

卢克锋博士, 现任四川大学华西医院生物治疗全国重点实验室研究员。主要研究领域: 细胞自噬及细胞器调控与功能。期望揭示细胞自噬以及细胞器在蛋白质稳态调控中的生理病理功能与机制, 并筛选调控药物以推动抗衰老等研究。研究成果论文在 *Cell*、*Nat Cell Biol*、*Dev Cell* 等刊物上发表。

蛋白质聚集体的选择性自噬降解: 聚集体自噬

贾白慧 李绘绘 卢克锋*

(四川大学华西医院生物治疗全国重点实验室, 成都 610041)

摘要 细胞通过蛋白质稳态的保持来支撑其蛋白质组的功能网络。由分子伴侣、泛素蛋白酶体和细胞自噬组成蛋白质稳态维持体系。稳态异常导致蛋白质聚集体的积累并引起衰老和各种疾病。细胞内选择性自噬途径清除蛋白质聚集体的机制被称为聚集体自噬。该文介绍了聚集体自噬的上游即各种聚集体的形成、介导聚集体自噬的底物受体分子以及基于聚集体自噬的药物研发研究。

关键词 聚集体; 细胞自噬; 生物分子聚合物; 相变; 受体分子

Selective Autophagy Degradation of Protein Aggregates: Aggrephagy

JIA Baihui, LI Huihui, LU Kefeng*

(State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University West China Hospital, Chengdu 610041, China)

Abstract The functional network of cellular proteome is essentially dependent on the maintenance of protein homeostasis through chaperone, ubiquitin proteasome and autophagy. The accumulation of abnormal protein aggregates results in aging and various diseases. The mechanism by which protein aggregates are selectively degraded by autophagy is called aggrephagy. Here the authors introduce the formation of protein aggregates, receptors that recruit substrate aggregates, and the drug development based on aggrephagy.

Keywords aggregate; autophagy; biomolecular condensates; phase transitions; receptor

细胞是生命的单元, 而蛋白质介导众多重要的生命过程。众多蛋白质在细胞内外会发生主动的(为了执行蛋白功能, 即有益的)或被动的(错误折叠

导致的, 即有害的)聚集从而形成聚集体(aggregate)。近年来, 相变(phase transition)和相分离(phase separation)概念的引入和推广促进了人们对蛋白形成聚

收稿日期: 2023-10-27 接受日期: 2023-12-08

国家自然科学基金(批准号: 32022020)资助的课题

*通信作者。Tel: 028-85422261, E-mail: lukf@scu.edu.cn

Received: October 27, 2023 Accepted: December 8, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32022020)

*Corresponding author. Tel: +86-28-85422261, E-mail: lukf@scu.edu.cn

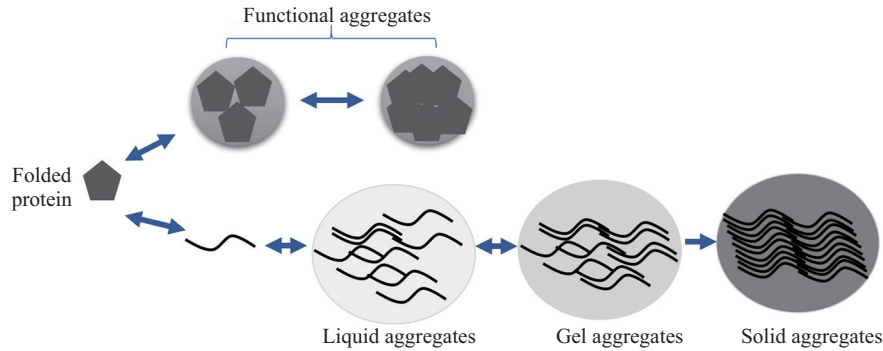


图1 功能性聚集体和细胞毒性聚集体的形成和相变过程

Fig.1 The formation and phase separation of functional and cellular toxic protein aggregates

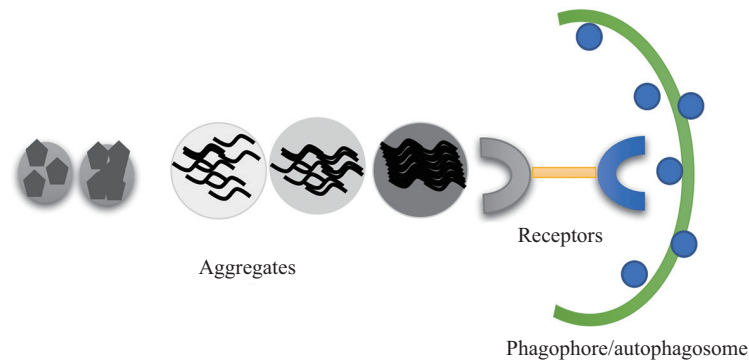


图2 聚集体自噬的受体分子募集聚集体到自噬体

Fig.2 Recruitment of protein aggregates into autophagosome by receptors

集体以执行功能,或者错误折叠蛋白形成聚集体造成细胞毒性的机制的认识(图1)。生物分子凝聚物(biomolecular condensate)是一个很大的概念,包括具有功能的聚集体和错误折叠蛋白形成的具有毒性的聚集体。相变和相分离过程被用来描述生物分子聚合物形成的过程。聚集体自噬(aggrephagy)一般用来指有害的聚集体经过自噬途径的降解^[1]。

对聚集体自噬的研究和理解,主要集中在该过程的几个方面,包括上游阶段聚集体如何形成,中游阶段受体分子识别聚集体,以及下游阶段聚集体被自噬体运输到溶酶体进行降解即自噬活性调控(图2)。相变概念的引入也提示我们对于聚集体的理解还较为初步,还需进一步深入揭示各种特异聚集体形成的本质驱动和液-胶-固的动态过程,以及其带来细胞毒性的共性和特性机制。对于聚集体形成机制的研究也有助于我们理解细胞内众多各异的聚集体和受体分子是如何协调相互识别的,理解上游聚集体如何引发受体分子介导的聚集体自噬的发生和进行。而且目前关于聚集体自噬受体分子和自噬活

