

文章编号 1006-8147(2023)01-0031-05

论著

核小体泛素连接酶 Bre1 的 eRING 结构域与泛素转移酶 Rad6 的相互作用研究

石萌, 向嵩

(天津医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 天津 300070)

摘要 目的:探究乳酸克鲁维酵母核小体泛素连接酶 Bre1 的 eRING 结构域与泛素转移酶 Rad6 的相互作用,解析 Bre1 的 RBD 结构域对该相互作用的影响。方法:在大肠杆菌中表达乳酸克鲁维酵母的 GST-Rad6、Rad6、Bre1 eRING 等蛋白并将它们纯化至纯度>95%,通过 GST-Rad6 下拉实验,结合蛋白免疫印迹实验研究 GST-Rad6 和 Bre1 的 eRING 结构域的相互作用及 Bre1 的 RBD 结构域对其相互作用的影响;通过 SPR 实验研究 Rad6 与 Bre1 的 eRING 结构域之间的相互作用。结果:乳酸克鲁维酵母的 GST-Rad6 与 Bre1 的 eRING 结构域存在相互作用,该相互作用可以被 Bre1 RBD 所抑制;GST 蛋白与乳酸克鲁维酵母 Bre1 的 eRING 存在相互作用,不可作为该蛋白的下拉标签使用。结论:Rad6 与 Bre1 的 eRING 结构域存在相互作用,该相互作用可以被 RBD 所抑制,GST 标签不适于乳酸克鲁维酵母的 eRING 相互作用研究。

关键词 Bre1;泛素;谷胱甘肽转移酶;蛋白质-蛋白质相互作用

中图分类号 Q51

文献标志码 A

Biochemical characterization of the interaction between the eRING domain in the nucleosome ubiquitin ligase Bre1 and the ubiquitin conjugating enzyme Rad6

SHI Meng, XIANG Song

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract **Objective:** To explore the interaction between the eRING domain of the nucleosome ribosome ubiquitin ligase Bre1 and the ubiquitin transferase Rad6 of *S. cerevisiae*, elucidate the influence of RBD domain of Bre1 to this interaction. **Methods:** GST-tagged *K. lactis* Rad6, Rad6, Bre1 eRING domain and related proteins were expressed in *E. coli* and purified to a purity of >95%. GST Rad6 pull-down experiments and Western blotting were performed to probe the interaction between the *K. lactis* Bre1 eRING domain and GST-Rad6 and the effect of the Bre1 RBD domain on their interaction. SPR experiments were performed to probe the interaction between the *K. lactis* Bre1 eRING domain and Rad6. **Results:** GST-tagged *K. lactis* Rad6 interacted strongly with the *K. lactis* Bre1 eRING domain, the interaction was inhibited by the *K. lactis* Bre1 RBD. The GST protein alone interacts with the *K. lactis* Bre1 eRING domain or its N-terminal CCNR domain, so the GST protein was not suitable for the pull-down tag in this experiment. **Conclusion:** Rad6 interacts with Bre1-eRING domain, and the interaction can be inhibited by RBD. GST tag is not suitable for the pull-down assay in *K. lactis*.

Key words Bre1; Ubiquitin; glutathione S-transferase; protein-protein interaction

核小体作为染色质的基本组成单位,由组蛋白和双链 DNA 组成^[1]。当双链 DNA 要执行转录或复制等一系列生命活动时,需要从核小体上释放出来,而这一过程主要依赖于组蛋白的翻译后修饰^[2-3]。泛素化作为组蛋白翻译后修饰的一种,主要发生在组蛋白 H2B^[4]。组蛋白 H2B 的 K123 位点的单泛素化修饰可以参与介导转录的起始和延伸^[5-6]、组蛋白 H3 上的甲基化修饰^[7-8]、DNA 的损伤应答和修复^[9-11]等一系列生命活动相关进程。组蛋白 H2B 的 K123 位点的单泛素化修饰,主要由泛素转移酶(E2)Rad6

