

综述

蛋白降解N端规则通路的研究进展

许纳新¹, 刘永¹, 汪毅², 凌树宽^{3,*}

¹北京体育大学运动人体科学院, 北京 100084; ²中国人民大学体育部, 北京 100872; ³瓯江实验室(再生调控与眼脑健康浙江省实验室), 温州 325000

摘要: N端规则通路是一种由泛素-蛋白酶体系统介导的, 能通过识别蛋白质N端特定的残基对目标蛋白进行特异性降解的一种蛋白降解方式。在N端规则通路中发挥关键性作用的残基被称为降解子(degron), 由于其往往是蛋白质N端的不稳定残基, 所以又被叫做N端降解子(N-degron)。目前在真核生物体内, 已被发现的N端规则通路包括N端精氨酸化规则通路(Arg/N端规则通路)、N端乙酰化规则通路(Ac/N端规则通路)、N端脯氨酸规则通路(Pro/N端规则通路)以及近年来最新发现的N端甘氨酸规则通路(Gly/N端规则通路)。Ac/N端规则通路靶向含有N端乙酰化(Nt-乙酰化)残基的蛋白质; Arg/N端规则通路则靶向一些未乙酰化的残基并涉及N端的精氨酸化; 对于一些N端氨基酸为Pro和Gly的蛋白来说, 它们既不能被乙酰化修饰也不能通过Arg/N端通路被识别, 因而主要通过Pro/N端规则通路和Gly/N端规则通路被识别和降解。通过N端规则通路介导的降解对特定蛋白质进行调节在大量生理和病理过程中发挥了重要作用, 包括心血管发育, 神经发生, 生殖细胞减数分裂、精子发生、HPV感染及细胞凋亡等。本文综述了已知的N端规则通路的作用和机制, 并探讨其与疾病发生的关系。作为一种独立的蛋白降解系统, N端规则通路仍包含了无数的生物学秘密等待着挖掘, 对这些通路的全面理解可能会为各种疾病揭示新的治疗靶点。

关键词: N端规则通路; E3泛素连接酶; 泛素化降解

Progress on the role of N-end rule pathways in protein degradation

XU Na-Xin¹, LIU Yong¹, WANG Yi², LING Shu-Kuan^{3,*}

¹Academy of Sports Human Sciences, Beijing Sport University, Beijing 100084, China; ²Department of Sports, Renmin University of China, Beijing 100872, China; ³Oujiang Laboratory (Zhejiang Lab for Regenerative Medicine, Vision and Brain Health), Wenzhou 325000, China

Abstract: The N-end rule pathway is a protein degradation pathway mediated by the ubiquitin-proteasome system, which specifically targets and degrades target proteins by recognizing specific residues at the N-terminus of the proteins. The residues which play a crucial role in the N-end rule pathway are called degrons, also known as N-degrons, as they are usually unstable at the N-terminal end of the protein. Currently, several N-end rule pathways have been identified in the eukaryotes, including the Arg/N-end rule, Ac/N-end rule, and Pro/N-end rule pathways, as well as the recently discovered Gly/N-end rule pathway. The Ac/N-end rule pathway targets proteins containing N-terminal acetylation (Nt-acetylation) residues. The Arg/N-end rule pathway, on the other hand, targets certain unacetylated residues and involves N-terminal arginylation. For proteins with N-terminal proline (Pro) and glycine (Gly) residues, they are neither modified by acetylation nor recognized through the Arg/N-end rule pathway. Therefore, these proteins are primarily recognized and degraded through the Pro/N-end rule pathway and the Gly/N-end rule pathway. The regulation of specific proteins through N-end rule pathway-mediated degradation plays an important role in numerous physiological and pathological processes, such as cardiovascular development, neurogenesis, meiosis, spermatogenesis, HPV infection, and cell apoptosis. In this review, we summarize the role and mechanisms of several known N-end rule pathways and discuss their relationship with certain diseases. As an independent protein degradation system, the N-end rule pathways still hold countless biological secrets waiting for exploring. The comprehensive understanding of these pathways could potentially uncover novel therapeutic targets for various diseases.

Key words: N-end rule pathway; E3 ubiquitin ligase; ubiquitin-mediated degradation

*Corresponding author. E-mail: sh2ling@126.com

细胞内蛋白稳定性的调控对维持细胞内环境稳态及正常生理活动起着十分重要的作用。蛋白质降解是指用酶将受损的蛋白质分解成多肽和氨基酸的生化过程, 这些多肽和氨基酸可以被细胞回收, 以用于新的蛋白质合成。一般来说, 在真核细胞中, 受损的蛋白质或细胞器可以通过蛋白酶体途径或溶酶体途径清除^[1]。这两种途径相互独立却又相互关联, 具体来说, 蛋白酶体途径主要是通过泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)消除短寿命蛋白质和可溶性错误折叠蛋白质^[2]; UPS是真核生物细胞中具有高度选择性的蛋白降解系统, 真核生物细胞内大多数蛋白的降解都被其调控^[3–5]。而溶酶体则主要通过①内吞: 细胞表面蛋白通过细胞内吞被溶酶体降解; ②吞噬: 细胞吞噬入侵的细菌、病毒等胞外物质形成吞噬泡进行降解; 或③自噬: 错误折叠或受损的蛋白质形成自噬小体被溶酶体降解^[6]三种途径降解长寿命蛋白质、不溶性蛋白质聚集体, 细胞器、大分子化合物和细胞内寄生虫等^[7]。

在真核生物体内, UPS对蛋白的降解主要涉及E1泛素激活酶、E2泛素结合酶、E3泛素连接酶及S26蛋白酶体的一系列反应。当降解目标出现时, 泛素分子首先被E1激活酶激活, 激活后的泛素分子通过E2泛素结合酶转移到可被E3泛素连接酶特异性识别的底物蛋白的赖氨酸(Lys, K)上, 并通过甘氨酸(Gly)与底物中的赖氨酸残基共价结合^[2]。而已经共价修饰到底物蛋白上的泛素分子的赖氨酸残基还可继续发生泛素化修饰, 形成泛素链, 因此泛素化可分为单泛素化、多泛素化两种方式^[8]。由于泛素共含有七个不同位置的赖氨酸, 不同位置的赖氨酸形成的泛素链往往发挥着不同的功能, 与蛋白酶体相关的往往是K48泛素链, 它的主要作用是将泛素化的蛋白导向蛋白酶体, 从而促进蛋白的泛素化降解, 负反馈调节蛋白的稳定性^[9]。研究表明至少需要4个通过K48连接的泛素组成的泛素链才能将底物蛋白导向蛋白酶体^[10], 因而涉及UPS的泛素化修饰是一种多泛素化修饰。

