



孙毅博士, 浙江大学求是讲席教授, 美国科学促进会(AAAS)会士, 曾任美国密歇根大学Lawrence-Krause冠名终身教授和放射与肿瘤生物学部主任, 浙江大学转化医学研究院创始院长。长期从事探究蛋白质泛素化系统失调在肿瘤发生发展中的分子机制, 鉴定SAG-Cullin-RING E3连接酶作为有效的抗肿瘤靶点和靶向药物的研发等工作, 已获得数类抗SAG-拟素化通路的小分子抑制剂和专利。撰写论文260余篇, 多篇以通讯作者身份发表在*Dev Cell*、*eLife*、*JCB*、*JCI*、*Mol Cell*、*Nat Commun*、*PNAS*、*Science Adv*等国际权威杂志上, 累计引用>32 200次, H指数为73, i10-index: 186, 多年入选爱思唯尔中国高被引学者。相关研究获得多项国内外科研基金资助。任科技部重点专项、基金委重点项目首席科学家, 兼任多个国际学术期刊的编委和80多种国际学术期刊的审稿专家。

<http://itm.zju.edu.cn/CN/lab.asp?t1=125&t2=180&t3=285>

## SAG E3泛素连接酶: 生物学功能、作用机理及其相关的人类疾病

俞卿<sup>1</sup> 孙毅<sup>2, 3, 4, 5\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院大学附属肿瘤医院(浙江省肿瘤医院)甲状腺外科, 杭州 310022;

<sup>2</sup>浙江大学医学院附属第二医院肿瘤研究所, 杭州 310029; <sup>3</sup>浙江大学转化医学研究院, 杭州 310029;

<sup>4</sup>浙江大学癌症研究院, 杭州 310058; <sup>5</sup>浙江大学滨江研究院生命与大健康中心, 杭州 310053)

**摘要** 凋亡敏感基因蛋白(Sensitive to Apoptosis Gene, SAG)是一种结构上进化保守的锌环指蛋白(zinc RING finger protein), 1997年由该文作者的实验室首次克隆, 并于1999年发表。大量研究先后证实SAG不仅是一个具有抗氧化能力、可抑制金属离子或ROS诱导的细胞凋亡的蛋白, 同时还是具有促癌作用的重要E3泛素连接酶, 也是一个极富潜力的新型抗肿瘤靶点。SAG是泛素化和拟素化修饰的双重E3连接酶, 通过介导Cullin-5蛋白的拟素化修饰参与形成CRL5或CRL1 E3泛素连接酶复合体, 介导多种抑癌底物蛋白的泛素化降解, 促进肿瘤细胞增生、存活、血管生成和肿瘤形成。此外, SAG还参与病毒的复制与合成, 并与多种人类疾病相关。目前, 靶向SAG的抗肿瘤小分子抑制剂正在研发中。该文回顾多年来在SAG的结构和功能方面的研究进展, 综述SAG的生物学功能, 重点阐述SAG促进肿瘤发生发展的功能和作用机理, 并探讨和展望SAG的基础研究方向和以SAG为靶点的新型抗肿瘤药物的研发策略。

**关键词** SAG; Cullin-5; E3泛素连接酶; 泛素化; 拟素化; 抗肿瘤

收稿日期: 2022-02-15 接受日期: 2022-03-07

国家重点研发计划(批准号: 2021YFA1101000、2016YFA0501800, 项目负责人: 孙毅)、国家自然科学基金(批准号: 82102749, 项目负责人: 俞卿)和浙江省自然科学基金(批准号: LD22H300003, 项目负责人: 孙毅)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0571-86971812, E-mail: yisun@zju.edu.cn

Received: February 15, 2022 Accepted: March 7, 2022

This work was supported by the National Key R&D Program of China (Grant No.2021YFA1101000 and 2016YFA0501800 to Sun Yi), the Natural Science Foundation of China (Grant No.82102749 to Yu Qing) and the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (Grant No.LD22H300003 to Sun Yi)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-86971812, E-mail: yisun@zju.edu.cn

# SAG E3 Ubiquitin Ligase: Biological Functions, Mechanism of Action and Associated Human Diseases

YU Qing<sup>1</sup>, SUN Yi<sup>2,3,4,5\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Thyroid Surgery, the Cancer Hospital of the University of Chinese Academy of Sciences (Zhejiang Cancer Hospital), Hangzhou 310022, China; <sup>2</sup>Cancer Institute of the Second Affiliated Hospital, Hangzhou 310029, China; <sup>3</sup>Institute of Translational Medicine, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310029, China; <sup>4</sup>Cancer Center, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; <sup>5</sup>Research Center for Life Science and Human Health, Binjiang Institute of Zhejiang University, Hangzhou 310053, China)

**Abstract** SAG (Sensitive to Apoptosis Gene) is an evolutionarily conserved RING finger protein, firstly cloned in 1997 in the author's laboratory and published in 1999. Numerous studies have demonstrated that SAG is not only an antioxidant protein that protects cells from apoptosis induced by metal ion or ROS, but also an important RING component of Cullin-RING ligases with oncogenic property, and being validated as an attractive anticancer target. SAG acts as an E3 ligase for both neddylation and ubiquitylation. Via neddylation Cullin-5, SAG activates CRL5, and then complexes with other components of CRL5 or CRL1 to promote ubiquitylation and degradation of many tumor suppressive substrates, leading to enhanced proliferation, survival, angiogenesis, and tumorigenesis. In addition, SAG is also involved in virus infection and associated with a few other human diseases. The drug discovery effort is currently under the way to identify small molecule inhibitors of SAG for anti-cancer applications. This review summarizes current knowledge and advancement in the field of SAG research, including its protein structure, biochemical activities, biological functions, especially in tumorigenesis, and mechanisms of action. Finally, the future perspectives in the basic research of SAG and SAG-targeting drug discovery efforts are proposed.

**Keywords** SAG; Cullin-5; E3 ubiquitin ligase; ubiquitylation; neddylation; anti-cancer

凋亡敏感基因蛋白(Sensitive to Apoptosis Gene, SAG)又被称作RING-box蛋白2(RING-box protein 2, RBX2)、Cullin调节蛋白-2(regular of cullins-2, ROC2)、环指蛋白-7(RING finger protein-7, RNF7)或CKII $\beta$ -结合蛋白1(CKII beta-binding protein 1, CKBBP1)。1997年, 笔者的实验室在寻找参与金属螯合剂诱导的细胞凋亡的相关基因的过程中<sup>[1]</sup>, 首次克隆了SAG, 并于1999年首次报道SAG是一个具有抗氧化能力且可抑制金属离子或ROS诱导的细胞凋亡的分子<sup>[2]</sup>。过去25年, 全球许多独立的研究者们已先后证实SAG不仅抑制细胞凋亡, 更是具有促癌作用的重要E3泛素连接酶, 是一个极富潜力的新型抗肿瘤靶点。SAG的功能也不仅限于参与细胞氧化应激和细胞凋亡途径, 还通过诱导多种抑癌蛋白的泛素化降解、Cullin-5蛋白的拟素化修饰, 促进肿瘤细胞增生、存活、血管生成和肿瘤形成, 甚至病毒的复制与合成, 并与多种人类疾病相关。针对SAG的高选择性小分子抑制剂也正在研发中。本

文将回顾多年来在SAG的结构和功能方面的研究进展, 综述SAG的生物学功能, 特别是其促进肿瘤发生发展的功能和作用机理, 最后探讨和展望SAG的基础研究和以SAG为靶点的新型抗肿瘤药物的研发。

## 1 SAG的结构与功能

### 1.1 SAG基因和蛋白的组成及蛋白晶体结构

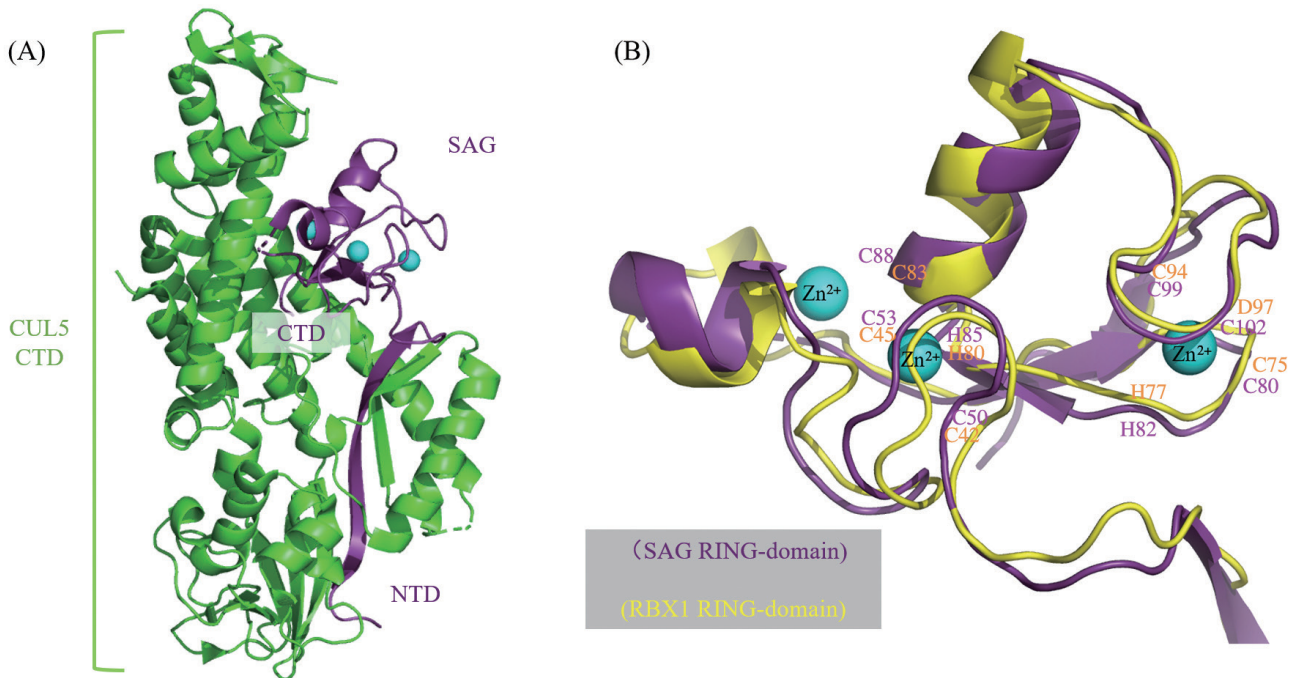
SAG属于一个进化保守的基因家族, 人类编码SAG的基因(*RNF7*)与小鼠编码Sag的基因(*Rnf7*)有96%的序列相似性<sup>[2]</sup>, 与酵母的有55%相同<sup>[3-4]</sup>。SAG在人类组织中广泛表达, 尤其在心、骨骼肌和睾丸这三种高耗氧量器官中高表达<sup>[2]</sup>。人类基因SAG位于染色体3q22-24, 有三种剪接体变异和两种家族假基因<sup>[5]</sup>。

