

综述

蛋白质 SUMO 化修饰的蛋白质组学研究述评

熊强强¹, 屠俊², 李郡如^{2,3}, 程金科², 左建宏^{1*}, 陈亚兰^{2*}

1. 南华大学衡阳医学院转化医学研究室, 衡阳 421001; 2. 上海交通大学基础医学院生物化学与分子细胞生物学系, 上海市肿瘤微环境与炎症重点实验室, 上海 200025; 3. 上海交通大学医学院2016级临床医学八年制, 上海 200025

[摘要] 小分子泛素相关修饰物 (small ubiquitin-related modifier, SUMO) 化修饰在真核细胞中广泛存在, 参与了多种信号转导和代谢途径。规模化鉴定 SUMO 化修饰蛋白质有助于从整体角度揭示 SUMO 化修饰的功能和作用机制。目前, 有关 SUMO 化修饰位点的鉴定难度较大, 如何规模化研究蛋白质的 SUMO 化修饰尚未有定论。基于此, 该文系统分析了哺乳动物细胞中开展 SUMO 化修饰蛋白质组学的研究工作, 并在总结其研究方法和成果的基础上, 对 SUMO 的突变模式和富集方式进行详细分析, 进而归纳出针对细胞和组织样品进行 SUMO 化修饰位点系统化鉴定的理想方法。

[关键词] 小分子泛素相关修饰物; 小类泛素化修饰; 蛋白质组学; 质谱

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.01.016 **[中图分类号]** Q5-33 **[文献标志码]** A

Review of proteomic study of protein SUMOylation

XIONG Qiang-qiang¹, TU Jun², LI Jun-ru^{2,3}, CHENG Jin-ke², ZUO Jian-hong^{1*}, CHEN Ya-lan^{2*}

1. Research Lab of Translational Medicine, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China; 2. Shanghai Key Laboratory for Tumor Microenvironment and Inflammation; Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China; 3. Eight-year Specialty of Grade 2016 Clinical Medicine, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] Small ubiquitin-related modifier (SUMO) exists widely in all eukaryotic cells, which is involved in many signal transduction and metabolism pathways. Systematic identification of SUMOylated proteins is helpful to reveal the function and mechanism of SUMOylation from an overall perspective. At present, it is difficult to identify the SUMOylation sites, and how to study the SUMOylated proteins on a large scale has not been determined. This paper systematically analyzes the proteomic studies of protein SUMOylation in mammalian cells. On the basis of summarizing the research methods and achievements, the mutation mode and enrichment mode of SUMO are analyzed in detail, and then the ideal methods for systematic identification of SUMOylation sites in cells and tissues are concluded.

[Key words] small ubiquitin-related modifier (SUMO); SUMOylation; proteomics; mass spectrometry

蛋白质翻译后修饰的存在极大丰富了蛋白质的多样性, 而且为蛋白质响应刺激和发挥功能提供了精密的调控方式。细胞内存在大量的磷酸化和乙酰化等化学修饰, 这些修饰的供体主要是 ATP 和乙酰辅酶 A 等, 它们是物质代谢过程中产生的小分子产物; 与此不同, 泛素和类泛素家族属于小分子蛋白质, 它们是由基因编码的, 并带有特定的“使命”。目前已知, 泛素化修饰与蛋白酶体降解途径密切相关^[1], 自噬相关蛋白质 12 (autophagy related 12, ATG12) 修饰则与自噬过程密切相关^[2]。人体内小分子泛素相关修饰物 (small ubiquitin-related modifier, SUMO) 化修饰是由活化酶、接合酶和连接酶

介导的, 而 SUMO 的成熟和去修饰过程则由 6 种 SUMO 特异性蛋白酶 (SUMO/sentrin-specific proteases, SENPs) 催化完成^[3]。SUMO 化修饰广泛存在于细胞内各个组分, 参与了基因表达、代谢调控、免疫应答和肿瘤发生发展等诸多生理病理调控过程^[4], 但目前对其主要“使命”尚不明确。对 SUMO 化修饰蛋白质进行系统化鉴定和研究, 有助于了解 SUMO 化修饰的时空分布、响应信号、作用机制和功能表型等, 而这些都需要建立在掌握特定的 SUMO 化修饰研究方法的基础上。尽管 SUMO 化修饰非常重要, 但由于 SUMO 本身的序列特征和修饰丰度问题, 鉴定 SUMO 化修饰位点一直是本领域的热点和难点。

