

# 肿瘤防治研究

Cancer Research on Prevention and Treatment

## 黑色素瘤抗原泛素连接酶的研究进展

严峻, 文静, 李希圣, 莫立根

引用本文:

严峻, 文静, 李希圣, 等. 黑色素瘤抗原泛素连接酶的研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2018, 45(05): 347-352.

YAN Jun, WEN Jing, LI Xisheng, et al. Research Progress on Melanoma-associated Antigen Gene-really Interesting New Gene (MAGE-RING) Ligases[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2018, 45(05): 347-352.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.17.1400>

## 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

### 足底恶性黑色素瘤术式选择及疗效分析

Selection of Surgical Methods and Curative Effect of Plantar Melanoma

肿瘤防治研究. 2019, 46(06): 537-542 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.1330>

### 维莫非尼在BRAF突变的肢端和黏膜型黑色素瘤患者中的有效性和安全性分析

Efficacy and Safety of Vemurafenib in Acral and Mucosal Melanoma Patients with BRAF Gene Mutation

肿瘤防治研究. 2018, 45(11): 879-882 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.18.0250>

### 沉默MCM7基因介导AKT信号通路参与黑色素瘤细胞增殖及凋亡的实验

MCM7 Knockdown Inhibits Migration and Invasion While Induces Apoptosis of Cutaneous Malignant Melanoma Cells Through AKT Signaling Pathway

肿瘤防治研究. 2018, 45(10): 739-745 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.18.0318>

### 肺腺癌组织中黑色素瘤相关抗原-As的表达及其临床意义

Expressions of Melanoma Antigen-As in Lung Adenocarcinoma Tissues and Related Clinical Significance

肿瘤防治研究. 2017, 44(8): 530-534 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2017.16.1316>

### PD1/PD-L1激活促进癌症发生、发展和转移的研究进展

Novel Findings on Activation of PD1/PD-L1 that Contributes to Cancer Development and Metastasis

肿瘤防治研究. 2017, 44(6): 423-427 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2017.17.0087>



杂志官网



微信公众号

# 黑色素瘤抗原泛素连接酶的研究进展

严峻<sup>1</sup>, 文静<sup>2</sup>, 李希圣<sup>3</sup>, 莫立根<sup>1</sup>

**Research Progress on Melanoma-associated Antigen Gene-really Interesting New Gene (MAGE-RING) Ligases**

YAN Jun<sup>1</sup>, WEN Jing<sup>2</sup>, LI Xisheng<sup>3</sup>, MO Ligen<sup>1</sup>

1. Department of Neurosurgery, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Department of Rheumatism, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3. Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Corresponding Author: MO Ligen, E-mail: ligenmo@163.com



**Abstract:** Melanoma-associated antigen gene(MAGE) is regarded as a popular target for cancer markers and immunotherapy. It was found that MAGE combined with E3-RING ubiquitin ligase to form MAGE-RING ligase complex(MRLs). MRLs are regulatory factors for ubiquitination to regulate the activity of the ligase, the specificity of the substrate and the subcellular localization. The structure, activation mechanism and transcription function of MRLs are reviewed in this article.

**Key words:** Melanoma-associated antigen gene; MAGE-RING ligases; Ubiquitination; Ubiquitin-ligase

**摘要:** 黑色素瘤抗原 (melanoma-associated antigen gene, MAGE) 被视为一种肿瘤标志物和免疫治疗的热门对象。研究发现MAGE联合E3-RING泛素连接酶形成MAGE-RING连接酶复合物 (MAGE-RING ligases, MRLs), 成为泛素化的调控因子, 从而调控连接酶的活性、底物的特异性和亚细胞定位。该文献就MRLs的结构、活化机制和转录功能作一综述。

**关键词:** 黑色素瘤抗原基因; MAGE-RING连接酶复合物; 泛素化修饰; 泛素连接酶

**中图分类号:** R739.5 **文献标识码:** A

## 0 引言

黑色素瘤抗原 (melanoma-associated antigen gene, MAGE) 在真核生物中高度保守, 通过共有的MAGE同源结构域 (mage homology domain, MHD) 来编码蛋白。虽然最早只在低等真核生物中发现, 但不久迅速扩展到哺乳动物中, 目前在人类基因上已鉴定出超过50种MAGE基因。因为MAGE基因独特的表达模式: 限制性的表达于生殖细胞和过表达于不同种类的肿瘤组织, 因此, MAGE基因被视为肿瘤标志物和免疫治疗热点。进一步研究发现MAGE基因不仅促进肿瘤的发生而且调控肿瘤的发展。最近有研究发现MAGE

