



泛素链的形成机理*

王亚楠 赵 博**

(上海交通大学细胞工程和抗体药物教育部工程研究中心, 上海交通大学药学院, 上海 200240)

摘要 泛素化是真核细胞中重要的蛋白质翻译后修饰过程, 通过靶向蛋白质降解或其他信号途径参与多种细胞功能. 底物蛋白的多聚泛素化修饰是一个持续的过程, 其中不仅涉及复杂泛素系统相关酶的参与, 而且存在更为复杂的结构上相互作用与泛素链组装机理. 不同的泛素链修饰决定了底物蛋白下游的不同命运, 泛素结合酶E2在泛素链形成中的重要作用受到越来越多的关注. 对泛素链形成机理的深入研究与认识有利于发现与泛素系统相关的疾病靶点和利用泛素化调控方法进行治疗. 本综述总结了E2和E3如何决定不同泛素链形成的机制和相关的结构信息, 以及两种不同的泛素链组装机理.

关键词 泛素链, 泛素结合酶E2, 泛素连接酶E3, 泛素链特异性, 泛素链组装

中图分类号 Q51, Q71

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0304

泛素化 (ubiquitination) 是真核细胞中一种十分重要的蛋白质翻译后修饰过程, 其最重要的功能为靶向底物蛋白被26S蛋白酶体降解, 此外也可以通过改变蛋白质结构、功能、定位、组装等参与细胞信号传导、细胞周期调控等多种功能^[1-5]. 泛素系统调控的广泛性也使其参与许多疾病进程^[6]. 泛素 (ubiquitin, Ub) 是由76个氨基酸组成的高度保守的分子质量较小的蛋白质, 通过泛素激活酶E1 (ubiquitinating enzyme, E1)、泛素结合酶E2 (Ub conjugating enzyme, E2)、泛素连接酶E3 (Ub ligase, E3) 参与的E1-E2-E3酶级联反应传递到底物蛋白表面, 这个过程连续进行, 进而在底物上形成多聚泛素链修饰. 被泛素化修饰的底物随后参与不同的细胞过程, 其命运主要由底物蛋白的泛素链所决定^[7-9], 因此研究泛素链形成的机理具有重要的意义. 底物蛋白可以在某一个或多个赖氨酸位点被泛素化, 而泛素本身有M1、K6、K11、K27、K29、K33、K48和K63等8个可以形成泛素链连接的位点, 因此底物的泛素化修饰存在多种形式, 每一种泛素化修饰可能对应调控不同的细胞功能, 这种复杂性为探究泛素链的形成提出了挑战, 也激发了人们研究泛素链形成机理的兴趣.

目前在人类细胞中发现了两个E1 (Uba1和Uba6)、约40个E2和600余个E3^[10-11], 共同调节

细胞中上万种底物蛋白的泛素化修饰. 泛素向底物蛋白的传递是一个较为复杂的过程 (图1). 首先, E1在ATP的作用下催化Ub的C端腺苷酸化, 将Ub激活形成Ub-AMP复合物, 该复合物随后攻击E1的活性位点Cys残基, 通过硫酯键连接形成E1~Ub复合物; 然后, E2识别结合E1~Ub复合物, 活化的Ub通过硫酯键连接被传递到E2的活性位点Cys残基, 形成E2~Ub复合物; 最后, E3识别结合E2~Ub复合物与底物蛋白, 将泛素传递到底物蛋白, 通常情况下Ub C端与底物蛋白或受体泛素上Lys侧链氨基连接形成异肽键. 此过程重复连续进行进而在底物上形成多聚泛素链. 在此三步泛素传递过程中, 最后一步Ub由E2~Ub复合物向底物的传递反应为限速步骤, 在细胞中E2主要以E2~Ub复合物的形式存在^[12]. E3根据结构和作用特点可分为RING (really interesting new gene)、HECT (homologous to E6-associated protein C terminus) 和RBR (RING-between-RING) 三类. 其中RING型E3占据大多数, 包括RING和U-box两个亚类, HECT E3约30个, RBR E3有10余个^[13-15].

* 国家自然科学基金(31770921, 31971187)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 021-34207498, E-mail: bozhao@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2020-08-21, 接受日期: 2020-10-21

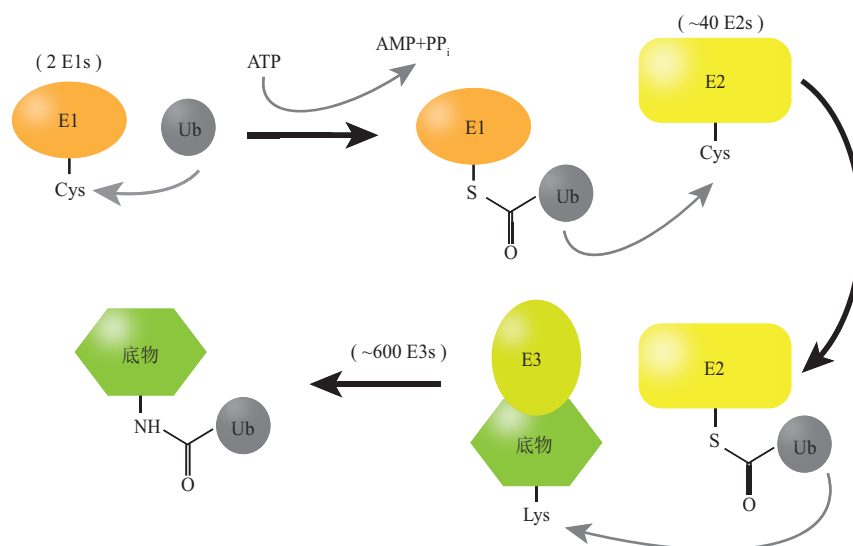


Fig. 1 Process of ubiquitin transfer

图1 泛素的传递过程

E2~Ub 复合物中 Ub 向底物的传递在不同类型 E3 的催化作用下存在两种不同的机制. 其一是在 RING 型 E3 的作用下, RING E3 催化 E2~Ub 通过结构上的变化将活化的 Ub 直接传递到底物^[16]; 另一种是在 HECT 或 RBR 型 E3 的作用下, 活化的 Ub 先被传递到 E3 的活性位点 Cys 残基, 通过硫酯键结合形成 E3~Ub 复合物, 然后 E3~Ub 复合物将 Ub 传递到相应的底物^[17-18]. 对于前一种机制, 泛素链的形成主要由 E2 决定, 而在第二种机制下, 泛素链的形成主要由相应的 HECT/RBR E3 决定. 细胞中 E3 大多为 RING 型 E3, 因此在与 RING 型 E3 的共同作用下, E2 在泛素链形成的过程中起到关键性作用^[19]. 近些年, E2 在泛素链形成中的重要作用受到越来越多的关注. 本文综述了泛素链形成机理的研究进展, 涉及 E2 与不同类型 E3 的共同催化作用和不同的泛素链组装机制.

1 RING型E3催化途径中E2的决定性作用

1.1 E2的结构特征与RING型E3的催化作用机制

E2 含有一个约由 150 个氨基酸残基组成的核心催化结构域, 称为 UBC (ubiquitin-conjugating) 结构域, 其大小约为 Ub 的 2 倍, UBC 结构域中含有 E2 唯一的活性位点 Cys (图 2). 部分 E2 在 UBC 结构域中含有重要的插入序列 (例如 Ube2R1、

Ube2G2) 或者 N 端/C 端延伸序列 (例如 Ube2S), 少数 E2 含有一个与 UBC 结构域相连的附加结构域 (例如 Ube2K) 或是大的多结构域蛋白的一部分 (例如 Ube2O). E2 在泛素化修饰途径中发挥重要作用, 不同的 E2 参与调控不同系统和器官的泛素化途径, 研究表明, 小鼠 Ube2I、Ube2L3、Ube2N、BIRC6 等 E2 基因敲除会引起胚胎致死^[20-24], 而敲除 Ube2A、Ube2B 等则会导致不育^[25-26].

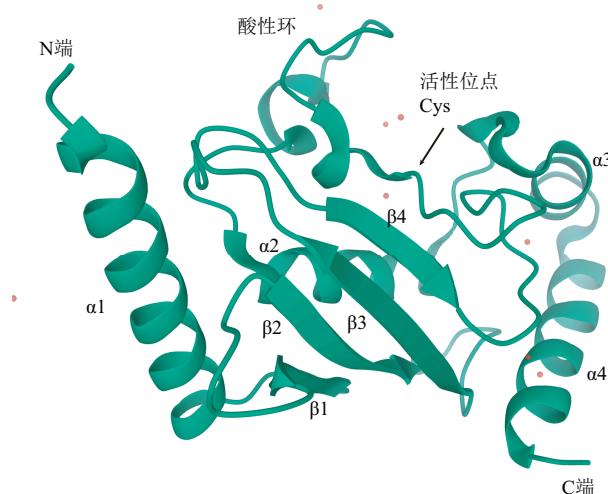


Fig. 2 Structure of E2 Ube2G2 UBC domain

图2 E2 Ube2G2 UBC结构域结构

(PDBID: 2CYX).

