

特约综述



本实验室的研究兴趣主要集中于调控肿瘤细胞生长、增殖的核心信号转导与细胞代谢调节机制方面,特别是发现关键信号蛋白的重要转录后修饰(包括磷酸化、泛素化等),从而诠释肿瘤细胞生长、增殖/癌症发生、发展的分子机制,并为癌症的临床治疗提供新的思路与治疗靶点。

<http://www.sibcb.ac.cn/PI.asp?id=146>

CRL E3泛素连接酶复合体研究进展

刘相元 胡弘历 欧阳华芳 高大明*

(细胞生物学国家重点实验室,中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所,上海 200031)

摘要 Cullin-Ring Ligase (CRL)是一大类E3泛素连接酶复合体的统称。它们有着相近的结构,都由Cullin骨架蛋白、Ring结构域蛋白Rbx1或Rbx2以及底物识别亚基几个部分组成,所包含Cullin骨架蛋白的不同决定了CRL不同的构成与功能特点。经过近20年的研究,对CRL功能和调控机制的理解已取得了很大的进展,该文拟对CRL的研究现状进行简单介绍。

关键词 Cullin; CRL; E3连接酶; 泛素化; 蛋白降解

CRL E3 Complexes: Assembled for Destruction

Liu Xiangyuan, Hu Hongli, Ouyang Huafang, Gao Daming*

(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Cullin-Ring Ligase (CRL) refers to a large family of ubiquitin E3 ligases composed of similar architectures, including a scaffold Cullin protein, a Ring protein (Rbx1 or Rbx2), and a substrate receptor module. Different Cullin protein decides the presence of other components in the same CRL complex. After nearly 2 decades of research efforts, much knowledge of CRL has been gained. This review is focused on giving a overlook of current understanding of functional and regulatory mechanisms of CRL complexes.

Key words Cullin; CRL; E3 ligase; ubiquitination; protein degradation

前言

细胞中的很多信号通路是通过泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)选择性降解

某些关键调控蛋白来实现调控的。靶蛋白的泛素化一般需要三个酶的共同作用,首先是E1活化酶来活化泛素分子,然后E2结合酶来“抱持”活化的泛素分子,最后由结合特异性底物的E3泛素连接酶与E2将泛素蛋白共价转移到靶蛋白的一个或多个赖氨酸残基上^[1-3]。细胞内每时每刻都有数以千计的蛋白泛素化过程在进行,这种对特定蛋白高度特异的降解机制主要是由E3泛素连接酶决定的,因此E3连接酶

*通讯作者。Tel: 021-54921281, E-mail: dgao@sibcb.ac.cn

国家自然科学基金(批准号: 81372602)资助的课题

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921281, E-mail: dgao@sibcb.ac.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81372602)

网络出版时间: 2014-02-13 13:42

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.02.9002.html>

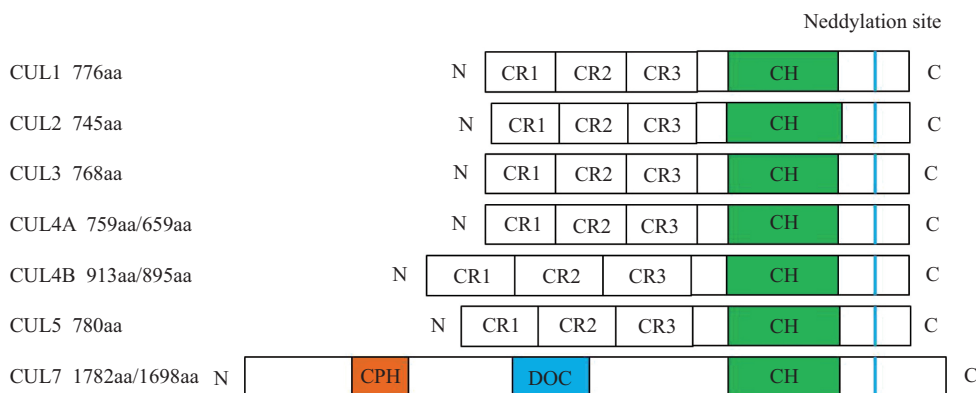
在靶蛋白的降解过程中是决定性的中心角色。含有Ring结构域的E3泛素连接酶是一个庞大的E3泛素连接酶类群,负责大概约20%的蛋白泛素化降解,而由Cullin蛋白等组成的Cullin-Ring Ligase (CRL)所调控的降解事件,在其中占有相当大的比例。Cullin (Cul)家族在1996年被首次报道能够形成调节细胞周期的活性复合体^[4],在人类基因组中有6个成员蛋白,分别是Cul1、Cul2、Cul3、Cul4A、Cul4B、Cul5及Cul7^[5-6]。Cullin家族蛋白有着较为相似的结构,所有6个Cul蛋白都有保守的Cul同源结构域(cullin homology domain, CHD)(图1),其功能是结合整个复合物中的真正具有活性的亚基Ring结构域蛋白Rbx1或Rbx2;除了Cul7外的5个成员还都在N-端有3个串联结构的Cul重复序列(cullin repeat, CR),用于结合E3泛素连接酶复合体中的底物识别亚基。本家族蛋白构成的Cullin-Ring Ligase (CRL)类型的E3连接酶复合体,自从近二十年前被发现和定义至今^[7-8],由于其复杂的结构及其在细胞周期、信号转导、发育等生理过程中的重要功能,越来越成为蛋白泛素化降解领域的热点。本文将对Cul家族各成员分子的研究现状和近期CRL功能研究的一些成果作一简单介绍。

1 Cul1

Cul1最早在线虫中被发现与细胞周期调控有关, Kipreos等^[5]在秀丽隐杆线虫中将*cull1*基因突变后,细胞出现了G₁-S期增加、有丝分裂停滞的现象,并有大量异常的小细胞产生,组织出现了畸形增

长,他们因此认为*cull1*基因在细胞周期中起到负调控作用。随后, Cul1在酵母中的同源物被发现特异性催化细胞周期蛋白激酶(CDK)抑制物的降解^[7,9]。Harper与Ellege的研究组^[8]发现,有一类蛋白含有与细胞周期蛋白F相似的一段序列(F-box),并可通过此种序列与Skp1及Cul1结合来催化底物的泛素化,他们把该类蛋白统称为F-box蛋白。结合前人的工作,他们正式提出了Cul1与Skp1及F-box蛋白形成E3泛素连接酶复合物CRL1(也被称为Skp1-Cul1-F-box, SCF)并催化多种底物降解的模型,并预言该类型的CRL可能调控数以千计的蛋白降解事件^[8]。在SCF模型提出后不久,一个典型的CRL E3连接酶复合体, SCF-Skp2的结构就得到了结构生物学的解析。结构研究表明,在SCF-Skp2连接酶复合体中,含有776个氨基酸残基的Cul1就像一个介导Skp1-F box (Skp2)和Rbx1亚基连接的支架,维持它们约100埃的距离,其结构类似一个火柴棒,由一个N-端杆状区域和一个C-端球状区域组成。球状区域通过 β -折叠与Ring蛋白Rbx1相连形成一个2亚基的催化中心,可以招募泛素连接酶。杆状区域包括3个重复和1个典型的5螺旋的序列,在它的头部和Skp1-F box (Skp2)蛋白底物识别复合体相结合^[10-11](图2)。通过这种结构,SCF仅仅需要更换结合底物的F-box蛋白,就可以实现对不同底物的特异性降解,而人类基因组中至今已有68个F-box蛋白并发现和鉴定,它们中的大多数均可以形成CRL1复合体^[12-13]。

根据F-box蛋白所包含的F-box之外的结构



Cul 1-5的N-端含有Cul重复结构(cullin repeat, CR)和C-端的Cul同源区(cullin homology domain, CH)。Cul含有两个独有的CPH和DOC结构。所有的Cul蛋白在靠近C-端处均含有一个保守且对功能至关重要的Neddy8修饰位点。