人类SAG和小鼠Sag编码的蛋白均含有113个氨基酸, 其中12个为半胱氨酸残基(占总氨基酸数的10.6%), 总分子量约12.7 kDa<sup>[2]</sup>。SAG在细胞质和细

胞核中均有分布。SAG属于RING-box蛋白家族,在SAG的碳末端有一个典型的RING结构域,包含一段C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>C<sub>3</sub>保守基序和两个锌原子<sup>[6]</sup>。RING-box蛋白家族的另一个成员RING-box蛋白-1(RING-box protein 1, RBX1)也含有相似的保守基序(C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D)(图1)。事实上,SAG和RBX1在从酵母到人类的许多物种中都具有进化上的保守性<sup>[4]</sup>。有意思的是,酵母只编码一种RING-box蛋白Hrt1,在酵母中敲除Hrt1所引起的致死表型可被人的SAG或RBX1逆转<sup>[7]</sup>,提示在酵母中SAG和RBX1的功能是可以互相替代的。尽管如此,人类或小鼠编码的SAG和RBX1在很多方面表现出不可替代性<sup>[8-9]</sup>,其背后的机制仍待继续深入的探讨。

2007年,MIYAMOTO等<sup>[10]</sup>在RCSB Protein Data Bank蛋白结构数据库上首次发表了由核磁共振谱解析的SAG的RING结构域的溶液结构(PDB数据库编号:2ECL)。2009年,SCHULMAN团队<sup>[11]</sup>通过结构生物学研究发现,SAG和RBX1可分别与特定的E2

拟素耦连酶结合,即SAG结合UBE2F,而RBX1结合UBE2M,从而选择性介导不同Cullin成员的拟素化修饰(neddylaton)。此外,RBX2的第52位异亮氨酸(Ile52)被认为是SAG结合E2拟素耦连酶的保守区域,与其拟素化酶活性有关<sup>[11]</sup>。2020年,LUMPKIN等<sup>[12]</sup>通过冷冻电镜技术分别解析了SAG-CUL5(PDB数据库编号:6V9I)<sup>[13]</sup>和CKB-ASB9-ELOB/C(PDB数据库编号:6V9H)<sup>[14]</sup>复合体的结构,并分析了SAG-CUL5-ASB9-ELOB/C多元复合体各个结构之间的相互作用模式。这也是有报道的第一个完整的SAG-CUL5高分辨率结构。此外,SCHULMAN团队<sup>[15]</sup>最新一项研究通过解析SAG-CUL5与另一免疫相关E3泛素连接酶AIRH2形成的SAG-CUL5-AIRH2复合体结构(PDB数据库编号:7ONI)<sup>[16]</sup>,提出了拟素通过别构方式介导两种不同E3相互作用的新机制<sup>[11]</sup>。上述研究从结构生物学角度为揭开SAG与复合体中其他蛋白的相互作用机制及相关抑制剂的研发提供了宝贵的信息。



A: SAG结合CUL5碳末端结构域(C-terminal domain, CTD)的冷冻电镜结构,青色小球代表锌离子(PDB: 6V9I<sup>[13]</sup>)。B: SAG的RING结构域(紫色)和RBX1的RING结构域(黄色)比对图(PDB: 6V9I<sup>[13]</sup>, 1LDJ<sup>[14]</sup>),其中两者的保守氨基酸分别由对应颜色标出,PyMOL软件绘制(The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.6.0a0 Open-Source, Schrödinger, LLC)。

A: the cryo-EM structure of SAG binding to the CTD (C-terminal domain) of CUL5, with cyan balls representing zinc ions (PDB ID: 6V9I<sup>[13]</sup>). B: the structural alignment of the RING domain of RBX1 (in purple) and SAG (in yellow), with key residues labeled in purple or yellow (PDB ID: 6V9I<sup>[13]</sup> and 1LDJ<sup>[14]</sup>). Cartoons were made by PyMol software (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.6.0a0 Open-Source, Schrödinger, LLC).

图1 SAG的晶体结构

Fig.1 The crystal structure of SAG

## 1.2 SAG作为E3泛素连接酶的功能

泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)是维持真核细胞内成千上万种蛋白质稳态的重要系统。UPS系统包含两个主要环节,即底物蛋白的泛素化修饰和底物蛋白的降解(图2A)。蛋白质的泛素化是由三个酶级联催化的反应: E1泛素激活酶在ATP作用下将一个泛素分子传递给E2泛素耦连酶,后者在E3泛素连接酶的催化下,将泛素分子传递到底物蛋白的特定赖氨酸残基上,完成底物蛋白的泛素化。上述E1-E2-E3介导的反应不断重复,可在底物蛋白上形成多聚泛素长链。当多聚泛素长链由泛素的第48或第11位赖氨酸(K48或K11)相连时,底物蛋白可被26S蛋白酶体识别和降解<sup>[17-19]</sup>(图2A)。

目前普遍认为人类基因组编码2种E1,约40种E2,和超过600种E3<sup>[20]</sup>(最新的生物信息学分析认为更准确的数字可能是8种E1、41种E2和634种E3<sup>[21]</sup>)。E3泛素连接酶负责识别和招募特定底物,决定了泛素化修饰的底物特异性<sup>[20]</sup>。E3泛素连接酶根据其E2结合域的结构特点和传递泛素的方式不同,可分为三类: 包含RING结构域的E3、包含HECT结构域

的E3和包含RBR结构域的E3<sup>[22]</sup>。

在所有E3连接酶中,Cullin-RING泛素连接酶(Cullin-RING ligases, CRLs)是最大的家族。CRLs介导了许多关键蛋白的瞬时泛素化降解,因此其在多种重要的生物学进程,包括细胞周期进程、信号转导、基因转录、胚胎发育、基因组完整性调控和肿瘤发生发展等<sup>[19]</sup>中扮演重要角色。CRLs是一个多元复合物,其组件通常包括<sup>[23-25]</sup>: (1) 包含多种蛋白家族的配体蛋白; (2) 包含8个成员的Cullin骨架蛋白(Cullin-1、-2、-3、-4A、-4B、-5、-7和-9,或简称为CUL1、2、3、4A、4B、5、7和9); (3) 包含多种家族成员的底物识别蛋白; (4) 包含2个成员的RING-box蛋白(RBX1和SAG)。上述组件形成的CRLs复合体可依据其Cullin骨架蛋白,简称为CRL1、CRL2、CRL3、CRL4A/B或CRL5等。CRLs的泛素连接酶活性依赖于Cullin蛋白的拟素化修饰。拟素NEDD8是一种类泛素蛋白,有约60%的氨基酸序列与泛素相同<sup>[26]</sup>。拟素化的过程也与泛素化相似: 在ATP作用下E1拟素激活酶(UBA3/APPBP1)将一个拟素分子传递给E2拟素耦连酶(UBE2M或UBE2F),后者再将拟素传递到Cullin蛋白碳末端的一个特定赖氨酸残基上,完成Cullin

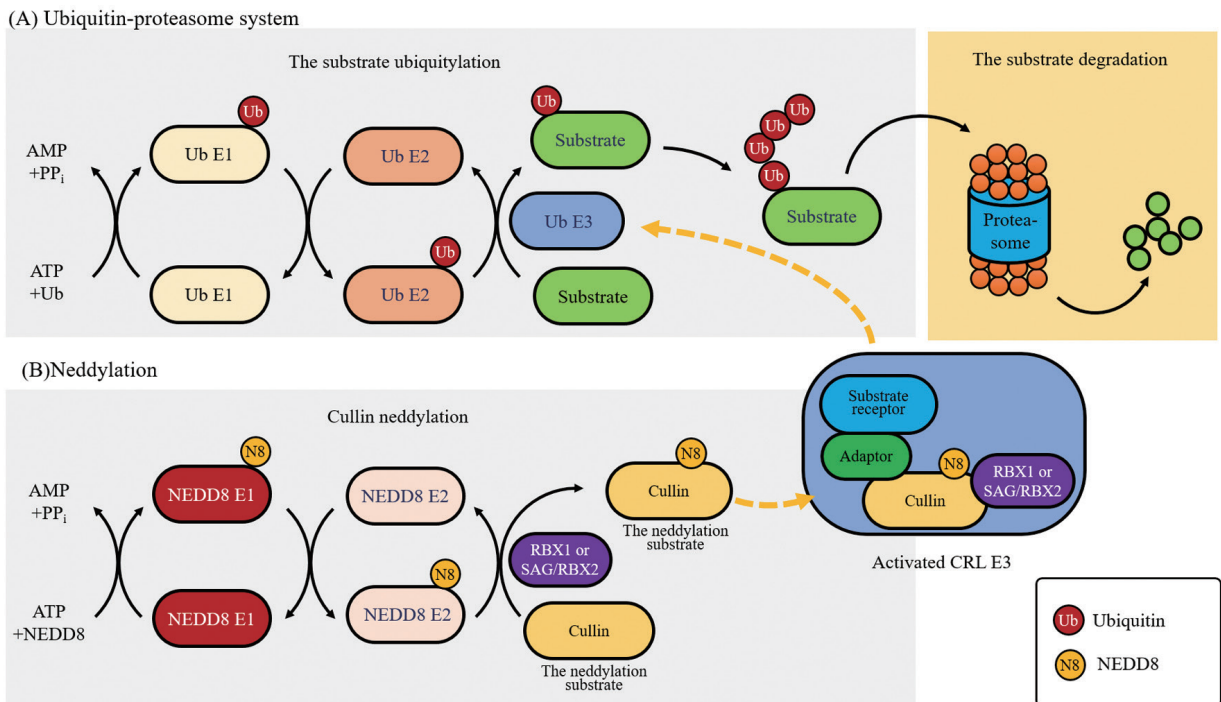


图2 泛素-蛋白酶体系统(A)和拟素化修饰(B)

Fig.2 Ubiquitin-proteasome system (A) and neddylation modification (B)

