

综述

TANK结合激酶1在PINK1/Parkin依赖性和非依赖性线粒体自噬中的作用研究进展

邓豪^{1, #}, 夏志^{2, 3, #}, 尚画雨^{1, *}

¹成都体育学院运动医学与健康学院, 成都 610041; ²温州大学体育与健康学院, 温州 325035; ³井冈山大学体育学院, 吉安 343009

摘要: 线粒体自噬是一种清除受损或多余线粒体的过程, 在调节细胞内线粒体质量和维持线粒体能量代谢等方面发挥重要作用。TANK结合激酶1 (TANK-binding kinase 1, TBK1)是一种多功能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 同时参与调控PTEN诱导假定激酶1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)/Parkin依赖性和非依赖性线粒体自噬过程。近期研究表明, TBK1可磷酸化视神经蛋白(optineurin, OPTN)、p62/sequestosome-1、Ras相关GTP结合蛋白7 (Ras-related GTP binding protein 7, Rab7)等自噬相关蛋白, 并介导核点蛋白52 (nuclear dot protein 52, NDP52)与UNC-51样自噬激活激酶1 (UNC-51 like autophagy activating kinase 1, ULK1)复合物相结合, 以及TAX1结合蛋白1 (TAX1-binding protein 1, TAX1BP1)与微管相关蛋白1轻链3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)相结合, 从而增强PINK1/Parkin依赖性线粒体自噬。TBK1亦可作为AMP活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK)/ULK1自噬通路的作用底物而被激活, 再通过磷酸化动力相关蛋白1 (dynamin-related protein 1, Drp1)、Rab7促进PINK1/Parkin非依赖性线粒体自噬。本文对TBK1在PINK1/Parkin依赖性和非依赖性线粒体自噬中的作用及机制进行了综述。

关键词: 线粒体; 线粒体自噬; TANK结合激酶1; PTEN诱导假定激酶1; Parkin

Research progress on the role of TANK-binding kinase 1 in PINK1/Parkin-dependent and -independent mitophagy

DENG Hao^{1, #}, XIA Zhi^{2, 3, #}, SHANG Hua-Yu^{1, *}

¹School of Sports Medicine and Health, Chengdu Sport University, Chengdu 610041, China; ²College of Physical Education and Health, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China; ³Physical Education College of Jinggangshan University, Ji'an 343009, China

Abstract: Mitophagy is a process that selectively removes excess or damaged mitochondria and plays an important role in regulating intracellular mitochondrial mass and maintaining mitochondrial energy metabolism. TANK-binding kinase 1 (TBK1) is a multifunctional serine/threonine protein kinase, which is involved in the regulation of PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1)/Parkin-dependent and -independent mitophagy. Recent studies have shown that TBK1 phosphorylates the autophagy related proteins, such as optineurin (OPTN), p62/sequestosome-1, Ras-related GTP binding protein 7 (Rab7), and mediates the binding of nuclear dot protein 52 (NDP52) to UNC-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1) complex, as well as the binding of TAX1-binding protein 1 (TAX1BP1) to microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), thereby enhancing PINK1/Parkin-dependent mitophagy. In

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31900842, 31960192), the Natural Science Foundation of Sichuan Province, China (No. 2023NSFSC1524), Jiangxi Provincial Science Fund for Distinguished Young Scholars (No. 20202ACBL216004), Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (No. LY23C110001), Basic Scientific Research Project of Wenzhou (No. Y20220209) and Innovative Project of Institute of Sports Medicine and Health of Chengdu Sport University (No. CX21A01).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: santanasan@163.com

addition, TBK1 is a direct substrate of AMP-activated protein kinase (AMPK)/ULK1 pathway, and its activation phosphorylates dynamin-related protein 1 (Drp1) and Rab7 to promote PINK1/Parkin-independent mitophagy. This article reviews the role and mechanism of TBK1 in regulating PINK1/Parkin-dependent and -independent mitophagy.

Key words: mitochondrion; mitophagy; TANK-binding kinase 1; PTEN-induced putative kinase 1; Parkin

线粒体作为细胞能量中心,在调控细胞代谢、增殖、自噬及凋亡等方面具有重要作用^[1]。线粒体参与细胞能量供应的同时会产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS),其生成增加将诱发线粒体结构损伤、DNA 突变和蛋白质错误折叠等失稳态现象^[2]。受损的线粒体需立即分离和选择性清除,故线粒体自噬 (mitophagy) 被视为维持线粒体稳态的重要机制之一。线粒体自噬作为一种典型的选择性细胞自噬,被多种途径激活和调控,将受损线粒体包裹入自噬体中并与溶酶体融合 (形成自噬溶酶体),从而完成受损线粒体的降解。然而,线粒体自噬异常可导致细胞环境紊乱,进而诱发多种疾病 (如神经退行性疾病、心血管疾病等)^[3]。目前研究表明,哺乳动物细胞内线粒体自噬主要有 PTEN 诱导假定激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)/Parkin 介导的泛素化降解途径及 BNIP3L (BCL2/adenovirus E1B 19-kDa protein-interacting protein 3-like)、BNIP3、FUNDC1 (FUN14 domain containing 1)、FKBP8/FKBP38 等不同蛋白介导的受体识别通路^[4]。鉴于细胞环境与线粒体功能互作的复杂性,调控线粒体自噬的分子机制以及在不同疾病中的作用迄今尚未厘清。

近期研究发现,TANK 结合激酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1) 是同时参与调控炎性干扰素 (interferon, IFN) 信号转导和选择性自噬的激酶之一,在调节细胞免疫^[5]、异体自噬^[6]及线粒体自噬^[7]等方面具有重要作用,从而可能影响多种组织和器官 (如心脏、肝脏和视网膜) 的炎症反应^[8]、脂质代谢^[9]和糖摄取^[10]等。例如, TBK1 可在 PINK1/Parkin 依赖性条件下磷酸化视神经蛋白 (optineurin, OPTN)^[7]、p62/sequestosome-1^[11]等货物蛋白及 GTP 酶 Ras 相关 GTP 结合蛋白 7 (Ras-related GTP binding protein 7, Rab7)^[12],从而介导线粒体自噬体的形成;亦可在 PINK1/Parkin 非依赖性条件下通过磷酸化动力相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, Drp1)^[13]及其受体^[14]阻止线粒体分裂并介导线粒体自噬体形成。根据线粒体自噬在病理生理模型上的研究成果,我们推测 TBK1 可能通过磷酸化 OPTN、p62、Rab7

和 Drp1 参与 PINK1/Parkin 依赖性和 / 或非依赖性途径介导的线粒体自噬。基于此,本文拟对近年来 TBK1 相关研究进行梳理,并归纳其对 PINK1/Parkin 依赖性和 / 或非依赖性线粒体自噬的调控作用,以期 TBK1 相关疾病的新药研发提供参考资料。

1 TBK1概述

TBK1 是由 Pomerantz 等^[15]发现的一种多功能的丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶,由 729 个氨基酸残基组成,在脑、肺、肾、肝和心脏等组织广泛高表达。TBK1 是一种非经典 IKK 激酶,与 I κ B 激酶 ϵ (IKK ϵ , 又称 IKKi) 同源,包含 N 端的激酶结构域、泛素样结构域和 C 端的螺旋结构域 1、螺旋结构域 2 等四个结构域^[16]。其中,激酶结构域中含有激活环 (Leu164~Gly199),环内的 Ser172 位点磷酸化可引起 TBK1 活化^[16];泛素样结构域则参与调控其激酶活性及其与 IFN 信号通路相关蛋白 IFN 调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 互作^[17];螺旋结构域 1 负责控制 TBK1 二聚反应^[18],而螺旋结构域 2 可促进其与接头蛋白 TANK、核因子 κ B (nuclear factor κ -B, NF- κ B) 活化激酶相关蛋白 1 (NF- κ B-activating kinase-associated protein 1, NAP1)、NAP1 类似的 TBK1 接头蛋白 (similar to NAP1 TBK1 adaptor, SINTBAD) 和 OPTN 互作^[19, 20]。研究证实, TBK1 可被抗病毒感染因子 [如 β 干扰素 TIR 结构域衔接蛋白 (TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- β , TRIF)、线粒体抗病毒信号蛋白 (mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS) 和 IFN 基因刺激因子 (stimulator of interferon genes, STING)] 激活以诱导天然免疫反应^[21]; TBK1 亦可被炎症细胞因子 [如白介素 -17 (interleukin-17, IL-17)] 激活以诱导肥胖引起的炎症反应^[22];还可受肿瘤蛋白 [如鼠类肉瘤病毒癌基因 (kirsten rat sarcoma viral oncogene, KRAS)] 激活以抑制细胞凋亡^[23]。此外,目前已知 TBK1 是线粒体自噬过程中的关键激酶之一^[24],一方面其可依赖于 Parkin、OPTN 和核点蛋白 52 (nuclear dot protein 52, NDP52) 的途径以自磷酸化激活以及依赖于 AMPK-UNC-51 样自噬激活激