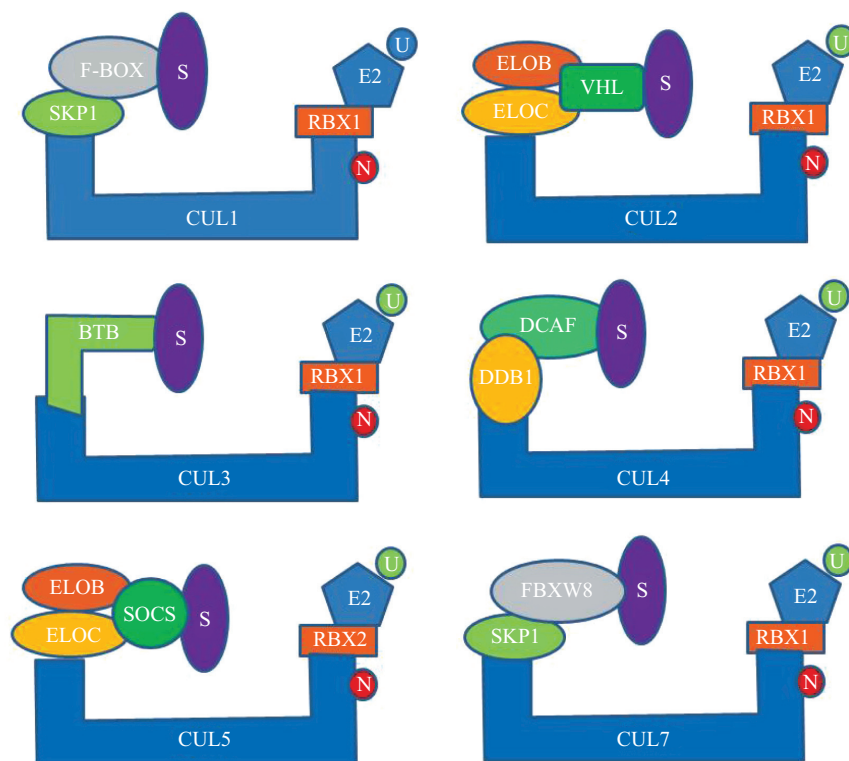
Cul 1-5 contain a Cul repeat domain (CR) and a Cullin homology domain (CH) at the N-terminus and C-terminus respectively, while Cul7 contains CPH and DOC region in addition to the C-terminal Cullin homology domain. All Cul proteins contain a conserved C-terminal Neddy8 conjugation site.

图1 Cul家族蛋白的结构示意图

Fig.1 Schematic domain organization of Cul proteins

域, 可以大致分为三种类型: 含有WD40重复序列(WD40 repeats)的F-box蛋白, 命名为Fbw-X (X为数字, 下同); 含有富亮氨酸重复结构域(leucine rich repeats)的F-box蛋白, 命名为Fbl-X; 以及不含有以上两种结构域的蛋白, 命名为Fbo-X^[14]。三种类型的F-box蛋白均可以参与形成有功能的CRL1泛素连接酶。有意思的是, 目前研究发现, 许多F-box蛋白与泛素化底物的结合需要底物分子在特定的位点被磷酸化, 这段序列被称作phospho degron。这就意味着特定底物的泛素化降解必须伴随着某种激酶信号通路的活化, 从而为蛋白泛素化降解提供了一种精确调控的机制^[13]。下面对研究较为深入的三个F-box蛋白Skp2 (Fbl1)、 β -Trcp1/ β -Trcp2 (Fbw1/Fbw11)以及Fbw7逐一介绍。最初, Skp2 (Fbl1)作为细胞周期激酶复合体的结合蛋白被发现^[15], 然后Pagano研究组^[16]发现, Skp2-SCF复合体能够在细胞周期激酶抑制分子P27KIP1被细胞周期激酶磷酸化后, 催化其泛素化降解, 从而促进细胞的DNA复制和增殖。Skp2还被发现降解P21、P130等其他细胞周期负调因子^[17-18], 并可通过降解关键转录因子Foxo1来抑制

细胞的凋亡^[19]。但是, Skp2所结合降解的底物似乎没有一致特征的序列。临床研究表明, Skp2在包括乳腺癌、前列腺癌、白血病等多种恶性肿瘤中高表达^[20-22], 而且在转基因小鼠过表达Skp2可导致低程度的前列腺肿瘤和白血病等^[21,23], 所以Skp2是一个较强的原癌蛋白(onco-protein)。更有意思的是, Lin等^[24]和Wang等^[25]的结果表明, 虽然Skp2敲除的小鼠没有明显表型, 但当在P53、PTEN、Rb等经典抑癌基因(tumor suppressor)敲除的小鼠基础上进一步敲除Skp2时, 可以明显减弱或消除因为抑癌基因缺失导致的肿瘤。这提示Skp2可能是一个潜在重要的肿瘤治疗靶点^[26]。 β -Trcp1/ β -Trcp2是另外两个研究较多的同源F-box蛋白, 它们虽然由不同的基因编码, 却有着非常相似的结构与功能, 调控许多重要的蛋白降解过程, 到目前为止已有数十个泛素化降解底物被发现^[27]。比如, Winston等^[28]发现, β -Trcp能够催化Wnt信号通路的关键转录因子 β -Catenin的泛素化降解; β -Trcp还可以催化NF κ B的剪切和I κ B的降解从而促进炎症信号通路的活化^[29]; 此外, β -Trcp被发现调控多个激酶与磷酸酶的降解, 如PDCD4^[30]、Cd-



S代表泛素化降解底物, N代表活化的CRL所带有的Neddy8修饰。

S represents ubiquitination substrate and N indicates Neddy8 conjugation for each individual CRL complex.

图2 不同Cul组成的CRL复合体结构构成示意图

Fig.2 Architecture of CRL E3 complexes

c25A^[31]等。 β -Trcp通常识别并结合明确的磷酸化氨基酸基序D-S-G-X-X-S, 其中的X可以为任意氨基酸残基, 而两个S都需要被磷酸化以结合 β -TRCP。有趣的是, 虽然 β -Trcp降解细胞增殖与信号转导通路中的多个重要蛋白, 其敲除的小鼠并没有特别明显的表型^[32]。在Moberg等^[33]在利用果蝇系统筛选与增殖相关的基因时, 发现了一个突变后导致增殖的分子被命名为AGO, 随后秀丽线虫中的同源物Sel10及哺乳动物中的同源物Fbw7相继被克隆鉴定^[34]。后续的研究表明, Fbw7及其同源分子调控Cyclin E^[33]、Notch^[34-35]、c-Myc^[36]、c-Jun^[37]、mTOR^[38]、Mcl-1^[39-40]等多个细胞增殖生存相关蛋白的泛素化降解, 提示Fbw7可能是一个抑癌基因。这种推测在多种肿瘤里得到了证实, 研究发现, Fbw7在结肠癌、乳腺癌等恶性肿瘤中的突变率在10%左右^[41-42], 而在某些类型白血病中突变率甚至高达60%^[43], 而且Fbw7的突变状态直接与化疗药的疗效密切相关^[39-40]。Fbw7敲除的小鼠在胚胎发育中期的E11天左右死亡, 主要原因是消化器官发育畸形^[44]。另外, 最近的多个研究也提示, Fbw7在干细胞类群的增殖成熟过程中发挥重要功能^[45]。与 β -Trcp类似, Fbw7通常也只识别并降解磷酸化的底物, 且需要两个磷酸化位点。

除了上述三个较为经典、研究深入的F-box蛋白之外, 近期的研究还发现了其他一些F-box蛋白通过形成有活性的CRL泛素连接酶复合体来调控众多生理过程。例如, Fbw5被证明可降解重要的信号转导分子Tsc2^[46], 从而调控细胞对代谢生长的通路; Fbl5可被铁信号激活来调控IRP2的降解和细胞内的铁平衡^[47-48]; Fbl3可以通过降解转录因子CR1和CR2来调节细胞节律^[49]; 而最早鉴定的F-box蛋白Cyclin F, 虽然很早以前就被发现能形成SCF泛素连接酶复合体, 但其功能一直未知, 直到最近才发现其降解中心粒蛋白CP10来调节细胞有丝分裂^[50]。也有些F-box蛋白虽然含有一个F-box, 但并不能与Cul1结合形成CRL1泛素连接酶复合体, 而是有着独特的功能。Fbl10就是其中的典型例子, 虽然早期有报道认为它可能与Skp1-Cul1结合, 随后更加深入的研究证实其真实功能是一个组蛋白去甲基化酶, 调控组蛋白H3上K36位的甲基化水平并与干细胞的分化密切相关^[51]。