表1 SAG E3连接酶的已知底物蛋白

Table 1 The reported substrates of SAG E3 ubiquitin ligase

底物蛋白 Substrate	E3泛素连接酶复合体 E3 ubiquitin ligase complex	底物蛋白主要功能 Major functions of the substrate	参考文献 Reference
Pro-caspase-3	SAG-SCF <sup>β-TrCP</sup>	A Caspase-3 precursor. The activated Caspase-3 cleaves variety of important effectors and initiates cell apoptosis	[29]
NOXA	SAG-CUL5	A BH3-only member of the BCL-2 protein family. NOXA binds to anti-apoptosis protein MCL-1, promotes MCL-1 degradation and initiates cell apoptosis. NOXA plays vital role in cell apoptosis	[30-31]
IκBα	SAG-SCF <sup>β-TrCP</sup>	An important member of the IκB family and the major inhibitor of NFκB pathway. IκBα regulates the activation and transcription of NFκB and plays an important role in both innate and adaptive immunity in all eukaryotes	[32]
p27	SAG-SCF <sup>β-TrCP</sup>	The natural inhibitor of CDK (cycle-dependent protein kinase). p27 mediates the cell cycle process by inhibiting the activity of the CDK or its complex	[33]
NF1	SAG-SCF <sup>FBXW7</sup>	A protein encoded by the gene <i>NF1</i> (neurofibromin 1). NF1 inhibits tumor generation by down-regulating RAS signal pathway, while its mutation is related to a variety of tumors such as neurofibromatosis, type I	[9]
DEPTOR	SAG-SCF <sup>β-TrCP</sup>	A natural inhibitor of mTORC1/2 (mechanistic target of rapamycin complex 1/2). The mTOR signaling pathway is widely involved in cellular metabolism, apoptosis and autophagy	[34]
c-Jun	SAG-SCF <sup>FBXW7</sup>	A family member of AP-1 (activator protein-1). C-Jun can be induced by a variety of stimulation such as growth signaling and UV and is involved in the transcriptional activation of various important effectors, regulating cell proliferation, cell cycle, apoptosis, and tumorigenesis	[35]
HIF-1α	SAG-CUL5	HIF-1 is a nuclear protein with important transcriptional activity, participating in hypoxia adaptation, inflammatory response and tumorigenesis	[36]
Erbin	SAG-SCF <sup>β-TrCP</sup>	A member of the PDZ protein family. Erbin modulates the function and localization of the tyrosine kinase receptor 2 (Erb-B2 or HER2), and blocks the Ras-RAF interaction	[37]
NRF2	SAG-SCF <sup>β-TrCP</sup>	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, a key transcription factor of cellular oxidative stress-related proteins. NRF2 plays an important role in the mediation of antioxidant response	[37]
β-TrCP1	SAG-CUL5	A member of the F-Box protein family and a component of the SCF E3 ubiquitin ligase. β-TrCP1 recognizes and ubiquitylates a variety of important substrate proteins, regulating multiple important signaling pathways and biological processes including NFκB signaling pathways, Wnt signaling pathways, cell cycle and etc.	[38]

蛋白的拟素化(图2B)<sup>[26]</sup>。两种RING-box蛋白与Cullin蛋白或E2拟素耦连酶的结合存在选择性: 目前已知RBX1特异性结合CUL1、CUL2、CUL3、CUL4A、CUL4B、CUL7或CUL9, 而SAG仅结合CUL1或CUL5; 在拟素化修饰中, RBX1结合E2拟素耦连酶UBE2M, 而SAG结合UBE2F<sup>[26]</sup>。细胞存在这种特定组合方式的原因尚不清楚, 但可以看到, SAG-CUL5复合体有别于其他CRLs, 可能具有更高的底物选择性<sup>[27-28]</sup>。

目前已知的由SAG参与调控的底物包括: (1) 凋亡相关蛋白如Caspase-3的前体Pro-caspase-3<sup>[29]</sup>和促凋亡蛋白NOXA<sup>[30-31]</sup>; (2) 核转录因子NFκB的天然抑制因子IκBα<sup>[32]</sup>; (3) 细胞周期相关蛋白p27<sup>[33]</sup>; (4) 抑

癌蛋白如NF1<sup>[9]</sup>和DEPTOR<sup>[34]</sup>; (5) 促癌蛋白c-Jun<sup>[35]</sup>; (6) 氧化应激相关蛋白HIF-1α<sup>[36]</sup>; (7) RAS-RAF抑制蛋白Erbin<sup>[37]</sup>; (8) 抗氧化转录因子NRF2<sup>[37]</sup>; (9) 同是E3泛素连接酶的β-TrCP1<sup>[38]</sup>等(表1)。

### 1.3 SAG的其他功能

1.3.1 抗氧化、抗凋亡 笔者实验室在筛选参与金属螯合剂诱导的细胞凋亡的相关基因的过程中首次克隆了SAG, 并发现SAG具有很强的抗氧化和抗凋亡特性<sup>[1]</sup>。后续研究相继发现SAG可保护肿瘤细胞、神经细胞、心肌细胞对抗各种因素诱导的细胞凋亡, 这些因素包括一氧化氮、热休克、神经毒性物质、1-甲基-4-苯基吡啶、UV-辐射、缺血介导的氧化应激

及电离辐射等<sup>[8]</sup>。SAG的敲降可抑制肿瘤细胞生长, 促进细胞凋亡。上述作用机制涉及SAG本身的清除活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)的能力, 以及作为E3泛素连接酶对Pro-caspase-3、I $\kappa$ B $\alpha$ 和NOXA等底物的降解<sup>[8]</sup>。

**1.3.2 抗辐射, 促DNA损伤修复** SAG介导细胞的抗辐射作用。首先, SAG具有清除ROS的能力, 而ROS是辐射杀伤细胞的主要产物之一<sup>[8,39]</sup>。其次, SAG介导I $\kappa$ B $\alpha$ 的泛素化和降解, 从而激活NF $\kappa$ B<sup>[32]</sup>, 后者被认为是介导细胞辐射敏感性的主要转录因子<sup>[40]</sup>。通过基因敲除和siRNA沉默技术敲除或敲降小鼠胚胎干细胞的*Sag*, 可显著上调细胞内ROS水平、抑制NF $\kappa$ B活性, 提升细胞对电离辐射的敏感性<sup>[32]</sup>。此外, MLN4924(商品名: Pevonedistat), 一种Cullin拟素化的通用抑制剂(可抑制SAG-CUL5的拟素化)<sup>[41]</sup>, 可增强胰腺癌、肺癌和乳腺癌等细胞的电离辐射敏感性, 而对正常细胞影响很小<sup>[42-43]</sup>。最后, COOPER等<sup>[44]</sup>通过基于双分子荧光互补技术(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)的高通量筛选, 发现SAG是增殖细胞核抗原PCNA的相互作用蛋白之一, 参与DNA复制、修复和相关细胞进程。

**1.3.3 调节细胞免疫应答** SAG与细胞免疫应答密切相关。一方面, SAG-CRL1 <sup>$\beta$ -TrCP</sup>介导I $\kappa$ B $\alpha$ 的降解, 而后者是NF $\kappa$ B的经典抑制因子<sup>[32]</sup>, NF $\kappa$ B的激活和入核促进了炎性细胞因子TNF $\alpha$ 和IL-6的转录表达<sup>[45]</sup>。笔者团队发现在体外树突细胞中, SAG失活可引起I $\kappa$ B $\alpha$ 积累, 从而抑制NF $\kappa$ B活性, 降低树突细胞的炎症反应<sup>[46]</sup>。另一方面, 在感染过程中, SAG可通过泛素化和降解促凋亡蛋白Bax和SARM, 调节免疫趋化因子的水平, 从而维持巨噬细胞活力<sup>[47-48]</sup>。此外, SAG参与拟素化的调控, 而拟素化被认为可调节脂多糖介导的促炎细胞因子的产生<sup>[48-49]</sup>。

笔者团队还通过建立在骨髓系统中条件性敲除*Sag*的*Sag<sup>fl/fl</sup>LysM<sup>cre</sup>*小鼠模型, 发现*Sag<sup>-/-</sup>*中性粒细胞比*Sag<sup>-/-</sup>*巨噬细胞产生更多的炎性细胞因子, 提示*Sag*在巨噬细胞和中性粒细胞的激活过程中起到不同的作用<sup>[50]</sup>。此外, 利用T细胞中条件敲除*Sag*的*Sag<sup>fl/fl</sup>Lck<sup>cre</sup>*小鼠模型, 及拟素化抑制剂MLN4924, 笔者团队证实*Sag*介导的CRLs拟素化在T细胞介导的免疫反应中起关键作用<sup>[51]</sup>。*Sag<sup>-/-</sup>* T细胞在体内体外均呈现活性降低、增殖能力减弱和细胞因子分泌减

少状态, 这有可能降低移植物抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)的发生率; 应用MLN4924抑制SAG介导的CRLs拟素化可得到相似的结果。该研究还发现SAG介导的拟素化在T细胞中的作用与细胞因子抑制蛋白SOCS1与SOC3的积累相关, 这与早期研究发现的拟素化在树突细胞或巨噬细胞中主要介导NF $\kappa$ B通路的负向调控不同, 因此提出了SAG参与调节细胞免疫应答的新机制<sup>[51]</sup>。

**1.3.4 调节胚胎发育、血管形成和神经细胞发育**为深入了解SAG在体内的生理学功能, 笔者团队曾建立*Sag*全基因敲除小鼠模型, 发现*Sag*的敲除会导致胚胎在发育的第11.5~12.5天死亡, 证实*Sag*是小鼠胚胎发育所必需的<sup>[7]</sup>, 这一现象与*Sag*在果蝇和线虫中的情况不同<sup>[52-53]</sup>。详细的形态学研究发现, *Sag*的敲除会引起小鼠胚胎生长迟缓、细胞大规模凋亡和异常血管生成, 这些与SAG在体外细胞培养实验中促进细胞增殖并抑制细胞凋亡的现象一致<sup>[2,4,54]</sup>。机制研究发现, *Sag*之所以对胚胎血管生成起重要作用, 是因为*Sag*敲除会引起抑癌蛋白Nf1的积累, 而后者是Ras的天然抑制因子, 会抑制血管生成。而同时敲除*Sag*和*Nf1*可部分逆转*Sag<sup>-/-</sup>*胚胎中的血管生成缺陷<sup>[9]</sup>。笔者团队随后的工作发现在内皮细胞中条件性敲除*Sag*也会引起血管生成异常和胚胎死亡, 并诱导p27的积累, 从而抑制细胞迁移、增殖和微管形成<sup>[55]</sup>, 这一结果进一步证明*Sag*是胚胎血管形成所必需的因子。HINO等<sup>[56]</sup>通过建立*Sag*敲入/敲除小鼠模型, 同样发现*Sag*是胚胎后期小鼠胚胎存活所必需的, 且*Sag*和*Cul5*在小鼠胚胎和成年小鼠的大脑中存在广泛的共表达。

