

Альтернативные убиквитин-конъюгирующие ферменты E2 регулируют эндоцитоз рецептора интерферона-1

Christopher J. Carbone, Hui Zheng, Serge Y. Fuchs

Отдел биологии животных; Центр сравнительной онкологии Мари Лоу, Университет Пенсильвании, 380 S. University Avenue, Hill 316, Philadelphia, PA 19104, USA

Контакты: Serge Y. Fuchs syfuchs@vet.upenn.edu

Автор перевода: Геннадий Альтерович Белицкий

Убиквитинирование сигнальных рецепторов, вызывающее их эндоцитоз, направлено на подавление передачи сигнала. Деградикация рецептора интерферона 1-го типа (IFN1) на поверхности клетки осуществляется путем убиквитинирования комплекса лиганда с рецептором (IFNAR1). Принято считать, что убиквитинирование способствует взаимодействию между линейным мотивом комплекса IFNAR1 и соответствующими структурами системы эндоцитоза, однако механизм этого процесса остается неясным. В данной работе изучена роль двух различных акцепторных сайтов убиквитина на этом рецепторе. Предпочтительное полиубиквитинирование сайтов Lys501 и Lys525/526 обеспечивается посредством Lys63- или Lys48-связанных цепей (K63-Ub и K48-Ub соответственно). Несмотря на то, что убиквитинлигаза SCF^{FBTRCP} E3 контролирует оба типа убиквитин-зависимого эндоцитоза IFNAR1, специфика этих процессов определяется двумя различными убиквитин-конъюгирующими ферментами E2 – Ubc13 и Cdc34. Эти ферменты могут непосредственно использоваться убиквитинлигазой SCF^{FBTRCP} E3 для создания K63-Ub или K48-Ub *in vitro*. Ubc13 принимает участие в эндоцитозе IFNAR1 путем модификации Lys501 с помощью K63-Ub, в то время как K48-Ub-специфичный Cdc34 изменяет эндоцитоз посредством конъюгации с убиквитином, которая происходит на Lys525/526. Совместный эффект обоих воздействий максимально стимулирует эндоцитоз IFNAR1, который обычно ингибирован конформационным несоответствием, связанным с наличием консервативного Pro470 во внутриклеточном домене IFNAR1.

Мы предлагаем модель, в которой эффекты обоих ферментов E2 объединяют отдельные составляющие системы полиубиквитинирования, обеспечивая им взаимодействие с внутриклеточным доменом IFNAR1 при оптимальном пространственном расположении, что дает наибольшую скорость эндоцитоза рецептора.

Ключевые слова: IFNAR, интерферон, рецептор, убиквитин, эндоцитоз, E2

Endocytosis of the IFNAR1 chain of Type 1 interferon receptor is regulated by diverse E2 ubiquitin conjugation enzymes

Christopher J. Carbone, Hui Zheng, Serge Y. Fuchs

Department of Animal Biology and Mari Lowe Center for Comparative Oncology, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, 380 S. University Avenue, Hill 316, Philadelphia, PA 19104, USA

Ubiquitination of signaling receptors triggers their endocytosis to restrict the extent of cell signaling. Type 1 interferon (IFN1) eliminates its receptor from cell surface via stimulating the ubiquitination of its IFNAR1 chain. While it was suggested that this ubiquitination aids IFNAR1 internalization via relieving a steric hindrance of a linear motif within IFNAR1 from the endocytic machinery, the mechanisms involved remain poorly understood. Here we describe a specific role for two disparate ubiquitin acceptor sites within this receptor. These sites, Lys501 and Lys525/526, exhibit a preference for polyubiquitination via either Lys63- or Lys48-linked chains (K63-Ub and K48-Ub, respectively). Whereas the SCF^{FBTRCP} E3 ubiquitin ligase controls either type of ubiquitination-dependent IFNAR1 endocytosis, the specificity of these processes is determined by two different E2 ubiquitin conjugating enzymes, Ubc13 and Cdc34. These enzymes can be directly used by SCF^{FBTRCP} E3 ubiquitin ligase to generate either K63-Ub or K48-Ub *in vitro*. Ubc13 is involved in IFNAR1 endocytosis driven by the K63-Ub modification of Lys501, whereas the K48-Ub-specific Cdc34 affects receptor endocytosis via ubiquitin conjugation that occurs on Lys525/526. Both types of linkages combine to maximize IFNAR1 endocytosis otherwise suppressed by unfavorable conformation dependent on the presence of a conserved Pro470 within the intracellular domain of IFNAR1. We propose a model where alternate utilization of both E2s to assemble diverse polyubiquitin linkages cooperates to achieve IFNAR1 intracellular domain conformations and spatial arrangements that favor a maximal rate of receptor endocytosis.

Key words: IFNAR, interferon, receptor, ubiquitin, endocytosis, E2

Введение

Эндоцитоз сигнальных рецепторов клеточной поверхности является основным механизмом, который контролирует способность этих рецепторов взаимодействовать с аффинными внеклеточными лигандами, ограничивая выраженность и длительность реакции клетки на эти лиганды. Одной из посттрансляционных

модификаций, способствующих этому, является убиквитинирование белка. Процесс ковалентного присоединения к нему полипептидов убиквитина происходит в результате каскада ферментативных реакций, опосредованных убиквитин-активирующими ферментами (E1), убиквитин-конъюгирующими ферментами (E2) и убиквитинлигазой (E3) [1]. Убиквитинирование

рецепторов является центральным механизмом, определяющим эффективность их эндоцитоза и, соответственно, ингибирование функций [2–4].

Тип убиквитинирования (моноубиквитинирование или полиубиквитинирование с топологией полиубиквитиновой цепи) а также вариант интернализации и/или постинтернализационной сортировки определяются в значительной степени типом рецептора. Многочисленные исследования показали, что полиубиквитинирование по Lys63-связанной цепочке играет большую роль в регуляции эндоцитоза многих белков клеточной поверхности, в том числе урацилпермеазы [5], рецептора фактора роста нервов TrkA [6], белков МНС класса II [7], рецепторов пролактина [8], химерных белков эндоцитоза [9], IFNAR1 рецептора интерферона 1-го типа (IFN1) и др. [10].

Интересно, что скорость эндоцитоза IFNAR1, рецептора, который играет ключевую роль в IFN1-сигнализации [11–13], оказалась чувствительной к гиперэкспрессии мутантов убиквитина K63R и K48R. Это вызвало предположение о том, что для полиубиквитинирования необходимы оба лизина, как Lys63, так и Lys48 (K63-Ub и K48-Ub) [10]. IFNAR1 является субстратом для SCF^{βTrcp} убиквитинлигазы E3, которая взаимодействует с рецептором после его фосфорилирования по определенному фосфодегрону [14, 15] и способна присоединить как K63-Ub, так и K48-Ub к IFNAR1 *in vitro* [10]. Убиквитинирование может произойти по многим остаткам Lys внутриклеточного домена IFNAR1, но наибольшее число конъюгатов с убиквитином приходится на кластер из трех лизинов (Lys501, Lys525 и Lys526) [14], наличие которого необходимо для эффективного эндоцитоза IFNAR1 [10]. Убиквитинирование по данной совокупности также обнажает смежный линейный эндоцитозный мотив, связанный с Tyr466, который блокирован IFNAR1-связанной TYK2 Janus-киназой. В результате данный мотив может взаимодействовать с комплексом адаптина AP2 с последующей интернализацией по клатрин-зависимому пути [10, 16]. Хотя эти исследования говорят в пользу схемы, по которой убиквитинирование IFNAR1 приводит к диссоциации TYK2 или конформационным изменениям в пределах внутриклеточного домена IFNAR1 [17, 18], многие важные вопросы остаются без ответа.

Масс-спектрометрический анализ показал присутствие K63-Ub и K48-Ub на диком типе IFNAR1 [10], однако остается неясным, необходима ли сборка обоих типов убиквитиновых цепей (или смешанных цепей) на IFNAR1 или на гипотетическом регуляторе эндоцитоза. Кроме того, предстоит еще выявить факторы, определяющие специфику топологии конкретных убиквитиновых акцепторов в кластерах Lys501, 525, 526 и конкретных конъюгирующих ферментах E2, используемых SCF^{βTrcp} лигазой E3. Таким образом, механизм, с помощью которого каждый тип убиквитинирования вносит свой вклад в регулирование IFNAR1

эндоцитоза, остается в значительной степени неизученным.

Целью данной работы было изучение конкретной роли конъюгирующих ферментов E2, связанных с K63-Ub или K48-Ub на различных акцепторах лизина IFNAR1, в интернализации этого рецептора. Наши данные показывают, что комбинированное воздействие обоих типов связей максимизирует скорость IFNAR1-интернализации, и позволяют предположить, что убиквитинирование IFNAR1 дает возможность внутриклеточному домену этого комплекса принять пространственную конформацию, благоприятную для его эндоцитоза.

Методика эксперимента

Плазмиды и клетки

Конструкции для экспрессии HA-меченного дикого типа, K48R и K63R убиквитина [19] были любезно предоставлены Йосефом Йорденом (Институт им. Вейцмана). Конструкция для экспрессии IFN-стимулированного элемента ответа (ISRE), обусловленного люциферазой [20], любезно предоставлена Куртом Хорватом (Северо-Западный университет). Экспрессионный вектор человеческого IFNAR2 был любезно предоставлен Джоном Кролевски (Калифорнийский университет в Ирвайне). Конструкция для экспрессии доминантно-негативного мутанта Ubc13^{C87A} была предоставлена Чжи Дж. Ченом (Юго-западный медицинский центр Университета Техаса). Векторы для экспрессии N-терминального FLAG-меченного человеческого IFNAR1 (дикого типа и мутантов K501, 525, 526R) были описаны ранее [10]. Эти плазмиды послужили в качестве основы для генерации дополнительных конструкций N-FLAG-IFNAR1 для экспрессии мутантов K501R и K525, 526 с помощью сайт-направленного мутагенеза; результаты были подтверждены секвенированием ДНК. Конструкты shPHK для разрушения βTrcp были описаны ранее [8, 21]. Олигонуклеотиды siPHK для разрушения Cdc34 и Ubc13 были получены от компании Сигма.