[基金项目] 国家自然科学基金 (81700701, 31600664); 上海交通大学医学院高水平地方高校创新团队 (SSMU-ZDCX20180802); 湖南省科学技术厅重点项目 (2017SK2082); 湖南省卫生健康委员会重点项目 (20201909)。

[作者简介] 熊强强 (1993—), 男, 硕士生; 电子邮箱: 1216268842@qq.com。

[通信作者] 左建宏, 电子信箱: 632138414@qq.com。陈亚兰, 电子信箱: chenyl@shsmu.edu.cn。*为共同通信作者。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (81700701, 31600664); Innovative Research Team of High-Level Local University in Shanghai (SSMU-ZDCX20180802); Key Program of China Hunan Provincial Science & Technology Department (2017SK2082); Key Program of Health Commission of Hunan Province (20201909)。

[Corresponding Author] ZUO Jian-hong, E-mail: 632138414@qq.com. CHEN Ya-lan, E-mail: chenyl@shsmu.edu.cn. *Co-corresponding authors.

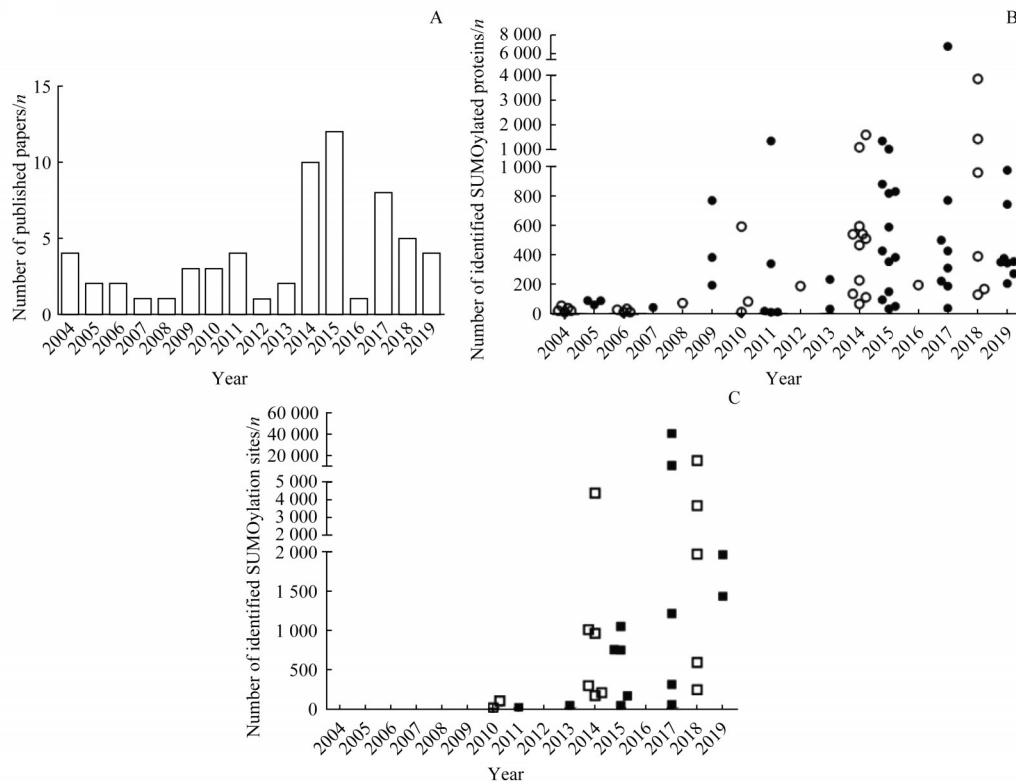
本文对利用质谱规模化研究哺乳动物中SUMO化修饰的方法进行总结, 供开展相关研究的学者们参考。

1 SUMO化修饰的规模化鉴定概述

要从全局性角度观察SUMO化修饰在特定细胞或组织中的状态和变化, 需要通过蛋白质组学的手段规模化鉴定SUMO化修饰位点。从2004年到2019年, 已经有近百篇涉及SUMO化修饰组学的文献, 其中大部分聚焦于哺乳动物中的SUMO化修饰。此外, 还有一些介绍植物或线虫中的SUMO化修饰组学的研究^[5-6], 在此不作讨论。

