



自噬相关去泛素化酶及其小分子抑制剂的 研究进展*

朱 凤 郑高利 田雪君**

(浙江省医学科学院药物研究所, 浙江省神经精神疾病药物研究重点实验室, 杭州 310013)

摘要 自噬是进化上高度保守并受到多途径严密调控的细胞生物学过程, 其向溶酶体递送多种细胞质组分以进行细胞内物质的降解以及再循环. 这一过程涉及到细胞器的更新、错误折叠蛋白质和蛋白质聚集体以及细胞内病原体的清除. 因此, 自噬对于细胞稳态的维持至关重要, 与许多人类疾病的发生发展密切相关. 随着细胞自噬调节机制研究的不断深入, 越来越多的去泛素化酶被证明在自噬相关的泛素信号调控系统中发挥了重要的作用. 这些去泛素化酶作用于细胞自噬的不同阶段, 靶向调节不同的泛素化自噬功能元件或自噬底物. 去泛素化酶作为包括神经退行性疾病以及肿瘤在内的细胞自噬相关疾病的治疗靶点受到了广泛的关注, 其中各类小分子抑制剂的发现为进一步研究去泛素化酶的自噬调节活性及相关疾病的治疗提供了可能.

关键词 去泛素化酶, 细胞自噬, 小分子抑制剂, 神经退行性疾病, 癌症

中图分类号 Q291

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0301

细胞自噬 (autophagy) 是真核细胞中普遍存在的通过将胞内物质运送到溶酶体, 最终在其水解酶的作用下得以降解释放的细胞生物学过程^[1-2]. 在营养缺乏或其他压力条件下, 细胞自噬可以确保胞内组分的循环和再利用, 同时它也能够用于清除损坏的细胞器、错误折叠的蛋白质和蛋白聚集体以及入侵的病原微生物^[3], 以维持细胞稳态的平衡^[1, 4]. 而细胞自噬异常同许多人类疾病都密切相关, 如阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 和亨廷顿病 (Huntington's disease, HD) 等神经退行性疾病^[5]、癌症^[6] 以及心脏病^[7] 等.

细胞自噬由底物通过不同方式被运送到溶酶体降解而被分为 3 个主要的类型: 微自噬 (microautophagy)、分子伴侣介导的自噬 (chaperone-mediated autophagy) 和巨自噬 (macroautophagy)^[8]. 其中巨自噬, 即通常所称的自噬, 是研究最广泛和最主要的一种类型. 细胞自

噬被诱导后, 首先成核形成吞噬泡 (phagophore); 吞噬泡随后不断延伸, 逐渐包裹包括细胞器在内的细胞质成分; 最后闭合形成完整双层膜结构的自噬体 (autophagosome); 自噬体或是先与晚期内涵体 (late endosome) /多泡体 (multivesicular body, MVB) 形成自噬内涵体 (amphisome) 再与溶酶体融合, 或是直接与溶酶体融合形成自噬溶酶体 (autolysosome); 最终, 自噬体的内容物以及自噬体的内膜在溶酶体中水解酶的作用下被降解, 释放到细胞质中被重新利用^[9-10].

从起始诱导阶段到最后自噬底物在自噬溶酶体中被降解, 整个细胞自噬过程都受到严密的调控,

* 国家自然科学基金 (31601094), 浙江省自然科学基金 (LQ16C090001) 和浙江省神经精神疾病药物研究重点实验室 (2019E10021) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0571-88215620, E-mail: tianxj@zjams.com.cn

收稿日期: 2019-12-04, 接受日期: 2020-02-17

使得细胞内的自噬维持在一个适当的水平^[11-12]. 其中, 泛素化作为一种重要的翻译后修饰参与调控了细胞自噬的多个阶段: 一方面, 许多自噬途径中的关键功能元件都需要经过泛素化修饰, 这些修饰在自噬的调节中起着重要的作用; 另一方面, 在选择性自噬过程中, 蛋白质聚集体或是损坏的细胞器等通过泛素化标记被特异性识别成为细胞自噬的底物, 最终在溶酶体中被降解^[13]. 作为泛素信号系统平衡的另一端, 越来越多的研究证明水解泛素连接的 特异性蛋白酶——去泛素化酶 (deubiquitinating enzymes, DUBs)^[14] 通过靶向泛素化的自噬调控组分或是自噬底物本身在细胞自噬过程中发挥了关键的调节作用. 并且, 近年来特异的 DUBs 小分子抑制剂陆续被发现, 使得 DUBs 调节细胞自噬的机制研究得到了进一步深入, 也为将 DUBs 作为相关疾病的治疗靶点提供了巨大的潜能.

1 泛素信号系统和去泛素化酶

从 1975 年由 76 个氨基酸组成的多肽——泛素首次被发现到现在, 蛋白质泛素信号系统已得到了

广泛的研究, 被认为是调节包括信号转导、转录调控、蛋白质降解、表观遗传学修饰和胞内定位在内的许多关键细胞生物学过程的重要机制^[15-16]. 泛素信号系统包括泛素化 (ubiquitination) 和去泛素化 (deubiquitination) 两部分, 维系着泛素信号系统的平衡, 平衡受到破坏将会导致靶蛋白的紊乱^[17].

泛素化是一种在真核细胞中高度保守的翻译后修饰^[18-19], 其过程主要通过 3 类不同的蛋白酶来完成: a. 泛素激活酶 (E1) 依赖 ATP 供能起始泛素化过程; b. 活化的泛素被转移到泛素结合酶 (E2) 上; c. 在泛素连接酶 (E3) 的协作下, 识别靶蛋白, 最终将泛素连接到靶蛋白的 Lys 残基上 (图 1). 单个泛素被连接到胞内蛋白质上被称为单泛素化 (monoubiquitination); 靶蛋白多个位点发生单泛素化被称为多泛素化 (multiubiquitination); 而多个泛素单体可以通过自身不同的 Lys 残基 (Lys6、Lys11、Lys27、Lys29、Lys33、Lys48 和 Lys63) 或 Met1 残基相互连接在靶蛋白上形成多聚泛素化链, 被称为多聚泛素化 (polyubiquitination)^[20] (图 1). 所有这些不同的泛

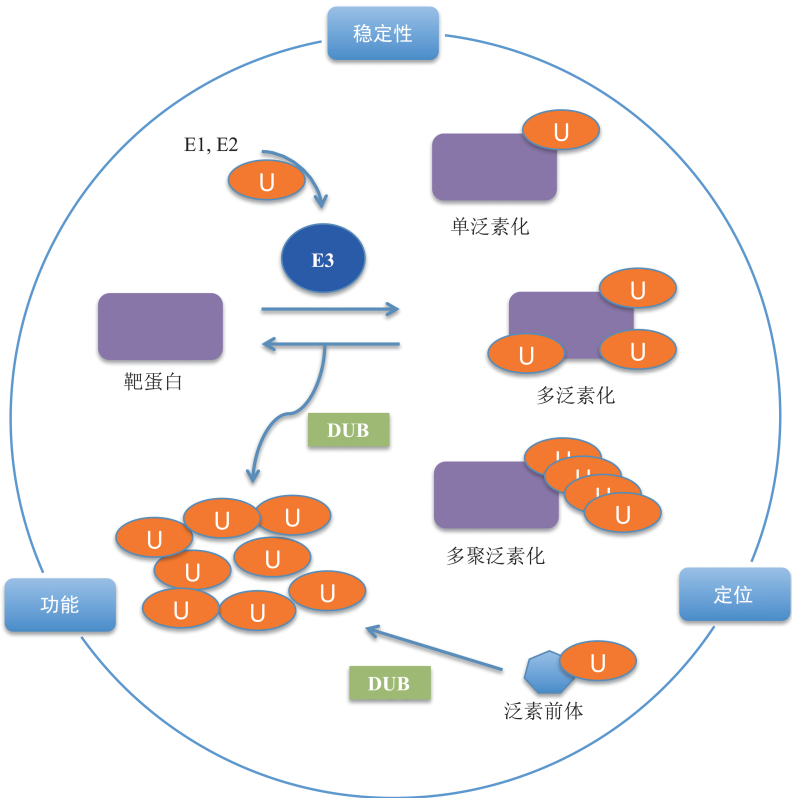


Fig. 1 Ubiquitin signaling system
图1 泛素信号系统

蛋白质泛素化是一个重要的翻译后修饰, 调控了从发育到稳态平衡的多种生物学过程. 泛素化会导致靶蛋白稳定性、功能或是定位的改变. DUBs一方面剪切泛素前体产生泛素单体, 另一方面直接逆向调控泛素化过程 (U代表泛素).