性调控的综述较多,因此本文主要从聚集体形成并兼顾受体分子的角度来介绍聚集体自噬。

1 聚集体的形成

蛋白质在生理条件下折叠成特定的三维结构来获得生物活性。分子伴侣蛋白质(chaperone)协助其他蛋白质实现正确折叠并防止聚集^[2]。然而,各种压力刺激会干扰分子伴侣系统,导致蛋白质折叠异常。因此,多种机制可用于保持蛋白质结构并减轻蛋白质损伤和错误折叠带来的细胞毒性^[3]。这些机制包括促进蛋白质折叠、重新折叠,以及蛋白质降解,从而维持蛋白质稳态和细胞功能^[4-6]。

各种细胞内外压力因素包括热应激和衰老等,会造成蛋白质稳态失衡,导致错误折叠蛋白的积累和聚集,以致最终的蛋白质聚集体的形成^[7]。蛋白质聚集体导致蛋白质功能丧失并对细胞产生毒性伤害^[8]。在某些条件下,蛋白质显示出组装成具有规律结构的倾向并形成聚集体。蛋白质聚集体结构可以呈现液体样属性,如应激颗粒(stress granule, SG),也可以呈现

固体样属性, 如阿尔茨海默病相关的淀粉样纤维。从本质上讲, 蛋白质聚集是多个蛋白质分子粘在一起。这可能是球状蛋白错误折叠的结果, 由此蛋白质内部的疏水残基暴露在表面并簇和在一起, 来与细胞质的水性环境相分离^[9]。此外, 氨基酸 β 折叠主要通过氢键和静电相互作用形成淀粉样结构^[10-11]。聚集体的溶解度较低, 成为不同程度的相对不可溶的存在^[12-14]。蛋白质聚集是一种广泛的现象, 几乎每个细胞中的蛋白质都具有聚集的潜力。通过理解蛋白质聚集的机制, 可以更好地理解大分子特别是蛋白质结构形成的物理基础以及研发相应药物预防或治疗蛋白质聚集体相关疾病如神经退行疾病。

在相变概念提出后, 人们对聚集体的形成有了更清晰的认识。相变过程可以非常好地描述蛋白质从相对可溶状态转变为相对不可溶状态聚集体的动态过程。细胞内蛋白质和核酸等大分子在其自身以及其他因素的调控下, 形成局部富集且与周围分离的结构。通过相分离, 从液相到胶状再到固相, 蛋白质聚集体特别是毒性聚集体得以形成。相分离的驱动力主要来自大分子内部和大分子之间的相互作用。相互结合结构域或者无序结构可以促进分子间的相互作用, 从而促进分子结合、聚合, 进而促使蛋白质发生分子相变。无序结构相对折叠较好的结构域, 可以提供更多的分子间和分子内的结合点, 在相变蛋白质中被广泛发现。无序结构是由简单且具有重复特征的氨基酸形成的简单序列区域。其中重复的氨基酸一般包含甘氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸和天冬酰胺等。这些类型的氨基酸不容易形成复杂结构, 因此暴露更多弱相互作用的作用位点, 从而在聚合后发生相分离。除了无序结构外, 具有聚合特征或串联重复的结构域, 因其可以提供数量较多的互作位点和形式, 也可以促进相分离。互作结合位点的数量在相变中的重要性也体现在相变发生与蛋白质物质浓度成正相关。蛋白质可以随其浓度的增高, 发生液相、胶状和固相的相变。此外, 改变蛋白质肽段性质和互作聚合点数量的翻译后修饰也调控相变和聚集体形成。

2 聚集体的分类

聚集体的种类非常多, 因此对其进行分类是较为困难的。聚集体形成和存在的位置非常多样, 可以是细胞核、细胞质以及细胞外。而且聚集体还是

一种较为动态的结构, 在时间上和空间上聚集体均具有动态和复杂特征。细胞毒性的聚集体除神经退行疾病相关聚集体外, 还包括数量众多的为执行细胞正常功能或应对外界刺激而产生的聚集体。本文尝试根据聚集体是否对细胞产生毒性, 将其分为功能性的聚集体和细胞毒性的聚集体。前者主要指的是细胞内执行某种生命功能的聚集体, 一般是没有细胞毒性的, 例如应激颗粒聚集体; 后者主要指的是细胞内形成的具有细胞毒性的聚集体, 例如神经退行疾病相关的聚集体。二者之间还有一些相变状态的区别。功能性的聚集体一般保持在液相状态, 也可以在一定条件下相变成为胶状, 没有或极少相变成为固相。而细胞毒性聚集体大多可以从液相转变为固相。因此推测在液相到固相的转变过程中, 细胞内功能分子被募集到聚集集体中, 或是固相聚集体对细胞内的功能分子产生了吸附。这可能是细胞毒性聚集体的致病机理之一。

2.1 功能性的聚集体

与蛋白质相互作用的概念推动对蛋白质功能的认知类似, 聚集体以及介导聚集体形成的相变过程的概念进一步推动了对细胞内蛋白质动态转变的理解。

细胞内蛋白质和RNA通过形成无膜细胞区室的过程, 即相分离过程, 形成各种聚集体, 如核仁、P-body、SG和核孔复合体等^[15-16]。在此类聚集体相变期间发生多种类型的相互作用, 例如RNA-RNA、蛋白质-蛋白质和核酸-蛋白质相互作用^[17-23]。核仁和核斑点聚集体介导核糖体RNA转录和前mRNA剪接^[24]。P-body是介导mRNA稳定和降解的细胞质凝聚物^[25]。胚芽颗粒是生殖细胞对种系发育至关重要的凝聚物^[26]。SG在应激条件下诱导产生, 以保护RNA免受有害因素的影响^[27]。从酵母细胞到哺乳动物细胞, SG形成的分子机制是非常保守的^[28]。在环境应激条件下, 细胞经历翻译因子eIF2 α (eukaryotic initiation factor-2 α)的磷酸化修饰, 导致翻译起始率下降, 抑制蛋白质合成, 最终导致SG形成, 因此, SG包含尚未翻译的核糖核酸、核糖核酸结合蛋白质和各种滞留的翻译因子, 可以影响细胞内遗传信息传递和各种信号通路活性^[29-30]。在哺乳动物细胞中, 多种RNA结合蛋白质已经被确定为SG的重要成分, 例如哺乳动物细胞SG中的T细胞内抗原-1(T-cell intracytoplasmic antigen 1, TIA-1)和组蛋白去乙酰化酶6(histone deacetylase 6, HDAC6)^[31-32]。