联合E3-RING泛素连接酶形成MAGE-RING (really interesting new gene) 连接酶 (MAGE-RING ligases, MRLs) 复合物<sup>[1]</sup>, 成为泛素化的调控因子, 从而调控连接酶的活性、底物特异性和亚细胞的定位。泛素化最常见的功能是识别标记的蛋白靶点并快速降解。蛋白质的异常降解与恶性肿瘤的发生发展密切相关, 因此, 阐明泛素化在蛋白质降解中的作用机制对理解疾病的发生发展有着重要意义, 本文现就MRLs的结构、活化机制和转录功能作一综述。

## 1 MAGE家族和MAGE同源结构域

黑色素瘤抗原基因的第一个成员是1991年van der Bruggen等从黑素瘤细胞中筛选出来的肿瘤特异抗原, 并命名为黑色素瘤抗原-1 (melanoma-associated antigen gene, MAGE-1), 之后的研究显示MAGE-1属于现在被称为MAGE的基因大家族, 更名为MAGE-A1。目前已经鉴定的MAGE基因已经超过50个。MAGE基因根据其序列保守性和组织表达特异性分为MAGE-I和MAGE-II两类, 它们包括10个亚科。MAGE-I型分为A、B、C三个亚家族, 其中包括12个MAGE-A、18个MAGE-B

收稿日期: 2017-11-06; 修回日期: 2018-01-31

基金项目: 广西高校中青年教师基础能力提升项目 (2017KY0489); 广西医药卫生自筹经费计划课题项目 (Z2016037); 广西中医药民族医药自筹经费科研课题 (GZZC16-53)

作者单位: 1. 530021 南宁, 广西医科大学附属肿瘤医院神经外科; 2. 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院风湿免疫科; 3. 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院神经外科

通信作者: 莫立根, E-mail: ligenmo@163.com

作者简介: 严峻 (1978-), 男, 博士, 副主任医师, 主要从事神经外科肿瘤研究

和7个MAGE-C基因。MAGE-I型基因相对进化较晚,定位在X染色体上,属于癌睾丸抗原(cancer testis antigens, CTAs),仅在特定组织(胎盘,胚胎,睾丸)和癌细胞中表达<sup>[2]</sup>。由于其具有肿瘤的特异性表达和显著的免疫原性,MAGE-I型基因常涉及肿瘤的发生进展过程中。根据其免疫原性,目前针对MAGE-I型抗原的癌症疫苗正在试验中<sup>[3]</sup>。MAGE-II型基因相对保守,由15个基因组成(包括4个MAGE-D、3个MAGE-E、MAGE-F1、MAGE-G1、MAGE-H1、2个MAGE-I、MAGE-K1、MAGE-L2和NECDIN),蛋白无表达的限制性,基因定位也不局限于X染色体<sup>[2]</sup>,它们普遍表达在正常组织,并在细胞周期调控、神经元分化和凋亡中起着重要作用。

大多数哺乳动物MAGE基因家族成员都有由两个翼状螺旋(WH/A和WH/B)亚结构域组成的MAGE同源结构域(mage homology domain, MHD),大约有200个氨基酸构成的高度保守序列,结构学研究表明,MHD由两个串联翼状螺旋(winged-helix, WH)序列组成,称为WH-A和-B<sup>[4-5]</sup>。每个WH都具有特征性的螺旋-反转-螺旋序列,是针对三股反平行的 $\beta$ 片“翼”,但是WH-B也包含附加的 $\alpha$ -螺旋<sup>[4-5]</sup>。即便是在MAGE-I型和MAGE-II型MAGE之间,MHDs也是极其相似的。总之,全人类MHD在氨基酸水平上达到46%蛋白质序列同一性,特定亚科的MHDs甚至更为保守,比如,在四个MAGE-D的MHD中保守序列达到75%,而在十二个MAGE-A的MHD中保守序列达到70%,MAGE-A3和MAGE-A4是MAGE家族中两个具有较好研究前景的靶向基因,它们的MHD结构相似,都显示出一个肽延伸结合到两个WH序列之间的保守裂隙中,然而MAGE-A4的C末端与分子的其余部分紧密结合并形成较长的 $\alpha$ 螺旋段<sup>[5]</sup>。尽管MHD在序列和结构上相似,但越来越多的证据表明MHD比人们预想的更为多变和复杂。MHD能特异性绑定多个独特序列,而不是识别和绑定一个共同序列<sup>[4]</sup>。此外,通过天然质谱法对MAGE-A4的生物物理研究显示存在广泛的电荷分布,表明MAGEs是结构动态蛋白<sup>[6]</sup>。因此,多变的MHD可以进行构象变化与不同蛋白质结构域结合,从而赋予MAGE独特的功能。