在对UPS的这一反应特异性的探索过程中, 人们发现了一条重要的规律, 被称作“N端规则”(N-end rule): 存在于多肽N端的降解子(degron)是E3泛素连接酶对底物进行特异性识别的关键因子。这种降解子通常被定义为蛋白质中足以被UPS识别和降解的最小的氨基酸序列^[11], 由于其最早于1986年发现于短寿命蛋白质的N端^[12], 所以又将其称为N

端降解子(N-degron)^[11]。通过识别N-degron来介导蛋白降解的UPS途径则被称为N端规则通路, 它将蛋白质在体内的半衰期与其N端残基的序列特异性联系起来^[13, 14]。

作为UPS途径的一个重要分支, N端规则通路被发现参与多种生理过程的调节^[14–16], 而N端规则通路的功能异常则会导致疾病的发生^[17–19]。本综述对目前发现的N端规则通路的机制和生理功能进行了介绍, 同时阐释了N端规则通路与某些人类疾病的关系, 最后对N端规则通路的功能进行了讨论并对其在临床的运用做出展望。

1 经典N端规则通路

N端规则最早于1986年被Varshavsky及其同事在酿酒酵母细胞中发现^[12], 他们观察到带有某些N端残基的底物蛋白被快速降解, 而这些残基是由泛素融合蛋白在被去泛素化酶切割后产生的, 这种蛋白降解的方式包括UBR家族E3泛素连接酶对底物的特异性识别和蛋白质底物N端的精氨酸化^[14, 20–22]。由于在该N端规则通路中精氨酸(Arg, R)是主要的降解子, 可以通过对N端氨基酸[天冬酰胺(Asn, N), 谷氨酰胺(Gln, Q), 天冬氨酸(Asp, D)和谷氨酸(Glu, E)]的精氨酸化和脱酰胺修饰产生, 因此又被称为“N端精氨酸化规则通路(Arg/N-end rule pathway, Arg/N端规则通路)”。

此后的30多年里, 研究者在哺乳动物^[23]、植物^[24, 25]乃至细菌^[26]中发现了更多类型的N端规则通路。截至目前, 除了Arg/N端规则通路之外, 还有2条N端规则通路被人们所熟知, 它们是N端乙酰化规则通路(Ac/N-end rule pathway, Ac/N端规则通路)^[27, 28]和N端脯氨酸规则通路(Pro/N-end rule pathway, Pro/N端规则通路)^[29, 30]。这些通路的底物范围十分广泛, 意味着大多数细胞蛋白可能都可以通过特定的N端规则降解途径进行降解^[31]。

1.1 Arg/N端规则通路

Arg/N端规则通路是一种由UBR家族E3泛素连接酶所介导的, 可识别N末端为精氨酸(Arg, R)、赖氨酸(Lys, K)、组氨酸(His, H)、亮氨酸(Leu, L)、苯丙氨酸(Phe, F)、酪氨酸(Tyr, Y)、色氨酸(Trp, W)、异亮氨酸(Ile, I)、天冬氨酸(Asp, D)、谷氨酸(Glu, E)、天冬酰胺(Asn, N)、谷氨酰胺(Gln, Q)及半胱氨酸(Cys, C)的底物蛋白并对其进行修饰降解的N端规则途径^[20, 32]。Arg/N端规则通路的UBR E3泛素连

接酶上有着可识别碱性残基(Arg、Lys、His)的type1结构域和识别庞大的疏水性残基(Leu、Phe、Tyr、Trp、Ile)的type2结构域,我们将这些能够被type1和type2结构域识别的N端残基称为N端主要失稳残基[a primary (p) destabilizing N-terminal residue, Ndp]^[32-34]。与之相反,一些本来不可被E3泛素连接酶识别的前N端残基被证明可在特定条件下转变为可被识别的N-degron^[35], Asp、Glu、Asn、Gln和Cys便是这样一类残基。这种转变中最重要的一步便是由Arg-tRNA蛋白转移酶1 (arginyl-tRNA-protein transferase 1, ATE1, 又称R转移酶)介导的N末端残基的精氨酸化,这种转化只能发生在真核生物中,因为R转移酶在原核生物中不存在^[36]。通过R转移酶,Arg得以与蛋白质或短肽的N-末端Asp、Glu或氧化后的Cys耦联,使得它们能够被E3泛素连接酶识别^[21,37],由于Asp、Glu和氧化后的Cys可直接被R转移酶精氨酸化,因此我们称这三种残基为Arg/N端规则通路的二级失稳残基[a secondary (s) destabilizing N-terminal residue, Nds]。而对于N端的Asn和Gln来说,它们不能直接与R转移酶ATE1发生反应,而是需要特定的N-末端酰胺酶(Nt酰胺酶)将其转化为Asp和Glu后,再通过R转移酶

发生精氨酸化^[38-40],因此,由于Asn和Gln在被E3泛素连接酶识别前经过了两次修饰,我们将这两种残基称为Arg/N端规则通路的三级失稳残基[a tertiary (t) destabilizing N-terminal residue, Ndt] (见图1)。

值得注意的是,单纯的N端Cys并不是R转移酶的直接底物,而是在NO和O₂的参与下被氧化为Cys亚磺酸[C3H7NO4S]或Cys磺酸[C3H7NO5S2]后才可被R转移酶进一步精氨酸化^[41]。RGS (Regulator of G protein signaling)蛋白家族(RGS4, RGS5, RGS16)便是这样一类底物^[42],只有当Cys被氧化后它们才能够被精氨酸化,从而被E3泛素连接酶UBR识别后降解;因此当NO或O₂缺乏时,该类蛋白的降解会受到抑制。作为G蛋白信号调节因子,RGS蛋白介导了信号的传导,通过对RGS蛋白的识别和降解作用,Arg/N端规则可能在动物体内发挥着NO及O₂传感器的作用^[43]。研究人员在拟南芥中也证实了这点,在常氧条件下,乙烯反应因子VII组转录因子,包括缺氧反应元件1和2(HRE1和HRE2)以及与AP2.12相关的转录因子(RAP2.12),通过Arg/N端规则通路降解而下调,然而,在低氧条件下,这些低氧敏感的转录因子的降解被抑制,