以及泛素连接酶(E3)Bre1 介导^[12-14]。目前为止,二者如何发生相互作用并介导组蛋白 H2B 的 K123 位点单泛素化的机制仍不清楚。

Bre1 是目前发现的唯一可以介导 H2BK123 特异性泛素化修饰的 E3,在真核生物中具有高保守性。在其 C 端具有一个 RING 结构域(氨基酸 630~700),该结构域通过诱导泛素-E2 复合物的活性构象催化泛素由 E2 向底物的转移^[15]。eRING 结构域(Extended RING,氨基酸 494~700)作为最小的 E3 核心执行组蛋白 H2B 的 K123 位点特异性泛素化修饰。除 eRING 结构域外,Bre1 的 N 端具有一个 Rad6 结合结构域(Rad6 Binding Domain, RBD,氨基酸 1~220),可与 Rad6 发生强相互作用^[16-17]。

基金项目 国家自然科学基金面上项目(32071205)

作者简介 石萌(1994-),女,硕士在读,研究方向:生物学;通信作者:向嵩,E-mail:xiangsong@tmu.edu.cn。

本课题组近期解析了乳酸克鲁维酵母(*K.lac-tis*)细胞 Bre1 RBD 结构域与 Rad6 形成复合物的晶体结构,揭示了两者相互作用的分子机制。为深入研究 Bre1 与 Rad6 催化 H2B 单泛素化的机制,本研究基于酿酒酵母 Bre1 的 eRING 结构域与 GST-Rad6 的相互作用,探究了 Bre1 的 RBD 是否参与调控 E2 与 eRING 结构域的相互作用。

1 材料与方法

1.1 蛋白表达和纯化 本研究主要从乳酸克鲁维酵母细胞的 cDNA 库中进行目的基因扩增,插入表达载体进行蛋白质的表达和纯化。

Bre1 的 RBD 基因片段插入到 pET28A (Novagen)表达载体上,其 N 端带有组氨酸标签。质粒转化大肠杆菌 BL21 Rosetta(DE3)感受态细胞,并通过含有 34 mg/L 卡那霉素以及 25 mg/L 氯霉素的液态 LB 培养基内进行培养。待菌液在 600 nm 的吸光值到 0.6 时,将菌液降温至 16℃,并加入终浓度 0.25 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导 16 h,然后离心收集菌体。菌体通过含有 20 mmol/L Tris (pH7.5)、300 mmol/L NaCl、10 mmol/L 苯甲基磺酰氟、2 mmol/L β -巯基乙醇的裂胞液悬浮,每克细胞使用 50 mL 裂胞液悬浮。通过高压裂胞仪(ATS)进行裂胞,流速为 50 mL/min。先在压强为 300 磅每平方英尺进行 1 次循环,破碎大颗粒细胞块;然后在压强为 900 磅每平方英尺进行 3 次循环,使得细胞完全破碎。通过 15 000 g、45 min 的离心清除不可溶组分,使用镍-次氨基三乙酸纯化琼脂糖树脂富集目的蛋白,并通过含有 20 mmol/L Tris (pH7.5)、300 mmol/L NaCl、10 mmol/L 苯甲基磺酰氟、2 mmol/L β -巯基乙醇、300 mmol/L 咪唑的洗脱液洗脱。目的蛋白进一步通过离子交换柱 Heparin (Hitrap Heparin HP, GE healthcare)和凝胶过滤层析柱(Superdex 200 10/300, GE healthcare)纯化,获得纯度高达 95% 的目的蛋白。文章中涉及到的 Bre1 RBD 的突变体蛋白质表达和纯化方法与上述一致。