## 2 MAGE-RING连接酶复合体

MAGE在MAGE-RING连接酶复合体中的作用是引导泛素化并成为泛素化的调控因子,进而

调控连接酶的活性、为泛素化提高特异性底物和选择亚细胞定位。这些MRL对不同细胞途径产生影响,并阐释与MAGE相关的各种病理机制,包括转录、代谢、蛋白质运输和细胞增殖。然而,这样的研究不多。自从MAGE基因问世以来,最重要的成果是MAGE基因在肿瘤方面的研究。虽然这些研究包括MAGE预后和治疗潜能等很多有价值的内容,但却未能在免疫学和病理学方面描述其分子功能。越来越多的文献表明MRLs作用于细胞生长过程,包括蛋白质组学在内的互作研究报道了超过50个不同的MRLs,其中有MAGE-A1-TRIM31、MAGE-B18-LNX1、MAGE-C2-TRIM28等,目前这些研究的进展程度各不相同。MAGE基因通过MRLs能调控同源RING蛋白,下面我们将详细讨论MRLs复合物的细节和其作用机制。

### 2.1 泛素化反应机制和RING连接酶的分类及特征

泛素是在真核生物中高度保守的由76个氨基酸残基组成的序列<sup>[7]</sup>。泛素化,即蛋白质翻译后修饰,是泛素共价结合到蛋白质赖氨酸残基或者N末端的过程。泛素化修饰是由泛素蛋白酶体系统(ubiquitin proteasome system, UPS)进行的,泛素几乎分布在各类细胞中并调节细胞功能的所有方面<sup>[7]</sup>,同时它也牵涉到各种疾病的发病机制,如肿瘤和神经退行性疾病<sup>[8]</sup>。泛素化修饰包括单泛素化(mono-ubiquitination)和多聚泛素化(poly-ubiquitination),前者是将单个的泛素修饰到底物,其功能主要是影响细胞的膜运输、内吞和病毒出芽等过程<sup>[9]</sup>。后者是利用泛素本身所包含的7个赖氨酸残基(分别是Lys6、Lys11、Lys27、Lys29、Lys33、Lys48和Lys63)形成的多聚泛素链修饰到底物或者通过肽键形成各种线性的泛素链,由于存在不同种类的泛素链,其功能多样化,与介导蛋白质的蛋白酶体降解、内吞作用、炎症反应、蛋白质翻译、转录调控、DNA修复和激酶活化相关<sup>[10]</sup>。而其他形式的泛素链与细胞周期调控、细胞凋亡、溶酶体降解、激酶识别等一系列过程相关<sup>[9-10]</sup>。参与泛素化过程主要有三种关键酶,泛素激活酶(E1, ubiquitin activating enzymes)、泛素结合酶(E2, ubiquitin conjugating enzymes)和泛素连接酶(E3, ubiquitin ligases)<sup>[8]</sup>。其作用机制逐渐明了:(1)单个游离的泛素以ATP依赖的方式激活,通过位于E1活性中心的半胱氨酸残基和泛素C端的甘氨酸残基形成硫酯键来实现;(2)通过泛素结合酶E2上的半胱氨酸残基形成另一个硫酯键,将这些活化的泛素递交给泛素结合酶E2;(3)泛素连接酶E3“募集”特异的

底物和E2, 并介导其结合<sup>[11]</sup>。泛素连接酶E3在不同细胞通路上起着关键调控作用, 它决定了蛋白底物的特异性识别, 因此, 泛素连接酶E3在整个蛋白质降解过程中的作用最为关键。在人类基因组中, 已经鉴定出2种E1酶, 38种E2酶和600多种E3连接酶, 目前在哺乳动物物种中, 估计E3连接酶的总数接近1 000种。调控酶的种类繁多以及修饰模式不同, 确保了泛素化调控细胞内稳态的全面性和重要性<sup>[12]</sup>。因为哺乳动物具有数以百计的泛素连接酶(E3连接酶), 所以赋予不同底物的特异性, 从而满足蛋白质加工的巨大需求, 这也反映了E3连接酶在泛素化机制中的核心作用<sup>[12-13]</sup>。如上所述, 泛素连接酶是将活化的泛素转移至相应底物的最后一步, 这在一定程度上解释了为什么数百个不同的E3连接酶具有相同的催化元素, 但在其底物识别中差别很大。