2 Cul2和Cul5

Cul2比Cul1稍短, 含有745个氨基酸残基(图1), 人

的Cul2基因在1998年首次被克隆出来^[52]。与Cul1通过Skp1-F-box的组合结合降解靶蛋白的方式不同的是, Cul2的桥接蛋白为Elongin B和Elongin C, 并通过Elongin B/C与von Hippel-Lindau (VHL)和Rbx1蛋白组装成E3泛素连接酶复合体CRL2^{pVHL}(图2), 也是目前研究最为深入、在癌症发生发展过程中最为重要的E3连接酶之一^[53-54]。在自然发生的癌症中, VHL经常存在突变, 有近70%的突变都是破坏了VHL与Elongin的结合^[54]。低氧诱导转录因子(hypoxia-inducing transcription factor 1 α , HIF-1 α)是一个低氧条件下高表达的转录因子, 调控血管生成、细胞迁移、代谢酶表达等一系列相关重要的基因表达。在正常氧气含量下, HIF-1 α 蛋白的多个脯氨酸残基位点可被氧化, 从而招募CRL2^{pVHL}导致HIF-1 α 的泛素化降解。在实体肿瘤内部低氧环境下或VHL基因突变的遗传背景下, HIF-1 α 得以逃脱CRL2^{pVHL}介导的泛素化降解, 从而导致HIF的蛋白水平升高, 并开启数以百计的下游基因的转录表达^[55-56]。有充分的证据表明, 肿瘤内部低氧的环境可以诱导HIF的表达, 进而促使癌细胞分泌细胞因子促使新的血管生成来为肿瘤提供营养, 或者促进肿瘤细胞的皮质-间质细胞转换来导致癌症患者病程的恶化。与这些研究一致的是, VHL的组织特异表达的老鼠模型显示, 在正常的氧气含量下, CRL2^{pVHL}介导的HIF-1 α 有效降解对多种细胞的存活、增殖、分化和维持正常的生理状态非常重要^[57]。这些研究解释了VHL的肿瘤抑制作用, 在生殖细胞中, VHL的突变会阻止CRL2复合体的形成或与HIF-1 α 的结合。后来又有人发现敲减VHL会使秀丽隐杆线虫的寿命显著增长, VHL和HIF-1 α 控制寿命的机理和饮食节制及胰岛素相似的信号途径不同, 这个发现使VHL成为了一个新的与长寿和体内蛋白稳态相关的基因^[58]。除了VHL外, 有研究表明, Cul2还可通过Elongin BC与mMED8^[59]、LRR1^[60]等形成E3泛素连接酶复合体, 但具体的组装机制、负责降解的靶蛋白种类及发挥的生理功能尚不清楚。

Cul5长780个氨基酸, 与Cul2结构类似, Cul5的N-端也有三个串联的CR结构域, C-端有一个CH结构域(图1)。与Cul2一样, Cul5蛋白的接头蛋白也是Elongin B和Elongin C, 但Cul2和Cul5介导了不同Cullin-Ring E3泛素连接酶(CRL)复合体的装配^[61-62]。Cullin5-Ring E3泛素连接酶复合体(CRL5)是由Cul5、Rbx2

和细胞因子信号抑制物结构域蛋白(suppressors of cytokine signaling-box蛋白, 简称为SOCS-box蛋白)(图2)组成^[61-62]。虽然有研究称CRL5只能利用SOCS蛋白而不是VHL作为底物识别蛋白, 但是现在尚不明确CRL2和CRL5分别通过特异结合VHL和SOCS-box蛋白来发挥功能的机制。虽然在人类基因组中有大约30个SOCS蛋白, 到目前为止只有少数几个的功能被鉴定和详细研究^[63]。最近有报导发现, Cul5和HIV蛋白病毒体感染因子Vif(HIV protein virion infectivity factor, 一种SOCS-box蛋白)能够形成CRL5 E3连接酶, 这种E3连接酶可以特异的介导人的抗病毒蛋白APOBEC3G的降解^[64]。虽然到目前为止, 尚无人建立Cul5的小鼠模型体系来进行功能研究, 但是通过秀丽线虫及果蝇等模式生物实验, 已有研究表明Cul5与神经突触的形成以及卵细胞的发生有关^[65-66], 而且这种功能可能是通过激活MPK-1的信号通路来完成的。因此, Cul5的生理功能及具体的调控机制还很不清楚, 有待于进一步的深入探寻。

3 Cul3

Cullin3(Cul3)与Cul1的大小结构相仿, 由768个氨基酸残基组成(图1)。但与其他Cul蛋白不同的是, CRL3中的Cul3可以直接与底物识别亚基BTB (bric-a-brac tramtrack, broad complex)类蛋白相结合^[67-68], 而并不需要一个额外的桥接蛋白, 如CRL1中的Skp1及CRL2/5中的Elongin B/C。因此, 一个典型的CRL3泛素连接酶复合体只包含Cul3、Rbx1、BTB蛋白三个亚基(图2)。可形成CRL3的BTB蛋白除了通过BTB结构域与Cul3结合外, 还需要一个辅助性的3-box结构域来稳定结合位置及一个与底物蛋白直接结合的蛋白相互作用结构域^[69]。因此, 虽然预测人类基因组内编码超过200个BTB蛋白, 可能只有一小部分能形成真正有活力的CRL3泛素连接酶复合体。

对CRL3功能的研究近年有了较长足的进展。细胞分裂是所有多细胞生物生长繁育过程中的关键环节, 而蛋白激酶aurora kinase B (Aurk B)特异性地定位在着丝粒附近的K-fibers微管上, 对有丝分裂或者减数分裂过程中染色体的分离起调节作用。研究发现, Cul3与BTB蛋白KLHL13和KLHL9构成一个蛋白复合体, Aurora B直接结合在KLHL9和KLHL13的底物识别区域, 从而以一种CRL3依赖的形式进行泛素化降解, 进而影响分裂中期染色体的成对排列、

中心体的形成及后续分裂的完成^[70]。Cul3在免疫方面也有重要作用。Mathew等^[71]通过条件性敲除Cul3基因证明了Cul3在早幼粒细胞性白血病锌指蛋白PLZF (promyelocytic leukaemia Zinc finger protein)及B细胞淋巴瘤蛋白BCL6 (B cell lymphoma 6)依赖的免疫细胞发育过程中的重要作用。他们发现, PLZF在NK细胞中主要与Cul3结合, 并转运Cul3入核, 组成一个染色体修饰复合体, 通过改变复合体的泛素方式来发挥作用。Cul3还可以与BTB-ZF转录因子BCL6相互作用, 影响B细胞和滤泡内T_H细胞的功能。因此, Cul3的这些功能可以通过调控白血病和淋巴瘤中的原癌蛋白PLZF和BCL6, 在疾病发生发展中起作用。Jin等^[72]发现, 在小鼠胚胎干细胞中敲除Klhl12或者Cul3基因后, 细胞排列变得更加紧密, 但增生受到延迟, 而在小鼠成纤维细胞中敲除Cul3后的效应较弱。其原理是KLHL12和Cul3的相互作用可诱导胶原蛋白运输过程中蛋白复合物II (coat protein complex II, COP II)组分Sec31的单泛素化。过表达KLHL12会导致大量货物蛋白(如原骨胶原蛋白)的转运和分泌, 进而使COP II囊泡的直径变小, 对于COP II囊泡的大小及大的货物分子的运输有重要作用。除了上述工作外, CRL3还被发现降解细胞骨架/迁移的关键蛋白RhoA^[73], 白血病相关的另一关键蛋白PML^[74], 以及细胞死亡相关激酶DAPK^[75]等。随着这些研究的不断发现, Cul3的重要功能正逐步被阐明, 也成为了CRL领域的新热点。

