

人泛素连接酶AREL1催化结构域的晶体结构*

李智慧** 商国辉** 唐晨骏 田姿姿 吴 玮 陈忠周***

(北京食品营养与人类健康高精尖创新中心, 中国农业大学生物学院, 北京 100193)

摘要 泛素化是一种重要的翻译后修饰, 几乎调控着生命活动的所有方面. 泛素连接酶是泛素化过程中唯一对底物蛋白质有特异性识别能力的一类酶, 它们在泛素化过程中是不可或缺的, 起到非常关键的作用. 人抗凋亡E3泛素连接酶(AREL1)是HECT泛素连接酶家族成员之一, 它能够泛素化促凋亡蛋白SMAC、HtrA2和ARTS, 并通过蛋白酶体将它们降解, 从而发挥抵抗细胞凋亡的作用. 本文解析了3.2 Å分辨率的人AREL1蛋白催化结构域(AREL1^{HECT})的晶体结构, 并将其与HECT家族中其他成员的结构进行了比对. 尺寸排阻色谱和X射线小角散射的结果表明, AREL1^{HECT}在溶液中是以多种聚集状态形式存在的, 小角散射的3D模型进一步表明AREL1^{HECT}在溶液中会发生二聚化. 这些结果将为AREL1^{HECT}与泛素复合物结构的解析及功能的分析提供坚实的结构基础, 为揭示AREL1泛素化底物蛋白质的分子机制提供重要的依据.

关键词 泛素化, 泛素连接酶, AREL1, HECT结构域, 晶体结构, 二聚化

中图分类号 Q71, Q5, Q6

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0008

泛素化是一种重要的翻译后修饰^[1-2], 它在调节蛋白质功能及降解方面发挥重要作用^[1], 几乎控制着生命活动的所有方面^[2]. 泛素化是酶的级联反应过程, 在这个过程中, 主要包括3类酶: E1泛素激活酶(ubiquitin-activating enzyme)、E2泛素结合酶(ubiquitin-conjugating enzyme)和E3泛素连接酶(ubiquitin-ligase)^[3-4], 每一类酶在蛋白质的转录后修饰方面都具有独特的功能^[5].

根据E3结构上的保守性和对底物识别的特异性, 可以将人体内的E3分为3类^[6]. 第一类是含有RING (really interesting new gene) 结构域的E3, 负责招募E2-泛素和底物蛋白质, 可以催化泛素从E2直接转移到底物上; 第二类是含有HECT (homology to E6AP C-terminus) 结构域的E3, 它们在对底物蛋白质进行泛素化的时候, 泛素分子先被转移到E3上, 再从E3上转移到底物蛋白质上; 第三类是含有RBR (RING-Between-RING) 结构域的E3, 这类酶催化泛素化反应的过程与HECT E3相同^[6].

HECT E3主要包含N端结构域和位于C末端的保守HECT结构域, HECT结构域被划分为较大的

N-lobe和较小的C-lobe^[1-2]. N端结构域能够与适配体蛋白和共活化因子相互作用, 并能够与HECT结构域发生分子内相互作用; N-lobe能够调节E2的招募过程; C-lobe包含具有催化活性的半胱氨酸残基, 此部分为HECT E3的活性中心^[1]. 这两个lobe之间由一段铰链区连接, 这使得C-lobe可以绕着铰链旋转, 从而获得不同的构象^[2].

人的AREL1 (apoptosis-resistant E3 ubiquitin protein Ligase 1) 蛋白属于HECT E3家族, 它包含N端的Filamin结构域(图1a中黄色表示)和C端的HECT结构域(图1a中绿色表示)^[1-2, 7-11]. AREL1的主要功能是抑制细胞凋亡, 其底物是线粒体促凋亡蛋白SMAC、HtrA2和ARTS^[11-12], 这些底物与HECT结构域相互作用, 而非Filamin结构域^[12]. 体外泛素化实验表明, 在E1 (UBA1) 和

* 科技部重点研发计划(2018YFE0113100)和国家自然科学基金(31872713)资助项目.

** 并列第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 010-62734078, E-mail: chenzhongzhou@cau.edu.cn

收稿日期: 2020-01-07, 接受日期: 2020-03-20

E2 (UbcH7) 存在的条件下, AREL1 的 HECT 结构域可以将 SMAC 和 HtrA2 多泛素化, 多泛素链主要通过 K33 形成^[11].

为了揭示 AREL1 催化底物蛋白质泛素化的分子机制, 本文解析了 3.2 Å 分辨率的 AREL1^{HECT} 晶体结构, 这是首次报道没有体外修饰的 AREL1 HECT 结构域结构. 本文通过尺寸排阻色谱 (SEC) 和 X 射线小角散射 (SAXS) 证明 AREL1^{HECT} 在溶液中是以多种聚集状态形式存在的, 以单体为主, 同时还存在至少两种二聚体. 另外, SAXS 的 3D 模型表明 AREL1^{HECT} 在溶液中会发生二聚化. 这些结果将为阐述 AREL1 参与泛素化过程提供坚实的结构基础, 对研究其与底物之间的作用机制和以之为靶点的药物设计具有重要的生物学意义和临床意义.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株、表达载体和纯化介质

本文所使用的菌株是大肠杆菌 (*E. coli*), 感受态细胞 BL21 (DE3) 由实验室自制; 感受态细胞 DH10β 购买于北京中美泰和生物科技有限公司. 本文使用的载体为改良之后含有 TEV 蛋白酶切位点的 pET-28a, 限制性酶切位点是 *Bam*HI/*Xho*I. 蛋白质纯化所使用的纯化介质和层析柱均购买于美国 GE 公司.