大多数E2既可以与RING型E3结合也可以与HECT型E3结合.核磁共振(NMR)和晶体学研究发现,E2中的经典E3结合表面位于UBC结构域,该表面由UBC结构域中螺旋1、环4和环7的残基组成,可以与RING或HECT结构域结合,同时该表面与E1结合表面有部分重合^[27-28].在与RING型E3结合时,RING上保守残基(Arg、Lys或Asp)与E2环7和Ub C末端的主链基团间形成氢键,定位Ub C末端的亲核攻击^[29-30].

RING型E3与E2~Ub复合物结合催化其构象由“开放式”转变为“闭合式”,激活E2~Ub复合物的反应性,进而将Ub传递到E3识别的底物蛋白上.由于Ub的C末端(72~76位氨基酸残基)具有高度柔韧性,像一根可摇动的绳连接E2和Ub,因此形成的E2~Ub复合物构象随着Ub C末端的变化而动态变化.当E2与Ub在结构上基本无接触时形成的构象称为“开放式”构象,此时E2~Ub复合物的反应活性低,细胞中E2~Ub复合物大多以此种构象存在.而当Ub以I44为中心的疏水口袋区域与E2交叉螺旋区域接触时形成的构象称为“闭合式”构象,此时E2~Ub复合物转移Ub到Lys的反应活性高^[31].通常情况下,RING型E3通过与E2~Ub复合物结合,可以促进E2~Ub复合物的构象转变,从而促进Ub传递到底物的Lys,而E2~Ub复合物与HECT或RBR型E3的结合不能促进类似的构象转变而提高赖氨酸反应性^[32-33].在没有RING型E3的情况下,E2~Ub复合物转移Ub到Lys的反应活性可能取决于其自身形成“闭合式”构象的趋势^[34].在少数情况下也存在特殊的作用机制,研究表明,Ube2S~Ub复合物在没有E3的情况下其自身形成“闭合式”构象的趋势很高,可以催化非E3依赖型多聚泛素链的形成^[35],而在与对应E3 APC/C共同作用时,APC/C的RING结构域亚基(Apc11)不影响E2反应性,反而两个非RING亚基(Apc2和Apc4)可以促进Ube2S的激活^[36],具体作用机制还有待研究.

1.2 链引发与链延伸过程E2与RING E3的作用机制

大部分E2在RING型E3的协同作用下催化Ub转移到底物蛋白或受体泛素的Lys残基,连接形成异肽键.底物上多聚泛素链修饰可分为链引发和链延伸两个过程.链引发过程即底物在某一Lys位点的单泛素化,涉及到底物在哪个位点形成泛素化修饰.链延伸过程即供体泛素向受体泛素不断转移,

从而促进泛素链的延长,涉及到形成多聚泛素链的类型.不同泛素链类型介导被泛素化修饰的底物参与不同的细胞途径,如K48和K11连接多聚泛素链通常靶向底物蛋白至蛋白酶体使其被降解,而K63连接多聚泛素链参与NF- κ B信号途径介导的免疫反应调节、DNA损伤耐受等过程.泛素链特异性抗体等为解密泛素链类型提供有效工具^[37].相应地,E2可以分为链引发E2和链延伸E2,有些E2既可以作为链引发E2也可以作为链延伸E2.在与RING型E3共同作用下,E2对于决定底物的多聚泛素链修饰起到关键作用.

1.2.1 链引发过程E2与RING E3的作用机制

链引发E2对底物的泛素化修饰作用基于结构特点与相互作用.Ub类似物SUMO的唯一E2 Ube2I (Ubc9),可以在没有E3的情况下,直接将SUMO传递到底物位于环上或未结构化区域的 ψ -K-X-D/E结构(ψ 为大的疏水基团,X为任意氨基酸)中的Lys上^[38-40],特定序列定位Lys亲核攻击Ube2I Cys活性位点处连接的SUMO.在E2 Ube2T和RING E3 FANCL的催化作用下,底物FANCD2可以在特定的Lys位点被单泛素化修饰,参与调节范可尼贫血DNA修复途径^[41].酵母Rad6/Rad18(E2/E3)共同催化底物PCNA在K164位点被单泛素化修饰,调节复制后DNA损伤修复相关信号通路^[42-43].有研究发现Rad6对应的人同源E2 Ube2A中Q93E突变可能与智力残疾相关,该突变不影响Ube2A结合泛素的能力但使其催化活性受损,E3 Rad18的作用也不能恢复其反应性,可能是由于该突变干扰了底物Lys去质子化所需的催化微环境,影响了Lys的亲核攻击而阻断了泛素转移过程^[44].泛素E3 TRIM21是自身免疫疾病的主要自身抗原和先天免疫信号的调节剂,在与E2 Ube2E1的共同作用下催化TRIM21自身作为底物的单泛素化,Ube2E1上关键残基的作用使TRIM21 Lys被捕获在Ube2E1活性位点,变构作用下的底物赖氨酸活化可能触发催化活性^[45].

少数E2具有特殊的反应性而催化形成非异肽键连接的泛素化产物.Ube2W含有独特的UBC结构域,其C末端区域无序且靠近活性位点,可以与底物的无序N末端相互作用,将Ub通过肽键连接到底物N端Met的 α 氨基,作为链引发E2催化底物的单泛素化.由于Ub的N末端高度结构化,因此其不能催化泛素链的延伸^[46-48].酵母过氧化物酶体E2 Pex2可以将Ub通过硫酯键连接传递到底物

Pex5p 和 Pex10p 的 Cys 残基^[49-50]. Ube2J2 在与 RING E3 mK3 的共同作用下将 Ub 通过含氧酯键连接到底物 Ser 或 Thr 的羟基上, 研究表明其酵母同源 E2 Ubc6 对于无 Lys 底物的降解发挥重要作用^[51-53].

相对于链延伸过程, 链引发的研究难点在于 E2、E3 与底物蛋白间复杂的对应关系与相互作用, 潜在的底物蛋白数量多, 以及底物通常含有多个可被泛素化修饰的 Lys 位点. 只有极少数底物在特定位点被泛素化修饰, 而且通常情况下只能形成单泛素化修饰^[19].

1.2.2 链延伸过程 E2 与 RING E3 的作用机制

链延伸过程决定了底物多聚泛素链修饰类型, 链的特异性主要由 E2/ RING E3 在催化多聚泛素链延伸的过程中基于结构特点与相互作用所呈递的受体泛素特定 Lys 位点决定. 链延伸 E2 Ube2R1 (Cdc34) 家族可催化形成特异性 K48 连接泛素链^[54-55]. 人的 E3 中大约一半属于 Cullin-RING 连接酶 (CRL) 家族, 参与调控细胞中近 20% 的蛋白酶体降解途径^[56-57]. Cdc34 是细胞中一种重要的 E2, 是 CRL 家族对应的主要 E2, 在细胞周期调控和信号转导中发挥重要作用. Cdc34 催化形成 K48 连接泛素链的特异性主要由其特殊的“酸性环”结构决定. Cdc34 含有一个特别位于活性位点远端的保守插入序列, 称为“酸性环”, 其与 Ub 上决定 K48 泛素链形成的关键结构 Y59-E51 环相互作用, 进而将受体 Ub K48 定位至 E2 活性位点处的供体 Ub, 从而催化形成 K48 泛素连接链^[49]. 此外, Cdc34 的“酸性环”结构可以促进其与 E3 SCF 之间的相互作用, 同时可以通过抑制 E2 或泛素上电离基团的 pKa 促进 Cdc34 的催化作用^[58]. 除“酸性环”外, Cdc34 还含有酸性 C 末端延伸序列, 其通过静电作用以纳摩尔级亲和力驱动与 SCF Cullin 亚基的“碱性峡谷”结构区域 (CRL 家族的保守结构) 快速识别结合, 促进泛素链的连续性延伸^[59-60]. 这些特有的结构和相互作用保证了 Cdc34 催化 K48 连接泛素链形成的效率和保真度.

Ube2G2 家族 E2 也含有类似 Cdc34 的靠近活性位点的保守“酸性环”结构, 具有 K48 连接特异性, 其与内质网膜结合, 催化在内质网相关降解 (endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD) 过程中从内质网内腔中转运出的错误折叠多肽形成 K48 连接泛素链修饰^[61-62], 与 RING E3 gp78 共同催化相应底物的泛素化降解. 虽然

Ube2G2 本身与 gp78 RING 区域的亲和力并不高, 但是 gp78 的非 RING 区域 G2BR 能以低纳摩尔级高亲和力与 Ube2G2 的 UBC 结构域背部 (活性位点 Cys 的相对面) 结合引起变构效应, 使 Ube2G2 的“酸性环”构象由螺旋形变为打开, 这使其对 RING 结构域的亲和力提高了约 50 倍, 增强 Ube2G2 与 RING 结构域的结合, 稳定 E2~Ub “闭合式”构象进而促进泛素传递^[63-64]. 但是这种 E2/E3 高亲和力不利于泛素链的持续性形成, 因为当 E2~Ub 复合物被 RING E3 激活进而将泛素传递到底物后, E2 需要从 E3 上解离下来才能重新装载另一个泛素分子从而进行新一轮传递, 同时 E3 也需要与 E2 解离才能结合新的 E2~Ub 复合物. 而更有趣的是, 当 RING 与未结合泛素的游离 Ube2G2 结合时会通过反馈调节机制引起变构效应, 破坏 Ube2G2 与 G2BR 间的接触使亲和力降低, 从而可以促进游离 Ube2G2 的释放与 Ube2G2-Ub 结合物的交换^[65]. Ube2G2 与 gp78 间的这种协同相互作用使得 Ube2G2 与 gp78 可以快速结合与解离从而促进泛素链的持续延伸, 同时也保证了催化形成 K48 连接泛素链的 Ube2G2 可以选择性与 gp78 作用靶向相应底物的泛素化降解. 许多 E2-RING E3 以低亲和力作用从而可以快速有效地催化多聚泛素链组装, Ube2G2 与 gp78 的这种相互作用为解释此种机制提供了一个很好的模型, E2 与 RING E3 的非经典结合位点与相互作用对 E3 特异性与泛素链组装过程的影响也逐渐受到更多的关注.