4 Cul4

人类基因组中含有两个线虫Cul4的同源蛋白, 分别被命名为Cul4A和Cul4B, 大小依次为759和913个氨基酸残基(图1), 它们的羧端有着高达近90%的同源性^[76]。与Cul1相仿, Cul4所形成的CRL4泛素连接酶复合体也需要一个特异的结头蛋白Ddb1来结合底物识别亚基DCAF (Ddb1 and Cul4 associated factors)蛋白, 进而结合并降解特异的底物(图2)。到目前为止, 人类基因组中已有近50个DCAF蛋白被发现鉴定, 大多数DCAF拥有WD40重复结构域, 并且通过保守的“WDXR”或“DXR”结构区介导DCAF与Ddb1的结合^[77-78]。近年来, 随着DNA损伤修复信号机制及表观遗传学分子机制方面研究的快速发展, 人们对于Cul4功能的原理及精细调控机制的了解也有了长足的进步, Cul4已成为Cul家族中最为热

门的研究对象。

到目前为止,研究最为深入的三个DCAF蛋白分别是Ddb2、CSA和Det1-Cop1。有意思的是,它们都是通过细胞核内调控基因组的修复或转录因子来发挥作用的。Cul4-Ddb1^{Ddb2}可以使组蛋白H2A、H3和H4^[79]以及DNA修复因子XPC^[80]发生泛素化。最近的研究发现,Cul4-Ddb1^{Ddb2}复合物可以响应DNA损伤信号,使组蛋白H2A^[81]、H3和H4^[79]发生单泛素化修饰。Cul4介导的组蛋白H3和H4的泛素化修饰改变了染色体的稳定性,更容易招募DNA修复蛋白(XPC)到损伤的DNA处^[79]。由于组蛋白H3的K4或K79发生甲基化需要H2B先发生泛素化修饰,所以泛素化修饰被认为是“组蛋白密码”的信号之一^[82-83]。除了使组蛋白发生直接的泛素化修饰,还有研究发现Cul4可以与甲基转移酶(CLR4、EED、WDR5和RBBP5)相互作用从而影响组蛋白的甲基化状态^[84-86]。Cul4-Ddb1^{CSA}可以使ATP依赖的染色质重塑酶SWI2/SNF2家族的成员之一的CSB发生泛素化修^[87]。在UV的刺激下,Cul4-Ddb1^{Ddb2}和Cul4-Ddb1^{CSA}通过不同的信号途径分别发挥全基因组修复GGR (global genome repair)和转录链修复TCR (transcription coupled repair)作用。这两种途径的主要区别在于损伤被发现的机制不同:被损伤的DNA (GGR)或通过被阻滞的RNA聚合酶 II (TCR)。尽管被同样的UV刺激诱发且CRL复合物组分类似,Cul4-Ddb1^{Ddb2}和Cul4-Ddb1^{CSA}的活性是通过COP9信号小体(CSN)经由不同的途径调控的^[88]。在GGR修复过程中,Cul4-Ddb1^{Ddb2}由于损伤的DNA和Ddb2的直接相互作用被募集到染色质区,具体的机制尚不是很清楚,目前认为是由XPC (xeroderma pigmentosum group C protein)、Rad23B和Centrin组成的复合物通过与损伤的DNA和Ddb2直接相互作用被招募到DNA损伤的位点^[89-90]。然后,CSN以未知的机制从Cul4-Ddb1^{Ddb2}上解离,导致连接酶的激活以及底物(XPC)、底物受体Ddb2和Cul4本身的多聚泛素化修饰。在TCR修复过程中,UV照射后引起高度磷酸化修饰的RNA聚合酶 II 停止在损伤的DNA区。首先,CSB被募集到RNA聚合酶 II 上,随后CSB起到后续招募NER蛋白、组蛋白乙酰基转移酶p300和非活化的与CSN结合的Cul4-Ddb1^{CSA}到RNA聚合酶 II 上的偶联因子的作用^[91]。Det1-Cop1是首先在植物中被深入研究的光信号通路的关键分子^[92]。在哺乳动

物细胞中,Cop1可利用自身带有的Ring结构独立作为E3泛素连接酶来催化p53⁹³、ETV⁹⁴等转录因子的降解。有意思的是,Cop1可以通过与Det1相互作用,成为CRL4复合体的底物识别亚基来催化转录因子复合体AP-1的核心因子——c-Jun的泛素化降解^[95]。在这种情况下,Cop1的Ring结构并没有发挥活性,而是利用CRL4复合体中Rbx1蛋白的Ring结构来实现泛素化功能的。

CRL1与CRL4除了结构类似,也有一些共同的降解底物。例如在哺乳动物中,两种泛素连接酶Cul1-Skp2^[96]和Cul4-Ddb1分别以不同的机制调控Cdt1的蛋白降解^[97]。Cdt1也被称为复制执照因子 (replication license factor),其降解调控在维持细胞内环境平衡中起着关键作用,是防止重新复制的主要机制^[98-99]。但只有Cul4-Ddb1在响应S期信号和DNA损伤时对Cdt1的蛋白降解是必需的^[97,100-102]。与典型的CRL1降解所需的 phospho degron序列不同,位于Cdt1蛋白N-端高度保守的PCNA结合结构域(PIP box)的降解信号负责响应S期和DNA损伤^[97,103-104]。另外的研究发现,Cul4-Ddb1被募集到染色质区也依赖于Cdt1与PCNA的相互作用^[104]。只有当DNA复制或者出现DNA损伤时PCNA才会与染色质结合并进而导致Cdt1的降解。在哺乳动物、斑马鱼和酵母中的研究发现,Cul4特异性因子Cdt2在Cul4-Ddb1依赖的Cdt1的降解中发挥了重要作用^[105-107],且Cdt2在DNA复制或者DNA损伤导致的Cdt1的蛋白降解过程是必需的。

近期的一项研究发现,CRL4^{DCAF1}可以催化降解孤儿核受体ROR α ,来调控下游基因*p21*的表达和影响乳腺癌细胞的增殖^[108]。该项研究发现,这种CRL4^{DCAF1}对ROR α 的特异识别与结合首先需要组蛋白甲基转移酶EZH2对ROR α 的38位赖氨酸残基进行甲基化^[108]。根据这一发现,预计可能有多达600个蛋白可能通过类似的机理被CRL4^{DCAF1}所识别和降解,因此,CRL4^{DCAF1}的功能可能远远超乎其他的CRL4复合物。而刚刚发表的一项工作恰恰证明了这一点,CRL4^{DCAF1}被发现通过直接结合DNA去甲基化过程的关键酶TET家族成员来激活TET的活性,进而调控卵母细胞的存活和稳定^[109]。虽然具体的分子机制尚不是很清楚,但实验显示CRL4的泛素连接酶活性和DCAF与TET蛋白的相互作用在此过程中都是必需的。

此外, CRL4还可能在病毒感染过程中发挥作用。如乙肝病毒的X蛋白(HBX)与DDB1结合从而有利于病毒的复制^[110-111], 这一过程可能与延长S期和促进细胞繁殖有关^[112]。