素化结构和连接方式及其组合形成了高度复杂的“泛素密码”，决定了靶蛋白未来的命运^[20-21]。例如，目前研究最广泛的是Lys48连接的泛素化介导的26S蛋白酶体降解靶蛋白^[22]。Lys63多聚泛素化则为蛋白质与蛋白质相互作用提供了一个重要的分子平台，参与信号转导、受体胞吞作用、蛋白质转运和DNA损伤修复等多个过程^[23]。总体而言，不同形式的泛素化功能可以被概括为3个方面：a. 改变靶蛋白的稳定性，使其通过泛素-蛋白酶体系统或是细胞自噬途径被降解；b. 改变靶蛋白的功能活性；c. 使靶蛋白的定位发生转移（图1）。

E1/2/3酶正向催化了泛素化反应，而DUBs则能够逆转泛素化的过程。DUBs将泛素从泛素化的蛋白质上切割下来，或是对泛素前体进行剪切，产生单个泛素基团^[24]（图1）。细胞内许多蛋白质功能的正常运作实际上依赖于E3泛素连接酶和DUBs活性之间的平衡。人类已知大约有100个DUBs，根据其催化结构域的属性不同，可被分成两大类：半胱氨酸蛋白酶（cysteine proteases）和金属蛋白酶（metalloproteases）。其中半胱氨酸蛋白酶还可以分为几个亚类，包括泛素特异加工蛋白酶（ubiquitin-specific-processing proteases, USPs）、泛素C端水解酶（ubiquitin C-terminal hydrolases, UCHs）、Machado-Joseph病蛋白结构域蛋白酶（Machado-Joseph disease protein domain proteases, MJDs）、卵巢瘤蛋白酶（ovarian tumour proteases, OTUs）和单核细胞趋化蛋白诱导蛋白蛋白酶（monocyte chemotactic protein-induced protein proteases, MCPiP），而金属蛋白酶只包括能结合锌离子的JAB/MPN/Mov34金属蛋白酶（JAB/MPN/Mov34 metalloproteases, JAMM）一类^[21]。DUBs的结构是模块化的，不仅包括催化结构域，还拥有额外的泛素结构域和各种蛋白质-蛋白质相互作用的结构域，使其得以完成特异的定位和底物选择。

2 去泛素化酶对细胞自噬的调节

自噬相关基因的诱导表达以及自噬本身整个动态过程都受到泛素信号系统的调控，DUBs作为泛素信号系统的关键组成部分在其中发挥了重要的调节作用。细胞自噬是个多步骤多因素的复杂通路，

泛素化修饰自噬调控功能元件来正向或者负向调节自噬通量。DUBs通过靶向到这些泛素化的自噬关键功能组分，来调节自噬从诱导起始到底物最终被降解的整个过程。而在选择性自噬过程中，特异的底物经过泛素化修饰被自噬受体识别，DUBs靶向泛素化的底物直接影响了自噬底物识别的进程。以下，将从这几个层面对DUBs的细胞自噬调节机理进行具体的阐述（表1）。

2.1 USP44在转录水平上对细胞自噬的调节

组蛋白H2B单泛素化是饥饿诱导细胞自噬的重要表观遗传学开关。在饥饿条件下，H2B单泛素化水平下降，引起细胞自噬相关调控基因的转录，激活细胞自噬的发生。研究人员发现这个过程是由USP44介导的^[25]。饥饿引起USP44 CpG岛的甲基化水平显著下降，增强USP44的转录，进而促进H2B单泛素化的水解。在小鼠胚胎干细胞中，下调USP44的表达抑制了细胞自噬的诱导^[25]。

2.2 DUBs对自噬调控元件的调节

2.2.1 对自噬诱导的调节

雷帕霉素靶蛋白复合物1（mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1）和ULK1/2激酶复合物是诱导自噬的关键复合物，后者是由ULK1/2、ATG13、FIP200和ATG101等组成。在营养充足的情况下，mTORC1与ULK1/2激酶复合物相结合，通过磷酸化ULK1/2和ATG13使其处于失活状态；在饥饿条件下，mTORC1的活性被抑制，从ULK1/2复合物上解离下来，使得ULK1/2和ATG13部分去磷酸化，诱导细胞自噬的发生^[26-27]。DEPTOR是mTORC1的内源抑制剂，在营养剥夺条件下，抑制mTORC1的活性，促进细胞自噬^[28]。而DUB OTUB1能通过N端结构域直接和DEPTOR结合，使DEPTOR去泛素化，从而增强其蛋白质稳定性，进一步抑制了mTORC1的活性^[29]。

ULK1是酵母蛋白Atg1的同源物，其稳定性和活性受E3连接酶TRAF6依赖的K63泛素化正调控^[30]。有研究表明，USP1从ULK1上直接去除K63泛素链进行去泛素化；但令人意外的是，在USP1敲除的细胞中，ULK1的K63泛素化水平虽然明显升高，经典的自噬途径却受到了抑制^[31]。研究人员推测，ULK1的K63泛素化和去泛素化的

动态变化是保证自噬进行所必需的. 在自噬被成功诱导以后, ULK1 实现自噬起始后功能需要借助 USP1 对其的去泛素化作用^[31]. ULK1 的 K48 泛素化诱导其被蛋白酶体降解, 从而抑制饥饿诱导的细胞自噬^[32-33]. USP20 能和 ULK1 相互作用, 去除 ULK1 上的 K48 泛素链, 保护其不被降解^[34]. 在基底条件下, USP20 维持一定的 ULK1 水平, 使其能够在压力条件下成功诱导细胞自噬; 但是在长时间诱导下, USP20 和 ULK1 的结合被削弱, 从而引起细胞自噬的抑制^[34]. 最近有报道发现, USP24 也可以通过调节 ULK1 的泛素化和蛋白质水平来抑制细胞自噬. 敲减 USP24 导致 ULK1 蛋白的表达增加, ULK1/2 激酶复合物的活性也得到了增强^[35].

2.2.2 对自噬体形成的调节

在各种压力条件下, ULK1 被激活, 进而激活并招募 VPS34/PI3K 复合物到自噬体形成位点上产生 PI3P 起始自噬体的成核^[26, 36]. VPS34/PI3K 复合物包含有脂类激酶 VPS34 及其调节蛋白 Beclin-1、VPS15 和 ATG14^[26, 37-38]. 其中, Beclin-1 的功能和活性受到不同的泛素化修饰的影响, 因而也成为了多种 DUBs 作用的靶蛋白, 是 DUBs 介导细胞自噬调控的关键一环^[39-40].

TLR 信号通路通过 E3 连接酶 TRAF6 介导 Beclin-1 的 K63 泛素化, 促进 VPS34-PI3K 复合物的形成. 属于 OTU 类别的 DUB A20 可以直接和 Beclin-1 作用, 靶向 K63 泛素链去泛素化, 从而抑制细胞自噬的起始^[41]. 而 USP14 可以通过和 TRAF6 竞争与 Beclin-1 的相互作用, 干扰 Beclin-1 和 TRAF6 的结合, 从而抑制 TRAF6 介导的 Beclin-1 K63 泛素化^[42]. 因此, A20 和 USP14 均是细胞自噬的负调控因子. K63 泛素化使 Beclin-1 趋于稳定, K11 连接的泛素化则会引起 Beclin-1 在蛋白酶体中的降解. USP19 水解 Lys437 位点上的 K11 泛素链以保护 Beclin-1 不被降解^[43]. USP10 和 USP13 均可降低 Beclin1 会导致蛋白酶体降解途径的泛素化修饰水平, 进而提高其蛋白质稳定性, 促进 VPS34-PI3K 复合物的形成; 而 Beclin1 自身可以通过调节 USP10 和 USP13 的催化活性来增强它们的稳定性, 形成一个正反馈调节回路, 放大正调节信号^[44]. 而 USP33 则可以通过去泛素化 RALB 来间接调节 Beclin-1 的自噬起始功能. 在营养匮乏条件下,

USP33 被招募和积聚到 RALB 阳性的囊泡结构上, 水解 RALB 上 Lys47 位点连接的泛素链, 促进了 RALB-EXO84-Beclin-1 复合物的装配, 推动自噬体的形成^[45].