其他链延伸 E2 的连接特异性同样由其结构特点决定. Ube2K 催化形成特异性 K48 连接泛素链, 但其机制与 Cdc34 和 Ube2G2 存在一定差异. 对人 Ube2K 酵母同源物 Ubc1 的研究发现, Ubc1 活性位点 Cys 附近的两个环上的多个极性残基 (T84、Q122 和 A124 等) 与泛素 K48 位点附近 Y59 等关键位点相互作用, 定位受体泛素 K48 亲核攻击 E2 活性位点处的硫酯键, 催化形成特异性 K48 连接泛素链^[66-67]. Ube2S 利用 UBC 结构域最后一个螺旋中的酸性残基, 通过静电作用识别定位泛素 K11 附近表面残基, 激活 K11 亲核攻击 Ube2S~Ub 复合物活性位点, 决定了 Ube2S 催化的 K11 连接泛素链特异性, 且此特异性可以在没有对应 E3 APC/C 的参与下实现, 通过底物辅助催化促进特异性泛素链的形成, 受体泛素 K11 邻近酸性残基 E34 促进 K11 去质子化从而促进其亲核攻击^[35, 68]. Ube2N 通过结合类 E2 亚基 Ube2V1/Ube2V2 定位泛素 K63, 催化形

成特异性 K63 连接泛素链, 进而通过 NF- κ B 信号调节免疫反应^[69-70]. 相关结构研究发现, 酵母同源 Mms2 (对应人 Ube2V2) - Ubc13 (对应人 Ube2N) - 供体 Ub 复合物中的 Ub 与邻近的 Mms2-Ubc13 复合物结合, 定位受体泛素 K63 靠近邻近 Ubc13 的活性位点, 通过 Ube2V2 的辅助作用定位受体泛素 K63, 决定形成泛素链的特异性. 此外, 研究发现嗜肺军团菌 (*legionella pneumophila*) 可以通过转谷氨酰胺酶 MavC 的作用催化 Ube2N K92 和 K94 位点的单泛素化而抑制宿主免疫, 提出了一种通过泛素转谷氨酰胺作用修饰一种关键泛素酶调节宿主免疫的新机制^[71].

相对于有连接特异性的 E2, Ube2D 家族 (UbcH5A~D) 在催化底物泛素化过程中基本没有选择性, 在对应的 RING E3 作用下被激活后可以将 Ub 传递到靠近其 Cys 活性位点的任意 Lys, 而在没有 RING E3 作用时其催化活性极低^[18], 因此 RING E3 对 Ube2D 家族 E2 的激活十分重要. 由于 Ube2D 家族 E2 的催化作用无选择性, 其在泛素传递相关体外研究中被广泛应用, 但是这对其所对应的 E3 及底物等研究也提出了一定的挑战. 此外, Ube2D 的背部区域可以与 Ub 相互作用, 当 Ube2D~Ub 复合物背部结合另一分子 Ub 时可以增强与 RING E3 的亲和力从而促进泛素的传递^[72-73].

在泛素链延伸的过程中, 相应泛素酶的作用主要识别连接在底物上的泛素链而不是底物本身, 即在多数情况下以 Ub 分子本身作为底物, 因此泛素链与底物的连接位点通常不影响泛素链的延伸, 大部分的底物蛋白也可以在多个位点被泛素化修饰形成多聚泛素链.

泛素链通过链引发与链延伸不同 E2 顺序作用的组装过程受到越来越广泛的关注. 链引发过程具有较低的 Lys 特异性, 对于多数底物只要其上 Lys 位点空间上接触供体泛素即可进行单泛素化修饰^[74], 因此通常底物可以在多个 Lys 位点被泛素化修饰. 而链延伸过程一般涉及由 E2 决定的特异性受体泛素 Lys, 这决定了多聚泛素链的特异性, 例如 Cdc34、Ube2N/Ube2V2、Ube2S 作为链延伸 E2 分别可以促进 K48、K63 和 K11 特异性泛素链延伸.

1.3 泛素链特异性的决定机制与 E2 的结构作用特点

从 E2 决定泛素链形成的作用机制来看, 底物泛素链修饰的特异性主要取决于基于结构特点的对

供体泛素与受体泛素的定位. E2~Ub 复合物除了通过硫酯键共价连接, 还可以通过较为保守的非共价相互作用结合定位供体泛素, 使其易于被受体泛素识别与亲核攻击. E2 根据自身结构特点, 通常是活性位点 Cys 附近的特殊结构或残基, 以静电相互作用等方式识别结合受体泛素特定结构或基团, 通过定位受体泛素特定 Lys 位点实现泛素链连接的特异性, 有时受体泛素上的特定催化残基可以通过底物辅助催化作用促进特异性泛素链的形成^[35]. E2 对受体泛素特定 Lys 的精准定位决定了泛素链连接的特异性, 而无特异性 E2, 例如 Ube2D 家族则不存在对某一特定 Lys 位点的定位作用. 具有相同催化特异性的不同 E2 可能存在不同的作用机制, 如 Cdc34 和 Ube2G2 主要通过特定“酸性环”结构催化形成 K48 连接特异性泛素链, 而 Ube2K 催化 K48 特异性泛素链组装则是基于其活性位点 Cys 附近极性残基簇的作用. 链引发与链延伸 E2 的分工同样基于 E2 的特定结构对不同 Lys 的定位, 链引发 E2 定位底物特定结构处的 Lys 位点, 实现对底物的单泛素化修饰, 而链延伸 E2 定位受体泛素特定 Lys 位点, 促进底物上多聚泛素链的组装.

除 E2 的特有结构外, 泛素本身也含有决定泛素链 Lys 特异性的结构特征. 例如, Chong 等^[54]报道了泛素的 Y59-E51 环在 K48 多聚泛素链形成过程中的决定性作用, 其中 R54 和 Y59 为关键残基位点, 研究发现 R54A/Y59A 突变会阻断 K48 特异性泛素链的形成而引起细胞死亡, 因此抑制 K48 多聚泛素化也可以考虑作为用于诱导细胞杀伤的新途径.

E2 中可能还含有促进泛素链组装持续性的关键结构, 而这些结构特征与决定泛素链连接特异性的结构不同. 例如, Ube2S Cys 附近的催化区域决定 K11 连接特异性, 而其 C 末端结构域决定了泛素链延伸的持续性^[74].

1.4 泛素链组装过程中多个 E2 与 E3 的协同作用

在底物多聚泛素链组装的过程中, 从 E2 的催化作用来看, 链引发 E2 和链延伸 E2 通常会分工协作. 例如, 催化形成特异性泛素链的 Ube2N、Ube2S 等链延伸 E2 只能催化泛素链的延伸, 因此对底物的泛素化修饰首先需要相应的链引发 E2 催化底物特定位点的泛素化修饰, 然后再由链延伸 E2 催化泛素链的延长形成多聚泛素链, 这一过程可能涉及单个或多个 E3 的协同作用.

Ube2S 为 E3 APC/C 的专用 E2, 可以共同作用

催化相关细胞周期蛋白的泛素化降解,进而调节细胞周期进程^[75]. APC/C 对应调控的底物倾向于形成 K11 连接泛素链,底物首先在 Ube2C/Ube2D 家族 E2 与 APC/C 的作用下被单泛素化,然后 APC/C 重新调整 RING 亚基而与链延伸 E2 Ube2S 结合,催化形成特异性 K11 连接泛素链,靶向底物的蛋白酶体降解^[74, 76]. 在链引发的过程中, APC/C 通过 RING 结构域 Apc11 与 Apc2 亚基的 WHB 结构域与 Ube2C 相互作用,其中 WHB 与 Ube2C 的背部结合引起 E2 的变构效应,可以提高 Ube2C 的催化效率而促进泛素转移^[77-78]. 在链延伸的过程中, APC 与 Ube2S 存在独特的作用机制, Ube2S 通过其 C 末端延伸序列被 APC/C 招募,与 APC/C 的两个非 RING 亚基 Apc2 和 Apc4 作用,激活与 Ube2S 结合的泛素向底物的传递,催化泛素链的延伸. 而 APC/C 的 RING 结构域 Apc11 在这一过程中发挥非经典功能,其追踪定位延伸泛素链的远端受体泛素分子, Apc11 的疏水口袋与泛素 K48 附近和 C 末端的残基作用封闭泛素 K48 位点,促进受体泛素 K11 位点亲和攻击 Ube2S 活性位点^[79]. 这种特殊的作用机制有助于保证 APC/C 对应调节的底物不会在错误的位置或时间被泛素化降解,而且形成单泛素化修饰的中间体后, APC/C RING 亚基的及时相应调整可以避免无特异性的 Ube2D 家族催化底物形成不正确的泛素链^[36, 80]. 在对细胞周期的调节中, Ube2S 可以通过自身的泛素化而抑制自身活性, Ube2S 活性是细胞周期内在调节的基础^[81]. 还有研究利用 Ub 突变体发现了 APC/C 隐藏的 K48 泛素链结合位点, Apc2 亚基的 Ub 结合“外位点(exosite)”与 K48 连接泛素链的结合可以抑制其招募 E2 Ube2C 的活性从而阻断泛素向 E3 的转移^[82].