5 Cul7

Cullin7(Cul7)蛋白是由1 782个氨基酸组成的大分子蛋白质, 其结构与其他Cul家族成员有较大不同, 除了含有所有Cul家族成员蛋白都有的、与Rbx1结合的保守CH结构域, Cul7还包含两个独特的结构域: 一个与细胞间期促进复合体APC (anaphase-promoting complex)相同的DOC domain, 还有一个特殊的CPH结构域(conserved domain in Cul7, Parc and Herc2)^[113](图1)。Cul7独特的结构决定了其形成泛素连接酶的方式与其他CRL不同。Cul1的SCF复合体相比, 由于不含有N-端的CR结构域, 虽然Cul7也参与构成了SCF-Rbx1-like的E3泛素连接酶复合体, 包括Skp1、Cul7、某些F-box蛋白(Fbx29、Fbw8)和Rbx1, 但是Cul7是和Skp1、Fbx29组成的复合物相结合, 而不是与Skp1单独结合, 且与其他典型的CRL1 F-box蛋白如Trcp或者Skp2相互作用。因此, Cul7参与的是一种非典型的、少数F-box蛋白如Fbx29介导的泛素依赖性蛋白降解途径^[113]。同一研究组近期的另一项研究表明, Cul7还可与Skp1-Fbxw8形成有活性的泛素连接酶, 来催化胰岛素受体底物IRS1 (insulin receptor substrate 1, IRS1)的泛素化降解(图2), 而这种降解作用可被mTOR激酶的特异性抑制剂Rapamycin所抑制^[114]。在Cul7基因敲除的小鼠成纤维细胞中, IRS1的表达水平大量增加, 而且伴随着细胞周期蛋白激酶抑制物p16的升高和细胞的增殖受阻、提前衰老。这些结果提示, CRL7可能在细胞生长信号通路的复杂反馈机制方面起着关键的调控作用^[114]。

人们对Cul7的认识, 除了其分子水平上的蛋白降解功能外, 还发现Cul7基因突变可能与一种遗传病——3M综合征(3M syndrome)的发生相关^[115]。3M综合征是一种常染色体隐性遗传病, 患者表现出严重的产前产后生长迟缓、面部畸形、头大等症状, 但智力发育和内分泌正常。3M综合征的疾病相关基因和Cul7基因被定位于染色体同一区域, 而临床上对3M综合征的患者进行Cul7序列分析后, 发现了25个明显的突变, 其中有19个突变导致翻译提前终

止, 6个导致错义突变^[115-116]。

Arai等^[117]在进行Cul7基因敲除小鼠实验时发现, 怀孕母鼠因呼吸困难而出现胎儿致死现象。而在胚胎发育的E10.5天到E12.5天期间, 会有一小部分胚胎消失。在E12.5天的时候, Cul7-null的幸存胚胎和野生型的对照胚胎相比, 在大小和重量上没有差别, 而突变型的胎盘变得非常小。这可能是由于在妊娠阶段, Cul7-null的胚胎出现了严重的生长迟缓, 且胎盘也因血管结构异常而出现了滋养层系统无法分化的情况。可见, Cul7在人体及小鼠胚胎发育过程中均有重要的调控作用, 但在此过程中其发挥功能的具体分子机制尚有待深入研究。

6 CRL复合体的重要调控机制

由前述可见, CRL泛素连接酶主要有两个功能区, N-端的底物识别/结合区, 以及C-端的泛素结合/转移区, 因此对CRL功能调控也主要集中于这两个部位。Nedd8是一个与泛素大小相似且有相当同源性的分子, 可以共价连接到Cul家族蛋白C-端的特定位点, 如Cul1的720位赖氨酸^[118-119]。这一反应被特定的Nedd8活化-连接酶体系所催化, 且需要Rbx1分子的参与来协调Cul1与未连接的Nedd8的相对位置^[120]。虽然早期的研究证实, Nedd8修饰的CRL能够更有效地在体内催化底物的泛素化降解, 并针对Nedd8活化-连接酶体系开发了著名的小分子抑制剂MLN4924^[121], 但Nedd8修饰对CRL功能的调控机制并不清楚。直到最近的结构生物学进展清晰地解析了Nedd8修饰的Cul5-Rbx1复合物的结构, 才较圆满地回答了这个问题^[120]。实际上, Cul分子C-端的Nedd8修饰, 可通过调整Cul分子C-端的构象, 来改变Rbx1与CRL复合物N-端底物的距离和相对位置, 从而使泛素分子从Rbx1转移至底物蛋白的过程迅速和便利。除了催化Cul蛋白Nedd8修饰的UBC12-DCN系统外^[122], 还有一套去Nedd8修饰的特异酶-CSN酶家族来负调控CRL复合体活性^[123]。但目前尚不清楚这两套系统是如何在不同条件下以协同/拮抗的方式, 保证特定CRL泛素连接酶对某一底物蛋白的有效降解的。

既然多数Cul家族蛋白可以通过结合不同底物识别亚基来组成不同的CRL以降解不同的底物, 那么这种不同底物亚基之间是如何切换的呢? 一种调控方式是这些底物识别亚基在不同的时间空间

分布的细胞里丰度是不同的,如结合Cul的F-box蛋白Skp2,只在细胞周期的S和G₂期表达,所以CRL^{Skp2}也只在S和G₂期活跃以激活细胞周期激酶CDK^[13]。另一种更通常的机制是通过Cand1蛋白的作用。人Cand1是由1 230个氨基酸残基组成的蛋白,可以以1:1的方式同时结合同一个Cul分子的N-端和C-端来改变其构象,促进底物识别亚基从CRL复合体上的解离^[124]。研究还发现,处于Nedd8修饰状态的Cul分子不能结合Cand1,因此,底物结合亚基的切换只能在CRL完成泛素化靶蛋白过程,且已经去除Nedd8修饰之后才能进行。当新的底物结合亚基结合到Cul分子上,引起Cand1蛋白的构象变化并离开Cul分子,然后Nedd8活化-连接酶体系将重新修饰Cul,新CRL的装配-激活过程才正式完成,并开始泛素化下一个底物蛋白^[125]。

综上所述,Cul家族蛋白及其结合蛋白构成了一个巨大的、可能由多达200个不同的泛素连接酶复合物组成的体系,调控数以千计的蛋白分子的泛素化降解过程,并与肿瘤、遗传缺陷等疾病的发生密切相关。从CRL概念的提出至今的近20年里,许多研究人员通过生物化学、遗传学、结构生物学等技术手段和持续不断的努力,已经初步阐明了Cul家族蛋白的具体功能及调控机制,为进一步探索和开发针对性的药物奠定了基础。但是,仍有许多的问题等待我们去探究。相信随着研究的深入,我们会发现Cul家族蛋白与CRL更多的重要功能,并利用这些知识为攻克疾病和增进人类健康作出贡献。

参考文献 (References)

- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 425-79.
- Schulman BA, Harper JW. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(5): 319-31.
- Wenzel DM, Stoll KE, Klevit RE. E2s: Structurally economical and functionally replete. *Biochem J* 2011; 433(1): 31-42.
- Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, *et al.* SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 1996; 86(2): 263-74.
- Kipreos ET, Lander LE, Wing JP, He WW, Hedgecock EM. cul-1 is required for cell cycle exit in *C. elegans* and identifies a novel gene family. *Cell* 1996; 85(6): 829-39.
- Guardavaccaro D, Pagano M. Oncogenic aberrations of cullin-dependent ubiquitin ligases. *Oncogene* 2004; 23(11): 2037-49.
- Feldman RM, Correll CC, Kaplan KB, Deshaies RJ. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* 1997; 91(2): 221-30.
- Skowyra D, Craig KL, Tyers M, Elledge SJ, Harper JW. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 1997; 91(2): 209-19.
- Willems AR, Lanker S, Patton EE, Craig KL, Nason TF, Mathias N, *et al.* Cdc53 targets phosphorylated G₁ cyclins for degradation by the ubiquitin proteolytic pathway. *Cell* 1996; 86(3): 453-63.
- Schulman BA, Carrano AC, Jeffrey PD, Bowen Z, Kinnucan ER, Finnin MS, *et al.* Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature* 2000; 408(6810): 381-6.
- Zheng N, Schulman BA, Song L, Miller JJ, Jeffrey PD, Wang P, *et al.* Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* 2002; 416(6882): 703-9.
- Jin J, Cardozo T, Lovering RC, Elledge SJ, Pagano M, Harper JW. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev* 2004; 18(21): 2573-80.
- Skaar JR, Pagan JK, Pagano M. Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14(6): 369-81.
- Cardozo T, Pagano M. The SCF ubiquitin ligase: Insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 739-51.
- Zhang H, Kobayashi R, Galaktionov K, Beach D. p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell* 1995; 82(6): 915-25.
- Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* 1999; 1(4): 193-9.
- Bornstein G, Bloom J, Sitry-Shevah D, Nakayama K, Pagano M, Hershko A. Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J Biol Chem* 2003; 278(28): 25752-7.
- Tedesco D, Lukas J, Reed SI. The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF(Skp2). *Genes Dev* 2002; 16(22): 2946-57.
- Huang H, Regan KM, Wang F, Wang D, Smith DI, van Deursen JM, *et al.* Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(5): 1649-54.
- Yang G, Ayala G, De Marzo A, Tian W, Frolov A, Wheeler TM, *et al.* Elevated Skp2 protein expression in human prostate cancer: Association with loss of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and PTEN and with reduced recurrence-free survival. *Clin Cancer Res* 2002; 8(11): 3419-26.
- Latres E, Chiarle R, Schulman BA, Pavletich NP, Pellicer A, Inghirami G, *et al.* Role of the F-box protein Skp2 in lymphomagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(5): 2515-20.
- Signoretti S, Di Marcotullio L, Richardson A, Ramaswamy S, Isaac B, Rue M, *et al.* Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in human breast cancer. *J Clin Invest* 2002; 110(5): 633-41.
- Shim EH, Johnson L, Noh HL, Kim YJ, Sun H, Zeiss C, *et al.* Expression of the F-box protein SKP2 induces hyperplasia, dysplasia, and low-grade carcinoma in the mouse prostate. *Cancer Res* 2003; 63(7): 1583-8.
- Lin HK, Chen Z, Wang G, Nardella C, Lee SW, Chan CH, *et al.* Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature* 2010; 464(7287): 374-9.