Bre1 的 eRING 基因片段插入到 pET28A 上,其 N 端带有组氨酸标签。通过突变的方式在组氨酸标签后插入 flag 标签。在此基础上,通过突变的方式删除 eRING 结构域内的 RING 结构域,获得 eRING 结构域内的 coiled-coil 区域,命名为 CCNR。蛋白的表达方法与 Bre1 RBD 类似。蛋白通过镍-次氨基三乙酸纯化琼脂糖树脂孵育富集,进一步通过离子交换柱 Heparin 和凝胶过滤层析柱(Superdex 75 10/300, GE healthcare)获得纯度高达 95% 的目的蛋白。

Rad6 的基因插入到 PEGX-5X-1 载体上,其 N

端带有 GST 标签。蛋白表达方法与 Bre1 RBD 类似。蛋白通过与谷胱甘肽琼脂糖树脂富集,并通过离子交换柱 Q (Hitrap Q HP, GE healthcare)以及凝胶过滤层析柱(Superdex 200 10/300, GE healthcare)进一步纯化,获得纯度高达 95% 的目的蛋白。GST 标签蛋白的表达和纯化采用类似的方法。

Rad6 的基因插入到 pET28A 上,其 N 端带有组氨酸标签。蛋白的表达方法与 Bre1 RBD 类似。蛋白通过镍-次氨基三乙酸纯化琼脂糖树脂孵育富集,进一步通过离子交换柱 Q (Hitrap Q HP, GE healthcare),获得目的蛋白后,通过 10 kD 浓缩管将蛋白浓缩至 1 mL,通过 Microdrop 测得蛋白浓度,按照每 0.1 mg 蛋白使用 0.5 U 的凝血酶对 Rad6 的 N 端组氨酸标签室温切割 2 h,通过凝胶过滤层析柱(Superdex 75 10/300, GE healthcare)获得纯度高达 95% 的无标签 Rad6 蛋白。

所有蛋白都在含有 20 mmol/L Tris (pH7.5)、200 mmol/L NaCl 和 2 mmol/L 二硫苏糖醇的缓冲液中保存,经液氮速冻后,储存在-80℃冰箱备用。

1.2 GST 下拉实验 7 μ mol/L 的 GST 蛋白或者 GST-Rad6 蛋白与 eRING 按照 1:2 的比例(若加入 RBD,则按照 GST/GST-Rad6:RBD=1:4 的比例)在含有 20 mmol/L Tris (pH 7.5)、200 mmol/L NaCl 的结合缓冲液中与谷胱甘肽琼脂糖树脂在 4℃下进行共同孵育。使用结合缓冲液对孵育后的磁珠进行冲洗,并通过含有 20 mmol/L Tris (pH 7.5)、200 mmol/L NaCl、10 mmol/L glutathione 的洗脱液对结合谷胱甘肽琼脂糖树脂的蛋白进行洗脱。使用 SDS-PAGE 分析和免疫印迹分析分析洗脱的蛋白质。使用鼠源 flag 抗体(F3165, MBL, 1:3 000 稀释)检测带有 flag 标签的 Bre1 eRING 结构域。

1.3 等离子表面共振 (SPR) 实验 SPR 实验是在 Biacore T200 上进行(中科院天津工业生物研究所)的。eRING 作为固定相被固定在 CM5 芯片上,将 Rad6 和 RBD 作为流动相流过芯片。数据用 Biacore evaluation 进行分析。

