

综述

泛素、泛素链和蛋白质泛素化研究进展

兰秋艳^{1,2}, 高媛², 李衍常², 洪学传¹, 徐平^{1,2}

1 武汉大学药学院 组合生物合成与新药发现教育部重点实验室, 湖北 武汉 430072

2 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 国家蛋白质科学中心 (北京) 北京蛋白质组研究中心 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 102206

兰秋艳, 高媛, 李衍常, 等. 泛素、泛素链和蛋白质泛素化研究进展. 生物工程学报, 2016, 32(1): 14-30.

Lan QY, Gao Y, Li YC, et al. Progress in ubiquitin, ubiquitin chain and protein ubiquitination. Chin J Biotech, 2016, 32(1): 14-30.

摘要: 蛋白质泛素化是以泛素单体和泛素链作为信号分子, 共价修饰细胞内其他蛋白质的一种翻译后修饰形式。不同蛋白质底物、同一底物的不同氨基酸修饰位点以及同一位点上泛素链连接方式的不同均可导致细胞效应的差异。蛋白质泛素化在真核细胞内广泛存在, 除了介导蛋白质的 26S 蛋白酶体降解途径之外, 还广泛参与了基因转录、蛋白质翻译、信号传导、细胞周期控制以及生长发育等几乎所有的生命活动过程。泛素链的形成及其修饰过程的任何失调均可导致生物体内环境的紊乱, 从而产生严重的疾病。文中结合实验室研究, 综述了泛素的发现历史、基因特点、晶体结构, 特别是泛素链的组装过程、结构、功能以及与人类相关疾病关系的新进展, 可为这些疾病的治疗靶点和药物靶标的研究提供思路。

关键词: 泛素, 泛素链, 晶体结构, 赖氨酸残基, 疾病

Received: March 29, 2015; **Accepted:** June 4, 2015

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (Nos. 2011CB910600, 2013CB911200), National High Technology Research and Development Program (863 Program) (Nos. SS2012AA020502, 2011AA02A114), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31070673, 31170780), National Mega Projects for Key Infectious Diseases (No. 2013zx10003002), Key Projects in the National Science & Technology Pillar Program (No. 2012BAF14B00).

Corresponding author: Ping Xu. Tel: +86-10-83147777-1314; Fax: +86-10-80705155; E-mail: xupingghy@gmail.com

国家重点基础研究计划 (973 计划) (Nos. 2011CB910600, 2013CB911200), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (Nos. SS2012AA020502, 2011AA02A114), 国家自然科学基金 (Nos. 31070673, 31170780), 国家传染病重大专项 (No. 2013zx10003002), 国家科技支撑计划 (No. 2012BAF14B00) 资助。

Progress in ubiquitin, ubiquitin chain and protein ubiquitination

Qiuyan Lan^{1,2}, Yuan Gao², Yanchang Li², Xuechuan Hong¹, and Ping Xu^{1,2}

1 Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery (Wuhan University), Ministry of Education, Wuhan University School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan 430072, Hubei, China

2 State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing Institute of Radiation Medicine, National Center for Protein Sciences Beijing, Beijing 102206, China

Abstract: Protein ubiquitination is one of the most important and widely exist protein post-translational modifications in eukaryotic cells, which takes the ubiquitin and ubiquitin chains as signal molecules to covalently modify other protein substrates. It plays an important roles in the control of almost all of the life processes, including gene transcription and translation, signal transduction and cell-cycle progression, besides classical 26S proteasome degradation pathway. Varied modification sites in the same substrates as well as different types of ubiquitin linkages in the same modification sites contain different structural information, which conduct different signal or even determine the fate of the protein substrates in the cell. Any abnormalities in ubiquitin chain formation or its modification process may cause severe problem in maintaining the balance of intracellular environment and finally result in serious health problem of human being. In this review, we discussed the discovery, genetic characteristics and the crystal structure of the ubiquitin. We also emphasized the recent progresses of the assembly processes, structure and their biological function of ubiquitin chains. The relationship between the dysregulation and related human diseases has also been discussed. These progress will shed light on the complexity of proteome, which may also provide tools in the new drug research and development processes.

Keywords: ubiquitin, ubiquitin chains, crystal structure, lysine, diseases

蛋白质是细胞的主要组成成分，也是细胞功能的直接执行者。蛋白质功能的发挥依赖于细胞内多样的蛋白质翻译后修饰，其中泛素化修饰在真核细胞内普遍存在。已知人体内参与蛋白质泛素化的泛素激活酶 E1、泛素耦联酶 E2、泛素连接酶 E3 以及脱泛素化酶 DUB 等的编码基因数目超过 1 000 种，远多于细胞内负责重要生物学功能的蛋白质磷酸化相关激酶和磷酸酶的基因数量^[1-3]，预示着这种翻译后修饰的重要性和调控的复杂性。在泛素化蛋白质的结构上，由于底物蛋白上存在多个赖氨酸残基，这些赖氨酸位点中的一个或多个可同时被泛素修饰，形成了蛋白质翻译后修饰的宏观不均一

性。即使在同一修饰位点也可形成不同赖氨酸参与的同质泛素链或者混合泛素链的修饰形式；而进一步深入研究还发现泛素分子的 N 端（甲硫氨酸的游离氨基）也可发生泛素化修饰形成线性泛素化链，从而产生复杂多样的蛋白质泛素化修饰中的微观不均一性^[4-5]。这些都从不同侧面反映了真核细胞中蛋白质泛素化修饰的普遍性、结构的多样性、调控的复杂性及功能的重要性^[2]。

由于蛋白质的泛素化修饰影响甚至决定着被修饰蛋白质的命运，因此泛素化及其信号途径的任何突变或失调均可引发包括癌症、神经退行性疾病在内的多种严重而且难治愈的人类

疾病。因此深入研究泛素及其修饰系统, 鉴定泛素化底物蛋白, 了解其调控机制对于对相关疾病分子机制的理解和治疗具有重要意义。本文就泛素和泛素链的结构、功能及泛素化修饰的多样性和复杂性等方面进行综述, 并结合本实验室现有工作, 介绍国际上相关方面研究进展和发展趋势。

1 泛素的发现

泛素最初在分离促胸腺生成素时在胸腺中被发现, 并被认为是普遍存在于真核生物中的免疫生成性多肽 UBIP。不同于促胸腺生成素仅促进 T 细胞分化的作用, 泛素能同时促进 T 细胞和 B 细胞的分化^[6]。随后 Goldknopf 和 Busch 发现泛素 C 末端可共价连接到组蛋白 H2A 赖氨酸残基的 ϵ -氨基上^[7], 揭示了泛素可修饰其他蛋白质的特性。1978 年, Hershko、Ciechanover 以及他们的同事发现兔网织红细胞的无细胞裂解物具有依赖于 ATP 的降解某些底物蛋白质的功能^[8]。随后 Hough 及其合作者从这种兔网织红细胞裂解物中成功地纯化到了能够降解多聚泛素-蛋白偶联物的 26S 蛋白酶体^[9], 完善了泛素-蛋白酶体系统学说。而泛素-蛋白酶体在系列生理过程中的重要作用及其分子机制是由 Finely 及其合作者阐明的^[10], 即泛素能够修饰底物蛋白, 并以此为信号将底物引导到蛋白酶体进行特异性降解, 从而维持机体内环境的稳态^[11]。