基于结构特点和功能机制, E3连接酶主要有两类, 包括RING家族和HECT (homologous to E6AP C terminus) 家族。对于RING家族, E3的主体包括RING结构域和RING样蛋白, E3连接酶同时与泛素-E2复合物和底物结合, 使泛素直接转移到底物上而不需要任何中间体, RING连接酶没有催化结构域, 不与泛素直接发生作用, 只是起到桥梁作用, 将挑选的底物与E2募集到一起, 完成泛素从E2到底物之间的传递过程。由于RING连接酶在维护基因组完整性和细胞内环境稳定性方面发挥的作用, 所以它们常涉及到肿瘤的发生和演变。对于HECT家族, E3最早在E6AP (E6 associated protein) 中发现, 大小从90到500 ku不等, 包含C端的350个残基的HECT催化结构域和N端的特异性结构域, 其过程分成两个独立的步骤, 首先泛素通过形成硫酯键与E3中的半胱氨酸残基反应, 然后E3连接酶特异性识别其底物并促进泛素-底物结合, 其功能包括基因转录、质膜蛋白的稳定及拥挤、错误折叠蛋白质的降解、抑癌因子的降解(如PTEN)等多种胞内进程<sup>[11, 14]</sup>。基于功能所必需的不同蛋白结构, RING连接酶被另外分成几个亚家族, 包括Cullin-RING连接酶(CRLs), c-Cbl (Casitas B系淋巴瘤), BRCA1异源二聚体(乳腺癌1), BARD1 (BRCA1相关的RING结构域1)和后期促进复合物(APC), 每个都携带一个RING催化结构域, E3连接酶中以Cullin-RING家族为主要代表<sup>[14]</sup>。

## 2.2 MAGE-RING连接酶的结构特点

为了阐明MAGE联合E3-RING泛素连接酶形成MAGE-RING连接酶复合体的结构特点, 研究

者通过生物化学和生物物理学来进一步解析MRLs的结构特征, 最早明确结构特征的是MAGE-G1联合NSE1 RING连接酶<sup>[4]</sup>。MAGE的MHD (78~295个氨基酸) 形成两个翼状螺旋序列 (WH-A和WH-B), MAGE-G1的WH-A和WH-B与两个NSE1的WH序列相互作用, 通过大量的氢键和疏水界面实现紧密结合, 其中包括保守的二异氰酸序列<sup>[4]</sup>。此外, 二异氰酸序列的变异不仅破坏了MAGE-G1和NSE1的结合, 也干扰了其他MRLs复合体的形成。表明这些保守序列在结合位点的绑定上发挥着重要的作用<sup>[4]</sup>。虽然NSE1的两个WH序列 (WH-A和WH-B) 结合MAGE-G1与游离MAGE-A4非常相似, 但它们的均方根偏差值不同, 分别为1.05Å和1.07Å, 它们的相对方向在两个结构中是有区别的<sup>[4-5]</sup>。MAGE-G1中的WH序列是远距离分离的, WH-B相对于WH-A旋转约170°<sup>[4-5]</sup>。而且, 在MAGE-A3和-A4的两个WH结构之间的肽延伸并不存在于MAGE-G1-NSE1结构中<sup>[4-5]</sup>。因此, 两种不同的构象状态表明MHD参与了MRL复合物的形成和结构变化的重排; 与RING连接酶结合的适应性赋予了其结构的特异性。

通过体外实验, Doyle和Kozakova等研究者观察到每一个MAGE基因都绑定一个特异性RING连接酶, 高度同源性的MAGE倾向于结合相同的RING蛋白<sup>[1, 4]</sup>, 比如, MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A6和MAGE-C2绑定TRIM28; MAGE-F1和MAGE-G1绑定NSE1。一般情况下, MAGE蛋白通过MHD结合含RING结构域的蛋白质, 然而, MAGE结合含RING结构域的蛋白质的区域是可变的, 在不同MRLs之间千差万别, 不一定要是RING结构域。比如, MAGE-C2绑定在TRIM28上的卷曲螺旋区域, MAGE-B18结合在RING和LNK1的第一个PDZ结构域之间的区域, MAGE-G1绑定在NSE1-N末端的WH-A<sup>[4]</sup>。这些结果进一步证实了MHD的灵活多变, 其结构的形成都需要考虑到与RING连接酶相互作用的特异性。

在结构上, MRLs与Cullin-RING-based E3泛素连接酶 (Cullin-RING-based E3-Ligases, CRL) 具有一些相似的关键特征。在泛素化修饰中, E3泛素连接酶具有多变性和复杂性, CRL人体内最庞大的一类泛素连接酶家族<sup>[15]</sup>, 在人类细胞中有超过400个CRLs, 约占整个泛素-蛋白酶体系统的20%, 其功能主要是调节胞内众多肿瘤相关蛋白的泛素化修饰与降解。它们由四个主要成分组成: Cullin蛋白、衔接蛋白、底物受体蛋白和RING-finger蛋白。哺乳动物