1.1.2 试剂和仪器

Pfu DNA 聚合酶为实验室自制; 限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 购自 NEB 公司; TEV 蛋白酶由实验室自制. 分子实验相关试剂无特殊说明均购于北京全式金生物技术有限公司, 化学试剂无特殊说明均购自 Sigma 公司. 用于晶体筛选的试剂盒均购买于 Hampton 公司. PCR 仪、核酸凝胶成像仪、蛋白质凝胶成像仪均购自 Bio-Rad 公司; FPLC 蛋白质纯化系统购自美国 GE 公司.

1.2 实验方法

1.2.1 AREL1^{HECT} 蛋白表达与纯化

将编码 AREL1^{HECT} 的多个基因片段亚克隆到 pET-28a 载体的 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切位点之间, 其 N 端带有一个 6×His 融合标签. 选取测序正确的质粒, 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 通过含有 50 mg/L 卡那霉素的固体培养基选出含有 pET-28a-AREL1^{HECT} 质粒的 BL21 (DE3) 单菌落,

将单菌落转接至含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37°C, 200 r/min 振摇. 当 $A_{600} \approx 0.7$ 时, 加入终浓度为 0.3 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖 (IPTG), 18°C 培养 20 h, 诱导蛋白质表达. 收取菌液, 离心收集表达了 N 端带有 6×His 标签和 TEV 蛋白酶切位点的重组 AREL1^{HECT} 蛋白的菌体.

离心得到的菌体用 25 mmol/L Bis-Tris Propane (BTP) pH 6.0 (4°C), 1 mol/L NaCl, 100 mmol/L 咪唑 (imidazole), 10% 甘油 (glycerol), 2 mmol/L β-巯基乙醇 (β-me) 重新悬起, 用超声破碎法破碎菌体. 菌体裂解液经高速离心分离, 将上清液上样到 Ni²⁺ 亲和层析柱, 纯化介质为 Chelating Sepharose Fast Flow Matrix, 通过 100 mmol/L 至 1 000 mmol/L 的咪唑梯度洗脱蛋白质. 将包含 AREL1^{HECT} 的蛋白质洗脱液透析到 25 mmol/L BTP pH 6.0 (4°C), 300 mmol/L NaCl, 100 mmol/L imidazole, 5% glycerol, 5 mmol/L DTT, 1 mmol/L 苯甲脒盐酸盐缓冲液中, 然后将蛋白质溶液上样到 AKTA 纯化系统, 用购买于 GE 公司的 Hitrap SP 柱进行阳离子交换层析纯化, 用 300 mmol/L 至 1 mol/L 的线性 NaCl 梯度进行洗脱. 最后, 将 AREL1^{HECT} 蛋白溶液浓缩到 6 g/L, 用于晶体筛选.

1.2.2 AREL1^{HECT} 蛋白结晶与衍射数据收集

晶体是利用气相扩散悬滴法生长的, 生长温度为 18°C. 2 μl AREL1^{HECT} 蛋白溶液与 1 μl 晶体生长液 (0.1 mol/L 磷酸钠 pH 6.4, 0.2 mol/L 氯化钾, 2.25 mol/L 氯化钠, 0.01 mol/L β-氨基乙磺酸) 混合, 蛋白质浓度为 2.8 g/L. 冻存晶体时, 防冻剂是终浓度 20% (v/v) 的甘油, 防冻时间 5 min. AREL1^{HECT} 的衍射数据是在上海同步辐射中心 BL17U1 线站收集的.

1.2.3 数据处理与结构解析

用 HKL2000 软件处理衍射数据^[13]. AREL1^{HECT} 的结构是用分子置换法解析的, 以 HUWE1 蛋白的 HECT 结构域的结构 (PDB ID: 5LP8) 为模型, 使用 CCP4 软件包的 Balbes 程序获得初始相位. 结构精修在 COOT 软件中手动完成^[14-15]. 数据收集与结构精修数据如表 1 所示. 结构图由 Pymol 软件制作 (<http://www.pymol.org>). AREL1^{HECT} 晶体结构的 PDB 号为 6LOH.

1.2.4 尺寸排阻色谱 (SEC)

将 Superdex™ 200 HR 10/300 层析柱用 25 mmol/L BTP pH 6.0 (4°C), 450 mmol/L NaCl, 100 mmol/L imidazole, 5% glycerol, 5 mmol/L DTT, 1 mmol/L 苯甲脒盐酸盐水合物缓冲液平衡, 将分离纯化得到的目的蛋白质以 500 μl 的体积上样, 设定流速 0.4 ml/min, 限压 1.2 MPa, 记录目的蛋白质洗脱体积, 收集紫外吸收峰的样品, 0.5 ml/管, 对收集的样品进行 SDS-PAGE 分析.

1.2.5 X射线小角散射 (SAXS)

本实验利用上海光源 (五站六线) BL19U2 线站进行散射, 毛细管为样品池, 通过泵将样品吸入毛细管中进行曝光, 每轮曝光所需样品 60 μl, 相应的缓冲液需要多次曝光. 要保证样品没有气泡, 否则影响散射结果. 样品台温度为 10°C, 为了得到更好的信噪比, 样品设置 3 个浓度梯度: 2 g/L、1 g/L 和 0.5 g/L. 对同一样品连续收集 20 张图像, 通过计算平均值降低噪声. 使用 RAW 软件完成从 2D 图像到 1D 数据的转换. 得到一维散射曲线后, 需要对散射曲线进行强度归一化; 用蛋白质样品的散射强度减去缓冲液的散射强度, 得到蛋白质样品的散射信号; 将散射信号数据与我们解析得到的蛋白质结构的单体、二聚体和三聚体及其混合形式通过 FoXS 网站 (<http://modbase.compbio.ucsf.edu/foxs/index.html>) 计算 χ^2 值, χ^2 值越小, 表明散射数据与蛋白质结构模型拟合得越好, 从而越接近蛋白质在溶液中的真实聚集状态.

