素链，这也是其名字的由来——特异性去除 M1 泛素链的 OTU 类的去泛素化酶 (OTU domain-containing linear deubiquitinase, OTULIN)^[22]。OTULIN 通过保守的 PIM 结构域和 HOIP 的 PUB 结构域相互作用，且这种相互作用依赖于 OTULIN 的 Tyr56 (56 位的酪氨酸残基) 和 HOIP 的 Asn102 (102 位的天冬酰胺残基)^[47-48]。OTULIN 的 Tyr56 磷酸化会阻碍 HOIP-OTULIN 的相互作用^[47-48]。CYLD 和 OTULIN 有许多共同的底物，如 TNFR1、RIPK1、RIPK2 和 NEMO^[49]，因此两者的功能看起来存在一定程度的冗余，但各自敲除的小鼠表型却表明还存在明显的功能差异。OTULIN 敲除小鼠胚胎致死，且有明显的血管发育异常^[50]。CYLD 敲除小鼠正常存活，没有明显的生长和生存缺陷。很多 CYLD 小鼠模型都表明，CYLD 在很多方向，如免疫细胞发育和功能、固有免疫、破骨细胞生成、精子发生和肝细胞内稳态等，发挥着重要的功能^[49]。OTULIN 小鼠模型则表现出在自身免疫方面的特异性。David Komander 实验室发现 T 细胞或者 B 细胞特异性敲除 OTULIN 小鼠没有明显的表型，但髓系细胞特异性敲除小鼠则表现出明显的自身免疫疾病^[51]。携带 OTULIN 突变的患者也表现出非常严重的炎症反应^[51]。因此，关于 CYLD 和 OTULIN

的功能冗余性和各自的特异性还期待后续更多的研究。另外，还有一个去泛素化酶 A20 也被报道和 M1 泛素链相关。A20 主要通过 C 端的锌指结构结合 M1 泛素链，但不具备切除 M1 泛素链的能力^[52]。当 A20 结合在 M1 泛素链上，其会避免 M1 泛素链被去泛素化酶 OTULIN 或者 CYLD 切除^[52]。类似地，A20 通过相同的方式来抑制泛素连接酶，如 TRAF6、TRAF2 和 cIAP1/2 的催化活性^[53]。

3 K29/K33泛素链与共同的去泛素化酶TRABID

K29 泛素链的泛素连接酶有 HECT 家族的 UBE3C、ITCH 和 SMURF1。其中，SMURF1 作为 NEDD4 家族成员中一员，其最经典的功能是在 BMP 通路节点分子 SMAD1/5 上形成 K48 泛素链并促进其降解。2013 年，SMURF1 才被发现可以在 WNT 通路中的 AXIN 上修饰 K29 泛素链；而这种被 K29 泛素链修饰的 AXIN 并不会被降解，只是丧失与 WNT 通路受体 LRP5/6 的相互作用能力^[54]。ITCH，作为 SMURF1 同家族成员，则被报道可以催化 NOTCH 通路中的 Deltex，形成 K29 泛素链^[55]。被 K29 泛素链修饰的 Deltex 随后会进入溶酶体通路降解。值得注意的是，ITCH 不仅是 K29 泛素链的泛素连接酶，还是 K33 泛素链的泛素连接酶。ITCH 和同为 K33 泛素链的泛素连接酶 Cbl-b 的敲除小鼠都因 T 细胞过度活化导致自发的自身免疫疾病，其机制就是 T 细胞受体 ζ 链被修饰上 K33 泛素链，这种泛素链阻碍了 T 细胞受体 ζ 链自身的磷酸化，进而抑制了 T 细胞的活化^[56]。进一步研究结果表明，T 细胞受体激活通路的下游 Zap70 也可以被修饰上 K33 泛素链，从而影响 CD8 阳性的 T 细胞活化^[57]。另外，K33 泛素链还和 K63 泛素链发挥类似的功能，参与蛋白质的转运过程。RING 类泛素连接酶 Cul3-KLHL20 会在 Crm7 上催化形成 K33 泛素链，随后 Crm7 会结合 Eps15 (一种含 UBD 结构域的网络蛋白适配器)，进入高尔基体蛋白转运网络中结合 F-actin，避免 F-actin 被解聚，从而保证蛋白质在高尔基体上正常转运^[14]。

OTULIN 可以特异性去除 M1 泛素链，而 TRABID/ZRANB1 不同，其偏好性去除 K29 和 K33 泛素链^[59]，是两者共同的去泛素化酶。TRABID 通过 N 端的 NZF1 结构域 (Npl4-like zinc finger domain, 类 NPL4 锌指结构域) 特异性识别以 K29/K33 方式结合的两个泛素分子，而且体外 TRABID 切除 K29 泛素链的效率比 K63 泛素链高 40 倍左右^[58-60]。然