- 25 Wang H, Bauzon F, Ji P, Xu X, Sun D, Locker J, *et al.* Skp2 is required for survival of aberrantly proliferating Rb1-deficient cells and for tumorigenesis in *Rb1^{+/-}* mice. *Nat Genet* 2010; 42(1): 83-8.
- 26 Wang Z, Gao D, Fukushima H, Inuzuka H, Liu P, Wan L, *et al.* Skp2: A novel potential therapeutic target for prostate cancer. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1825(1): 11-7.
- 27 Frescas D, Pagano M. Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: Tipping the scales of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(6): 438-49.
- 28 Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ, Harper JW. The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination *in vitro*. *Genes Dev* 1999; 13(3): 270-83.
- 29 Yaron A, Hatzubai A, Davis M, Lavon I, Amit S, Manning AM, *et al.* Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase. *Nature* 1998; 396(6711): 590-4.
- 30 Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M. S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* 2006; 314(5798): 467-71.
- 31 Busino L, Donzelli M, Chiesa M, Guardavaccaro D, Ganoth D, Dorrello NV, *et al.* Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage. *Nature* 2003; 426(6962): 87-91.
- 32 Kudo Y, Guardavaccaro D, Santamaria PG, Koyama-Nasu R, Latres E, Bronson R, Yamasaki L, *et al.* Role of F-box protein betaTrcp1 in mammary gland development and tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 2004; 24(18): 8184-94.
- 33 Moberg KH, Bell DW, Wahrer DC, Haber DA, Hariharan IK. Archipelago regulates Cyclin E levels in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Nature* 2001; 413(6853): 311-6.
- 34 Gupta-Rossi N, Le Bail O, Gonen H, Brou C, Logeat F, Six E, *et al.* Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor. *J Biol Chem* 2001; 276(37): 34371-8.
- 35 Oberg C, Li J, Pauley A, Wolf E, Gurney M, Lendahl U. The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J Biol Chem* 2001; 276(38): 35847-53.
- 36 Yada M, Hatakeyama S, Kamura T, Nishiyama M, Tsunematsu R, Imaki H, *et al.* Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J* 2004; 23(10): 2116-25.
- 37 Nateri AS, Riera-Sans L, Da Costa C, Behrens A. The ubiquitin ligase SCFFbw7 antagonizes apoptotic JNK signaling. *Science* 2004; 303(5662): 1374-8.
- 38 Mao JH, Kim IJ, Wu D, Climent J, Kang HC, DelRosario R, *et al.* FBXW7 targets mTOR for degradation and cooperates with PTEN in tumor suppression. *Science* 2008; 321(5895): 1499-502.
- 39 Inuzuka H, Shaik S, Onoyama I, Gao D, Tseng A, Maser RS, *et al.* SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature* 2011; 471(7336): 104-9.
- 40 Wertz IE, Kusam S, Lam C, Okamoto T, Sandoval W, Anderson DJ, *et al.* Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature* 2011; 471(7336): 110-4.
- 41 Rajagopalan H, Lengauer C. hCDC4 and genetic instability in cancer. *Cell Cycle* 2004; 3(6): 693-4.
- 42 Rajagopalan H, Jallepalli PV, Rago C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, *et al.* Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature* 2004; 428(6978): 77-81.
- 43 Maser RS, Choudhury B, Campbell PJ, Feng B, Wong KK, Protopopov A, *et al.* Chromosomally unstable mouse tumours have genomic alterations similar to diverse human cancers. *Nature* 2007; 447(7147): 966-71.
- 44 Tetzlaff MT, Yu W, Li M, Zhang P, Finegold M, Mahon K, *et al.* Defective cardiovascular development and elevated cyclin E and Notch proteins in mice lacking the Fbw7 F-box protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(10): 3338-45.
- 45 Wang Z, Inuzuka H, Fukushima H, Wan L, Gao D, Shaik S, *et al.* Emerging roles of the FBW7 tumour suppressor in stem cell differentiation. *EMBO Rep* 2012; 13(1): 36-43.
- 46 Hu J, Zacharek S, He YJ, Lee H, Shumway S, Duronio RJ, *et al.* WD40 protein FBW5 promotes ubiquitination of tumor suppressor TSC2 by DDB1-CUL4-ROC1 ligase. *Genes Dev* 2008; 22(7): 866-71.
- 47 Vashisht AA, Zumbrennen KB, Huang X, Powers DN, Durazo A, Sun D, *et al.* Control of iron homeostasis by an iron-regulated ubiquitin ligase. *Science* 2009; 326(5953): 718-21.
- 48 Salahudeen AA, Thompson JW, Ruiz JC, Ma HW, Kinch LN, Li Q, *et al.* An E3 ligase possessing an iron-responsive hemerythrin domain is a regulator of iron homeostasis. *Science* 2009; 326(5953): 722-6.
- 49 Godinho SI, Maywood ES, Shaw L, Tucci V, Barnard AR, Busino L, *et al.* The after-hours mutant reveals a role for Fbxl3 in determining mammalian circadian period. *Science* 2007; 316(5826): 897-900.
- 50 D'Angiolella V, Donato V, Vijayakumar S, Saraf A, Florens L, Washburn MP, *et al.* SCF(Cyclin F) controls centrosome homeostasis and mitotic fidelity through CP110 degradation. *Nature* 2010; 466(7302): 138-42.
- 51 He J, Kallin EM, Tsukada Y, Zhang Y. The H3K36 demethylase Jhdmlb/Kdm2b regulates cell proliferation and senescence through p15(Ink4b). *Nat Struct Mol Biol* 2008; 15(11): 1169-75.
- 52 Michel JJ, Xiong Y. Human CUL-1, but not other cullin family members, selectively interacts with SKP1 to form a complex with SKP2 and cyclin A. *Cell Growth Differ* 1998; 9(6): 435-49.
- 53 Pause A, Lee S, Worrell RA, Chen DY, Burgess WH, Linehan WM, *et al.* The von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene product forms a stable complex with human CUL-2, a member of the Cdc53 family of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(6): 2156-61.
- 54 Lonergan KM, Iliopoulos O, Ohh M, Kamura T, Conaway RC, Conaway JW, *et al.* Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol Cell Biol* 1998; 18(2): 732-41.
- 55 Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; 399(6733): 271-5.
- 56 Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(11): 865-73.