2 高度保守的泛素基因及其编码的蛋白质序列

泛素这种普遍存在于真核生物体内的小蛋

白在编码基因的结构和序列上都是非常保守的。已知在细胞中编码泛素蛋白的基因有多个, 且在不同的物种中这些基因或基因簇在染色体上的位置各异。在不同的生理状态下, 这些由不同基因座编码的泛素基因可特异地开启, 并按照要求表达特定量的泛素蛋白, 以满足不同生理条件的需要。

表 1 展示了泛素基因在不同物种中的分布情况。其中拟南芥中的泛素编码基因最多, 高达 14 种, 它们在染色体上的分布也最为分散。这些基因按照序列特点可分为多聚泛素编码基因、类泛素基因以及泛素延伸基因 3 类。如 *ubq3*、*ubq4*、*ubq10*、*ubq11* 和 *ubq14* 等多聚泛素基因都包含 228 bp 的泛素串联重复区域, 但在同义替代、泛素编码区域的数量、非泛素部分 C 末端氨基酸以及染色体定位等方面存在一定的差异, 而类泛素基因 *ubq7*、*ubq8*、*ubq9* 和 *ubq12* 也包含串联重复的泛素编码区域, 但是至少每个重复基因编码一个发生了氨基酸替换的蛋白^[12]。

除拟南芥外, 大多数生物的泛素编码基因通常表达成多聚泛素前体、N 端泛素基团分别与核糖体多肽 L40 或 S27 共融合表达的 Ub_{L40} 和 Ub_{S27} 融合蛋白 (图 1) 等 3 种不同的前体结构。在酵母中, 这几种泛素前体分别为由 *ubi1*、*ubi2* 和 *ubi3* 产生的融合蛋白以及由 *ubi4* 产生的多聚泛素链。有趣的是这 4 个基因都含有不同的内含子序列, 其中 *ubi1*、*ubi2*、*ubi3* 和 *ubi4* 在 5'端和 3'端均有内含子的分布, 但这些内含子序列相似度不高, 表明它们可能具有不同的调节功能。*ubi1* 位于酵母基因组 IX 号染色体上, *ubi2* 位于 XI 号染色体上。这两个基因的表达产物均含一个泛素多肽和一个完全相同的含 52 个

表 1 不同物种中泛素基因座位分布

Table 1 Ubiquitin genes and their loci in varied species

Species	Gene	Chromosome
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>ubi1</i>	IX
	<i>ubi2</i>	XI
	<i>ubi3, ubi4</i>	XII
	<i>ubq12, ubq13</i>	I
	<i>ubq2, ubq6, ubq7</i>	II
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>ubq1, ubq5, ubq8</i>	III
	<i>ubq10, ubq11, ubq14</i>	IV
	<i>ubq3, ubq4, ubq9</i>	V
	<i>ubiquitin-5E</i>	x
<i>Drosophila</i>	<i>ubiquitin-63E</i>	3L
	<i>Polyubiquitin</i>	Unknown
	<i>ubiquitin-60S ribosomal protein L40</i>	Unknown
Nematode	<i>ubq-1, ubq-2</i>	III
	<i>ubc</i>	V
	<i>uba52a</i>	VIII
<i>Musculus</i>	<i>rps27a, ubb</i>	XI
	<i>mCG1048340</i>	XIV
	<i>ubiquitin C</i>	XII
	<i>Ubb</i>	XVII
<i>Homo sapiens</i>	<i>ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1,</i> <i>ubiquitin-60S ribosomal protein L40 precursor</i>	XIX

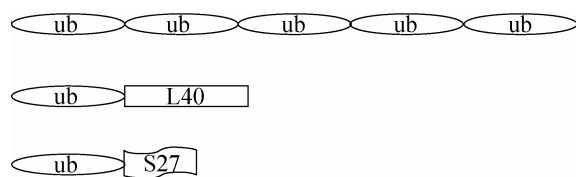
图 1 泛素分子不同前体结构的示意图^[16]

Fig. 1 Schematic representation of different ubiquitin precursor's structures^[16].

残基的前体肽。*ubi3* 位于 XII 号染色体上，编码一个泛素多肽和一个包含了 76 个氨基酸残基的前体肽，且这一前体肽与 Ubi1 和 Ubi2 前体肽的氨基酸序列相似性较低^[13]。*ubi4* 也位于酵母基因组的 XII 号染色体上，编码一个由 5 个泛素基团首尾相连而成的多聚泛素。该多聚泛素是高温、饥饿或氨基酸类似物刺激等应激条件下

泛素的主要供应者^[14]。这 4 种基因都能在指数生长的细胞中表达，但在稳定期中仅 *ubi3* 和 *ubi4* 可表达。

这 4 个基因编码的泛素的氨基酸序列完全相同，但它们各有不同的尾部序列。*ubi1*、*ubi2* 和 *ubi3* 的尾部片段含有预测的 DNA 结合区域以及类 TFIIIA 核酸结合区域，因此这些尾部区域可能与特定 DNA 结合。另有研究者认为泛素单体本身作为一种修饰泛素分子的蛋白，而未处理的泛素前体则可能是蛋白水解作用的一种调节信号^[13]。这些泛素融合蛋白基因表达的蛋白可被特异性的内肽酶切开，释放出序列一致的泛素分子，进入细胞内游离的泛素库，供机体使用。而与核糖体蛋白融合表达的泛素单体

不仅提供了细胞必需的泛素分子，还作为伴侣蛋白加速核糖体的组装，参与蛋白质合成机器的调控^[15]。

尽管细胞内编码泛素的基因众多，但这一由 76 个氨基酸组成的蛋白质经过长时间的生物进化仍能在氨基酸序列上高度保守，这与该蛋白质在细胞内的重要功能相符。研究显示这些泛素分子在同种生物中的氨基酸序列完全一致，即使在不同的物种如芽殖酵母、植物和人体中也仅有 4 个氨基酸存在差异 (图 2)。

不仅泛素本身的氨基酸序列保守，多聚泛素前体和 Ub_{L40} 的氨基酸序列在大多数物种中也是完全一致的，说明编码这两种蛋白的基因座之间存在频繁的重组事件。通过对编码这些泛素基因的密码子分析，研究者发现 Ub_{S27} 基因座的重组并不像多聚泛素或 Ub_{L40} 基因座那样均匀。对比预测的 Ub_{S27} 的二级结构与人类泛素分子的 NMR 结构显示泛素蛋白的整体结构似乎比序列更加保守，推测泛素结构限制了对 Ub_{S27} 序列退化的容忍程度。进一步研究推测多聚泛素基因座很可能作为一种重组的供体或者底物以维持非等位泛素基因的稳定，同时也为新的类泛素结构的产生提供序列源泉。比较泛素和类泛素蛋白质的序列，泛素蛋白中 76 个氨基酸有 60 个可发生替换形成类泛素蛋白，但新形成的类泛素蛋白分子的功能却没有发生改