UVRAG 是一个重要的自噬调节因子, 其 Lys517 和 Lys559 位点能被 E3 连接酶 SMURF1 加上 K29 和 K33 泛素链. UVRAG 的 K29 和 K33 泛素化削弱了 UVRAG 和 RUBCN 之间的相互作用, 从而增强 PIK3C3 的活性, 促进了自噬体的成熟. DUB ZRANB1 能和 UVRAG 形成复合物, 切除由 SMURF1 介导的 K29 和 K33 连接的泛素链, 增强 UVRAG 和 RUBCN 的相互作用, 抑制细胞自噬^[46].

2.2.3 对自噬体与晚期内涵体或溶酶体融合的调节

包裹自噬底物的完整双层膜结构的自噬体形成以后, 会与晚期内涵体/MVB 融合形成杂合细胞器-自噬内涵体, 使得细胞自噬和细胞内吞作用两条通路发生交汇, 最终通过与溶酶体融合完成内容物的降解^[47-48].

有研究发现, 自噬的有效降解需要 MVB 的参与^[47]. 而且, 在细胞内吞作用中发挥关键作用的 ESCRT 蛋白复合物, 包括 ESCRT-0、ESCRT-I、ESCRT-II 和 ESCRT-III, 参与调节泛素化膜蛋白的分选以及向 MVB 的转运^[49], 它们被敲除后会引发自噬相关表型、泛素化修饰的蛋白质聚集体和自噬体的大量积累以及神经退行性疾病的发生^[47, 50-51]. 因此, 作用于内吞作用和 ESCRT 蛋白复合物的一些 DUBs 也可以直接或间接地参与调节细胞自噬. 定位于内涵体上的 AMSH 属于金属蛋白酶 JAMM 类型, 参与调节 MVB 的生物合成, 促进内吞的膜受体分选和回收^[52]. AMSH 缺失会导致严重的神经细胞损伤, 且 AMSH 缺失的神经元中存在被泛素化标记的蛋白质聚集体和自噬受体 p62 的积累, 显示细胞自噬受到了阻抑^[53-54]. 在对模式植物拟南芥的研究中发现, AMSH1/3 能与 ESCRT-III 蛋白复合物的 VPS2.1 亚基相互作用, 并且促进细胞自噬介导的降解作用^[55-56]. β 2 肾上腺受体 (β 2-adrenergic receptor, β 2-AR) 位于细胞膜上, 泛素化的 β 2-AR 经过胞吞作用进入胞质后, 不是先进入溶酶体内, 而是直接进入自噬体中, USP20 在这个过程中发挥了重要的功能, 它促进了 β 2-AR 的去泛

素化以及 $\beta 2$ -AR向自噬体的转运^[57]。

通过自噬在调节干细胞功能的研究中发现, 胚胎干细胞需要维持高自噬通量, 以确保快速的增殖和自我更新的代谢率^[58], 而USP8可以通过对EPG5的去泛素化来维持胚胎干细胞的干性。RAB7A的效应分子EPG5定位于晚期内涵体和溶酶体上, 主要通过和LC3结合来发挥功能, 是介导自噬体和溶酶体融合的细胞自噬调节因子。EPG5在胚胎干细胞中高表达, 促进胚胎干细胞特性的维持。该研究发现USP8直接与EPG5结合, 水解其Lys252位点上的K63泛素链, 增强了EPG5和LC3之间的相互作用, 从而保证必要的自噬通量以维持胚胎干细胞的干性^[59]。

2.3 DUBs对选择性自噬的调节

选择性自噬的底物可以是线粒体、过氧化物酶体、内质网、脂滴、核糖体、中间体、细胞核、蛋白质聚集体和入侵的病原体^[60]。底物表面蛋白质经过泛素化修饰, 泛素信号被自噬受体(如p62/SQSTM1、OPTN、NBR1、NDP52和TAX1BP1等)识别并结合, 这些自噬受体蛋白质作为桥梁招募LC3, 将选择性底物包裹进形成的自噬体内, 最后通过与溶酶体融合而被降解^[61-62]。

2.3.1 线粒体自噬(mitophagy)

线粒体自噬是目前研究最多的选择性自噬, 它主要是由蛋白激酶PINK1和E3泛素连接酶PRKN/Parkin介导的。在线粒体受到损伤或者去极化的状态下, 位于线粒体外膜上的蛋白激酶PINK1招募Parkin蛋白, 通过磷酸化泛素和泛素样结构域激活其E3泛素连接酶的活性, 使得大量线粒体外膜蛋白被泛素化, 从而被泛素结合选择自噬受体识别, 在线粒体周围形成自噬体, 随后自噬体与溶酶体融合, 导致多余或受损伤的线粒体降解从而微调线粒体数量并维持机体能量代谢的平衡^[63-64]。

USP30是位于线粒体外膜上的跨膜DUB, 可以抑制由泛素连接酶PARK2和蛋白激酶PINK1介导的线粒体自噬。许多研究发现, USP30主要逆转线粒体上Parkin底物的泛素化, 如TOM20等^[65]。在神经元中, 过表达USP30大大减弱了由CCCP诱导线粒体去极化而引起的线粒体自噬对线粒体的清除作用; 而降低USP30的活性则增强了线粒体的降解。敲减USP30能缓解Parkin病理活性突变所引

起的线粒体自噬障碍, 以及在Parkin或者PINK1缺陷的果蝇中增强其线粒体的完整性。USP30的泛素水解活性可以去除K6、K11、K48和K63连接的泛素链, 但对以K6连接的泛素链最为有效^[65-67]。USP30的缺失导致K6连接的泛素链丰度明显高于K11、K48和K63连接的泛素链, 并促进了神经元中线粒体的降解^[65-66]。

最近有报道发现, 去泛素化酶USP33定位于线粒体外膜, 并与E3泛素连接酶Parkin存在直接的相互作用。USP33主要通过去除Parkin蛋白Lys435位点的K63泛素化链来调控线粒体自噬的发生。敲低USP33在增加Parkin蛋白稳定性的同时促进Parkin转运到去极化的线粒体上, 从而增强线粒体自噬^[68]。

除了USP30和USP33外, USP35和USP15也都可以负向调节线粒体自噬^[69-70], 而USP8则是目前发现的唯一正向调节线粒体自噬的DUB。USP8特异性去除Parkin上的K6泛素链, 敲低USP8可以阻止Parkin向去极化线粒体的募集, 而阻抑Parkin介导的线粒体自噬^[71]。有研究报道, USP8能同E3连接酶Nrdp1和Clec16a组成线粒体自噬复合物, 促进了 β 细胞中的线粒体自噬, 对胰岛 β 细胞的功能非常重要^[72]。

2.3.2 聚集体自噬(aggrephagy)

选择性降解蛋白质聚集体的自噬被称为聚集体自噬。聚集体自噬通常在蛋白质毒性条件下被激活, 例如蛋白酶体或者伴侣蛋白的功能被抑制、有效的翻译过程受到干扰等^[73]。在这个过程中, 有细胞毒性的蛋白质聚集体被泛素化标记, 从而被自噬受体(如p62/SQSTM1)所识别, 被包裹进自噬体中, 最后在溶酶体中被降解^[74-75]。自噬异常会导致这些有毒性的蛋白质聚集体累积, 与神经退行性疾病尤为相关。

α -突触核蛋白的聚集是PD一大病理特征, 而单泛素化 α -突触核蛋白被认为是其靶向蛋白酶体降解途径所必需的。USP9X与 α -突触核蛋白相互作用并且去除其单泛素化基序, 有利于 α -突触核蛋白通过自噬而非蛋白酶体途径被降解^[76]。DUB UCH-L1在脑组织中高表达, 与PD紧密相关, 它能和 α -突触核蛋白相互作用。UCH-L1作为细胞自噬的负调控因子, 通过抑制细胞自噬促进 α -突触核蛋白聚

集体的形成^[77-78]. 另有研究发现, UCH-L1 可以通过下调溶酶体的降解来增加 α -突触核蛋白的聚集^[79]. 有研究报道, USP8 能和 α -突触核蛋白相互作用, 水解其 K63 泛素链从而降低 α -突触核蛋白聚集体的溶酶体降解. 在果蝇眼睛中敲减 USP8 能降低 α -突触核蛋白的水平以及 α -突触核蛋白引起的组织毒性; 在人源细胞中敲减 USP8 能增强溶酶体介导的 α -突触核蛋白降解^[80].