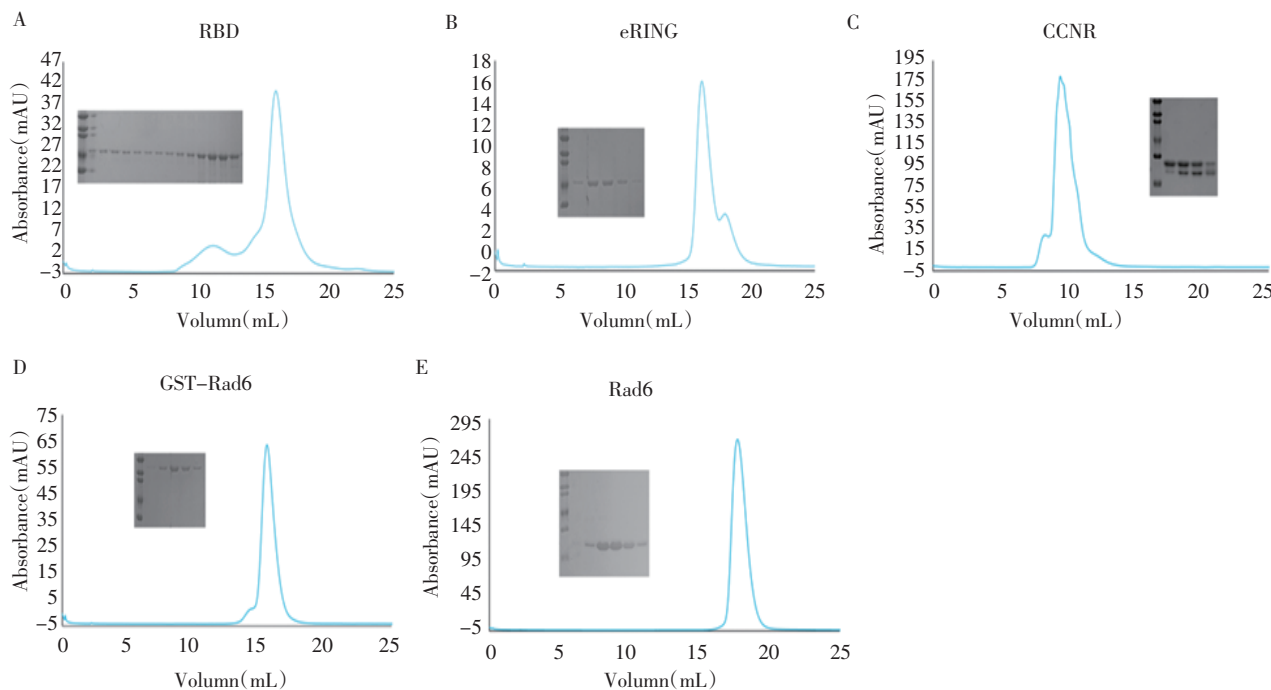
2 结果

2.1 蛋白质在细菌中的表达和纯化 经过摸索,发现离子交换柱 Heparin 可显著去除经过镍-次氨基三乙酸纯化琼脂糖树脂纯化后 RBD 蛋白过程中残留的杂蛋白,目的蛋白在离子柱上电导 40 左右出峰。凝胶过滤层析柱进一步将蛋白纯化,使其纯度高达 95% (图 1A)。经过镍-次氨基三乙酸纯化琼脂糖树脂纯化后,残留在 Bre1 eRING 和 CCNR 样品中的杂蛋白由离子交换柱 Heparin 去除,蛋白由凝

胶过滤柱进一步纯化,获得纯度高达 95%的目的蛋白(图 1B、1C)。GST-Rad6 经过谷胱甘肽琼脂糖凝胶富集后主要通过离子交换柱 Q 和凝胶过滤层析柱获得纯净的目的蛋白(图 1D)。无标签 Rad6 经过镍-次氨基三乙酸纯化琼脂糖树脂和离子交换柱 Q,进一步通过酶切去除标签,再经过凝胶过滤层析获得纯净蛋白(图 1E)。