而目前来看, TRABID 切除 K63 链的功能也不可忽视。最早 TRABID 就被报道可以去除 APC 的 K63 泛素链, 从而正调控 WNT 通路^[61]。在果蝇中, TRABID 被发现可以结合 TAK1 (TGF- β activating kinase 1, TGF β 激活激酶 1) 并去除其 K63 泛素链, 负调控果蝇的免疫缺陷通路^[62]。另外, 2016 年的研究发现, TRABID 可以促进 IL12 和 IL23 的表达, 其机制是: 在正常的树突状细胞中, IL12 和 IL23 的启动子区会被甲基化修饰, 导致 c-Rel 无法结合启动子区启动 IL12 和 IL23 的转录; TRABID 在其中的功能就是可以去除组蛋白去甲基化酶 Jmjd2d 的 K29 泛素链, 维持 Jmjd2d 的稳定性; 稳定的 Jmjd2d 去除 IL12 和 IL23 的启动子区组蛋白的甲基化, 启动 IL12 和 IL23 的转录^[63]。树突状细胞特异性敲除 TRABID 小鼠 TLR 受体激活的 IL12 和 IL23 表达下调, 免疫 T 细胞分化被破坏也证明了这一点^[63]。2016 年, 一个新的 K33 泛素链的去泛素化酶 USP38 被报道, 其可以去除 I 型干扰素通路中关键的节点分子 TBK1 (TANK-binding kinase 1, TANK 结合激酶 1) 的 K33 泛素链, 给随后在同样位点进行 K48 泛素链修饰让位^[64]。细胞中敲除 USP38 可导致 TBK1 无法被 DTX4 和 TRIP 这两种 K48 型泛素连接酶降解, 从而导致 I 型干扰素通路被激活^[64]。

4 K27泛素链与DNA损伤修复和固有免疫

K27 泛素链的研究主要集中在 DNA 损伤修复和固有免疫两个方向。DNA 损伤, 尤其是双链断裂的 DNA 损伤修复过程中, RNF168 会协助 RNF8 在组蛋白上形成多聚泛素链, 随后募集 53BP1 和 BRCA1 到 DNA 损伤位点启动 DNA 损伤修复过程^[65]。Lorenza Penengo 实验室通过细胞中感染不同类型的泛素 KR 突变体发现, RNF168 特异性催化 K27 泛素链^[66]。在 DNA 损伤修复过程中, RNF168 依赖的组蛋白的 K27 泛素链十分关键; 缺失 K27 泛素链, 53BP1 和 BRCA1 将无法被正确募集到 DNA 损伤位点, 这大大拓展了大家对 K27 泛素链修饰的认知。除此之外, K27 泛素链在固有免疫方面的早期研究发现: 当宿主细胞受到胞外 DNA 刺激后, 内质网蛋白 AMFR 和 INSIG1 作为泛素连接酶会给 STING (stimulator of interferon genes, 刺激后的干扰素基因) 修饰上 K27 泛素链^[67]。这种修饰便于 STING 募集 TBK1, 诱发其后的 IRF-3 (干扰素调控因子) 活化。类似的研究还发现, 在 STING 的上游, 泛素连接酶 RNF185 催化循环的 GMP-AMP

合成酶 cGAS 形成 K27 泛素链活化其自身酶活, 从而形成更多的 cGAMP 来结合并激活 STING 下游通路^[68]。另外, USP21 作为一个去泛素化酶, 在此过程中可以去除 STING 的 K27 泛素链, 但其功能受到 p38 的调控^[69]。后来研究发现, 当宿主细胞受到另一种类型的胞外刺激如胞外 RNA 刺激时, 又会激活另一个蛋白 TRIM40, 从而在 MDA5 和 RIG-I 上形成 K27/K48 泛素链, 并促进它们的降解, 后两者是机体响应胞外 RNA 的关键分子^[70]。随后, K27 泛素链在固有免疫领域的研究继续被拓展, 研究发现当宿主细胞受到胞外真菌入侵时, 泛素连接酶 TRIM62 则催化 CARD9 形成 K27 泛素链, 激活 CARD9 下游的免疫通路。CARD9 和 TRIM62 敲除小鼠肠道都易于感染真菌也证实了前面的理论^[71]。2014 年, K27 泛素链还被报道和树突状细胞分泌 IL6 有关: 泛素连接酶 Rbhd3 会在 NEMO 上催化形成 K27 泛素链, 从而抑制树突状细胞分泌 IL6^[72]。帕金森病中关键分子 LRRK2 也可以被泛素连接酶 WSB1 催化形成 K27/K29 泛素链, 导致其在早期的神经元中沉淀, 诱发帕金森症^[73]。以上这些在固有免疫领域中 K27 泛素链的研究将有利于加深大家对这种泛素链功能的理解。