p62/SQSTM1 作为选择性自噬受体, 起到多聚泛素化底物和自噬体之间的桥梁作用^[73, 81]. 在果蝇或是人源细胞中, USP36 可以通过去除蛋白质聚集体的泛素信号, 抑制 p62/SQSTM1 自噬识别受体介导的蛋白质聚集体自噬. USP36 失活细胞的细胞核及胞质中都出现泛素化标记的蛋白质聚集体, 从而能被自噬受体识别进而激活聚集体自噬^[82]. p62/SQSTM1 可以特异性识别并结合 K63 和 K33 泛素化修饰的蛋白质聚集体^[83-84]. ZRANB1/TRABID 选择性水解 K29 和 K33 泛素链, 从而负向调节聚集体自噬. 下调 ZRANB1 的表达增强了 p62/SQSTM1 到 K33 泛素化标记的蛋白质聚集体的招募^[84]. 最新的研究发现, USP8 可以直接和 p62/SQSTM1 相互作用, 去除其 Lys420 位点上的泛素化, 并且优先剪切 K11 连接的泛素链, 抑制了 p62/SQSTM1 的自噬活性, 是聚集体自噬的负调控因子^[85].

2.3.3 异体自噬 (xenophagy)

泛素依赖的选择性自噬还可以用于清除胞内入侵的病原微生物, 如沙门氏菌、李斯特菌和结核分枝杆菌等, 这种特殊的细胞免疫防御机制被称为异体自噬^[86]. 在宿主细胞中, 这些病原微生物被宿主的 E3 连接酶加上泛素化标记而被自噬受体识别. 为了对抗宿主的防御机制, 细菌和病毒也发展出相应的去泛素化酶来逆转宿主蛋白对其进行的泛素化修饰^[8]. 在感染期间, 细胞内的鼠伤寒沙门氏菌处于液泡结构中, 它可以将有毒性的蛋白质转移到宿主细胞质中, 含有鼠伤寒沙门氏菌液泡的周围会产生泛素化蛋白质聚集体, 从而被自噬受体所识别. 而鼠伤寒沙门氏菌可以将 DUB 样酶 Sse1 分泌到宿主细胞质中去泛素化这些蛋白质聚集体, 降低异体自噬的诱导, 并进一步促进自身的复制和增

殖^[87-88]. 有趣的是, 病原微生物还能利用宿主细胞的 DUBs 来保护自身抵御细胞自噬的清除作用. HIV-1 病毒的 Tat 蛋白是病毒转录的一个关键调节因子, 最近有研究发现宿主 T 细胞质中的 BRCC36 能选择性水解 Tat 蛋白的 K63 泛素化, 从而帮助 Tat 蛋白逃脱细胞自噬的降解^[89]. DUB BRCC36 属于 JAMM 亚类, 敲减 BRCC36 能够显著增加 Tat K63 泛素化的水平, 促进其通过 K63 泛素化依赖的细胞自噬途径被降解^[89].

3 自噬相关 DUBs 的小分子抑制剂

细胞自噬与多种人类疾病相关联^[5-7]. 研究人员陆续鉴别筛选出特异的自噬相关 DUBs 的小分子抑制剂, 这些小分子抑制剂展现出对自噬相关疾病的治疗潜能. 它们的发现也为进一步研究 DUBs 的自噬调节活性提供了有效的手段 (表 1).

3.1 Pimozide、GW7647 和 ML323

单体形式的 USP1 催化活性很低, 它需要和 UAF1 形成复合物来发挥水解功能. 在对生物活性分子进行的一次大规模定量筛选中, 研究人员发现了两个 USP1-UAF1 复合物抑制剂 pimozide 和 GW7647^[90]. pimozide 和 GW7647 处理下, 能够成功逆转非小细胞肺癌细胞对化疗药物的耐药性^[90]. 但是, GW7647 和 Pimozide 的抑制效力比较有限, 并且特异性较低. 研究团队又发现了新的 USP1-UAF1 复合物小分子抑制剂 ML323. ML323 表现出对 USP1-UAF1 复合物的高度选择性和更高的抑制性能, 能增强非小细胞肺癌和骨肉瘤细胞对顺铂 (cisplatin) 的敏感性, 增强抗癌药物对肿瘤的杀伤作用^[91].

3.2 IU-1 及其衍生物

2010 年, 首次报道了 USP14 特异性抑制剂 IU1^[92], 它也是第一个被发现的 DUBs 高选择性抑制剂. 该抑制剂表现出对于前列腺癌、乳腺癌和结肠癌中的潜在药物靶点 USP14 的高度选择性; 而且, IU1 在抑制催化活性的同时并不影响 USP14 其他的调节功能^[92]. 随后, 有研究团队合成和鉴定了 IU1 的 87 个类似物^[93], 发现 IU1-47 是 USP14 更有效的抑制剂. IU1-47 处理培养的小鼠原代神经元

和人诱导多能干细胞分化而来的神经元,抑制了USP14水解泛素的活性,增强了细胞自噬通量,并且加速Tau蛋白的降解^[93].随着结构生物学的进步及发展,对于IU1的研究也更深入.2018年,有研究团队解析了USP14与IU1及其3个衍生物结合的共晶体结构.这些复合物的结构显示IU1及其类似物与USP14的空间结合位点非常独特,其阻断了泛素C端进入USP14的活性位点,从而抑制USP14的催化活性.基于此相干空间阻滞的机制,研究人员设计并合成了IU1-248,其效力比IU1高十倍之多^[94].

3.3 Spautin-1及其衍生物

如之前所述,USP10和USP13作用于VPS34-PI3K激酶复合物的Beclin1亚基,降低Beclin1泛素化水平而抑制其降解的同时,Beclin1自身可以通过调节USP10和USP13的催化活性来增强它们的稳定性,对细胞自噬形成一个级联放大的正反馈调节回路^[44].小分子抑制剂spautin-1通过抑制USP10和USP13的活性提高VPS34-PI3K激酶复合物中Beclin1亚基的泛素化水平,促进其降解,进而抑制了细胞自噬过程.在饥饿条件下,用spautin-1处理促进了癌细胞的死亡.spautin-1作为有效的细胞自噬抑制剂,和一些抗癌药物联用,能增强肿瘤细胞对药物的敏感性.如与伊马替尼(imatinib)联用,增强了慢性粒细胞性白血病细胞的凋亡^[95];与阿霉素联用,降低了犬阑尾骨肉瘤细胞的生存率和克隆形成力^[96];与线粒体复合物I抑制剂二甲双胍(metformin)联用,更有效地限制了BRCA1阴性乳腺癌细胞的氧化呼吸和克隆形成能力,抑制了肿瘤的生长^[97].在最近的一次基于成像的高通量筛选中,研究人员发现了新的spautin-1衍生物spautin-A41,是更有效且更稳定的细胞自噬抑制剂^[98].spautin-A41能有效降低PI3K复合物的活性,继而抑制自噬体的形成,缓解急性胰腺炎的症状^[98].

3.4 15-oxospiramylactone (S3)和MF-094

S3是目前所知的唯一一种天然小分子DUBs抑制剂.它是一种二萜衍生物,最早被发现可以促进

线粒体融合^[99].S3主要靶向定位于线粒体的USP30,通过其与催化结构域中的半胱氨酸残基相互作用而直接抑制USP30的催化活性.这种抑制作用导致Mfn1/2非降解途径泛素化的增加,从而增强Mfn1和Mfn2的活性并促进线粒体融合^[99].随着线粒体自噬相关研究不断深入,USP30可以逆转线粒体上Parkin底物的泛素化,从而抑制线粒体自噬的调控机制被揭示^[65].最近,就有研究发现了一个新的小分子化合物MF-094是高效的USP30选择性抑制剂.该化合物可以增加线粒体蛋白的泛素化水平,促进细胞的线粒体自噬^[100].

3.5 LDN-57444和NSC632839

在一次高通量的药物筛选中,研究人员发现了靶向UCH-L1的小分子抑制剂LDN-57444,用LDN-57444处理H1299肺癌细胞系使得肿瘤细胞的增殖率显著下降^[101].除了LDN-57444外,小分子化合物NSC632839也是UCH-L1的抑制剂,但它还可以抑制USP2和USP7的活性^[102].用这两种化合物处理少突胶质细胞都可以显著增强细胞内LC3斑点的形成、降低p62的水平、增强细胞自噬通量、从而抑制 α -突触核蛋白聚集体在细胞内的积聚^[102].