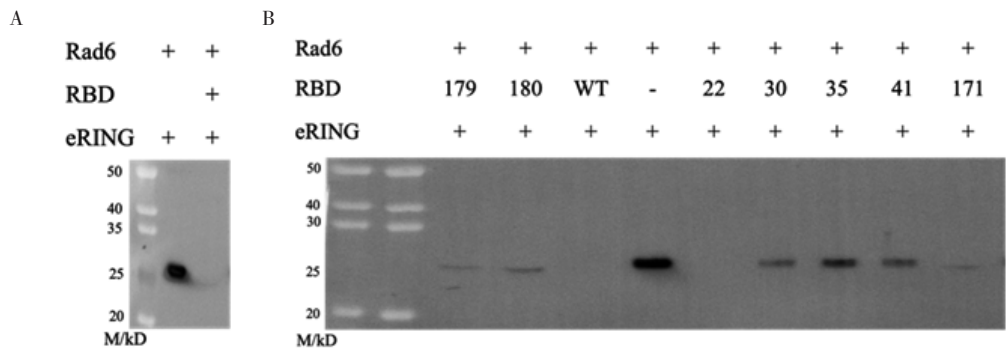
2.2 乳酸克鲁维酵母的 GST-Rad6 和 eRING 存在相互作用 与对酿酒酵母的研究一致,乳酸克鲁维

酵母的 GST-Rad6 与 Bre1 的 eRING 结构域具有显著的相互作用。而且,该相互作用可被 Bre1 RBD 结构域显著抑制(图 2A)。基于本课题组近期获得 Bre1 RBD 与 Rad6 的复合物结构信息,Bre1 RBD 上被引入了突变,削弱 Bre1 RBD 与 Rad6 之间的相互作用。使用这些突变体的研究表明,随着 Bre1 RBD 与 Rad6 之间相互作用力的减弱,Bre1 RBD 对于 GST-Rad6 与 eRING 之间相互作用的影响也发生不同程度的减弱(图 2B)。



注:A:用 S200 10/300 柱纯化 Bre1 RBD 蛋白的 SDS-PAGE 分析和分子筛柱洗脱图;B:用 S200 10/300 柱纯化 Bre1 eRING 结构域蛋白的 SDS-PAGE 分析和分子筛柱洗脱图;C:S75 10/300 柱纯化 Bre1 CCNR 结构域蛋白 SDS-PAGE 分析和分子筛柱洗脱图;D:S200 10/300 柱纯化 GST-Rad6 蛋白 SDS-PAGE 分析和分子筛柱洗脱图;E:S200 10/300 柱纯化无标签 Rad6 蛋白的 SDS-PAGE 分析和分子筛柱洗脱图

图 1 蛋白的纯化
Fig 1 Protein purification

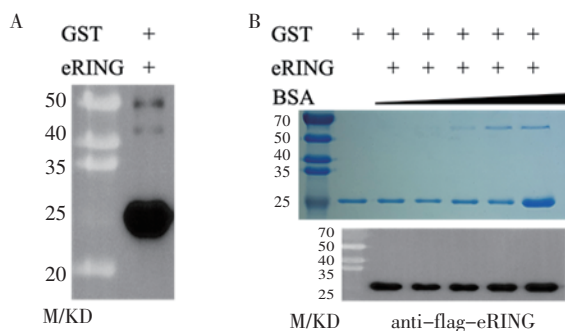


注:A、B:图中显示为 GST-Rad6 下拉 eRING 的 Western 印迹分析

图 2 乳酸克鲁维酵母的 GST-Rad6 与 Bre1 eRING 结构域的相互作用及 Bre1 RBD 结构域对相互作用的影响

Fig 2 The influence of Bre1 RBD on the interaction between GST-Rad6 and Bre1 eRING in *K. lactis*

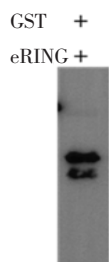
2.3 GST 存在对 eRING 的相互作用 本实验表明, GST 蛋白与乳酸克鲁维酵母 Bre1 的 eRING 有显著的相互作用(图 3A), 并且该相互作用不能被高浓度的牛血清蛋白所抑制(图 3B)。为了确定 Rad6 与 eRING 之间的相互作用是否对观察到的 GST-Rad6 域 eRING 的相互作用有贡献, 采用等离子表面共振技术(SPR)对无 GST 标签的 Rad6 与 eRING 之间的相互作用进行检测。结果表明, 不带有 GST 标签的乳酸克鲁维酵母 Rad6 与 Bre1 的 eRING 之间的相互作用不能被 SPR 实验检测到(图 3C)。