然而,去除上述蛋白质后细胞内仍然可以形成SG,最近,G3BP应激颗粒装配因子1(G3BP stress granule assembly factor 1, G3BP1)被证明对SG组装至关重要^[33]。G3BP1的特征是三个固有的无序结构通过结合RNA作为相变的驱动,细胞老化和外界压力因素相结合可以改变SG的动力学^[34-36]。年龄相关蛋白质稳态的丧失可导致SG的病理形成,而这被认为在阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化症和额颞叶痴呆等神经退行疾病的发展中发挥作用^[37]。SG的形成也依赖RNA-蛋白质的浓度。当RNA和蛋白质处于特定状态和比率时,可以驱动形成特定状态和大小的SG,并在生理状况恢复时形成动态变化的SG^[38-39]。高浓度的蛋白质可以改变SG性质并使其呈现凝胶状或固体状以此引发其进行降解^[18-21,40-43]。在正常细胞中,异常SG发生选择性的靶向降解,而在自噬阻断的细胞中,异常SG的降解被阻断,导致细胞功能的破坏^[44]。此外,细胞内线粒体也随着细胞衰老而发生重大变化,包括呼吸链功能降低引起腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)的水平降低,并增加电子泄漏^[43]。由于SG动态变化受到ATP驱动蛋白复合物的调控,ATP产生受损也可以影响SG形成和降解^[45]。

除了上述较为动态变化的聚集体外,细胞内还有一些相对较为稳定的聚集体。在酵母中,Ape1是液泡中的水解酶。Ape1前体蛋白(pro-Ape1)在细胞质中合成后,形成聚集体,然后被自噬体运送到液泡内成为具有功能的水解酶。Ape1前体蛋白的N-端具有45个氨基酸残基形成的前导肽。Ape1前体蛋白的卷曲和螺旋结构之间形成多个互作位点,介导其相变形成聚集体,之后被自噬受体分子Atg19识别并结合,在Atg11帮助下通过与自噬体膜蛋白Atg8相互作用而被募集到自噬体中。Atg19与Ape1聚集体结合后可以形成更大的聚集体,但是该聚集体只有保持液相状态才可以进入自噬体并最终进入液泡。当Ape1突变后,形成的固相聚集体则无法进入自噬体。保持液相可能也是功能性聚集体区别于细胞毒性聚集体的特征之一。而液相Ape1聚集体能够进入自噬体的原因目前尚不清楚。推测可能是液相Ape1聚集体与自噬体具有类似的液相特征,因为自噬体形成也是受液相蛋白(自噬蛋白如Atg1复合体等)驱动的。液相Ape1与液相自噬体形成蛋白可以相互募集到一起,而当Ape1聚集体呈现固相后,则可能不会被募集。

2.2 细胞毒性的聚集体

具有细胞毒性的聚集体是很多的。众多具有细胞毒性的聚集体与神经退行疾病如阿尔茨海默病密切相关。关于与神经退行疾病相关的聚集体的综述已经很多,而朊病毒是在较早期引起公众关注和科学家研究的、较为典型的可引起神经退行疾病的毒性聚集体,其发现历史体现经典的科学研究推动历程。因此这里着重介绍朊病毒,同时兼顾介绍几种代表性的、与神经退行疾病密切相关的聚集体。

在18世纪,人们在美利奴绵羊中发现了一种奇怪的疾病,其导致羊的异常行为,例如步态改变、过度舔舐和强烈的瘙痒迫使羊病态地刮擦栅栏。这个疾病被命名为羊瘙痒病(Scrapie)^[46]。1920年,科学家描述了一种病因不明的人类神经系统疾病即克雅病(Creutzfeldt-Jakob disease, CJD)^[47]。1944年,科学家使用福尔马林灭活受感染动物的大脑和脾脏,然后将其作为健康动物的疫苗。接种疫苗的动物两年后患上瘙痒病进而死亡^[48-49]。稍后,科学家在巴布亚新几内亚的福尔部落中发现了另一种人类神经系统疾病,被称为库鲁病(Kuru),该病表现得很像克雅病和瘙痒病^[50]。1959年,科学家发现库鲁病、瘙痒病和克雅病是同一神经病变的不同形式^[51-52]。1966年,科学家用死于库鲁病的人类的大脑材料感染灵长类动物黑猩猩,并在两年后用CJD大脑材料重复此实验,发现这两种疾病的致病因子可以在脑内传播^[53-54]。来自不同领域的科学家尝试使用电离、紫外线照射、极端热、高压和其他已知会灭活病毒和细菌的化合物灭活羊瘙痒病病毒^[55-60]。科学家开始推测诱发羊瘙痒病的病毒的化学本质可能是蛋白质^[60-61]。1980年开始,英国暴发疯牛病,摄入感染牛肉的人也因此感染,该疾病也被称为变异型克雅病。1982年PRUSINER创造了术语“朊病毒(Prion)”,作为羊瘙痒病的蛋白质传染性粒子,为此后来获得了诺贝尔奖^[59]。1985年,科学家发现了编码该病毒蛋白质序列的mRNA转录本PrP 27-30,并发现了这种朊蛋白mRNA在感染和未感染的脑组织中都有表达^[62]。科学家将瘙痒病感染动物的大脑匀浆接种到缺乏PrP的小鼠中未能诱发瘙痒病,证明了PrP参与朊病毒感染^[63]。朊病毒不会刺激体液免疫反应,提示其可能是一种无免疫原性的宿主编码蛋白^[64]。之后各种遗传和生化方法产生的朊病毒在体外和体内

的实验结果均确证朊病毒是具有传染性的、错误折叠的蛋白质^[65-66]。机体内正常编码的PrP可以错误地折叠成其病理形式以引起朊病毒宿主的疾病表型。作为最简单的真核生物, 酵母细胞中朊病毒类似因子的研究进一步支持了朊病毒假说。1994年科学家发现酵母非染色体遗传元件[URE3]是酵母蛋白Ure2p的变异形式, 并提出它是一种酵母朊病毒。进一步发现[PSI⁺]是酵母朊病毒, 是Sup35蛋白质形成错误折叠状态的朊病毒形式^[67-68]。酵母中朊病毒研究的简便性和快速性加快了科学家对哺乳动物朊病毒的研究^[69-70]。目前相对较为公认的理论是朊蛋白PrP^C发生结构转变后变为致病性蛋白PrP^{Sc}, 后者是造成朊病毒疾病发生发展以及其具备传染性的致病因素。