5 K6泛素链——被忽略的泛素链

受限于现有特异性检测 K6 泛素链的手段, 目前对于 K6 泛素链的研究不多。K6 泛素链在蛋白酶体抑制剂处理的细胞中总的蛋白质水平没有明显改变, 提示其不同于 K11 和 K48 泛素链的功能。早期对 K6 泛素链的研究主要是发现 BRCA1-BARD1 可以催化自身形成 K6 泛素链, 间接参与 DNA 损伤修复过程^[74]。随后有研究表明, 紫外照射后细胞内 K6 和 K33 泛素链明显增多^[15], 这提示 K6 泛素链的确参与 DNA 损伤修复, 但具体的功能尚不明确。另有研究发现, K6 泛素链参与线粒体稳态维持。正常状态下, 线粒体蛋白激酶 PINK1 的跨膜结构域会被蛋白酶 PARL 切除, 随后又会被泛素连接酶 Nerl 降解^[75]。当线粒体受损后, PARL 对 PINK1 的切除功能会被抑制, PINK1 会在受损的线粒体外膜快速聚集, 随后募集 Parkin 启动线粒体自噬过程^[76]。Parkin 催化形成的泛素链主要是 K6 和 K11 泛素链, 但也会少量形成 K48 和 K63 泛素链。如果在细胞中过表达 K6R 或者 K63R, 线粒体自噬会被明显抑制^[77]。与 K6 的泛素连接酶相对的去泛素化酶有 USP30 和 USP8。前者主要是去除线粒体外膜蛋白

(mitochondrial outer membrane protein, MOM 蛋白) 的 K6 和 K11 泛素链^[78], 后者选择性去除 Parkin 的 K6 泛素链并抑制其自身泛素化^[79]。2017 年的研究表明, RNF144A 和 RNF144B 作为泛素连接酶在体外可催化形成 K6、K11 和 K48 泛素链, HUWE1 则主要催化形成 K6 泛素链^[80]。敲除或者敲低 HUWE1, 细胞内都会出现明显的 K6 泛素链的富集。Mfn2 (Mitofusin-2, 线粒体融合素-2) 是 HUWE1 已知的底物, 其被发现可以被 K6 泛素链修饰^[80]。对于 Mfn2 的研究将有利于拓展 K6 泛素链在线粒体自噬方向的认知。

6 分支型及混合型异型多聚泛素化修饰

除了 8 种同型多聚泛素化修饰, 细胞内广泛存在异型多聚泛素化修饰, 此类修饰主要指在底物的多聚泛素链上由两种不同类型的赖氨酸连接方式形成混合类型的泛素链和泛素链分支, 即混合型和分支型多聚泛素化修饰 (图 1B)^[10, 81]。基于 8 种不同的连接类型 (M1、K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63), 理论上至少有 84 种异型多聚泛素化链存在^[82]。目前异型泛素链的生成、解读及功能正在成为新的研究焦点, 数种异型多聚泛素化链及其特异性 E3 酶已经被报道, 如 APC/C 能在一系列细胞周期调控因子底物上催化形成 K11/K48 分支型多聚泛素化链, 从而促进其被蛋白酶体识别降解, 促进细胞周期的推进^[83]。除了 K11/K48 分支多聚泛素链外, 已鉴定的异型泛素链包括 M1/K63、K29/K48、K11/

K63 和 K48/K63 泛素链; 多种 E3 连接酶都具有异型多聚泛素化活性, 如 Jmjd2d 和 HACE1 等^[68, 84-85]。它们涉及的生理功能众多, 包括蛋白酶体降解、自噬降解、病原体感染、细胞泡膜的分泌和吞噬以及更为广泛的信号转导^[82, 85-86]。一般认为多样化的异型泛素链有利于形成广泛和特异性的泛素识别因子作用平台即泛素云 (Ub clouds), 泛素结合蛋白通过在泛素云上彼此结合相互作用来完成多样化和特异性的信号转导^[82]。一个比较经典的例子如 NF- κ B 信号通路中 LUBAC 催化的 M1 泛素链常常以 K63 泛素链为基点形成 M1/K63 异型多聚泛素化, 构成功能性平台招募各种 NF- κ B 信号调节因子调节其下游信号^[87]。异型多聚泛素化使得泛素密码更为复杂, 怎么去解码这些复杂的生物学修饰有赖于新的鉴定手段, 如连接特异性抗体和特异性结合因子或药物的开发。