1.2.6 SAXS 3D建模

将 SAXS 数据输入 Atsas 软件包的 GNOM 程序, 优化蛋白质结构参数 r , 得出 AREL1^{HECT} 蛋白的对分布函数 (pair distribution function) $P(r)$, $P(r)$ 图象反映了 AREL1^{HECT} 在溶液中的聚集状态^[16]. 确定 AREL1^{HECT} 聚集状态后, 用 DAMMIN 在线程序 (<https://www.embl-hamburg.de/biosaxs/atsas-online/dammin.php>) 进行三维重构, 得到从头计算模型 (*ab initio* model), 将此模型与 SAXS 数据通过 FoXS 网站进行拟合, 计算 χ^2 值, χ^2 值越小, 表明从头计算模型与 SAXS 数据拟合得越好, 从而模型的可信度越高. 通过 SUPCOMB 程序对从头计算模型与 AREL1^{HECT} 二聚体结构进行比对, 验证从头计算模型的真实性和 SAXS 模型的真实性和^[16].

Table 1 Data collection and refinement statistics

		AREL1 ^{HECT}
Data collection	Wavelength/Å	0.9792
	Resolution range/Å	50.0–3.21 (3.31–3.21)
	Space group	<i>P</i> 6 ₃ 22
	Cell parameters	
	<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> / Å	150.2, 150.2, 342.6
	α , β , γ / (°)	90, 90, 120
	Unique reflections	36070 (1756)
	Completeness/%	98 (98.9)
	<i>I</i> /sigma (<i>I</i>)	9.60 (2.06)
	R_{merge} ¹⁾	0.119 (0.628)
Refinement	R_{pim}	0.071
	CC _{1/2} ²⁾	0.635
	R_{work} / % ³⁾	20.87
	R_{free} / % ⁴⁾	23.76
	Average B-factor/Å	77.66
	Macromolecules	77.69
	Root mean square deviations	
	Bond length/Å	0.0041
	Bond angles/ (°)	1.3610
	Ramachandran plot ⁵⁾	
		Most favored / %
		88.4
		Additionally allowed / %
		11.4
		Generously allowed / %
		0.2
		Disallowed / %
		0

Values in parentheses are for the highest resolution shell.
1) $R_{\text{merge}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$. *I* is the measured intensity for reflections.
2) CC_{1/2} for the highest resolution shell. 3) $R_{\text{work}} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$.
4) $R_{\text{free}} = R$ factor for a selected subset (5%) of the reflections that were not included in prior refinement calculations. 5) Calculated by PROCHECK.

2 实验结果

2.1 AREL1^{HECT}的整体结构

纯化过程中, AREL1^{HECT} 蛋白溶解度低, 容易沉淀, 不能达到足够高的浓度 (>5 g/L) 用于晶体筛选. 通过筛选缓冲液及添加剂, 我们发现在缓冲液中加入终浓度为 100 mmol/L 的咪唑可以提高蛋白质的稳定性和溶解度. 用于结构解析和 SAXS 实验的蛋白质样品均由 AREL1 蛋白的 437~811 位氨基酸残基组成 (图 1a).

本文解析了 3.2 Å 分辨率的 AREL1^{HECT} 晶体结构, 每一个不对称单元中包含 3 个 AREL1^{HECT} 分子 (图 1b). 每个 AREL1^{HECT} 分子都具有经典 HECT 结