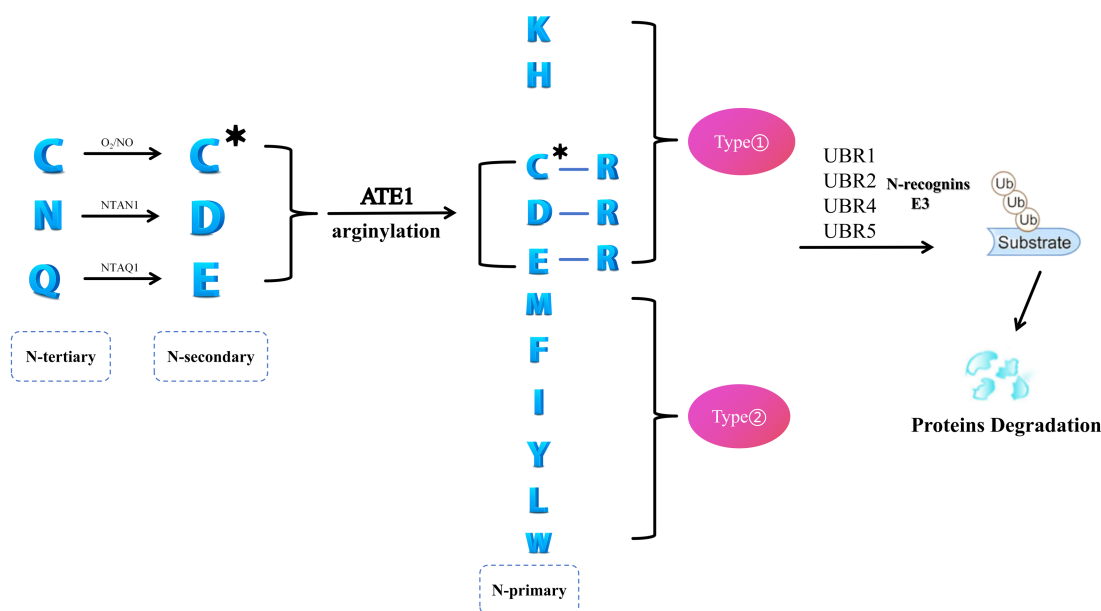


图 1. Arg/N端规则通路示意图

Fig. 1. The Arg/N-end rule pathway. C*: C is oxidized with the participation of NO and O₂; NTAN1: N-terminal asparagine amidohydrolase 1, which can recognize N-terminal asparagine (Asn) and convert it into aspartic acid (Asp); NTAQ1: N-terminal glutamine amidohydrolase 1, which functions to remove the amine group and convert N-terminal glutamine to glutamate; ATE1: arginyl-tRNA-protein transferase 1; UBR1, 2, 4, 5: ubiquitin protein ligase E3 component N-recognin 1, 2, 4, 5; R: Arg; K: Lys; H: His; L: Leu; F: Phe; Y: Tyr; W: Trp; I: Ile; D: Asp; E: Glu; N: Asn; Q: Gln; C: Cys.

逐渐累积, 促进无氧代谢和低氧生存的基因转录诱导^[44], 以适应低氧环境下的生存代谢反应^[45]。

研究表明, 动物体内 Arg/N 端规则通路功能的缺失不仅会影响能量的代谢, 还会阻碍精子的发生, 心血管的正常发育以及各种生理功能的失调甚至造成死亡^[18, 46]。

1.2 Ac/N 端规则通路

2010 年人们发现了 Ac/N 端规则通路^[27], 这是一种涉及新生蛋白质 N 末端含有甲硫氨酸(Met, M)、丙氨酸(Ala, A)、缬氨酸(Val, V)、丝氨酸(Ser, S)或 Cys (C)的乙酰化的通路^[27, 28]。对于新生的蛋白质来说, 如果其 N 末端是 Met 而其第二位是 Ala、Gly、Ser、Cys、苏氨酸(Thr, T)、脯氨酸(Pro, P)或缬氨酸(Val, V), 则会被核糖体结合的 Met-氨基肽酶(methionine aminopeptidases, MetAPs)修饰去除 N 端 Met 从而暴露第二位氨基酸, 反之 Met 则被保留^[47]。在真核生物中, 被保留的 N 端 Met 和暴露的第二位氨基酸在乙酰辅酶(Nt-乙酰化酶)的作用下发生乙酰化, 与肽链内部的乙酰化不同, 这种发生在 N 末端的乙酰化已被证明是不可逆的^[48]。此后, 这些被乙酰化的 N 端蛋白大多数可与 Ubc6 和 Ubc7 E2 泛素结合酶结合, 被 Doa10 E3 泛素连接酶靶向识别并进行泛素化和蛋白酶体介导的降解^[20]。但值得注意的是, 被 MetAPs 切割后暴露的 N 端 Gly (G)和 Pro (P)几乎不能够发生乙酰化修饰^[49–51], 因此也不会通过乙酰化通路降解(见图 2)。

Nt-乙酰化酶属于 GCN5 相关的 N-乙酰转移酶(GCN5-related N-acetyltransferase, GCNT)家族, 在 Ac/N 通路中起到了将 N 端残基乙酰化的作用^[52]。根据底物特异性和亚基, 其可分为 NatA、NatB、NatC、NatD、NatE 和 NatF 六种, 其中 NatA、NatB

和 NatC 主要作用于蛋白质 N 末端^[53]。NatA 在细胞增殖、基因沉默、抗应激性、交配过程、核糖体生物发生、细胞凋亡、蛋白质折叠和解聚、光合作用、发育和应激反应中起作用, NatA 的缺失可能会导致生物的生长发育缺陷甚至引起死亡^[53, 54]。对于人类而言, NatA 的失调还会导致各种癌症和神经疾病^[55]。而 NatB 在细胞生长中发挥作用, 如响应各种应激源, 线粒体遗传, 肌动蛋白的合成及植物发育等^[53, 56]; NatC 主要影响细胞生长、蛋白质靶向、病毒颗粒维持、应激反应、叶绿体发育等^[53]。已知人体中超过 80% 的蛋白与 Ac/N 端规则通路介导的降解有关联^[27]。因此, Ac/N 端规则通路在维持人体正常生理活动中起着重要的作用。