朊病毒致病机制是因为存在于宿主细胞内的一些正常形式的朊蛋白被致病性蛋白PrP^{Sc}诱导发生错误折叠后变成了致病朊蛋白。朊蛋白通过不断聚合, 形成聚集纤维, 然后在中枢神经细胞中堆积, 并被大量传播到细胞外, 黏附在神经细胞膜表面, 最终破坏神经细胞。此外, 朊病毒蛋白在神经元树突和其他神经细胞如小脑星状细胞以及树枝状细胞的内部引发进展性空泡化, 使得星状细胞胶质增生, 最终引起脑部产生海绵状空洞病变。根据脑部受损伤的区域不同, 朊病毒引发疾病的症状也不同。小脑感染朊病毒导致运动机能的损害, 引起共济失调症状, 而大脑皮层感染朊病毒导致记忆下降。朊病毒潜伏期较长, 且其所引发疾病的病程进展缓慢, 其最终可引起功能紊乱。该病目前无法缓解和康复, 最终可导致病人死亡。从这一点来讲, 朊病毒病与神经退行疾病如渐冻症和阿尔茨海默病等较为相似。

蛋白质聚集体是包括阿尔茨海默病和帕金森病等神经退行疾病的重要病症, 也是该类疾病的典型临床表征之一, 不同的神经退行疾病发病的主要神经/脑区不同, 其关联的蛋白质聚集体也不同^[71-72]。阿尔茨海默病影响包括海马区在内的多个脑区, 其关联的聚集体为淀粉样蛋白A β 及过度磷酸化的tau蛋白。帕金森病主要影响大脑的纹状体脑区中多巴胺神经元, 关联的蛋白质聚集体是 α 突触核蛋白累积形成的嗜酸性路易小体。肌萎缩侧索硬化症, 就是俗称的渐冻症, 影响中枢神经的运动神经元, 关联的聚集体是TDP-43、SOD1及FUS蛋白等形成的聚集体。亨廷顿病关联的是突变的HTT蛋白[多聚谷氨

酰胺HTT(polyQ HTT)]形成的聚集体^[72-73]。这些疾病相关聚集体会造成遗传物质结构、转录翻译、胞质蛋白折叠、质膜通透性和细胞外连接等的紊乱^[74]。

3 聚集体自噬的受体分子

已有科学研究表明, 神经退行疾病相关的蛋白质聚集体呈现固体状, 而相变过程介导蛋白质从液体到凝胶最后到固态的变化^[75]。最近的一项研究表明, 无序结构域的突变可以增强蛋白质的自身聚合能力, 因此破坏凝聚物的动态变化, 促进中末端即固态聚集体的形成^[76]。细胞自噬通过靶向结合并运输聚集体到溶酶体进行降解, 实现细胞内聚集体的清除。鉴于聚集体的细胞毒性, 细胞自噬对聚集体的降解可以缓解细胞毒性, 维持细胞的健康状态, 这一降解过程也就是狭义上的聚集体自噬。对聚集体自噬的研究有助于更好地理解聚集体相关疾病的发病机理, 而且可为基于聚集体自噬设计相应药物提供思路和靶点。

聚集体自噬过程的研究, 简要来讲, 主要是针对上游, 即特异聚集体如何形成以及如何动态进展到特定状态被聚集体受体分子识别, 或者逃脱受体分子的识别; 针对中游, 就是发现特异或广谱高效识别聚集体的受体分子; 针对下游, 就是研究自噬过程整体活性的调控。其中, 受体分子的揭示对于理解聚集体如何被自噬降解是至关重要的, 而且不同特性的受体分子的研究也可以推动对聚集体本质的理解。例如最近发现的CCT2受体分子特异靶向固态的聚集体的研究推动了对聚集体液体-胶状-固态的不同特性的认知。从另外一个更广的范围来讲, 细胞自噬最开始被认为是不具备选择性识别底物的特征的, 受体分子的发现也推动了对自噬的选择性的认知。

在蛋白质聚集体自噬降解之前, 细胞还有, 推测也是首先利用的机制, 分子伴侣系统和泛素-蛋白酶体系统来修复和快速降解错误折叠蛋白。因此分子伴侣网络、泛素-蛋白酶体系统和自噬是真核生物进化出的来维持细胞内蛋白质稳态的三种主要途径^[77]。此外, 细胞还可以通过分泌蛋白质聚集体来减轻聚集体毒性。一些化合物药物可以促进这种外泌作用, 例如囊泡融合激酶PIKfyve的抑制剂可以改善与蛋白质聚集相关的肌萎缩性脊髓侧索硬化症的病理变化^[78]。因此, 细胞进化出了多个不同的途径来清除蛋白质聚

集。聚集体自噬降解在维持神经系统健康和功能中发挥重要作用^[79-80]。蛋白质错误折叠和聚集可能由细胞压力(如热休克、蛋白质生物合成错误和蛋白质的老化)引起。为了减少蛋白质聚集,分子伴侣促进错误折叠蛋白进行重新折叠和恢复。当重新折叠失败时,错误折叠蛋白被泛素标记从而通过蛋白酶体进行降解^[77]。当错误折叠蛋白数量过多超出蛋白酶体降解能力或错误折叠蛋白逃离分子伴侣的修复系统时,它们形成聚集体,并成为自噬降解的底物,最终在溶酶体中被降解^[81]。

自噬分为三种途径——巨自噬、微自噬和伴侣介导的自噬。尽管所有这些途径都涉及溶酶体降解,但它们的分子机制是不同的。在微自噬中,底物通过溶酶体内陷直接进入溶酶体^[82]。在伴侣介导的自噬中,胞质蛋白质被分子伴侣识别并转运进入溶酶体^[83]。相比之下,巨自噬(也就是一般情况下定义的自噬),是底物被封闭在从头形成的双膜囊泡即自噬体中,并通过与溶酶体融合进入其中进行降解^[84]。不同类型的蛋白质聚集体具有特异的结构,并对细胞具有各种不同的影响。