酶 1 (UNC-51 like autophagy activating kinase 1, ULK1) 途径磷酸化激活^[7,14], 另一方面可与泛素 (ubiquitin, Ub)^[25] 互作并磷酸化 OPTN^[26]、NDP52^[7]、p62^[11]、TAX1 结合蛋白 1 (TAX1-binding protein 1, TAX1BP1)^[26]、Rab7^[12] 和 Drp1^[13] 等多种自噬相关蛋白。

TBK1 的多重结构使其可以参与多个关键的生理和病理过程。例如, TBK1 可通过其激酶活性介导中心体蛋白 170 (centrosomal protein 170, CEP170) 与驱动蛋白家族成员 2B (kinesin family member 2B, KIF2B) 相结合, 以及介导核有丝分裂器蛋白 (nuclear mitotic apparatus protein, NuMA) 与动力蛋白 (Dynein) 相结合, 从而促进哺乳动物细胞有丝分裂进程^[27]; TBK1 可通过磷酸化机制介导线粒体自噬体形成, 从而减轻棕榈酸诱导的脂毒性肝损伤^[28]。此外, TBK1 亦可在牛分歧杆菌诱导内质网应激条件下通过磷酸化 IRF3 激活下游蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 8 (cysteine containing aspartate specific protease-8, Caspase-8), 从而正性调节细胞凋亡^[29]。

2 TBK1参与调控PINK1/Parkin依赖性线粒体自噬

PINK1/Parkin 信号通路是哺乳细胞内介导线粒体自噬的典型泛素依赖性信号途径: 在正常情况下, 胞质合成的 PINK1 首先通过与线粒体外膜转位酶 (translocase of outer membrane, TOM) 互作进入线粒体膜间隙^[30], 再与线粒体内膜转位酶 (translocase of inner membrane, TIM) 互作而转位至线粒体内膜^[31], 此时线粒体内膜蛋白早老素相关菱形样蛋白 (presenilin-associated rhomboid like, PARL)^[32] 和线粒体基质蛋白线粒体加工肽酶 (mitochondrial-processing peptidase, MPP)^[33] 可剪切 PINK1, 使其从线粒体内膜转位至胞质, 最终被胞质内 E3 泛素连接酶 [如泛素连接酶 E3 成分 N-识别蛋白 1 (ubiquitin protein ligase E3 component N-recognin 1, UBR1)、UBR2 和 UBR4] 经蛋白酶体途径降解^[34]; 当线粒体去极化或损伤时, PINK1 大量累积在线粒体外膜, 通过自磷酸化和 / 或磷酸化修饰 E3 泛素连接酶 Parkin 与 Ub, 使 Parkin 从胞质转位至线粒体外膜并泛素化线粒体底物蛋白以形成多聚泛素链, 此时泛素接头蛋白 p62 通过其 C 端连接泛素化线粒体, 再通过其 N 端与微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 结合, 将泛素化线粒体聚集并包裹进入自噬体, 最终被溶酶体降解和

清除^[24, 35-37]。研究显示, 胞质内 TBK1 可通过与 Parkin 泛素化底物蛋白相结合而转位至受损线粒体, 随即局部浓缩以自磷酸化激活, 此时自噬相关蛋白 200 kDa 的家族相互作用蛋白 (family interacting protein of 200 kDa, FIP200)、货物蛋白 (OPTN、NDP52、p62、TAX1BP1) 和自噬相关蛋白 13 (autophagy-related protein 13, ATG13) 依次转位至受损线粒体以参与介导自噬体形成^[38]。其中, 货物蛋白 OPTN、NDP52、p62、TAX1BP1 的共同特点是含有泛素结合域及 LC3 结合域^[39, 40], 而 FIP200 和 ATG13 可分别促进货物蛋白靶向募集至受损线粒体及结合 LC3^[38]。大量研究结果表明, 在 Parkin 依赖性条件下, TBK1 首先通过与多聚泛素链相结合以自磷酸化激活, 活化的 TBK1 再通过磷酸化上述货物蛋白和 GTP 酶 Rab7 以介导货物蛋白与多聚泛素链相结合以及自噬体的形成, 从而促进线粒体自噬^[7, 11, 12, 25]。

2.1 Parkin促进TBK1与多聚泛素链相结合

现已证实, Parkin 在泛素化修饰底物蛋白后可形成 K6、K11、K48 和 K63 等位点的多聚泛素链^[41], TBK1 则可通过其 Lys30、Lys401 位点与 K63 耦联的多聚泛素链相结合以促进其 Ser172 位点磷酸化激活, 进而转位至受损线粒体并诱发自噬^[25, 42]。Gao 等^[25] 研究显示, 用阿霉素诱导原代小鼠心肌细胞衰老后线粒体自噬被抑制, 表现为线粒体 p-TBK1 Ser172、p-p62 Ser403、Parkin、LC3-II 蛋白表达明显下调, 同时 ROS 生成量、衰老相关因子 p53 与 p21 蛋白表达以及 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase, β -gal) 活性显著上调; 此外, 衰老心肌细胞内 Parkin 过表达可促进 TBK1 Lys30、Lys401 位点与 K63 耦联的多聚泛素链相结合, 进而上调线粒体 p-TBK1 Ser172、p-p62 Ser403、LC3-II 蛋白表达和下调 ROS 生成量、p53 与 p21 蛋白表达以及 β -gal 活性, 并抑制心肌细胞凋亡; 然而, 在 Parkin 过表达的衰老心肌细胞中给予 TBK1 抑制剂 BX795 干预后上述自噬保护效应被逆转, 提示 Parkin 可通过促进 TBK1 与 K63 耦联的多聚泛素链相结合介导 TBK1 活化, 进而改善衰老心肌线粒体自噬障碍。

研究表明, TBK1 转位至受损线粒体及介导自噬亦可通过磷酸化 OPTN 促使其与多聚泛素链相结合而实现。Heo 等^[7] 和 Richter 等^[26] 分别利用线粒体呼吸链抑制剂寡霉素与抗霉素联合处理 HFT 细胞以及用羰基氰化物氯苯腙 (carbonyl cyanide chloro

phenyl hydrazine, CCCP) 处理 HeLa 细胞后发现, 在 PINK1/Parkin 依赖的情况下, 一方面 TBK1 磷酸化 OPTN Ser473、Ser513 位点 (泛素结构域内) 以促使 OPTN 与 K63 耦联的多聚泛素链相结合, 进而上调线粒体 p-TBK1 Ser172、OPTN 蛋白表达, 另一方面 TBK1 磷酸化 OPTN Ser177 位点 (LC3 结构域内) 以增强 OPTN 与 LC3 互作。Manford 等^[43]认为, TBK1 和 OPTN 在协同调控线粒体自噬过程中可能存在正反馈机制: 在线粒体去极化过程中, TBK1 转位至受损线粒体并磷酸化货物蛋白 OPTN Ser473 与 Ser513 位点, 介导 OPTN 与 K63 耦联的多聚泛素链相结合, 致使更多的 TBK1 被募集至受损线粒体而形成正反馈回路, 此时 TBK1 磷酸化 OPTN Ser177 位点以促使 OPTN 与 LC3 互作, 最终诱导线粒体自噬。