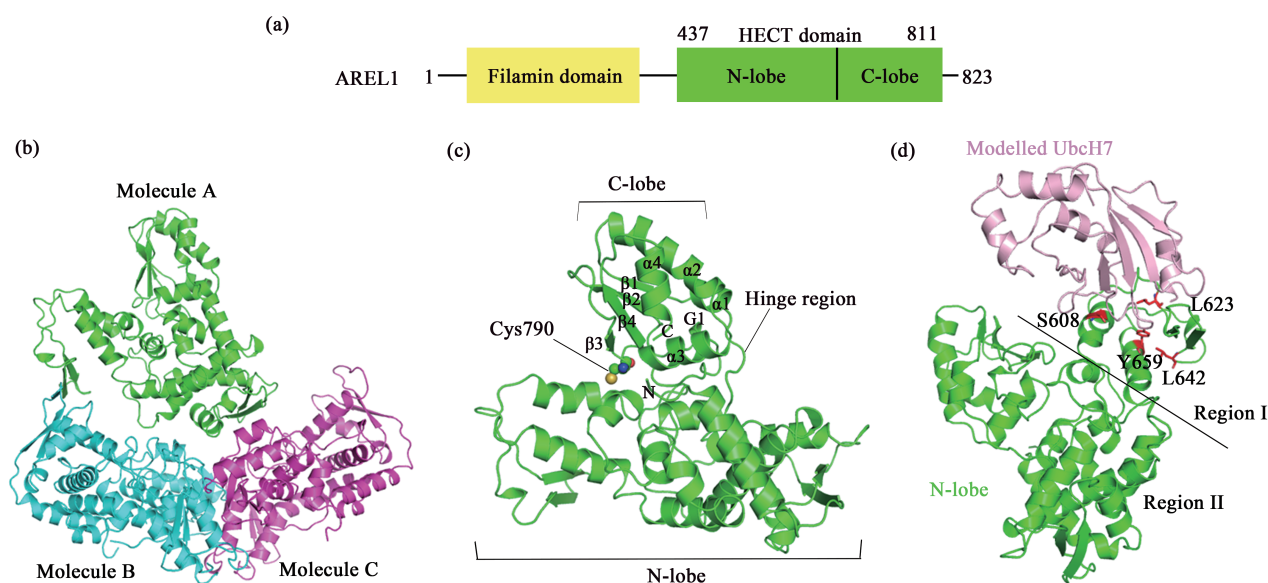


Fig. 1 Overall structure of AREL1^{HECT}

(a) Schematic representation of human AREL1 domains. (b) Ribbon diagram of the AREL1^{HECT} structure. Molecules A, B, and C are indicated in green, cyan and light magenta, respectively. (c) All three molecules comprise an N-lobe and a C-lobe, and the C-lobe consists of four β -strands ($\beta 1$ to $\beta 4$), one 3_{10} helix (G1), and four α -helices ($\alpha 1$ to $\alpha 4$). The catalytic Cys790 (indicated with spheres) and hinge region are highlighted by straight lines. Only the secondary elements on C-lobe are labeled. (d) Model of AREL1^{HECT}-UbcH7 complex was generated based on the structure of E6AP-UbcH7 complex (PDB ID: 1C4Z). The C-lobe of AREL1^{HECT} is omitted for clarity, and the N-lobe indicated in green consists of region I and region II. The conserved residues necessary for UbcH7 binding are shown by sticks and indicated in red. The modelled UbcH7 is indicated in light pink.

构域的特征,即整体结构呈现为“T”形,包含一个 N-lobe (437~705 aa) 和一个 C-lobe (712~811 aa),二者之间由一段短的铰链区 (706~711 aa) 连接 (图 1c)。这段铰链区使得 N-lobe 和 C-lobe 可以根据功能的需求发生一定角度的摆动,从而有利于 AREL1 发挥泛素连接酶活性。C-lobe 主要包含一段 3_{10} 螺旋 (G1)、4 段 α 螺旋 ($\alpha 1 \sim \alpha 4$) 和 4 段 β 折叠 ($\beta 1 \sim \beta 4$) (图 1c)。按照从 NH_2 -端到 COOH -端的顺序, C-lobe 的折叠方式为: $\alpha 1$ - $\beta 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ -G1- $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\beta 4$ - $\alpha 4$ (图 1c)。具有催化活性的半胱氨酸残基 (Cys790) 位于连接 $\beta 3$ 和 $\beta 4$ 的 loop 上,这段 loop 暴露在溶剂中 (图 1c),有利于 Cys790 催化泛素分子连接到底物蛋白质上。根据 E6AP-UbcH7 复合物的结构 (PDB ID: 1C4Z),我们模拟了 AREL1^{HECT}-UbcH7 复合物结构模型。模型显示 AREL1^{HECT} 的 4 个保守残基 (S608、L623、L642 和 Y659) 对 UbcH7 的结合可能是必要的,它们均来自于 N-lobe 的区域 I (602~669 aa, 图 1d)。这提示我们,区域 I 可能是 AREL1^{HECT} 与 UbcH7 的

结合面。

2.2 AREL1^{HECT}与HECT家族其他成员的结构比对及分析

通过 DALI 服务器,我们搜索到了其他 HECT 泛素连接酶,并将 AREL1^{HECT} 与 NEDD4 (PDB ID: 2XBF)、E6AP (PDB ID: 1D5F)、WWP1 (PDB ID: 6J1X) 和 HUWE1 (PDB ID: 5LP8) 的 HECT 结构域的结构分别进行了比对 (图 2)。为了更清楚地观察 AREL1^{HECT} 与 NEDD4 及 E6AP 的 HECT 结构域之间的差异,我们将 N-lobe 和 C-lobe 分别进行了比对,结构比对结果显示: AREL1^{HECT} 在 N-lobe 和 C-lobe 的构象上与 NEDD4 及 E6AP 均存在差异 (图 2a 和 2b)。AREL1^{HECT} 与 WWP1 及 HUWE1 的 HECT 结构域之间的差异主要位于 N-lobe 上 (图 2c 和 2d)。通过对不同 HECT 泛素连接酶结构的比对及分析,我们发现 AREL1^{HECT} 与其他 HECT E3 之间存在构象差异的区域 (616~655 aa) 包含在 N-lobe 的区域 I 中 (图 1d 和图 2)。根据 AREL1^{HECT}-UbcH7 复合物结构模型 (图 1d),区域 I 可能是 AREL1^{HECT}