1.3 Pro/N 端规则通路

Pro/N 端规则通路是由一种称为葡萄糖诱导降解蛋白(glucose-induced degradation protein, GID)的多亚基 E3 泛素连接酶介导的^[29, 57], 靶向降解 N 末端为 Pro 的蛋白的 N 端降解通路。该系统的一个功能是, 当细胞返回到充满葡萄糖的状态时, 通过对糖异生酶的破坏, 快速下调糖异生^[29]。1998 年, Wolf 等人证明 4 种酵母糖异生酶中果糖 1,6-二磷酸酶 1(fructose-1,6-bisphosphatase 1, Fbp1)、异柠檬酸裂解酶 1(isocitrate lyase 1, Icl1)、苹果酸脱氢酶 2(malate dehydrogenase 2, Mdh2)的 GID/蛋白酶体依赖性降解是由它们共同具有的 N 末端 Pro 残基介导的^[58]。近年来的研究证明了 GID E3 泛素连接酶的一个亚基 GID4, 作为 Pro/N 端规则通路的识别蛋白, 它通过与糖异生酶 Fbp1、Icl1 和 Mdh2 (可能还有其他蛋白质)的 N 端 Pro 残基和相邻序列基序的结合, 对其进行靶向降解^[29, 30]。具体来说, GID4 可以通过其蛋白质结构中的特定基序 CTLH 结构域来识别蛋白质 N

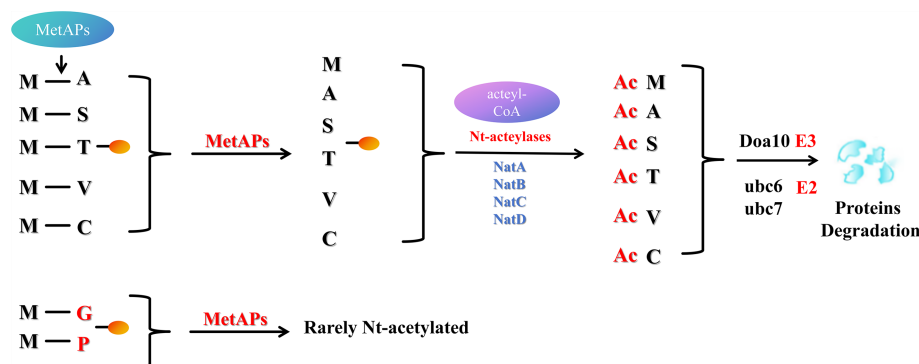


图 2. Ac/N 端规则通路示意图

Fig. 2. The Ac/N-end rule pathway. MetAPs: methionine aminopeptidases; Ac: acetylation; M: Met; A: Ala; V: Val; S: Ser; C: Cys; T: Thr; V: Val; G: Gly; P: Pro.

端的Pro, CTLH复合物由多个亚基组成, 包括WDR26、RanBPM、TWA1和RING域蛋白等, 而GID4作为CTLH复合物的一部分, 其底物结合结构域具有深的、封闭的和可配体的口袋, 可以识别蛋白质底物的N端Pro, 介导其泛素化降解^[59]。而第四种糖异生酶磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶1 (phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, Pck1)在被氨肽酶切割暴露N端Pro后也会通过泛素化的方式被GID4识别降解^[29, 60]。糖异生酶的异常控制可能会介导癌症、糖尿病和其他人类疾病^[61, 62], 而最新的研究也显示GID4蛋白在识别N端Pro的同时, 还能识别除Pro之外的其他疏水性N端残基。例如, 序列Nt-IGLW (含N端异亮氨酸)与野生型人类GID4的结合亲和力为16 $\mu\text{mol/L}$, 而相同序列但含N端Pro的PGLW与GID4的结合更为紧密, 亲和力为1.9 $\mu\text{mol/L}$ 。尽管GID4对Nt-IGLW与Nt-PGLW的亲和力存在差异, 但研究发现GID4介导的Pro/N-degron途径依然能够将含Nt-IGLW的蛋白质快速降解^[63]。因此, GID4介导的Pro/N端规则通路可能具备着十分广泛的底物库, 探明GID4蛋白与其底物库之间的联系对人类健康有着巨大的潜在价值。

2 最新发现的N端甘氨酸规则通路(Gly/N-end rule pathway, Gly/N端规则通路)

除了上述3种经典N端规则通路外, 近年来最新发现的Gly/N端规则通路也受到人们的广泛关注^[64]。

2.1 Gly/N端规则通路的发现及其主要机制

Gly/N端规则通路是一种由E3泛素连接酶ZYG11B (zyg-11 family member B)/ZER1 (zyg-11 related cell cycle regulator)所介导的^[64, 65], 识别并降解多肽链N端为甘氨酸(Gly, G)的一种N端规则降解通路, 该通路于2019年被发现^[64, 66]。该通路目前被认为能够对N端肉豆蔻酰化进行调控, N端肉豆蔻酰化即肉豆蔻酸连接到真核蛋白亚群N端的过程。有趣的

是, N端肉豆蔻酰化只会发生在N端Gly上^[67], 因此ZYG11B/ZER1通过对N端Gly的识别作用可以及时地将那些未能成功进行肉豆蔻酰化的N端Gly多肽进行降解^[64]。肉豆蔻酰化已被证明可用于癌症的治疗^[68, 69], 具有调节先天免疫功能的作用^[70], 同时还能够调节细胞凋亡^[71], 在一项动物实验中, N端肉豆蔻酰化所必需的N端肉豆蔻酰化转移酶(N-Myristoyltransferase, NMT)被证明可能影响心肌的损伤修复^[72]。因此, 对于能够对N端肉豆蔻酰化进行调控的Gly/N端规则通路来说, 其对人类健康的价值有着诸多待研究的可能性(见图3)。