简单的聚集体由少量的错误折叠蛋白组成,通常被称为低聚物,其富含暴露的疏水氨基酸模序^[85]。这个特性使此类聚集体具有高反应性特征,就是可以和细胞内其他的功能蛋白质等物质进行结合,这就是为什么此类聚集体被认为是最危险的聚集体的原因^[86]。低聚物通常具有亚稳态并继续募集结合错误折叠蛋白向高阶结构发展,形成由数量更多的低聚物组成的更紧凑的纤维结构^[87]。在该阶段的聚集体的疏水残留物更密集,可以非常稳定,在细胞中可以存在较长时间^[88]。从低聚物到纤维结构的转变过程包含许多中间体,其特点是凝聚物体积的增大和凝聚力度的提高^[85]。这种高凝聚力度也可以称为刚性。许多刚性蛋白质聚集体采用淀粉样蛋白结构,富含 β 折叠^[85]。

聚集体自噬中首先被发现的受体分子是p62(又称SQSTM1)和NBR1,其介导的聚集体自噬的主要选择性决定因素是聚集体的泛素化^[89-91]。p62和NBR1都具有可识别泛素的UBA结构域,以及介导同源和异源聚合的PB1结构域。在p62中,PB1结构域使其能够与自身的PB1结构域或NBR1的PB1结构域结合^[92]。p62-NBR1寡聚体能够将泛素化的聚集体封存在体积较大的凝聚体中^[93]。受体分子TAX1BP1

通过其SKICH结构域招募自噬核心蛋白ULK1复合物亚基FIP200(又称RB1CC1),进而促进聚集体底物区域的自噬体生成。在围绕聚集体底物生长的过程中,新生的自噬体膜被LC3蛋白修饰,而LC3蛋白与受体分子p62、NBR1和TAX1BP1中的LC3相互作用区(LC3-interacting region, LIR)结合^[84]。自噬体生成过程完成后,聚集体底物被封闭的双层膜自噬体包裹,并被运送至溶酶体。因此,受体分子通过参与聚集体识别、招募诱导自噬体生成的自噬蛋白并将聚集体募集到自噬体中,在聚集体自噬过程中起着核心作用。p62对泛素的特异亲和力是实现有效和选择性地捕获聚集体的基础,而不会针对细胞中的其他泛素化蛋白质^[94]。激酶ULK1和TBK1调节货物-受体分子与泛素化聚集体的亲和力。TBK1会使p62的403位丝氨酸磷酸化,以增加其对泛素聚集体的亲和力^[95-97]。ULK1对p62的磷酸化可将KEAP1保留在p62凝聚物中,从而将吞噬作用与氧化还原反应结合起来^[98]。ALFY(又称WDFY3)蛋白可作为聚集体自噬的支架,将p62与富含3-磷酸肌醇的自噬体膜连接起来^[99]。WDR81蛋白可以增加神经元中p62、UXT和TECPR1的聚合,后者通过结合LC3将嘌呤霉素诱导的聚集体募集到自噬体^[100]。除p62、NBR1和TAX1BP1外,泛素结合受体OPTN和Tollip也被发现可通过泛素和ATG8结合来促进蛋白质聚集体的清除^[84]。

最近研究发现了另一种涉及分子伴侣复合物TRiC亚基CCT2的聚集体自噬途径,其将末期的刚性的固态聚集体靶向自噬体^[73]。CCT2独立于TRiC复合物发挥受体分子作用,将蛋白质聚集体直接募集到LC3,促进其降解。受体分子除了可以特异识别并募集聚集体到自噬体中外,还可以促进聚集体的运动。在生理条件下,神经元的溶酶体大部分都分布在胞体中,聚集体自噬在远离胞体的突触中也很活跃,因此,受体分子介导的聚集体自噬可以将聚集体从远端突起运送到胞体中进行降解^[19]。聚集体的凝集是收集错误折叠蛋白质的关键,而这些错误折叠蛋白质在基础条件下远离神经元的胞体区。受体分子p62和ALFY在聚集体从远端突起运送到胞体运动方面发挥了重要作用。这也推动了我们对聚集体形成、自噬体生成和溶酶体降解是如何在时间和空间上协调的认知。

自噬受体分子与自噬膜蛋白Atg8/LC3、辅助

蛋白以及其他自噬蛋白相互作用来促进自噬体捕获聚集体。不同类型的自噬受体分子识别不同状态的聚集体(液相、胶状和固相)。具有泛素结合能力的受体分子可以介导液相或胶状聚集体的自噬降解, 例如Atg19和EPG-2介导胶状聚集体的自噬靶向降解^[100]。分子伴侣蛋白CCT2可以识别固相聚集体并促进其自噬降解^[73]。

4 总结和展望

尽管受体分子在维持细胞蛋白质稳态中发挥作用, 但蛋白质聚集体在各种疾病中仍然被广泛发现。在阿尔茨海默病和帕金森病中, 聚集体受体分子p62分别与疾病相关聚集体tau和 α -突触核蛋白淀粉样聚集体定位在一起。在脊髓小脑共济失调疾病和注意力缺失症大脑中也发现了聚集体的异常累积。聚集体自噬过程的分子特别是受体分子下游的自噬体生成分子招募缺陷, 或者某种特定病理条件下疾病相关聚集体过度产生或更多处于某种高细胞毒性的相变状态, 造成毒性聚集体的积累以致最终的细胞损伤或死亡。这也进一步凸显了聚集体自噬在保持细胞特别是神经元蛋白质稳态中的重要作用, 以及该途径的失调与神经退行的关联。