变，因此泛素折叠的结构需要而不是泛素蛋白的功能需要促成了泛素家族进化上的保守性^[16]。

3 泛素蛋白质的结构

泛素以一种特殊的由 5 个 β 折叠包围着一个 α 螺旋的形式存在。这种 SSHSSS 的结构在类泛素化蛋白中也存在^[16]。泛素分子表面存在几个对于其发挥生物学功能不可或缺的重要的疏水表面，其中由 Ile44、Leu8、Val70 以及 His68 组成的疏水口袋介导泛素单体与蛋白酶体和大多数泛素结合结构域 (UBDs) 结合，且这些保守序列对于细胞分裂以及蛋白酶体降解功能的发挥是必需的^[17-18]。以 Ile36 为中心，加上 Leu71 和 Leu73 形成的疏水表面介导了与泛素链的相互作用以及与 HECT 类泛素连接酶、去泛素化酶^[19]和泛素结合结构域^[20]的识别。由 Gln2、Phe4 和 Thr12 组成的表面可能参与转运以及与泛素特异性蛋白酶结构域和 UBAN 结构域的相互作用^[21]。而由 Thr12、Thr14、Glu34、Lys6 和 Lys11 组成的 TEK-box 对于有丝分裂相关蛋白的降解是必需的^[22]。

4 蛋白质的泛素化修饰和泛素链的特异性

泛素蛋白本身可作为信号分子，经由泛素激活酶 E1、泛素偶联酶 E2 和泛素连接酶 E3 的级联反应共价修饰到底物蛋白质的赖氨酸残基

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	MQIFVKTLTGKTITLEVESSDTIDNVKSKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYN	60
Plant		MQIFVKTLTGKTITLEVESSDTIDNVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLADYN	
<i>Homo sapiens</i>		MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYN	
	61	IQKESTLHLVLRRLGG	76
		IQKESTLHLVLRRLGG	
		IQKESTLHLVLRRLGG	

图 2 不同物种中泛素氨基酸序列比对结果

Fig. 2 Ubiquitin amino acids sequence alignment result of different species.

上,由此实现蛋白质的泛素化。单个泛素分子修饰底物蛋白上的单个赖氨酸残基,可形成单泛素化修饰。多个泛素分子修饰底物蛋白上的多个赖氨酸残基,可形成多泛素化修饰。由于泛素分子本身携带有 7 个赖氨酸残基,已经共价修饰到底物蛋白上的泛素分子的赖氨酸残基还可继续发生泛素化修饰,形成泛素链。与此对应,泛素分子 N 端的甲硫氨酸也有一个自由的氨基,该氨基可串联泛素分子,形成线性泛素链。因此细胞中可存在单泛素化、多泛素化以及 8 类不同形式的同质泛素链修饰。如果一个泛素链上结合泛素本身不同的赖氨酸残基,形成混合或分支泛素链,则进一步增加了泛素链的复杂性(图 3)。定量蛋白质组学研究表明上述泛素链在细胞中均广泛存在^[23],但其浓度存在一定的差异。在对数生长期酵母细胞中,七类由赖氨酸连接的同质泛素链 K6 K11

K27 K29 K33 K48 K63 的百分比约为 11 28 9 3 4 29 16^[24]。

5 泛素链的空间结构

不同的赖氨酸连接形成的泛素链空间结构各异。同质 K48 泛素链彼此紧紧包裹,产生一种紧凑的球状构象^[25]。这种链通过与受体蛋白作用,将蛋白导向蛋白酶体并进行特异性降解。研究表明至少需要 4 个通过 K48 连接的泛素组成的泛素链才能将底物蛋白导向蛋白酶体^[26]。泛素单体表面的疏水性残基 Leu8、Ile44 和 Val70 对于蛋白酶体识别 K48 连接的泛素链十分重要^[27]。在近中性 pH (pH 6.7) 条件下,该泛素链的整体结构非常类似一种关闭的形式,其 Ile44 疏水口袋彼此相对^[26-28];而 K6 和 K11 连接的泛素二聚体和泛素四聚体则呈现紧凑的空间结构。由于缺少分子间相互作用,Leu8、Ile44

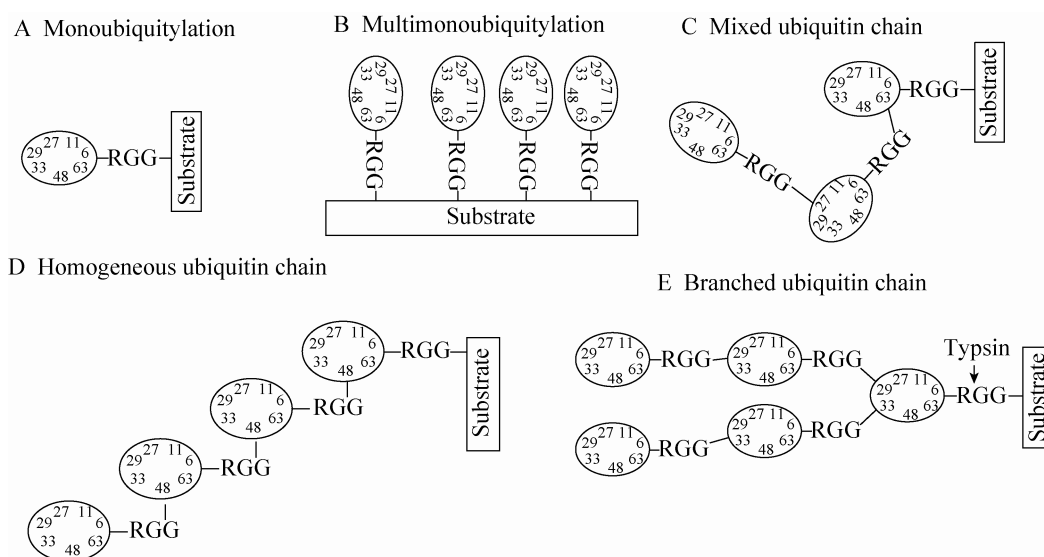


图 3 不同泛素链修饰的示意图

Fig. 3 Schematic representation of the different Ub modifications.

和 Val70 形成的疏水性口袋暴露在外,这有利于识别 NEMO 等伴侣蛋白^[4,20]。K11 连接的泛素链也存在一定的结构灵活性,即在 K11 连接的二聚泛素链上有不对称的表面基团,并覆盖着其 α 螺旋,或者泛素单体通过 Ile36 口袋对称地相互作用^[29-30]。

在泛素结构中,M1 和 K63 位的残基在空间上接近,因此 M1 和 K63 连接的泛素二聚体有相似但不完全相同的空间构象。它们的泛素间因没有任何联系从而都采取等效开放构象^[31]。大部分含有泛素结合结构域的结合伴侣通过这种泛素链识别泛素基团之间的距离和灵活性^[32]。K27、K29、K33 泛素链由于丰度低,富集困难,针对其晶体结构的研究还较少。

多样的泛素间连接形式形成了多样的泛素链结构。这些多样的结构可与相关蛋白的结构域发生特异而多样的相互作用,从而将底物蛋白导向蛋白酶体、溶酶体或其他信号通路,形成复杂的信号网络,最终调控细胞的重要生命活动。

6 不同泛素链的组装方式及其生物学功能

6.1 K48 泛素链

以 Sic1 (Cyclin 依赖的激酶抑制剂) 为例,其泛素化可分为两步。首先是在 cullin-RING 泛素连接酶 SCF^{Cdc4} 与其泛素耦联酶 Cdc34 作用下,添加第一个泛素到 Sic1 上。随后快速延伸 K48 连接的泛素链。Cdc34 酸性环偏好蛋白质底物泛素化中的 K48 连接的泛素链,攻击 SCF 结合的 Cdc34-泛素硫酯从而持续合成 K48 连接的泛素链^[33]。