2.2 Gly/N端规则通路中的E3泛素连接酶

2.2.1 E3泛素连接酶ZYG11B

ZYG11B是属于RING家族的E3泛素连接酶, 是Cul2-RING泛素连接酶复合物的一部分, 又叫做细胞周期调节剂(cell cycle regulator)。ZYG11B可调节减数分裂的进展和细胞极性的建立^[73-75], 介导有丝分裂中细胞周期蛋白B1的降解, 从而促进有丝分裂的发生^[76], 这对维持细胞正常的减数分裂十分重要。在疾病方面, ZYG11B被认为和扩张性心脏病有着一定的关联^[77]; 并能够识别严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2)的ORF10的N末端^[78, 79]。至于这些过程中ZYG11B是否发挥了N端降解的功能仍未可知。

2.2.2 E3泛素连接酶ZER1

ZER1作为Gly/N端规则通路的E3泛素连接酶, 其最早被发现于人类的睾丸细胞中, 由766个氨基酸残基组成^[80], 其功能除了参与N端Gly的识别介导相应蛋白质降解外, 还被证明与生殖细胞减数分裂、HPV病毒的毒力及免疫应答、细胞凋亡有关联。在男性生殖细胞减数分裂过程中ZER1特异性表达, 参与了精子的生成和发育^[75, 80]。此外, ZER1被证明能够识别HPV16型病毒E7蛋白的C端, 从而加强HPV16病毒的致癌性, 当改变ZER1的识别位点后, HPV16所感染的细胞增殖能

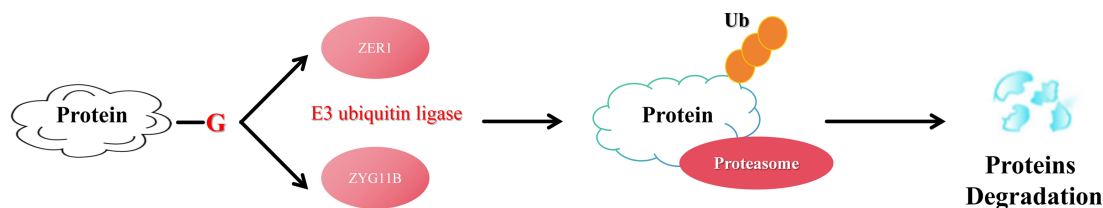


图 3. Gly/N端规则通路示意图

Fig. 3. The glycine/N-end rule pathway. G: Gly.

力明显降低^[81]。ZER1 还参与免疫应答反应和促进细胞凋亡的过程^[82]。

事实上, 在 Gly/N 端规则通路中, ZYG11B 对 N 端 Gly 有着更高的亲和力, 因而在对 N 端 Gly 的识别中起主要的作用, 而 ZER1 则更多地起到了辅助 ZYG11B 识别 N 端 Gly 的功能^[64], 其对除 Gly 之外的一些小氨基酸如 Ser, Thr, Ala 以及 Cys 也有着较好的亲和性^[83]。

3 N 端规则通路在生理过程中的作用及其与疾病发生的关系

N 端规则通路的生理功能是广泛的, 并且仍在被继续探索。由 N 端规则通路调节的蛋白质降解介导的生理过程包括对血红素^[84]、NO、氧^[43]的感知; 选择性消除错误折叠的蛋白^[85]; DNA 修复的调控^[86]; 染色体分离^[87]; 调节跨膜信号的转导^[42]等。在哺乳动物中, N 端规则还与细胞凋亡^[88], 脂肪代谢^[46], 心血管系统、神经系统^[89]、生殖系统的器官发育密切相关^[19]。在本综述中, 我们将主要介绍 N 端规则通路在心血管系统, 神经系统, 生殖系统发育及 Johanson-Blizzard 综合征 (Johanson-Blizzard syndrome, JBS, 又名鼻翼发育不良, 甲状腺功能减退, 胰源性胃液缺乏和先天性耳聋综合征) 发展中的功能和作用。

3.1 N 端规则通路与心血管系统

3.1.1 N 端规则通路通过调节心血管信号传导和肌原纤维的结构调控心血管的发育

G 蛋白信号通路是一种重要的细胞信号传导机制, 它参与调节细胞内外的多种生理过程。G 蛋白是一类跨膜蛋白, 位于细胞质膜内侧, 能够将外界信号传递到细胞内。该信号通路可以被广泛地分为 G 蛋白耦联受体 (G protein-coupled receptors, GPCR) 和非 GPCR 两大类^[90, 91]。在 GPCR 信号通路中, 信号分子 (如激素、神经递质等) 作为配体与 GPCR 结合, 激活 G 蛋白。G 蛋白由 α 、 β 和 γ 三个亚单位组成, 激活后的 G 蛋白会使 α 亚单位从 β 和 γ 亚单位上解离, 从而激活下游一系列的蛋白激酶、离子通道或一些细胞内信号传导分子, 最终调控细胞的功能。在心血管健康中, G 蛋白信号通路已被证明可以通过调节血管平滑肌细胞及心肌细胞中的钙离子水平来调节血管收缩和舒张及心肌的收缩及心率^[92, 93]; 并能够通过 GPCR 的激活影响内皮细胞的功能, 包括通过增强血管生成因子 (如 VEGF) 的信号