注:A:图中显示 GST 蛋白对 eRING 下拉情况的 Western 免疫印迹分析;B:上图显示 BSA 对 GST 下拉 eRING 影响情况的 SDS-PAGE 分析,下图为 eRING 的 Western 免疫印迹分析;C:图中显示为 SPR 技术检测无标签 Rad6 与 eRING 之间的相互作用分析

图 3 GST 与乳酸克鲁维酵母 Bre1 的 eRING 结构域的相互作用研究

Fig 3 The interaction between GST and Bre1 eRING in *K. lactis*



注:图中显示 CCNR 与 GST 相互作用的 Western 免疫印迹分析

图 4 GST 与乳酸克鲁维酵母 Bre1 的 CCNR 结构域的相互作用研究

Fig 4 The interaction between GST and Bre1 CCNR in *K. lactis*

3 讨论

Bre1 作为 RING 结构域家族的 E3, 具有一个典型的 RING 特征结构域: 主要由结合两个锌原子形成的锌指样结构构成^[18-20]。其可将泛素分子特异性转移到底物上, 完成底物的泛素化修饰^[21]。多个 RING 家族的 E3 酶可通过特殊结构域结合 E2 酶活性位点的背部, 调节 E2 酶的泛素化活性, 如 AO7^[22]、Rad18^[23]和 gp78^[24-25]。此外, 一些 RING 家族 E3 酶通过其 RING 结构域和 E2 发生相互作用, 从而实现底物蛋白的泛素化修饰, 如 RNF4^[26]。但目前还不清楚 E3 酶与 E2 酶活性位点背部的结合是否参与调节 E3 酶的 RING 结构域与 E2 酶之间的相互作用。

近期研究发现, 酿酒酵母的 Bre1 全长 700 个氨基酸, 其 C 端 RING 结构域可参与介导组蛋白特异

2.4 GST 与乳酸克鲁维酵母 Bre1 eRING 结构域 N 端的 coiled-coil 区域相互作用 为定位 GST 蛋白与乳酸克鲁维酵母 Bre1 eRING 之间的相互作用位点, 构建在 eRING 结构域中删除了 RING 结构域的片段。该片段只含有位于 RING 结构域 N 端的 coiled-coil 区域(CCNr, 氨基酸 468~609)。实验结果显示, CCNR 与 GST 之间存在明显的相互作用(图 4)。因此, GST 可与乳酸克鲁维酵母菌 Bre1 位于 RING 结构域 N 端的 coiled-coil 区域发生相互作用。

性的 H2B 的 K123 位点泛素化^[27-28]。此外, 其 eRING 结构域和带 GST 标签的 Rad6 有显著的相互作用, 该作用不依赖于 GST 蛋白而主要是由 Bre1 的 eRING 结构域介导^[28]。为探究 Bre1 的 RBD 结构域是否参与 Rad6 和 eRING 的相互作用, 笔者对乳酸克鲁维酵母菌属进行研究, 发现 GST-Rad6 与 eRING 的相互作用具有完全不同于酿酒酵母的表现, 两者的相互作用主要由 GST 蛋白介导。