Эмбриональные клетки почки человека 293T, эмбриональные фибробласты мыши и клетки линии HeLa (ATCC) растили в модифицированной по Дульбекко среде Игла с 10 % термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки с добавлением пенициллина и стрептомицина. Стабильные U2OS-производные клеточной линии для внесения убиквитина или мутантов Ubc13 были любезно предоставлены Чжи Дж. Ченом. Эти клетки хранили и использовали, как описано ранее [22]. Добавление тетрациклина (1 мкг/мл в течение 72 ч) к этим клеткам подавляет экспрессию эндогенного убиквитина или эндогенного Ubc13 одновременно с индукцией экспрессии экзогенной PHK-интерференции резистентного убиквитина (дикого типа или мутанта K63R) или Ubc13 (дикого типа или каталитически неактивного мутанта C87A). Трансфекцию производили с помощью липофектамина

плюс, липофектамина 2000 или олигофектамина (Инвитроген) в зависимости от типа клеток и эксперимента. Для всех трансфекций пустые векторы были включены в смеси, чтобы поддерживать одинаковое количество трансфицированных ДНК.

Реактивы, антитела, анализ по гену-репортеру и иммунологический метод

Мышиный интерферон- β и человеческий интерферон- α (IFN α 2) (роферон) были приобретены у компаний Рош и ПВЛ. Циклогексимид и другие химические соединения были приобретены у компании Сигма. Также были приобретены антитела против FLAG (M2, Сигма), убиквитин (FLys2, Биомол), HA (12CA5, Рош Берингер Маннхайм). Вторичные антитела были получены от Инвитроген и Рош Берингер Маннхайм. Иммунопреципитация и процедуры иммуноблоттинга были описаны ранее [23–25].

Для анализа репортерных генов эмбриональные фибробласты мыши котрансфицировали с помощью плазмид, кодирующих человеческий IFNAR2, ISRE-люциферазы светляков (с вектором для конститутивной экспрессии люциферазы Renilla), а также различных человеческих IFNAR1-конструкций. Спустя 24 ч после трансфекции клетки обрабатывали человеческим IFN α или мышинным IFN β (2000 ЕД/мл) в течение 30 мин. Затем среду удаляли, клетки инкубировали в течение 24 ч без интерферона, после чего определяли активность люциферазы с использованием системы двойного анализа репортерного гена люциферазы (Промега). Данные (нормированные до активности люциферазы Renilla) от трех независимых экспериментов (каждый в пяти повторах) представлены в произвольных единицах измерения в виде среднего значения с указанием ошибки среднего ($M \pm SE$). Значения p были рассчитаны с использованием двустороннего t -критерия Стьюдента.

Анализ убиквитинирования IFNAR1

Реакции лигирования убиквитина *in vitro* проводили, как описано ранее [24], с помощью SCF^{TRIP}, выделенного из клеток 293Т по методике [26], и рекомбинантного E2s, включая рекомбинантный Cdc34 ([27], дар от Чжэнь-Цян Пан, Школа медицины Маунт-Синай) или 6His-Ubc13/Uve1 ([28, 29], дар от Зеев Ронаи, Институт Бернэм). Упакованные сферы (10 мкл), содержащие иммобилизованный SCF^{TRIP}-HA, инкубировали с E1 (20 пмоль), mCdc34 или 6His-Ubc13/Uve1 (1 нмоль) в реакционной смеси (общий объем 30 мкл), содержащей 50 мМ Tris-HCl pH 7,4, 5 мМ MgCl₂, 2 мМ NaF, 2 мМ аденозинтрифосфата, 0,6 мМ дитиотреитола и 1 мкг убиквитина. Смесь инкубировали при температуре 37 °С в течение 60 мин, кипятили в 20 мкл загрузочного буфера Лэммли, разделяли на полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия и анализировали с помощью иммуноблоттинга.

Для оценки убиквитинирования IFNAR1 *in vivo* образцы IFNAR1, меченные FLAG, были экспресси-

рованы в клетках 293Т. Анализируемые образцы клеток лизировали в смеси 1 % NP40, 50 мМ Tris pH 7,6, 150 мМ NaCl, 1 мМ NaVO₄, 1 мМ фенолметансульфанилфторида, 2,5 мМ этилендиаминтетраацетата, содержащей смесь ингибиторов протеаз (1:500; Сигма), 1 мМ NaF и 20 мМ N-этилмалеимида. Концентрацию белка определяли по связыванию красителя Брэдфорда. Равные количества лизатов белка инкубировали с глобулами, связанными с M2, для образования иммунопреципитата IFNAR1, меченного FLAG. Образцы промывали 3 раза с помощью 50 мМ Tris pH 7,4, 5 % глицерина, 1 М NaCl и 1 раз с помощью 50 мМ Tris pH 7,4, 5 % глицерина, 150 мМ NaCl, и после кипячения в буфере Лэммли, содержащем додецилсульфат натрия, аликвоту от каждой пробы анализировали с помощью иммуноблоттинга M2 FLAG, чтобы нормализовать уровни рецептора. На основании нормализации количества лизатов, которые дают сопоставимые уровни IFNAR1, были разделены электрофорезом в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфата натрия и проанализированы с помощью иммуноблоттинга с использованием антитела антиубиквитина (Биомол) или цепь-специфических антител антиполиубиквитинов K63-Ub или K48-Ub (Миллипор).

Анализ интернализации IFNAR1

Интернализацию эндогенного или экзогенно экспрессированного IFNAR1 определяли, используя способ на основе флуоресцентного метода, ранее подробно описанного [10, 16]. Клетки в 60-мм чашках трансфектировали с помощью указанных конструкций или индуцировали с помощью тетрациклина и высевали в одинаковом количестве на 24 луночные поли-D-лизиновые чашки (Бектон Дикинсон). Клетки содержали на бессывороточной среде Игла, модифицированной по Дульбекко, и либо обрабатывали IFN α 2a в течение определенного времени, либо хранили на льду и не подвергали воздействию IFN α 2a (временная точка 0). Спустя различное время клетки промывали, блокировали и инкубировали с помощью анти-IFNAR1 AA3 антител [30] или анти-FLAG M2 антителами. Первичные антитела удаляли и клетки интенсивно промывали перед добавлением козьих антимышиных IgG H + L антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. После следующей промывки клетки инкубировали с помощью AmplexRed Ultra Reagent 10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазина (Molecular Probes). Аликвоты помещали в черную 96-луночную плашку (NUNC) и измеряли флуоресценцию, считывая ее с помощью индикаторной пластинки ридера Beckman Coulter DTX880 Mutimode с использованием фильтров с длиной волны 530 нм для возбуждения и 590 нм для излучения. Результаты рассчитывали по следующей формуле:

$$\% \text{ интернализации} = 100 - \frac{(V_s - V_b) \times t_n}{(V_s - V_b) \times t_0} \times 100,$$

где V_s – показатели образцов; V_b – показатели фона (ложнотрансфицированные или исследованные с помощью нерелевантных антител); t_n – временная точка n ; t_0 – временная точка 0.

Результаты

Поскольку SCF^{βTcr} E3-лигаза активно использует Cdc34 убиквитин-конъюгирующий фермент E2 для K48-Ub протеасомальных субстратов, таких как IκBα [27], мы предположили, что он нужен для убиквитинирования IFNAR1 и эндоцитоза. С другой стороны, специфичное убиквитинирование белков по K63 *in vitro* может быть достигнуто с помощью ряда ферментов E2, при том что убиквитин-конъюгирующий фермент 13 (Ubc13 в комплексе с Uev1A либо MMS2) оказался наиболее активным как при образовании этих связей *in vivo*, так и в K63-зависимых процессах, таких как ДНК-рекомбинация [31], репарация [32] и активация путей передачи сигнала [33–35].

В качестве подхода мы использовали РНК-интерференцию, чтобы определить роль этих E2s в убиквитинировании и интернализации IFNAR1. Нокдаун Cdc34, который ингибировал K48-Ub IFNAR1, оценивали с помощью иммуоблоттинга, используя специфическое антитело (рис. 1а). И наоборот, K63-Ub IFNAR1 инактивировали в клетках РНК-интерференцией против Ubc13 (см. рис. 1а). Поскольку SCF^{βTcr} был способен использовать любой из этих ферментов для цепь-специфического лигирования убиквитина *in vitro* (рис. 1б), можно полагать, что и в клетках как Cdc34, так и Ubc13 могут вносить свой вклад в процесс убиквитинирования IFNAR1 посредством K48-Ub и K63-Ub. Соответственно, нокдаун Cdc34 либо Ubc13 заметно замедлял кинетику интернализации эндогенного IFNAR1 в клетках 293Т (рис. 1в). Кроме того, экспрессия доминантно-негативного мутанта Ubc13 (Ubc13^{C87A} [22]) ингибировала скорость интернализации N-терминального FLAG-меченного дикого типа IFNAR1 (рис. 1г). В совокупности эти данные позволяют предположить, что для максимальной скорости эндоцитоза IFNAR1 необходимы как Cdc34, так и Ubc13.