SAG在维持神经细胞形态和功能方面也有重要作用。COOPER等<sup>[57]</sup>发现SAG-CUL5-SOCS7介导DAB1的降解, 后者是Reelin信号通路的关键信号分子。FAIRCHILD等<sup>[58]</sup>发现SAG是视网膜维持正常形态和功能的必要元素。SAG可调节杆双极细胞、锥形光感受器和Muller细胞的最终细胞位置。而敲除SAG或底物识别亚基SOCS7会导致RELN/DAB1的持续激活, 从而导致杆双极细胞的位置异常<sup>[58]</sup>。最新的一项研究提示, SAG-CUL5 E3泛素连接酶调控ARL4C的蛋白稳定性, 影响海马体神经细胞的形态发生<sup>[59]</sup>。SAG敲除和CUL5敲降均可引起海马神经元的形态发育异常, 表明SAG-CUL5是海马神经元细胞发育的关键调节因子<sup>[59]</sup>。另外, UEMATSU

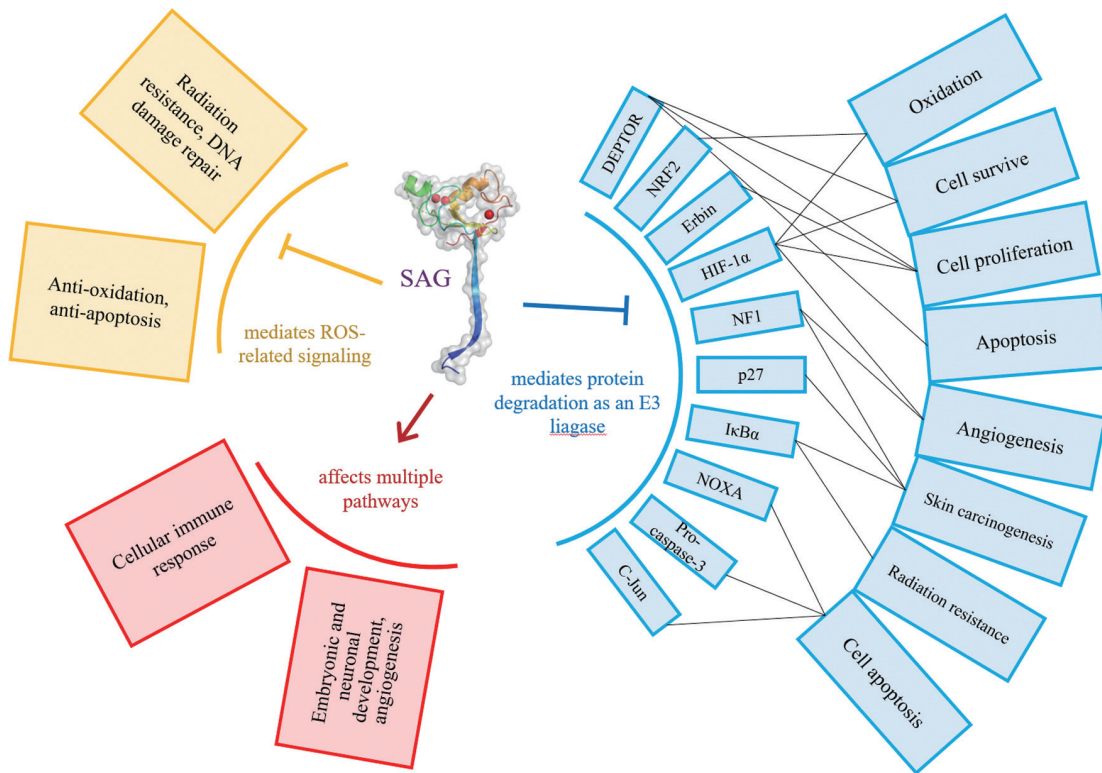


图3 受SAG调节的蛋白底物、信号通路和生物过程

Fig.3 The protein substrates, signaling pathways and biological processes regulated by SAG

等<sup>[60]</sup>发现SAG-CUL5通过ASB7泛素化和降解DDA3调控神经元细胞发育,后者是调节纺锤体运动的重要调节因子,从而提示SAG参与细胞有丝分裂和细胞分化(图3)。

#### 1.4 SAG的调节因子及其他互作蛋白

SAG受多种因子调节。笔者实验室发现SAG与HIF-1存在相互间的负向调控,形成一个HIF-1-SAG反馈环路:在缺氧应激下,HIF-1可结合SAG基因第一个内含子的HIF-1结合位点GCGTG,转录调控促进SAG基因的表达。诱导表达的SAG反过来促进了HIF-1 $\alpha$ 的泛素化降解。上述环路可能是细胞应对氧化应激所产生的高水平HIF-1的保护性机制之一<sup>[36]</sup>。

笔者团队还发现SAG受激活子蛋白AP-1的转录调控<sup>[35]</sup>。AP-1可结合SAG启动子的特定区域,诱导SAG的表达,高表达的SAG反过来可以促进c-Jun的泛素化和降解,从而抑制AP-1的活性<sup>[35]</sup>。

SAG的降解同样受UPS调控。笔者团队发现NEDD4-1,一个包含HECT结构域的E3泛素连接酶,可通过其HECT结构域直接结合SAG的碳末端RING

结构域,从而促进SAG的泛素化降解<sup>[61]</sup>。

最近,笔者团队还发现SAG与另一种E3泛素连接酶——后期促进复合物/细胞周期体(anaphase-promoting complex/cyclosome, APC/C)之间存在着负反馈调节环路<sup>[62]</sup>。APC/C可结合E2泛素耦联酶UBE2C和UBE2S,促进底物发生第11位赖氨酸(K11)多聚泛素化修饰<sup>[63]</sup>。笔者团队早期的研究发现SAG也可以与UBE2C和UBE2S E2结合,介导底物的K11多聚泛素化<sup>[38]</sup>。研究证实SAG可与APC2竞争性结合UBE2C和UBE2S,从而抑制APC/C活性,影响细胞周期的G<sub>2</sub>-M进程,而SAG本身又是APC/C<sup>CDH1</sup>的底物,可在细胞周期的G<sub>1</sub>期被APC/C<sup>CDH1</sup>降解<sup>[62]</sup>。上述环路不仅揭示了SAG与APC/C的相互作用,也提出了细胞周期调控的新机制。

## 2 SAG与人类疾病

### 2.1 SAG与恶性肿瘤

SAG在包括肺癌、结肠癌、胃癌、肝癌和多形性成胶质母细胞瘤在内的多种恶性肿瘤组织中过度表达<sup>[31,64-66]</sup>。有研究发现包括SAG在内的许多拟素

化通路关键因子在肝癌中都过度表达, 且与患者较差的预后呈正相关<sup>[67]</sup>。在肺癌、结直肠癌和多形性胶质母细胞瘤患者中, SAG的过度表达与不良预后呈正相关<sup>[68-70]</sup>。另有研究认为SAG是结肠腺癌和胰腺癌的潜在不良预后风险标志物<sup>[71-72]</sup>。

我们在肺癌细胞的体外实验中, 发现SAG敲降可诱导NOXA累积, 抑制细胞增殖和存活<sup>[31]</sup>。在癌基因*Kras*诱导的小鼠肺癌模型中, 条件性敲除肺部*Sag*, 可以显著抑制*Kras*激活诱导的原发性肺癌的发生发展, 并明显延长小鼠的生存期<sup>[31]</sup>。机制研究表明, *Sag*敲除导致抑癌蛋白p21、p27、Noxa、Bim、I $\kappa$ b $\alpha$ 和Deptor等的积累, 从而阻断细胞周期的进展, 诱导细胞凋亡, 抑制Nf $\kappa$ b和mTor信号通路相关蛋白的活性。这些研究有力地证明, *Sag*可协同癌基因*Kras*<sup>G12D</sup>促进肺癌形成<sup>[73]</sup>, 因此SAG是一个潜在的抗肿瘤靶点<sup>[2,74]</sup>。笔者团队的上述研究直接推动了一项肺癌II期临床试验的启动(NCT03228186)。

此外, 笔者团队进一步通过建立*Sag*和*Pten*双重条件敲除小鼠模型, 发现*Sag*是一个*Pten*缺失型前列腺癌的协同促癌基因<sup>[34,75]</sup>。另有研究通过体外细胞培养发现, SAG敲降抑制前列腺癌生成, 并增强前列腺癌细胞对顺铂的敏感性<sup>[76]</sup>。

*Sag*在癌基因*Kras*驱动的胰腺癌发生过程中也起到关键作用。在笔者实验室建立的*Kras*<sup>G12D</sup>-*Sag*联合转基因小鼠模型中, *Sag*的转基因表达引起Deptor-mTorc1信号通路和Nrf2-Nqo1轴等多条关键信号通路的改变, 这些改变在早期会导致腺泡细胞-导管细胞转化(acinar-to-ductal metaplasia, ADM)和胰管上皮内瘤变形成, 在后期则引起胰腺腺泡细胞囊泡化, 使胰腺功能重度损伤, 明显缩短了小鼠的生存期<sup>[77]</sup>。

在皮肤肿瘤发生过程中, *Sag*则因致癌剂的不同, 显示不同的作用。笔者实验室早期建立了K14-SAG转基因小鼠模型, 用致癌剂DMBA和促癌剂TPA诱导皮肤肿瘤发生。该研究发现SAG对皮肤肿瘤的发生呈现双相调控作用: 在早期阶段, SAG通过促进c-Jun的降解, 抑制AP-1, 从而抑制肿瘤的形成; 在晚期阶段, SAG则通过降解I $\kappa$ b $\alpha$ , 激活Nf $\kappa$ b, 促进肿瘤的增长<sup>[78]</sup>。在UVB诱导的皮肤癌模型中, SAG在皮肤组织的表达同时促进了促癌蛋白c-Jun和抑癌蛋白p27的降解, 最终虽不引起肿瘤的形成, 却导致皮肤细胞增生, 说明底物p27的降解在此过程中起主要作用<sup>[33]</sup>。然而在*Kras*<sup>G12D</sup>诱导的皮肤肿瘤模型中, 笔

者团队发现*Sag*的敲除可显著促进*Kras*<sup>G12D</sup>介导的乳头状瘤形成<sup>[37]</sup>。相关机制研究表明, *Sag*敲除可导致*Sag*底物Erbin和Nrf2的积累, 抑制Ras-Erk信号通路, 阻断ROS产生, 从而抑制细胞自噬和衰老, 促进细胞增殖和肿瘤形成。因此*Sag*可被视作是一个皮肤特异性的*Kras*<sup>G12D</sup>抑制因子<sup>[37]</sup>。这跟*Sag*在*Kras*<sup>G12D</sup>诱导的肺癌模型中的作用正好相反<sup>[36]</sup>, 提示*Sag*的功能具有组织特异性(图4)。