在这16年的研究中, 从研究成果的数量来看, 2014年和2015年的成果最多(图1A); 从鉴定到的修饰蛋白质和修饰位点来看, 2017年和2018年的成果最丰(图1B、C)。从总体研究趋势来看, 2004年多篇人源细胞中SUMO化修饰组学研究成果陆续被发表, 数十个修饰蛋白质被鉴定, 但均未鉴定到修饰位点。2005—2008年, 通过串联亲和纯化技术富集SUMO化修饰蛋白质以及通过突变SUMO蛋白鉴定修饰位点的技术路线逐步被建立^[7-8]。2009—2013年, 得益于细胞培养稳定同位素标记(stable-isotope labelling by amino acids in cell culture,

SILAC)定量技术和高分辨率质谱的广泛应用, SUMO化修饰组学的研究又开始逐渐增多。在此期间, 研究人员针对SUMO蛋白质的C端序列进行改造, 获得了具体的修饰位点^[9-10]。在2011年和2013年出现了针对细胞内源性SUMO化修饰蛋白质进行鉴定的研究, 但均未能鉴定到修饰位点^[11-12]。在2014年和2015年, SUMO化修饰组学的研究达到高潮, 在此期间学者们对SUMO蛋白质的氨基酸序列进行了多种改造, 对富集和洗脱方法也进行了优化, 鉴定到的修饰位点数目有了显著增加。2016年出现了多篇综述性论文^[13-16], 但研究成果数量较少。在2017年和2018年, 得益于SUMO突变模式、刺激条件、富集方法、搜库设置的成熟和Q-Exactive™等高性能质谱的广泛应用, SUMO化修饰蛋白质和修饰位点的鉴定数目达到顶峰, 且内源性SUMO化修饰也能鉴定出大量修饰位点^[17]。在2019年, 由于SUMO化修饰蛋白质组学研究已经相对成熟, 规模化鉴定SUMO化修饰蛋白质和修饰位点被应用在SUMO化修饰的功能实验中^[18-19], 而专门针对SUMO化修饰蛋白质组学技术的研究数量有所减少。下文我们主要从SUMO蛋白质改造和富集方法方面重点论述, 并总结在细胞和组织水平进行SUMO化修饰蛋白质组学研究的最优路线。



Note: A. Number of research papers published each year. B. Number of identified SUMOylated proteins in published papers each year. C. Number of identified SUMOylation sites in published papers each year.

图1 哺乳动物中SUMO化修饰蛋白质组学研究分析

Fig 1 Analysis of proteomic study on protein SUMOylation in mammals

2 通过改造SUMO以鉴定修饰位点

在人体中, SUMO存在5种旁系同源物^[4,20-21], 研究较多的是SUMO1、SUMO2和SUMO3, 其中SUMO2和SUMO3的成熟蛋白质序列高度一致, 难以区分, 所以通常合并研究。这些SUMO的C端缺少赖氨酸或精氨酸, 在经过胰酶酶解后, SUMO1和SUMO2/3分别会在修饰底物上残留包含19或32个氨基酸的长链多肽, 不利于质谱鉴定修饰位点。因此, 为方便质谱鉴定, 需要对SUMO进行改造。目前, 常用的改造模式为SUMO1-T95R^[22]、SUMO2-K0Q87R^[23]和SUMO3-Q87RQ88N^[24], 这些突变改造都使SUMO1、SUMO2或SUMO3产生在胰酶酶解后便于质谱鉴定的残留序列, 依次分别为GG-K、QQTGG-K和NQTGG-K, 据此可以鉴定修饰位点。当谷氨酰胺在N端时容易环化, QQTGG-K转变成pyroQQTGG-K^[25-26]; 而NQTGG-K容易发生中性丢失产生TGG-K^[27], 这些也是鉴定位点的搜库指标。我们注意到在这些研究工作中, SUMO1和SUMO3的序列计数包含了首位甲硫氨酸; 而对SUMO2, 研究者在计数其序列时去除了第一个甲硫氨酸, 所以经过胰酶酶解后得到的残留肽段仍然是QQTGG。在SUMO2-K0Q87R中, 研究者们将SUMO2上所有的赖氨酸突变成了精氨酸, 这样用赖氨酸内肽酶(Lys-C)进行酶解后, SUMO2不会受到任何切割, 仍然保持完整性, 因而可以利用其N端带的His tag再次纯化, 进一步富集修饰肽段^[23]。在SUMO3-Q87RQ88N中, 研究者将第88位的谷氨酰胺突变成天冬氨酸, 这样可以避免N端的谷氨酰胺在实验过程中发生改变^[27]。上述突变为质谱鉴定修饰位点提供了便利, 然而由于突变位点靠近SUMO与靶蛋白质的接合之处, 且研究者们没有对野生型SUMO蛋白质和突变型SUMO蛋白质在细胞内的结合蛋白质进行全面细致的比较^[10,23,27], 因而对于突变对SUMO本身修饰行为的影响难以进行全面准确的判定。尽管存在此类风险, 但通过突变改变SUMO的蛋白质序列在样品处理过程中操作便捷, 鉴定位点的成功率高, 受到大多数研究者的青睐; 故此策略仍是当前的主流研究方案。