Далее мы стремились охарактеризовать кластер акцепторов убиквитина в пределах IFNAR1. Хотя было известно, что тройной мутант K501R/K525R/K526R (IFNAR1^{3KR}) обладает низкой способностью к общему убиквитинированию [14], интернализации и направленной миграции к лизосомам [10], а также деградации [14], роль специфичных акцепторов оставалась неясной. Вначале мы исследовали гипотетический канонический участок, представленный дублетом Lys525/526, расположенным на 9–10 аминокислотных остатков ближе к участку связывания βTcr₅₃₄ (DSGNYS). Этот участок напоминает акцептор убиквитина Lys21/22 в IκBα (рис. 2а) и подходит под описание предпочтительных акцепторов убиквитина для SCF^{βTcr} E3-лигазы [36]. Ранее был отмечен низкий уровень

интернализации мутанта IFNAR1^{3KR} [10]. Интересно, что мутация канонического (Lys525/526) или дополнительного (Lys501) участка давала промежуточный фенотип; эти мутанты эндоцитировались медленнее, чем дикий IFNAR1, но быстрее, чем мутант IFNAR1^{3KR} (рис. 2б). Это показывает, что на акцепторном кластере убиквитина оба участка – Lys525/526 и Lys501 способствуют максимальной скорости IFNAR1-эндоцитоза.

Основываясь на этих результатах, мы решили узнать, играет ли роль в регуляции стабильности и сигнализации IFNAR1 его убиквитинирование по каноническим или дополнительным сайтам. Протеолиз FLAG-IFNAR1 оценивали с помощью анализа циклогексимида. Мутант IFNAR1^{3KR}, лишенный канонических и дополнительных сайтов, имел более длительный период полураспада по сравнению с белком дикого типа (рис. 2в). Этот результат согласуется с ранее полученными данными [14]. Промежуточная скорость деградации наблюдалась как для мутантов K501R, так и K525/526R (см. рис. 2в), указывая на то, что убиквитинирование канонических и дополнительных сайтов способствует эффективной деградации IFNAR1.

Чтобы проверить функциональную активность этих мутантов, мы коэкспрессировали их вместе с человеческим IFNAR2 в фибробласты эмбриона мыши и оценили активацию стимулированного интерфероном ответа люциферазы. Экспрессия белков человека IFNAR1 не влияла на индукцию люциферазы мышечным IFNβ, который функционирует за счет эндогенного мышечного рецептора IFN1 (рис. 2г, синие полосы). Это свидетельствует о том, что уменьшение активации сигнального пути рецепторов IFN не сильно нарушается экспрессией этих белков человека. В то же время экспрессия дикого типа человеческого IFNAR1 задействует трансактивацию люциферазы с помощью короткого воздействия импульса с человеческим IFNα; экспрессия мутанта IFNAR1^{3KR} значительно увеличивала чувствительность клеток мыши по отношению к человеческому IFN1. IFNAR1-мутанты, дефектные по каноническим или дополнительным сайтам, значительно увеличили влияние человеческого IFNα (см. рис. 2г, черные полосы). Эти результаты показывают, что убиквитинирование на канонических или дополнительных сайтах способствует ослаблению клеточных ответов на IFN1, вероятно, посредством регулирования IFNAR1 эндоцитоза и деградации.

В соответствии с ранее показанной ролью βTcr2 в убиквитинировании эндогенного IFNAR1 [10, 15], нокдаун этого белка заметно снизил уровень убиквитинирования FLAG-IFNAR1^{WT} (рис. 3а). Кроме того, эндоцитоз дикого типа IFNAR1 был также нарушен в клетках с РНК-интерференцией против βTcr2 (рис. 3б). Важно отметить, что убиквитинирование и интернализация мутантов IFNAR1, дефектных по K525/526 или K501, были также подавлены после нокдауна βTcr2 (см. рис. 3а, б). Этот результат позволяет

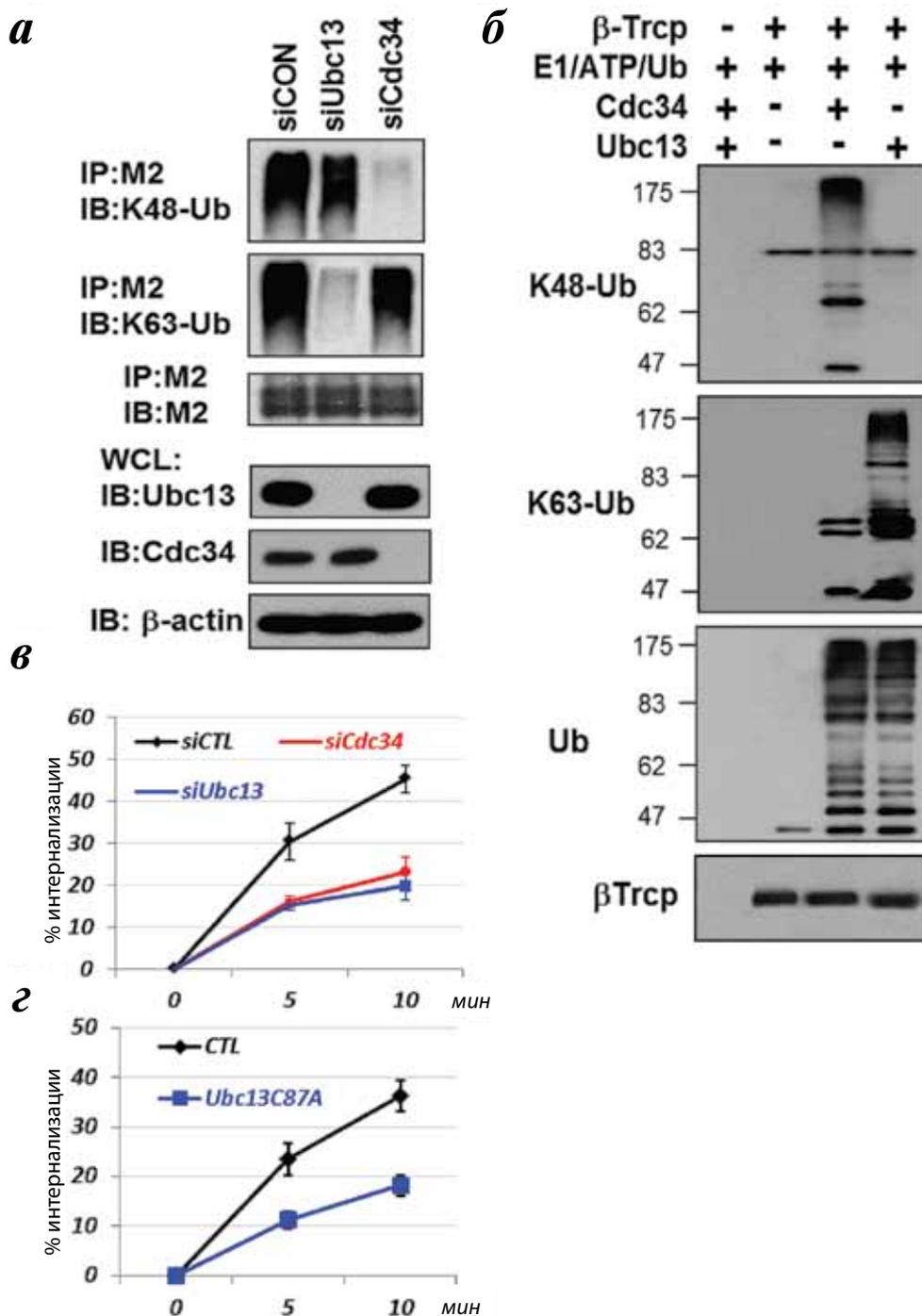


Рис. 1. Роль *Cdc34* и *Ubc13* в убиквитинировании *IFNAR1* и эндоцитозе:
а – специфическое полиубиквитинирование белков FLAG-*IFNAR1* (очищенных от *IFN α* -стимулированного 293Т с помощью иммунопреципитации) анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против FLAG (M2), а также антител против K63-Ub и K48-Ub, а также антител против FLAG (M2). Уровни белков эндогенного *Ubc13* или *Cdc34* в лизатах цельных клеток (WCL) были измерены с помощью иммуноблоттинга с использованием указанных антител. Иммуноблот для β -актина включен в качестве контроля;
б – *in vitro* реакцию лигирования убиквитина, катализируемую SCF ^{β Trcp} E3-убиквитинлигазой (опушено в качестве отрицательного контроля в левой полосе) в присутствии *Cdc34* или комплекса *Ubc13/UEV1*, анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против убиквитина Lys63 и Lys48, а также антител против неспецифических цепей убиквитина (Ub). Были также проанализированы уровни β Trcp;
в – влияние нокадауна *Cdc34* или *Ubc13* на интернализацию эндогенного *IFNAR1* в клетках 293Т, обработанных *IFN α* (6000 ЕД/мл) в течение указанного времени, оценивали с помощью анти-*IFNAR1* AA3 антител и выражали в процентах от потери иммунореактивности клеточной поверхности, рассчитанной из трех независимых экспериментов (каждый в пяти повторениях) в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего;
г – кинетику интернализации FLAG-*IFNAR1* в клетках 293Т, которые получали контрольный вектор (ЦТЛ, *pcDNA3*) или вектор для экспрессии мутанта *Ubc13^{C87A}*, обработанного *IFN α* (6000 ЕД/мл) в течение указанного времени, оценивали с помощью анти-FLAG-антител и выражали в процентах от потери иммунореактивности клеточной поверхности, рассчитанной из трех независимых экспериментов (каждый в пяти повторениях) в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего

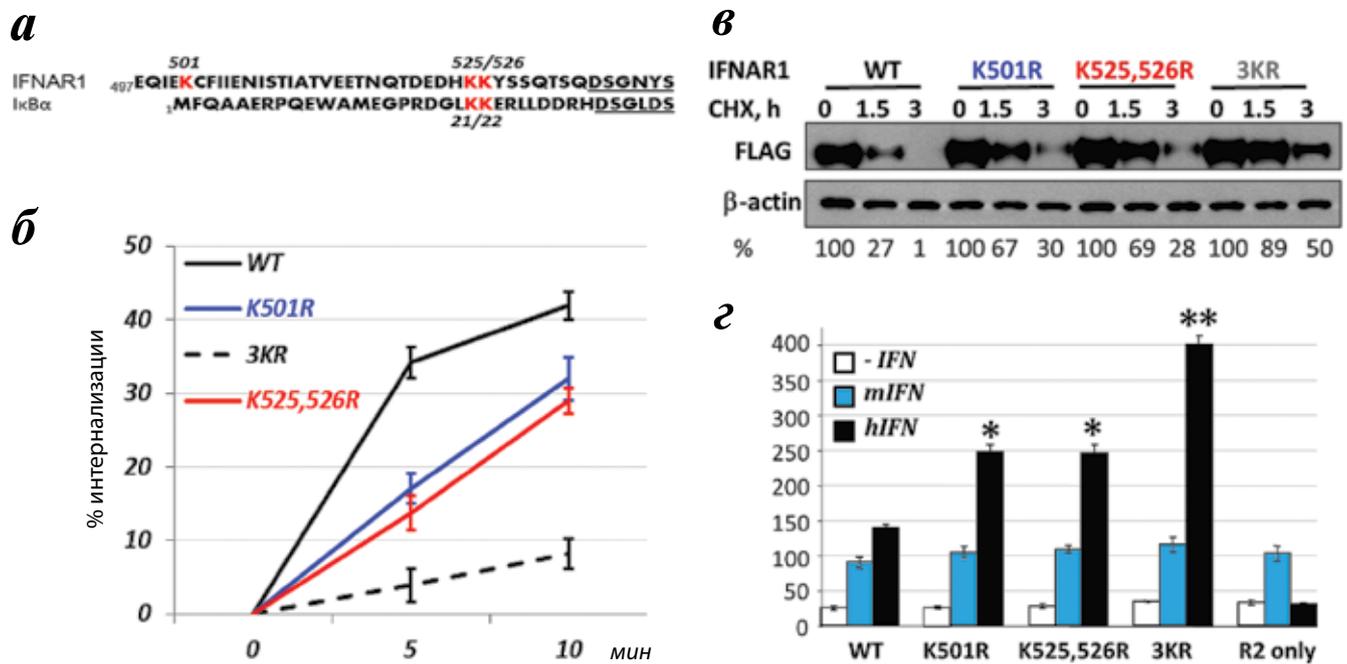


Рис. 2. Роль специфических акцепторных сайтов убиквитина в интернализации и деградации IFNAR1 и IFNAR1-опосредованной сигнальной системы IFN:

а – сходства первичных детерминантов сайта мобилизации βTrcp и предполагаемых акцепторных участков убиквитина IFNAR1 и IkBα человека; **б** – показатели интернализации FLAG-меченных белков IFNAR1, экспрессированных в клетках 293T, после обработки IFNα (6000 ЕД/мл) в течение указанного времени оценивали с помощью анти-FLAG-антител и выражали в процентах от потери иммуореактивности клеточной поверхности, полученных в трех независимых экспериментах (каждый в пяти повторениях) в качестве среднего значения ± стандартная ошибка среднего; **в** – оборот белков FLAG-IFNAR1 определяли в клетках 293T, обработанных IFNα (6000 МЕ/мл) и циклогексимидом (CHX, 20 мкг/мл) в течение указанного времени. Процент оставшегося сигнала IFNAR1 (нормализованный относительно сигнала β-актина) по отношению к временной точке «0» (принятой за 100 %) изображен ниже;

г – относительная активность люциферазного репортера ISRE в мышинных эмбриональных фибробластах, обработанных человеческим IFNAR2 (R2) и экспрессирующим человеческий конструктор IFNAR1, представлена в контроле (пунктир), с добавлением мышинного IFNβ (синие линии) или человеческого IFNα (черные линии). Нормированные (по активности люциферазы Renilla) значения из трех независимых экспериментов представлены в произвольных единицах. Расчетное значение $p < 0,002$ было получено по сравнению с WT-рецептором (*) либо с WT, K501R или мутантами K525, 526 (**)

предположить, что SCF^{βTrcp} отвечает за убиквитинирование как канонических, так и дополнительных участков IFNAR1 и что эффективный эндоцитоз IFNAR1 зависит от согласованного убиквитинирования этих участков, регулируемых той же E3-убиквитинлигазой.

Поскольку наличие мутаций как в канонических, так и в дополнительных сайтах незначительно изменяло общее убиквитинирование IFNAR1 (см. рис. 3а), но заметно влияло на его интернализацию (см. рис. 2б, 3б), деградацию (см. рис. 2в) и сигнализацию (см. рис. 2г), нельзя исключить качественное различие в последствиях убиквитинирования этих сайтов. В самом деле, количественный масс-спектрометрический анализ связей полиубиквитина показал, что диккий тип IFNAR1 связан с цепями как K63-Ub, так и K48-Ub [10], однако большее количество K63-Ub-связей было найдено на мутанте K525, 526R (65 ± 18 фмоль в FLAG-IFNAR1^{K525, 526R} по сравнению с 3 ± 0 фмоль в FLAG-IFNAR1^{K501R} (Ch.J. Carbone, S.Y. Fuchs, неопубликованные данные). Недавнее создание антител, специфичных к топологии убиквитиновых цепей, дало возможность подтвердить этот вывод. Исследование иммуноблотов, содержащих очищенные иммуносорб-

ционным методом белки IFNAR1 с полиубиквитиновыми цепь-специфическими антителами, позволило обнаружить оба типа цепей на диком типе IFNAR1 (см. рис. 1а, 3в). Интересно, что мутация канонического участка (Lys525, 526) снизила уровни K48-Ub, в то время как мутант IFNAR1, лишенный дополнительного сайта (Lys501), практически не дал специфического сигнала на связывание с K63 (см. рис. 3в). Даже учитывая, что некоторое убиквитинирование может возникнуть в четырех других остатках Lys в пределах цитоплазматического домена IFNAR1, которые находятся за пределами исследуемого кластера, эти данные (вместе с рис. 1а) дают возможность предположить сценарий, где два разных акцепторных участка убиквитина могут быть избирательными для различных типов полиубиквитинирования, зависящих от специфического конъюгирующего фермента E2 (рис. 3е).

Далее мы исследовали роль конъюгирования с каноническими или дополнительными сайтами в регуляции эндоцитоза IFNAR1. Для этого мы использовали усиленную экспрессию мутантов убиквитина (K63R или K48R), которая может предотвратить элонгацию специфической цепи в клетках. Экспрессия этих спе-

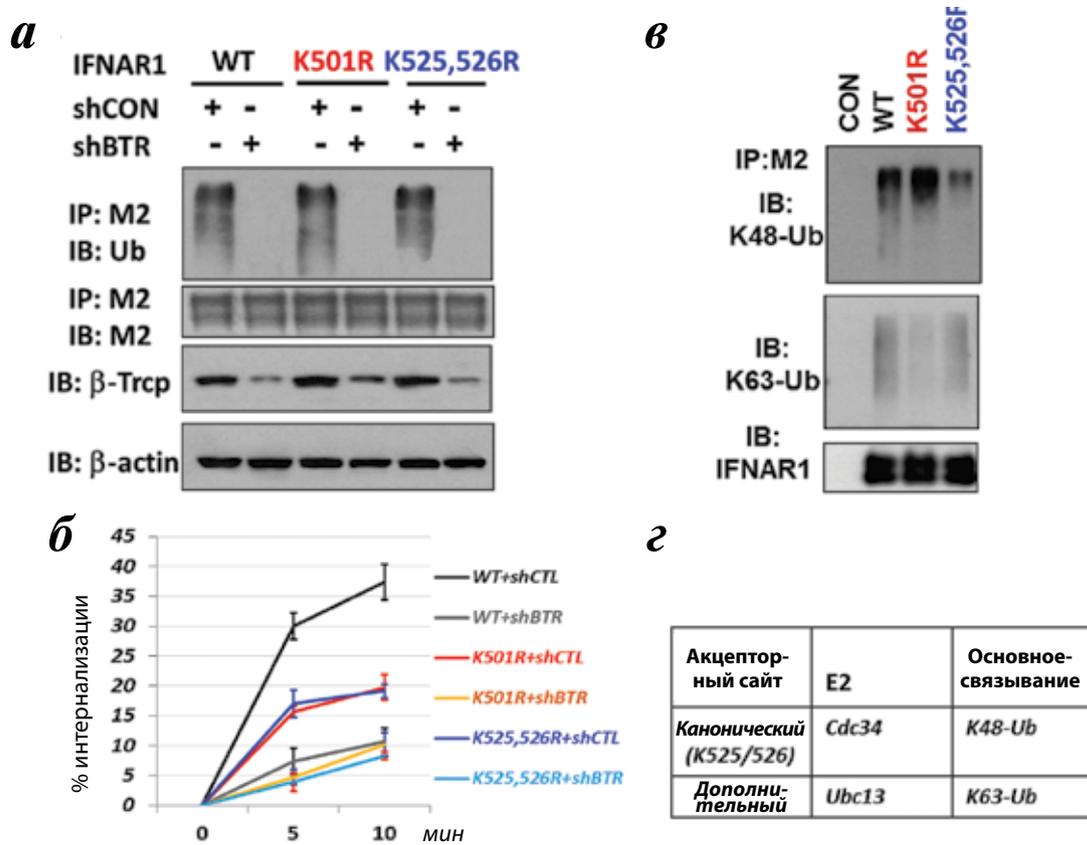


Рис. 3. β Trcp-зависимая сборка цепей K63-Ub, связанных с цепям Lys501 и K48-Ub, конъюгированных в IFNAR1 с Lys525, 526: а – убиквитинирование белков IFNAR1, меченных FLAG, в клетках 293Т, обработанных в контроле shRNA (shCON) или ShRNA против β Trcp (shBTR), а также обработанных или не обработанных IFN α (6000 МЕ/мл, 5 мин), анализировали денатурирующей иммунопреципитацией с помощью антитела M2 с последующим иммуноблоттингом с помощью антитела против убиквитина. Входы для каждого иммунопреципитованного образца были нормализованы, чтобы получить сопоставимые уровни IFNAR1. В качестве контроля проанализированы уровни эндогенных белков β Trcp и β -актина; б – показатели интернализации в клетках, обработанных в контроле ShRNA против GFP (shCTL) или β Trcp (shBTR) для указанных белков FLAG-IFNAR1 проводили, как указано в подписи к рис. 2б; в – специфическое полиубиквитинирование K48- и K63-белков IFNAR1, меченных FLAG, анализировали, как в панели а. Количество FLAG-меченого IFNAR1 включено в качестве контроля загрузки; г – резюме E2s и типов убиквитиновых связей, участвующих в модификации канонических и дополнительных акцепторных участков на IFNAR1