和泛素链合成的严格受控相似,泛素链的

降解也具有一定的特异性。在酵母中脱泛素化酶 Ubp15 与人的 USP7 同源,可快速移除泛素单体或二聚体以及 K63 连接的长泛素链,但移除 K48 连接的泛素链非常慢。这种对长泛素链的耐受性使 K48 链修饰的底物处于游离状态,直到某种泛素连接酶促使其发生降解^[34]。相反,Ubp12 很容易从末端开始裂解所有的泛素链。

K48 泛素链的主要作用是负反馈调节蛋白质稳定性。已知 K48 泛素链的缺乏对细胞是致死的^[24]。该泛素链通过与受体蛋白作用,将蛋白导向蛋白酶体降解^[35-36]。K48 连接的泛素链也参与 DNA 损伤应答。当 DNA 损伤时,RNF8 和 RNF168 泛素连接酶转移到 DNA 损伤位点,介导蛋白 JMJD2A、JMJD2B 和 L3MBTL1 的泛素化,一方面引导 JMJD2A 和 JMJD2B 到蛋白酶体降解,从而解除由于 JMJD2A 和 JMJD2B 结合在甲基化的组蛋白 H4K20 上而造成的 53BP1 (肿瘤抑制因子 p53 结合蛋白 1) 无法结合,促进 CHK2 的高效磷酸化,并激活 p53。另一方面 L3MBTL1 的泛素化会促进 VCP/p97 和 RNF8/168 依赖的染色体提取效应^[37]。

6.2 K63 泛素链

大多数情况下,合成 K63 连接的多聚泛素链依赖于一个额外的蛋白——UEV。该蛋白与泛素耦联酶 Ubc13 形成异二聚体^[38]。E1 催化硫醇转移反应将供体泛素加载到 Ubc13 的半胱氨酸活性位点上,此后第二个泛素单体加到 UEV 和 E2 上,第 63 位的赖氨酸侧链靠近供体泛素,并与 Ubc13 形成硫酯键。由此,K63 能够攻击硫酯键使供体泛素从 Ubc13 的活性位点上转移到受体泛素的第 63 位赖氨酸侧链上,形成异肽键。最后供体泛素转移到受体位点成为受体泛素,

继续后续的泛素化。经过多个循环可形成 K63 连接的泛素链^[39]。另外含 JAMM/MPN⁺ 结构的脱泛素化酶对 K63 泛素链的共有特异性也在实验中得到了证明^[40]。

研究还发现哺乳动物细胞中存在一种可溶性因子 ESCRT0 以及它的组件 STAM 和 Hrs, 可选择性地结合 K63 连接的泛素链, 阻止其与蛋白酶体结合, 并将底物蛋白特异地定位到溶酶体上^[41]。因此, K63 泛素链在哺乳动物细胞中主要参与调节 DNA 损伤修复、线粒体遗传^[42]、核糖体和 NF- κ B 的功能^[23,43-45]等非蛋白水解信号途径, 并与遗传性帕金森病相关^[46]。但在芽殖酵母中, HECT 类泛素连接酶 Rsp5 能以 K63 连接的泛素链修饰 Mga2-p120, 将其转位到蛋白酶体中完成降解过程。同时该研究也发现了蛋白酶体对长的 K63 泛素链的偏好性^[47]。

以亨廷顿舞蹈症为例, 在年轻的亨廷顿蛋白基因敲入鼠中, K48 泛素链特异性泛素连接酶 Ube3a (也称 E6AP) 含量很高, 它以 K48 泛素链修饰突变的亨廷顿蛋白, 并将其引导到蛋白酶体, 进行特异性降解。随着年龄的增长, Ube3a 的含量逐渐减少, 蛋白酶体能够有效降解的突变亨廷顿蛋白逐渐减少, 导致突变亨廷顿蛋白被 K63 泛素链修饰, 进而发生蛋白质聚集, 出现选择性神经退行性疾病, 并最终形成亨廷顿舞蹈症^[48]。

6.3 K11 泛素链

K11 连接的泛素链在体内和体外均作为蛋白酶体的高效靶向信号^[49-50]。不同于其他链, K11 泛素链的高效合成依赖于泛素表面的 TEK-box。有意思的是 APC/C 底物中同样发现了同源的 TEK-box 结构, 它可促进成核反应。

拓扑结构研究发现 APC/C 是一种 Ring finger 类泛素连接酶^[51], 猜测 APC/C 识别底物和泛素表面相同的 TEK-box 基序, 以此促进第一个泛素到底物赖氨酸残基的转移。之后 APC/C 与其特异性的泛素耦联酶 UbcH10 借助泛素表面的 TEK-box 高效特异地组装 K11 链, 从而实现严格的细胞周期调控^[22]。

除泛素连接酶外, 近年也有研究鉴定到了 K11 泛素链的其他特异性底物, 如泛素耦联酶 Ubc6。该酶主要合成 K11 泛素链, 且在内质网相关降解途径中发挥作用^[24]。另外 OTU 家族的去泛素化酶 Cezanne 特异性地对 K11 泛素链修饰的底物进行去泛素化^[29], 再次说明了 DUB 对泛素链的特异性。

6.4 K6 泛素链

K6 连接的泛素链可由 Rad6 (酵母直接同源 UbcH2) 催化形成。有趣的是在合适的 E3 存在时, Rad6 也可以主要催化 K48 连接的泛素链合成。类似的情况在 p53 泛素化时也会发生。当存在 E6AP 时, UbcH5c 主要催化 p53 发生 K48 泛素链修饰; 但是当 BRCA1/BARD1 存在时, UbcH5c 主要催化生成 K6 泛素链^[52]。此外, 红褐蛋白环指蛋白 1 (MGRN1) 能以 K6 泛素链修饰 α -tubulin^[53]。除泛素化修饰的特异性外, 最新研究表明去泛素化酶 USP8 能特异性消化 Parkin 蛋白上 K6 泛素链, 从而招募 Parkin 到去极化的线粒体中, 最后经线粒体自噬得以消除^[54]。

K6 连接的泛素链的生理功能至今不甚明了。已有的研究表明 K6 泛素链能够修饰一种肿瘤抑制因子 BRCA1。BRCA1 本身可与 BARD1 组成异二聚体, 具有 E3 泛素连接酶的活性, 催化泛素链的形成, 并参与包括 DNA 修复、转录

调节以及细胞周期检验点控制等^[55]多种细胞过程。BRCA1 的突变可能造成遗传性胸癌或卵巢癌^[56]等多种人类严重疾病。虽然 BRCA1 泛素化后续的信号传递机制尚不清楚,但是这足以说明 K6 连接的泛素链对机体正常生命活动的重要性。

6.5 K27、29、33 泛素链

由于 K27/29/33 连接的泛素链在生物体内的含量偏低,富集困难,因此针对这几种泛素链的研究还较少。但是仅有的一些研究已经表明这几种泛素链在生命活动中也扮演着重要的角色。