7 泛素的磷酸化和乙酰化修饰

前面讨论了不同类型的泛素化修饰, 可总结为表 1。除此之外, 泛素化修饰还包括一些类泛素化修饰, 如 SUMO 化修饰和 NEDD8 修饰。这些修饰已经有很好的综述^[81, 88], 这里就不再赘述。本文关注的是最近被报道的泛素自身磷酸化或者乙酰化修饰。关于泛素的磷酸化修饰, 最早 Miratul M. K. Muqit 实验室和 Nobutaka Hattori 实验室发现, Parkin 的 N 端的类泛素 UBL 结构域 Ser65 (第 56 位丝氨酸残基) 可以被 PINK1 磷酸化^[3-4]。UBL 结构域和

表1 8种泛素连接类型的代表性泛素连接酶和去泛素化酶以及其功能

	代表性泛素连接酶	代表性去泛素化酶	功能	参考文献
K6	BRCA1、Parkin、RNF144A、RNF144B、HUWE1	USP30、USP8	DNA损伤修复、线粒体自噬	[15,74,77-80]
K11	APC/C	OTUD7A、OTUD7B	细胞周期	[12,22,27-28]
K27	RNF168、AMFR、INSIG1、RNF185、TRIM40、TRIM62、Rhbdd3、LRRK2	USP21	DNA损伤修复、固有免疫	[66,67-73]
K29	ITCH、SMURF1、UBE3C	TRABID	WNT通路、NOTCH通路	[54-55,59,63]
K33	ITCH、Cbl-b、Cul3-KLHL20	TRABID、USP38	TCR通路、蛋白质转运、AMPK通路、DNA损伤修复	[14-15,56-57,59,64]
K48	SCF、gp78、E6AP	-	经典泛素-蛋白酶体通路	[16-17]
K63	TRAF6	-	线粒体遗传、激酶依赖的信号通路激活、吞噬作用	[16-17]
M1	LUBAC	OTULIN、CYLD、A20	NF- κ B通路、TLR通路、IRF3介导的细胞凋亡、NLRP3/ASC相关的免疫信号通路和LMP1信号通路	[22,31-42]

泛素分子在结构上非常相似, 这给了研究者灵感。随后 Richard J. Youle 实验室、Noriyuki Matsuda 实验室和 Miratul M. K. Muqit 实验室几乎同时发现泛素 Ser65 被磷酸化^[5-7] (图 2)。质谱数据也发现在线粒体发生损伤后, 磷酸化泛素水平从总泛素水平的 0.1% 上升到了 2%^[89]。在损伤的线粒体上大约有 20% 的泛素都被磷酸化, 并且这种磷酸化泛素链会随即招募自噬相关的受体启动线粒体自噬^[89]。Parkin 与帕金森病息息相关, 其被磷酸化的泛素修饰之后, 会从自抑制的状态释放出来, 进入活化状态, 激活接下来的线粒体自噬过程。磷酸化泛素分子和泛素活化酶、泛素结合酶的结合没有受到影响, 但结合了该磷酸化泛素分子的泛素结合酶与泛素的解离功能以及随后的泛素连接酶催化形成多聚泛素链的功能受到了抑制^[90]。到目前为止, 因为很多去泛素化酶对含 Ser65 磷酸化泛素分子的泛素链切除能力减弱^[90], 因此, 还没有鉴定到可以特异性切除磷酸化泛素链的去泛素化酶。关于泛素的乙酰化修饰, 很早之前就已经有研究表明泛素分子的 K6 和 K48 位可以被乙酰化修饰, 但当时并没有引起重视。直到泛素的磷酸化被发现之后, 一些研究才揭示泛素乙酰化的功能, 发现组蛋白可以被乙酰化的泛素链修饰, 并且这种修饰会增加组蛋白 H2B 的稳定性^[2]。值得注意的是, 这种泛素的乙酰化修饰研究还很少, 催化其形成的泛素连接酶和去泛素化酶都没有被报道。

8 总结与展望

随着研究的深入, 泛素链越来越具有多样性和复杂性。早期对泛素系统的理解仅仅是泛素化的蛋白质进入蛋白酶体通路被降解, 现在泛素与泛素之间连接类型的不同就会决定被修饰的底物功能的差异。这之间检测技术的进步对于发现更多的泛素连接类型至关重要。蛋白质翻译后修饰有很多, 如泛素化修饰、乙酰化修饰、磷酸化修饰、甲基化修饰和糖基化修饰等, 现在发现泛素可以被磷酸化修饰和乙酰化修饰, 自然而然, 泛素是否被甲基化修饰或者糖基化修饰, 就成了亟待解决的问题。得益于现今质谱技术、识别特异性泛素连接类型的抗体或者结合泛素的结构域, 人们发现了泛素的 8 种不同连接类型。但目前对它们的功能了解得还不够全面。比如, K6 泛素链在目前看来可能参与到 DNA 损伤修复过程中某一个关键环节^[15], 也可能参与到线粒体自噬中某一个意想不到的途径^[14]。从上述线索出