- 57 Kapitsinou PP, Haase VH. The VHL tumor suppressor and HIF: Insights from genetic studies in mice. *Cell death and differentiation* 2008; 15(4): 650-9.
- 58 Mehta R, Steinkraus KA, Sutphin GL, Ramos FJ, Shamieh LS, Huh A, *et al.* Proteasomal regulation of the hypoxic response modulates aging in *C. elegans*. *Science* 2009; 324(5931): 1196-8.
- 59 Brower CS, Sato S, Tomomori-Sato C, Kamura T, Pause A, Stearman R, *et al.* Mammalian mediator subunit mMED8 is an Elongin BC-interacting protein that can assemble with Cul2 and Rbx1 to reconstitute a ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(16): 10353-8.
- 60 Starostina NG, Simpliciano JM, McGuirk MA, Kipreos ET. CRL2(LRR-1) targets a CDK inhibitor for cell cycle control in *C. elegans* and actin-based motility regulation in human cells. *Dev Cell* 2010; 19(5): 753-64.
- 61 Kamura T, Maenaka K, Kotoshiba S, Matsumoto M, Kohda D, Conaway RC, *et al.* VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Dev* 2004; 18(24): 3055-65.
- 62 Mahrour N, Redwine WB, Florens L, Swanson SK, Martin-Brown S, Bradford WD, *et al.* Characterization of Cullin-box sequences that direct recruitment of Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules to Elongin BC-based ubiquitin ligases. *J Biol Chem* 2008; 283(12): 8005-13.
- 63 Muniz JR, Guo K, Kershaw NJ, Ayinampudi V, von Delft F, Babon JJ, *et al.* Molecular architecture of the ankyrin SOCS box family of Cul5-dependent E3 ubiquitin ligases. *J Mol Biol* 2013; 425(17): 3166-77.
- 64 Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, *et al.* Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 2003; 302(5647): 1056-60.
- 65 Sasagawa Y, Sato S, Ogura T, Higashitani A. *C. elegans* RBX-2-CUL-5- and RBX-1-CUL-2-based complexes are redundant for oogenesis and activation of the MAP kinase MPK-1. *FEBS Lett* 2007; 581(1): 145-50.
- 66 Ayyub C, Sen A, Gonsalves F, Badrinath K, Bhandari P, Shashidhara LS, *et al.* Cullin-5 plays multiple roles in cell fate specification and synapse formation during *Drosophila* development. *Dev Dyn* 2005; 232(3): 865-75.
- 67 Furukawa M, He YJ, Borchers C, Xiong Y. Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases. *Nat Cell Biol* 2003; 5(11): 1001-7.
- 68 Stogios PJ, Downs GS, Jauhal JJ, Nandra SK, Prive GG. Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biology* 2005; 6(10): R82.
- 69 Zhuang M, Calabrese MF, Liu J, Waddell MB, Nourse A, Hammel M, *et al.* Structures of SPOP-substrate complexes: Insights into molecular architectures of BTB-Cul3 ubiquitin ligases. *Mol Cell* 2009; 36(1): 39-50.
- 70 Sumara I, Quadroni M, Frei C, Olma MH, Sumara G, Ricci R, *et al.* A Cul3-based E3 ligase removes Aurora B from mitotic chromosomes, regulating mitotic progression and completion of cytokinesis in human cells. *Dev Cell* 2007; 12(6): 887-900.
- 71 Mathew R, Seiler MP, Scanlon ST, Mao AP, Constantinides MG, Bertozzi-Villa C, *et al.* BTB-ZF factors recruit the E3 ligase cullin 3 to regulate lymphoid effector programs. *Nature* 2012; 491(7425): 618-21.
- 72 Jin L, Pahuja KB, Wickliffe KE, Gorur A, Baumgärtel C, Schekman R, *et al.* Ubiquitin-dependent regulation of COPII coat size and function. *Nature* 2012; 482(7386): 495-500.
- 73 Chen Y, Yang Z, Meng M, Zhao Y, Dong N, Yan H, *et al.* Cullin mediates degradation of RhoA through evolutionarily conserved BTB adaptors to control actin cytoskeleton structure and cell movement. *Mol Cell* 2009; 35(6): 841-55.
- 74 Yuan WC, Lee YR, Huang SF, Lin YM, Chen TY, Chung HC, *et al.* A Cullin3-KLHL20 Ubiquitin ligase-dependent pathway targets PML to potentiate HIF-1 signaling and prostate cancer progression. *Cancer Cell* 2011; 20(2): 214-28.
- 75 Lee YR, Yuan WC, Ho HC, Chen CH, Shih HM, Chen RH. The Cullin 3 substrate adaptor KLHL20 mediates DAPK ubiquitination to control interferon responses. *EMBO J* 2010; 29(10): 1748-61.
- 76 Osaka F, Kawasaki H, Aida N, Saeki M, Chiba T, Kawashima S, *et al.* A new NEDD8-ligating system for cullin-4A. *Genes Dev* 1998; 12(15): 2263-8.
- 77 Angers S, Li T, Yi X, MacCoss MJ, Moon RT, Zheng N. Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. *Nature* 2006; 443(7111): 590-3.
- 78 Jin JP, Arias EE, Chen J, Harper JW, Walter JC. A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1. *Mol Cell* 2006; 23(5): 709-21.
- 79 Wang H, Zhai L, Xu J, Joo HY, Jackson S, Erdjument-Bromage H, *et al.* Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol Cell* 2006; 22(3): 383-94.
- 80 Sugawara K, Okuda Y, Saijo M, Nishi R, Matsuda N, Chu G, *et al.* UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* 2005; 121(3): 387-400.
- 81 Kapetanaki MG, Guerrero-Santoro J, Bisi DC, Hsieh CL, Rapić-Otrin V, Levine AS. The DDB1-CUL4A(DDB2) ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(8): 2588-93.
- 82 Jason LJ, Moore SC, Lewis JD, Lindsey G, Ausio J. Histone ubiquitination: A tagging tail unfolds? *Bioessays* 2002; 24(2): 166-74.
- 83 Osley MA. H2B ubiquitylation: the end is in sight. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1677(1/2/3): 74-8.
- 84 Higa LA, Wu M, Ye T, Kobayashi R, Sun H, Zhang H. CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation. *Nat Cell Biol* 2006; 8(11): 1277-83.
- 85 Horn P J, Bastie JN, Peterson CL. A Rik1-associated, cullin-dependent E3 ubiquitin ligase is essential for heterochromatin formation. *Gene Dev* 2005; 19(14): 1705-14.
- 86 Jia ST, Kobayashi R, Grewal SI. Ubiquitin ligase component Cul4 associates with Clr4 histone methyltransferase to assemble heterochromatin. *Nat Cell Biol* 2005; 7(10): 1007-13.
- 87 Groisman R, Kuraoka I, Chevallier O, Gaye N, Magnaldo T, Tanaka K, *et al.* CSA-dependent degradation of CSB by the ubiquitin-proteasome pathway establishes a link between complementation factors of the Cockayne syndrome. *Gene Dev* 2006; 20(11): 1429-34.
- 88 Higa LA, Zhang H. Stealing the spotlight: CUL4-DDB1 ubiquitin ligase docks WD40-repeat proteins to destroy. *Cell division*