3.6 WP1130

WP1130是部分选择性DUBs抑制剂,可直接抑制USP5、USP9X、USP14、UCH37和UCH-L1的去泛素活性^[103],并显示出对多种癌症细胞的抗增殖和促凋亡作用^[104-105].WP1130对DUBs的抑制作用导致ULK1泛素化增加,抑制了ULK1的活性,从而阻断自噬通量,因此它有潜力成为抑制诱导自噬所必需的ULK1激酶复合物的有效工具^[106].可是,在已知的WP1130靶向DUBs中没有参与调节ULK1泛素化和活性的,这表明必然还有未知的参与相关调节机制的DUBs有待发现.吉西他滨(gemcitabine)是治疗胰腺癌的重要药物,但吉西他滨在用药过程中会诱导细胞自噬,使肿瘤细胞产生耐药,因此吉西他滨与WP1130联合用药,可通过抑制体内的自噬水平提高肿瘤对吉西他滨的敏感性,从而增强其抗肿瘤的作用^[107].

Table 1 List of deubiquitinating enzymes involved in autophagy
表1 自噬相关去泛素化酶

去泛素化酶	机制	底物	疾病类型	抑制剂
USP44	正调节因子. 介导H2B单泛素化的水解 ^[25]	H2B ^[25]	癌症 ^[108]	
OTUB1	正调节因子. 介导DEPTOR去泛素化、抑制mTORC1活性 ^[29]	DEPTOR ^[29]	癌症 ^[109] 神经退行性疾病 ^[110]	
USP1	正调节因子. 水解ULK1的K63泛素链、调节ULK1自噬起始和起始后的动态活性 ^[31]	ULK1 ^[31]	癌症 ^[111]	Pimozide ^[90] GW7647 ^[90] ML323 ^[91]
USP20	正调节因子. 水解ULK1的K48泛素链 ^[34]	ULK1 ^[34] β 2-AR ^[34]	癌症 ^[112]	
USP24	负调节因子. 降低ULK1泛素化水平及其蛋白质稳定性 ^[35]	ULK1 ^[35]	神经退行性疾病 ^[35]	
A20	负调节因子. 水解Beclin-1的K63泛素链 ^[40-41]	Beclin1 ^[41]	癌症 ^[113] 炎症 ^[114]	
USP14	负调节因子. 抑制TRAF6介导的Beclin-1 K63泛素化 ^[42]	TAB 2 ^[42]	癌症 ^[115]	IU1-47 ^[93] IU1-248 ^[94] WP1130 ^[103]
USP19	正调节因子. 水解Lys437位点上的K11泛素链保护Beclin-1不被降解 ^[43]	Beclin1 ^[43]	癌症 ^[116]	
USP10/USP13	正调节因子. 增强Beclin1蛋白稳定性、促进VPS34-PI3K复合物的形成 ^[44] .	Beclin1 ^[44] P53 ^[44]	癌症 ^[117-118] 神经退行性疾病 ^[119] 炎症 ^[120]	Spautin-1 ^[44] Spautin-A41 ^[98]
USP33	自噬正调控因子. 去泛素化RALB间接调节Beclin-1 ^[45] 线粒体自噬负调节因子. 水解Parkin蛋白Lys435位点的K63泛素链 ^[68]	RALB ^[45] Parkin ^[68]	癌症 ^[121]	
ZRANB1	自噬负调节因子. 水解UVRAG K29和K33泛素链、促进自噬体成熟 ^[46] 聚集体自噬负调节因子. 水解蛋白质聚集体K33泛素标记、抑制自噬受体p62/SQSTM1的识别 ^[84]	UVRAG ^[46] 蛋白质聚集体 ^[84]	癌症 ^[122]	
AMSH	正调节因子. 与ESCRT-III蛋白复合物的VPS2. 1亚基相互作用 ^[55-56] .	内吞蛋白 ^[53-54] ESCRT-III ^[55-56]	神经退行性疾病 ^[53-54]	
USP8	自噬正调节因子. 促进自噬体和溶酶体融合、水解EPG5 Lys252位点上的K63泛素链 ^[59] . 线粒体自噬正调控因子. 水解Parkin上的K6泛素链 ^[71] . 聚集体自噬负调节因子. 水解 α -突触核蛋白的K63泛素链 ^[80] ; 水解p62/SQSTM1 Lys420位点上的泛素化、抑制p62/SQSTM1的自噬活性 ^[85]	EPG5 ^[59] Parkin ^[71] α -突触核蛋白 ^[80] p62/SQSTM1 ^[85]	神经退行性疾病 ^[59]	
USP30	线粒体自噬负调节因子. 逆转线粒体上Parkin底物的泛素化 ^[65-67]	线粒体蛋白 ^[65-67]	神经退行性疾病 ^[65]	S3 ^[99] MF-094 ^[100]
USP35/USP15	线粒体自噬负调节因子. 逆转线粒体上Parkin底物的泛素化 ^[69-70]	线粒体蛋白 ^[69-70]	神经退行性疾病 ^[69-70]	
USP36	聚集体自噬负调节因子. 去除蛋白质聚集体的泛素信号、抑制自噬受体p62/SQSTM1的识别 ^[82]	蛋白质聚集体 ^[82]	癌症 ^[123]	
USP9X	聚集体自噬正调节因子. 水解 α -突触核蛋白的单泛素化基序 ^[76]	α -突触核蛋白 ^[76]	神经退行性疾病 ^[76]	WP1130 ^[103]
UCH-L1	聚集体自噬负调节因子. 能与 α -突触核蛋白相互作用 ^[77-78] 、或通过下调溶酶体的降解来增加 α -突触核蛋白的聚集 ^[79]		神经退行性疾病 ^[77]	WP1130 ^[103] LDN-57444 ^[101] NSC632839 ^[102]
Ssel	异体自噬负调节因子. 由病原微生物分泌到宿主细胞质中去泛素化蛋白质聚集体 ^[87-88]	蛋白质聚集体 ^[87-89]	细菌感染 ^[87]	
BRCC36	异体自噬负调节因子. 选择性水解Tat蛋白K63泛素化 ^[89]	Tat蛋白 ^[89]	HIV-1感染 ^[89]	

4 讨论与展望

在过去的十年中,我们对DUBs的结构功能、作用和调节机制,以及与疾病的联系有了更深入的认识,越来越多的研究证明DUBs在细胞自噬的整个过程中均起着重要的调节作用,影响着机体的正常生理活动以及许多人类疾病的发生与发展.未来,如何在生理或者病理条件下将其体外相关分子机制的发现置于整个生物系统中加以证实和解释会是DUBs研究领域的重要前沿课题.

尽管已经有大量的相关研究工作,我们对于DUBs功能的认识还是非常有限的,这主要有几个方面的原因:a. DUBs种类和数量多样化,并且自身可能受到多种形式的复杂调控;b. 一些DUBs可能作用于平行的通路互为补偿;c. 一个DUBs可以通过多个不同的底物调节多条信号通路.一个解决问题的有效途径是利用各类不同的体内外模型,借助它们各自的方法学优势来做分析;另一个重要的途径就是寻找特异性的抑制剂,并对其有效性、选择性和脱靶效应进行准确的评估.由于无论是细胞自噬,还是去泛素化的过程都发生在胞内,小分子化合物仍是目前抑制剂的首要筛选方向.因为许多DUBs拥有相似的序列和结构,并且它们大多存在变构效应,在活性状态和非活性状态间转换,而且常常是作为蛋白质复合物或者是庞大的分子机器中的其中一个组成部分来发挥功能的^[124],这些都为寻找特异的小分子抑制剂带来了困难.但随着DUBs生化分析和筛选技术的重大改进,不断有小分子DUBs抑制剂被发现,并被运用于药物的临床前研究.这类抑制剂及其衍生物不仅为发现具有临床价值的药物分子提供了基础,在新药研发中发挥了先导化合物的作用,也作为一种有力的工具用以研究DUBs的细胞生物学特性和调控机制,或是在各类疾病模型中验证治疗假设,为包括神经退行性疾病和癌症在内的细胞自噬相关疾病的靶向治疗提供思路和指导.