цифических мутантов ослабила скорость интернализации дикого типа рецептора IFNAR1 примерно на 50 % [10] и заметно снизила соответствующее связывание-специфическое убиквитинирование белка IFNAR1 (рис. 4а). Важно отметить, что экспрессия мутанта убиквитина K48R (но не K63R) далее снижала эффективность интернализации IFNAR1^{K501R} (рис. 4б). И наоборот, в клетках 293Т на эндоцитоз IFNAR1^{K525, 526R} влияла принудительная экспрессия K63R, но не мутант убиквитина K48R (рис. 4в).

Вклад K63-связанных цепей в интернализацию IFNAR1 сопоставим с известной ролью этой модификации в эндоцитозе ряда других рецепторов, например TrkA [6]. Большинство этих исследований, в том числе наши собственные работы на клетках млекопитающих, проводились с принудительной экспрессией мутантов убиквитина, которые завершают элонгацию цепочек специфических связей. Последние исследования изогенных U2OS-производных, в которых обработка тетрациклином дает нокдаун эндогенного

убиквитина наряду с параллельной экспрессией РНК-интерференции нечувствительного рекомбинантного убиквитина (дикого типа или мутанта K63R [22, 37]), позволили нам дополнительно определить роль связывание-специфических модификаций K63 в интернализации IFNAR1. В соответствии с результатами, полученными с помощью принудительной экспрессии убиквитина, эндоцитоз дикого типа IFNAR1 был ингибирован в клетках, экспрессирующих убиквитин K63R (рис. 4з). Интересно, что эти клетки показали снижение скорости интернализации мутанта IFNAR1^{K525, 526R}, но не его копии K501R (см. рис. 4з). Эти результаты подтверждают присутствие K63-связанной цепи на акцепторном участке Lys501. Взятые вместе с данными убиквитинирования белка, эти результаты показывают, что убиквитинирование канонического участка K525/526 посредством K48-связанных цепей вместе с убиквитинированием K501 посредством K63-связанных цепей максимально стимулирует эндоцитоз IFNAR1.

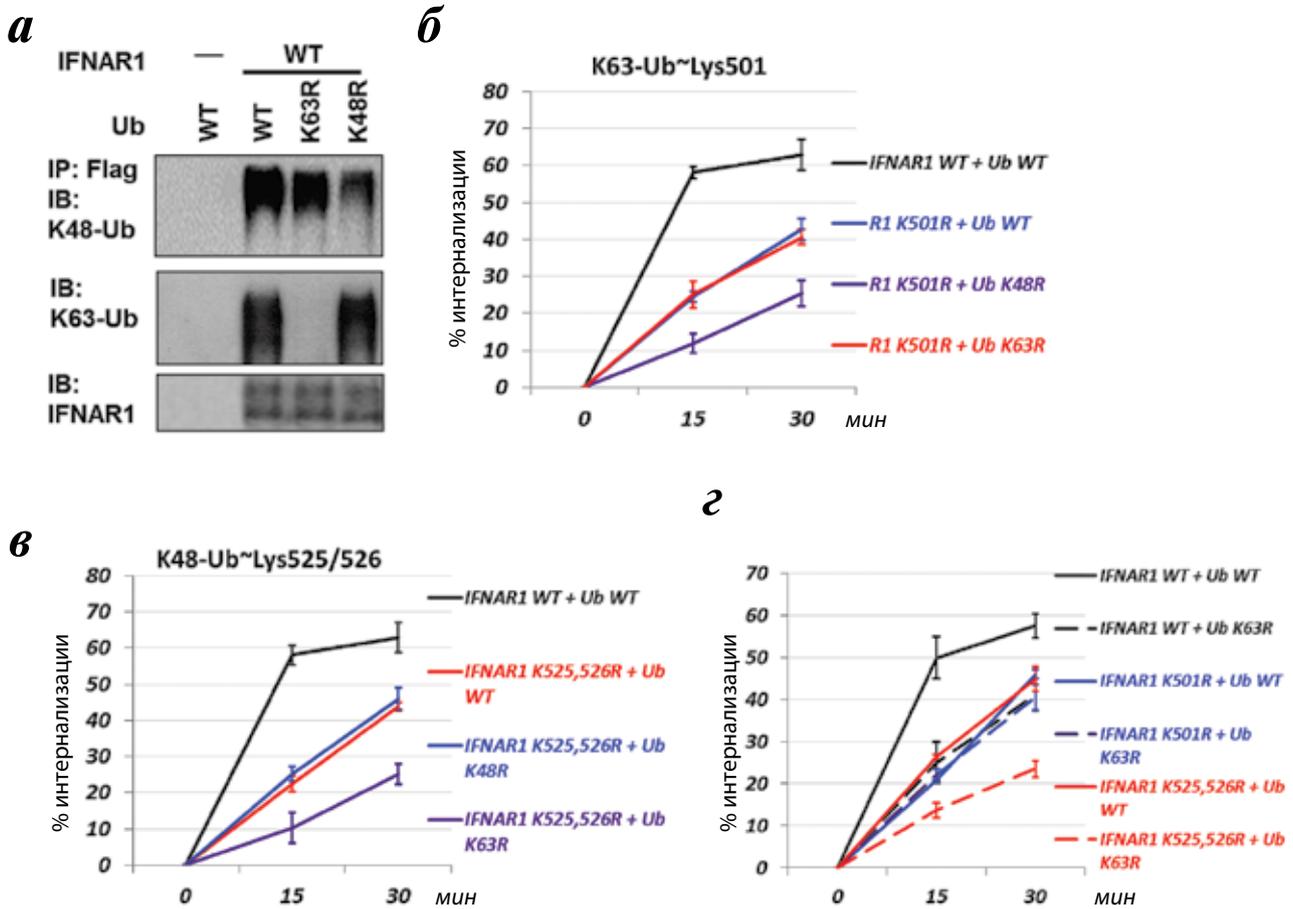


Рис. 4. Несопоставимое действие убиквитиновых мутантов на интернализацию белков *IFNAR1* с каноническими или дополнительными акцепторными участками убиквитина:

а — цель-специфическое полубиквитинирование дикого типа белков *FLAG-IFNAR1*, коэкспрессированных с указанными убиквитиновыми конструкциями и очищенных от стимулированного *IFN α* анализировали, как указано в подписи к рис. 3а;

б — кинетику интернализации *FLAG-IFNAR1^{WT}*, коэкспрессированного с убиквитином дикого типа (*WT*, черная линия), сравнивали с кинетикой интернализации *FLAG-IFNAR1^{K501R}*, коэкспрессированного с помощью убиквитина дикого типа (синяя линия), *K63R* убиквитина (красная линия) или *K48R* убиквитина (пурпурная линия) в клетках 293Т. Анализы проводили, как указано в подписи к рис. 2б;

в — кинетику интернализации *FLAG-IFNAR1^{WT}*, коэкспрессированного с убиквитином дикого типа (*WT*, черная линия) сравнивали с кинетикой интернализации *FLAG-IFNAR1^{K525,526R}*, коэкспрессированного с помощью убиквитина дикого типа (красная линия), *K63R* убиквитина (пурпурная линия), или *K48R* убиквитина (синяя линия) в клетках 293Т. Анализы проводили, как указано в подписи к рис. 2б;

г — кинетика интернализации указанных *FLAG-IFNAR1* белков в клетках *U2OS*, индуцированных для нокдауна эндогенного убиквитина и для ре-экспрессии убиквитина дикого типа (сплошные линии) либо убиквитина *K63R* (пунктирные линии) была проанализирована, как на рис. 2б

Для дальнейшей проверки предположения о том, что взаимодействие *E2s* разного типа может определять судьбу *IFNAR1* через варианты сайт-специфического убиквитинирования, мы изучали влияние модуляции *E2s* на интернализацию *IFNAR1*. Нокдаун *Cdc34* замедлял кинетику интернализации эндогенного *IFNAR1* (см. рис. 1б) и дикого типа *FLAG-IFNAR1*, экспрессированного в клетках 293Т (рис. 5а). Интересно, что в клетках, подвергнутых РНК-интерференции против *Cdc34*, замедлялась интернализация мутанта *FLAG-IFNAR1^{K501R}*, но на эндоцитоз белка *FLAG-IFNAR1^{K525,526R}* это не влияло (см. рис. 5а). Эти данные позволяют предположить, что роль *K48-Ub* в стимулировании эффективного эндоцитоза *IFNAR1* облегчается *Cdc34*-опосредованной конъюгацией убиквитина с каноническим акцепторным участком (*Lys525/526*).