泛素连接酶 TRAF6 在组装 K63 连接的泛素链中发挥作用,但也促进 K6、K27 和 K29 泛素链在帕金森疾病相关蛋白 DJ-1 和 α -synuclein 上的组装,从而促进它们在细胞质中的积累。在宿主与病原相互作用时,两种不同的 K27 泛素链修饰 NF- κ B 调节亚基 IFF γ (也叫 NEMO)。在病毒感染时,泛素连接酶 TRIM23 添加 K27 泛素链到 IFF γ 上,激活 IFF γ 并产生抗病毒干扰素 β 。相反,当志贺氏杆菌感染时,细菌泛素连接酶 IpaH9.8 添加另一种 K27 泛素链到 IFF γ 上,促进其降解,从而抑制 NF- κ B 信号和宿主防御应答^[57-58]。转录调节蛋白 Jun 的半衰期也严格地受到 K27 泛素链的调控。在多个类型的细胞中很多泛素连接酶能特异地催化 Jun 发生 K27 泛素链修饰,进而经由 TSG101 和 HRS 的识别将其转位到溶酶体,完成蛋白质自身的降解,以应答不同的刺激^[59]。此外,最新的研究还发现 K27 连接的泛素链也在抑制自身免疫性疾病中发挥作用^[60]。

Deltex (DTX) 和 AIP4 是果蝇 *deltex* 与其抑

制基因的人类直系同源基因,参与抑制 Notch 信号途径。这两种基因分别编码 RING-H2 和 HECT 类泛素连接酶。研究发现这两种分子相互影响,并且部分共定位于内吞膜泡中。AIP4 主要组装 K29 连接的泛素链,并将自身与 DTX 泛素化,引导 DTX 靶向溶酶体降解,表明 K29 连接形式与溶酶体降解和内吞作用相关^[61]。另外 K29 连接的泛素链也参与蛋白酶体靶向信号,与招募底物蛋白解折叠伴侣蛋白 (如 VCP/Cdc48p) 的过程相关^[62]。

最近研究发现一种新的泛素连接酶 CUL3-KLHL20 可催化 CRN7 的 K33 泛素链修饰。修饰后的 CRN7 定位于高尔基体网反面,从而稳定 F 肌动蛋白,并促进 post-Golgi 转运^[63-64]。在 T 细胞中也发现了 K33 的泛素链。这些 K33 泛素链是由泛素连接酶 Cbl-b 和 Itch 共同催化 TCR- ζ 的泛素化修饰形成的,可抑制 TCR- ζ 信号的磷酸化及与酪氨酸激酶 Zap-70 的联系,最终约束 TCR 信号^[65]。

6.6 线性泛素链

泛素分子 N 端的甲硫氨酸残基 (M1) 也可与另一个泛素分子 C 末端的羧基共价结合,形成线性泛素链^[31]。一个 600 kDa 的 E3 复合物 LUBAC 负责形成线性泛素链。该复合体包括泛素连接酶 HOIL-1、HOIL-1 相互作用蛋白 HOIP 和 SHARPIN 等三部分。由于 HOIL-1 含有与泛素相互作用的结构域 UBL,而 HOIP 上有与蛋白酶体结合的结构域 UBA,推测 LUBAC 具有将靶蛋白导向蛋白酶体降解的作用^[66]。LUBAC 功能多样,不仅参与炎症抑制和免疫应答调节^[67],还在炎症和固有免疫中参与 NOD2 信号传递^[68]、NF- κ B 信号激活^[69]、TNF 介导的基因

诱导^[70]、负反馈调节 RIG-1 和 TRIM25 介导的 1 型干扰素感应^[71]以及巨噬细胞 Toll 样受体 2 (TLR2) 应答^[72]等多种信号传递过程。

现今研究最清楚的是其在 TNF 受体 1 (TNFR1) 中的作用。当有 TNF 信号刺激时, TNF 与 TNFR1 交联形成 TNF-RSC, 交联的 TNFR1 招募 TNFR1 相关的死亡结构域 (TRADD) 和受体相互作用蛋白 PIP1、TNFR 相关因子 (TRAF2) 被招募到 TRADD, cIAP (细胞凋亡抑制蛋白) 1 和 2 转移到 TRAF2, LUBAC 转移到 Ciap (有 E3 连接酶活性), 并形成泛素化。LUBAC 随后以线性泛素链修饰 RIP1 和 NF- κ B 必需的调节因子 NEMO。cIAPs 和 LUBAC 使用不同的泛素链赋予 TNF-RSC 不同的基因活化功能, 使 NF- κ B 激酶 (IKK) 和 TAK/TAB (TNF- β 活化激酶 1 和 TAK1 结合蛋白) 复合物在 TNF-RSC 中实现正确定位和差异调节^[73]。

而最新的研究表明在骨髓衍生巨噬细胞中一种新的 HOIL-1L 作为 NLRP3/ASC 炎性小体活化的必需调节子。当 NLRP3 受到刺激时, NLRP3 炎性小体适配器蛋白凋亡相关斑点样蛋白 ASC 发生线性泛素链修饰, 从而在细胞质中由分散的状态转变为明显的区域分布。此外 LUBAC 能够活化 caspase 1 从而以一种独立于 NF- κ B 的形式促进 IL-1 β 的形成。这说明 LUBAC 也可以作为固有免疫的一种调节因子^[74-75]。

6.7 混合和分支泛素链

相对于同质泛素链, 混合和分支泛素链的组装和拓扑学结构更加复杂, 对其进行研究也更加困难。但已有的结果显示混合和分支泛素链同样具有重要的生物学功能。

目前对于混合和分支泛素链的组装机制研

究比较清楚的是 APC/C 组装的分支泛素链。首先 Ube2C 以含 K11、K48、K63 的短泛素链修饰 APC/C 的底物, 之后 Ube2S 添加大约 6 个 K11 连接的泛素分子到这些短泛素链上, 从而在底物上形成分支泛素链。这些分支泛素链能快速地将底物从 APC/C 复合物中移出, 导向蛋白酶体, 发生降解。这一过程能介导包括 Cdc20 在内的许多 APC/C 底物的降解, 从而促使纺锤体检验点的去组装, 使细胞退出有丝分裂^[76-77]。另外, Kaposi's 肉瘤相关疱疹病毒 K5 基因产物也能以 K11 和 K63 连接的混合泛素链修饰组织相容性复合物 MHC I, 从而促进 MHC I 的内吞作用^[78]。而 K63 和 M1 连接的混合泛素链能修饰白细胞介素 1 相关激酶 IRAK1、类 Toll 受体 1/2 激动剂 1/2、髓样分化初反应基因 88 MyD88 以及 IRAK4 等, 从而活化 I κ B 激酶 (IKK) 复合物^[79]。

6.8 单泛素化修饰

单泛素化并不像通常的多聚泛素链一样将底物蛋白导向蛋白酶体进行降解, 而是受体内化、膜泡分选^[23]、转录激活、DNA 修复^[80]、Ras 活化^[81]和基因沉默的信号^[82]。最先鉴定到的泛素化组蛋白 H2A 即是单泛素化蛋白, 但这种修饰事件的功能至今未证明。在酵母中 H2B 是唯一已知的存在泛素化修饰的组蛋白。在组蛋白乙酰化或泛素化缺陷的突变中, 一种 SWI/SNF 染色体重构因子定位到 GAL1 上游激活序列, 但是在二者皆突变时不会出现。这说明 H3 的乙酰化与 H2B 的泛素化在转录激活中存在相同的功能^[83]。另外 H3 第 4 位赖氨酸的甲基化与染色体沉默相关。通过突变抑制 Rad6 介导的 H2B 的第 123 位赖氨酸的泛素化, 可使 Set1 介导的