## 2.2 SAG与其他疾病

### 2.2.1 SAG与病毒感染

在感染宿主细胞过程中, 大多数逆转录病毒, 包括人类免疫缺陷病毒1型(human immunodeficiency virus-1, HIV-1), 均进化出了一种防御机制, 即利用宿主的泛素蛋白酶体系统, 来突破宿主的抗病毒防线<sup>[79]</sup>。有趣的是, SAG-CRL5可以广泛参与包括HIV和丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)在内的多种病毒感染的机制<sup>[27-28]</sup>。目前已知Vif, 一种HIV-1蛋白, 可通过挟持SAG-CUL5来促进抗病毒蛋白家族A3C(APOBEC3)的泛素化降解<sup>[80-81]</sup>。近年来更深入的机制研究表明Vif需要挟持CBF- $\beta$ , 一个细胞转录因子, 来协助其控制CRL5对A3C蛋白的降解<sup>[79]</sup>。后续研究证实, CBF- $\beta$ 在Vif挟持CRL5的过程中扮演了分子伴侣的角色, 而最新研究发现ARIH2也是CUL5<sup>Vif/CBF- $\beta$</sup> 的协同作用因子<sup>[82-83]</sup>, 说明这是一个精准的调控体系。另外, CRL5的拟素化修饰对HIV Vif介导的抗病毒蛋白A3G的降解也至关重要, 通过敲降*UBE2F*、SAG或应用MLN4924抑制拟素化通路可恢复APOBEC3G对HIV的限制作用<sup>[84]</sup>。另一项工作检测了RBX1和SAG在HIV-1 Vif-CUL5复合物中的作用, 发现RBX1和SAG都可在体外实验中激活CUL5-Vif E3泛素连接酶的活性, 但只有降低内源性SAG, 而非RBX1水平, 才能影响Vif介导的A3G降解, 提示SAG在HIV Vif-CUL5中可能存在选择性的机制<sup>[85]</sup>。最近一项研究显示SAG-CUL5在Vif介导的STAT1/STAT3降解中也扮演了关键角色<sup>[86]</sup>。

此外, 多项基于全基因组的关联研究表明在SAG/*RNF7*第一个内含子含有一个可能与HCV继发性肝纤维化密切相关的单核苷酸多态性位点<sup>[87-89]</sup>。还有研究表明HCV可通过产生ROS抑制宿主DNA损伤修复<sup>[90]</sup>, 而SAG作为一个抗氧化分子, 是否同时参与病毒挟持宿主泛素化进程和阻断ROS诱导的氧化应激, 有待进一步探究。



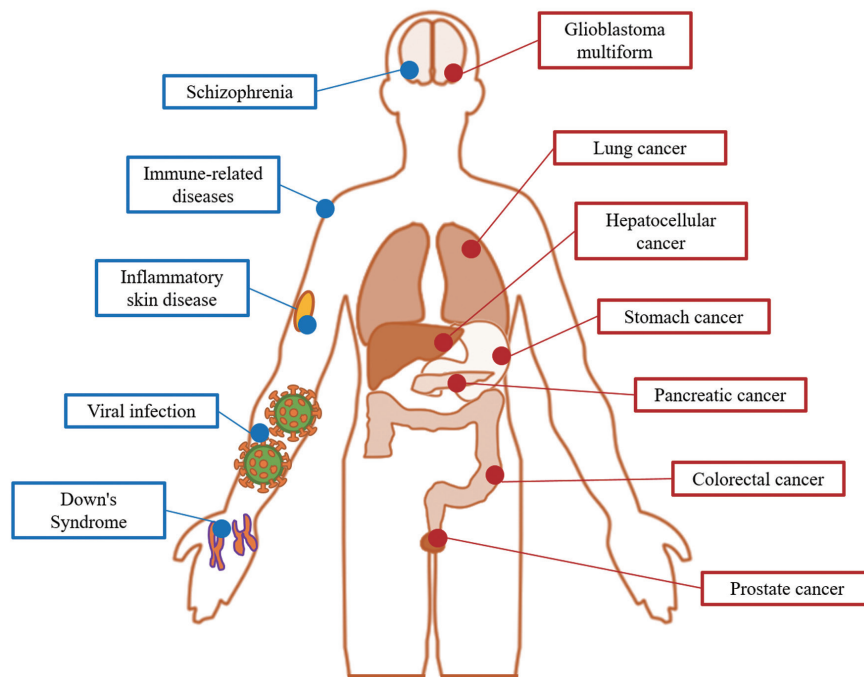


图4 SAG相关的人类疾病

Fig.4 SAG-associated human diseases

2.2.2 SAG与其他疾病 SAG与部分人类皮肤炎症性疾病及其他免疫相关疾病的发生发展相关。研究发现SAG可促进MALT1和NF $\kappa$ B调节分子NEMO的泛素化,阻止CARMA2蛋白激活NF $\kappa$ B通路,而人银屑病相关的CARMA2突变则可逃避SAG对CARMA2的负向调节,提示SAG可能在人银屑病的发生机制中扮演重要角色<sup>[91]</sup>。此外,SAG在烧伤患者皮肤成纤维细胞中可被维生素C诱导高表达<sup>[92]</sup>,因此SAG可能参与皮肤炎症应激和损伤修复。

此外,有研究发现SAG在精神分裂症患者的脑组织中低表达,而拟素化异常阻断可能与精神分裂症的发生相关<sup>[93]</sup>。另有研究发现*Rnf7/Sag*在唐氏综合征小鼠模型中存在异常表达<sup>[94]</sup>。

帕金森综合征的发生被认为与细胞中产生过量ROS有关。SAG具有较强的抗氧化能力,在氧化应激条件下可有效清除ROS。因此有研究者在人重组SAG蛋白上融合了蛋白转导结构域Tat,合成的Tat-SAG融合蛋白可以有效转导至SH-SY5Y神经母细胞瘤细胞和体外小鼠脑组织内,显著抑制1-甲基-4-苯基吡啶(MPP)诱导的ROS生成、DNA损伤和细胞凋亡<sup>[95]</sup>。该研究提示了SAG在帕金森综合征临床治疗方面的应用潜力。笔者所在实验室早期的工作也表明,SAG可以通过清除ROS,保护脑缺血引起

的脑组织损伤<sup>[96]</sup>(图4)。

### 3 靶向SAG的抗肿瘤治疗策略

上世纪90年代,随着多种蛋白酶体抑制剂的相继开发,一系列研究发现蛋白酶体抑制剂可有效诱导细胞凋亡,而肿瘤细胞对蛋白酶体抑制剂的敏感性要显著高于正常细胞,以蛋白酶体为靶点的抗肿瘤策略随之浮出水面<sup>[97-99]</sup>。随后,硼替佐米(Bortezomib)成为第一个被FDA批准上市的蛋白酶体抑制剂类抗肿瘤药物,可用于治疗人多发性骨髓瘤<sup>[100]</sup>。硼替佐米的临床应用证实了UPS系统作为抗肿瘤靶点的可行性。然而,UPS系统是维持正常细胞内蛋白稳定的关键,与细胞内各种正常生理途径密切相关。蛋白酶体作为UPS系统最后的“执行者”,其功能的阻断不可避免地会对正常细胞带来较高的毒性。随着对UPS系统各组分的结构和功能研究的不断深入,近年来人们逐渐将目标转向UPS系统的上游泛素化体系,包括E1泛素激活酶、E2泛素耦连酶、E3泛素连接酶或去泛素化酶,这些酶负责调控特定底物的泛素化,理论上具有更好的选择性和更低的毒性<sup>[101]</sup>。Pevonedistat是近年来广泛应用的特异性E1拟素激活酶抑制剂,可通过抑制E1拟素激活酶活性,有效阻断Cullin蛋白拟素化,从而抑制CRLs的活性<sup>[41]</sup>。在

体外实验和动物模型中, Pevonedistat对肺癌、前列腺癌、乳腺癌等多种实体瘤和血液系统肿瘤都有良好的抑制作用, 并进入针对上述肿瘤的多项I、II期临床试验<sup>[102]</sup>, 进一步证实靶向CRLs作为抗肿瘤策略的可行性。但由于Pevonedistat广泛抑制Cullin蛋白的拟素化, 全面阻断CRLs的活性, 不可避免地给患者带来一定程度的副作用。另外, 笔者团队发现Pevonedistat不仅抑制Cullin拟素化, 还具有促进肿瘤成球能力和损伤愈合、抑制纤毛形成和促进糖酵解等脱靶作用<sup>[103-104]</sup>。

SAG作为CRLs E3连接酶复合体的重要组成成分, 在近年来的研究中不断表现出具有成为抗肿瘤靶点的潜力。首先, SAG在肺癌、结直肠癌、胰腺癌等多种恶性肿瘤组织中过度表达, 且与患者的不良预后呈正相关<sup>[31,64-72]</sup>。其次, 笔者团队研究发现沉默*Sag*可引起p21、p27、NOXA、BIM和DEPTOR等多种抑癌蛋白的积累, 抑制NF $\kappa$ B和mTOR信号通路, 从而抑制肺癌细胞的生长和存活, 诱导肺癌细胞凋亡<sup>[8,31]</sup>, 而过表达*Sag*能促进肺癌细胞的生长<sup>[8,73]</sup>。通过*Kras*小鼠肺癌模型的研究, 笔者团队证实*Sag*是一个*Kras*的协同促癌基因, 可促进肺癌的发生和发展<sup>[73]</sup>。笔者团队还证实SAG-CUL5可通过E2拟素耦连酶UBE2F介导促凋亡蛋白NOXA的降解, 促进肺癌细胞的存活<sup>[30]</sup>。此外, CHEN等<sup>[105]</sup>发现SAG-CUL5-ASB11介导促凋亡蛋白BIK的降解。KABIR等<sup>[106]</sup>通过基于多流式细胞术的全基因组CRISPR筛选, 发现CRL5的三个主要成员SAG、CUL5和UBE2F可介导肺癌细胞对CDK9和MCL1抑制剂的抵抗。WU等<sup>[107]</sup>通过CRISPR/Cas9在结直肠癌细胞系中敲除*SAG*, 发现SAG与结直肠癌细胞增殖、克隆形成、顺铂敏感性和侵袭转移特性密切相关, 提示SAG是抗结直肠癌生长和转移的潜在靶点。上述研究都提示SAG是一个极富潜力的抗肿瘤治疗靶点。