Учитывая, что *Lys501 IFNAR1* убиквитинируется *K63-Ub*, который требует активности *Ubc13* (см. рис. 1а, 3в), мы стремились определить, являлся ли этот *E2* также регулятором эндоцитоза *IFNAR1*. Нокдаун *Ubc13* заметно ингибировал скорость интернализации дикого типа *IFNAR1* или мутанта *IFNAR1^{K525,526R}*, но не *K63-Ub*-дефектного мутанта *IFNAR1^{K501R}*, экспрессированного в клетках 293Т (рис. 5б). Кроме того, принудительная экспрессия доминантно-негативного каталитически неактивного мутанта *Ubc13 (S87A)* также снизила эффективность интернализации канонического сайт-специфического мутанта и *IFNAR1^{WT}*, но не изменила эндоцитоз *IFNAR1^{K501R}* (рис. 5в). Эти результаты показывают, что *Ubc13* способствует *K63-Ub* в убиквитинировании дополнительного акцепторного участка (*Lys501*) и играет существенную роль в эффективности эндоцитоза *IFNAR1*.

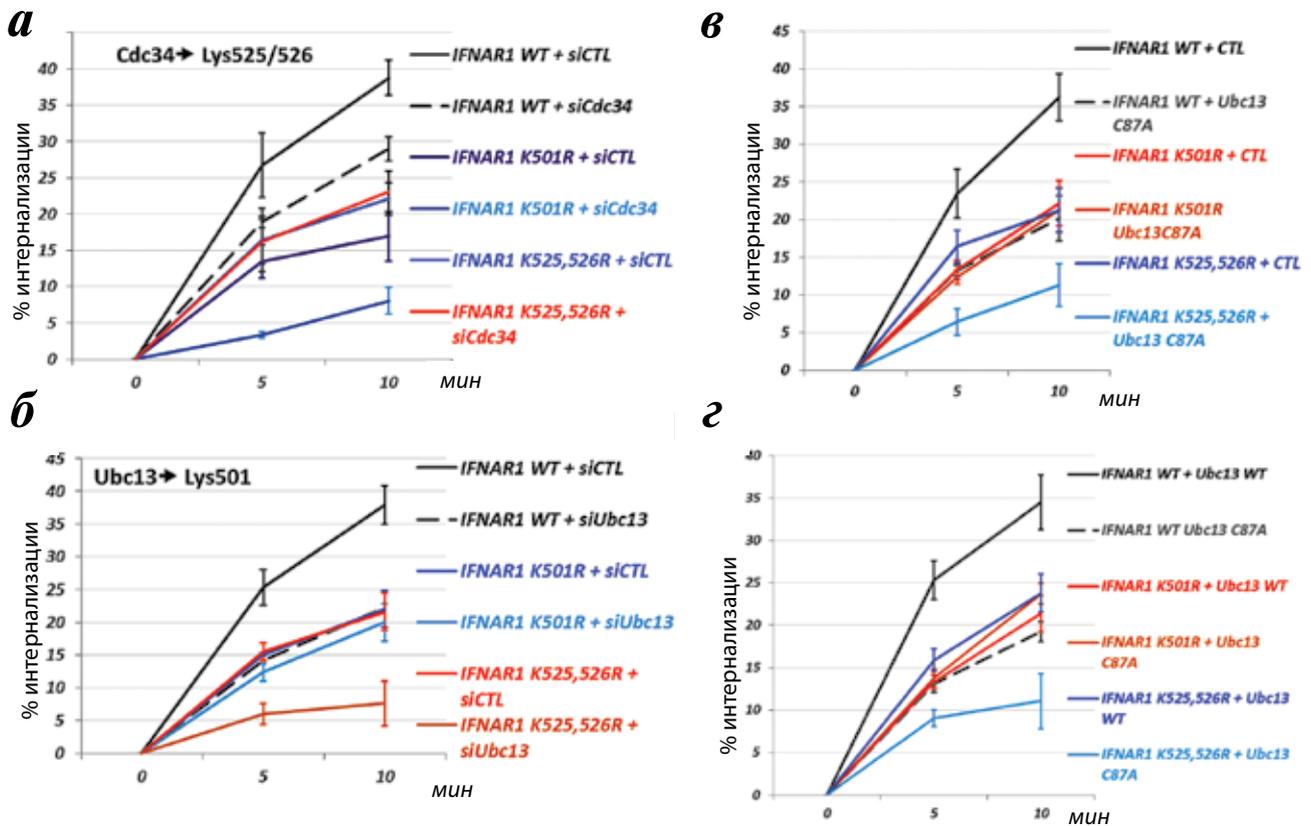


Рис. 5. Для достижения максимально эффективной интернализации *IFNAR1* требуется комбинированное действие *Cdc34*-зависимого *K48-Ub* (собранный на *Lys525, 526*) и *Ubc13*-зависимого *K63-Ub* (собранный на *Lys501*). Анализы проводили, как указано на рис. 2б: *а* – кинетика интернализации белков *FLAG-IFNAR1*, экспрессированных в клетках 293Т, обработанных контрольным *RNAi* (*siCTL*) или *RNAi* против *Cdc34*; *б* – кинетика интернализации белков *FLAG-IFNAR1*, экспрессированных в клетках 293Т, обработанных контрольным *RNAi* (*siCTL*) или *RNAi* против *Ubc13*; *в* – действие каталитически неактивного мутанта (*C87A*) *Ubc13* на интернализацию белков *FLAG-IFNAR1* в клетках 293Т. Транфекцию клеток пустым вектором *pCDNA3* использовали в качестве контроля (*CTL*); *г* – кинетика интернализации белков *FLAG-IFNAR1*, экспрессированных в клетках U2OS, взятых для нокдауна эндогенного *Ubc13* и реэкспрессии, либо дикого типа *Ubc13* или мутанта *Ubc13^{C87A}*

Далее мы стремились подтвердить эти выводы, используя варианты клеточной линии U2OS, которые позволяют заменять эндогенный *Ubc13* рекомбинантными белками дикого типа или мутанта *C87A* [22]. Интернализация *FLAG-IFNAR1^{WT}* явно нарушалась в клетках, которые экспрессировали каталитически активный мутантный белок *Ubc13* (рис. 5е). Аналогичный результат наблюдался в случае *K48-Ub*-зависимого мутанта *IFNAR1*, лишённого дополнительного сайта (*Lys501*), но не на *K63-Ub*-зависимом мутанте (*IFNAR1^{K525, 526R}*, см. рис. 5е). В совокупности эти результаты показывают, что *Ubc13* участвует в сборке *K63*-связанных цепей на *Lys501* *IFNAR1* и эта система взаимодействует с *Cdc34*-зависимой *K48-Ub* на *Lys525, 526*, способствуя эффективному эндоцитозу *IFNAR1*.

Ранее было показано, что базальный уровень эндоцитоза *IFNAR1* в интактных клетках человека ингибируется *TYK2* [38], который предотвращает взаимодействие специфического линейного эндоцитозного мотива с *AP2*-системой эндоцитоза механическим комплексом (рис. 6а, б) [16]. Воздействие на

клетки *IFN1* способствует привлечению комплекса β Tcrp и последующему убиквитинированию *IFNAR1* [14, 15, 39–41]. В целом предполагается, что вызванное *IFN* сайт-специфическое (*K501, 525, 526*) убиквитинирование *IFNAR1* стимулирует его интернализацию путем раскрытия этого линейного эндоцитозного мотива [10] по механизму, который еще предстоит понять.

Далее мы исследовали гипотетические механизмы, с помощью которых убиквитинирование *IFNAR1* способствует раскрытию линейного эндоцитозного мотива. Учитывая, что связывание *TYK2* с *IFNAR1* было одинаковым в случае рецептора дикого типа и дефектного по убиквитинированию мутанта *IFNAR1^{3KR}* (рис. 6в), кажется маловероятным, что убиквитинирование *IFNAR1* диссоциирует *TYK2* от его рецептора. Кроме того, после обработки клеток *IFN* на ранних стадиях эндоцитоза и направленной миграции в субклеточных фракциях *TYK2* остается связанным с *IFNAR1* [42], несмотря на то что убиквитинирование *IFNAR1* и интернализация стимулируются *IFN* [14,