E3 SCF 也可以与多个 E2 协同作用催化对应底物特异性泛素链的组装, Ube2D2/D3 作为链引发 E2 催化第一个泛素转移到底物,随后 Ube2R1 催化 K48 特异性泛素链延伸^[83]. 有研究还发现 SCF 在此过程中可以与另一个 RBR E3 HHARI 共同作用^[84-85]. 同许多 RBR E3 一样, HHARI 以自抑制状态存在,其 Ariadne 结构域与 RING2 结构域相互作用导致活性位点 Cys 被封闭,因而不能催化泛素传递^[86]. HHARI 可以与 NEDD8 修饰形式的 CRL 结合而缓解自抑制, HHARI 催化 CRL 对应底物的单泛素化即链引发过程,随后 Ube2R1 与 CRL 作用催化链延伸形成 K48 连接多聚泛素链.

E2 Ube2W 催化底物 N 端 Met 位点处的单泛素

化修饰,其作为链引发 E2 催化形成的产物可以作为 Ube2N 等链延伸 E2 的底物,催化相关底物形成 K63 多聚泛素链,在固有免疫应答中发挥重要作用^[87]. 研究表明 RING E3 TRIM21 和 TRIM5 α 可能是此过程的对应底物,其首先在 Ube2W 的作用下被单泛素化,随后在 Ube2N/Ube2V2 的催化下形成 K63 多聚泛素链,通过 NF- κ B 信号参与调节相关固有免疫反应过程^[88-89]. 研究表明, TRIM E3 通过独特的三离子锚定机制,能够在其 RING 结构域周围招募包裹一个 Ube2N-Ub 复合体,稳定 Ube2N-Ub 的“闭合式”构象并促进泛素的转移,催化自身的 K63 连接泛素链修饰^[90]. 有趣的是, TRIM 家族蛋白在宿主防御病毒感染过程发挥重要作用,作为泛素 E3 可以催化重要病毒蛋白的泛素化降解,同时其自身被 K63 连接泛素链修饰作为固有免疫调节的信号,这一过程受到泛素化与去泛素化的精密调控,协调两个途径共同抵抗病毒感染^[89, 91].

Cbl 家族 RING E3 参与催化许多受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinases, RTKs)的泛素化,研究发现其可以与多个 E2 相互作用,与 Ube2D 家族、Ube2E 家族、Ube2N/Ube2V1 和 Ube2W 作用可以催化 Cbl 的自泛素化,与 Ube2D2、Ube2E1 和 Ube2N/Ube2V1 作用可以催化 Cbl 底物 EGFR 和 SYK 的泛素化,形成的泛素链类型由参与催化的 E2 决定, Ube2D2 可以催化形成 K48 和 K63 连接链, Ube2N/Ube2V1 催化形成 K63 连接链, Ube2W 则诱导单泛素化^[92].

有时两个 E2/E3 对分别独立催化底物的链引发和链延伸过程,被单泛素化修饰和多聚泛素链修饰的底物也会介导完全不同的信号通路. 例如,底物蛋白 PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 在 Rad6-Rad18 (E2-E3 对) 的催化作用下形成单泛素化修饰,参与 DNA 损伤修复过程的信号传导,促进易错的跨损伤 DNA 合成损伤耐受过程^[43, 93],而链引发形成的单泛素化 PCNA 产物可以作为底物在 E2 Ube2N/Ube2V2 和 E3 Rad5 的协同催化作用下形成 K63 连接的多聚泛素链修饰,转换到无错损伤旁路过程介导促进模板转换和参与同源重组机制的信号^[42, 94].

2 HECT/RBR 型 E3 催化途径中 E3 的决定性作用

在 RING 型 E3 参与催化的机制中, E2~Ub 复合物中 Ub 传递到 Lys 的反应性需依赖于“闭合式”

构象,而在HECT或RBR型E3作用时,E2~Ub复合物中Ub传递到E3活性位点Cys残基的反应性不需要形成“闭合式”构象,即在通常的“开放式”构象下即可将Ub传递到HECT/RBR E3^[95-96],对于HECT E3的相关研究发现此过程依赖于HECT结构域中C瓣与Ub的相互作用^[97].形成的E3~Ub复合物中Ub尾部变成充分延伸的构象,这与由RING E3激活的E2~Ub复合物“闭合式”构象的拓扑结构十分相似,随后通过E3~Ub复合物构象上的调整将Ub传递到底物^[98].

2.1 HECT E3参与的催化作用机制

HECT E3上Ub向底物的传递同样可以分为链引发和链延伸不同过程,有些底物的泛素化修饰涉及多个E3的协同作用. HECT E3同RING E3一样可以催化特异性连接多聚泛素链的形成,但在此种机制下催化形成的泛素链类型取决于HECT E3而非E2. HECT E3 E6AP催化形成K48连接泛素链,Rsp5等NEDD4家族HECT E3倾向于催化底物形成K63连接多聚泛素链修饰^[99].将Rsp5的C末端62个氨基酸残基以E6AP相应的氨基酸序列替换之后,Rsp5即可催化形成特异性K48连接泛素链,说明HECT E3 C末端对于催化形成的泛素链类型具有重要的决定作用,但是具体的机制还有待研究.

HECT E3有时也可以催化形成更为复杂的混合型泛素链和分支型泛素链. HECT E3 WWP1催化底物形成K63特异性连接链,而当泛素链达到约4个亚基的长度时,由于K63泛素连接链远端的拓扑约束,WWP1转而催化形成分支的K11和K48连接链^[100-102].不同的泛素链类型决定了底物蛋白的不同命运,当底物连接较短的K63泛素链时,其参与非蛋白酶体依赖的途径,而当底物连接K11和K48分支链时,其最终通过蛋白酶体途径被降解. HECT E3 HUWE1和UBR5可以作为链延伸E3催化被泛素化修饰的蛋白质作为底物的分支泛素链延伸.研究表明HUWE1可以识别由另一个E3(例如TRAF6)引发的K63连接泛素化的底物,催化从分支点延伸K48连接泛素链,从而将对应底物的泛素化命运从非降解转为降解^[103].类似地,UBR5可以将其他E3(例如ITCH和UBR4)作用下被多聚泛素化修饰的蛋白质作为底物,催化K48连接分支泛素链的形成与延伸,靶向底物通过蛋白酶体途径降解^[102, 104].

目前,对于HECT E3识别受体泛素的结构基

础认识还不够清晰.研究表明HECT E3催化结构域中N瓣结构含有一个特殊的非共价Ub结合位点即“外位点”,该位点的突变会影响链延伸过程但不影响链引发过程和链的特异性,该位点可能与泛素链中的泛素分子相互作用,间接稳定了靠近活性位点的受体泛素从而促进泛素链的持续性延伸^[105-108].

2.2 RBR E3参与的催化作用机制

RBR型E3为新定义的一类与E2 UbcH7(Ube2L3)作用的E3,其含有两个RING结构域(RING1和RING2)和一个中间的锌结合IBR(in-between-RINGs)结构域,同时在RING2结构域含有一个类似于HECT E3的保守Cys残基.作为RING-HECT E3杂合体,RBR E3可以作为HECT型E3通过形成E3-Ub中间体发挥催化功能,但不能发挥类似于RING型E3直接将Ub传递到底物的催化功能^[18, 109-110].与帕金森病相关的PARKIN、线性泛素链组装复合物(linear ubiquitin chain assembly complex, LUBAC)的中心亚基HOIP、HHARI、TRIAD1等均为RBR E3.研究表明,PARKIN、HHARI等许多RBR E3以自抑制状态存在,需要构象上的变化才能激活^[86, 111].有研究发现,位于RBR E3活性位点对侧RING1-IBR结构域的Ub结合位点,通过Ub结合引起的变构效应有助于RBR E3自抑制状态的缓解并促进泛素链的持续性延伸^[95, 112].