参 考 文 献

- [1] Xie Z, Klionsky D J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, 2007, **9**(10): 1102-1109
- [2] Alexander D E, Ward S L, Mizushima N, *et al.* Analysis of the role of autophagy in replication of herpes simplex virus in cell culture. *J Virol*, 2007, **81**(22): 12128-12134
- [3] Levine B, Mizushima N, Virgin H W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, 2011, **469**(7330): 323-335
- [4] Choi A M, Ryter S W, Levine B. Autophagy in human health and disease. *The New England Journal of Medicine*, 2013, **368**(7): 651-662
- [5] Nixon R A. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature Medicine*, 2013, **19**(8): 983-997
- [6] Bhat P, Kriel J, Shubha Priya B, *et al.* Modulating autophagy in cancer therapy: advancements and challenges for cancer cell death sensitization. *Biochemical Pharmacology*, 2018, **147**: 170-182
- [7] Gustafsson A B, Gottlieb R A. Autophagy in ischemic heart disease. *Circulation Research*, 2009, **104**(2): 150-158
- [8] Jacomin A C, Taillebourg E, Fauvarque M O. Deubiquitinating enzymes related to autophagy: new therapeutic opportunities? *Cells*, 2018, **7**(8): pii E112
- [9] Tanida I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011, **14**(11): 2201-2214
- [10] Lee J A. Neuronal autophagy: a housekeeper or a fighter in neuronal cell survival?. *Experimental Neurobiology*, 2012, **21**(1): 1-8
- [11] Yang Z, Klionsky D J. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2009, **335**: 1-32
- [12] Chen Y, Klionsky D J. The regulation of autophagy - unanswered questions. *Journal of Cell Science*, 2011, **124**(2): 161-170
- [13] Grumati P, Dikic I. Ubiquitin signaling and autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, **293**(15): 5404-5413
- [14] Magraoui F E, Reidick C, Meyer H E, *et al.* Autophagy-related deubiquitinating enzymes involved in health and disease. *Cells*, 2015, **4**(4): 596-621
- [15] Tse W K, Eisenhaber B, Ho S H, *et al.* Genome-wide loss-of-function analysis of deubiquitylating enzymes for zebrafish development. *BMC Genomics*, 2009, **10**: 637
- [16] Kowalski J R, Juo P. The role of deubiquitinating enzymes in synaptic function and nervous system diseases. *Neural Plasticity*, 2012, **2012**: 892749
- [17] Ciechanover A, Schwartz A L. The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. *Biochimica et Biophysica acta*, 2004, **1695**(1-3): 3-17
- [18] Varshavsky A. The ubiquitin system. *Trends in Biochemical Sciences*, 1997, **22**(10): 383-387
- [19] Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2006, **22**: 159-180
- [20] Komander D, Rape M. The ubiquitin code. *Annual Review of Biochemistry*, 2012, **81**(7): 203-229
- [21] Komander D. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society Transactions*, 2009, **37**(5): 937-953
- [22] Glickman M H, Maytal V. Regulating the 26S proteasome. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2002, **268**: 43-72
- [23] Panier S, Durocher D. Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair*, 2009, **8**(4): 436-443
- [24] Reyes-Turcu F E, Ventii K H, Wilkinson K D. Regulation and

- cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, **78**:363-397
- [25] Chen S, Jing Y, Kang X, *et al.* Histone H2B monoubiquitination is a critical epigenetic switch for the regulation of autophagy. *Nucleic Acids Research*, 2017, **45**(3): 1144-1158
- [26] He C, Klionsky D J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics*, 2009, **43**:67-93
- [27] Zachari M, Ganley I G. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays in Biochemistry*, 2017, **61**(6): 585-596
- [28] Zhao Y, Xiong X, Sun Y. DEPTOR, an mTOR inhibitor, is a physiological substrate of SCF(betaTrCP) E3 ubiquitin ligase and regulates survival and autophagy. *Molecular Cell*, 2011, **44**(2): 304-316
- [29] Zhao L, Wang X, Yu Y, *et al.* OTUB1 protein suppresses mTOR complex 1 (mTORC1) activity by deubiquitinating the mTORC1 inhibitor DEPTOR. *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, **293**(13): 4883-4892
- [30] Nazio F, Strappazzon F, Antonioli M, *et al.* mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nature Cell Biology*, 2013, **15**(4): 406-416
- [31] Raimondi M, Cesselli D, Di Loreto C, *et al.* USP1 (ubiquitin specific peptidase 1) targets ULK1 and regulates its cellular compartmentalization and autophagy. *Autophagy*, 2019, **15**(4): 613-630
- [32] Jiao H, Su G Q, Dong W, *et al.* Chaperone-like protein p32 regulates ULK1 stability and autophagy. *Cell Death and Differentiation*, 2015, **22**(11):1812-1823
- [33] Nazio F, Carinci M, Valacca C, *et al.* Fine-tuning of ULK1 mRNA and protein levels is required for autophagy oscillation. *The Journal of Cell Biology*, 2016, **215**(6): 841-856
- [34] Kim J H, Seo D, Kim S J, *et al.* The deubiquitinating enzyme USP20 stabilizes ULK1 and promotes autophagy initiation. *EMBO Reports*, 2018, **19**(4):e44378
- [35] Thayer J A, Awad O, Hegdekar N, *et al.* The PARK10 gene USP24 is a negative regulator of autophagy and ULK1 protein stability. *Autophagy*, 2019, **16**(1):140-153
- [36] Noda T. Autophagy in the context of the cellular membrane-trafficking system: the enigma of Atg9 vesicles. *Biochemical Society Transactions*, 2017, **45**(6): 1323-1331
- [37] Kihara A, Noda T, Ishihara N, *et al.* Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 2001, **152**(3): 519-530
- [38] Lipinski M M, Hoffman G, Ng A, *et al.* A genome-wide siRNA screen reveals multiple mTORC1 independent signaling pathways regulating autophagy under normal nutritional conditions. *Developmental Cell*, 2010, **18**(6): 1041-1052
- [39] Chen R H, Chen Y H, Huang T Y. Ubiquitin-mediated regulation of autophagy. *Journal of Biomedical Science*, 2019, **26**(1): 80
- [40] Boutouja F, Brinkmeier R, Mastalski T, *et al.* Regulation of the tumor-suppressor beclin 1 by distinct ubiquitination cascades. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, **18**(12):E2541
- [41] Shi C S, Kehrl J H. TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy. *Science Signaling*, 2010, **3**(123):ra42
- [42] Min Y, Lee S, Kim M J, *et al.* Ubiquitin-specific protease 14 negatively regulates toll-like receptor 4-mediated signaling and autophagy induction by inhibiting ubiquitination of TAK1-binding protein 2 and beclin 1. *Frontiers in Immunology*, 2017, **8**:1827
- [43] Jin S, Tian S, Chen Y, *et al.* USP19 modulates autophagy and antiviral immune responses by deubiquitinating Beclin-1. *The EMBO Journal*, 2016, **35**(8): 866-880
- [44] Liu J, Xia H, Kim M, *et al.* Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell*, 2011, **147**(1): 223-234
- [45] Simicek M, Lievens S, Laga M, *et al.* The deubiquitylase USP33 discriminates between RALB functions in autophagy and innate immune response. *Nature Cell Biology*, 2013, **15**(10): 1220-1230
- [46] Feng X, Jia Y, Zhang Y, *et al.* Ubiquitination of UVRAG by SMURF1 promotes autophagosome maturation and inhibits hepatocellular carcinoma growth. *Autophagy*, 2019, **15**(7): 1130-1149
- [47] Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, *et al.* Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *The Journal of Cell Biology*, 2007, **179**(3): 485-500
- [48] Nakamura S, Yoshimori T. New insights into autophagosome-lysosome fusion. *Journal of Cell Science*, 2017, **130**(7): 1209-1216
- [49] Rusten T E, Stenmark H. How do ESCRT proteins control autophagy? *Journal of Cell Science*, 2009, **122**(13): 2179-2183
- [50] Lee J A, Beigneux A, Ahmad S T, *et al.* ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Current Biology*, 2007, **17**(18): 1561-1567
- [51] Rusten T E, Vaccari T, Lindmo K, *et al.* ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Current Biology*, 2007, **17**(20): 1817-1825
- [52] Clague M J, Urbe S. Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell*, 2010, **143**(5): 682-685
- [53] Ishii N, Owada Y, Yamada M, *et al.* Loss of neurons in the hippocampus and cerebral cortex of AMSH-deficient mice. *Molecular and Cellular Biology*, 2001, **21**(24): 8626-8637
- [54] Suzuki S, Tamai K, Watanabe M, *et al.* AMSH is required to degrade ubiquitinated proteins in the central nervous system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, **408**(4): 582-588
- [55] Katsiarimpa A, Kalinowska K, Anzenberger F, *et al.* The deubiquitinating enzyme AMSH1 and the ESCRT-III subunit VPS2.1 are required for autophagic degradation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2013, **25**(6): 2236-2252
- [56] Katsiarimpa A, Anzenberger F, Schlager N, *et al.* The *Arabidopsis* deubiquitinating enzyme AMSH3 interacts with ESCRT-III