总之, 在线粒体去极化过程中, TBK1 先通过其 Lys30、Lys401 位点与 K63 耦联的多聚泛素链相结合以自磷酸化激活, 再磷酸化 OPTN 以促进其与 K63 耦联的多聚泛素链相结合, 从而诱导线粒体自噬, 但是除 OPTN 以外, 其他货物蛋白 (如 NDP52、p62、TAX1BP1) 能否与多聚泛素链相结合以及 TBK1 在二者互作中的调控作用尚有待进一步研究予以阐明。

2.2 TBK1参与调控线粒体自噬体的形成

自噬诱导后, 前体分子 pro-LC3 可被少量 ATG4 切割而生成胞质定位的 LC3-I, LC3-I 再与磷脂酰乙醇胺相结合, 转化为锚定于自噬体膜的 LC3-II, 此时 OPTN、NDP52、p62 及 TAX1BP1 等货物蛋白可介导线粒体泛素化并与 LC3-II 互作, 从而形成包裹线粒体的自噬体; 当自噬体膜形成后, ATG4 去脂化 LC3-II 致使其从自噬体外膜解耦联, 在抑制自噬体形成的同时回收 LC3-II 以供细胞再次利用, 因此 ATG4 对 LC3 既具有介导转化的脂化作用, 亦发挥清除回收且抑制自噬的去脂化作用^[44-46]。目前研究表明, 在线粒体去极化过程中, TBK1 既可通过磷酸化货物蛋白 OPTN^[26, 40, 47, 48]、NDP52^[49, 50]、p62^[11, 51]、TAX1BP1^[7, 40] 及 GTP 酶 Rab7^[12] 以促进线粒体自噬体形成, 亦可磷酸化 LC3C Ser93/96 和 / 或 γ -氨基丁酸受体相关蛋白类似物 2 (γ -aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2, GABARAPL2) Ser87/88 以阻止 LC3C/GABARAPL2 与 ATG4 相结合, 进而减弱 ATG4 去脂化作用以维持 LC3C/GABARAPL2 脂质化状态, 最终诱导自噬体形成^[52]。

2.2.1 OPTN

现已证实, 在 Parkin 依赖性条件下, TBK1 可磷酸化 OPTN 以正性调控线粒体自噬体形成。Moore 等^[40]报道指出, 在施加 CCCP 诱导 HeLa 细胞 (Parkin 低表达) 线粒体去极化后, 线粒体 LC3 蛋白表达无明显变化; 将 Parkin 引入 CCCP 处理后的 HeLa 细胞, 结果显示, 线粒体 TBK1、OPTN、LC3 蛋白表达以及 TBK1 与 OPTN、OPTN 与 LC3 在线粒体上共定位水平均显著上调; 使用 siRNA 干扰 TBK1 表达可有效逆转上述变化, 而给予 OPTN Ser177A 突变体 (磷酸化失活) 处理后, OPTN 与 LC3 在线粒体上共定位水平亦明显减少, 相反, 给予 OPTN Ser177E 突变体 (拟磷酸化) 处理则可显著提高 OPTN 与 LC3 在线粒体上共定位水平。鉴于 TBK1 可磷酸化 OPTN Ser177^[26], Moore 等^[40]推测在 Parkin 依赖的情况下, 货物蛋白 OPTN 在募集至受损线粒体后需被 TBK1 磷酸化激活以发挥其作用, 其中 OPTN Ser177 位点磷酸化主要参与介导线粒体自噬体形成。因此, 在 Parkin 介导线粒体自噬的过程中, 尚未活化的 OPTN 可与多聚泛素链相结合而促进 TBK1 转位至受损线粒体并局部浓缩以自磷酸化, 活化的 TBK1 进而磷酸化 OPTN Ser473 与 Ser513 以增强 OPTN 与多聚泛素链的结合, 促使更多的 TBK1 募集至受损线粒体, 随即 TBK1 磷酸化 OPTN Ser177 以增加 OPTN 与 LC3 互作, 最终介导线粒体自噬体形成^[48]。值得注意的是, Wang 等^[47]研究显示, 在小鼠胚胎干细胞线粒体去极化过程中, 在不依赖于 Parkin 的情况下, 累积在线粒体外膜上的 PINK1 还可通过磷酸化 Ub Ser65 促进 OPTN 转位至线粒体, 随即 TBK1 磷酸化 OPTN Ser473、Ser513 及 Ser177, 使受损线粒体被自噬体包裹进而降解和清除。由此可见, 在 Parkin 依赖性和非依赖性条件下, PINK1 均可介导 TBK1-OPTN 相关的线粒体自噬体形成, 然而 Parkin 在上述自噬过程中的作用可能具有细胞类型特异性, 其具体作用尚需进一步研究确认。

2.2.2 NDP52

TBK1 还可通过促进 NDP52 与 ULK1 复合物 (ULK1-ATG13-FIP200) 互作以正性调节 Parkin 依赖性线粒体自噬。Vargas 等^[49]研究显示, 在 Parkin 依赖的情况下, 活化的 TBK1 可通过结合 NDP52 的 SKICH 结构域以促进 NDP52 与 FIP200 互作, 随即 NDP52 再与 ULK1 相结合并靶向至泛素化线

粒体以介导线粒体自噬。Nozawa 等^[53]对引入 Parkin 的 HeLa 细胞给予寡霉素与抗霉素联合处理,结果显示,HeLa 细胞线粒体 TBC1 结构域家族成员 9 (TBC1 domain family member 9, TBC1D9)、p-TBK1 Ser172、NDP52 与 ATG13 蛋白表达明显上调,而细胞色素 C 氧化酶亚基 II (cytochrome C oxidase subunit II, COXII) 蛋白表达显著下调;敲除 TBC1D9 可有效逆转上述变化,施加钙离子螯合剂 BAPTA-AM 处理后线粒体 TBC1D9、p-TBK1 Ser172 和 NDP52 蛋白表达明显下调;另外,在引入 Parkin 的 HeLa 细胞中敲除 TBK1 可显著下调线粒体 NDP52 蛋白表达,以上结果表明 TBC1D9 可能通过钙离子信号和 Parkin 依赖性机制转位至受损线粒体,进而介导 TBK1 活化并招募 NDP52 与 ULK1 复合物至受损线粒体,最终诱导线粒体自噬。另有研究显示, TBK1 可磷酸化 NDP52 的 SKICH 结构域^[26],但其具体磷酸化位点还有待研究证实。

此外,Heo 等^[7]同样用寡霉素与抗霉素联合处理引入 Parkin 的 HFT 细胞 (Parkin 低表达),亦观察到线粒体 p-TBK1 Ser172、OPTN 与 NDP52 蛋白表达及线粒体清除率明显上调;敲除 TBK1 可显著下调线粒体 OPTN 与 NDP52 蛋白表达及线粒体清除率;而双敲除 OPTN 与 NDP52 相较于仅敲除 OPTN 而言,其线粒体 p-TBK1 Ser172、LC3-II 蛋白表达和线粒体清除率亦明显下调,提示在 Parkin 依赖性条件下,NDP52 与 OPTN 可能协同参与正性调控 TBK1 介导的线粒体自噬。Ke 等^[50]研究显示,用黄芩素处理肝癌 Huh7 细胞可显著上调线粒体 PINK1、Parkin、p-Ub Ser65 和 p-TBK1 Ser172 蛋白表达以及 p-TBK1 Ser172 与 LC3、OPTN 与 LC3、NDP52 与 LC3 在线粒体上共定位水平,最终诱导线粒体自噬体形成,而在黄芩素处理的 Huh7 细胞内敲除 OPTN 或 NDP52 均可有效抑制自噬体形成,致使线粒体自噬流受阻,提示黄芩素可能促进 Parkin-TBK1-OPTN/NDP52 介导的肝线粒体自噬,而自噬激活是否引起 Huh7 细胞内病理变化迄今仍不明确。需要注意的是,Moore 等^[40]用 CCCP 处理引入 Parkin 的 HeLa 细胞后亦发现线粒体 NDP52 蛋白表达、NDP52 与 LC3 在线粒体上共定位水平显著上调,然而使用 TBK1 抑制剂 BX795 干扰 TBK1 表达后对上述变化无明显影响,提示 NDP52 亦可能在不依赖于 TBK1 的情况下参与调节 Parkin 介导的线粒体自噬。以上研究结果表明,在 Parkin 依赖的情况