同HECT E3相似,RBR E3参与的泛素化修饰所形成的泛素链特异性取决于RBR E3的催化结构域. LUBAC催化底物形成M1连接线性泛素链修饰,通过NF- κ B途径调节固有免疫和炎症^[113-114]. LUBAC由HOIP和HOIL-1L两个RBR E3亚基组成,其中只有HOIP具有形成M1连接泛素链的催化活性. LUBAC通过特定作用位点与受体泛素的作用识别受体泛素M1,RING2结构域与HOIP的“线性泛素链决定区”共同创建了一个平台,确保受体泛素M1的 α -氨基靠近其活性位点,HOIP特定的组氨酸残基促进M1 α -氨基去质子化而亲核攻击E3活性位点处的供体泛素,催化M1连接特异性泛素链的形成^[96, 115]. GDHS(Gordon Holmes syndrome)患者RBR E3 TRIAD3(RNF216)中两个突变影响了该酶的活性,其中R660位点是Ub从E2转移到TRIAD3活性位点Cys所必需的,TRIAD3被发现可以催化潜在SUMO化底物形成K63特异性泛素链修饰,与此前报道的促进底物形成K48泛素链修饰而靶向蛋白降解不一致,说明

TRIAD3 的过表达引起 K48 连接链增加可能是一种间接效应^[116]。

3 泛素链组装的顺序加成机制与整体转移机制

关于泛素链是如何组装的问题, 目前主要提出

了两种机制, 即顺序加成机制和整体转移机制 (图 3)。顺序加成机制指在泛素链组装过程中, 每次转移一个泛素分子到底物, 第一个连接到底物上, 然后依次连接到延伸的泛素链远端形成多聚泛素链。整体转移机制指泛素链预先在 E2 或 HECT/RBR E3 的活性位点 Cys 上完成组装, 随后被整体转移到底物上。

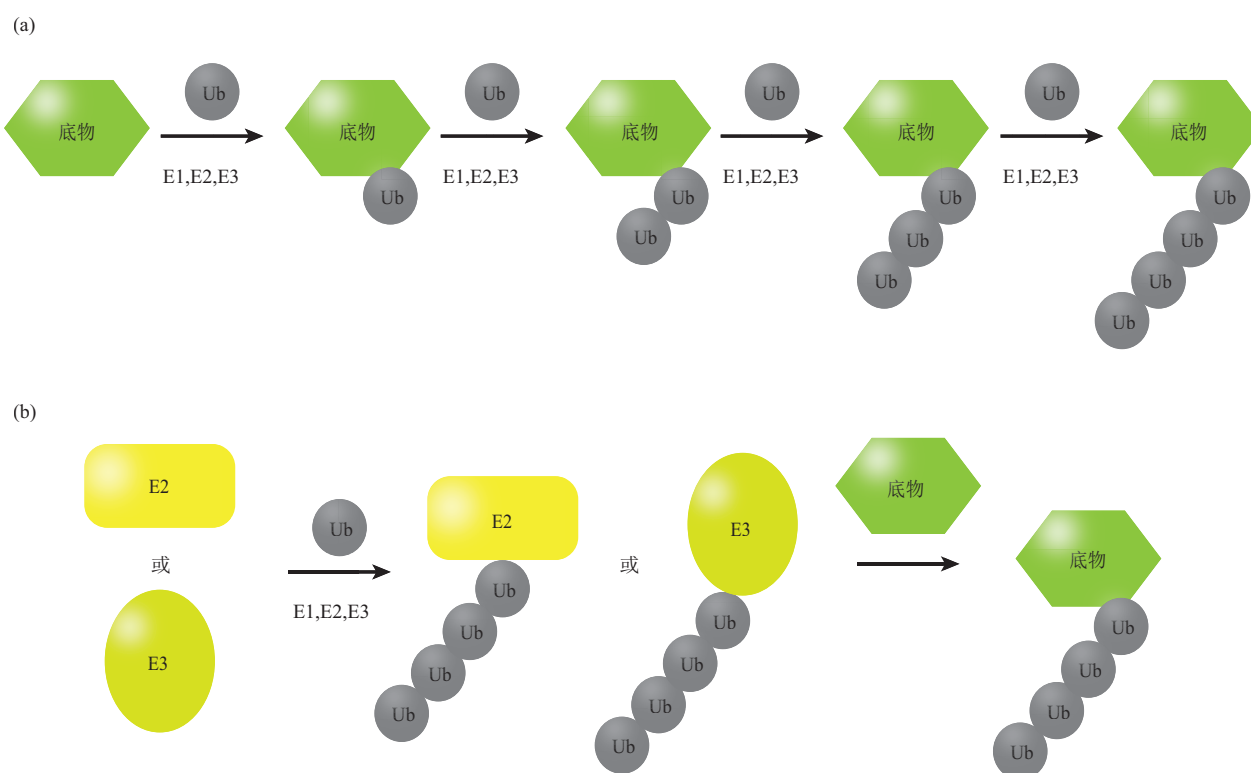


Fig. 3 Mechanisms of ubiquitin chain assembly

图3 泛素链的组装机制

(a) 顺序加成机制; (b) 整体转移机制。

3.1 顺序加成机制

顺序加成机制是细胞中泛素链组装的主要机制。在顺序加成机制中, 单个泛素分子陆续被转移到底物延伸的泛素链上, 即每一个反应中间体作为下一轮链延伸的底物。这一机制的有力证据最初通过 Cdc34-SCF 泛素化体系的动力学研究提出^[117], 即每一个新的泛素化修饰形式 (单泛素化、连接 2 个泛素分子的底物、连接 3 个泛素分子的底物等) 以非同步的滞后期顺序出现, 其中单泛素化即链引发的过程为此体系的限速步骤, 一旦第一个泛素转移到底物, 泛素顺序加成的速率 (k_{ub-n}) 远快于从底物上解离的速率 (k_{off}), 允许在酶-底物复合物解

离之前发生多次泛素转移, 在几秒内可以催化底物的多聚泛素化。在顺序加成机制中, 多聚泛素链的持续性形成过程决定了泛素链的长度进而决定了底物命运。一般情况下, 随着泛素链的不断延伸, 泛素链的空间构象更为复杂, 从而导致定位远端受体泛素更加困难而不利于泛素链的持续性延伸。APC/C E3 通过一种被称作持续性亲和力扩大 (processive affinity amplification, PAA) 的正反馈机制催化泛素链的组装^[118], 转移加成到底物上的每个泛素分子都会增加被泛素化修饰的底物对 APC/C 的亲和力, 从而促进链形成过程持续进行。CRL E3 的有关研究表明, 底物 Lys 泛素化位点与

E2 活性位点 Cys 的距离、E2 与泛素链构象上的柔韧性等因素影响 K48 多聚泛素链形成的持续性^[119]。链组装的持续性及泛素化过程受到 E2 背部区域与 Ub 或 E3 的非共价结合、Ub 及相关酶的共价翻译后修饰及某些更为复杂和特殊的结构上相互作用等多种方式的复杂调控^[73, 120-122]。

3.2 整体转移机制

在整体转移机制中, 泛素链在 E2 或 E3 的活性位点预先组装, 要求泛素链在相应酶预组装的速率快于链向底物整体转移的速率, E3 与底物不需要长时间结合以形成足够长的泛素链来介导下游信号通路, 从多聚泛素化修饰底物的效率来看是一种理想的机制。整体转移机制最先在 HECT E3 E6AP 的相关研究中提出^[123], 泛素通过 E2 Ube2L3 转移到 E6AP 活性位点 Cys, 连接到 E6AP 活性位点的 Ub 可以作为受体泛素攻击与 Ube2L3 或 E6AP 连接的供体泛素的 C 末端, 进而在 E6AP 活性位点 Cys 持续组装 K48 连接泛素链, 随后在 E6AP 上预先组装的泛素链被整体转移至底物 HHR23A。动力学研究证实了 E6AP 和 NEDD4 亚家族 E3 (WWP1 除外) 整体转移机制的可行性^[124-126]。

特定的 E2/RING E3 催化体系也可以利用整体转移机制将在 E2 上预先形成的泛素链转移到底物。Ube2G2-gp78 体系显示了整体转移机制的有力证据^[127], 在 E3 gp78 的催化作用下可以在 Ube2G2 的活性位点 Cys 预先组装泛素链, 随后泛素链被整体传递到底物的 Lys 形成多聚泛素化修饰。泛素链在 Ube2G2 活性位点 Cys 预组装的速率稍快于泛素链向底物转移的速率, 在动力学上证明了整体转移机制的可行性。在这一过程中, gp78 的寡聚化倾向有利于泛素链在 Ube2G2 上的预组装, 因为形成的 Ube2G2-gp78 异源寡聚体使多个 Ube2G2 的活性位点互相靠近, Ube2G2~Ub 复合物中受体泛素 K48 亲和攻击临近的 Ube2G2~Ub 复合物中硫酯键连接处的供体泛素 C 末端, 促进了泛素链的预组装过程^[64, 128]。此外, Ube2K 也被报道以整体转移机制在活性位点 Cys 处预先组装泛素链, 链组装的过程与远端泛素以 I44 为中心的疏水口袋和 Ube2K UBA 结构域的相互作用使多聚泛素链的构象发生改变有关^[129]。

还有研究提出了两个不同的 E2/E3 对相互协作促进底物 PCNA 多聚泛素化修饰的整体转移机制^[130]。首先在 RING E3 Rad5 的作用下, 在 Ube2N 的活性位点 Cys 组装形成 K63 连接多聚泛素链, 然

后预先组装的泛素链被转移到另一个 E2 Rad6, 随后在 RING E3 Rad18 的作用下转移到 PCNA 的 K164 位点形成多聚泛素化修饰。这种整体转移机制相比于不同 E2-E3 对分别催化链引发与链延伸的顺序转移机制具有更高的组装效率。