编码8个Cullin蛋白 (Cullin 1~3、Cullin 4A、Cullin 4B、Cullin 5、Cullin 7和Cullin 9)，两个RING-finger蛋白 (RBX1和RBX2)，四个衔接蛋白 (SKP1、ElonginB、ElonginC和DDB1) 和超过400种的底物受体蛋白<sup>[16]</sup>。Cullin蛋白本身不具备催化活性，而是在CRLs复合物中发挥“核心分子支架”的作用来组织和协调E3连接酶复合物的各种组分，在其N末端结构域 (N terminal domain, NTD) 直接与衔接蛋白结合，在其C末端结构域 (C terminal domain, CTD) 与RING-finger蛋白直接结合。此外，RING结构域与活化的泛素E2载体相连，而底物受体蛋白与衔接蛋白连接，共同完成泛素-底物识别的结构基础。如MRLs一样，CRLs的组装是通过具有多种底物识别蛋白来招募各种特异性的底物来实现的<sup>[16]</sup>，比如Cul4A通过与DDB1和不同的DCAF (DDB1-Cul4 associated factors) 分子相互作用来捕获特异性底物。另外，Cullin C末端结构域与MAGEs具有显著的结构相似性，其中两个WH序列有助于RING结构域形成结合的凹槽。有趣的是，Cullin CTD的这个区域，称为Cullin同源性区域，在其他几种蛋白质中是高度保守的，这些蛋白包括后期促进复合物/细胞周期体 (APC/c) E3连接酶的APC2亚型，因为结构的相似性，MRLs很有可能具有CRLs相同的保守功能。此外，Cullin支架的活化对于其后续的泛素转移功能是必不可少的，目前已经发现CRL E3连接酶与许多人类疾病相关，其中已经鉴定出几种CRL组参与肿瘤发生发展，如癌蛋白SKP2 (S期激酶相关蛋白2)<sup>[17]</sup>、肿瘤抑制剂VHL (Von Hippel-Lindau病)<sup>[18]</sup>和SPOP (散斑型POZ蛋白)<sup>[19]</sup>。这些CRLs通过调节细胞生长和凋亡以影响细胞的增殖和存活。

### 3 MAGEs增强E3泛素连接酶的活性

在大多数蛋白质研究中发现，RING结构域与泛素连接酶的活性存在相关性。最近有研究表明，MAGE-G1和MAGE-C2分别可以增强NSE1和TRIM28的E3泛素连接酶活性<sup>[4]</sup>。在UbcH13/Mms2 E2泛素结合酶存在的情况下，NSE1本身具有相对弱的泛素连接酶活性，然而，加入MAGE-G1后，NSE1活性显著增强<sup>[4]</sup>。此外，这种增强依赖于MAGE-G1直接结合NSE1来实现的<sup>[4]</sup>。相同的作用方式也存在于MAGE-C2增强TRIM28泛素连接酶活性的过程中。有研究显示，MAGE-C2可以直接绑定到RING域蛋白Rbx1，并参与SCF (Skp1-Cul1-Fbox) 蛋白复合物。此外，MAGE-C2可以抑制SCF复合物的E3泛素连接酶活性。内源性

MAGE-C2的消除能降低细胞周期蛋白E，并通过抑制泛素介导的蛋白酶体的降解来加速细胞周期蛋白E的周转。MAGE-C2的过度表达提高细胞周期蛋白E的水平，并促进G<sub>1</sub>/S的转化和细胞增殖，增加了cyclin E在肿瘤细胞中的稳定性<sup>[20]</sup>。

另有研究表明，MAGE-C2与E3 RING泛素连接酶形成复合物，并调控TRIM28 (也是称为KAP1) E3泛素连接酶，TRIM28是一个涉及转录、调控、细胞分化和DNA损伤修复的多功能蛋白，早期有研究显示，MAGEs可以同时刺激TRIM28实现自身泛素化和其底物肿瘤抑制因子p53的泛素化，增强MAGE-TRIM28泛素连接酶的活性可以降低p53和ZNF382蛋白的水平<sup>[4,21]</sup>，Jin等研究也证实了MAGE-TRIM28复合体可以通过介导蛋白酶体FBP1的降解来促进肝细胞癌的进展<sup>[22]</sup>。MAGE除了能调节TRIM28以外，有报道证实MAGE-A1能刺激TRIM31的连接酶活性<sup>[1]</sup>。而且，MAGEs增强E3泛素连接酶活性的范围不限于MAGE-I型。Doyle等报道的MAGE-G1显著增强NSE1 E3泛素连接酶活性<sup>[4]</sup>就属于MAGE-II型。因此，增强E3 RING泛素连接酶的能力是MAGE-I型和II型的共同特征。