- 2007; 2: 5.
- 89 Groisman R, Polanowska J, Kuraoka I, Sawada J, Saijo M, Drapkin R, *et al.* The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell* 2003; 113(3): 357-67.
- 90 Wang QE, Zhu QZ, Wani G, Chen JM, Wani AA. UV radiation-induced XPC translocation within chromatin is mediated by damaged-DNA binding protein, DDB2. *Carcinogenesis* 2004; 25(6): 1033-43.
- 91 Fousteri M, Vermeulen W, van Zeeland AA, Mullenders LHF. Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II *in vivo*. *Mol Cell* 2006; 23(4): 471-82.
- 92 Chen H, Shen Y, Tang X, Yu L, Wang J, Guo L, *et al.* *Arabidopsis* CULLIN4 forms an E3 ubiquitin ligase with RBX1 and the CDD complex in mediating light control of development. *Plant Cell* 2006; 18(8): 1991-2004.
- 93 Dornan D, Wertz I, Shimizu H, Arnott D, Frantz GD, Dowd P, *et al.* The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature* 2004; 429(6987): 86-92.
- 94 Vitari AC, Leong KG, Newton K, Yee C, O'Rourke K, Liu J, *et al.* COP1 is a tumour suppressor that causes degradation of ETS transcription factors. *Nature* 2011; 474(7351): 403-6.
- 95 Bianchi E, Denti S, Catena R, Rossetti G, Polo S, Gasparian S, *et al.* Characterization of human constitutive photomorphogenesis protein 1, a RING finger ubiquitin ligase that interacts with Jun transcription factors and modulates their transcriptional activity. *J Biol Chem* 2003; 278(22): 19682-90.
- 96 Li XH, Zhao QP, Liao R, Sun PQ, Wu XH. The SCFSkp2 ubiquitin ligase complex interacts with the human replication licensing factor Cdt1 and regulates Cdt1 degradation. *J Biol Chem* 2003; 278(33): 30854-8.
- 97 Nishitani H, Sugimoto N, Roukos V, Nakanishi Y, Saijo M, Obuse C, *et al.* Two E3 ubiquitin ligases, SCF-Skp2 and DDB1-Cul4, target human Cdt1 for proteolysis. *EMBO J* 2006; 25(5): 1126-36.
- 98 Arias EE, Walter JC. Replication-dependent destruction of Cdt1 limits DNA replication to a single round per cell cycle in *Xenopus* egg extracts. *Gene Dev* 2005; 19(1): 114-26.
- 99 Zhong WW, Feng H, Santiago FE, Kipreos ET. CUL-4 ubiquitin ligase maintains genome stability by restraining DNA-replication licensing. *Nature* 2003; 423(6942): 885-9.
- 100 Higa LA, Mihaylov IS, Banks DP, Zheng JY, Zhang H. Radiation-mediated proteolysis of CDT1 by CUL4-ROC1 and CSN complexes constitutes a new checkpoint. *Nat Cell Biol* 2003; 5(11): 1008-15.
- 101 Hu J, McCall CM, Ohta T, Xiong Y. Targeted ubiquitination of CDT1 by the DDB1-CUL4A-ROC1 ligase in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 2004; 6(10): 1003.
- 102 Takeda DY, Parvin JD, Dutta A. Degradation of Cdt1 during S phase is Skp2-independent and is required for efficient progression of mammalian cells through S phase. *J Biol Chem* 2005; 280(24): 23416-23.
- 103 Senga T, Sivaprasad U, Zhu W, Park JH, Arias EE, Walter JC, *et al.* PCNA is a cofactor for Cdt1 degradation by CUL4/DDB1-mediated N-terminal ubiquitination. *J Biol Chem* 2006; 281(10): 6246-52.
- 104 Arias EE, Walter JC. PCNA functions as a molecular platform to trigger Cdt1 destruction and prevent re-replication. *Nat Cell Biol* 2006; 8(1): 84-90.
- 105 Higa LA, Banks D, Wu M, Kobayashi R, Sun H, Zhang H. L2DTL/CDT2 interacts with the CUL4/DDB1 complex and PCNA and regulates CDT1 proteolysis in response to DNA damage. *Cell Cycle* 2006; 5(15): 1675-80.
- 106 Sansam CL, Shepard JL, Lai K, Ianari A, Danielian PS, Amsterdam A, *et al.* DTL/CDT2 is essential for both CDT1 regulation and the early G₂/M checkpoint. *Gene Dev* 2006; 20(22): 3117-29.
- 107 Ralph E, Boye E, Kearsley SE. DNA damage induces Cdt1 proteolysis in fission yeast through a pathway dependent on Cdt2 and Ddb1. *Embo Rep* 2006; 7(11): 1134-9.
- 108 Lee JM, Lee JS, Kim H, Kim K, Park H, Kim JY, *et al.* EZH2 generates a methyl degron that is recognized by the DCAF1/DDB1/CUL4 E3 ubiquitin ligase complex. *Mol Cell* 2012; 48(4): 572-86.
- 109 Yu C, Zhang YL, Pan WW, Li XM, Wang ZW, Ge ZJ, *et al.* CRL4 complex regulates mammalian oocyte survival and reprogramming by activation of TET proteins. *Science* 2013; 342(6165): 1518-21.
- 110 Leupin O, Bontron S, Schaeffer C, Strubin M. Hepatitis B virus X protein stimulates viral genome replication via a DDB1-dependent pathway distinct from that leading to cell death. *J Virol* 2005; 79(7): 4238-45.
- 111 Leupin O, Bontron S, Strubin M. Hepatitis B virus X protein and simian virus 5 V protein exhibit similar UV-DDB1 binding properties to mediate distinct activities. *J Virol* 2003; 77(11): 6274-83.
- 112 Martin-Lluesma S, Schaeffer C, Robert EI, van Breugel PC, Leupin O, Hantz O, *et al.* Hepatitis B virus X protein affects S phase progression leading to chromosome segregation defects by binding to damaged DNA binding protein 1. *Hepatology* 48(5): 1467-76.
- 113 Dias DC, Dolios G, Wang R, Pan ZQ. CUL7: A DOC domain-containing cullin selectively binds Skp1. Fbx29 to form an SCF-like complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(26): 16601-6.
- 114 Kim SJ, DeStefano MA, Oh WJ, Wu CC, Vega-Cotto NM, Finlan M, *et al.* mTOR complex 2 regulates proper turnover of insulin receptor substrate-1 via the ubiquitin ligase subunit Fbw8. *Mol Cell* 2012; 48(6): 875-87.
- 115 Huber C, Dias-Santagata D, Glaser A, O'Sullivan J, Brauner R, Wu K, *et al.* Identification of mutations in CUL7 in 3-M syndrome. *Nat Genetics* 2005; 37(10): 1119-24.
- 116 Huber C, Delezoide AL, Guimiot F, Baumann C, Malan V, Le Merrer M, *et al.* A large-scale mutation search reveals genetic heterogeneity in 3M syndrome. *Eur J Hum Genet* 2009; 17(3): 395-400.
- 117 Arai T, Kasper JS, Skaar JR, Ali SH, Takahashi C, DeCaprio JA. Targeted disruption of p185/Cul7 gene results in abnormal vascular morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(17): 9855-60.
- 118 Pan ZQ, Kentsis A, Dias DC, Yamoah K, Wu K. Nedd8 on cullin: Building an expressway to protein destruction. *Oncogene* 2004; 23(11): 1985-97.
- 119 Huang DT, Ayrault O, Hunt HW, Taherbhoy AM, Duda DM, Scott DC, *et al.* E2-RING expansion of the NEDD8 cascade confers specificity to cullin modification. *Mol Cell* 2009; 33(4): 483-95.
- 120 Duda DM, Borg LA, Scott DC, Hunt HW, Hammel M, Schulman BA. Structural insights into NEDD8 activation of cullin-RING li-

- gases: Conformational control of conjugation. *Cell* 2008; 134(6): 995-1006.
- 121 Soucy TA, Smith PG, Milhollen MA, Berger AJ, Gavin JM, Adhikari S, *et al.* An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature* 2009; 458(7239): 732-6.
- 122 Kurz T, Chou YC, Willems AR, Meyer-Schaller N, Hecht ML, Tyers M, *et al.* Dcn1 functions as a scaffold-type E3 ligase for cullin neddylation. *Mol Cell* 2008; 29(1): 23-35.
- 123 Enchev RI, Scott DC, da Fonseca PC, Schreiber A, Monda JK, Schulman BA, *et al.* Structural basis for a reciprocal regulation between SCF and CSN. *Cell Rep* 2012; 2(3): 616-27.
- 124 Pierce NW, Lee JE, Liu X, Sweredoski MJ, Graham RL, Larimore EA, *et al.* Cnd1 promotes assembly of new SCF complexes through dynamic exchange of F box proteins. *Cell* 2013; 153(1): 206-15.
- 125 Duda DM, Scott DC, Calabrese MF, Zimmerman ES, Zheng N, Schulman BA. Structural regulation of cullin-RING ubiquitin ligase complexes. *Curr Opin Struct Biol* 2011; 21(2): 257-64.