4 总结与展望

泛素链的形成是一个十分复杂的修饰过程, 链引发和链延伸过程涉及 Ub、泛素酶及底物间复杂的相互作用, 相关结构学、动力学等方面研究逐渐揭示出泛素链形成的机理。在 RING 型 E3 参与催化的泛素化途径中泛素链特异性由 E2 决定, 而在 HECT/RBR 型 E3 参与催化时泛素链的特异性由 E3 决定。泛素链组装主要为顺序加成机制, 研究也发现了某些特定途径以整体转移机制完成泛素链组装与转移。泛素链形成多涉及独特复杂的相互作用与组装机理, E2-E3 多位点相互作用、受体泛素与供体泛素的定位作用、链引发与链延伸过程不同泛素酶的参与与分工协作等共同保证泛素链的特异性与持续性组装^[131], E2 的背部 Ub 结合及底物赖氨酸活化作用促进泛素链形成等问题近期也备受关注。泛素化过程中泛素及泛素转移机制中相关酶的磷酸化、乙酰化、去酰胺化、ADP 核糖化等翻译后修饰参与进一步调控泛素化信号, 使泛素化过程调节与泛素链形成机制更为复杂^[82]。泛素复杂的酶级联系统及泛素链形成的特异性与持续性等相关机理仍需要深入广泛的研究, 使其可以服务于与泛素系统相关联的疾病的治疗, 利用泛素系统这一广泛的蛋白质翻译后修饰途径找到相关靶点与泛素化调控方法。

参 考 文 献

- [1] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, 1998, **67**: 425-479
- [2] Pickart C M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry*, 2001, **70**: 503-533
- [3] Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, **78**: 477-513
- [4] Collins GA, Goldberg AL. The logic of the 26S proteasome. *Cell*, 2017, **169**(5): 792-806
- [5] Oh E, Akopian D, Rape M. Principles of ubiquitin-dependent signaling. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2018, **34**: 137-162
- [6] 方帅, 赵博. 泛素化及相关疾病研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2017, **44**(5): 377-384

- Fang S, Zhao B. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2017, **44**(5): 377-384
- [7] Komander D, Rape M. The ubiquitin code. Annual Review of Biochemistry, 2012, **81**: 203-229
- [8] Swatek K N, Komander D. Ubiquitin modifications. Cell Research, 2016, **26**(4): 399-422
- [9] Yau R, Rape M. The increasing complexity of the ubiquitin code. Nature Cell Biology, 2016, **18**(6): 579-586
- [10] Yates B, Braschi B, Gray K A, *et al.* Genenames.org: the HGNC and VGNC resources in 2017. Nucleic Acids Research, 2017, **45**(D1): D619-D625
- [11] Wei L, Bengtson M H, Axel U, *et al.* Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. Plos One, 2008, **3**(1): e1487
- [12] Siepmann T J, Bohnsack R N, Tokgöz Z, *et al.* Protein interactions within the N-end rule ubiquitin ligation pathway. Journal of Biological Chemistry, 2003, **278**(11): 9448-9457
- [13] Deshaies R J, Joazeiro C A P. RING domain E3 ubiquitin ligases. Annual Review of Biochemistry, 2009, **78**: 399-434
- [14] Lorenz S. Structural mechanisms of HECT-type ubiquitin ligases. Biological Chemistry, 2018, **399**(2): 127-145
- [15] Walden H, Rittinger K. RBR ligase-mediated ubiquitin transfer: a tale with many twists and turns. Nature Structural & Molecular Biology, 2018, **25**(6): 440-445
- [16] Metzger M B, Pruneda J N, Klevit R E, *et al.* RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination. Biochimica Et Biophysica Acta, 2013, **1843**(1): 47-60
- [17] Rotin D, Kumar S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009, **10**(6): 398-409
- [18] Wenzel D M, Lissounov A, Brzovic P S, *et al.* UBCH7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids. Nature, 2011, **474**(7349): 105-108
- [19] Stewart M D, Ritterhoff T, Klevit R E, *et al.* E2 enzymes: more than just middle men. Cell Research, 2016, **26**(4): 423-440
- [20] Nacerddine K, Lehembre F, Bhaumik M, *et al.* The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. Developmental Cell, 2005, **9**(6): 769-779
- [21] Harbers K, Muller U, Grams A. Provirus integration into a gene encoding a ubiquitin-conjugating enzyme results in a placental defect and embryonic lethality. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, **93**(22): 12412-12417
- [22] Yamamoto M, Okamoto T, Takeda K, *et al.* Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. Nature Immunology, 2006, **7**(9): 962-970
- [23] Zhao G Y, Sonoda E, Barber L J, *et al.* A critical role for the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in initiating homologous recombination. Molecular Cell, 2007, **25**(5): 663-675
- [24] Ren J, Shi M, Liu R, *et al.* The Birc6 (Bruce) gene regulates p53 and the mitochondrial pathway of apoptosis and is essential for mouse embryonic development. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, **102**(3): 565-570
- [25] Roest H P, Baarends W M, De Wit J, *et al.* The ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme HR6A is a maternal factor essential for early embryonic development in mice. Molecular and Cellular Biology, 2004, **24**(12): 5485-5495
- [26] Bedard N, Hingamp P, Pang Z, *et al.* Mice lacking the UBC4-testis gene have a delay in postnatal testis development but normal spermatogenesis and fertility. Molecular & Cellular Biology, 2005, **25**(15): 6346-6354
- [27] Zheng N, Wang P, Jeffrey P D, *et al.* Structure of a c-Cbl - UbcH7 complex RING domain function in ubiquitin-protein ligases. Cell, 2000, **102**(4): 533-539
- [28] Huang L, Kinnucan E, Wang G. Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. Science, 1999, **286**(5443): 1321-1325
- [29] Dou H, Buetow L, Sibbet G J, *et al.* BIRC7 - E2 ubiquitin conjugate structure reveals the mechanism of ubiquitin transfer by a RING dimer. Nature Structural & Molecular Biology, 2012, **19**(9): 876-883
- [30] Plechanovova A, Jaffray E G, Tatham M H, *et al.* Structure of a RING E3 ligase and ubiquitin-loaded E2 primed for catalysis. Nature, 2012, **489**(7414): 115-120
- [31] Pruneda J N, Stoll K E, Bolton L J, *et al.* Ubiquitin in motion: structural studies of the ubiquitin-conjugating enzyme~ubiquitin conjugate. Biochemistry, 2011, **50**(10): 1624-1633
- [32] Soss S E, Klevit R E, Chazin W J. Activation of UbcH5c ~ Ub is the result of a shift in interdomain motions of the conjugate bound to U-Box E3 ligase E4B. Biochemistry, 2013, **52**(17): 2991-2999
- [33] Pruneda J N, Littlefield P J, Soss S E, *et al.* Structure of an E3:E2 ~ Ub complex reveals an allosteric mechanism shared among RING/ U-box ligases. Molecular Cell, 2012, **47**(6): 933-942
- [34] Hamilton K S, Ellison M J, Barber K R, *et al.* Structure of a conjugating enzyme-ubiquitin thiolester intermediate reveals a novel role for the ubiquitin tail. Structure, 2001, **9**(10): 897-904
- [35] Wickliffe K E, Lorenz S, Wemmer D E, *et al.* The mechanism of linkage-specific ubiquitin chain elongation by a single-subunit E2. Cell, 2011, **144**(5): 769-781
- [36] Brown N G, Watson E R, Weissmann F, *et al.* Mechanism of polyubiquitination by human anaphase-promoting complex: RING repurposing for ubiquitin chain assembly. Molecular Cell, 2014, **56**(2): 246-260
- [37] 李贞, 赵博. 解密泛素链的亲工具和. 生物化学与生物物理进展, 2019, **46**(9): 845-857
- Li Z, Zhao B. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2019, **46**(9): 845-857
- [38] Bernier-Villamor V, Sampson D A, Matunis M J, *et al.* Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. Cell, 2002, **108**(3): 345-356
- [39] Pichler A, Knipscheer P, Oberhofer E, *et al.* SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. Nature Structural &