- subunits and regulates their localization. *The Plant Cell*, 2011, **23**(8): 3026-3040
- [57] Kommaddi R P, Jean-Charles P Y, Shenoy S K. Phosphorylation of the deubiquitinase USP20 by protein kinase A regulates post-endocytic trafficking of beta2 adrenergic receptors to autophagosomes during physiological stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, **290**(14): 8888-8903
- [58] Liu P, Liu K, Gu H, *et al.* High autophagic flux guards ESC identity through coordinating autophagy machinery gene program by FOXO1. *Cell Death and Differentiation*, 2017, **24**(10): 1672-1680
- [59] Gu H, Shi X, Liu C, *et al.* USP8 maintains embryonic stem cell stemness via deubiquitination of EPG5. *Nature Communications*, 2019, **10**(1): 1465
- [60] Khaminets A, Behl C, Dikic I. Ubiquitin-dependent and independent signals in selective autophagy. *Trends in Cell Biology*, 2016, **26**(1): 6-16
- [61] Stolz A, Ernst A, Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nature Cell Biology*, 2014, **16**(6): 495-501
- [62] Zaffagnini G, Martens S. Mechanisms of selective autophagy. *Journal of Molecular Biology*, 2016, **428**(9): 1714-1724
- [63] Youle R J, Narendra D P. Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011, **12**(1): 9-14
- [64] Durcan T M, Fon E A. The three 'P's of mitophagy: PARKIN, PINK1, and post-translational modifications. *Genes & Development*, 2015, **29**(10): 989-999
- [65] Bingol B, Tea J S, Phu L, *et al.* The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy. *Nature*, 2014, **510**(7505): 370-375
- [66] Cunningham C N, Baughman J M, Phu L, *et al.* USP30 and parkin homeostatically regulate atypical ubiquitin chains on mitochondria. *Nature Cell Biology*, 2015, **17**(2): 160-169
- [67] Michel M A, Swatek K N, Hospenthal M K, *et al.* Ubiquitin linkage-specific affimers reveal insights into K6-linked ubiquitin signaling. *Molecular Cell*, 2017, **68**(1): 233-246.e5
- [68] Niu K, Fang H, Chen Z, *et al.* USP33 deubiquitinates PRKN/parkin and antagonizes its role in mitophagy. *Autophagy*, 2020, **16**(4): 724-734
- [69] Wang Y, Serricchio M, Jauregui M, *et al.* Deubiquitinating enzymes regulate PARK2-mediated mitophagy. *Autophagy*, 2015, **11**(4): 595-606
- [70] Cornelissen T, Haddad D, Wauters F, *et al.* The deubiquitinase USP15 antagonizes Parkin-mediated mitochondrial ubiquitination and mitophagy. *Human Molecular Genetics*, 2014, **23**(19): 5227-5242
- [71] Durcan T M, Tang M Y, Perusse J R, *et al.* USP8 regulates mitophagy by removing K6-linked ubiquitin conjugates from parkin. *The EMBO Journal*, 2014, **33**(21): 2473-2491
- [72] Pearson G, Chai B, Vozheiko T, *et al.* Clec16a, Nrdp1, and USP8 form a ubiquitin-dependent tripartite complex that regulates beta-cell mitophagy. *Diabetes*, 2018, **67**(2): 265-277
- [73] Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of Cell Biology*, 2005, **171**(4): 603-614
- [74] Lamark T, Johansen T. Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. *International Journal of Cell Biology*, 2012, **2012**(12): 736905
- [75] Hyttinen J M, Amadio M, Viiri J, *et al.* Clearance of misfolded and aggregated proteins by aggrephagy and implications for aggregation diseases. *Ageing Research Reviews*, 2014, **18**: 16-28
- [76] Rott R, Szargel R, Haskin J, *et al.* Alpha-Synuclein fate is determined by USP9X-regulated monoubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(46): 18666-18671
- [77] Engelender S. Alpha-Synuclein fate: proteasome or autophagy? *Autophagy*, 2012, **8**(3): 418-420
- [78] Pukass K, Richter-Landsberg C. Oxidative stress promotes uptake, accumulation, and oligomerization of extracellular alpha-synuclein in oligodendrocytes. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2014, **52**(3): 339-352
- [79] Liu Z, Meray R K, Grammatopoulos T N, *et al.* Membrane-associated farnesylated UCH-L1 promotes alpha-synuclein neurotoxicity and is a therapeutic target for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(12): 4635-4640
- [80] Alexopoulou Z, Lang J, Perrett R M, *et al.* Deubiquitinase Usp8 regulates alpha-synuclein clearance and modifies its toxicity in Lewy body disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, **113**(32): E4688-E4697
- [81] Pankiv S, Clausen T H, Lamark T, *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**(33): 24131-24145
- [82] Taillebourg E, Gregoire I, Viargues P, *et al.* The deubiquitinating enzyme USP36 controls selective autophagy activation by ubiquitinated proteins. *Autophagy*, 2012, **8**(5): 767-779
- [83] Tan J M M, Wong E S P, Dawson V L, *et al.* Lysine 63-linked polyubiquitin potentially partners with p62 to promote the clearance of protein inclusions by autophagy. *Autophagy*, 2008, **4**(2): 251-253
- [84] Nibe Y, Oshima S, Kobayashi M, *et al.* Novel polyubiquitin imaging system, PolyUb-FC, reveals that K33-linked polyubiquitin is recruited by SQSTM1/p62. *Autophagy*, 2018, **14**(2): 347-358
- [85] Peng H, Yang F, Hu Q, *et al.* The ubiquitin-specific protease USP8 directly deubiquitinates SQSTM1/p62 to suppress its autophagic activity. *Autophagy*, 2020, **16**(4): 698-708
- [86] Sharma V, Verma S, Seranova E, *et al.* Selective autophagy and xenophagy in infection and disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2018, **6**: 147
- [87] Thomas M, Mesquita F S, Holden D W. The DUB-ious lack of ALIS in *Salmonella* infection: a *Salmonella* deubiquitinase regulates the autophagy of protein aggregates. *Autophagy*, 2012, **8**(12): 1824-1826
- [88] Mesquita F S, Thomas M, Sachse M, *et al.* The *Salmonella* deubiquitinase SseL inhibits selective autophagy of cytosolic