尽管SAG是一个潜在的抗肿瘤靶点, 但目前尚未有靶向SAG的特异性抑制剂。原因是多方面的。首先, 同UPS系统的大多数组分一样, SAG在结构上缺少一个明确的催化口袋, 因而无法轻易地找到或设计相应的小分子抑制剂<sup>[101]</sup>。其次, 泛素化和拟素化进程依赖于一整套的动态酶催化反应, 涉及多种瞬时、持续发生的蛋白-蛋白相互作用, 因而SAG不是一个传统小分子化合物的理想靶点<sup>[101]</sup>。尽管如此, 许多团队还在不断尝试攻克这一似乎“不可成药”的

靶点。SHAFIQUE等<sup>[108]</sup>借助一系列生物信息学手段, 对RBX1和7种Cullin蛋白的结合模式进行分析, 找到关键的结合位点, 通过分子动态(molecular dynamics, MD)模拟实验预测影响RBX1-Cullin结合稳定性的关键构象, 并通过基于结构的虚拟筛选和对接分析, 得到部分可能直接作用于RBX1-Cullin结合位点的小分子化合物结构。尽管该研究并未证实这些小分子化合物的抑制活性, 其对RBX1-Cullin结合位点和结合构象的分析可为设计靶向SAG-CUL5的小分子抑制剂提供参考。

为了寻找靶向SAG-CUL5 E3泛素连接酶的特异性小分子抑制剂, 笔者实验室研发了基于AlphaScreen的体外CRL5拟素化高通量筛选平台, 通过建立动态的体外CRL5拟素化报告系统, 高通量筛选可能阻断CRL5拟素化的小分子抑制剂<sup>[109]</sup>。在前期预筛选过程中, 笔者等发现醋酸棉酚可在多种肿瘤细胞系中阻断CRL5和CRL1的拟素化, 促进底物NOXA和MCL1的积累<sup>[109]</sup>。目前, 更多的候选化合物仍在进一步研发中(图5)。

此外, 一项研究表明SAG和CUL5参与调节人类癌症细胞对热休克蛋白90(heat shock protein 90, HSP90)抑制剂的敏感性, 提示联合SAG-CUL5小分子抑制剂和HSP90抑制剂可能是潜在的抗肿瘤药物联用策略<sup>[110]</sup>。

## 4 总结与展望

综上所述, SAG是一个具有多种生物学功能的重要蛋白。在缺氧或ROS等应激条件下, 细胞启动保护机制, 诱导SAG表达。SAG可作为一个抗氧化因子, 独立发挥其清除ROS的功能, 阻断ROS诱导的DNA损伤、脂质过氧化和凋亡。SAG也可作为CRLs E3的组分, 发挥其泛素连接酶功能, 促进特定底物的泛素化降解。SAG与多种人类疾病包括恶性肿瘤、病毒感染、炎症性皮肤病和精神疾病在内等相关。SAG在多种人类恶性肿瘤组织中异常表达, 与癌症患者的不良预后相关。笔者实验室建立的*Sag*转基因小鼠模型揭示了*Sag*在多个肿瘤诱导模型中都有癌基因的协同作用, 而大量研究也支持SAG是一个富有潜力的抗肿瘤靶点。

展望SAG领域未来的研究方向, 笔者认为在基础研究方面, 应该涉及以下几个方面。(1) SAG是泛素化和拟素化的双重E3连接酶, Cullin-5的拟素化激

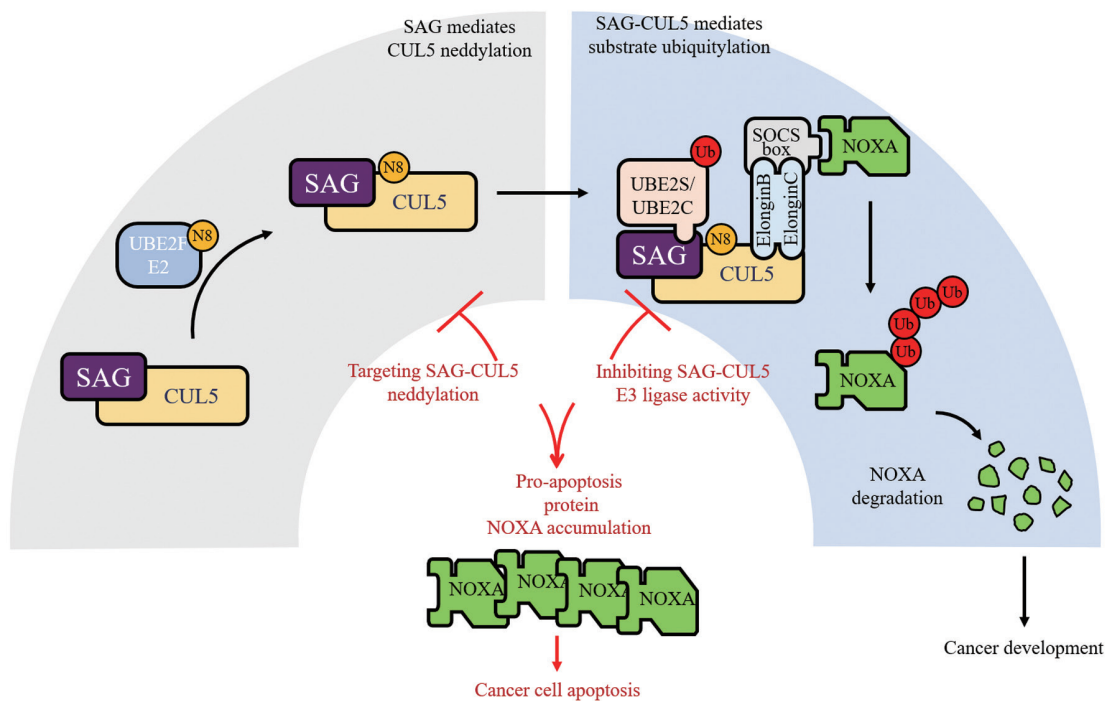


图5 靶向SAG的抗肿瘤策略

Fig.5 Proposed SAG targeting anti-cancer approaches

活需要它, CUL5催化底物的泛素化也需要它。SAG的作用是按先拟素化、后泛素化的模式序列进行的, 还是存在某种拟素化和泛素化之间相互促进/相互制约的交替平衡机制? 在何种生理或病理条件下会激活SAG的上述生化活性? 解决上述问题, 不仅有助于明确SAG的作用机制, 更可能帮助解开细胞内泛素化和拟素化或其他类泛素化修饰之间的相互作用和动态平衡机制。(2) SAG是一个应激响应基因。研究细胞是如何在各种不同的应激条件下, 调节SAG的活性来发挥相关功能的将会是非常有意思的课题。例如, 在转录水平, 除了已知的HIF-1<sup>[36]</sup>和AP-1<sup>[35]</sup>外, 还有哪些转录因子会调控SAG? 在翻译后水平, 除了可被NEDD4<sup>[61]</sup>或APC/C<sup>CDH1</sup><sup>[62]</sup>泛素化外, SAG还会接受哪些修饰? 除了已知的CK2<sup>[11]</sup>外, 还有哪些激酶介导SAG的磷酸化? SAG的稳定性是否受去泛素化酶调节? 发现和明确SAG的相互作用蛋白、寻找新的可被SAG拟素化或泛素化修饰的底物, 都将会进一步拓展对SAG生物学功能和作用机制的认知。(3) 利用人类患者的标本、基因工程改造的小鼠模型, 或其他疾病模型, 进一步探寻SAG和人类疾病的因果关系, 也将会进一步深化对SAG的生物学意义的理解。

在研发靶向SAG的抗肿瘤小分子化合物方面, 目前有三条途径可以尝试: (1) 笔者团队正在进行的靶向SAG-CUL5拟素化修饰<sup>[109]</sup>, 目前已得到数类候选化合物, 并正在结构优化中; (2) 基于SAG-CUL5晶体结构<sup>[12,15]</sup>的虚拟筛选以及随后的化合物合成和结构优化; (3) 通过DNA编码化合物库<sup>[112]</sup>合成和筛选可与SAG特异性结合的小分子化合物, 然后应用蛋白降解靶向嵌合体技术(proteolysis targeting chimeric, PROTAC)<sup>[113]</sup>, 研发靶向SAG降解的嵌合体化合物。期待在不久的将来, 能找到特异性靶向SAG的先导化合物, 继而研发出一类新型的抗肿瘤药物, 最终造福肿瘤患者。

### 参考文献 (References)

- [1] SUN Y. Induction of glutathione synthetase by 1,10-phenanthroline [J]. FEBS Lett, 1997, 408(1): 16-20.
- [2] DUAN H, WANG Y, AVIRAM M, et al. Sag, a novel zinc ring finger protein that protects cells from apoptosis induced by redox agents [J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(4): 3145-55.
- [3] SUN Y. Rnf7 (ring finger protein-7) [J]. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol, 2008, 12(4): 289-91.
- [4] SUN Y, TAN M, DUAN H, et al. Sag/roc/rbx/hrt, a zinc ring finger gene family: molecular cloning, biochemical properties, and biological functions [J]. Antioxid Redox Signal, 2001, 3(4): 635-50.