下,NDP52 可能与 OPTN 协同介导线粒体自噬体形成,且该过程是否受 TBK1 磷酸化的调控可能与不同处理因素有关,其具体机制仍有待深入研究。

2.2.3 p62

TBK1 亦可通过磷酸化 p62 Ser403 促进 Parkin 依赖性线粒体自噬体的形成。Matsumoto 等^[11]研究显示,用 CCCP 处理引入 Parkin 的 N2A 细胞可诱导线粒体去极化,使 TBK1 与 OPTN 共同募集至泛素化线粒体,引起 TBK1 局部浓缩进而自磷酸化激活,活化的 TBK1 磷酸化 p62 泛素结构域的 Ser403 位点,促使 p62 分别连接泛素化线粒体和 LC3 以形成线粒体自噬体;相反,在上述细胞内敲除 TBK1 则可有效抑制 p62 活化,从而阻止线粒体自噬体形成,表明 TBK1 可通过磷酸化 p62 Ser403 以促进 Parkin 介导的线粒体自噬体形成。Garcia-Garcia 等^[51]研究显示,敲除 E3 泛素连接酶三联基序蛋白 27 (tripartite motif-containing protein 27, TRIM27) 的 HEK293 细胞内线粒体 p-TBK1 Ser172、p62 与 LC3 蛋白表达和线粒体自噬体数量显著下调,而再次恢复 TRIM27 表达则能有效逆转上述变化;在此基础上敲除 p62 或施加 TBK1 抑制剂 MRT67307 均可显著减少线粒体 TRIM27 蛋白表达和自噬体数量,提示 TRIM27 可能依赖 TBK1 和 p62 转位至受损线粒体并促进线粒体自噬体形成。鉴于 TRIM27 在多种癌细胞 (如卵巢癌^[54]、肺癌^[55]、结肠癌^[56]) 内高表达,在介导线粒体自噬及参与癌细胞凋亡过程中 TRIM27、TBK1 和 p62 之间可能存在的相互作用或竞争性表达机制均具有深入研究的价值。

2.2.4 TAX1BP1

在 Parkin 依赖性条件下, TBK1 可正性调控 TAX1BP1 介导的线粒体自噬体形成过程。Lazarou 等^[45]用 CCCP 处理引入 Parkin 的 HeLa 细胞,结果显示,货物蛋白 OPTN、NDP52、p62、TAX1BP1 和 NBR1 均被募集至受损线粒体,在此基础上同时敲除上述五种基因 (五敲除) 可明显上调 COXII 蛋白表达和 mtDNA 拷贝数,提示线粒体自噬可能受阻;Lazarou 等在逐一恢复单个基因表达后发现,单独恢复 OPTN、NDP52 或 TAX1BP1 表达可有效逆转五敲除细胞内线粒体自噬功能障碍,表明 OPTN、NDP52 和 TAX1BP1 均可促进 Parkin 介导的线粒体自噬。Moore 等^[40]用 CCCP 处理引入 Parkin 的 HeLa 细胞,引起线粒体 TAX1BP1 蛋白表达、TAX1BP1 与 LC3 在线粒体上共定位水平显著上调,

再给予 TBK1 抑制剂 BX795 处理可明显下调线粒体 TAX1BP1 蛋白表达以及 TAX1BP1 与 LC3 在线粒体上共定位水平, 提示 TAX1BP1 可在 TBK1 依赖的情况下参与介导线粒体自噬体形成。此外, TBK1 亦可磷酸化 TAX1BP1 的 SKICH 结构域, 但其磷酸化位点仍不清楚^[26]。与 Moore 等^[40] 研究结果相反, Heo 等^[7] 用寡霉素与抗霉素处理引入 Parkin 的 HFT 细胞后发现线粒体 TAX1BP1 蛋白表达显著上调, 而在敲除 TBK1 后线粒体 TAX1BP1 蛋白表达无明显变化, 故推测 TAX1BP1 募集至受损线粒体可能不依赖于 TBK1。上述研究结果表明, 在 Parkin 依赖性条件下, TBK1 可促进 TAX1BP1 与 LC3 相结合以诱导线粒体自噬体形成, 而 TAX1BP1 线粒体转位是否受 TBK1 磷酸化调控可能与不同细胞类型和处理因素有关。

2.2.5 Rab7

在 Parkin 依赖性条件下, 定位于溶酶体膜的 Rab7 可转位至受损线粒体, 促进 ATG9A 介导的囊泡运输和自噬体膜扩张以形成线粒体自噬体^[57], TBK1 则可通过磷酸化 Rab7 Ser72 而促进自噬体形成^[12]。Heo 等^[12] 对引入 Parkin 的 HFT 细胞施加阿霉素和 / 或寡霉素与抗霉素联合处理以诱导线粒体损伤, TBK1 随即转位至线粒体并磷酸化 Rab7 Ser72, Rab7 活化可明显增加线粒体 ATG9A、抑癌基因 folliculin (FLCN) 及其相互作用蛋白 1 (folliculin interacting protein 1, FNIP1) 蛋白表达以及 Rab7 与 FLCN/FNIP1 复合物互作, 进而促使自噬体膜形成以清除受损线粒体, 提示在 Parkin 依赖的情况下, TBK1 可通过磷酸化 Rab7 Ser72 以正性调节线粒体自噬体形成, 且 Rab7-ATG9A 和 Rab7-FLCN/FNIP1 信号途径可能协同参与上述过程。然而, 近年 Malik 等^[58] 同样用寡霉素与抗霉素处理小鼠胚胎成纤维细胞以诱导线粒体去极化损伤及 Parkin 依赖性自噬激活, 但并未观察到 TBK1 磷酸化修饰 Rab7 Ser72, 故推测 TBK1 对 Rab7 活化的调控作用可能取决于特定的细胞条件。

总体而言, 一方面, OPTN、NDP52、p62 和 TAX1BP1 作为货物蛋白均具有共同的泛素结合域和 LC3 结合域, 可分别与泛素化线粒体和自噬体膜标记物 LC3 相结合, 从而介导泛素化线粒体被自噬体包裹; 另一方面, 在 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬过程中, 上述货物蛋白和 GTP 酶 Rab7 均受 TBK1 磷酸化调控: TBK1 可通过磷酸化 OPTN

Ser473、Ser513 和 Ser177 位点以介导 OPTN 结合多聚泛素链及 LC3; TBK1 可通过磷酸化 p62 Ser403 以促进 p62 连接泛素化线粒体及 LC3; TBK1 亦可促进 NDP52 与 ULK1 复合物 (ULK1-FIP200-ATG13) 相结合并增强后者线粒体转位; 此外, TBK1 还能促进 TAX1BP1 与 LC3 相结合, 并通过磷酸化 Rab7 Ser72 以生成自噬体膜, 最终参与正性调控线粒体自噬体形成。未来应进一步阐明 TBK1 和货物蛋白 OPTN、p62、NDP52、TAX1BP1 及 GTP 酶 Rab7 之间的互作与机制, 而 TBK1 及其互作蛋白对于不同细胞环境的应答亦有待后续研究予以证实。

3 TBK1参与调控PINK1/Parkin非依赖性自噬途径

另有报道指出, 在不依赖于 PINK1/Parkin 的情况下, 能量开关因子 AMP 活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 可通过磷酸化 ULK1 以介导线粒体自噬^[59]。在此过程中, TBK1 可由 AMPK-ULK1 磷酸化激活, 活化的 TBK1 随即磷酸化 Drp1 与 Rab7 以分别介导线粒体自噬体^[13] 和自噬溶酶体的形成^[60]。