通路促进血管新生, 或通过调控细胞间连接蛋白表达和血管平滑肌细胞的收缩调节血管通透性^[94]。

ATE1 是 Arg/N 端规则通路中介导 Nds 转变为 Arg 的酶, *ATE1*^{-/-} 小鼠胚胎在妊娠中期死亡, 并与心脏发育和血管生成缺陷相关^[18]。UBR1 和 UBR2 是 ATE1 依赖的精氨酸化途径的下游 E3 泛素连接酶, 可识别和降解 RGS 蛋白家族中的 RGS4、RGS5 和 RGS16^[42, 43]。RGS 蛋白家族与 G 蛋白信号通路密切相关。RGS 通过与 GPCR 以及 G 蛋白亚单位的相互作用, 调控 G 蛋白信号传导的强度和持续时间, RGS 蛋白家族中的成员可以通过多种机制抑制 G 蛋白信号通路, 其中最重要的机制是通过促进 GTP 酶活性促使 $G\alpha$ 亚单位回到其不活化的 GDP 结合态。这样一来, RGS 蛋白可以迅速将 $G\alpha$ 亚单位转变为失活状态, 从而减少下游信号级联反应的持续时间和强度, 调节细胞对外界刺激的响应。这种 RGS 蛋白对 G 蛋白通路的负调控对于控制心肌生长、血管成熟和完整性至关重要, 在调控心脏和血管的生长形成和信号传导过程中发挥了重要作用^[42, 95–98]。在一项研究中, 研究人员已证明在 *ATE1*^{-/-} 小鼠中, 由于 RGS4 (RGS5 及 RGS16) 无法通过 Arg/N 端规则通路及时降解从而导致 G 蛋白信号传导受损是造成 *ATE1*^{-/-} 小鼠心肌发育受损的主要原因^[98]。同时, 由于这些蛋白在降解的过程中还需要有 NO 和 O₂ 的介入, 这说明 Arg/N 通路可能在心血管的信号传导和生长发育中还充当着 NO 和 O₂ 的感受器^[43]。因此, 该通路的一个功能是通过涉及 NO、O₂、ATE1、UBR1 和 UBR2 的途径降解 RGS4、RGS5 和 RGS16, 调节心脏和血管中信号传导从而影响心血管的生长发育。

此外, ATE1 缺陷的心脏肌原纤维也显示出超微结构缺陷, 包括 Z 带的弥散和整体肌原纤维的排列紊乱和无序, 这提示精氨酸化除了介导特定蛋白质的降解外, 还可能通过调节肌原纤维的结构参与心血管发育^[99] (见图 4)。

3.1.2 N 端规则通路与高血压

已知 RGS2 是 G 蛋白的调节剂, 通过减少 $G\alpha$ 的信号传导来降低血压。野生型 MQ-RGS2 (Met-Gln-RGS2) 是哺乳动物 Ac/N 端规则通路的一个靶向底物, 而其突变体 ML-RGS2 和 MR-RGS2 与人类高血压病相关, 并且也是 Ac/N 端规则通路的底物, 它们可被泛素连接酶 Teb4 (一种内质网膜包埋的泛素连接酶) 识别后降解^[100]。研究表明, 相比 MQ-

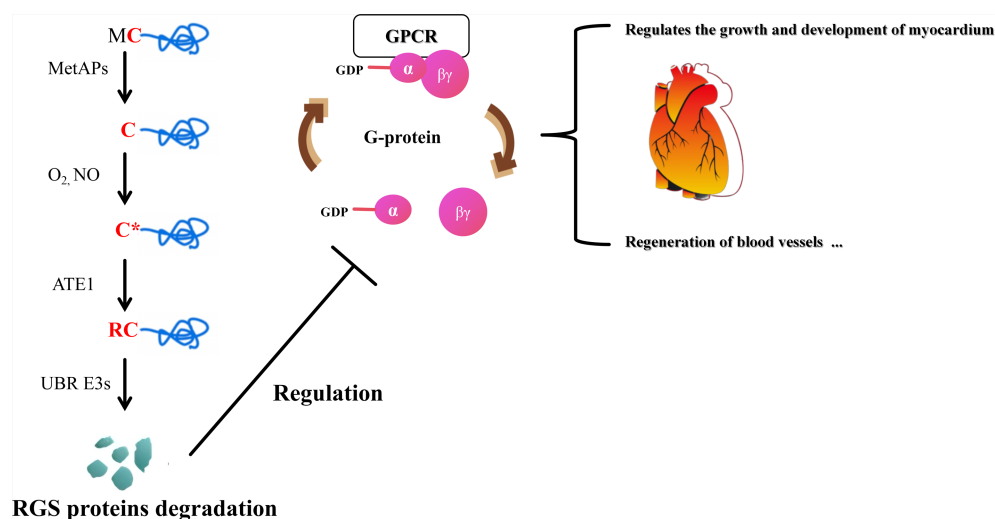


图 4. N端精氨酸化规则通路调节心肌细胞中G蛋白信号传导稳态的模型

Fig. 4. A model of Arg/N-end rule pathway regulating the homeostasis of G protein signaling in cardiomyocytes. GPCR: G protein-coupled receptors; ATE1: arginyl-tRNA-protein transferase 1; MetAPs: methionine aminopeptidases; MC: methionine-cysteine; C: cysteine; C*: C is oxidized with the participation of NO and O₂; RC: arginylated cysteine.

RGS2, ML-RGS2 和 MR-RGS2 突变的人更容易患有高血压^[100]。这是因为ML-RGS2 和 MR-RGS2 被更快地降解,所以在体内的水平较低,这导致了通过Gαq的信号传导增加,进而导致血压升高^[100,101]。因此,Ac/N端规则通路在人体血压的调控中起到了重要作用。

3.2 N端规则通路与JBS

JBS 是一种常染色体隐性遗传疾病,包括先天性外分泌腺功能不全、多种生理畸形(如头皮缺损、肛门闭锁、耳聋和甲状腺功能减退)和智力发育迟缓^[102]。研究已证明Arg/N端规则通路的E3泛素连接酶UBR1蛋白的突变或缺失是导致JBS的原因^[19,103],JBS主要由UBR1编码的缺失、截断和错义所导致^[19],其中单个或多个外显子的缺失是导致JBS相关UBR1突变的一个主要原因^[104]。

在一项研究中,研究人员在正常胰腺组织的腺泡细胞中检测到高水平的UBR1蛋白,而在JBS患者的胰腺中未检测到UBR1蛋白^[19],同时对于UBR1基因敲除的小鼠,其胰腺酶能够正常合成但不能正常分泌,这说明UBR1是调控胰腺酶分泌的重要调节因子^[19]。由此可见,Arg/N端规则通路可能在JBS的发生中起到了重要的作用,其具体机制还有待于进一步考证。