组蛋白 H3 第 4 位的赖氨酸残基无法发生甲基化, 从而造成染色体端粒沉默^[84]。此外, H2B 的 C 末端螺旋参与了核小体间的相互作用。因此 H2B 的 C 末端第 123 位赖氨酸残基的泛素化可能破坏这些核小体间的相互作用, 改变局部和整体的染色体折叠形式, 从而影响基因的表达^[85]。

7 泛素突变对机体生存能力的影响

Finley 通过同源重组的方式以特定标记基因 *HIS*、*TRP1*、*LEU* 分别替换 *UBI1*、*UBI2* 和 *UBI4* 等泛素编码基因, 并突变 *UBI3* 基因中编码泛素的部分, 形成酵母染色体上泛素基因完全缺失的菌株。在此基础上转化进一个携带 CUP1 启动子驱动的泛素基因的质粒, 由此成功构建了与野生型酵母细胞泛素表达水平相当的酵母菌株。该工程菌株的构建大大简化了酵母细胞中泛素基因的进一步改造^[14-15,86]。

研究发现 K6、K11、K27、K29、K33 等非常规赖氨酸残基连接的泛素链在体内均广泛存在, 并且都可将底物蛋白质靶向蛋白酶体降解^[41]。但这些多样的连接形式又有不同的冗余功能, 从而造成了泛素修饰影响的广泛性和功能多样性。突变研究表明 K48R 的突变无法维持酵母的生存, 且只保留第 48 位赖氨酸也不足以维持酵母的生存。而保留 K29、K33 和 K48 三个赖氨酸的泛素突变体尽管可维持酵母的生长, 但会导致严重的生长阻滞。各种泛素突变株在 YPD 培养基中的生长速率为: WT=R11=R11R63>R27>R11R27R63>R6R11R27R63, 这表明突变对细胞增殖有一种累积的负效应^[24]。

泛素分子内部含有由 13 个脂肪族氨基酸形成的疏水核心和两个极性氨基酸 (Thr7 和 Gln41) 组成的溶剂难接近区。为了检测这些内

部的氨基酸如何影响蛋白功能, 有研究者以丙氨酸扫描诱变策略测定丙氨酸替换突变对于酵母生长的影响。他们发现除 I30A 和 L43A 突变外的其余 13 种氨基酸突变对酵母生长没有毒性, 而 I30A 突变会造成泛素化蛋白降解的缺陷, L43A 突变会造成细胞中游离泛素链的缺失, 二者都造成了蛋白水解作用的缺陷, 从而导致细胞无法生长^[87-88]。

8 泛素-蛋白酶体系统失调和人类疾病

蛋白质泛素化修饰在细胞周期、细胞分裂、细胞分化、细胞发育、对细胞内外刺激的应答、神经网络形态的形成、细胞表面受体调节、离子通道和分泌途径、DNA 修复、转录调节和基因沉默、长时记忆、生物周期节律、免疫调节、炎症应答以及细胞器的形成等细胞生命活动的方方面面均起着重要的作用^[35,89]。这些过程的失调可引发如帕金森病、阿尔茨海默症、亨廷顿症、普里昂症以及肌萎缩性脊髓侧索硬化症等多种严重的人类疾病^[90]。

Uba6 (E1)-Use1 (E2) 介导底物蛋白泛素化的级联反应, 通过调节这些蛋白的特异性降解实现对鼠胚胎发育的有效调控。如在鼠胚胎发育时期缺失 Uba6 会造成海马和杏仁体神经元结构的改变, 树突刺密度的减少以及多种行为的紊乱。在 Uba6 缺陷鼠中, 虽然 Ube3a 的底物 Arc 的量减少了, 但与树突刺功能相关的 Ube3a 和 Shank3 在杏仁体中的水平得到了提升。因此 Uba6 和 Use1 在鼠的胚胎纤维母细胞中促进 Ube3a 发生 K48 泛素链修饰, 从而促进其转运到蛋白酶体降解。该现象在人细胞模型的研究也得到了证实, 显示了这一分子对于胚胎发育的重要性^[91]。

另外,去泛素化酶 CYLD 与家族性圆柱瘤密切相关。CYLD 是一种肿瘤抑制因子,可对非 K48 泛素链发挥去泛素化作用。正常情况下,当受体活化时,会引发 TRAF2、TRAF6 和 NEMO (IKK γ) 亚基发生 K63 泛素链修饰,从而活化 IKK 复合物,磷酸化 I κ B。随后 I κ B 被 K48 泛素链修饰,导向蛋白酶体发生降解,实现 NF κ B 信号的下调。突变的 CYLD 可引发 NF κ B 信号的上调,使得机体耐受凋亡等刺激的能力增强,从而形成肿瘤^[92]。

9 展望

近年来,泛素这一信号分子的重要性得到了越来越多的关注和证明。但随着研究的深入,更多的泛素及其修饰的生物学问题逐渐显现,有待多学科科学家去探索。在泛素化蛋白研究的技术方面,高覆盖定量蛋白质组学技术的飞速发展泛素-蛋白酶体系统的深入研究提供了契机。抗体、表位标签、串联亲和纯化、定点突变等策略使得富集低丰度的泛素化蛋白质底物成为可能。在数据分析方面,生物信息学人才的加盟为蛋白质泛素化的系统生物学研究提供了便利。他们系统收集、汇总、处理、存储和呈现了泛素/泛素化相关的信息和数据,成功构建了包括 UbiProt (泛素化修饰底物蛋白数据库: <http://ubiprot.org.ru/>)、hUbiquitome (实验验证的人类泛素化相关蛋白质数据库: <http://202.38.126.151/hmdd/hubi/>)、E3Miner (使用文本挖掘方法建立的泛素化 E3 数据库: <http://e3miner.biopathway.org/e3miner.html>)、E3Net (升级的 E3Miner: <http://pnet.kaist.ac.kr/e3net/>)等系列数据库。这些数据库的构建不仅集中了特定的泛素相关信息,而且为构建细胞内

泛素相关信号通路网络及泛素化与其他翻译后修饰的复杂关联奠定了基础,也为更好地预测泛素化位点和泛素化修饰的基序提供了线索^[93]。如何解读这些海量数据并且用生物学的方法验证这些数据隐含的生物学信息、如何获得各种不同连接形式的泛素链是一直以来困扰科学界的难题。最近 Tatjana Schneider 等利用密码子扩张和以点击化学为基础的聚合作用合成了人工泛素链,为我们分析复杂的泛素信号提供了契机^[94]。未来人们将继续关注泛素系统的时空活性及其在多种生理过程中所扮演的重要角色,并就泛素链及泛素相关酶类的特异性进行探究。