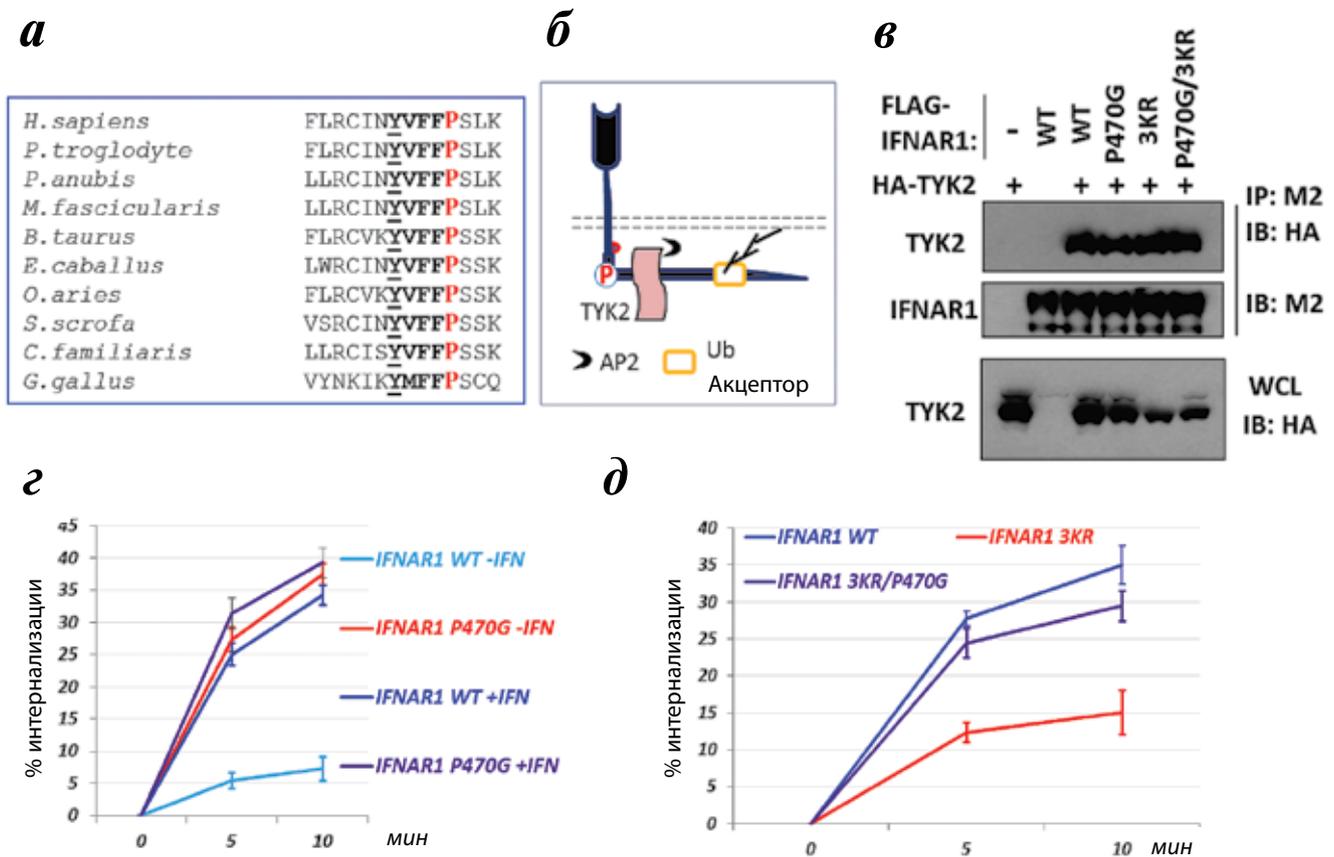


Рис. 6. Комбинированное убиквитинирование канонических и дополнительных сайтов в IFNAR1 происходит выше места изменений конформации IFNAR1, регулируемых консервативным Pro470:

а – консервативность специфического Pro-остатка (P470 в IFNAR1 человека, (красный шрифт), прилегающего к эндоцитозному мотиву (жирный шрифт), критического остатка Тур, который взаимодействует с AP2 (подчеркнуто) на IFNAR1 указанных видов;

б – гипотетическая модель, которая предполагает роль пролин-опосредованного изгиба цепи IFNAR1, обусловленного связыванием с TYK2, в маскировке эндоцитозного мотива (красная точка) от эндоцитозного системного комплекса AP2. Убиквитинирование IFNAR1 предполагает вытеснение TYK2 или изменение взаимного пространственного расположения эндоцитозного мотива, цитоплазматической мембраны и AP2;

в – указанные белки IFNAR1-FLAG (маркер на COOH-конце) с HA-меченым TYK2 или без него были коэкспрессированы в клетках 293T. После обработки IFN (6000 ЕД/мл в течение 10 мин) клетки снимали, лизировали и белки подвергали иммунопреципитации с анти-FLAG-антителом. После предварительного иммуноблоттинга с анти-FLAG-антителом (не показано) различное количество реакционной смеси наносили на другой гель, чтобы получить сопоставимый уровень FLAG-меченных белков IFNAR1 в каждой полосе. Эти реакции анализировали с помощью иммунопреципитации-иммуноблоттинга с использованием указанных антител. Показано также содержание HA-TYK2 в лизатах цельных клеток (WCL);

г – скорость интернализации FLAG-IFNAR1, экспрессированного в клетках 293T, была проанализирована, как описано на рис. 2б, как в отсутствие добавленного IFN α , замещенного аналогичными объемами PBS;

д – скорость интернализации FLAG-IFNAR1, экспрессированного в клетках 293T, была проанализирована, как описано на рис. 2б

15, 39]. Таким образом, мы рассмотрели альтернативную модель, где убиквитинирование IFNAR1 может изменять конформацию его внутриклеточного домена или его пространственное расположение по отношению к TYK2 и плазматической мембране. Высококонсервативный остаток пролина, расположенный дистально по отношению к эндоцитозному мотиву (например, Pro470 в человеческом IFNAR1, см. рис. 6а), может генерировать полипептидную цепочку, которая задерживает активацию эндоцитозного мотива (см. рис. 6б). Замена Pro470 на Gly, повышающий гибкость цепи, дает белок IFNAR1^{P470G}, который эффективно взаимодействовал с TYK2 (см. рис. 6в), проявляя при этом очень высокий уровень эндоцитоза даже без обработки IFN (рис. 6д). Поразительно, что мутация этого остат-

ка пролина в убиквитин-дефицитном IFNAR1^{3KR} в значительной степени восстановила способность этого мутанта к эффективной интернализации (рис. 6д). Эти результаты показывают, что убиквитинирование IFNAR1, предшествующее пространственным изменениям внутриклеточного домена IFNAR1, определяет эффективность эндоцитоза.

Обсуждение

Представленные данные показывают, что максимальная скорость эндоцитоза IFNAR1 является совместной функцией K48-Ub, связанного с акцепторными сайтами убиквитина Lys525, 526, и K63-Ub, конъюгированного с сайтом Lys501 (см. рис. 2–5). Хотя SCF^{ВТср} контролирует конъюгацию убиквитина со

всем кластером Lys, важным для эндоцитоза IFNAR1 (см. рис. 3), эти события зависят от альтернативной работы ферментов Cdc34 и Ubc13 E2, стимулирующих тополого-специфическую интернализацию цепочки убиквитина (см. рис. 5).

Cdc34-зависимая конъюгация K48-Ub с сайтами Lys525, 526 сопоставима с ранее опубликованными результатами на материале протеасомальных субстратов bTcrp [36]. Лизины 525 и 526 расположены на сайтах 9–10 IFNAR1 вблизи от сайта связывания bTcrp (например, дегрон₅₃₄ DSGNYS₅₃₉). В этом смысле они представляют собой канонические акцепторные участки для убиквитинирования, опосредованного SCF^{bTcrp}, аналогично Lys21/22 на IкВа (см. рис. 2a) [14]. Преимущество такого расположения акцепторных участков убиквитина действительно сообщалось для bTcrp протеасомального субстрата β-катенина [43], и введение удвоенного остатка лизина на таком же расстоянии от сайта связывания bTcrp преобразовало латентный мембранный белок 1 вируса Эпштейна–Барр из псевдосубстрата в подлинный субстрат bTcrp [44]. Представленные здесь результаты соответствуют данным литературы о сходстве в расположении акцепторного участка протеасомальных субстратов SCF^{bTcrp} и Lys525/526. Эти данные позволяют предположить, что многосторонние взаимодействия между SCF^{bTcrp}, Cdc34 как E2 и Lys21/22 в случае IкВа [27] или Lys525, 526 в случае IFNAR1 (в этом исследовании) в качестве субстратов может быть благоприятным для элонгации полиубиквитиновой цепи K48-связанной топологии.

Однако в отличие от IкВа, который является цитозольным белком и чьи основные акцепторные участки убиквитина Lys21/22 расположены в гибкой N-концевой области [45], выбор участков конъюгации для IFNAR1 может быть зависим от пространственных ограничений, введенных фиксацией трансмембранного домена плазматической мембраны. Соответственно, SCF^{bTcrp} может иметь узкий спектр выбора субстрата среди остатков лизина IFNAR1 или среди цепей, преимущественно построенных на этих остатках. И наоборот, другой тип цепи, такой как K63-Ub, может быть построен этой E3-лигазой на акцепторе Lys501 с использованием альтернативы Cdc34 E2, например Ubc13. Эта возможность соответствует зависимости максимальной скорости эндоцитоза мутанта IFNAR1^{K525, 526R} от наличия K63 на убиквитине и каталитической активности Ubc13 (см. рис. 4, 5). Наши результаты впервые продемонстрировали, что SCF^{bTcrp} может напрямую использовать комплекс Ubc13/UEV1 в качестве E2-фермента, чтобы катализировать элонгацию K63-связанной цепи *in vitro* (см. рис. 1б). Соответственно, подобный механизм, который может работать и *in vivo*, мог бы послужить в качестве самого простого объяснения для βTcrp/Ubc13/K63 цепь-зависимого эндоцитоза IFNAR1. Тем не менее остается вероятность, что необходимость и βTcrp, и Ubc13 для K63-связанного убиквитинирования IFNAR1

по Lys501 отражает не прямое регулирование, которое может включать в себя дополнительные E2s/E3s.

Возможные значения для других ферментов E2, таких как разнородные члены семейства UbcH5, показали способность убиквитинирования IFNAR1 *in vitro* [10], а также продемонстрировали роль в моноубиквитинировании субстратов с последующей элонгацией K48-связанной цепи (посредством Cdc34 [27]) или K63-связанной цепи (посредством Ubc13 [46]), которые еще предстоит уточнить. Хотя мы не наблюдали последовательного изменения скорости IFNAR1-эндоцитоза в клетках, которые получили реагенты против членов семейства UbcH5 (Ch.J. Carbone, S.Y. Fuchs, неопубликованные данные), роль этих видов E2 не может быть однозначно исключена.

Предстоит выяснить, как эти два типа полиубиквитиновых цепей, построенные на двух разных лизинах акцепторного субстрата с помощью двух различных ферментов E2 могут взаимодействовать для раскрытия линейного эндоцитозного мотива и для увеличения скорости интернализации IFNAR1. С одной стороны, есть основания полагать, что степень интернализации просто пропорциональна общему уровню убиквитина на кластере Lys501/525/526 IFNAR1, и оба акцепторных участка вносят свой вклад, формируя те цепи, которые могут быть эффективно созданы на данном остатке лизина субстрата в рамках возможной субстрат-лигазы E2. С другой стороны, мы не можем исключить, что эти различные типы цепей могут играть разную роль в мобилизации или перегруппировке белков, взаимодействующих с рецептором, и что эти две функции взаимно дополняют друг друга в механизме стимуляции эндоцитоза IFNAR1.