为了阐明MAGE增强E3泛素连接酶活性的机制，Doyle等通过大量的实验最终证实MAGE-G1并没有改变NSE1的构象，同样，MAGE-A2/C2也没有改变TRIM28的结构<sup>[4]</sup>。实验证明MAGE-A2/C2特异性结合UbcH2 E2泛素结合酶，MAGE通过募集E2酶可以增强TRIM28 E3泛素连接酶活性<sup>[4]</sup>。然而，MAGE-A2/C2是同时结合UbcH2和TRIM28，还是竞争性选择其一尚不明确。Feng等为此提出了两种假设<sup>[23]</sup>：(1) MAGE-A2/C2绑定的TRIM28和UbcH2是呈竞争关系的。将一个泛素转移到底物后，UbcH2是通过E1泛素活化酶得到补充，同时通过与MAGE-A2/C2的相互作用来稳定TRIM28，MAGE因此可以及时补充E2酶。(2) MAGE-A2/C2同时结合TRIM28和UbcH2。当两个UbcH2分子被招募到TRIM28中，其中一个UbcH2与TRIM28 RING结构域相互作用，另一个与MAGE-A2/C2作用，促进聚泛素链在底物上连续组装<sup>[23]</sup>。但是，MAGE-A2/C2是否同时结合TRIM28和UbcH2仍然不清楚，此外，MAGE增强E3泛素连接酶活性的机制研究也可能存在以下几种机制：(1) 通过泛素E1刺激E2泛素结合酶的装载；(2) MAGE促进底物与E2-E3泛素连接酶的结合；(3) MAGE诱导E3-RING连接酶的构象变化，从而促进活性增加。未来需要大量的工作来验证这些问题。

#### 4 MAGE-RING连接酶复合体的调控功能

与MAGE相关的E3 RING泛素连接酶都涉及重要细胞靶点的降解过程。

首先,最值得注意的是MAGE涉及到转录的调节。MRLs可调控E2F和p53转录因子,实现转录调控。E2F转录因子是关键的细胞周期调节因子,E2F1是反式激活所必需并参与G<sub>1</sub>/S转换的靶基因<sup>[24]</sup>。视网膜母细胞瘤抑制因子是E2F1转录活性的关键调节因子,Necdin和MAGE结合E2F1的反式激活域并抑制E2F1转录活动<sup>[25]</sup>。相反,研究表明MAGEA11能稳定视网膜母细胞瘤相关蛋白p107,并促进p107与E2F1的结合,从而激活E2F1转录活性<sup>[26]</sup>。Peche等研究显示MAGE-B2与E2F1抑制剂-HDAC1相互作用,增强了E2F1的反式激活<sup>[27]</sup>。因此,一些MAGE-II基因能抑制E2F功能,其他MAGE-I型基因可能刺激E2F活性,促进肿瘤细胞增殖。

p53作为转录因子可响应多种应激信号,并协调有助于肿瘤抑制的基因表达程序。MAGE-TRIM28可以泛素化肿瘤抑制因子p53,并通过MDM2调控p53蛋白水平,从而调节p53稳定性<sup>[28]</sup>,还有研究发现MAGE在调节p53的其他方面的作用。例如,MAGE-A2可以空间闭塞p53 DNA结合结构域,“招募”组蛋白脱乙酰酶(HDAC),或通过抑制MDM2 E3连接酶从而抑制p53转录活性<sup>[29]</sup>。

其次,通过MAGE和SCF(Skp1-Cul1-Fbox)调节细胞周期蛋白。SCF蛋白复合物是研究最为清楚的CRL,一方面,有研究认为MAGE-C2能通过抑制SCF依赖性泛素化和随后的蛋白酶体降解来稳定cyclin E<sup>[30]</sup>。这种由MAGE-C2介导的cyclin E的稳定性能促进细胞周期进程和细胞增殖,cyclin E是细胞周期从G<sub>1</sub>到S期的必需调节因子。重要的是,cyclin E表达与黑色素瘤肿瘤样本中的MAGE-C2表达呈正相关,这表明MAGE-C2的功能可能与肿瘤发生相关<sup>[30]</sup>。另一方面,MAGE可通过调节SCF泛素连接酶活性和底物识别来调节细胞周期进程。有研究认为MAGE-A11与Skp2(SCF CRL的F-box结构域底物识别蛋白)相互作用<sup>[31]</sup>,MAGE-A11能调节Skp2的底物特异性,增强Skp2介导的cyclin A和视网膜母细胞瘤相关蛋白p130的降解,但同时抑制Skp2介导的E2F1转录因子的降解<sup>[31]</sup>。MAGE-A11和Skp2竞争性结合cyclin A的理论解释了MAGE-A11在Skp2上产生的差异效应。

第三,通过MAGE-A3/6-TRIM28调控AMP活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)。MAGE-A3和MAGE-A6极其相似(简

称MAGE-A3/6),它们都能与TRIM28相结合。在筛选MAGE-A3/6-TRIM28底物的体外实验中,Pineda等发现MAGEA3/6的表达增强了AMPK $\alpha$ 1的泛素化,MAGE-A3/6不仅促进AMPK $\alpha$ 1的泛素化和随后的蛋白酶体降解,而且还直接与AMPK $\alpha$ 1相互作用并作为TRIM28的底物<sup>[32]</sup>。因此,与肿瘤抑制因子p53不同的是,在MAGE-A3/6作用下,AMPK $\alpha$ 1被TRIM28特异性识别,MAGE-A3/6在癌细胞中的表达重新编排了TRIM28泛素连接酶,从而降解关键的代谢调节因子和肿瘤抑制因子以增强肿瘤发生。此外,Pineda等还发现MAGEA3/6-TRIM28对维持mTOR活性至关重要<sup>[32]</sup>。值得一提的是MAGE-A3/6-TRIM28在调节AMPK和mTOR信号转导中作用一致,即MAGE-A3/6-TRIM28能抑制自噬<sup>[33]</sup>。所有这些结果表明致癌MAGE-A3/6-TRIM28通过泛素化和AMPK $\alpha$ 1的降解来调节多种细胞代谢调控途径。