此外,人们对以泛素-蛋白酶体系统关键蛋白作为药靶的可行性也给予了越来越多的关注。如何将基础研究成果快速转变为实际应用,以期找到治疗某些疾病的方法是我们需要面对的重大问题。未来人们希望鉴定所有的泛素修饰酶,揭示泛素化引导的分子信号及其生物学功能,建立泛素化与其他翻译后修饰的串联相互作用网络,从而发现与某些疾病相关的关键蛋白的泛素化靶点,开发单靶点或多靶点药物,为人类战胜现今无法治疗的疾病作出贡献^[57]。

REFERENCES

- [1] Schwartz DC, Hochstrasser M. A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28(6): 321–328.
- [2] Wong BR, Parlati F, Qu KB, et al. Drug discovery in the ubiquitin regulatory pathway. *Drug Discov Today*, 2003, 8(16): 746–754.
- [3] Sun LJ, Chen ZJ. The novel functions of

- ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(2): 119–126.
- [4] Komander D, Rape M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 203–229.
- [5] Kulathu Y, Komander D. Atypical ubiquitylation—the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(8): 508–523.
- [6] Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, et al. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, 72(1): 11–15.
- [7] Goldknopf IL, Busch H. Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74(3): 864–868.
- [8] Hershko A, Ciechanover A, Rose IA. Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(7): 3107–3110.
- [9] Hough R, Pratt G, Rechsteiner M. Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem*, 1987, 262(17): 8303–8313.
- [10] Finley D, Varshavsky A. The ubiquitin system: functions and mechanisms. *Trends Biochem Sci*, 1985, 10(9): 343–347.
- [11] Jentsch S. The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet*, 1992, 26: 179–207.
- [12] Callis J, Carpenter T, Sun CW, et al. Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *Genetics*, 1995, 139(2): 921–939.
- [13] Ozkaynak E, Finley D, Solomon MJ, et al. The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *EMBO J*, 1987, 6(5): 1429–1439.
- [14] Finley D, Özkaynak E, Varshavsky A. The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell*, 1987, 48(6): 1035–1046.
- [15] Finley D, Bartel B, Varshavsky A. The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature*, 1989, 338(6214): 394–401.
- [16] Catic A, Ploegh HL. Ubiquitin-conserved protein or selfish gene? *Trends Biochem Sci*, 2005, 30(11): 600–604.
- [17] Shih SC, Sloper-Mould KE, Hicke L. Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *EMBO J*, 2000, 19(2): 187–198.
- [18] Dikic I, Wakatsuki S, Walters KJ. Ubiquitin-binding domains—from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(10): 659–671.
- [19] Hu M, Li PW, Li MY, et al. Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde. *Cell*, 2002, 111(7): 1041–1054.
- [20] 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(6): 1098–1109.
- [21] Sloper-Mould KE, Jemc JC, Pickart CM, et al. Distinct functional surface regions on ubiquitin. *J Biol Chem*, 2001, 276(32): 30483–30489.
- [22] Jin LY, Williamson A, Banerjee S, et al. Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell*, 2008, 133(4): 653–665.
- [23] Galan JM, Haguenaer-Tsapis R. Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J*, 1997, 16(19): 5847–5854.
- [24] Xu P, Duong DM, Seyfried NT, et al. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell*, 2009, 137(1): 133–145.
- [25] Cook WJ, Jeffrey LC, Kasperek E, et al. Structure of tetraubiquitin shows how multiubiquitin chains

- can be formed. *J Mol Biol*, 1994, 236(2): 601–609.
- [26] Satoh T, Sakata E, Yamamoto S, et al. Crystal structure of cyclic lys48-linked tetraubiquitin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 400(3): 329–333.
- [27] Varadan R, Walker O, Pickart C, et al. Structural properties of polyubiquitin chains in solution. *J Mol Biol*, 2002, 324(4): 637–647.
- [28] Ryabov Y, Fushman D. Interdomain mobility in di-ubiquitin revealed by NMR. *Proteins*, 2006, 63(4): 787–796.
- [29] Bremm A, Freund SMV, Komander D. Lys11-linked ubiquitin chains adopt compact conformations and are preferentially hydrolyzed by the deubiquitinase Cezanne. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17(8): 939–947.
- [30] 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(3): 477–484.
- [31] Komander D, Reyes-Turcu F, Licchesi JDF, et al. Molecular discrimination of structurally equivalent lys 63-linked and linear polyubiquitin chains. *EMBO Rep*, 2009, 10(5): 466–473.
- [32] Sims JJ, Cohen RE. Linkage-specific avidity defines the lysine 63-linked polyubiquitin-binding preference of rap80. *Mol Cell*, 2009, 33(6): 775–783.
- [33] Petroski MD, Deshaies RJ. Mechanism of lysine 48-linked ubiquitin-chain synthesis by the cullin-ring ubiquitin-ligase complex scf-cdc34. *Cell*, 2005, 123(6): 1107–1120.
- [34] Schaefer JB, Morgan DO. Protein-linked ubiquitin chain structure restricts activity of deubiquitinating enzymes. *J Biol Chem*, 2011, 286(52): 45186–45196.
- [35] Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, 2002, 82(2): 373–428.
- [36] Finley D, Sadis S, Monia BP, et al. Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(8): 5501–5509.
- [37] Mallette FA, Richard S. K48-linked ubiquitination and protein degradation regulate 53BP1 recruitment at DNA damage sites. *Cell Res*, 2012, 22(8): 1221–1223.
- [38] Hofmann RM, Pickart CM. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell*, 1999, 96(5): 645–653.
- [39] Eddins MJ, Carlile CM, Gomez KM, et al. Mms2-Ubc13 covalently bound to ubiquitin reveals the structural basis of linkage-specific polyubiquitin chain formation. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13(10): 915–920.
- [40] Cooper EM, Cutcliffe C, Kristiansen TZ, et al. K63-specific deubiquitination by two JAMM/MPN+ complexes: BRISC-associated Brcc36 and proteasomal Poh1. *EMBO J*, 2009, 28(6): 621–631.
- [41] Nathan JA, Kim HT, Ting L, et al. Why do cellular proteins linked to K63-polyubiquitin chains not associate with proteasomes? *EMBO J*, 2013, 32(4): 552–565.
- [42] Fisk HA, Yaffe MP. A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 1999, 145(6): 1199–1208.
- [43] 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. *Cell*, 2000, 103(2): 351–361.
- [44] Spence J, Gali RR, Dittmar G, et al. Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell*, 2000, 102(1): 67–76.
- [45] Springael JY, Galan JM, Haguenaer-Tsapis R, et al. NH₄⁺-induced down-regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1p permease involves its ubiquitination with lysine-63-linked