如果不对SUMO进行突变, 则需要引入多酶进行酶解。例如, 对于SUMO1, Cai等^[28]采用Lys-C和谷氨酸内肽酶(Glu-C)酶解, 得到QTGG残留肽段; 对于SUMO2/3, Hendriks等^[17]采用Lys-C和天冬氨酸内肽酶(Asp-N)酶解, 得到DVFQQQTGG残留肽段; Lumpkin等^[29]采用一种野生型 α 裂解蛋白酶(WaLP)在苏氨酸的C端进行切割, 从而使SUMO1/2/3都能产生GG残留肽段; 不过WaLP能够在多种氨基酸附近进行不同程度的切

割, 其特异性还需要提高, 产生结果的准确性还有待验证。多酶酶解方案既缩短了残留片段以便于后续质谱鉴定修饰位点, 又不会影响体内SUMO本身的修饰行为, 是未来很有前景的发展方向, 特别是在鉴定内源SUMO的修饰位点方面。未来需要在酶的特异性、有效性和经济性上进行优化, 以提高鉴定位点的成功率和准确性。

3 通过亲和纯化富集修饰的蛋白质

在2004年开展的研究中, 研究者在SUMO上融合不同的标签, 对修饰蛋白质进行富集。有的利用His tag在变性条件下进行富集^[30], 也有的利用Myc tag或者HA tag在非变性条件下进行富集^[31-32]。His tag与Ni的相互作用不受尿素和盐酸胍等变性溶液的影响, 利用变性溶液可以消除大量非共价相互作用, 从而去掉一些SUMO相互作用蛋白质, 得到的共价接合的修饰蛋白质相对更多。此外, 变性溶液可以在一定程度上抑制去修饰酶SENPs和其他蛋白酶, 从而减少蛋白质提取过程中SUMO修饰蛋白质的降解或去修饰, 增加修饰蛋白质的鉴定率。然而, 利用His tag富集修饰蛋白质的特异性不高, 这主要是由于真核生物中有较多含poly-His的蛋白质, 这些都可能被Ni富集下来, 产生假阳性。针对这一问题, 可通过在蛋白质结合过程中加入少量咪唑和在清洗过程中降低溶液的pH值加以改善。基于His tag的理论优势和实际效果, 研究人员在后续细胞水平的规模化研究中大部分采用了His tag。这样, 可以在蛋白质富集过程中尽可能多地富集SUMO化修饰蛋白质, 减少假阴性率, 而在后续搜库过程中, 通过鉴定到具体修饰位点而减少假阳性率。