目前还不清楚聚集体自噬是如何整合到蛋白稳态网络中的, 特别是聚集体自噬与分子伴侣系统的联系, 而最近的分子伴侣复合体组分CCT2作为聚集体受体分子的研究初步揭示了二者之间的级联。聚集体自噬与泛素-蛋白酶体这两条降解通路之间的区别与共同点也有待进一步深入研究。此外, 我们还不清楚聚集体自噬的不同步骤是如何在神经元等复杂类型细胞中进行空间协调的, 以及不同类型的细胞和神经元之间是否存在差异。不同细胞类型中的聚集体自噬的研究, 特别是不同的聚集体的特异性和不同受体分子的存在有助于推动我们理解蛋白质聚集体自噬的本质驱动力。因此在组织特异性的细胞中, 很可能还有更多特异的受体分子和调节机制有待发现。例如酒精诱导的肝硬化就是一个非神经元蛋白聚集疾病的例子, 其特征是肝细胞中受体分子p62阳性蛋白质聚集体的累积。此外, 在免疫细胞中, 聚集体自噬也在炎症反应调控中发挥重要作用。炎症反应中的重要介导分子如NLRP3聚集形成的炎症小体通过自噬途径被降解。

尽管基因编辑纠正聚集体蛋白编码核酸序列

的方法具有前景, 但目前尚未应用于临床。而基于聚集体自噬的药物用来清除聚集体已经展现曙光。例如, 科学家已经开发出了一些小分子能介导连接酶的招募, 催化泛素链连接到目标蛋白质聚集体上, 促进受体分子p62的招募。这种策略被命名为自噬靶向融合(*autophagy-targeting chimeras*, AUTACs)。此外, 通过化学方法将病理蛋白质聚集体与受体分子拴在一起, 实现了病理聚集体的清除。科学家还开发了一些小的双功能分子将聚集体直接拴系到自噬体膜蛋白LC3上, 并将其引向自噬体。AUTACs和AUTOTACs都间接或直接利用了聚集体受体分子的活性, 包括它们与核心自噬分子和底物聚集体的相互作用。其中一些方法目前已进入临床试验阶段。利用对聚集体自噬的调节来治疗疾病和促进健康衰老的药物的研发不但可促进健康和疾病治疗, 也可推动聚集体自噬的基础研究。

参考文献 (References)

- [1] BANANI S F, LEE H O, HYMAN A A, et al. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(5): 285-98.
- [2] SAIBIL H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(10): 630-42.
- [3] DIAZ-VILLANUEVA J F, DIAZ-MOLINA R, GARCIA-GONZALEZ V. Protein folding and mechanisms of proteostasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(8): 17193-230.
- [4] HORWICH A L. Molecular chaperones in cellular protein folding: the birth of a field [J]. *Cell*, 2014, 157(2): 285-8.
- [5] HARTL F U. Molecular chaperones in cellular protein folding [J]. *Nature*, 1996, 381(6583): 571-9.
- [6] HARTL F U, BRACHER A, HAYER-HARTL M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis [J]. *Nature*, 2011, 475(7356): 324-32.
- [7] LABBADIA J, MORIMOTO R I. The biology of proteostasis in aging and disease [J]. *Annu Rev Biochem*, 2015, 84: 435-64.
- [8] SHAMSI T N, ATHAR T, PARVEEN R, et al. A review on protein misfolding, aggregation and strategies to prevent related ailments [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 105(Pt 1): 993-1000.
- [9] CHITI F, DOBSON C M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease [J]. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75: 333-66.
- [10] WANG L, MAJI S K, SAWAYA M R, et al. Bacterial inclusion bodies contain amyloid-like structure [J]. *PLoS Biol*, 2008, 6(8): e195.
- [11] WANG Q, XIE C. Microglia activation linking amyloid-beta drive tau spatial propagation in Alzheimer's disease [J]. *Front Neurosci*, 2022, 16: 951128.
- [12] MARKOSSIAN K A, KURGANOV B I. Protein folding, misfolding, and aggregation. Formation of inclusion bodies and aggregates [J]. *Biochemistry*, 2004, 43(9): 971-84.