发, 还需要更多的研究去发现真相。不仅如此, 8 种不同的泛素链只是简单的泛素链, 而 K11/K48 混合泛素链会促进底物被蛋白酶体降解, M1/K63 混合泛素链会协同作用加快 NF- κ B 通路激活^[91]。这种包含多种不同的泛素连接类型的分支型和混合型泛素链, 其功能需要更进一步的探索。

泛素系统有一整套的编辑元件, 包括催化形成多聚泛素链的泛素连接酶 (也包含泛素活化酶和泛素结合酶)、识别多聚泛素链的 UBD 结构域和去除多聚泛素链的去泛素化酶。现在不同泛素连接类型中有些连接类型的编辑元件已经比较清楚, 如 K48/K63 泛素链; 也有一些的编辑元件只是有了简单的了解, 如 M1 泛素链的泛素连接酶现在被报道的只有 LUBAC, 是否有其他类型的泛素连接酶也可催化 M1 泛素链还不可知; 更有一些泛素连接类型的编辑元件尚未被发现, 如 K27 泛素链的去泛素化酶以及乙酰化泛素修饰的泛素连接酶和去泛素化酶都未被报道。另外, 这些不同的泛素连接类型对应的编辑元件不只一种, 到底哪种是最主要的编辑元件还需要更多的研究来发现。因此, 对这些泛素链的编辑元件的深入研究将有利于发现泛素密码潜在规律, 为更深入地了解整个泛素系统提供更坚实的理论支持。

[参 考 文 献]

- [1] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 425-79
- [2] Ohtake F, Saeki Y, Sakamoto K, et al. Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. *EMBO Rep*, 2015, 16: 192-201
- [3] Kondapalli C, Kazlauskaitė A, Zhang N, et al. PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating serine 65. *Open Biol*, 2012, 2: 120080
- [4] Shiba-Fukushima K, Imai Y, Yoshida S, et al. PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Sci Rep*, 2012, 2: 1002
- [5] Kazlauskaitė A, Kondapalli C, Gourlay R, et al. Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *Biochem J*, 2014, 460: 127-39
- [6] Kane LA, Lazarou M, Fogel AI, et al. PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *J Cell Biol*, 2014, 205: 143-53
- [7] Koyano F, Okatsu K, Kosako H, et al. Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature*, 2014, 510: 162-6
- [8] Husnjak K, Dikic I. Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu Rev*