- [5] SWAROOP M, GOSINK M, SUN Y. Sag/roc2/rbx2/hrt2, a component of Scf E3 ubiquitin ligase: genomic structure, a splicing variant, and two family pseudogenes [J]. *DNA Cell Biol*, 2001, 20(7): 425-34.
- [6] LIPKOWITZ S, WEISSMAN A M. Rings of good and evil: ring finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(9): 629-43.
- [7] SWAROOP M, WANG Y, MILLER P, et al. Yeast homolog of human Sag/Roc2/Rbx2/Hrt2 is essential for cell growth, but not for germination: chip profiling implicates its role in cell cycle regulation [J]. *Oncogene*, 2000, 19(24): 2855-66.
- [8] SUN Y, LI H. Functional characterization of sag/rbx2/roc2/rnf7, an antioxidant protein and an E3 ubiquitin ligase [J]. *Protein Cell*, 2013, 4(2): 103-16.
- [9] TAN M, ZHAO Y, KIM S J, et al. Sag/rbx2/roc2 E3 ubiquitin ligase is essential for vascular and neural development by targeting nfl1 for degradation [J]. *Dev Cell*, 2011, 21(6): 1062-76.
- [10] MIYAMOTO K, TOMIZAWA T, KOSHIBA S, et al. Solution structure of the ring domain of the human ring-box protein 2 [J]. 2007, doi: 10.2210/pdb2ECL/pdb.
- [11] HUANG D T, AYRAULT O, HUNT H W, et al. E2-ring expansion of the nedd8 cascade confers specificity to cullin modification [J]. *Mol Cell*, 2009, 33(4): 483-95.
- [12] LUMPKIN R J, BAKER R W, LESCHZINER A E, et al. Structure and dynamics of the asb9 cul-ring E3 ligase [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2866.
- [13] KOMIVES E A, LUMPKIN R J, BAKER R W, et al. Cryo-em structure of cullin5 bound to ring-box protein 2 (Cul5-rbx2) [J]. *Nature*, 2020, doi: 10.2210/pdb6V9I/pdb.
- [14] KOMIVES E A, LUMPKIN R J, BAKER R W, et al. Ankyrin repeat and socs-box protein 9 (asb9), elonginb (elob), and elonginc (eloc) bound to its substrate brain-type creatine kinase (ckb) [J]. *Nat Commun*, 2020, doi: 10.2210/pdb6V9H/pdb.
- [15] KOSTRHON S, PRABU J R, BAEK K, et al. Cul5-arih2 E3-E3 ubiquitin ligase structure reveals cullin-specific nedd8 activation [J]. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(10): 1075-83.
- [16] KOSTRHON S, PRABU J R, SCHULMAN B A. Structure of neddylation cul5 c-terminal region-rbx2-arih2 [J]. *Nat Chem Biol*, 2021, doi: 10.2210/pdb7ONI/pdb.
- [17] HERSHKO A, CIECHANOVER A. The ubiquitin system [J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 425-79.
- [18] CIECHANOVER A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life [J]. *EMBO J*, 1998, 17(24): 7151-60.
- [19] JIA L, SUN Y. Scf E3 ubiquitin ligases as anticancer targets [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2011, 11(3): 347-56.
- [20] SKAAR J R, PAGAN J K, PAGANO M. Scf ubiquitin ligase-targeted therapies [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(12): 889-903.
- [21] LIU L, DAMERELL D R, KOUKOUFLIS L, et al. Ubihub: a data hub for the explorers of ubiquitination pathways [J]. *Bioinformatics*, 2019, 35(16): 2882-4.
- [22] CRUZ WALMA D A, CHEN Z, BULLOCK A N, et al. Ubiquitin ligases: guardians of mammalian development [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, doi: 10.1038/s41580-021-00448-5.
- [23] SARIKAS A, HARTMANN T, PAN Z Q. The cullin protein family [J]. *Genome Biol*, 2011, 12(4): 220.
- [24] WEI D, SUN Y. Small ring finger proteins rbx1 and rbx2 of scf E3 ubiquitin ligases: the role in cancer and as cancer targets [J]. *Genes Cancer*, 2010, 1(7): 700-7.
- [25] LEE J, ZHOU P. Cullins and cancer [J]. *Genes Cancer*, 2010, 1(7): 690-9.
- [26] ENCHEV R I, SCHULMAN B A, PETER M. Protein neddylation: beyond cullin-ring ligases [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(1): 30-44.
- [27] ZHAO Y, XIONG X, SUN Y. Cullin-ring ligase 5: functional characterization and its role in human cancers [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 67(Pt 2): 61-79.
- [28] ZHANG S, SUN Y. Cullin ring ligase 5 (crl-5): neddylation activation and biological functions [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1217: 261-83.
- [29] TAN M, GALLEGOS J R, GU Q, et al. Sag/roc-scf beta-trcp E3 ubiquitin ligase promotes pro-caspase-3 degradation as a mechanism of apoptosis protection [J]. *Neoplasia*, 2006, 8(12): 1042-54.
- [30] ZHOU W, XU J, LI H, et al. Neddylation E2 ube2f promotes the survival of lung cancer cells by activating Crl5 to degrade noxa via the K11 linkage [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(4): 1104-16.
- [31] JIA L, YANG J, HAO X, et al. Validation of sag/rbx2/roc2 E3 ubiquitin ligase as an anticancer and radiosensitizing target [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(3): 814-24.
- [32] TAN M, ZHU Y, KOVACEV J, et al. Disruption of sag/rbx2/roc2 induces radiosensitization by increasing ros levels and blocking NF-kappa activation in mouse embryonic stem cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(6): 976-83.
- [33] HE H, GU Q, ZHENG M, et al. Sag/roc2/rbx2 E3 ligase promotes UVB-induced skin hyperplasia, but not skin tumors, by simultaneously targeting c-JUN/AP-1 and p27 [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(4): 858-65.
- [34] TAN M, XU J, SIDDIQUI J, et al. Depletion of sag/rbx2 E3 ubiquitin ligase suppresses prostate tumorigenesis via inactivation of the PI3K/AKT/Mtor axis [J]. *Mol Cancer*, 2016, 15(1): 81.
- [35] GU Q, TAN M, SUN Y. Sag/roc2/rbx2 is a novel activator protein-1 target that promotes c-jun degradation and inhibits 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced neoplastic transformation [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8): 3616-25.
- [36] TAN M, GU Q, HE H, et al. Sag/roc2/rbx2 is a HIF-1 target gene that promotes HIF-1 alpha ubiquitination and degradation [J]. *Oncogene*, 2008, 27(10): 1404-11.
- [37] XIE C M, WEI D, ZHAO L, et al. Erbin is a novel substrate of the sag-beta-trcp E3 ligase that regulates krasg12d-induced skin tumorigenesis [J]. *J Cell Biol*, 2015, 209(5): 721-37.
- [38] KUANG P, TAN M, ZHOU W, et al. Sag/rbx2 E3 ligase complexes with ubch10 and ube2s E2s to ubiquitylate beta-trcp1 via K11-linkage for degradation [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37441.
- [39] MOLONEY J N, COTTER T G. Ros signalling in the biology of cancer [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 80: 50-64.
- [40] PORDANJANI S M, HOSSEINIMEHR S J. The role of NF-kb inhibitors in cell response to radiation [J]. *Curr Med Chem*, 2016, 23(34): 3951-63.
- [41] SOUCY T A, SMITH P G, MILHOLLEN M A, et al. An inhibitor of Nedd8-activating enzyme as a new approach to treat cancer [J]. *Nature*, 2009, 458(7239): 732-6.
- [42] WEI D, MORGAN M A, SUN Y. Radiosensitization of cancer

- cells by inactivation of cullin-ring E3 ubiquitin ligases [J]. *Transl Oncol*, 2012, 5(5): 305-12.
- [43] WEI D, LI H, YU J, et al. Radiosensitization of human pancreatic cancer cells by mln4924, an investigational Nedd8-activating enzyme inhibitor [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(1): 282-93.
- [44] COOPER S E, HODIMONT E, GREEN C M. A fluorescent bimolecular complementation screen reveals maf1, rnf7 and setd3 as pcna-associated proteins in human cells [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(15): 2509-19.
- [45] LAWRENCE T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1(6): a001651.
- [46] MATHEWSON N, TOUBAI T, KAPELES S, et al. Neddylation plays an important role in the regulation of murine and human dendritic cell function [J]. *Blood*, 2013, 122(12): 2062-73.
- [47] CHANG S C, DING J L. Ubiquitination by sag regulates macrophage survival/death and immune response during infection [J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(9): 1388-98.
- [48] CHANG F M, REYNA S M, GRANADOS J C, et al. Inhibition of neddylation represses lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine production in macrophage cells [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(42): 35756-67.
- [49] LI L, LIU B, DONG T, et al. Neddylation pathway regulates the proliferation and survival of macrophages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 432(3): 494-8.
- [50] XIONG X, MATHEWSON N D, LI H, et al. Sag/rbx2 E3 ubiquitin ligase differentially regulates inflammatory responses of myeloid cell subsets [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2882.
- [51] MATHEWSON N D, FUJIWARA H, WU S R, et al. Sag/rbx2-dependent neddylation regulates t-cell responses [J]. *Am J Pathol*, 2016, 186(10): 2679-91.
- [52] REYNOLDS P J, SIMMS J R, DURONIO R J. Identifying determinants of cullin binding specificity among the three functionally different drosophila melanogaster roc proteins via domain swapping [J]. *PLoS One*, 2008, 3(8): e2918.
- [53] MOORE R, BOYD L. Analysis of ring finger genes required for embryogenesis in *C. Elegans* [J]. *Genesis*, 2004, 38(1): 1-12.
- [54] DUAN H, TSVETKOV L M, LIU Y, et al. Promotion of s-phase entry and cell growth under serum starvation by sag/roc2/rbx2/hrt2, an E3 ubiquitin ligase component: association with inhibition of p27 accumulation [J]. *Mol Carcinog*, 2001, 30(1): 37-46.
- [55] TAN M, LI H, SUN Y. Endothelial deletion of sag/rbx2/roc2 E3 ubiquitin ligase causes embryonic lethality and blocks tumor angiogenesis [J]. *Oncogene*, 2014, 33(44): 5211-20.
- [56] HINO K, SIMO S, COOPER J A. Comparative analysis of cul5 and rbx2 expression in the developing and adult murine brain and their essentiality during mouse embryogenesis [J]. *Dev Dyn*, 2018, 247(11): 1227-36.
- [57] SIMO S, COOPER J A. Rbx2 regulates neuronal migration through different cullin 5-ring ligase adaptors [J]. *Dev Cell*, 2013, 27(4): 399-411.
- [58] FAIRCHILD C L, HINO K, HAN J S, et al. Rbx2 maintains final retinal cell position in a dab1-dependent and -independent fashion [J]. *Development*, 2018, doi: 10.1242/dev.155283.
- [59] HAN J S, HINO K, LI W, et al. Crl5-dependent regulation of the small gtpases arl4c and arf6 controls hippocampal morphogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(37): 23073-84.
- [60] UEMATSU K, OKUMURA F, TONOGAI S, et al. Asb7 regulates spindle dynamics and genome integrity by targeting DDA3 for proteasomal degradation [J]. *J Cell Biol*, 2016, 215(1): 95-106.
- [61] ZHOU W, XU J, ZHAO Y, et al. Sag/rbx2 is a novel substrate of nedd4-1 E3 ubiquitin ligase and mediates nedd4-1 induced chemosensitization [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(16): 6746-55.
- [62] ZHANG S, SHEN Y, LI H, et al. The negative cross-talk between sag/rbx2/roc2 and apc/c E3 ligases in regulation of cell cycle progression and drug resistance [J]. *Cell Rep*, 2020, 32(10): 108102.
- [63] MEYER H J, RAPE M. Enhanced protein degradation by branched ubiquitin chains [J]. *Cell*, 2014, 157(4): 910-21.
- [64] ZHENG S, LI Z. Identification of a cullin5-ring E3 ligase transcriptome signature in glioblastoma multiforme [J]. *Aging*, 2020, 12(17): 17380-92.
- [65] LAZAR V, SUO C, OREAR C, et al. Integrated molecular portrait of non-small cell lung cancers [J]. *BMC Med Genomics*, 2013, 6: 53.
- [66] HUANG Y, DUAN H, SUN Y. Elevated expression of sag/roc2/rbx2/hrt2 in human colon carcinomas: Sag does not induce neoplastic transformation, but antisense sag transfection inhibits tumor cell growth [J]. *Mol Carcinog*, 2001, 30(1): 62-70.
- [67] YU J, HUANG W L, XU Q G, et al. Overactivated neddylation pathway in human hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(7): 3363-72.
- [68] XIE Z C, WU H Y, DANG Y W, et al. Role of alternative splicing signatures in the prognosis of glioblastoma [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(18): 7623-36.
- [69] OZDEN S A, OZYURT H, OZGEN Z, et al. Prognostic role of sensitive-to-apoptosis gene expression in rectal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(44): 4905-10.
- [70] SASAKI H, YUKIUE H, KOBAYASHI Y, et al. Expression of the sensitive to apoptosis gene, sag, as a prognostic marker in nonsmall cell lung cancer [J]. *Int J Cancer*, 2001, 95(6): 375-7.
- [71] ZUO H, CHEN L, LI N, et al. Identification of a ubiquitination-related gene risk model for predicting survival in patients with pancreatic cancer [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 612196.
- [72] YIN Z, YAN X, WANG Q, et al. Detecting prognosis risk biomarkers for colon cancer through multi-omics-based prognostic analysis and target regulation simulation modeling [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 524.
- [73] LI H, TAN M, JIA L, et al. Inactivation of sag/rbx2 E3 ubiquitin ligase suppresses krasg12d-driven lung tumorigenesis [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(2): 835-46.
- [74] SNOEK B C, DE WILT L H, JANSEN G, et al. Role of E3 ubiquitin ligases in lung cancer [J]. *World J Clin Oncol*, 2013, 4(3): 58-69.
- [75] TAN M, LI H, SUN Y. Inactivation of sag/rbx2/roc2 E3 ubiquitin ligase triggers senescence and inhibits kras-induced immortalization [J]. *Neoplasia*, 2015, 17(1): 114-23.
- [76] XIAO Y, JIANG Y, SONG H, et al. Rnf7 knockdown inhibits prostate cancer tumorigenesis by inactivation of ERK1/2 pathway [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43683.
- [77] ZHANG Q, WEI D, TAN M, et al. Transgenic expression of sag/rbx2 E3 causes early stage tumor promotion, late stage cytogenesis and acinar loss in the kras-pdac model [J]. *Neoplasia*, 2020,