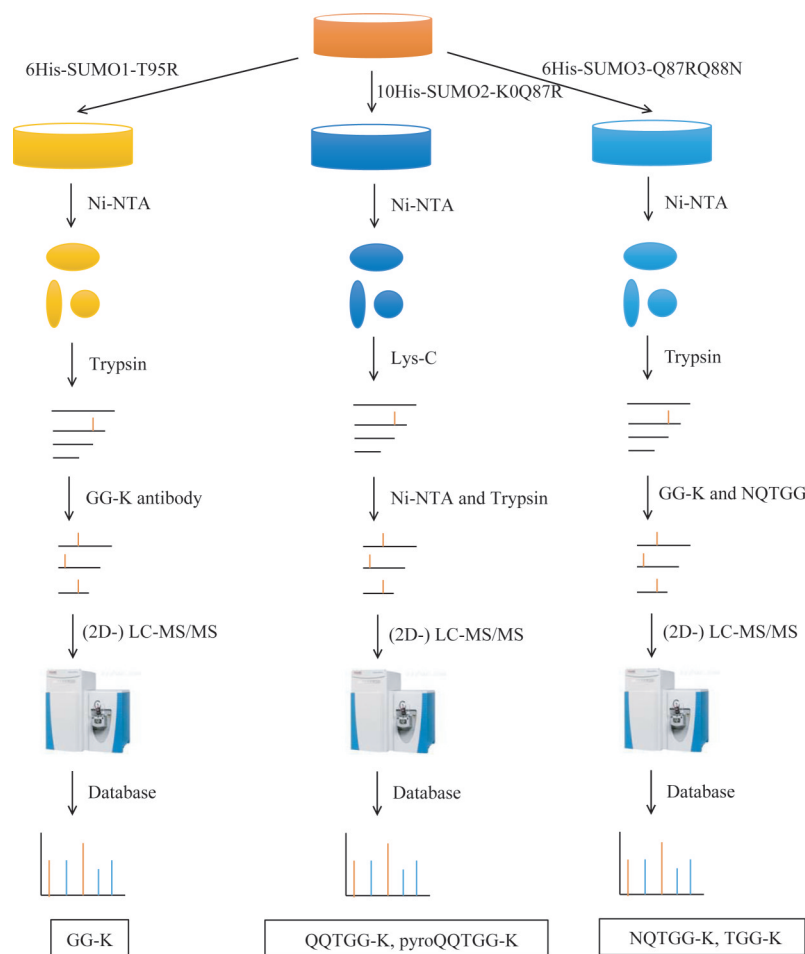
除了利用融合标签进行富集外, 还有研究者利用SUMO的抗体富集内源性SUMO的修饰蛋白质, 这对于难以进行转染操作的组织样品非常重要^[17,28]。在最初的研究中, 利用SUMO1或SUMO2/3抗体富集的是修饰蛋白质而非修饰肽段, 不仅富集效率低, 得到的非修饰肽段多, 而且难以鉴定到修饰位点。2017年本课题组首次报道了规模化鉴定内源性SUMO的修饰位点的方法^[28]。在此方法中, 我们合成了将SUMO1的C端连接在靶蛋白赖氨酸 ϵ -NH₃上的支链肽段, 以此为抗原制备了SUMO1的多克隆抗体(TC)。利用此抗体, 我们可以富集经过Lys-C酶解后的SUMO1修饰肽段, 并经过Glu-C酶解后鉴定到具体修饰位点。此后, 又有研究者设计制备了抗NQTGG的抗体^[27], 或直接利用商业化的识别SUMO2/3 C端的抗体(8A2)富集修饰肽段, 并用Asp-N酶解鉴定到了具体修饰位点^[17]。值得一提的是, 利用商业化的

GG-K 抗体也能有效富集 SUMO 化修饰肽段^[22,33], 这种方法可以整合在标签纯化和抗体纯化过程中^[27], 从而增加纯度, 有利于提高修饰位点的鉴定率。

综上, 对于能够转染的细胞而言, 最有效便捷的富集方式还是使用 His tag; 而对于不便转染的组织样品, 使用 SUMO 的 C 端抗体富集修饰肽段则是首选之策。此外, 这 2 种方法还可以结合起来, 增加样品纯度以提高修饰位点的鉴定率。

4 细胞样品的 SUMO 化修饰组学研究

细胞是研究 SUMO 化修饰蛋白质组学最便捷的样品, 可以通过转染操作进行过表达, 还可以对 SUMO 序列进行改造, 因而鉴定得到更多的修饰位点。通过对培养细胞样品的 SUMO 化修饰蛋白质组学研究的的方法和结果进行分析 and 比较, 我们发现了针对 SUMO1、SUMO2 和 SUMO3 最有效的研究策略 (图 2)。



Note: Ni-NTA—nickel-nitrilotriacetic acid; LC-MS/MS—liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