- Biochem, 2012, 81: 291-322
- [9] Clague MJ, Coulson JM, Urbe S. Cellular functions of the DUBs. *J Cell Sci*, 2012, 125: 277-86
- [10] Swatek KN, Komander D. Ubiquitin modifications. *Cell Res*, 2016, 26: 399-422
- [11] Chen ZJ, Sun LJ. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell*, 2009, 33: 275-86
- [12] Matsumoto ML, Wickliffe KE, Dong KC, et al. K11-linked polyubiquitination in cell cycle control revealed by a K11 linkage-specific antibody. *Mol Cell*, 2010, 39: 477-84
- [13] Rittinger K, Ikeda F. Linear ubiquitin chains: enzymes, mechanisms and biology. *Open Biol*, 2017, 7: 170026
- [14] Yuan WC, Lee YR, Lin SY, et al. K33-linked polyubiquitination of coronin 7 by Cul3-KLHL20 ubiquitin E3 ligase regulates protein trafficking. *Mol Cell*, 2014, 54: 586-600
- [15] Elia AE, Boardman AP, Wang DC, et al. Quantitative proteomic atlas of ubiquitination and acetylation in the DNA damage response. *Mol Cell*, 2015, 59: 867-81
- [16] Komander D, Rape M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 203-29
- [17] Clague MJ, Urbe S. Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell*, 2010, 143: 682-5
- [18] Jin L, Williamson A, Banerjee S, et al. Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell*, 2008, 133: 653-65
- [19] Garnett MJ, Mansfeld J, Godwin C, et al. UBE2S elongates ubiquitin chains on APC/C substrates to promote mitotic exit. *Nat Cell Biol*, 2009, 11: 1363-9
- [20] Wu T, Merbl Y, Huo Y, et al. UBE2S drives elongation of K11-linked ubiquitin chains by the anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 1355-60
- [21] Grice GL, Lobb IT, Weekes MP, et al. The Proteasome distinguishes between heterotypic and homotypic lysine-11-linked polyubiquitin chains. *Cell Rep*, 2015, 12: 545-53
- [22] Mevissen TE, Hospenthal MK, Geurink PP, et al. OTU deubiquitinases reveal mechanisms of linkage specificity and enable ubiquitin chain restriction analysis. *Cell*, 2013, 154: 169-84
- [23] Hu H, Brittain GC, Chang JH, et al. OTUD7B controls non-canonical NF- κ B activation through deubiquitination of TRAF3. *Nature*, 2013, 494: 371-4
- [24] Luong le A, Fragiadaki M, Smith J, et al. Cezanne regulates inflammatory responses to hypoxia in endothelial cells by targeting TRAF6 for deubiquitination. *Circ Res*, 2013, 112: 1583-91
- [25] Hu H, Wang H, Xiao Y, et al. Otud7b facilitates T cell activation and inflammatory responses by regulating Zap70 ubiquitination. *J Exp Med*, 2016, 213: 399-414
- [26] Pareja F, Ferraro DA, Rubin C, et al. Deubiquitination of EGFR by cezanne-1 contributes to cancer progression. *Oncogene*, 2012, 31: 4599-608
- [27] Mevissen TET, Kulathu Y, Mulder MPC, et al. Molecular basis of Lys11-polyubiquitin specificity in the deubiquitinase cezanne. *Nature*, 2016, 538: 402-5
- [28] Bremm A, Moniz S, Mader J, et al. Cezanne (OTUD7B) regulates HIF-1 α homeostasis in a proteasome-independent manner. *EMBO Rep*, 2014, 15: 1268-77
- [29] Wang B, Jie Z, Joo D, et al. TRAF2 and OTUD7B govern a ubiquitin-dependent switch that regulates mTORC2 signalling. *Nature*, 2017, 545: 365-9
- [30] Xu Z, Pei L, Wang L, et al. Snail1-dependent transcriptional repression of Cezanne2 in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2014, 33: 2836-45
- [31] Yamanaka K, Ishikawa H, Megumi Y, et al. Identification of the ubiquitin-protein ligase that recognizes oxidized IRP2. *Nat Cell Biol*, 2003, 5: 336-40
- [32] Kirisako T, Kamei K, Murata S, et al. A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO J*, 2006, 25: 4877-87
- [33] Tokunaga F, Sakata S, Saeki Y, et al. Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF- κ B activation. *Nat Cell Biol*, 2009, 11: 123-32
- [34] Rahighi S, Ikeda F, Kawasaki M, et al. Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF- κ B activation. *Cell*, 2009, 136: 1098-109
- [35] Yamamoto M, Okamoto T, Takeda K, et al. Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat Immunol*, 2006, 7: 962-70
- [36] Ikeda F, Deribe YL, Skanland SS, et al. SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF- κ B activity and apoptosis. *Nature*, 2011, 471: 637-41
- [37] Tokunaga F, Nakagawa T, Nakahara M, et al. SHARPIN is a component of the NF- κ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature*, 2011, 471: 633-6
- [38] Gerlach B, Cordier SM, Schmukle AC, et al. Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. *Nature*, 2011, 471: 591-6
- [39] Peltzer N, Rieser E, Taraborrelli L, et al. HOIP deficiency causes embryonic lethality by aberrant TNFR1-mediated endothelial cell death. *Cell Rep*, 2014, 9: 153-65
- [40] Hrdinka M, Gyrd-Hansen M. The Met1-linked ubiquitin machinery: emerging themes of (de)regulation. *Mol Cell*, 2017, 68: 265-80
- [41] Komander D, Lord CJ, Scheel H, et al. The structure of the CYLD USP domain explains its specificity for Lys63-linked polyubiquitin and reveals a B box module. *Mol Cell*, 2008, 29: 451-64
- [42] Komander D, Reyes-Turcu F, Licchesi JD, et al. Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains. *EMBO Rep*, 2009, 10: 466-73
- [43] Elliott PR, Leske D, Hrdinka M, et al. SPATA2 links CYLD to LUBAC, activates CYLD, and controls LUBAC signaling. *Mol Cell*, 2016, 63: 990-1005
- [44] Kupka S, De Miguel D, Draber P, et al. SPATA2-mediated binding of CYLD to HOIP enables CYLD recruitment to signaling complexes. *Cell Rep*, 2016, 16: 2271-80
- [45] Schlicher L, Wissler M, Preiss F, et al. SPATA2 promotes CYLD activity and regulates TNF-induced NF- κ B signaling and cell death. *EMBO Rep*, 2016, 17: 1485-97
- [46] Wagner SA, Satpathy S, Beli P, et al. SPATA2 links CYLD to the TNF- α receptor signaling complex and modulates