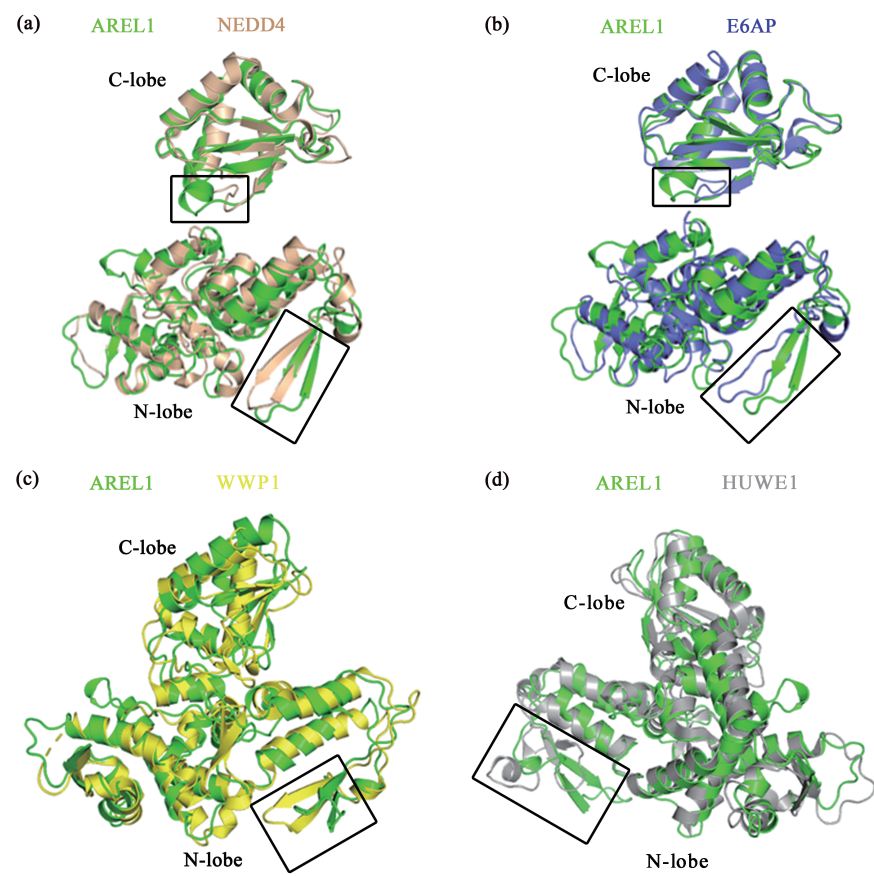


Fig. 2 Structural comparisons of AREL1^{HECT} against different HECT E3 ligases
Superimpositions of AREL1^{HECT} (green) and (a) NEDD4 (wheat); (b) E6AP (purple); (c) WWP1 (yellow); (d) HUWE1 (dark gray) . The N-lobe and C-lobe of AREL1^{HECT} were compared with the corresponding regions of (a) NEDD4 and (b) E6AP, respectively. The differences in the secondary structure elements are highlighted by rectangular boxes.

与UbcH7的相互作用界面，这暗示着N-lobe上存在构象差异的这段区域在HECT E3识别E2过程中起着重要作用。

2.3 AREL1^{HECT}在溶液中的聚集状态分析

经过凝胶过滤层析（SEC，Superdex™ 200 HR 10/300），AREL1^{HECT}蛋白在15.4 ml处被洗脱，其洗脱体积较大，约为6 ml（12~18 ml，图3a）。SDS-PAGE对洗脱峰进行分析，结果显示洗脱峰的主要组分是AREL1^{HECT}（图3b），这说明洗脱液中的AREL1^{HECT}蛋白很可能是以多种聚集状态存在的。AREL1^{HECT}单体的理论分子质量为44.9 ku，其在Superdex 200上的理论出峰位置为14~16 ml，所以图3a洗脱峰的主要组分是AREL1^{HECT}单体，溶液中很可能还存在AREL1^{HECT}的二聚体或其他寡聚体。

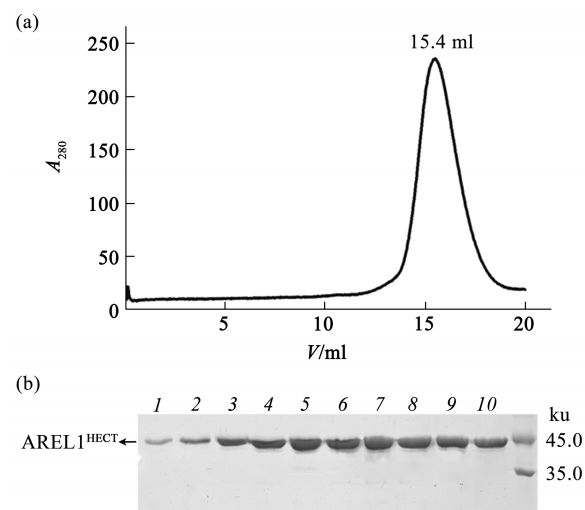


Fig. 3 Analysis of human AREL1^{HECT} by SEC
(a) The AREL1^{HECT} was analyzed by SEC (Superdex™ 200 HR 10/300), and the elution volume was 15.4 ml. (b) The elution of SEC was analyzed by SDS-PAGE.

为了进一步分析 AREL1^{HECT} 在溶液中的真实聚集状态, 我们进行了 SAXS 实验. SAXS 实验得到的散射信号数据与 AREL1^{HECT} 的单体结构模型 (C 链) 拟合得出的 χ^2 值为 10.75 (图 4a), 与 AREL1^{HECT} 二聚体结构模型 (由 B 链和 C 链组成) 拟合得出 χ^2 值为 3.58 (图 4b), 与 AREL1^{HECT} 三聚体结构模型 (本文解析的晶体结构) 拟合得出的 χ^2 值为 20.35 (图 4c). 比较以上 3 个 χ^2 值, AREL1^{HECT} 二聚体结构模型拟合后的 χ^2 最小, 即 AREL1^{HECT} 在溶液中以二聚体为主, 但这与 SEC 实

验结果不符. 因此, 我们进一步通过多种晶体结构模型 (包括 3 种单体、多种二聚体和三聚体) 与小角散射数据拟合得出的 χ^2 值为 2.88, χ^2 值变小, 这表明含有多种聚集状态的混合形式与小角散射数据拟合得更好, 在溶液中对应的蛋白质聚集状态包括 51.6% 的单体 (C 链) 和 48.4% 的二聚体 (A 链和 B 链; A 链和 C 链) (图 4d). 以上结果说明 AREL1^{HECT} 蛋白在溶液中存在多种聚集状态, 并且以单体为主, 另外还有至少两种二聚体存在, 这一结论与 SEC 实验结果一致.