本研究结果显示, 乳酸克鲁维酵母 Bre1 eRING 与 GST 蛋白存在显著的相互作用。在 SPR 实验中, 不带 GST 标签的 Rad6 与 eRING 之间的相互作用不能被检测到。因此, 本研究中观察到的乳酸克鲁维酵母 Bre1 eRING 与 GST-Rad6 的相互作用是由 GST 蛋白介导的, 且两者间的相互作用不是非特异的。而 Bre1 eRING 结构域本身对相互作用的贡献不显著。该结果与近期发表的对酿酒酵母的相似研究截然不同^[28]。本研究结果显示, Bre1 RBD 结构域对 Bre1 eRING 与 Rad6 的相互作用有显著的抑制。Bre1 RBD 与 Rad6 之间有强的相互作用^[28]。该相互作用介导形成稳定的 GST-Rad6 与 Bre1 RBD 的复合物。在复合物中, GST 标签上与 Bre1 eRING 的相互作用位点很可能被 Bre1 RBD 遮盖, 使得 GST-Rad6 与 Bre1 eRING 的相互作用受到抑制。而由突变引

起的 Bre1 RBD 与 Rad6 相互作用的减弱,使遮盖效应减弱,GST-Rad6 与 Bre1 eRING 之间的相互作用呈现出不同程度的恢复。

来源于酿酒酵母和乳酸克鲁维酵母的 Bre1 的 eRING 结构域的同源性高达 75%,其中完全相同的氨基酸占 58.9%。GST 作为一种常用蛋白质纯化标签和免疫印迹检测蛋白,却在结合这两种高度相似的 Bre1 的 eRING 结构域时,具有截然不同的表现。它不与酿酒酵母 Bre1 的 eRING 结合,而与乳酸克鲁维酵母 Bre1 的 eRING 有显著结合。因此,使用 GST 标签通过下拉实验研究相互作用时,需要仔细设计对照实验。

RING 结构域与相应 E2 酶的相互作用通常是瞬时、较弱、难以捕捉的。本研究未能通过 GST 下拉的方法捕捉到乳酸克鲁维酵母 Bre1 的 eRING 与 Rad6 的相互作用,因此未能深入研究 Bre1 的 RBD 结构域对相互作用的可能影响。通过使用其他的亲和标签,如 strep 标签、MBP 标签、flag 标签、HA 标签等,及相应的亲和纯化介质,有可能捕捉到乳酸克鲁维酵母 Bre1 的 eRING 与 Rad6 的相互作用;使用标签化的 Bre1,也可能对此有帮助。

参考文献:

- [1] ZHOU K, GAULLIER G, LUGER K. Nucleosome structure and dynamics are coming of age[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2019, 26(1): 3-13.
- [2] CUTLER J A, PERNER F, ARMSTRONG S A. Histone PTM crosstalk stimulates dot1 methyltransferase activity[J]. *Trends Biochem Sci*, 2021, 46(7): 522-524.
- [3] KUNADIS E, LAKIOTAKI E, KORKOLOPOULOU P, et al. Targeting post-translational histone modifying enzymes in glioblastoma[J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 220: 107721.
- [4] BONNET J, DEVYS D, TORA L. Histone H2B ubiquitination: signaling not scrapping[J]. *Drug Discov Today*, 2014, 12: e19-e27.
- [5] PACÉ V, CHEN J J, DURAND-DUBIEF M, et al. Histone H2B ubiquitylation regulates histone gene expression by suppressing antisense transcription in fission yeast[J]. *Genetics*, 2019, 213(1): 161-172.
- [6] SANSÓ M, PARUA P K, PINTO D, et al. Cdk9 and H2Bub1 signal to Ctr6-Ctr1/Rpd3S to suppress aberrant antisense transcription[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(13): 7154-7168.
- [7] HSU P L, SHI H, LEONEN C, et al. Structural basis of H2B ubiquitination-dependent H3K4 methylation by compass[J]. *Mol Cell*, 2019, 76(5): 712-723, e4.
- [8] WORDEN E J, HOFFMANN N A, HICKS C W, et al. Mechanism of cross-talk between H2B ubiquitination and H3 methylation by dot1L[J]. *Cell*, 2019, 176(6): 1490-1501, e12.
- [9] MOYAL L, LERENTHAL Y, GANA-WEISZ M, et al. Requirement of ATM-dependent monoubiquitylation of histone H2B for timely repair of DNA double-strand breaks[J]. *Mol Cell*, 2011, 41(5): 529-542.
- [10] JEUSSET L M, MCMANUS K J. Characterizing and exploiting the many roles of aberrant H2B monoubiquitination in cancer pathogenesis[J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 86(3): 782-798.
- [11] COLE A J, DICKSON K A, LIDDLE C, et al. Ubiquitin chromatin remodelling after DNA damage is associated with the expression of key cancer genes and pathways[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(3): 1011-1027.
- [12] WOOD A, KROGAN N J, DOVER J, et al. Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter[J]. *Mol Cell*, 2003, 11(1): 267-274.
- [13] HWANG W W, VENKATASUBRAHMANYAM S, IANCULESCU A G, et al. A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control[J]. *Mol Cell*, 2003, 11(1): 261-266.
- [14] ROBZYK K, RECHT J, OSLEY M A. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast[J]. *Science*, 2000, 287(5452): 501-504.
- [15] HORN V, UCKELMANN M, ZHANG H, et al. Structural basis of specific H2A K13/K15 ubiquitination by RNF168[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1751.
- [16] TURCO E, GALLEGOL D, SCHNEIDER M, et al. Monoubiquitination of histone H2B is intrinsic to the Bre1 RING domain-Rad6 interaction and augmented by a second Rad6-binding site on Bre1[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(9): 5298-5310.
- [17] KIM J, ROEDER R G. Direct Bre1-Paf1 complex interactions and RING finger-independent Bre1-Rad6 interactions mediate histone H2B ubiquitylation in yeast[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(31): 20582-20592.
- [18] FREEMONT P S, HANSON I M, TROWSDALE J. A novel cysteine-rich sequence motif[J]. *Cell*, 1991, 64(3): 483-484.
- [19] BARLOW P N, LUISI B, MILNER A, et al. Structure of the C3HC4 domain by 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. A new structural class of zinc-finger[J]. *J Mol Biol*, 1994, 237(2): 201-211.
- [20] BORDEN K L, BODDY M N, LALLY J, et al. The solution structure of the RING finger domain from the acute promyelocytic leukaemia proto-oncoprotein PML[J]. *EMBO J*, 1995, 14(7): 1532-1541.
- [21] MATTIROLI F, PENENGO L. Histone ubiquitination: an integrative signaling platform in genome stability[J]. *Trends Genet*, 2021, 37(6): 566-581.
- [22] LI S, LIANG Y H, MARIANO J, et al. Insights into ubiquitination from the unique clamp-like binding of the RING E3 AO7 to the E2 UbcH5B[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(51): 30225-30239.
- [23] HIBBERT R G, HUANG A, BOELEN R, et al. E3 ligase Rad18 promotes monoubiquitination rather than ubiquitin chain formation by E2 enzyme Rad6[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2011, 108(14): 5590-5595.
- [24] LOPATA A, KNISS A, LÖHR F, et al. Ubiquitination in the ERAD process[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): E5369.
- [25] DAS R, LIANG Y H, MARIANO J, et al. Allosteric regulation of E2: E3 interactions promote a processive ubiquitination machine[J]. *EMBO J*, 2013, 32(18): 2504-2516.
- [26] PLECHANOVÁ A, JAFFRAY E G, TATHAM M H, et al. Structure of aRING E3 ligase and ubiquitin-loaded E2 primed for catalysis[J]. *Nature*, 2012, 489(7414): 115-120.
- [27] KUMAR P, WOLBERGER C. Structure of the yeast Bre1 RING domain[J]. *Proteins*, 2015, 83(6): 1185-1190.
- [28] DENG Z H, AI H S, LU C P, et al. The Bre1/Rad6 machinery: writing the central histone ubiquitin mark on H2B and beyond[J]. *Chromosome Res*, 2020, 28(3/4): 247-258.