- [13] KOPITO R R. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation [J]. *Trends Cell Biol*, 2000, 10(12): 524-30.
- [14] SALOMONS F A, MENENDEZ-BENITO V, BOTTCHER C, et al. Selective accumulation of aggregation-prone proteasome substrates in response to proteotoxic stress [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(7): 1774-85.
- [15] ESCUSA-TORET S, VONK W I, FRYDMAN J. Spatial sequestration of misfolded proteins by a dynamic chaperone pathway enhances cellular fitness during stress [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(10): 1231-43.
- [16] SATHYANARAYANAN U, MUSA M, BOU DIB P, et al. ATP hydrolysis by yeast Hsp104 determines protein aggregate dissolution and size *in vivo* [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5226.
- [17] LI P, BANJADE S, CHENG H C, et al. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins [J]. *Nature*, 2012, 483(7389): 336-40.
- [18] HOU K, LIU T, LI J, et al. Liquid-liquid phase separation regulates alpha-synuclein aggregate and mitophagy in Parkinson's disease [J]. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1250532.
- [19] AINANI H, BOUCHMAA N, BEN MRID R, et al. Liquid-liquid phase separation of protein tau: an emerging process in Alzheimer's disease pathogenesis [J]. *Neurobiol Dis*, 2023, 178: 106011.
- [20] MUKHERJEE S, SAKUNTHALA A, GADHE L, et al. Liquid-liquid phase separation of alpha-synuclein: a new mechanistic insight for alpha-synuclein aggregation associated with Parkinson's disease pathogenesis [J]. *J Mol Biol*, 2023, 435(1): 167713.
- [21] ALBERTI S, DORMANN D. Liquid-liquid phase separation in disease [J]. *Annu Rev Genet*, 2019, 53: 171-94.
- [22] ALBERTI S, GLADFELTER A, MITTAG T. Considerations and challenges in studying liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates [J]. *Cell*, 2019, 176(3): 419-34.
- [23] MOLLIEUX A, TEMIROV J, LEE J, et al. Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization [J]. *Cell*, 2015, 163(1): 123-33.
- [24] STANEK D, FOX A H. Nuclear bodies: news insights into structure and function [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 46: 94-101.
- [25] LUO Y, NA Z, SLAVOFF S A. P-bodies: composition, properties, and functions [J]. *Biochemistry*, 2018, 57(17): 2424-31.
- [26] DAVIS M, MONTALBANO A, WOOD M P, et al. Biphasic adaptation to osmotic stress in the *C. elegans* germ line [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2017, 312(6): C741-C8.
- [27] DECKER C J, PARKER R. P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(9): a012286.
- [28] KEDERSHA N, STOECKLIN G, AYODELE M, et al. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling [J]. *J Cell Biol*, 2005, 169(6): 871-84.
- [29] KHONG A, MATHENY T, JAIN S, et al. The stress granule transcriptome reveals principles of mRNA accumulation in stress granules [J]. *Mol Cell*, 2017, 68(4): 808-20.e5.
- [30] FRANZMANN T M, CZEKALLA A, WALTER S G. Regulatory circuits of the AAA+ disaggregase Hsp104 [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(20): 17992-8001.
- [31] GILKS N, KEDERSHA N, AYODELE M, et al. Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1 [J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(12): 5383-98.
- [32] KWON S, ZHANG Y, MATTHIAS P. The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response [J]. *Genes Dev*, 2007, 21(24): 3381-94.
- [33] YANG P, MATHIEU C, KOLAITIS R M, et al. G3BP1 is a tunable switch that triggers phase separation to assemble stress granules [J]. *Cell*, 2020, 181(2): 325-45.e28.
- [34] AULAS A, VANDE VELDE C. Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and FUS: a link to pathological inclusions in ALS [J]? *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 423.
- [35] CAREY J L, GUO L. Liquid-liquid phase separation of TDP-43 and FUS in physiology and pathology of neurodegenerative diseases [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 826719.
- [36] RATTI A, GUMINA V, LENZI P, et al. Chronic stress induces formation of stress granules and pathological TDP-43 aggregates in human ALS fibroblasts and iPSC-motoneurons [J]. *Neurobiol Dis*, 2020, 145: 105051.
- [37] LECHLER M C, DAVID D C. More stressed out with age? Check your RNA granule aggregation [J]. *Prion*, 2017, 11(5): 313-22.
- [38] CAMPOS-MELO D, HAWLEY Z C E, DROPELMANN C A, et al. The integral role of RNA in stress granule formation and function [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 621779.
- [39] PROTTER D S W, PARKER R. Principles and properties of stress granules [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(9): 668-79.
- [40] HIRAI Y, TOMONAGA K, HORIE M. Borna disease virus phosphoprotein triggers the organization of viral inclusion bodies by liquid-liquid phase separation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 192: 55-63.
- [41] LI M, FAN Y, LI Q, et al. Liquid-liquid phase separation promotes protein aggregation and its implications in ferroptosis in Parkinson's disease dementia [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 7165387.
- [42] WANG C, DUAN L, WANG T, et al. Newcastle disease virus forms inclusion bodies with features of liquid-liquid phase separation [J]. *Vet Microbiol*, 2023, 284: 109800.
- [43] LOPEZ-OTIN C, BLASCO M A, PARTRIDGE L, et al. Hallmarks of aging: an expanding universe [J]. *Cell*, 2023, 186(2): 243-78.
- [44] AMAN Y, SCHMAUCK-MEDINA T, HANSEN M, et al. Autophagy in healthy aging and disease [J]. *Nat Aging*, 2021, 1(8): 634-50.
- [45] JAIN S, WHEELER J R, WALTERS R W, et al. ATPase-modulated stress granules contain a diverse proteome and substructure [J]. *Cell*, 2016, 164(3): 487-98.
- [46] CASSMANN E D, GREENLEE J J. Pathogenesis, detection, and control of scrapie in sheep [J]. *Am J Vet Res*, 2020, 81(7): 600-14.
- [47] ZERR I. Laboratory diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(14): 1345-50.
- [48] UNGER H, KANGETHE R T, LIAQAT F, et al. Advances in irradiated livestock vaccine research and production addressing the unmet needs for farmers and veterinary services in FAO/IAEA member states [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 853874.
- [49] GORDON W S. Advances in veterinary research [J]. *Vet Rec*, 1946, 58(47): 516-25.
- [50] GAJDUSEK D C, ZIGAS V. Kuru: clinical, pathological and epidemiological study of an acute progressive degenerative disease of the central nervous system among natives of the Eastern