3.1 TBK1参与调控线粒体自噬体的形成

Hu 等^[13] 通过手术破坏 C57BL/6 小鼠内侧半月板或用肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 处理原代小鼠膝关节的软骨细胞以建立膝关节骨性关节炎模型, 引起软骨面积显著缩小, 其细胞内 p-AMPK Thr172、p-TBK1 Ser172 和线粒体 p-Drp1 Ser637、LC3 蛋白表达及 ATP 合成量明显下调, 而 Caspase-3 和线粒体 p-Drp1 Ser616 蛋白表达及 ROS 生成量显著上调, 且线粒体数量下降, 呈碎片化。在成模小鼠和 / 或 TNF- α 处理的膝关节软骨细胞内过表达 TBK1 均可上调线粒体 p-Drp1 Ser637、LC3 蛋白表达和 ATP 合成量, 并下调 Caspase-3 蛋白表达与 ROS 生成量, 引起软骨面积和细胞内线粒体数量明显增加且趋向融合, 在此基础上敲低 Drp1 可显著下调线粒体 LC3 蛋白表达并增加凋亡细胞数量。另外, 该研究组研究显示, 用 AMPK 激活剂 M3A 处理膝关节原代软骨细胞可明显上调 p-AMPK Thr172、p-ULK1 Ser555、p-TBK1 Ser172 及 p-Drp1 Ser637 的蛋白表达; 而在此基础上敲低 TBK1 可显著抑制胞内 TBK1 和 Drp1 的磷酸化表达, 但不影响 p-AMPK Thr172 和 p-ULK1 Ser555 的蛋白表达, 以上结果提示 AMPK-ULK1-TBK1 信号途

径可能通过磷酸化 Drp1 以阻止线粒体分裂并促进线粒体自噬体的形成,从而抑制膝关节骨性关节炎所致软骨面积丢失和细胞凋亡^[13]。

3.2 TBK1参与调控自噬溶酶体的形成

Devi 等^[61]在高糖诱导的人视网膜色素上皮 ARPE-19 细胞中观察到 OPTN 与 p62 蛋白表达明显降低,线粒体膜蛋白 COXIV 与溶酶体相关膜蛋白 2A (lysosomal-associated membrane protein 2A, LAMP2A) 共定位水平显著增加且溶酶体增大,而给予 TBK1 抑制剂 Amlexanox 则可有效逆转上述结果,提示 TBK1 可能通过与 OPTN 和 / 或 p62 相结合而促进自噬溶酶体形成和溶酶体增大,但 TBK1 对自噬溶酶体的正性调节作用是否引起高糖孵育的 ARPE-19 细胞病理变化迄今仍不明确。Sun 等^[60]通过结扎小鼠心脏左冠状动脉前降支或缺氧处理 H9C2 细胞以构建在体和离体心肌梗死模型,引起心肌间质纤维化和细胞凋亡加重,心肌细胞内 p62 和 LC3-II 蛋白表达及 TBK1 与 Rab7、Rab7 与 LAMP1 共定位水平明显上调,而 PINK1、Parkin、NDP52 和 p-Rab7 Thr71 蛋白表达以及 TBK1 与 NDP52 共定位水平显著下调,同时线粒体肿胀、破裂并靶向募集至溶酶体;在缺氧处理的 H9C2 细胞内过表达 NDP52 则可有效逆转上述变化,但 PINK1 和 Parkin 蛋白表达无显著变化,在此基础上施加 TBK1 抑制剂 GSK8612 则再次下调 p-Rab7 Thr71 蛋白表达。鉴于 Rab7 在线粒体去极化过程中可从溶酶体膜转位至受损线粒体^[12],Sun 等^[60]推测在 PINK1/Parkin 非依赖性途径下,NDP52 过表达可能有助于 TBK1 与 Rab7 募集至受损线粒体并通过 TBK1 磷酸化 Rab7 促进自噬溶酶体形成,进而诱导梗死心肌细胞内受损线粒体的降解和清除。

Seabright 等^[14]用 CCCP 诱导小鼠 C2C12 成肌细胞线粒体去极化后发现,TBK1 的 Ser172 位点磷酸化激活发生在 PINK1 与 Parkin 活化之前,用 CCCP 处理 PINK1 基因敲除的 HeLa 细胞亦可明显上调 TBK1 Ser172 磷酸化水平,提示 TBK1 能在不依赖于 PINK1 和 Parkin 情况下被迅速激活。此外,用 AMPK 激活剂 991 诱导 C2C12 细胞内 AMPK 活化后,p-TBK1 Ser172 和 p-ULK1 Ser555 蛋白表达显著上调且线粒体靶向至溶酶体的量显著升高,而 p-Ub Ser65 和 Parkin 泛素化底物 CDGSH 铁硫簇结构域 1 蛋白表达均无明显变化;然而,在敲除 AMPK $\alpha 1/\alpha 2$ 的 HEK293 细胞中施加 991 处理则可

有效抑制 p-TBK1 Ser172 和 p-ULK1 Ser555 蛋白表达,以上结果提示 AMPK 可通过磷酸化 TBK1 Ser172 和 ULK1 Ser555 以促进自噬溶酶体的形成,进而增强 PINK1/Parkin 非依赖性线粒体自噬,但活化的 TBK1 能否通过与 OPTN 和 / 或 p62 相结合以及磷酸化 Rab7 而促进自噬溶酶体形成尚需进一步研究确认。鉴于 AMPK 可介导 ULK1 活化以激活线粒体自噬,且 AMPK-ULK1 可能位于 TBK1 上游而介导后者活化^[59,62],故在 PINK1/Parkin 非依赖性条件下,可能存在 AMPK-ULK1-TBK1 介导的线粒体自噬途径。

综合上述内容,我们将 TBK1 与自噬蛋白的关联及对线粒体自噬的调控作用归纳于表 1。

4 小结与展望

作为一种多功能蛋白激酶,TBK1 在 PINK1/Parkin 依赖性或非依赖性线粒体自噬信号通路中似乎不可或缺。一方面,在 PINK1/Parkin 依赖性条件下,TBK1 既可通过磷酸化 OPTN 以介导 OPTN 与多聚泛素链相结合,亦可磷酸化 OPTN、p62 和 Rab7 以诱导线粒体自噬体形成,还可促进 NDP52 与 ULK1 复合物相结合以及 TAX1BP1 与 LC3 相结合而增强线粒体自噬。另一方面,在不依赖于 PINK1/Parkin 的情况下,AMPK-ULK1 亦可作为 TBK1 上游而介导后者磷酸化,活化的 TBK1 分别磷酸化 Drp1 与 Rab7 以促进线粒体自噬体和自噬溶酶体的形成(图 1)。在介导线粒体自噬和参与线粒体质量控制过程中,TBK1 与 OPTN、NDP52、p62、TAX1BP1 和 Rab7 等自噬相关蛋白之间可能存在的互作或竞争性表达机制均有着深入研究的价值。目前,有如下关键问题尚待阐明:(1) 在 PINK1/Parkin 介导线粒体自噬过程中,受 TBK1 磷酸化调控的货物蛋白(如 NDP52 和 TAX1BP1)具体磷酸化位点尚不清楚,亟需厘清这些位点磷酸化有何作用;(2) 在不依赖 PINK1/Parkin 的情况下,除 AMPK-ULK1 途径外,TBK1 能否通过其他平行信号途径(如受体蛋白识别途径)介导线粒体自噬;(3) TBK1 在自噬体与溶酶体融合(形成自噬溶酶体)过程中的调控作用亦不明确,需探明是否还有更多的关键因子(如膜融合蛋白 SNARE)参与其中;(4) 在线粒体自噬过程中,有 3 个激酶介导的分子事件发生:PINK1 触发线粒体自噬启动信号、TBK1 触发自噬货物蛋白识别信号及 ULK1 触发自噬体吞

表 1. TBK1与自噬相关蛋白的关联及对线粒体自噬的调控作用

Table 1. The relationship between TBK1 and autophagy-related proteins and its regulatory effect on mitophagy