- the receptor signaling outcomes. *EMBO J*, 2016, 35: 1868-84
- [47] Elliott PR, Nielsen SV, Marco-Casanova P, et al. Molecular basis and regulation of OTULIN-LUBAC interaction. *Mol Cell*, 2014, 54: 335-48
- [48] Schaeffer V, Akutsu M, Olma MH, et al. Binding of OTULIN to the PUB domain of HOIP controls NF- κ B signaling. *Mol Cell*, 2014, 54: 349-61
- [49] Lork M, Verhelst K, Beyaert R. CYLD, A20 and OTULIN deubiquitinases in NF- κ B signaling and cell death: so similar, yet so different. *Cell Death Differ*, 2017, 24: 1172-83
- [50] Rivkin E, Almeida SM, Ceccarelli DF, et al. The linear ubiquitin-specific deubiquitinase gumby regulates angiogenesis. *Nature*, 2013, 498: 318-24
- [51] Damgaard RB, Walker JA, Marco-Casanova P, et al. The deubiquitinase OTULIN is an essential negative regulator of inflammation and autoimmunity. *Cell*, 2016, 166: 1215-30 e20
- [52] Draber P, Kupka S, Reichert M, et al. LUBAC-recruited CYLD and A20 regulate gene activation and cell death by exerting opposing effects on linear ubiquitin in signaling complexes. *Cell Rep*, 2015, 13: 2258-72
- [53] Shembade N, Ma A, Harhaj EW. Inhibition of NF- κ B signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science*, 2010, 327: 1135-9
- [54] Fei C, Li Z, Li C, et al. Smurf1-mediated Lys29-linked nonproteolytic polyubiquitination of axin negatively regulates Wnt/ β -catenin signaling. *Mol Cell Biol*, 2013, 33: 4095-105
- [55] Chastagner P, Israel A, Brou C. Itch/AIP4 mediates deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO Rep*, 2006, 7: 1147-53
- [56] Huang H, Jeon MS, Liao L, et al. K33-linked polyubiquitination of T cell receptor-zeta regulates proteolysis-independent T cell signaling. *Immunity*, 2010, 33: 60-70
- [57] Yang M, Chen T, Li X, et al. K33-linked polyubiquitination of Zap70 by Nrdp1 controls CD8⁺ T cell activation. *Nat Immunol*, 2015, 16: 1253-62
- [58] Kristariyanto YA, Abdul Rehman SA, Campbell DG, et al. K29-selective ubiquitin binding domain reveals structural basis of specificity and heterotypic nature of k29 polyubiquitin. *Mol Cell*, 2015, 58: 83-94
- [59] Michel MA, Elliott PR, Swatek KN, et al. Assembly and specific recognition of k29- and k33-linked polyubiquitin. *Mol Cell*, 2015, 58: 95-109
- [60] Licchesi JD, Mieszczykanek J, Mevissen TE, et al. An ankyrin-repeat ubiquitin-binding domain determines TRABID's specificity for atypical ubiquitin chains. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 19: 62-71
- [61] Tran H, Hamada F, Schwarz-Romond T, et al. Trabid, a new positive regulator of Wnt-induced transcription with preference for binding and cleaving K63-linked ubiquitin chains. *Genes Dev*, 2008, 22: 528-42
- [62] Fernando MD, Kounatidis I, Ligoxygakis P. Loss of Trabid, a new negative regulator of the *Drosophila* immune-deficiency pathway at the level of TAK1, reduces life span. *PLoS Genet*, 2014, 10: e1004117
- [63] Jin J, Xie X, Xiao Y, et al. Epigenetic regulation of the expression of Il12 and Il23 and autoimmune inflammation by the deubiquitinase Trabid. *Nat Immunol*, 2016, 17: 259-68
- [64] Lin M, Zhao Z, Yang Z, et al. USP38 inhibits type I interferon signaling by editing TBK1 ubiquitination through NLRP4 signalosome. *Mol Cell*, 2016, 64: 267-81.
- [65] Brown JS, Jackson SP. Ubiquitylation, neddylation and the DNA damage response. *Open Biol*, 2015, 5: 150018
- [66] Gatti M, Pinato S, Maiolica A, et al. RNF168 promotes noncanonical K27 ubiquitination to signal DNA damage. *Cell Rep*, 2015, 10: 226-38
- [67] Wang Q, Liu X, Cui Y, et al. The E3 ubiquitin ligase AMFR and INSIG1 bridge the activation of TBK1 kinase by modifying the adaptor STING. *Immunity*, 2014, 41: 919-33
- [68] Wang Q, Huang L, Hong Z, et al. The E3 ubiquitin ligase RNF185 facilitates the cGAS-mediated innate immune response. *PLoS Pathog*, 2017, 13: e1006264
- [69] Chen Y, Wang L, Jin J, et al. p38 inhibition provides anti-DNA virus immunity by regulation of USP21 phosphorylation and STING activation. *J Exp Med*, 2017, 214: 991-1010
- [70] Zhao C, Jia M, Song H, et al. The E3 ubiquitin ligase TRIM40 attenuates antiviral immune responses by targeting MDA5 and RIG-I. *Cell Rep*, 2017, 21: 1613-23
- [71] Cao Z, Conway KL, Heath RJ, et al. Ubiquitin ligase TRIM62 regulates CARD9-mediated anti-fungal immunity and intestinal inflammation. *Immunity*, 2015, 43: 715-26
- [72] Liu J, Han C, Xie B, et al. Rhbdd3 controls autoimmunity by suppressing the production of IL-6 by dendritic cells via K27-linked ubiquitination of the regulator NEMO. *Nat Immunol*, 2014, 15: 612-22
- [73] Nucifora FC Jr, Nucifora LG, Ng CH, et al. Ubiquitination via K27 and K29 chains signals aggregation and neuronal protection of LRRK2 by WSB1. *Nat Commun*, 2016, 7: 11792
- [74] Wu-Baer F, Lagrazon K, Yuan W, et al. The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin. *J Biol Chem*, 2003, 278: 34743-6
- [75] Jin SM, Lazarou M, Wang C, et al. Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol*, 2010, 191: 933-42
- [76] Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol*, 2010, 8: e1000298
- [77] Ordureau A, Heo JM, Duda DM, et al. Defining roles of PARKIN and ubiquitin phosphorylation by PINK1 in mitochondrial quality control using a ubiquitin replacement strategy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 6637-42
- [78] Cunningham CN, Baughman JM, Phu L, et al. USP30 and parkin homeostatically regulate atypical ubiquitin chains on mitochondria. *Nat Cell Biol*, 2015, 17: 160-9