3.3 N端规则通路与神经系统

Arg/N端规则通路除了会影响心血管发育外,

还在神经系统发育中发挥重要的作用,在一项研究中,研究人员发现介导Arg/N端规则通路的E3泛素连接酶UBR1和UBR2双敲除的UBR1^{-/-}UBR2^{-/-}小鼠发生了严重的神经发育缺陷。这些小鼠在第11.5个胚胎日神经管发生严重的扭曲,神经上皮层变得弯曲、变薄,厚度不一,并且神经前体细胞在脑室区(VZ)和分化区(mantle)的分化细胞分布变得紊乱,神经前体细胞数量减少^[105]。进一步的研究发现,在UBR1^{-/-}UBR2^{-/-}小鼠胚胎中Cyclin D的表达水平降低,这可能与神经前体细胞的数量下降有关,同时UBR1^{-/-}UBR2^{-/-}小鼠胚胎中的Notch通路由于转录激活子Notch1的表达减少而被抑制,这也可能是神经发生受损的原因之一,此外,调控细胞增殖、分化和凋亡的丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路也受到UBR1和UBR2缺失的影响,导致其激活水平大幅增加,这也可能是导致神经细胞发育受损的原因^[89,105](见图5)。

虽然UBR可能通过对上述三种蛋白的调控去影响神经细胞的发育,但其具体机制仍有待于进一步的研究。

3.4 N端规则通路与生殖系统

像许多其他生物过程一样,精子发生依赖于蛋白质泛素化的蛋白降解来调节,N端规则通路对精子生成影响的研究主要体现在精子细胞中组蛋白的移除,减数分裂和生殖细胞凋亡几个方面^[106]。

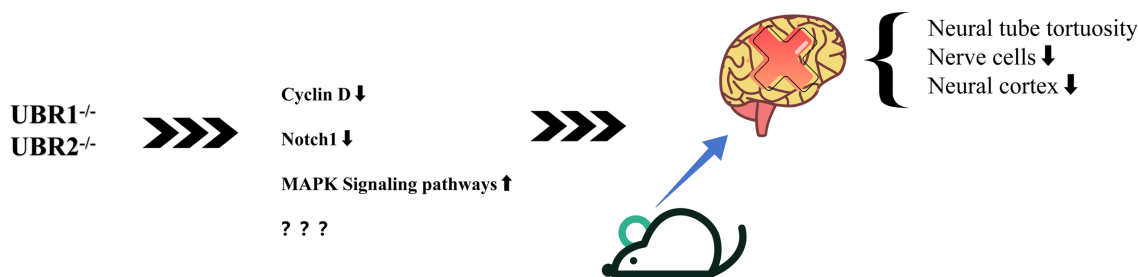


图 5. UBR 缺乏会导致小鼠神经系统的发育缺陷

Fig. 5. The UBR gene deficiency results in developmental abnormalities within the mouse nervous system. MAPK: mitogen-activated protein kinase.

3.4.1 E3 泛素连接酶在精子细胞组蛋白的移除中发挥一定的作用

在精子发生的过程中圆形精子细胞经历一系列形态和分子改变，从而分化为长形精子细胞^[107]。在这一过程中染色质内的组蛋白被替换为鱼精蛋白以允许 DNA 发生浓缩^[108]。而在 1988 年组蛋白的泛素化已被证明对其在减数分裂后的生殖细胞中降解非常重要^[109]。E2 泛素结合酶 UBC4 已被证明与组蛋白降解时睾丸内高水平的泛素化现象有一定关系^[110]，通过筛选能够泛素化组蛋白的 UBC4 依赖性 E3 泛素连接酶，发现了一种 HECT 家族的 E3 泛素连接酶，称为 E3Histone，它能够泛素化所有核心蛋白，并能够形成多泛素链，这提示它可能参与了精子细胞组蛋白的降解。紧接着，研究人员对 E3Histone 的细胞特异性表达进行了评估，发现其 mRNA 在出生后 10 天和 20 天的大鼠睾丸中表达最高，并且随着年龄的增长而降低，而其蛋白在粗线期精母细胞核中高表达，但在精子细胞亚型中没有检测到组蛋白被泛素化和降解^[111]，这说明 E3 泛素连接酶在精子细胞组蛋白的移除中确实发挥了作用，但其具体机制仍有待于进一步研究。

3.4.2 E3 泛素连接酶介导对生精上皮连接复合体的调节

相邻支持细胞间的紧密连接是构成血睾屏障的

主要组织。血睾屏障将减数分裂后的生殖细胞与体循环隔离开来，防止在免疫耐受建立后对这些细胞产生免疫反应，为精子发生提供了合适的环境。在睾丸中，二倍体精原干细胞及其分化过程中的精原细胞紧贴基底膜，位于血睾屏障下方，这有助于它们通过增殖和分化维持生育功能。与此同时，进行减数分裂的精母细胞以及处于不同发育阶段的精子细胞则位于血睾屏障的上方，这一空间布局确保了它们能够在不受外界干扰的环境中完成其生命周期。因此，一个复杂和动态的重组血睾屏障的过程允许细线前期精母细胞和细线期精母细胞穿过血睾屏障进入内腔室。这个过程受到多种机制的调节，其中也包括 UPS 的参与。

Itch 属于 E3 泛素连接酶 HECT 家族，在整个发育过程中广泛表达于组织和器官，由一个 N 端脂质结合 C2 结构域、4 个内部 WW 蛋白结合域和一个 C 端酶活性 HECT 结构域组成^[112]。在大鼠睾丸中，Itch 介导紧密连接蛋白 occludin 的泛素化和蛋白降解性破坏，而 occludin 是构成血睾屏障的一个重要介质，当紧密连接蛋白被破坏时，研究人员观察到 Itch 的蛋白质水平增加，因此 Itch 通过调节支持细胞间紧密连接的降解达到调节血睾屏障功能，影响精子发生^[113] (见图 6)。

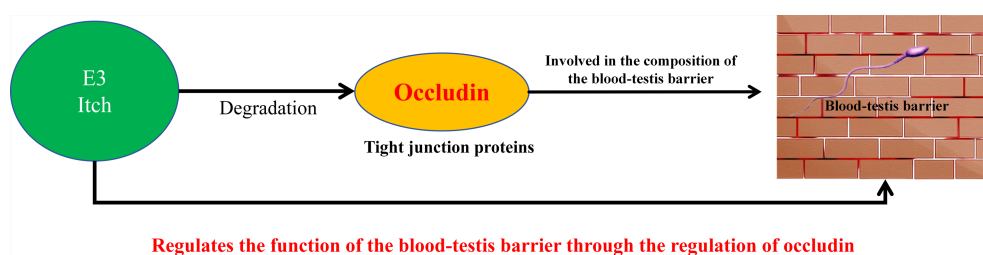


图 6. E3 泛素连接酶 Itch 通过调控 occludin 降解调控血睾屏障的功能

Fig. 6. The E3 ligase Itch modulates the function of the blood-testis barrier by regulating occludin degradation.