Autophagy-related proteins	Relationship	Effect	References
Ub	Binds to K63-linked polyubiquitination	Facilitates the mitochondrial membrane localization and activation of TBK1	[25, 42]
LC3C/GABARAPL2	Phosphorylates LC3C Ser93/96 and GABARAPL2 Ser87/88	Prevents premature cleavage of LC3s from nascent autophagosomes by ATG4, and then promotes the formation of the autophagosomal membranes	[52]
OPTN	Phosphorylates OPTN Ser473, Ser513 and Ser177	Increases the binding of OPTN to poly-Ub chains and then promotes the mitochondrial translocation of TBK1; Promotes mitophagosome formation via enhancing OPTN binding to LC3	[7, 23, 40, 43]
NDP52	Phosphorylates NDP52	Promotes mitophagy via enhancing the interaction of NDP52 with ULK1 complex; Promotes mitophagosome formation via enhancing NDP52 binding to LC3	[7, 23, 40, 45, 49, 50, 53]
p62	Phosphorylates p62 Ser403	Promotes mitophagosome formation via enhancing p62 binding to LC3	[11, 52]
TAX1BP1	Phosphorylates TAX1BP1	Promotes mitophagosome formation via enhancing TAX1BP1 binding to LC3	[7, 23, 40, 45]
Rab7	Phosphorylates Rab7 Ser72 and Thr71	Promotes the recruitment of ATG9 and FLCN/FNIP1 to damaged mitochondria; Promotes targeted recruitment of damaged mitochondria to lysosomes	[12, 60]
Drp1	Phosphorylates Drp1 Ser637	Abrogates the mitochondrial fission of Drp1 and promotes mitophagosome formation	[13]
ULK1	ULK1 phosphorylates TBK1 Ser172	Promotes targeted recruitment of damaged mitochondria to lysosomes via increasing the phosphorylation of TBK1	[14, 59, 62]

TBK1: TANK-binding kinase 1; Ub: ubiquitin; LC3C/GABARAPL2: microtubule-associated protein 1 light chain 3C/gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2; ATG4: autophagy-related protein 4; OPTN: optineurin; NDP52: nuclear dot protein 52; ULK1: UNC-51 like autophagy activating kinase 1; p62: sequestosome-1; TAX1BP1: TAX1-binding protein 1; Rab7: Ras-related GTP binding protein 7; FLCN/FNIP1: folliculin/folliculin interacting protein 1; Drp1: dynamin-related protein 1.

噬线粒体信号，上述事件是按一定顺序出现还是同时发生？厘清上述问题将为 TBK1 作为疾病诊疗潜在靶点在临床转化医学领域的应用提供理论与实验基础。

参考文献

1

Killackey SA, Philpott DJ, Girardin SE. Mitophagy pathways in health and disease. *J Cell Biol* 2020; 219(11): e202004029.

2

Pickles S, Vigié P, Youle RJ. Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance. *Curr Biol* 2018; 28(4): R170–R185.

3

Luo H, Zhang R, Krigman J, McAdams A, Ozgen S, Sun N. A healthy heart and a healthy brain: looking at mitophagy. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 294.

4

Ma RG (马穰桂), Xia Z, Shang HY. Advances in the study of mitophagy-related receptor proteins. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2021; 73(6): 1025–1034 (in Chinese).

5

Xiao Y, Zou Q, Xie X, Liu T, Li HS, Jie Z, Jin J, Hu H, Manyam G, Zhang L, Cheng X, Wang H, Marie I, Levy DE, Watowich SS, Sun SC. The kinase TBK1 functions in dendritic cells to regulate T cell homeostasis, autoimmunity, and antitumor immunity. *J Exp Med* 2017; 214(5): 1493–1507.

6

Ravenhill BJ, Boyle KB, von Muhlinen N, Ellison CJ, Masson

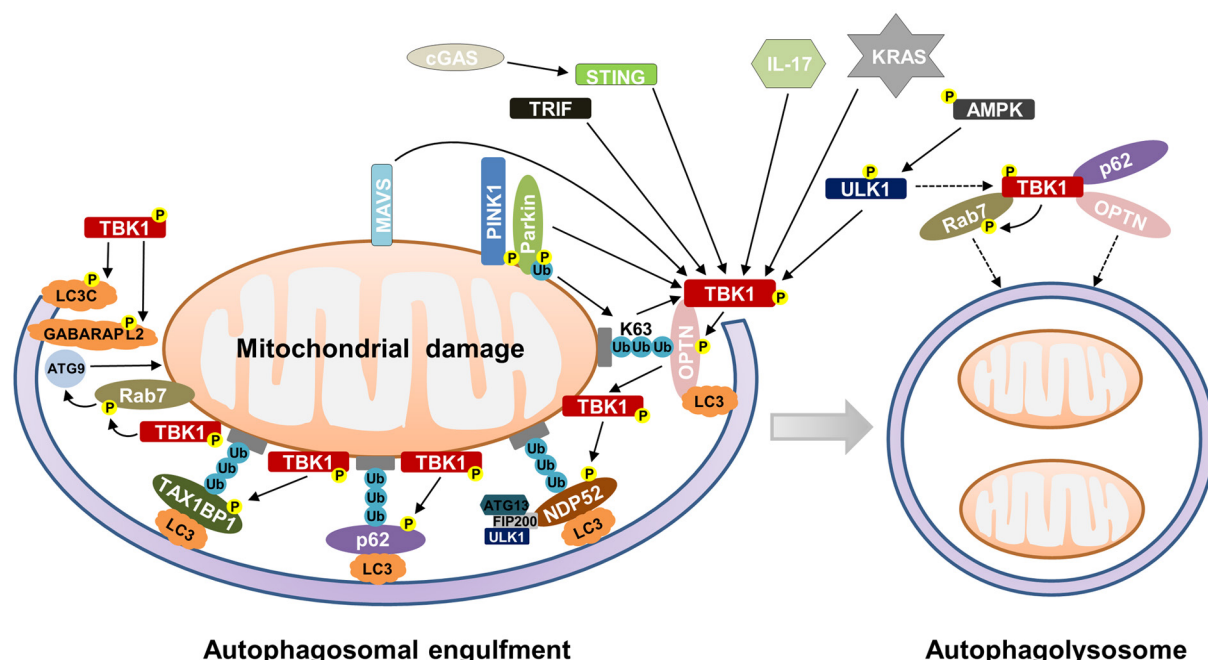


图 1. TBK1在PINK1/Parkin依赖性和非依赖性线粒体自噬中的作用

Fig. 1. The role of TANK-binding kinase 1 (TBK1) in PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1)/Parkin-dependent and -independent mitophagy. In PINK1/Parkin-dependent mitophagy: Parkin facilitates the mitochondrial localization and activation of TBK1 through promoting K63-linked polyubiquitination of TBK1; TBK1 phosphorylates optineurin (OPTN) to increase the binding of OPTN to K63-linked ubiquitin (Ub) chains and then promote the mitochondrial translocation of TBK1; TBK1 phosphorylates OPTN, p62/sequestosome-1, TAX1-binding protein 1 (TAX1BP1) to enhance their binding to microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3); TBK1 phosphorylates nuclear dot protein 52 (NDP52) to enhance the interaction of NDP52 with UNC-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1) complex, ULK1-autophagy-related protein 9 (ATG9)-family interacting protein of 200 kDa (FIP200), and enhances NDP52 binding to LC3; TBK1 phosphorylates Ras-related GTP binding protein 7 (Rab7) to promote the recruitment of ATG9-positive vesicles to damaged mitochondria; TBK1 phosphorylates LC3C and gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2 (GABARAPL2) to enhance autophagosomal engulfment of damaged mitochondria. In PINK1/Parkin-independent mitophagy: AMP-activated protein kinase (AMPK) activation leads to TBK1 phosphorylation possibly via ULK1; TBK1 may promote the formation of autophagolysosome through phosphorylation of Rab7 and/or interacting with OPTN, p62. Furthermore, activation of several proteins, TRIF-domain-containing adaptor-inducing interferon- β (TRIF), mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS), cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase (cGAS)-stimulator of interferon genes (STING), interleukin-17 (IL-17) and kirsten rat sarcoma viral oncogene (KRAS), causes TBK1 activation.