- Molecular Biology, 2005, **12**(3): 264-269
- [40] Yunus AA, Lima C D. Lysine activation and functional analysis of E2-mediated conjugation in the SUMO pathway. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2006, **13**(6): 491-499
- [41] Machida Y J, Machida Y, Chen Y, *et al.* UBE2T is the E2 in the Fanconi anemia pathway and undergoes negative autoregulation. *Molecular Cell*, 2006, **23**(4): 589-596
- [42] Hoege C, Pfander B, Moldovan G L, *et al.* RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, 2002, **419**(6903): 135-141
- [43] Parker J L, Bielen A B, Ivan D, *et al.* Contributions of ubiquitin- and PCNA-binding domains to the activity of Polymerase η in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 2007, **35**(3): 881-889
- [44] De Oliveira J F, Do Prado P F V, Da Costa S S, *et al.* Mechanistic insights revealed by a UBE2A mutation linked to intellectual disability. *Nature Chemical Biology*, 2019, **15**(1): 62-70
- [45] Anandapadamanaban M, Kyriakidis N C, Csizmók V, *et al.* E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21-mediated lysine capture by UBE2E1 reveals substrate-targeting mode of a ubiquitin-conjugating E2. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, **294**(30): 11404-11419
- [46] Vittal V, Shi L, Wenzel D M, *et al.* Intrinsic disorder drives N-terminal ubiquitination by Ube2w. *Nature Chemical Biology*, 2014, **11**(1): 83-89
- [47] Tatham M H, Plechanovová A, Jaffray E G, *et al.* Ube2W conjugates ubiquitin to α -amino groups of protein N-termini. *Biochemical Journal*, 2013, **453**(1): 137-145
- [48] Scaglione K M, Basrur V, Ashraf N S, *et al.* The ubiquitin-conjugating enzyme (E2) Ube2w ubiquitinates the N terminus of substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, **288**(26): 18784-18788
- [49] Williams C, Van D B M, Sprenger R R, *et al.* A conserved cysteine is essential for Pex4p-dependent ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**(31): 22534-22543
- [50] Léon S, Subramani S. A conserved cysteine residue of *Pichia pastoris* Pex20p is essential for its recycling from the peroxisome to the cytosol. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**(10): 7424-7430
- [51] Wang X, Herr R A, Chua W-J, *et al.* Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. *Journal of Cell Biology*, 2007, **177**(4): 613-624
- [52] Wang X, Herr R A, Rabelink M, *et al.* Ube2j2 ubiquitinates hydroxylated amino acids on ER-associated degradation substrates. *Journal of Cell Biology*, 2009, **187**(5): 655-668
- [53] Boban M, Ljungdahl P O, Foisner R. Atypical ubiquitylation in yeast targets lysine-less Asi2 for proteasomal degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, **290**(4): 2489-2495
- [54] Chong R A, Wu K, Spratt D E, *et al.* Pivotal role for the ubiquitin Y59-E51 loop in lysine 48 polyubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(23): 8434-8439
- [55] Hill S, Harrison J S, Lewis S M, *et al.* Mechanism of lysine 48 selectivity during poly-ubiquitin chain formation by the Ube2R1/2 ubiquitin-conjugating enzyme. *Molecular & Cellular Biology*, 2016, **36**(11): 1720-1732
- [56] Petroski M D, Deshaies R J. Function and regulation of Cullin-RING ubiquitin ligases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005, **6**(1): 9-20
- [57] Soucy T A, Smith P G, Milhollen M A, *et al.* An inhibitor of Nedd8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature*, 2009, **458**(7239): 732-736
- [58] Ziemba A, Hill S, Sandoval D, *et al.* Multimodal mechanism of action for the Cdc34 acidic loop: a case study for why ubiquitin-conjugating enzymes have loops and tails. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, **288**(48): 34882-34896
- [59] Kleiger G, Saha A, Lewis S, *et al.* Rapid E2-E3 assembly and disassembly enable processive ubiquitylation of cullin-RING ubiquitin ligase substrates. *Cell*, 2009, **139**(5): 957-968
- [60] Kleiger G, Hao B, Mohl D A, *et al.* The acidic tail of the Cdc34 ubiquitin-conjugating enzyme functions in both binding to and catalysis with ubiquitin ligase SCFCdc4. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, **284**(52): 36012-36023
- [61] Fang S, Ferrone M, Yang C, *et al.* The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(25): 14422-14427
- [62] Chen B, Mariano J, Tsai Y C, *et al.* The activity of a human endoplasmic reticulum-associated degradation E3, gp78, requires its Cue domain, RING finger, and an E2-binding site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(2): 341-346
- [63] Das R, Mariano J, Tsai Y C, *et al.* Allosteric activation of E2-RING finger-mediated ubiquitylation by a structurally defined specific E2-binding region of gp78. *Molecular Cell*, 2009, **34**(6): 674-685
- [64] Li W, Tu D Q, Li L, *et al.* Mechanistic insights into active site-associated polyubiquitination by the ubiquitin-conjugating enzyme Ube2g2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(10): 3722-3727
- [65] Das R, Liang Y H, Mariano J, *et al.* Allosteric regulation of E2:E3 interactions promote a processive ubiquitination machine. *The EMBO Journal*, 2013, **32**(18): 2504-2516
- [66] Rodrigo-Brenni M C, Foster S A, Morgan D O. Catalysis of lysine 48-specific ubiquitin chain assembly by residues in E2 and ubiquitin. *Molecular Cell*, 2010, **39**(4): 548-559
- [67] Middleton A J, Day C L. The molecular basis of lysine 48 ubiquitin chain synthesis by Ube2K. *Scientific Reports*, 2015, **5**: 16793
- [68] Bremm A, Freund S M V, Komander D. Lys11-linked ubiquitin chains adopt compact conformations and are preferentially hydrolyzed by the deubiquitinase Cezanne. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010, **17**(8): 939-947
- [69] Eddins M J, Carlile C M, Gomez K M, *et al.* Mms2-Ubc13 covalently bound to ubiquitin reveals the structural basis of linkage-specific polyubiquitin chain formation. *Nature Structural*

- & Molecular Biology, 2006, **13**(10): 915-920
- [70] 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): 645-653
- [71] Gan N, Nakayasu E S, Hollenbeck P J, *et al.* Legionella pneumophila inhibits immune signalling via MavC-mediated transglutaminase-induced ubiquitination of UBE2N. *Nature Microbiology*, 2019, **4**(1): 134-143
- [72] Brzovic P S, Lissounov A, Christensen D E, *et al.* A UbcH5/Ubiquitin noncovalent complex is required for processive BRCA1-directed ubiquitination. *Molecular Cell*, 2006, **21**(6): 873-880
- [73] Buetow L, Gabrielsen M, Anthony N G, *et al.* Activation of a primed RING E3-E2-ubiquitin complex by non-covalent ubiquitin. *Molecular Cell*, 2015, **58**(2): 297-310
- [74] Wu T, Merbl Y, Huo Y, *et al.* UBE2S drives elongation of K11-linked ubiquitin chains by the anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(4): 1355-1360
- [75] Watson E R, Brown N G, Peters J-M, *et al.* Posing the APC/C E3 ubiquitin ligase to orchestrate cell division. *Trends in Cell Biology*, 2018, **29**(2): 117-134
- [76] Williamson A, Wickliffe K E, Mellone B G, *et al.* Identification of a physiological E2 module for the human anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(43): 18213-18218
- [77] Page R C, Pruneda J N, Amick J, *et al.* Structural insights into the conformation and oligomerization of E2 ~ ubiquitin conjugates. *Biochemistry*, 2012, **51**(20): 4175-4187
- [78] Ranaweera R S, Yang X. Auto-ubiquitination of Mdm2 enhances its substrate ubiquitin ligase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, **288**(26): 18939-18946
- [79] Brown N G, Vanderlinden R, Watson E R, *et al.* Dual RING E3 architectures regulate multiubiquitination and ubiquitin chain elongation by APC/C. *Cell*, 2016, **165**(6): 1440-1453
- [80] Kelly A, Wickliffe K E, Song L, *et al.* Ubiquitin chain elongation requires E3-dependent tracking of the emerging conjugate. *Molecular Cell*, 2014, **56**(2): 232-245
- [81] Liess A K L, Kucerova A, Schweimer K, *et al.* Autoinhibition mechanism of the ubiquitin-conjugating enzyme UBE2S by autoubiquitination. *Structure*, 2019, **27**(8): 1195-1210
- [82] Song L, Luo Z Q. Post-translational regulation of ubiquitin signaling. *Journal of Cell Biology*, 2019, **218**(6): 1776-1786
- [83] Wu K, Kovacev J, Pan Z Q. Priming and extending: a UbcH5/Cdc34 E2 handoff mechanism for polyubiquitination on a SCF substrate. *Molecular Cell*, 2010, **37**(6): 784-796
- [84] Scott D, Rhee D, Duda D, *et al.* Two distinct types of E3 ligases work in unison to regulate substrate ubiquitylation. *Cell*, 2016, **166**(5): 1198-1214
- [85] Dove K K, Kemp H A, Bona K R D, *et al.* Two functionally distinct E2/E3 pairs coordinate sequential ubiquitination of a common substrate in *Caenorhabditis elegans* development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(32): E6576-E6584
- [86] Duda D M, Olszewski J L, Schuermann J P, *et al.* Structure of HHARI, a RING-IBR-RING ubiquitin ligase: autoinhibition of an Ariadne-family E3 and insights into ligation mechanism. *Structure*, 2013, **21**(6): 1030-1041
- [87] Wang B, Merillat S A, Vincent M, *et al.* Loss of the ubiquitin-conjugating enzyme UBE2W results in susceptibility to early postnatal lethality and defects in skin, immune, and male reproductive systems. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, **291**(6): 3030-3042
- [88] Fletcher A J, Christensen D E, Nelson C, *et al.* TRIM5 requires Ube2W to anchor Lys63-linked ubiquitin chains and restrict reverse transcription. *The EMBO Journal*, 2015, **34**(15): 2078-2095
- [89] Fletcher A J, Mallery D L, Watkinson R E, *et al.* Sequential ubiquitination and deubiquitination enzymes synchronize the dual sensor and effector functions of TRIM21. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(32): 10014-10019
- [90] Kiss L, Zeng J, Dickson C F, *et al.* A tri-ionic anchor mechanism drives Ube2N-specific recruitment and K63-chain ubiquitination in TRIM ligases. *Nature Communications*, 2019, **10**(1): 4502
- [91] Michiel V G, Sparrer K M J, Gack M U. TRIM proteins and their roles in antiviral host defenses. *Annual Review of Virology*, 2018, **5**(1): 385-405
- [92] Liyasova M S, Ma K, Voeller D, *et al.* Cbl interacts with multiple E2s *in vitro* and in cells. *Plos One*, 2019, **14**(5): e0216967
- [93] Stelter P, Ulrich H D. Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature*, 2003, **425**(6954): 188-191
- [94] Parker J L, Ulrich H D. Mechanistic analysis of PCNA poly-ubiquitylation by the ubiquitin protein ligases Rad18 and Rad5. *The EMBO Journal*, 2009, **28**(23): 3657-3666
- [95] Kamadurai H B, Souphron J, Scott D C, *et al.* Insights into ubiquitin transfer cascades from a structure of a UbcH5B approximately ubiquitin-HECT(NEDD4L) complex. *Molecular Cell*, 2009, **36**(6): 1095-1102
- [96] Lechtenberg B C, Rajput A, Sanishvili R, *et al.* Structure of a HOIP/E2 similar to ubiquitin complex reveals RBR E3 ligase mechanism and regulation. *Nature*, 2016, **529**(7587): 546-550
- [97] Maspero E, Valentini E, Mari S, *et al.* Structure of a ubiquitin-loaded HECT ligase reveals the molecular basis for catalytic priming. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2013, **20**(6): 696-701
- [98] Hammel M, Kuhlman B, Qiu Y, *et al.* Mechanism of ubiquitin ligation and lysine prioritization by a HECT E3. *Elife*, 2013, **2**(15): e00828
- [99] Kim H C, Huibregtse J M. Polyubiquitination by HECT E3s and the determinants of chain type specificity. *Molecular and Cellular Biology*, 2009, **29**(12): 3307-3318
- [100] French M E, Klosowiak J L, Aslanian A, *et al.* Mechanism of ubiquitin chain synthesis employed by a HECT ubiquitin ligase. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, **292**(25): 10398-10413
- [101] Liu C, Liu W, Ye Y, *et al.* Ufd2p synthesizes branched ubiquitin chains to promote the degradation of substrates modified with