- aggregates. *Plos Pathogens*, 2012, **8**(6): e1002743
- [89] Xu M, Moresco J J, Chang M, *et al.* SHMT2 and the BRCC36/BRISC deubiquitinase regulate HIV-1 Tat K63-ubiquitylation and destruction by autophagy. *Plos Pathogens*, 2018, **14**(5): e1007071
- [90] Chen J, Dexheimer T S, Ai Y, *et al.* Selective and cell-active inhibitors of the USP1/ UAF1 deubiquitinase complex reverse cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells. *Chemistry & Biology*, 2011, **18**(11): 1390-1400
- [91] Liang Q, Dexheimer T S, Zhang P, *et al.* A selective USP1-UAF1 inhibitor links deubiquitination to DNA damage responses. *Nature Chemical Biology*, 2014, **10**(4): 298-304
- [92] Lee B H, Lee M J, Park S, *et al.* Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature*, 2010, **467**(7312): 179-184
- [93] Boselli M, Lee B H, Robert J, *et al.* An inhibitor of the proteasomal deubiquitinating enzyme USP14 induces tau elimination in cultured neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 2017, **292**(47): 19209-19225
- [94] Wang Y, Jiang Y, Ding S, *et al.* Small molecule inhibitors reveal allosteric regulation of USP14 *via* steric blockade. *Cell Research*, 2018, **28**(12): 1186-1194
- [95] Shao S, Li S, Qin Y, *et al.* Spautin-1, a novel autophagy inhibitor, enhances imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia. *International Journal of Oncology*, 2014, **44**(5): 1661-1668
- [96] Schott C R, Ludwig L, Mutsaers A J, *et al.* The autophagy inhibitor spautin-1, either alone or combined with doxorubicin, decreases cell survival and colony formation in canine appendicular osteosarcoma cells. *Plos One*, 2018, **13**(10): e0206427
- [97] Yeo S K, Paul R, Haas M, *et al.* Improved efficacy of mitochondrial disrupting agents upon inhibition of autophagy in a mouse model of BRCA1-deficient breast cancer. *Autophagy*, 2018, **14**(7): 1214-1225
- [98] Dong K, Chen X, Xie L, *et al.* Spautin-A41 attenuates cerulein-induced acute pancreatitis through inhibition of dysregulated autophagy. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2019, **42**(11): 1789-1798
- [99] Yue W, Chen Z, Liu H, *et al.* A small natural molecule promotes mitochondrial fusion through inhibition of the deubiquitinase USP30. *Cell Research*, 2014, **24**(4): 482-496
- [100] Kluge A F, Lagu B R, Maiti P, *et al.* Novel highly selective inhibitors of ubiquitin specific protease 30 (USP30) accelerate mitophagy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2018, **28**(15): 2655-2659
- [101] Liu Y, Lashuel H A, Choi S, *et al.* Discovery of inhibitors that elucidate the role of UCH-L1 activity in the H1299 lung cancer cell line. *Chemistry & Biology*, 2003, **10**(9): 837-846
- [102] Yan C, Huo H, Yang C, *et al.* Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 regulates autophagy by inhibiting autophagosome formation through its deubiquitinating enzyme activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, **497**(2): 726-733
- [103] Sun H S, Kapuria V, Peterson L F, *et al.* Inhibition of usp9x deubiquitinase activity by WP1130 reduces Mcl-1 levels and induces apoptosis in cells from patients with plasma cell dyscrasia and drug-refractory multiple myeloma. *Blood*, 2010, **116**(21): 1238-1239
- [104] Kim S, Woo S M, Min K J, *et al.* WP1130 enhances trail-induced apoptosis through usp9x-dependent miR-708-mediated downregulation of c-flip. *Cancers*, 2019, **11**(3): E344
- [105] Wang S, Juan J, Zhang Z, *et al.* Inhibition of the deubiquitinase USP5 leads to c-Maf protein degradation and myeloma cell apoptosis. *Cell Death & Disease*, 2017, **8**(9): e3058
- [106] Driessen S, Berleth N, Friesen O, *et al.* Deubiquitinase inhibition by WP1130 leads to ULK1 aggregation and blockade of autophagy. *Autophagy*, 2015, **11**(9): 1458-1470
- [107] Ma T, Chen W, Zhi X, *et al.* USP9X inhibition improves gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer by inhibiting autophagy. *Cancer Letters*, 2018, **436**: 129-138
- [108] Cheng J, Demeulemeester J, Wedge D C, *et al.* Pan-cancer analysis of homozygous deletions in primary tumours uncovers rare tumour suppressors. *Nature Communications*, 2017, **8**(1): 1221
- [109] Zhou Y, Wu J, Fu X, *et al.* OTUB1 promotes metastasis and serves as a marker of poor prognosis in colorectal cancer. *Molecular Cancer*, 2014, **13**: 258
- [110] Wang P, Joberty G, Buist A, *et al.* Tau interactome mapping based identification of Otub1 as Tau deubiquitinase involved in accumulation of pathological Tau forms *in vitro* and *in vivo*. *Acta Neuropathologica*, 2017, **133**(5): 731-749
- [111] Ma A, Tang M, Zhang L, *et al.* USP1 inhibition destabilizes KPNA2 and suppresses breast cancer metastasis. *Oncogene*, 2019, **38**(13): 2405-2419
- [112] Wang C, Yang C, Ji J, *et al.* Deubiquitinating enzyme USP20 is a positive regulator of Claspin and suppresses the malignant characteristics of gastric cancer cells. *International Journal of Oncology*, 2017, **50**(4): 1136-1146
- [113] Qi X F, Kim D H, Lee K J, *et al.* Autophagy contributes to apoptosis in A20 and EL4 lymphoma cells treated with fluvastatin. *Cancer Cell International*, 2013, **13**(1): 111
- [114] Hammer G E, Turer E E, Taylor K E, *et al.* Expression of A20 by dendritic cells preserves immune homeostasis and prevents colitis and spondyloarthritis. *Nature Immunology*, 2011, **12**(12): 1184-1193
- [115] Han K H, Kwak M, Lee T H, *et al.* USP14 inhibition regulates tumorigenesis by inducing autophagy in lung cancer *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(21): E5300
- [116] Shahriyari L, Abdel-Rahman M, Cebulla C. BAP1 expression is prognostic in breast and uveal melanoma but not colon cancer and is highly positively correlated with RBM15B and USP19. *Plos One*, 2019, **14**(2): e0211507
- [117] Han G H, Chay D B, Yi J M, *et al.* Loss of both USP10 and p14ARF protein expression is an independent prognostic biomarker for poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer. *Cancer Genomics & Proteomics*, 2019, **16**(6): 553-562
- [118] Han C, Lu X, Nagrath D. Regulation of protein metabolism in

- cancer. *Molecular & Cellular Oncology*, 2018, **5**(5): e1285384
- [119] Liu X, Hebron M L, Mulki S, *et al.* Ubiquitin specific protease 13 regulates tau accumulation and clearance in models of alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2019, **72**(2):1-17
- [120] Li L, Wei J, Li S, *et al.* The deubiquitinase USP13 stabilizes the anti-inflammatory receptor IL-1R8/Sigirr to suppress lung inflammation. *EBioMedicine*, 2019, **45**:553-562
- [121] Jia M, Guo Y, Lu X. USP33 is a biomarker of disease recurrence in papillary thyroid carcinoma. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, **45**(5): 2044-2053
- [122] Zhang P, Xiao Z, Wang S, *et al.* ZRANB1 is an ezh2 deubiquitinase and a potential therapeutic target in breast cancer. *Cell Reports*, 2018, **23**(3): 823-837
- [123] Li J, Olson L M, Zhang Z, *et al.* Differential display identifies overexpression of the USP36 gene, encoding a deubiquitinating enzyme, in ovarian cancer. *International Journal of Medical Sciences*, 2008, **5**(3): 133-142
- [124] Mevissen T E T, Komander D. Mechanisms of deubiquitinase specificity and regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 2017, **86**:159-192

Research Progress of Autophagy-related Deubiquitinating Enzymes and Their Small-molecule Inhibitors*

ZHU Feng, ZHENG Gao-Li, TIAN Xue-Jun**

(Key Laboratory of Neuropsychiatric Drug Research of Zhejiang Province, Institute of Materia Medica,
Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

Abstract Autophagy is an evolutionary conserved cellular process that delivers the intracellular components to lysosome for degradation and recycling, which is tightly regulated by multiple pathways. This catabolic process involves the renewal of organelles, the removal of misfolded proteins and protein aggregates as well as the elimination of pathogens in cells. Therefore, autophagy is critical to maintain cellular homeostasis and closely related to the development of many human diseases. With the deepening of the mechanism research of autophagy regulation, more and more deubiquitinating enzymes have been proved to play an important role in autophagy-related ubiquitin signaling system. These enzymes can act at different stages of autophagy, and target different ubiquitinated machinery components or substrates of autophagy. As the therapeutic targets for autophagy-related diseases including neurodegeneration diseases and tumors, deubiquitinating enzymes have attracted extensive attention. The discovery of various small-molecule inhibitors provides the possibility to further study the autophagy regulatory activity of the ubiquitinases and also the treatment of related diseases.

Key words deubiquitinating enzymes, autophagy, small-molecule inhibitor, neurodegeneration disease, cancer

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0301

* This work was supported by grants from The National Science Foundation of China (31601094), Zhejiang Natural Science Foundation (LQ16C090001) and Key Laboratory of Neuropsychiatric Drug Research of Zhejiang Province (2019E10021)

** Corresponding author.

Tel: 86-571-88215620, E-mail: tianxj@zjams.com.cn

Received: December 4, 2019 Accepted: February 17, 2020