GR, Otten EG, Foeglein A, Williams R, Randow F. The cargo receptor NDP52 initiates selective autophagy by recruiting the ULK complex to cytosol-invading bacteria. *Mol Cell* 2019; 74(2): 320–329.e6.

- 7 Heo JM, Ordureau A, Paulo JA, Rinehart J, Harper JW. The PINK1-PARKIN mitochondrial ubiquitylation pathway drives a program of OPTN/NDP52 recruitment and TBK1 activation to promote mitophagy. *Mol Cell* 2015; 60(1): 7–20.
- 8 Wang S, Wang L, Qin X, Turdi S, Sun D, Culver B, Reiter RJ, Wang X, Zhou H, Ren J. ALDH2 contributes to melatonin-induced protection against APP/PS1 mutation-prompted cardiac anomalies through cGAS-STING-TBK1-mediated

regulation of mitophagy. *Signal Transduct Target Ther* 2020; 5(1): 119.

- 9 Cho CS, Park HW, Ho A, Semple IA, Kim B, Jang I, Park H, Reilly S, Saltiel AR, Lee JH. Lipotoxicity induces hepatic protein inclusions through TANK binding kinase 1-mediated p62/sequestosome 1 phosphorylation. *Hepatology* 2018; 68(4): 1331–1346.
- 10 Wang M, Wan C, He T, Han C, Zhu K, Waddington JL, Zhen X. Sigma-1 receptor regulates mitophagy in dopaminergic neurons and contributes to dopaminergic protection. *Neuropharmacology* 2021; 196: 108360.
- 11 Matsumoto G, Shimogori T, Hattori N, Nukina N. TBK1 controls autophagosomal engulfment of polyubiquitinated

- mitochondria through p62/SQSTM1 phosphorylation. *Hum Mol Genet* 2015; 24(15): 4429–4442.
- 12 Heo JM, Ordureau A, Swarup S, Paulo JA, Shen K, Sabatini DM, Harper JW. RAB7A phosphorylation by TBK1 promotes mitophagy via the PINK-PARKIN pathway. *Sci Adv* 2018; 4(11): eaav0443.
- 13 Hu SL, Mamun AA, Shaw J, Li SL, Shi YF, Jin XM, Yu YX, Pang CZ, Li ZY, Lu JJ, Cai YP, Wang XY, Xiao J. TBK1-mediated DRP1 phosphorylation orchestrates mitochondrial dynamics and autophagy activation in osteoarthritis. *Acta Pharmacol Sin* 2023; 44(3): 610–621.
- 14 Seabright AP, Fine NHF, Barlow JP, Lord SO, Musa I, Gray A, Bryant JA, Banzhaf M, Lavery GG, Hardie DG, Hodson DJ, Philp A, Lai YC. AMPK activation induces mitophagy and promotes mitochondrial fission while activating TBK1 in a PINK1-Parkin independent manner. *FASEB J* 2020; 34(5): 6284–6301.
- 15 Pomerantz JL, Baltimore D. NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *EMBO J* 1999; 18(23): 6694–6704.
- 16 Larabi A, Devos JM, Ng SL, Nanao MH, Round A, Maniatis T, Panne D. Crystal structure and mechanism of activation of TANK-binding kinase 1. *Cell Rep* 2013; 3(3): 734–746.
- 17 Li J, Li J, Miyahira A, Sun J, Liu Y, Cheng G, Liang H. Crystal structure of the ubiquitin-like domain of human TBK1. *Protein Cell* 2012; 3(5): 383–391.
- 18 Ahmad L, Zhang SY, Casanova JL, Sancho-Shimizu V. Human TBK1: a gatekeeper of neuroinflammation. *Trends Mol Med* 2016; 22(6): 511–527.
- 19 Goncalves A, Bärckstümmer T, Dixit E, Scheicher R, Górna MW, Karayel E, Sugar C, Stukalov A, Berg T, Kralovics R, Planyavsky M, Bennett KL, Colinge J, Superti-Furga G. Functional dissection of the TBK1 molecular network. *PLoS One* 2011; 6(9): e23971.
- 20 Freischmidt A, Wieland T, Richter B, Ruf W, Schaeffer V, Müller K, Marroquin N, Nordin F, Hübers A, Weydt P, Pinto S, Press R, Millicamps S, Molko N, Bernard E, Desnuelle C, Soriani MH, Dorst J, Graf E, Nordström U, Feiler MS, Putz S, Boeckers TM, Meyer T, Winkler AS, Winkelmann J, de Carvalho M, Thal DR, Otto M, Brännström T, Volk AE, Kursula P, Danzer KM, Lichtner P, Dikic I, Meitinger T, Ludolph AC, Strom TM, Andersen PM, Weishaupt JH. Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. *Nat Neurosci* 2015; 18(5): 631–636.
- 21 Liu S, Cai X, Wu J, Cong Q, Chen X, Li T, Du F, Ren J, Wu YT, Grishin NV, Chen ZJ. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science* 2015; 347(6227): aaa2630.
- 22 Lee SH, Jhun J, Byun JK, Kim EK, Jung K, Lee JE, Choi JY, Park SH, Cho ML. IL-17 axis accelerates the inflammatory progression of obese in mice via TBK1 and IKK pathway. *Immunol Lett* 2017; 184: 67–75.
- 23 Barbie DA, Tamayo P, Boehm JS, Kim SY, Moody SE, Dunn IF, Schinzel AC, Sandy P, Meylan E, Scholl C, Fröhling S, Chan EM, Sos ML, Michel K, Mermel C, Silver SJ, Weir BA, Reiling JH, Sheng Q, Gupta PB, Wadlow RC, Le H, Hoersch S, Wittner BS, Ramaswamy S, Livingston DM, Sabatini DM, Meyerson M, Thomas RK, Lander ES, Mesirov JP, Root DE, Gilliland DG, Jacks T, Hahn WC. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* 2009; 462(7269): 108–112.
- 24 Dikic I. Proteasomal and autophagic degradation systems. *Annu Rev Biochem* 2017; 86: 193–224.
- 25 Gao B, Yu W, Lv P, Liang X, Sun S, Zhang Y. Parkin overexpression alleviates cardiac aging through facilitating K63-polyubiquitination of TBK1 to facilitate mitophagy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2021; 1867(1): 165997.
- 26 Richter B, Sliter DA, Herhaus L, Stolz A, Wang C, Beli P, Zaffagnini G, Wild P, Martens S, Wagner SA, Youle RJ, Dikic I. Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(15): 4039–4044.
- 27 Pillai S, Nguyen J, Johnson J, Haura E, Coppola D, Chellappan S. Tank binding kinase 1 is a centrosome-associated kinase necessary for microtubule dynamics and mitosis. *Nat Commun* 2015; 6: 10072.
- 28 Lu YT, Xiao YF, Li YF, Li J, Nan FJ, Li JY. Sulfuretin protects hepatic cells through regulation of ROS levels and autophagic flux. *Acta Pharmacol Sin* 2019; 40(7): 908–918.
- 29 Cui Y, Zhao D, Sreevatsan S, Liu C, Yang W, Song Z, Yang L, Barrow P, Zhou X. *Mycobacterium bovis* induces endoplasmic reticulum stress mediated-apoptosis by activating IRF3 in a murine macrophage cell line. *Front Cell Infect Microbiol* 2016; 6: 182.
- 30 Kato H, Lu Q, Rapaport D, Kozjak-Pavlovic V. Tom70 is essential for PINK1 import into mitochondria. *PLoS One* 2013; 8(3): e58435.
- 31 Sekine S, Wang C, Sideris DP, Bunker E, Zhang Z, Youle RJ. Reciprocal roles of Tom7 and OMA1 during mitochondrial import and activation of PINK1. *Mol Cell* 2019; 73(5): 1028–1043.e5.
- 32 Meissner C, Lorenz H, Hehn B, Lemberg MK. Intramembrane protease PARL defines a negative regulator of PINK1 and PARK2/Parkin-dependent mitophagy. *Autophagy* 2015;