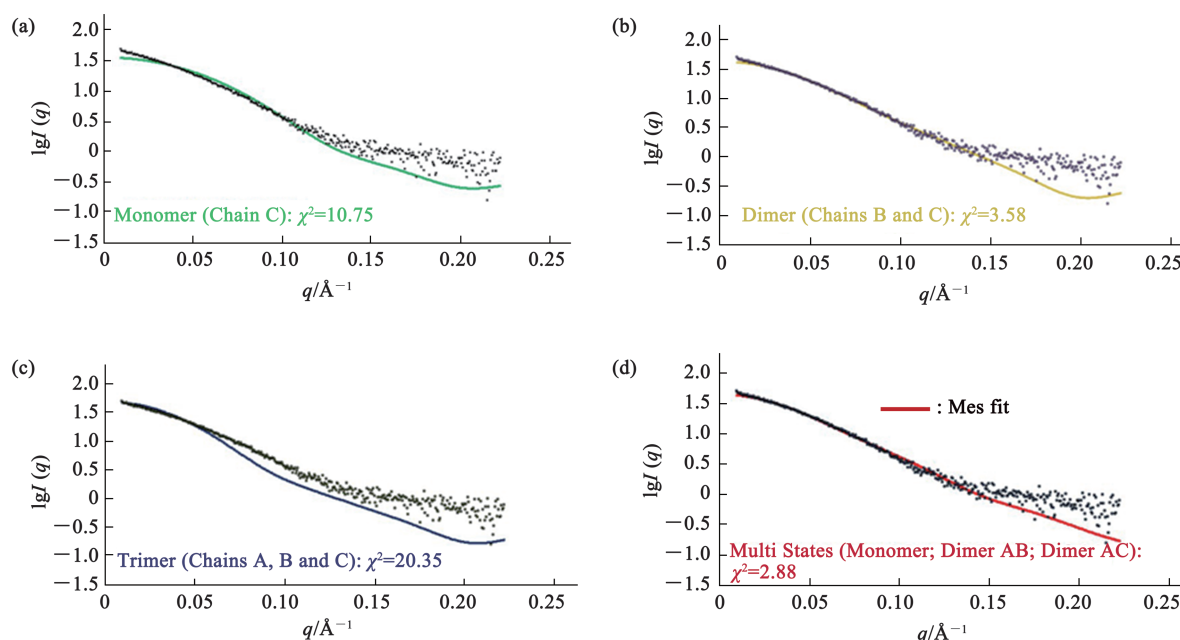


Fig. 4 The experimental and theoretical SAXS scattering curves of AREL1^{HECT}

The theoretical scattering curves of (a) AREL1^{HECT} monomer (green, chain C extracted from solved structure), (b) AREL1^{HECT} dimer (yellow, chain B and chain C extracted from solved structure), (c) AREL1^{HECT} trimer (dark blue, AREL1^{HECT} structure) and (d) the assembly from MES fit (red) [17] are shown. The MES approach using the above three models improves the fit ($\chi^2 = 2.88$) obviously. In the optimized mixture, the proportion of the monomer and dimers (including AB dimer and AC dimer) are 51.6% and 48.4%, respectively. Experimental data are represented in black dots at 2 g/L protein concentration at pH 6.0.

为了确定 AREL1^{HECT} 在溶液中是否会发生二聚化, 我们将 SAXS 数据进行了 3D 建模. AREL1^{HECT} 蛋白的 $P(r)$ 函数图象不是经典的曲线且拖尾严重 (图 5a), 表明 AREL1^{HECT} 在溶液中存在多种聚集状态. 于是, 我们通过 DAMMIN 程序进行三维重构, 得到从头计算模型 (*ab initio* model), 并将此模型与 SAXS 数据在 FoXS 网站拟合, χ^2 值为

1.21 (图 5b), 数值很小, 表明 SAXS 数据与从头计算模型拟合得很好, 模型可信, 能够反映 AREL1^{HECT} 在溶液中的真实状态. 将从头计算模型与 AREL1^{HECT} 二聚体结构进行叠加, 二者可以很好地吻合 (图 5c), 这表明 AREL1^{HECT} 在溶液中会发生二聚化.