Примечательно, что придание пластичности внутриклеточному домену IFNAR1 посредством замены высококонсервативного Pro470 на глицин создает рецептор с очень высокой скоростью эндоцитоза даже при отсутствии стимуляции IFN1. Кроме того, введение замещения P470G значительно восстановило интернализацию IFNAR1^{3KR} с дефектом убиквитинирования (см. рис. 6). Этот результат позволяет предположить, что убиквитинирование IFNAR1 стимулирует его интернализацию, скорее всего через изменение конформации/пространственного расположения IFNAR1-внутриклеточного домена. В рамках этой модели вполне вероятно, что наличие двух типов полиубиквитиновых цепей на IFNAR1 может дополнительно стимулировать принятие конформации, при которой возможен эндоцитоз. Учитывая, что цепочки K63-Ub и K48-Ub имеют очень различные конформации [47], взаимодействия между эндоцитозным мотивом и эндоцитозным механизмом могут быть усилены и/или стабилизированы присутствием обоих типов цепей. Дальнейшие структурные исследования дадут возможность непосредственно исследовать этот механизм.

Приносим благодарность D.P. Baker, Z.J. Chen, C. Horvath, J. Krolewski, Z. Ronai, Z.Q. Pan и Y. Yarden за реактивы; J. Peng, B. Varghese и G. Swaminathan за техническую помощь на ранних стадиях этого проек-

та. Мы благодарны также Z.Q. Pan за критическое обсуждение рукописи. Этот проект был поддержан грантами Национального института здравоохранения на S.Y.F.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* 1998;17(24):7151–60.
- Bonifacino J.S., Weissman A.M. Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:19–57.
- Holler D., Dikic I. Receptor endocytosis via ubiquitin-dependent and -independent pathways. *Biochem Pharmacol* 2004;67(6):1013–7.
- Huangfu W.C., Fuchs S.Y. Ubiquitination-dependent regulation of signaling receptors in cancer. *Genes Cancer* 2010;1(7):725–34.
- Galan J.M., Haguenaer-Tsapis R. Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J* 1997;16(19):5847–54.
- Geetha T., Jiang J., Wooten M.W. Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol Cell* 2005;20(2):301–12.
- Duncan L.M., Piper S., Dodd R.B. et al. Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules. *EMBO J* 2006;25(8):1635–45.
- Varghese B., Barriere H., Carbone C.J. et al. Polyubiquitination of prolactin receptor stimulates its internalization, postinternalization sorting, and degradation via the lysosomal pathway. *Mol Cell Biol* 2008;28(17):5275–87.
- Barriere H., Nemes C., Lechardeur D. et al. Molecular basis of oligoubiquitin-dependent internalization of membrane proteins in Mammalian cells. *Traffic* 2006;7(3):282–97.
- Kumar K.G., Barriere H., Carbone C.J. et al. Site-specific ubiquitination exposes a linear motif to promote interferon-alpha receptor endocytosis. *J Cell Biol* 2007;179(5):935–50.
- Constantinescu S.N., Croze E., Wang C. et al. Role of interferon alpha/beta receptor chain 1 in the structure and transmembrane signaling of the interferon alpha/beta receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(20):9602–6.
- Colamonici O.R., Porterfield B., Domanski P. et al. Complementation of the interferon alpha response in resistant cells by expression of the cloned subunit of the interferon alpha receptor. A central role of this subunit in interferon alpha signaling. *J Biol Chem* 1994;269(13):9598–602.
- Muller U., Steinhoff U., Reis L.F. et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 1994;264(5167):1918–21.
- Kumar K.G., Krolewski J.J., Fuchs S.Y. Phosphorylation and specific ubiquitin acceptor sites are required for ubiquitination and degradation of the IFNAR1 subunit of type I interferon receptor. *J Biol Chem* 2004;279(45):46614–20.
- Kumar K.G., Tang W., Ravindranath A.K. et al. SCF(HOS) ubiquitin ligase mediates the ligand-induced down-regulation of the interferon-alpha receptor. *EMBO J* 2003;22(20):5480–90.
- Kumar K.G., Varghese B., Banerjee A. et al. Basal ubiquitin-independent internalization of interferon alpha receptor is prevented by Tyk2-mediated masking of a linear endocytic motif. *J Biol Chem* 2008;283(27):18566–72.
- Fuchs S.Y. Hope and fear for interferon: the receptor-centric outlook on the future of interferon therapy. *J Interferon Cytokine Res* 2013;33(4):211–25.
- Fuchs S.Y. Ubiquitination-mediated regulation of interferon responses. *Growth Factors* 2012;30(3):141–8.
- Mosesson Y., Shtiegman K., Katz M. et al. Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. *J Biol Chem* 2003;278(24):21323–6.
- Parisien J.P., Lau J.F., Rodriguez J.J. et al. Selective STAT protein degradation induced by paramyxoviruses requires both STAT1 and STAT2 but is independent of alpha/beta interferon signal transduction. *J Virol* 2002;76(9):4190–8.
- Li Y., Kumar K.G., Tang W. et al. Negative regulation of prolactin receptor stability and signaling mediated by SCF(beta-TrCP) E3 ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol* 2004;24(9):4038–48.
- Xu M., Skaug B., Zeng W., Chen Z.J. A ubiquitin replacement strategy in human cells reveals distinct mechanisms of IKK activation by TNFalpha and IL-1beta. *Mol Cell* 2009;36(2):302–14.
- Soldatenkov V.A., Dritschilo A., Ronai Z., Fuchs S.Y. Inhibition of homologue of Slimb(HOS) function sensitizes human melanoma cells for apoptosis. *Cancer Res* 1999;59(20):5085–8.
- Li Y., Gazdoui S., Pan Z.Q., Fuchs S.Y. Stability of homologue of Slimb F-box protein is regulated by availability of its substrate. *J Biol Chem* 2004;279(12):11074–80.
- Liu J., Huangfu W.C., Kumar K.G. et al. Virus-induced unfolded protein response attenuates antiviral defenses via phosphorylation-dependent degradation of the type I interferon receptor. *Cell Host Microbe* 2009;5(1):72–83.
- Tan P., Fuchs S.Y., Chen A. et al. Recruitment of a ROC1-CUL1 ubiquitin ligase by Skp1 and HOS to catalyze the ubiquitination of I kappa B alpha. *Mol Cell* 1999;3(4):527–33.
- Wu K., Kovacev J., Pan Z.Q. Priming and extending: a UbcH5/Cdc34 E2 handoff mechanism for polyubiquitination on a SCF substrate. *Mol Cell* 2010;37(6):784–96.
- Topisirovic I., Gutierrez G.J., Chen M. et al. Control of p53 multimerization by Ubc13 is JNK-regulated. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(31):12676–81.
- Laine A., Topisirovic I., Zhai D. et al. Regulation of p53 localization and activity by Ubc13. *Mol Cell Biol* 2006;26(23):8901–13.
- Goldman L.A., Zafari M., Cutrone E.C. et al. Characterization of antihuman IFNAR-1 monoclonal antibodies: epitope localization and functional analysis. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19(1):15–26.
- Zhao G.Y., Sonoda E., Barber L.J. et al. A critical role for the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in initiating homologous recombination. *Mol Cell* 2007;25(5):663–75.
- Hofmann R.M., Pickart C.M. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 1999;96(5):645–53.
- Karin M., Gallagher E. TNFR signaling: ubiquitin-conjugated TRAF6 signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes. *Immunol Rev* 2009;228(1):225–40.
- Laine A., Ronai Z. Ubiquitin chains in the ladder of MAPK signaling. *Sci STKE* 2005;2005(281):re5.
- Chen Z.J. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* 2005;7(8):758–65.
- Fuchs S.Y., Spiegelman V.S., Kumar K.G. The many faces of beta-TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer. *Oncogene* 2004;23(11):2028–36.
- Zeng W., Sun L., Jiang X. et al. Reconstitution of the RIG-I pathway reveals

- a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity. *Cell* 2010;141(2):315–30.
38. Ragimbeau J., Dondi E., Alcover A. et al. The tyrosine kinase Tyk2 controls IFNAR1 cell surface expression. *EMBO J* 2003;22(3):537–47.
39. Marijanovic Z., Ragimbeau J., Kumar K.G. et al. TYK2 activity promotes ligand-induced IFNAR1 proteolysis. *Biochem J* 2006;397(1):31–8.
40. Liu J., Plotnikov A., Banerjee A. et al. Ligand-independent pathway that controls stability of interferon alpha receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;367(2):388–93.
41. Carbone C.J., Zheng H., Bhattacharya S. et al. Protein tyrosine phosphatase 1B is a key regulator of IFNAR1 endocytosis and a target for antiviral therapies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(47):19226–31.
42. Payelle-Brogard B., Pellegrini S. Biochemical monitoring of the early endocytic traffic of the type I interferon receptor. *J Interferon Cytokine Res* 2010;30(2):89–98.
43. Wu G., Xu G., Schulman B.A. et al. Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP1) ubiquitin ligase. *Mol Cell* 2003;11(6):1445–56.
44. Tang W., Pavlish O.A., Spiegelman V.S. et al. Interaction of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 with SCFHOS/beta-TrCP E3 ubiquitin ligase regulates extent of NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 2003;278(49):48942–9.
45. Karin M., Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa] B activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:621–63.
46. Windheim M., Peggie M., Cohen P. Two different classes of E2 ubiquitin-conjugating enzymes are required for the mono-ubiquitination of proteins and elongation by polyubiquitin chains with a specific topology. *Biochem J* 2008;409(3):723–9.
47. Tenno T., Fujiwara K., Tochio H. et al. Structural basis for distinct roles of Lys63- and Lys48-linked polyubiquitin chains. *Genes Cells* 2004;9(10):865–75.