- 22(6): 242-52.
- [78] GU Q, BOWDEN G T, NORMOLLE D, et al. Sag/roc2 E3 ligase regulates skin carcinogenesis by stage-dependent targeting of c-Jun/AP1 and ikappab-alpha/nf-kappab [J]. *J Cell Biol*, 2007, 178(6): 1009-23.
- [79] JAGER S, KIM D Y, HULTQUIST J F, et al. Vif hijacks cbf-beta to degrade apobec3g and promote HIV-1 infection [J]. *Nature*, 2011, 481(7381): 371-5.
- [80] ZHANG W, WANG H, LI Z, et al. Cellular requirements for bovine immunodeficiency virus VIF-mediated inactivation of bovine Apobec3 proteins [J]. *J Virol*, 2014, 88(21): 12528-40.
- [81] MALIM M H, EMERMAN M. HIV-1 accessory proteins-ensuring viral survival in a hostile environment [J]. *Cell Host Microbe*, 2008, 3(6): 388-98.
- [82] HUTTENHAIN R, XU J, BURTON L A, et al. Aih2 is a vif-dependent regulator of Cul5-mediated Apobec3g degradation in HIV infection [J]. *Cell Host Microbe*, 2019, 26(1): 86-99, e7.
- [83] FRIBOURGH J L, NGUYEN H C, WOLFE L S, et al. Core binding factor beta plays a critical role by facilitating the assembly of the Vif-Cullin 5 E3 ubiquitin ligase [J]. *J Virol*, 2014, 88(6): 3309-19.
- [84] STANLEY D J, BARTHOLOMEEUSEN K, CROSBY D C, et al. Inhibition of a nedd8 cascade restores restriction of HIV by apobec3g [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(12): e1003085.
- [85] WANG X, WANG X, WANG W, et al. Both rbx1 and rbx2 exhibit a functional role in the HIV-1 Vif-cullin5 E3 ligase complex *in vitro* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 461(4): 624-9.
- [86] GARGAN S, AHMED S, MAHONY R, et al. HIV-1 promotes the degradation of components of the type 1 IFN JAK/STAT pathway and blocks anti-viral isg induction [J]. *EBioMedicine*, 2018, 30: 203-16.
- [87] KUPCINSKAS J, VALANTIENE I, VARKALAITA G, et al. Pnpla3 and rnf7 gene variants are associated with the risk of developing liver fibrosis and cirrhosis in an eastern european population [J]. *J Gastrointest Liver Dis*, 2017, 26(1): 37-43.
- [88] ENACHE E L, SIN A, ENACHE L S, et al. Triplex high-resolution melting assay for the simultaneous assessment of ifn13 rs12979860, abcb11 rs2287622, and rnf7 rs16851720 genotypes in chronic hepatitis c patients [J]. *J Mol Diagn*, 2017, 19(6): 857-69.
- [89] PATIN E, KUTALIK Z, GUERGNON J, et al. Genome-wide association study identifies variants associated with progression of liver fibrosis from hcv infection [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(5): 1244-52, e12.
- [90] MACHIDA K, MCNAMARA G, CHENG K T, et al. Hepatitis c virus inhibits DNA damage repair through reactive oxygen and nitrogen species and by interfering with the ATM-NBS1/MRE11/RAD50 DNA repair pathway in monocytes and hepatocytes [J]. *J Immunol*, 2010, 185(11): 6985-98.
- [91] TELESIO G, SCUDIERO I, PIZZULO M, et al. The E3 ubiquitin ligase rnf7 negatively regulates CARD14/CARMA2SH signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): 21-35.
- [92] BONUCCI J, GRAGNANI A, TRINCADO M M, et al. The role of vitamin C in the gene expression of oxidative stress markers in fibroblasts from burn patients [J]. *Acta Cir Bras*, 2018, 33(8): 703-12.
- [93] RUBIO M D, WOOD K, HAROUTUNIAN V, et al. Dysfunction of the ubiquitin proteasome and ubiquitin-like systems in schizophrenia [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38(10): 1910-20.
- [94] SAHUN I, MARECHAL D, PEREIRA P L, et al. Cognition and hippocampal plasticity in the mouse is altered by monosomy of a genomic region implicated in down syndrome [J]. *Genetics*, 2014, 197(3): 899-912.
- [95] SOHN E J, SHIN M J, KIM D W, et al. Tat-fused recombinant human sag prevents dopaminergic neurodegeneration in a mptp-induced Parkinson's disease model [J]. *Mol Cells*, 2014, 37(3): 226-33.
- [96] YANG G Y, PANG L, GE H L, et al. Attenuation of ischemia-induced mouse brain injury by sag, a redox-inducible antioxidant protein [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21(6): 722-33.
- [97] HIDESHIMA T, RICHARDSON P, CHAUHAN D, et al. The proteasome inhibitor ps-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(7): 3071-6.
- [98] TEICHER B A, ARA G, HERBST R, et al. The proteasome inhibitor ps-341 in cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(9): 2638-45.
- [99] ADAMS J, PALOMBELLA V J, SAUSVILLE E A, et al. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(11): 2615-22.
- [100] ADAMS J. The proteasome: a suitable antineoplastic target [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(5): 349-60.
- [101] HUANG X, DIXIT V M. Drugging the undruggables: exploring the ubiquitin system for drug development [J]. *Cell Res*, 2016, 26(4): 484-98.
- [102] ZHOU L, ZHANG W, SUN Y, et al. Protein neddylation and its alterations in human cancers for targeted therapy [J]. *Cell Signal*, 2018, 44: 92-102.
- [103] MAO H, SUN Y. Neddylation-independent activities of mln4924 [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1217: 363-72.
- [104] ZHOU Q, SUN Y. Mln4924: additional activities beyond neddylation inhibition [J]. *Mol Cell Oncol*, 2019, 6(5): e1618174.
- [105] CHEN F Y, HUANG M Y, LIN Y M, et al. BIK ubiquitination by the E3 ligase cul5-asb11 determines cell fate during cellular stress [J]. *J Cell Biol*, 2019, 218(9): 3002-18.
- [106] KABIR S, CIDADO J, ANDERSEN C, et al. The cul5 ubiquitin ligase complex mediates resistance to cdk9 and mcl1 inhibitors in lung cancer cells [J]. *eLife*, 2019, 8: e44288.
- [107] WU X Y, FANG J, WANG Z J, et al. Identification of ring-box 2 as a potential target for combating colorectal cancer growth and metastasis [J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(6): 1238-51.
- [108] SHAFIQUE S, ALI W, KANWAL S, et al. Structural basis for cullins and ring component inhibition: targeting E3 ubiquitin pathway conductors for cancer therapeutics [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 106: 532-43.
- [109] YU Q, HU Z, SHEN Y, et al. Gossypol inhibits cullin neddylation by targeting sag-cul5 and rbx1-cul1 complexes [J]. *Neoplasia*, 2020, 22(4): 179-91.
- [110] SAMANT R S, CLARKE P A, WORKMAN P. E3 ubiquitin ligase cullin-5 modulates multiple molecular and cellular responses to heat shock protein 90 inhibition in human cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(18): 6834-9.

- [111] HE H, TAN M, PAMARTHY D, et al. Ck2 phosphorylation of sag at thr10 regulates sag stability, but not its E3 ligase activity [J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, 295(1/2): 179-88.
- [112] FAIR R J, WALSH R T, HUPP C D. The expanding reaction toolkit for DNA-encoded libraries [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2021, 51: 128339.
- [113] BEKES M, LANGLEY D R, CREWS C M. Protac targeted protein degraders: the past is prologue [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(3): 181-200.
- [114] ZHENG N, SCHULMAN B A, SONG L, et al. Structure of the cul1-rbx1-skp1-f boxskp2 scf ubiquitin ligase complex [J]. *Nature*, 2002, 416(6882): 703-9.