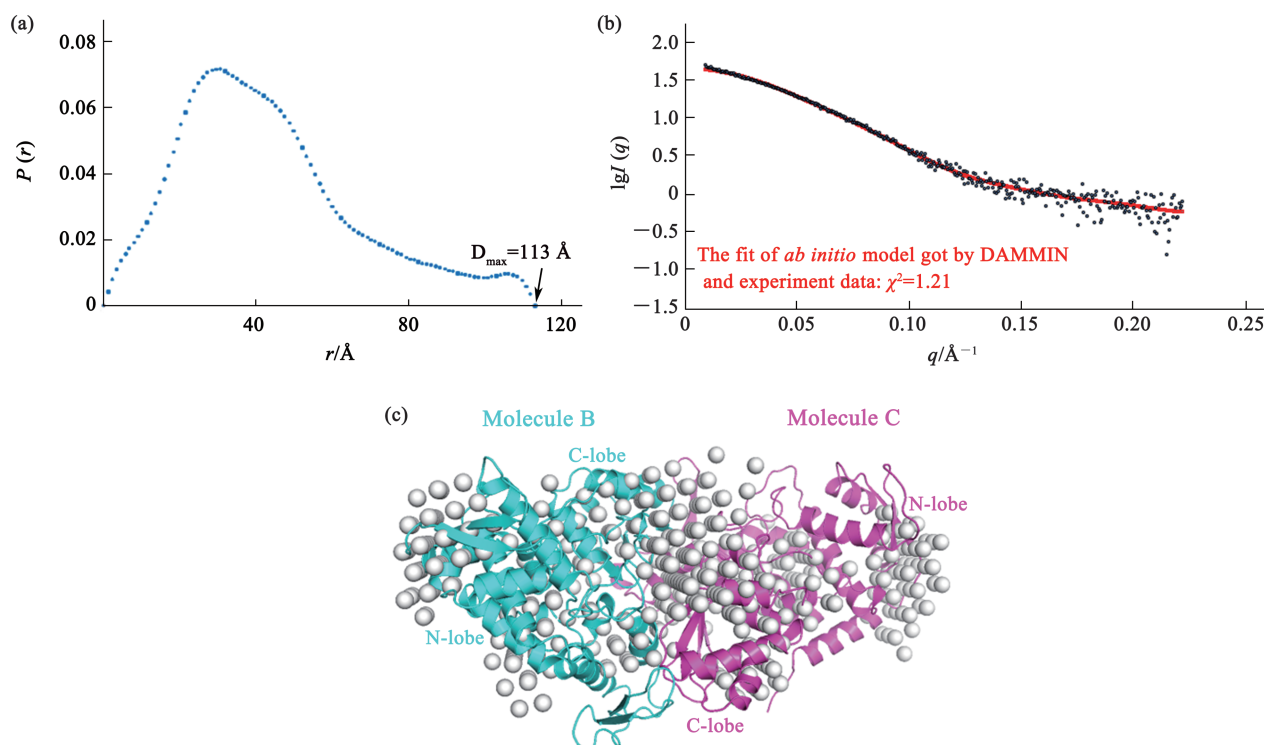


Fig. 5 SAXS analysis of the AREL1^{HECT} structure in solution

(a) Pair distance distribution $P(r)$ functions for AREL1^{HECT}. (b) The fit of the experimental scattering profile with the low-resolution *ab initio* model of AREL1^{HECT} from DAMMIN. (c) Superposition of low-resolution *ab initio* model and rigid body model of AREL1^{HECT}. The *ab initio* model is shown as silvery spheres representation. Two molecules (B and C) of AREL1^{HECT} in the rigid body model are colored as in Figure 1b.

3 讨 论

本文研究的 AREL1 蛋白是一种重要的泛素连接酶, 它能够泛素化线粒体内的促凋亡蛋白并通过蛋白酶体将其降解, 从而抑制细胞凋亡^[12]. 一些散发性和遗传性人类疾病的发生都与 E3 密切相关, 如癌症、心脑血管疾病和神经系统紊乱^[2]. 细胞中很多重要的蛋白质都是 E3 的底物^[18]. 因此, 解析 E3 的三维结构有利于揭示其与底物蛋白质之间的相互作用机制, 这将为药物靶点的发现和新药开发带来新的机会.

2019 年 12 月末, 新加坡国立大学的一个研究团队报道了 2.4 Å 分辨率的 AREL1 的 HECT 结构域晶体结构, 他们通过体外甲基化实验使蛋白质样品均一性提高, 进而解析了其结构^[19]. 本文解析的 AREL1^{HECT} 晶体结构是没有经过任何体外修饰的, 因此, 其理化性质与人体细胞内天然状态的 AREL1 蛋白更接近, 这是首次报道接近天然状态的 AREL1 晶体结构. 由于 AREL1^{HECT} 蛋白没有经过

体外的甲基化修饰, 所以本文解析的 AREL1^{HECT} 结构只有 3.2 Å 的分辨率. 由此可见, 蛋白质的高度均一性是晶体生长和高分辨率结构解析的关键因素.

SEC 和 SAXS 的结果表明 AREL1^{HECT} 在溶液中存在多种聚集体, SAXS 的 3D 模型进一步表明 AREL1^{HECT} 在溶液中会发生二聚化. 除了 AREL1, HECT 家族的其他 E3 也会发生二聚化, 如 E6AP、HERC6、HUWE1 等. E6AP 和 HERC6 都能够以结构域交换 (domain-swapped) 的方式二聚化, 与它们的 HECT 结构域单体形式相比, C-lobe 的结构都发生了重排^[20]. HUWE1 通过分子间的氢键相互作用和疏水作用形成二聚体, 当它的活化片段 (activation segment) 与二聚化区域 (dimerization region) 形成分子内相互作用时, HUWE1 由二聚体变成单体; 当活化片段与细胞内的活化因子或底物相互作用时, HUWE1 由单体变成二聚体^[9]. 这说明 HECT E3 普遍会发生二聚化, 只是它们形成二聚体的方式不同. E6AP、HERC6

和HUWE1的二聚化从侧面证明了AREL1^{HECT}二聚体的存在。

HECT E3的二聚化或其他寡聚化可能与它们的体外活性密切相关。具有泛素连接酶活性的E6AP是寡聚体,尤其是当E6AP为三聚体时,其体外酶活最高^[21]。然而,当HUWE1由单体变成二聚体时,其泛素连接酶活性被抑制;由二聚体变成单体时,其酶活增强^[9]。E6AP和HUWE1的寡聚化对酶活的影响不同,表明HECT E3的寡聚化对酶活的影响是一个有争议的问题。AREL1的HECT结构域在体外能够将SMAC^[11, 19]和HtrA2^[11]多泛素化,它的二聚化是否会影响其泛素连接酶活性,这是一个非常值得讨论的问题。另外, HUWE1能够通过自身的“开关”控制其聚集状态和酶活, AREL1蛋白内部是否也存在类似的“开关”来控制其催化活性,这还需更进一步的研究。

关于AREL1蛋白,仍有很多未知值得我们更加深入的探索,例如:AREL1是如何特异性地指导泛素分子形成K33连接的多泛素链的;AREL1是如何特异性识别底物蛋白质的;不同的HECT E3与E2之间的识别模式是否相同。这些问题都需要通过解析AREL1与泛素、E2、底物复合物的结构来回答,而AREL1^{HECT}结构的解析为上述复合物的结构研究奠定了坚实基础。