- chains. *J Cell Sci*, 1999, 112(9): 1375–1383.
- [46] Lim KL, Chew KCM, Tan JMM, et al. Parkin mediates nonclassical, proteasomal-independent ubiquitination of synphilin-1: implications for lewy body formation. *J Neurosci*, 2005, 25(8): 2002–2009.
- [47] Saeki Y, Kudo T, Sone T, et al. Lysine 63 - linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *EMBO J*, 2009, 28(4): 359–371.
- [48] Bhat KP, Yan S, Wang CE, et al. Differential ubiquitination and degradation of huntingtin fragments modulated by ubiquitin-protein ligase E3A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(15): 5706–5711.
- [49] Chaney J, Das C. Understanding K11-polyubiquitin recognition at the 26S proteasome. *FASEB J*, 2013, 27: 785.5.
- [50] Zhang Z, Lü XD, Yin WC, et al. Ter94 ATPase complex targets k11-linked ubiquitinated ci to proteasomes for partial degradation. *Dev Cell*, 2013, 25(6): 636–644.
- [51] Rape M, Reddy SK, Kirschner MW. The processivity of multiubiquitination by the APC determines the order of substrate degradation. *Cell*, 2006, 124(1): 89–103.
- [52] 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(37): 34743–34746.
- [53] Srivastava D, Chakrabarti O. Mahogunin-mediated α -tubulin ubiquitination via noncanonical K6 linkage regulates microtubule stability and mitotic spindle orientation. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1064.
- [54] Durcan TM, Tang MY, Pérusse JR, et al. USP8 regulates mitophagy by removing K6-linked ubiquitin conjugates from parkin. *EMBO J*, 2014, 33(21): 2473–2491.
- [55] Scully R, Livingston DM. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature*, 2000, 408(6811): 429–432.
- [56] Welch PL, Owens KN, King MC. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet*, 2000, 16(2): 69–74.
- [57] Malynn BA, Ma A. Ubiquitin makes its mark on immune regulation. *Immunity*, 2010, 33(6): 843–852.
- [58] Arimoto KI, Funami K, Saeki Y, et al. Polyubiquitin conjugation to NEMO by tripartite motif protein 23 (TRIM23) is critical in antiviral defense. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(36): 15856–15861.
- [59] Ikeda H, Kerppola TK. Lysosomal localization of ubiquitinated jun requires multiple determinants in a lysine-27-linked polyubiquitin conjugate. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(11): 4588–4601.
- [60] Liu J, Han CF, Xie B, et al. Rhd3 controls autoimmunity by suppressing the production of IL-6 by dendritic cells via K27-linked ubiquitination of the regulator NEMO. *Nat Immunol*, 2014, 15(7): 612–622.
- [61] Chastagner P, Israël A, Brou C. Itch/AIP4 mediates deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO Rep*, 2006, 7(11): 1147–1153.
- [62] Pickart CM. Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25(11): 544–548.
- [63] 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(4): 586–600.
- [64] Baumann K. Post-translational modifications: lys33-linked ubiquitin in post-golgi transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(6): 365.
- [65] Huang HN, Jeon MS, Liao LJ, et al. K33-linked polyubiquitination of T cell receptor-zeta regulates proteolysis-independent T cell signaling. *Immunity*, 2010, 33(1): 60–70.
- [66] Kirisako T, Kamei K, Murata S, et al. A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO J*, 2006, 25(20): 4877–4887.

- [67] Gerlach B, Cordier SM, Schmukle AC, et al. Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. *Nature*, 2011, 471(7340): 591–596.
- [68] Damgaard RB, Nachbur U, Yabal M, et al. The ubiquitin ligase XIAP recruits LUBAC for NOD2 signaling in inflammation and innate immunity. *Mol Cell*, 2012, 46(6): 746–758.
- [69] 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(7340): 633–636.
- [70] Tokunaga F, Sakata SI, Saeki Y, et al. Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF- κ B activation. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(2): 123–132.
- [71] Inn KS, Gack MU, Tokunaga F, et al. Linear ubiquitin assembly complex negatively regulates RIG-I- and TRIM25-mediated type I interferon induction. *Mol Cell*, 2011, 41(3): 354–365.
- [72] Zak DE, Schmitz F, Gold ES, et al. Systems analysis identifies an essential role for SHANK-associated RH domain-interacting protein (SHARPIN) in macrophage toll-like receptor 2 (TLR2) responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(28): 11536–11541.
- [73] Rieser E, Cordier SM, Walczak H. Linear ubiquitination: a newly discovered regulator of cell signalling. *Trends Biochem Sci*, 2013, 38(2): 94–102.
- [74] Rodgers MA, Bowman JW, Fujita H, et al. The linear ubiquitin assembly complex (LUBAC) is essential for NLRP3 inflammasome activation. *J Exp Med*, 2014, 211(7): 1333–1347.
- [75] Minton K. Inflammasomes: ubiquitin lines up for inflammasome activity. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(9): 580–581.
- [76] Meyer HJ, Rape M. Enhanced protein degradation by branched ubiquitin chains. *Cell*, 2014, 157(4): 910–921.
- [77] Meyer HJ, Rape M. Processive ubiquitin chain formation by the anaphase-promoting complex. *Semin Cell Dev Biol*, 2011, 22(6): 544–550.
- [78] Boname JM, Thomas M, Stagg HR, et al. Efficient internalization of MHC I requires lysine-11 and lysine-63 mixed linkage polyubiquitin chains. *Traffic*, 2010, 11(2): 210–220.
- [79] 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(38): 15247–15252.
- [80] Rajendra E, Oestergaard VH, Langevin F, et al. The Genetic and biochemical basis of FANCD2 monoubiquitination. *Mol Cell*, 2014, 54(5): 858–869.
- [81] Baker R, Lewis SM, Sasaki AT, et al. Site-specific monoubiquitination activates ras by impeding GTPase-activating protein function. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, 20(1): 46–52.
- [82] Johnson ES. Ubiquitin branches out. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(12): E295–E298.
- [83] Robzyk K, Recht J, Osley MA. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science*, 2000, 287(5452): 501–504.
- [84] Sun ZW, Allis CD. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*, 2002, 418(6893): 104–108.
- [85] White CL, Suto RK, Luger K. Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. *EMBO J*, 2001, 20(18): 5207–5218.
- [86] Ecker DJ, Khan MI, Marsh J, et al. Chemical synthesis and expression of a cassette adapted ubiquitin gene. *J Biol Chem*, 1987, 262(8): 3524–3527.
- [87] Lee SY, Pullen L, Virgil DJ, et al. Alanine scan of core positions in ubiquitin reveals links between dynamics, stability, and function. *J Mol Biol*, 2014, 426(7): 1377–1389.
- [88] Roscoe BP, Thayer KM, Zeldovich KB, et al. Analyses of the effects of all ubiquitin point mutants on yeast growth rate. *J Mol Biol*, 2013, 425(8): 1363–1377.

- [89] Ciechanover A. The ubiquitin–proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J*, 1998, 17(24): 7151–7160.
- [90] Ciechanover A, Brundin P. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron*, 2003, 40(2): 427–446.
- [91] Lee Peter CW, Dodart JC, Aron L, et al. Altered Social behavior and neuronal development in mice lacking the Uba6-Use1 ubiquitin transfer system. *Mol Cell*, 2013, 50(2): 172–184.
- [92] Singhal S, Taylor MC, Baker RT. Deubiquitylating enzymes and disease. *BMC Biochem*, 2008, 9(Suppl 1): S3.
- [93] Lu L, Li D, He FC. Bioinformatics advances in protein ubiquitination. *Hereditas*, 2013, 35(1): 17–26 (in Chinese).
卢亮, 李栋, 贺福初. 蛋白质泛素化修饰的生物信息学研究进展. *遗传*, 2013, 35(1): 17–26.
- [94] Schneider T, Schneider D, Rosner D, et al. Dissecting ubiquitin signaling with linkage-defined and protease resistant ubiquitin chains. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014: 53(47): 12925–12929.

(本文责编 郝丽芳)