此外,E3 RING泛素连接酶结合MAGE-B18(LNX1)能促进p53抑制剂NUMB的泛素化和蛋白酶体的降解,MAGE-D1联合IAP蛋白在凋亡调控方面扮演多重角色,其中多个涉及底物的泛素化<sup>[34]</sup>。MRLs不仅能调节底物识别和细胞定位。然而,目前这样的机制研究还很少,未来的研究重点放在MAGE成员的功能和相关疾病关系的确立上。

#### 5 局限性

在MRLs结构上,MAGE可以通过E3底物复合物募集和(或)稳定E2泛素结合酶来增强泛素连接酶的活性,然而,研究者仍然有未能解决的问题,比如,MAGE-A2/C2可以同时绑定UbcH2和TRIM28,还是相互排斥?其次,MAGE-A2/C2与UbcH2结合有助于增加TRIM28泛素化连接酶的活性?第三,MAGEs与整个MAGE家族中保守的E2泛素化结合酶的结合,还是通过不同的机制使不同的MAGEs增强E3泛素连接酶的活性?

MRLs有诸多调控功能,也还有很多问题悬而未决,比如,MAGE的通路调控如何影响疾病预后;如何进一步确定其他MAGE基因的功能以及他们对疾病的影响;受MAGE影响的细胞功能如何干预疾病的进展,等等;其中一项重要的挑战是如何确定与单一MAGEs发挥作用的E3 RING泛素连接酶。

#### 6 总结和展望

虽然MRLs的结构功能机制还需要进一步探究,MAGE和RING泛素连接酶之间的相互作用还

需要进一步鉴定和分类,但去泛素化酶将提供一个独特的视角来了解MAGE基因;结构学研究能帮助我们不仅理解MRLs的生物物理学基础,而且设计出特异性的MAGE抑制剂用于免疫学治疗。MAGE的发现让越来越多的研究者将其作为癌症研究的标志物和肿瘤免疫治疗的靶点。虽然以MAGE为基础的免疫治疗还未能完全成功,但最近的研究已经让我们看到MAGE在E3-RING泛素连接酶调控上的潜在作用,让我们对MAGE蛋白质的结构和功能有了更进一步的理解,包括p53信号通路,细胞代谢和蛋白转运方面。同时也为MRLs在肿瘤精准治疗方面开辟了新路径。未来的研究将重点放在MAGE-RING复合物的新型靶向抗癌药物的研究上,这将为疾病的靶向治疗打开一扇崭新的大门。