图 2 细胞样品中鉴定 SUMO 修饰位点示意图

Fig 2 Sketch map of identification of SUMOylation sites in cell samples

对于 SUMO1, 首先在细胞中稳定转染 6His-SUMO1-T95R, 根据需要进行刺激或直接收集细胞。用含有盐酸胍和多种蛋白酶抑制剂的变性裂解液提取蛋白质, 并用 Ni-NTA 磁珠富集 SUMO1 修饰蛋白质。利用咪唑洗脱后再用胰酶酶解得到肽段, 将这些肽段用 GG-K 试剂盒进行第 2 轮富集, 而后进行质谱鉴定。最初用 Ni-NTA 一步富集只能鉴定得到 14 个 SUMO1 修饰位点^[9], 而研究者们进一步采用 GG-K 富集后可以鉴定得到 295 个 SUMO1 修饰位点, 近期用此方法将鉴定位点数目进一步扩大到了 1 428 个修

饰位点^[22,34]。由此可见, 2 轮富集得到的效果可能更好。如果起始样品很多, 可以在质谱鉴定前使用强阳离子交换或高 pH 色谱预分离, 以鉴定到更多的修饰蛋白质和修饰位点^[17,27]。在质谱选择上, 现在通常需要 Q-Exactive 或更高级别的质谱, 以增强扫描速度和识别精度。在搜库中, 通过设置 GG-K 可变修饰来鉴定修饰位点。

对于 SUMO2, 首先在细胞中稳定转染 10His-SUMO2-K0Q87R, 可以通过热休克和蛋白酶体抑制剂 MG132 刺激增强修饰, 然后收集细胞并在变性条件下利用 Ni-NTA

磁珠富集SUMO2修饰蛋白质。洗脱后用Lys-C酶解并再次用Ni-NTA磁珠富集SUMO2修饰肽段,经过胰酶酶解后进行质谱鉴定。色谱和质谱选择同上述SUMO1鉴定方案。在搜库中,通过设置QQTGG-K和pyroQQTGG-K鉴定修饰位点^[35]。

对于SUMO3,首先在细胞中稳定转染6His-SUMO3-Q87RQ88N。由于SUMO3和SUMO2均能响应热休克和MG132刺激而增加修饰,因而可对细胞进行这2种刺激。收集细胞后用Ni-NTA磁珠富集SUMO3修饰蛋白质。洗脱后通过胰酶酶解产生NQTGG残留肽段,这些修饰肽段依次用GG-K抗体和NQTGG-K抗体富集,然后进行质谱鉴定,色谱和质谱选择同上。在搜库中,通过设置NQTGG-K和TGG-K鉴定修饰位点^[27]。

5 组织样品的SUMO化修饰蛋白质组学研究

对于来源于小鼠或人的组织样本,难以进行转染操作,需要鉴定内源SUMO的修饰位点。通过分析已发表的相关文献并结合本课题组的近期研究,提出组织样品的SUMO1和SUMO2/3的修饰蛋白质组学研究方法(图3)。我们前期在SUMO1修饰最丰富的小鼠睾丸中开展了首次鉴定组织样品内源SUMO化修饰位点的工作^[28],其技术路线也可以应用在其他组织样品中。首先提取组织蛋白质,在变性条件下用Lys-C酶解。然后,用制备的SUMO1抗体(TC)富集SUMO1修饰肽段,再经过Glu-C酶解后即可进行色谱分离和质谱鉴定,通过QTGG-K和pyroQTGG-K鉴定修饰位点。需要指出的是,我们当初的工作中并未考虑通过pyroQTGG-K鉴定修饰位点,但基于我们近期的研究测试,pyroQTGG-K在SUMO1的修饰位点鉴定中也广泛存在,故提出将此加入可变修饰设置中。对SUMO2/3的研究与此类似,差异在于需要用SUMO2/3抗体(8A2)富集SUMO2/3修饰肽段,在经过Asp-N酶解后进行质谱鉴定^[17]。由于Asp-N酶解特异性问题和切割位置,产生的肽段较长且具有多种中性丢失和切割模式,在搜库时均需考虑。在搜库软件上,除了可以使用传统的MaxQuant和Mascot外,