参 考 文 献

- [1] Sluimer J, Distel B. Regulating the human HECT E3 ligases. *Cell Mol Life Sci*, 2018, **75**(17): 3121-3141
- [2] Fajner V, Maspero E, Polo S. Targeting HECT-type E3 ligases - insights from catalysis, regulation and inhibitors. *FEBS Lett*, 2017, **591**(17): 2636-2647
- [3] Li Z, Wang Y, Xu M, *et al.* Crystal structures of the UBX domain of human UBXD7 and its complex with p97 ATPase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, **486**(1): 94-100
- [4] Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM. Protein ubiquitination involving an E1 - E2 - E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature*, 1995, **373**: 81-83
- [5] Willis M S, Townley-Tilson W H, Kang E Y, *et al.* Sent to destroy: the ubiquitin proteasome system regulates cell signaling and protein quality control in cardiovascular development and disease. *Circ Res*, 2010, **106**(3): 463-478
- [6] Morreale F E, Walden H. Types of ubiquitin ligases. *Cell*, 2016, **165**(1): 248-248
- [7] Berndsen C E, Wolberger C. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, **21**(4): 301-307
- [8] Zheng N, Shabek N. Ubiquitin ligases: structure, function, and regulation. *Annu Rev Biochem*, 2017, **86**(1): 129-157
- [9] Sander B, Xu W, Eilers M, *et al.* A conformational switch regulates the ubiquitin ligase HUWE1. *eLIFE*, 2017, **6**: 1-32
- [10] Verdecia M A, Joazeiro C, Wells N J, *et al.* Conformational flexibility underlies ubiquitin ligation mediated by the WWP1 HECT domain E3 ligase. *Mol Cell*, 2003, **11**(1): 249-259
- [11] Martin A M, Paul R E, Kirby N S, *et al.* Assembly and specific recognition of k29- and k33-linked polyubiquitin. *Mol Cell*, 2015, **58**(1): 95-109
- [12] Kim J B, Kim S Y, Kim B M, *et al.* Identification of a novel anti-apoptotic E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates antagonists of inhibitor of apoptosis proteins SMAC, HtrA2, and ARTS. *J Biol Chem*, 2013, **288**(17): 12014-12021
- [13] Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzym*, 1997, **276**: 307-326
- [14] Emsley P, Lohkamp B, Scott W G, *et al.* Features and development of coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2010, **66**: 486-501
- [15] Hu Y S, Feng F, Liu Y F. Structural and functional characterization of *Acinetobacter baumannii* nucleoside diphosphate kinase. *Prog Biochem Biophys*, 2015, **42**(3): 260-267
- [16] Li H, Yang K, Wang W, *et al.* Crystal and solution structures of human protein-disulfide isomerase-like protein of the testis (PDILT) provide insight into its chaperone activity. *J Biol Chem*, 2018, **293**(4): 1192-1202
- [17] Pelikan M, Hura G L, Hammel M. Structure and flexibility within proteins as identified through small angle X-ray scattering. *Gen Physiol Biophys*, 2009, **28**(2): 174-189
- [18] Li X, Elmira E, Rohondia S, *et al.* A patent review of the ubiquitin ligase system: 2015-2018. *Expert Opin Ther Pat*, 2018, **28**(12): 919-937
- [19] Singh S, Ng J, Nayak D, *et al.* Structural insights into a HECT-type E3 ligase AREL1 and its ubiquitination activities *in vitro*. *J Biol Chem*, 2019, **294**(52): 19934-19949
- [20] Ries L K, Liess A K L, Feiler C G, *et al.* Crystal structure of the catalytic C-lobe of the HECT-type ubiquitin ligase E6AP. *Protein Sci*, 2020, **1**-5
- [21] Ronchi V P, Klein J M, Edwards D J, *et al.* The active form of E6-associated protein (E6AP)/UBE3A ubiquitin ligase is an oligomer. *J Biol Chem*, 2014, **289**(2): 1033-1048

Crystal Structure of The Catalytic Domain of Human Ubiquitin Ligase AREL1*

LI Zhi-Hui**, SHANG Guo-Hui**, TANG Chen-Jun, TIAN Zi-Zi, WU Wei, CHEN Zhong-Zhou***

(Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, College of Biological Sciences,
China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Ubiquitination is an important post-translational modification that controls nearly every facet of a cell's life and death. Only ubiquitin ligases E3 can specifically recognize substrates during ubiquitination, so E3 plays a pivotal role in ubiquitination and degradation of substrate proteins. Human apoptosis-resistant E3 ubiquitin protein Ligase 1 (AREL1) belongs to the Homology to E6AP C-Terminus(HECT) ubiquitin ligase family, and it inhibits apoptosis through ubiquitinating mitochondrial proapoptotic proteins such as SMAC, HtrA2, and ARTS, which are degraded by the 26 S proteasome. Here, the crystal structure of the HECT domain of AREL1 (AREL1^{HECT}) at 3.2 Å resolution is reported, and structural comparisons of AREL1^{HECT} against different HECT E3 ligases are conducted. Size Exclusion Chromatography (SEC) and Small Angle X-ray Scattering (SAXS) indicate that there are diverse oligomeric states of AREL1^{HECT} in solution, and the SAXS 3D model further suggests that AREL1^{HECT} can dimerize in solution. These findings offer a structural basis for studying the complex of AREL1^{HECT} and ubiquitin, and provide insights into molecular mechanisms of substrate ubiquitination by AREL1.

Key words ubiquitination, ubiquitin ligase, AREL1, HECT domain, crystal structure, dimerization

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0008

* This work was supported by grants from The National Key Research and Development Program of China (2018YFE0113100) and The National Natural Science Foundation of China (31872713).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-10-62734078, E-mail: chenzhongzhou@cau.edu.cn

Received: January 7, 2020 Accepted: March 20, 2020