- 11(9). 1484–1498.
- 33 Greene AW, Grenier K, Aguilera MA, Muise S, Farazifard R, Haque ME, McBride HM, Park DS, Fon EA. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Rep* 2012; 13(4): 378–385.
- 34 Yamano K, Youle RJ. PINK1 is degraded through the N-end rule pathway. *Autophagy* 2013; 9(11): 1758–1769.
- 35 Shang H, Xia Z, Bai S, Zhang HE, Gu B, Wang R. Downhill running acutely elicits mitophagy in rat soleus muscle. *Med Sci Sports Exerc* 2019; 51(7): 1396–1403.
- 36 Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19(6): 349–364.
- 37 Ordureau A, Sarraf SA, Duda DM, Heo JM, Jedrychowski MP, Sviderskiy VO, Olszewski JL, Koerber JT, Xie T, Beausoleil SA, Wells JA, Gygi SP, Schulman BA, Harper JW. Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis. *Mol Cell* 2014; 56(3): 360–375.
- 38 Zachari M, Gudmundsson SR, Li Z, Manifava M, Cugliandolo F, Shah R, Smith M, Stronge J, Karanasios E, Piunti C, Kishi-Itakura C, Vihinen H, Jokitalo E, Guan JL, Buss F, Smith AM, Walker SA, Eskelinen EL, Ktistakis NT. Selective autophagy of mitochondria on a ubiquitin-endoplasmic-reticulum platform. *Dev Cell* 2020; 55(2): 251.
- 39 Runde AP, Mack R, S J PB, Zhang J. The role of TBK1 in cancer pathogenesis and anticancer immunity. *J Exp Clin Cancer Res* 2022; 41(1): 135.
- 40 Moore AS, Holzbaur EL. Dynamic recruitment and activation of ALS-associated TBK1 with its target optineurin are required for efficient mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(24): E3349–E3358.
- 41 Wang L, Qi H, Tang Y, Shen HM. Post-translational modifications of key machinery in the control of mitophagy. *Trends Biochem Sci* 2020; 45(1): 58–75.
- 42 Tu D, Zhu Z, Zhou AY, Yun CH, Lee KE, Toms AV, Li Y, Dunn GP, Chan E, Thai T, Yang S, Ficarro SB, Marto JA, Jeon H, Hahn WC, Barbie DA, Eck MJ. Structure and ubiquitination-dependent activation of TANK-binding kinase 1. *Cell Rep* 2013; 3(3): 747–758.
- 43 Manford AG, Rape M. Better safe than sorry: interlinked feedback loops for robust mitophagy. *Mol Cell* 2015; 60(1): 1–2.
- 44 Maruyama T, Noda NN. Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition. *J Antibiot (Tokyo)* 2017; 71(1): 72–78.
- 45 Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, Sideris DP, Fogel AI, Youle RJ. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 2015; 524(7565): 309–314.
- 46 Nakatogawa H, Ishii J, Asai E, Ohsumi Y. Atg4 recycles inappropriately lipidated Atg8 to promote autophagosome biogenesis. *Autophagy* 2012; 8(2): 177–86.
- 47 Wang C, Liu K, Cao J, Wang L, Zhao Q, Li Z, Zhang H, Chen Q, Zhao T. PINK1-mediated mitophagy maintains pluripotency through optineurin. *Cell Prolif* 2021; 54(5): e13034.
- 48 He L, Chen L, Li L. The TBK1-OPTN axis mediates cross-talk between mitophagy and the innate immune response: a potential therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Neurosci Bull* 2017; 33(3): 354–356.
- 49 Vargas JNS, Wang C, Bunker E, Hao L, Maric D, Schiavo G, Randow F, Youle RJ. Spatiotemporal control of ULK1 activation by NDP52 and TBK1 during selective autophagy. *Mol Cell* 2019; 74(2): 347–362.e6.
- 50 Ke PY, Chang CW, Hsiao YC. Baicalein activates Parkin-dependent mitophagy through NDP52 and OPTN. *Cells* 2022; 11(7): 1132.
- 51 Garcia-Garcia J, Berge AKM, Overå KS, Larsen KB, Bhujabal Z, Brech A, Abudu YP, Lamark T, Johansen T, Sjøttem E. TRIM27 is an autophagy substrate facilitating mitochondria clustering and mitophagy via phosphorylated TBK1. *FEBS J* 2023; 290(4): 1096–1116.
- 52 Herhaus L, Bhaskara RM, Lystad AH, Gestal-Mato U, Covarrubias-Pinto A, Bonn F, Simonsen A, Hummer G, Dikic I. TBK1-mediated phosphorylation of LC3C and GABARAP-L2 controls autophagosome shedding by ATG4 protease. *EMBO Rep* 2020; 21(1): e48317.
- 53 Nozawa T, Sano S, Minowa-Nozawa A, Toh H, Nakajima S, Murase K, Aikawa C, Nakagawa I. TBC1D9 regulates TBK1 activation through Ca^{2+} signaling in selective autophagy. *Nat Commun* 2020; 11(1): 770.
- 54 Ma Y, Wei Z, Bast RC Jr, Wang Z, Li Y, Gao M, Liu Y, Wang X, Guo C, Zhang L, Wang X. Downregulation of TRIM27 expression inhibits the proliferation of ovarian cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Lab Invest* 2016; 96(1): 37–48.
- 55 Zoumpoulidou G, Broceño C, Li H, Bird D, Thomas G, Mitnacht S. Role of the tripartite motif protein 27 in cancer development. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104(12): 941–952.
- 56 Zhang Y, Feng Y, Ji D, Wang Q, Qian W, Wang S, Zhang Z, Ji B, Zhang C, Sun Y, Fu Z. TRIM27 functions as an oncogene by activating epithelial-mesenchymal transition and p-AKT in colorectal cancer. *Int J Oncol* 2018; 53(2): 620–632.
- 57 Yamano K, Wang C, Sarraf SA, Münch C, Kikuchi R, Noda NN, Hizukuri Y, Kanemaki MT, Harper W, Tanaka K, Matsuda N, Youle RJ. Endosomal Rab cycles regulate Parkin-mediated mitophagy. *Elife* 2018; 7: e31326.

- 58 Malik AU, Karapetsas A, Nirujogi RS, Mathea S, Chatterjee D, Pal P, Lis P, Taylor M, Purlyte E, Gourlay R, Dorward M, Weidlich S, Toth R, Polinski NK, Knapp S, Tonelli F, Alessi DR. Deciphering the LRRK code: LRRK1 and LRRK2 phosphorylate distinct Rab proteins and are regulated by diverse mechanisms. *Biochem J* 2021; 478(3): 553–578.
- 59 Laker RC, Drake JC, Wilson RJ, Lira VA, Lewellen BM, Ryall KA, Fisher CC, Zhang M, Saucerman JJ, Goodyear LJ, Kundu M, Yan Z. Ampk phosphorylation of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in exercise-induced mitophagy. *Nat Commun* 2017; 8(1): 548.
- 60 Sun M, Zhang W, Bi Y, Xu H, Abudureyimu M, Peng H, Zhang Y, Ren J. NDP52 protects against myocardial infarction-provoked cardiac anomalies through promoting autophagosome-lysosome fusion via recruiting TBK1 and RAB7. *Antioxid Redox Signal* 2022; 36(16–18): 1119–1135.
- 61 Devi TS, Yumnamcha T, Yao F, Somayajulu M, Kowluru RA, Singh LP. TXNIP mediates high glucose-induced mitophagic flux and lysosome enlargement in human retinal pigment epithelial cells. *Biol Open* 2022; 11(8): bio059489.
- 62 Zhao P, Wong KI, Sun X, Reilly SM, Uhm M, Liao Z, Skrobogatko Y, Saltiel AR. TBK1 at the crossroads of inflammation and energy homeostasis in adipose tissue. *Cell* 2018; 172(4): 731–743.e12.