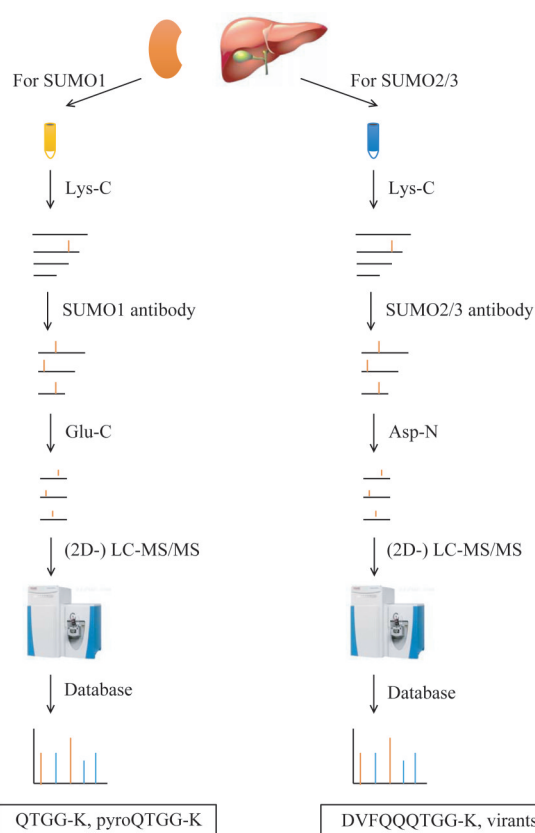


图3 组织样品中鉴定SUMO修饰位点示意图

Fig 3 Sketch map of identification of SUMOylation sites in tissue samples

pLink非常适合这种发生修饰的“交联肽”的鉴定^[28]。

6 总结和展望

当前,随着SUMO突变模式和富集技术的完善,色谱质谱技术的日益发展以及搜库软件的不断更新,在全局水平鉴定蛋白质的SUMO化修饰位点的方法已经比较成熟,这些方法也已经广泛应用在功能研究中,为揭示SUMO的主要功能提供了支持。值得注意的是,当前绝大部分的研究还是基于过表达和点突变策略来鉴定修饰位点,而鉴定内源野生型SUMO的修饰位点和定量变化则是未来的趋势。另外,在个体化鉴定内源SUMO化修饰位点的研究中,减少细胞用量、简化操作流程、增加鉴定成功率和阳性率将是未来努力的方向。

参·考·文·献

- [1] Hochstrasser M. Ubiquitin-dependent protein degradation[J]. Annu Rev Genet, 1996, 30: 405-439.
- [2] Mizushima N. The ATG conjugation systems in autophagy[J]. Curr Opin Cell Biol, 2020, 63: 1-10.
- [3] Hay RT. SUMO: a history of modification[J]. Mol Cell, 2005, 18(1): 1-12.
- [4] Creton S, Jentsch S. SnapShot: the SUMO system[J]. Cell, 2010, 143(5): 1-12.