- atypical chains. *Nature Communications*, 2017, **8**: 14274
- [102] Ohtake F, Tsuchiya H, Saeki Y, *et al.* K63 ubiquitylation triggers proteasomal degradation by seeding branched ubiquitin chains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, **115**(7): E1401-E1408
- [103] Ohtake F, Saeki Y, Ishido S, *et al.* The K48-K63 branched ubiquitin chain regulates NF- κ B signaling. *Molecular Cell*, 2016, **64**(2): 251-266
- [104] Yau R G, Doerner K, Castellanos E R, *et al.* Assembly and function of heterotypic ubiquitin chains in cell-cycle and protein quality control. *Cell*, 2017, **171**(4): 918-933
- [105] Kim H C, Steffen A M, Oldham M L, *et al.* Structure and function of a HECT domain ubiquitin-binding site. *The EMBO Journal*, 2011, **12**(4): 334-341
- [106] Ogunjimi A A, Wiesner S, Briant D J, *et al.* The ubiquitin binding region of the Smurf HECT domain facilitates polyubiquitylation and binding of ubiquitylated substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, **285**(9): 6308-6315
- [107] Ries L K, Sander B, Deol K K, *et al.* Analysis of ubiquitin recognition by the HECT ligase E6AP provides insight into its linkage specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, **294**(15): 6113-6129
- [108] Fajner V, Maspero E, Polo S. Targeting HECT -type E3 ligases - insights from catalysis, regulation and inhibitors. *Febs Letters*, 2017, **591**(17): 2636-2647
- [109] Huang A, Jong R N D, Wienk H, *et al.* E2-c-Cbl recognition is necessary but not sufficient for ubiquitination activity. *Journal of Molecular Biology*, 2009, **385**(2): 507-519
- [110] Brzovic P S, Keffe J R, Nishikawa H, *et al.* Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(10): 5646-5651
- [111] Wauer T, Komander D. Structure of the human Parkin ligase domain in an autoinhibited state. *The EMBO Journal*, 2013, **32**(15): 2099-2112
- [112] Wauer T, Simicek M, Schubert A, *et al.* Mechanism of phospho-ubiquitin-induced PARKIN activation. *Nature*, 2015, **524**(7565): 370-374
- [113] Ikeda F, Deribe Y L, Skånland S S, *et al.* SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF- κ B activity and apoptosis. *Nature*, 2011, **471**(7340): 637-641
- [114] Tokunaga F, Nakagawa T, Nakahara M, *et al.* SHARPIN is a component of the NF- κ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature*, 2011, **471**(7340): 633-636
- [115] Stieglitz B, Rana R R, Koliopoulos M G, *et al.* Structural basis for ligase-specific conjugation of linear ubiquitin chains by HOIP. *Nature*, 2013, **503**(7476): 422-426
- [116] Ramkumar S, Thomas H, Tamara B, *et al.* Mechanism and chain specificity of RNF216/TRIAD3, the ubiquitin ligase mutated in Gordon Holmes syndrome. *Human Molecular Genetics*, 2019, **28**(17): 2862-2873
- [117] Pierce N W, Kleiger G, Shan S O, *et al.* Detection of sequential polyubiquitylation on a millisecond timescale. *Nature*, 2009, **462**(7273): 615-619
- [118] Lu Y, Wang W, Kirschner M W. Specificity of the anaphase-promoting complex: a single-molecule study. *Science*, 2015, **348**(6231): 1248737
- [119] Markin C J, Mercier P, Spyrapoulos L. Role of polyubiquitin chain flexibility in the catalytic mechanism of cullin-RING ubiquitin ligases. *Journal of Physical Chemistry B*, 2018, **123**(4): 776-786
- [120] Brzovic P S, Klevit R E. Ubiquitin transfer from the E2 perspective: why is UbcH5 so promiscuous?. *Cell Cycle*, 2006, **5**(24): 2867-2873
- [121] Hibbert R G, Huang A, Boelens R, *et al.* E3 ligase Rad18 promotes monoubiquitination rather than ubiquitin chain formation by E2 enzyme Rad6. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(14): 5590-5595
- [122] Kumar P, Magala P, Geiger-Schuller K R, *et al.* Role of a non-canonical surface of Rad6 in ubiquitin conjugating activity. *Nucleic Acids Research*, 2015, **43**(18): 9039-9050
- [123] Wang M, Cheng D, Peng J, *et al.* Molecular determinants of polyubiquitin linkage selection by an HECT ubiquitin ligase. *The EMBO Journal*, 2006, **25**(8): 1710-1719
- [124] Ronchi V P, Kim E D, Summa C M, *et al.* In silico modeling of the cryptic E2~ubiquitin binding site of E6-associated protein (E6AP)/UBE3A reveals the mechanism of polyubiquitin chain assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, **292**(44): 18006-18023
- [125] Todaro D R, Augustus-Wallace A C, Klein J M, *et al.* The mechanism of neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4-2 (Nedd4-2)/NEDD4L-catalyzed polyubiquitin chain assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, **292**(47): 19521-19536
- [126] Todaro D R, Augustus-Wallace A C, Klein J M, *et al.* Oligomerization of the Hect ubiquitin ligase Nedd4-2/NEDD4L is essential for polyubiquitin chain assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, **293**(47): 18192-18206
- [127] Li W, Tu D, Brunger A T, *et al.* A ubiquitin ligase transfers preformed polyubiquitin chains from a conjugating enzyme to a substrate. *Nature*, 2007, **446**(7133): 333-337
- [128] Liu W, Shang Y, Zeng Y, *et al.* Dimeric Ube2g2 simultaneously engages donor and acceptor ubiquitins to form Lys48-linked ubiquitin chains. *The EMBO Journal*, 2014, **33**(1): 46-61
- [129] Cook B W, Lacoursiere R E, Shaw G S. Recruitment of ubiquitin within an E2 chain elongation complex. *Biophys J*, 2020, **118**(7): 1679-1689
- [130] Masuda Y, Suzuki M, Kawai H, *et al.* En bloc transfer of polyubiquitin chains to PCNA *in vitro* is mediated by two different human E2 - E3 pairs. *Nucleic Acids Research*, 2012, **40**(20): 10394-10407
- [131] Deol K K, Lorenz S, Strieter E R. Enzymatic logic of ubiquitin chain assembly. *Frontiers in Physiology*, 2019, **10**: 835

Mechanisms of Ubiquitin Chain Formation*

WANG Ya-Nan, ZHAO Bo**

(Engineering Research Center of Cell and Therapeutic Antibody Ministry of Education, School of Pharmacy,
Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract Ubiquitination is an important protein post-translational modification process in eukaryotic cells, participating in a variety of cellular functions such as protein degradation and signaling pathways. The polyubiquitination modification of the substrate proteins is a continuous process, which not only involves the complex participation of enzymes related to ubiquitin system, but also refers to more complex structural interactions and ubiquitin chain assembly mechanisms. Ubiquitin chain modifications determine the fate of the downstream substrate proteins. The crucial role of ubiquitin-conjugating enzyme E2 in the formation of ubiquitin chains has attracted more and more attentions. Understanding of the mechanisms of ubiquitin chain formation is conducive to the discovery of disease targets and treatment related to the ubiquitin system. In this review, we summarize the research progress of the mechanisms of ubiquitin chain formation, involving how E2 reacting with different types of E3 determine the type and the assembly process of ubiquitin chain formed on the substrates, with complex structural information provided. Two different mechanisms on how ubiquitin chain assembly, including the sequential addition mechanism and the en bloc transfer mechanism, are also discussed.

Key words ubiquitin chains, ubiquitin conjugating enzyme E2, ubiquitin ligase E3, ubiquitin chain specificity, ubiquitin chain assembly

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0304

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31770921, 31971187).

** Corresponding author.

Tel: 86-21-34207498, E-mail: bozhao@sjtu.edu.cn

Received: August 21, 2020 Accepted: October 21, 2020