- Highlands of New Guinea [J]. *Am J Med*, 1959, 26(3): 442-69.
- [51] HADLOW W J. Neuropathology and the scrapie-kuru connection [J]. *Brain Pathol*, 1995, 5(1): 27-31.
- [52] KLATZO I, GAJDUSEK D C, ZIGAS V. Pathology of Kuru [J]. *Lab Invest*, 1959, 8(4): 799-847.
- [53] GIBBS C J Jr, GAJDUSEK D C, ASHER D M, et al. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee [J]. *Science*, 1968, 161(3839): 388-9.
- [54] BECK E, DANIEL P M, MATTHEWS W B, et al. Creutzfeldt-Jakob disease. The neuropathology of a transmission experiment [J]. *Brain*, 1969, 92(4): 699-716.
- [55] HUNTER G D, MILLSON G C. Studies on the heat stability and chromatographic behaviour of the scrapie agent [J]. *J Gen Microbiol*, 1964, 37: 251-8.
- [56] PATTISON I H. Resistance of the scrapie agent to formalin [J]. *J Comp Pathol*, 1965, 75: 159-64.
- [57] ALPER T, HAIG D A, CLARKE M C. The exceptionally small size of the scrapie agent [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1966, 22(3): 278-84.
- [58] ALPER T, CRAMP W A, HAIG D A, et al. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid [J]? *Nature*, 1967, 214(5090): 764-6.
- [59] PRUSINER S B, BOLTON D C, GROTH D F, et al. Further purification and characterization of scrapie prions [J]. *Biochemistry*, 1982, 21(26): 6942-50.
- [60] PRUSINER S B, COCHRAN S P, GROTH D F, et al. Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay [J]. *Ann Neurol*, 1982, 11(4): 353-8.
- [61] PRUSINER S B, HADLOW W J, GARFIN D E, et al. Partial purification and evidence for multiple molecular forms of the scrapie agent [J]. *Biochemistry*, 1978, 17(23): 4993-9.
- [62] CHESEBRO B, RACE R, WEHRLY K, et al. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain [J]. *Nature*, 1985, 315(6017): 331-3.
- [63] MOORE R C, HOPE J, MCBRIDE P A, et al. Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent [J]. *Nat Genet*, 1998, 18(2): 118-25.
- [64] PRUSINER S B, GROTH D, SERBAN A, et al. Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(22): 10608-12.
- [65] DELEAULT N R, GEOGHEGAN J C, NISHINA K, et al. Protease-resistant prion protein amplification reconstituted with partially purified substrates and synthetic polyanions [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(29): 26873-9.
- [66] JACKSON W S, BORKOWSKI A W, FAAS H, et al. Spontaneous generation of prion infectivity in fatal familial insomnia knockin mice [J]. *Neuron*, 2009, 63(4): 438-50.
- [67] GLOVER J R, KOWAL A S, SCHIRMER E C, et al. Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI⁺], a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae* [J]. *Cell*, 1997, 89(5): 811-9.
- [68] CHERNOFF Y O, LINDQUIST S L, ONO B, et al. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi⁺] [J]. *Science*, 1995, 268(5212): 880-4.
- [69] LIEBMAN S W. Prions. The shape of a species barrier [J]. *Nature*, 2001, 410(6825): 161-2.
- [70] CASCARINA S M, ROSS E D. Yeast prions and human prion-like proteins: sequence features and prediction methods [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(11): 2047-63.
- [71] ALBERTI S, HYMAN A A. Biomolecular condensates at the nexus of cellular stress, protein aggregation disease and ageing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(3): 196-213.
- [72] ROSS C A, POIRIER M A. Protein aggregation and neurodegenerative disease [J]. *Nat Med*, 2004, 10 Suppl: S10-7.
- [73] MA X, LU C, CHEN Y, et al. CCT2 is an aggrephagy receptor for clearance of solid protein aggregates [J]. *Cell*, 2022, 185(8): 1325-45, e22.
- [74] OLZSCHA H, SCHERMANN S M, WOERNER A C, et al. Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions [J]. *Cell*, 2011, 144(1): 67-78.
- [75] PESKETT T R, RAU F, O'DRISCOLL J, et al. A liquid to solid phase transition underlying pathological huntingtin exon1 aggregation [J]. *Mol Cell*, 2018, 70(4): 588-601, e6.
- [76] ZHOU X, SUMROW L, TASHIRO K, et al. Mutations linked to neurological disease enhance self-association of low-complexity protein sequences [J]. *Science*, 2022, 377(6601): eabn5582.
- [77] HIPPI M S, KASTURI P, HARTL F U. The proteostasis network and its decline in ageing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(7): 421-35.
- [78] HUNG S T, LINARES G R, CHANG W H, et al. PIKfyve inhibition mitigates disease in models of diverse forms of ALS [J]. *Cell*, 2023, 186(4): 786-802, e28.
- [79] HARA T, NAKAMURA K, MATSUI M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice [J]. *Nature*, 2006, 441(7095): 885-9.
- [80] KOMATSU M, WAGURI S, CHIBA T, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice [J]. *Nature*, 2006, 441(7095): 880-4.
- [81] DIKIC I. Proteasomal and autophagic degradation systems [J]. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86: 193-224.
- [82] YAMAMOTO H, ZHANG S, MIZUSHIMA N. Autophagy genes in biology and disease [J]. *Nat Rev Genet*, 2023, 24(6): 382-400.
- [83] KAUSHIK S, CUERVO A M. The coming of age of chaperone-mediated autophagy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(6): 365-81.
- [84] ADRIAENSSENS E, FERRARI L, MARTENS S. Orchestration of selective autophagy by cargo receptors [J]. *Curr Biol*, 2022, 32(24): R1357-R71.
- [85] KNOWLES T P, VENDRUSCOLO M, DOBSON C M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(6): 384-96.
- [86] LASAGNA-REEVES C A, CASTILLO-CARRANZA D L, SENGUPTA U, et al. Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease [J]. *FASEB J*, 2012, 26(5): 1946-59.
- [87] CREMADES N, COHEN S I, DEAS E, et al. Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of alpha-synuclein [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1048-59.
- [88] BRAAK H, THAL D R, GHEBREMEDHIN E, et al. Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2011, 70(11): 960-9.
- [89] BJORKOY G, LAMARK T, BRECH A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a pro-

- protective effect on huntingtin-induced cell death [J]. *J Cell Biol*, 2005, 171(4): 603-14.
- [90] KIRKIN V, LAMARK T, SOU Y S, et al. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates [J]. *Mol Cell*, 2009, 33(4): 505-16.
- [91] SUN D, WU R, ZHENG J, et al. Polyubiquitin chain-induced p62 phase separation drives autophagic cargo segregation [J]. *Cell Res*, 2018, 28(4): 405-15.
- [92] LAMARK T, PERANDER M, OUTZEN H, et al. Interaction codes within the family of mammalian Phox and Bem1p domain-containing proteins [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(36): 34568-81.
- [93] TURCO E, SAVOVA A, GERE F, et al. Reconstitution defines the roles of p62, NBR1 and TAX1BP1 in ubiquitin condensate formation and autophagy initiation [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5212.
- [94] WURZER B, ZAFFAGNINI G, FRACCHIOLLA D, et al. Oligomerization of p62 allows for selection of ubiquitinated cargo and isolation membrane during selective autophagy [J]. *eLife*, 2015, 4: e08941.
- [95] LIM J, LACHENMAYER M L, WU S, et al. Proteotoxic stress induces phosphorylation of p62/SQSTM1 by ULK1 to regulate selective autophagic clearance of protein aggregates [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11(2): e1004987.
- [96] MATSUMOTO G, WADA K, OKUNO M, et al. Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins [J]. *Mol Cell*, 2011, 44(2): 279-89.
- [97] PILLI M, ARKO-MENSAH J, PONPUAK M, et al. TBK-1 promotes autophagy-mediated antimicrobial defense by controlling autophagosome maturation [J]. *Immunity*, 2012, 37(2): 223-34.
- [98] ICHIMURA Y, WAGURI S, SOU Y S, et al. Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy [J]. *Mol Cell*, 2013, 51(5): 618-31.
- [99] FILIMONENKO M, ISAKSON P, FINLEY K D, et al. The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alf1 [J]. *Mol Cell*, 2010, 38(2): 265-79.
- [100] LIU X, LI Y, WANG X, et al. The BEACH-containing protein WDR81 coordinates p62 and LC3C to promote autophagy [J]. *J Cell Biol*, 2017, 216(5): 1301-20.