- [79] Durcan TM, Tang MY, Perusse JR, et al. USP8 regulates mitophagy by removing K6-linked ubiquitin conjugates from parkin. *EMBO J*, 2014, 33: 2473-91
- [80] Michel MA, Swatek KN, Hospenthal MK, et al. Ubiquitin linkage-specific affimers reveal insights into K6-linked ubiquitin signaling. *Mol Cell*, 2017, 68: 233-46.e5
- [81] Hu R, Hochstrasser M. Recent progress in ubiquitin and ubiquitin-like protein (Ubl) signaling. *Cell Res*, 2016, 26: 389-90
- [82] Stolz A, Dikic I. Heterotypic ubiquitin chains: Seeing is believing. *Trends Cell Biol*, 2017, 28: 1-3
- [83] Meyer HJ, Rape M. Enhanced protein degradation by branched ubiquitin chains. *Cell*, 2014, 157: 910-21
- [84] Hospenthal MK, Freund SM, Komander D. Assembly, analysis and architecture of atypical ubiquitin chains. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20: 555-65
- [85] Liu Z, Chen P, Gao H, et al. Ubiquitylation of autophagy receptor optineurin by HACE1 activates selective autophagy for tumor suppression. *Cancer Cell*, 2014, 26: 106-20
- [86] Sheng X, You Q, Zhu H, et al. Bacterial effector NleL promotes enterohemorrhagic *E. coli*-induced attaching and effacing lesions by ubiquitylating and inactivating JNK. *PLoS Pathog*, 2017, 13: e1006534
- [87] Emmerich CH, Ordureau A, Strickson S, et al. Activation of the canonical IKK complex by K63/M1-linked hybrid ubiquitin chains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 15247-52
- [88] Ronau JA, Beckmann JF, Hochstrasser M. Substrate specificity of the ubiquitin and Ubl proteases. *Cell Res*, 2016, 26: 441-56
- [89] Ordureau A, Sarraf SA, Duda DM, et al. Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis. *Mol Cell*, 2014, 56: 360-75
- [90] Wauer T, Swatek KN, Wagstaff JL, et al. Ubiquitin Ser65 phosphorylation affects ubiquitin structure, chain assembly and hydrolysis. *EMBO J*, 2015, 34: 307-25
- [91] Ohtake F, Tsuchiya H. The emerging complexity of ubiquitin architecture. *J Biochem*, 2017, 161: 125-33