#### 参考文献:

- [1] Kozakova L, Vondrova L, Stejskal K, *et al.* The melanoma-associated antigen 1 (MAGEA1) protein stimulates the E3 ubiquitin-ligase activity of TRIM31 within a TRIM31-MAGEA1-NSE4 complex[J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(6): 920-30.
- [2] Weon J L, Potts PR. The MAGE protein family and cancer[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 37: 1-8.
- [3] Adam V, Wauters I, Vansteenkiste J. Melanoma-associated antigen-A3 vaccination in the treatment of non-small-cell lung cancer[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2014, 14(3): 365-76.
- [4] Doyle JM, Gao J, Wang J, *et al.* MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases[J]. *Mol Cell*, 2010, 39(6): 963-74.
- [5] Newman JA, Cooper CD, Roos AK, *et al.* Structures of Two Melanoma-Associated Antigens Suggest Allosteric Regulation of Effector Binding[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148762.
- [6] Hagiwara Y, Sieverling L, Hanif F, *et al.* Consequences of point mutations in melanoma-associated antigen 4 (MAGE-A4) protein: Insights from structural and biophysical studies[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25182.
- [7] Chen HY, Chen RH. Cullin 3 Ubiquitin Ligases in Cancer Biology: Functions and Therapeutic Implications[J]. *Front Oncol*, 2016, 6: 113.
- [8] Varshavsky A. The Ubiquitin System, Autophagy, and Regulated Protein Degradation[J]. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86: 123-28.
- [9] Livneh I, Kravtsova-Ivantsiv Y, Braten O, *et al.* Monoubiquitination joins polyubiquitination as an esteemed proteasomal targeting signal[J]. *Bioessays*, 2017, 39(6).
- [10] Sadowski M, Suryadinata R, Tan AR, *et al.* Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes[J]. *IUBMB Life*, 2012, 64(2): 136-42.
- [11] Natarajan C, Takeda K. Regulation of various DNA repair pathways by E3 ubiquitin ligases[J]. *J Cancer Res Ther*, 2017, 13(2): 157-69.
- [12] O'Connor HF, Huijbregtse JM. Enzyme-substrate relationships in the ubiquitin system: approaches for identifying substrates of ubiquitin ligases[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(18): 3363-75.
- [13] Zheng N, Zhou Q, Wang Z, *et al.* Recent advances in SCF ubiquitin ligase complex: Clinical implications[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1866(1): 12-22.
- [14] Zheng N, Shabek N. Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation[J]. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86: 129-57.
- [15] Genschik P, Sumara I, Lechner E. The emerging family of CULLIN3-RING ubiquitin ligases (CRL3s): cellular functions and disease implications[J]. *EMBO J*, 2013, 32(17): 2307-20.
- [16] Chen Z, Sui J, Zhang F, *et al.* Cullin family proteins and tumorigenesis: genetic association and molecular mechanisms[J]. *J Cancer*, 2015, 6(3): 233-42.
- [17] Inuzuka H, Gao D, Finley LW, *et al.* Acetylation-dependent regulation of Skp2 function[J]. *Cell*, 2012, 150(1): 179-93.
- [18] Vriend J, Reiter RJ. Melatonin and the von Hippel-Lindau/HIF-1 oxygen sensing mechanism: A review[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1865(2): 176-83.
- [19] Zhang L, Peng S, Dai X, *et al.* Tumor suppressor SPOP ubiquitinates and degrades EglN2 to compromise growth of prostate cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2017, 390: 11-20.
- [20] Hao J, Song X, Wang J, *et al.* Cancer-testis antigen MAGE-C2 binds Rbx1 and inhibits ubiquitin ligase-mediated turnover of cyclin E[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(39): 42028-39.
- [21] Xiao TZ, Suh Y, Longley BJ. MAGE proteins regulate KRAB zinc finger transcription factors and KAP1 E3 ligase activity[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 563: 136-44.
- [22] Jin X, Pan Y, Wang L, *et al.* MAGE-TRIM28 complex promotes the Warburg effect and hepatocellular carcinoma progression by targeting FBP1 for degradation[J]. *Oncogenesis*, 2017, 6(4): e312.
- [23] Feng Y, Gao J, Yang M. When MAGE meets RING: insights into biological functions of MAGE proteins[J]. *Protein Cell*, 2011, 2(1): 7-12.
- [24] Chen HZ, Tsai SY, Leone G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(11): 785-97.
- [25] Minamide R, Fujiwara K, Hasegawa K, *et al.* Antagonistic interplay between necdin and Bmi1 controls proliferation of neural precursor cells in the embryonic mouse neocortex[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e84460.
- [26] Su S, Minges JT, Grossman G, *et al.* Proto-oncogene activity of melanoma antigen-A11 (MAGE-A11) regulates retinoblastoma-related p107 and E2F1 proteins[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(34): 24809-24.
- [27] Pêche LY, Ladelfa MF, Toledo MF, *et al.* Human MageB2 Protein Expression Enhances E2F Transcriptional Activity, Cell Proliferation, and Resistance to Ribotoxic Stress[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(49): 29652-62.
- [28] Marcar L, Ihrig B, Hourihan J, *et al.* MAGE-A Cancer/Testis Antigens Inhibit MDM2 Ubiquitylation Function and Promote Increased Levels of MDM4[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e127713.
- [29] Marcar L, Maclaine NJ, Hupp TR, *et al.* Mage-A cancer/testis antigens inhibit p53 function by blocking its interaction with chromatin[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(24): 10362-70.
- [30] Hao J, Song X, Wang J, *et al.* Cancer-testis antigen MAGE-C2 binds Rbx1 and inhibits ubiquitin ligase-mediated turnover of cyclin E[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(39): 42028-39.
- [31] Su S, Chen X, Geng J, *et al.* Melanoma antigen-A11 regulates substrate-specificity of Skp2-mediated protein degradation[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 439: 1-9.
- [32] Pineda CT, Ramanathan S, Fon TK, *et al.* Degradation of AMPK by a cancer-specific ubiquitin ligase[J]. *Cell*, 2015, 160(4): 715-28.
- [33] Pineda CT, Potts PR. Oncogenic MAGEA-TRIM28 ubiquitin ligase downregulates autophagy by ubiquitinating and degrading AMPK in cancer[J]. *Autophagy*, 2015, 11(5): 844-6.
- [34] Tosoni D, Zecchini S, Cozzoli M, *et al.* The Numb/p53 circuitry couples replicative self-renewal and tumor suppression in mammary epithelial cells[J]. *J Cell Biol*, 2015, 211(4): 845-62.