- 848-848. e1.
- [5] Miller MJ, Barrett-Wilt GA, Hua Z, et al. Proteomic analyses identify a diverse array of nuclear processes affected by small ubiquitin-like modifier conjugation in *Arabidopsis*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(38): 16512-16517.
- [6] Drabikowski K, Ferralli J, Kistowski M, et al. Comprehensive list of SUMO targets in *Caenorhabditis elegans* and its implication for evolutionary conservation of SUMO signaling[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1139.
- [7] Knuesel M, Cheung HT, Hamady M, et al. A method of mapping protein sumoylation sites by mass spectrometry using a modified small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1) and a computational program[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4(10): 1626-1636.
- [8] Rosas-Acosta G, Russell WK, Deyrieux A, et al. A universal strategy for proteomic studies of SUMO and other ubiquitin-like modifiers[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4(1): 56-72.
- [9] Blomster HA, Imanishi SY, Siimes J, et al. *In vivo* identification of sumoylation sites by a signature tag and cysteine-targeted affinity purification[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(25): 19324-19329.
- [10] Matic I, Schimmel J, Hendriks IA, et al. Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif[J]. *Mol Cell*, 2010, 39(4): 641-652.
- [11] Bruderer R, Tatham MH, Plechanovova A, et al. Purification and identification of endogenous polySUMO conjugates[J]. *EMBO Rep*, 2011, 12(2): 142-148.
- [12] Becker J, Barysch SV, Karaca S, et al. Detecting endogenous SUMO targets in mammalian cells and tissues[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(4): 525-531.
- [13] Hendriks IA, Vertegaal AC. A comprehensive compilation of SUMO proteomics[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(9): 581-595.
- [14] Matunis MJ, Rodriguez MS. Concepts and methodologies to study protein SUMOylation: an overview[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1475: 3-22.
- [15] Hendriks IA, Vertegaal AC. A high-yield double-purification proteomics strategy for the identification of SUMO sites[J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(9): 1630-1649.
- [16] Hendriks IA, Vertegaal AC. Label-free identification and quantification of SUMO target proteins[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1475: 171-193.
- [17] Hendriks IA, Lyon D, Su D, et al. Site-specific characterization of endogenous SUMOylation across species and organs[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2456.
- [18] Chachami G, Stankovic-Valentin N, Karagiota A, et al. Hypoxia-induced changes in SUMO conjugation affect transcriptional regulation under low oxygen[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2019, 18(6): 1197-1209.
- [19] Schmidt N, Domingues P, Golebiowski F, et al. An influenza virus-triggered SUMO switch orchestrates co-opted endogenous retroviruses to stimulate host antiviral immunity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(35): 17399-17408.
- [20] Guo D, Li M, Zhang Y, et al. A functional variant of SUMO4, a new IκBα modifier, is associated with type 1 diabetes[J]. *Nat Genet*, 2004, 36(8): 837-841.
- [21] Liang YC, Lee CC, Yao YL, et al. SUMO5, a novel poly-SUMO isoform, regulates PML nuclear bodies[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26509.
- [22] Impens F, Radoshevich L, Cossart P, et al. Mapping of SUMO sites and analysis of SUMOylation changes induced by external stimuli[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(34): 12432-12437.
- [23] Hendriks IA, D'Souza RC, Yang B, et al. Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21(10): 927-936.
- [24] Lamoliatte F, Caron D, Durette C, et al. Large-scale analysis of lysine SUMOylation by SUMO remnant immunoaffinity profiling[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5409.
- [25] Schimmel J, Eifler K, Sigurðsson JO, et al. Uncovering SUMOylation dynamics during cell-cycle progression reveals FoxM1 as a key mitotic SUMO target protein[J]. *Mol Cell*, 2014, 53(6): 1053-1066.
- [26] Bonacci T, Audebert S, Camoin L, et al. Identification of new mechanisms of cellular response to chemotherapy by tracking changes in post-translational modifications by ubiquitin and ubiquitin-like proteins[J]. *J Proteome Res*, 2014, 13(5): 2478-2494.
- [27] McManus FP, Lamoliatte F, Thibault P. Identification of cross talk between SUMOylation and ubiquitylation using a sequential peptide immunopurification approach[J]. *Nat Protoc*, 2017, 12(11): 2342-2358.
- [28] Cai L, Tu J, Song L, et al. Proteome-wide mapping of endogenous SUMOylation sites in mouse testis[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2017, 16(5): 717-727.
- [29] Lumpkin RJ, Gu H, Zhu Y, et al. Site-specific identification and quantitation of endogenous SUMO modifications under native conditions[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1171.
- [30] Vertegaal AC, Ogg SC, Jaffray E, et al. A proteomic study of SUMO-2 target proteins[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(32): 33791-33798.
- [31] Zhao Y, Kwon SW, Anselmo A, et al. Broad spectrum identification of cellular small ubiquitin-related modifier (SUMO) substrate proteins[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(20): 20999-21002.
- [32] Li T, Evdokimov E, Shen RF, et al. Sumoylation of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, zinc finger proteins, and nuclear pore complex proteins: a proteomic analysis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(23): 8551-8556.
- [33] Sohn SY, Bridges RG, Hearing P. Proteomic analysis of ubiquitin-like posttranslational modifications induced by the adenovirus E4-ORF3 protein [J]. *J Virol*, 2015, 89(3): 1744-1755.
- [34] Wu Q, Aroankins TS, Cheng L, et al. SUMOylation landscape of renal cortical collecting duct cells[J]. *J Proteome Res*, 2019, 18(10): 3640-3648.
- [35] Hendriks IA, Lyon D, Young C, et al. Site-specific mapping of the human SUMO proteome reveals co-modification with phosphorylation[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24(3): 325-336.

[收稿日期] 2020-03-17

[本文编辑] 邢宇洋