E3 泛素连接酶 β -TrCP 是功能性精子发生所必需的,在哺乳动物中 β -TrCP 分为 β -TrCP1 和 β -TrCP2 两种亚型,二者具有相似的生化性质^[73,74]。研究发现, β -TrCP1^{-/-}小鼠的精子发生和生育力受到中度破坏^[114],而 β -TrCP2^{-/-}小鼠精子发生过程受到干扰,影响精原细胞、精母细胞和精子细胞的正常发育和功能^[115]。研究发现, β -TrCP1 和 β -TrCP2 水平的降低是由于转录调节因子 snail 的稳定表达所导致的,snail 是这两种亚型的已知底物。在 β -TrCP2 发育不全的小鼠模型中,观察到 snail 水平的上升会导致 E-cadherin 表达减少,进而破坏支持细胞与生殖细胞之间的黏着结构,这是导致精子发生障碍的一个关键因素^[115,116] (见图 7)。

综上所述,E3 泛素连接酶可以通过介导对血睾屏障紧密连接的调节起到调控精子发生的作用。

3.4.3 E3 泛素连接酶对精原细胞减数分裂的影响

减数分裂是生物细胞中染色体数目减半的分裂方式,也是精原细胞转变为精子的唯一途径。许多 E3 泛素连接酶已被证明在精母细胞产生精子的过程中起到重要调节因子的作用。

CUL4A (cullin 4A) 是一种 E3 泛素连接酶,属于泛素连接酶 Cullin 家族,也是哺乳动物中发现的最大的连接酶家族^[117]。它已被证明在精子的生成过程中发挥了重要作用。Kopanja 等人通过删除外显子 4~8 制备了 $Cul4A^{-/-}$ 小鼠,发现雄性 $Cul4A^{-/-}$ 小鼠睾丸重量显著下降,附睾和睾丸中的精母细胞数量减少,精母细胞严重变形,活力极低。这些小鼠睾丸中异常的多核生殖细胞增多,生殖细胞凋亡数量增多^[118]。而在另一项研究中,研究人员通过删除外显子 17~19 制备了 $Cul4A^{-/-}$ 小鼠,也发现这些小鼠睾丸中异常的多核生殖细胞增多,生殖细胞凋亡数量增多,精子活力下降^[119]。这些研究说明,CUL4A 可

能通过促进生殖细胞的减数分裂和分化维持精子的正常生长发育。

此外,E3 泛素连接酶 RNF8 被认为在组蛋白泛素化降解的过程中,与 E2 结合酶 UBC13 结合,使组蛋白 H2A 和 H2AX 泛素化^[120,121]。在一项 RNF8 基因缺陷小鼠的研究中发现,RNF8 的缺失会阻碍精子的发生,但却不影响卵巢的生长发育^[122]。RNF8 对组蛋白的泛素化也被认为在减数分裂后生殖细胞的核小体组蛋白的移除中发挥作用,使组蛋白被鱼精蛋白取代^[123]。

综上所述,我们认为 E3 泛素连接酶在精子发生过程中发挥了十分重要的作用,而 E3 泛素连接酶又是 N 端规则通路中不可或缺的一部分,这提示 N 端规则通路在精子发生中发挥了作用。

3.5 N 端规则通路对细胞凋亡的调控

Arg/N 端规则通路被证明在抑制细胞凋亡的过程中发挥重要作用,细胞凋亡往往由 caspase 所介导^[124,125],在细胞凋亡的过程中 caspase 将蛋白裂解为很多的凋亡片段,caspase 在哺乳动物细胞中切割约 500~1 000 种不同的蛋白质^[126]。所得蛋白质片段的一小部分包含具有促凋亡活性的多肽,它们对细胞凋亡有着促进作用。事实上,已知的促凋亡蛋白片段 Cys-RIPK1、Cys-TRAF1、Asp-BRCA1、Leu-LIMK1、Tyr-NEDD9、Arg-BID、Asp-BCLX、Arg-BIMEL、Asp-EPHA4 和 Tyr-MET 都具有不稳定的 N 端残基,并且它们都是 Arg/N 端规则通路的短寿命底物。很明显,促凋亡片段的 N 末端残基的不稳定性在进化中总是保守的。进一步的研究发现,Cys-RIPK1 的代谢稳定性显著提升了人细胞中效应 caspase-3 的活性,这提示 Arg/N 端规则通过降解凋亡蛋白片段起到抗凋亡作用^[88] (见图 8)。

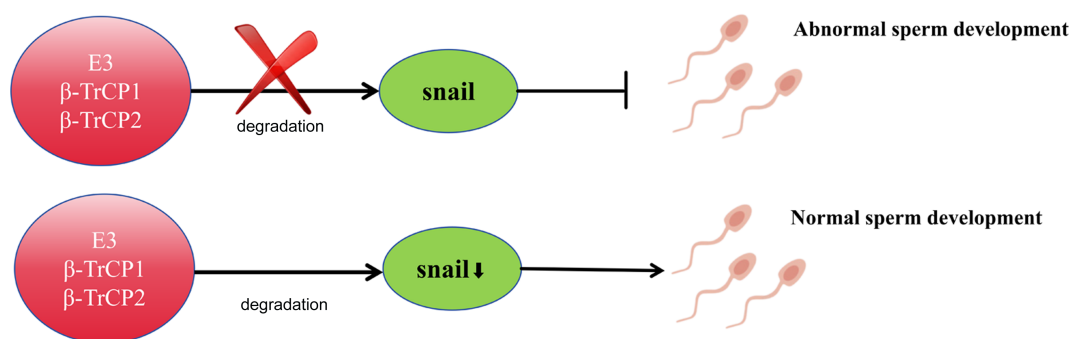


图 7. E3 泛素连接酶 β -TrCP 通过调控 snail 降解保证精子的正常发生

Fig. 7. The E3 ubiquitin ligase β -TrCP regulates the degradation of snail to ensure proper spermatogenesis.

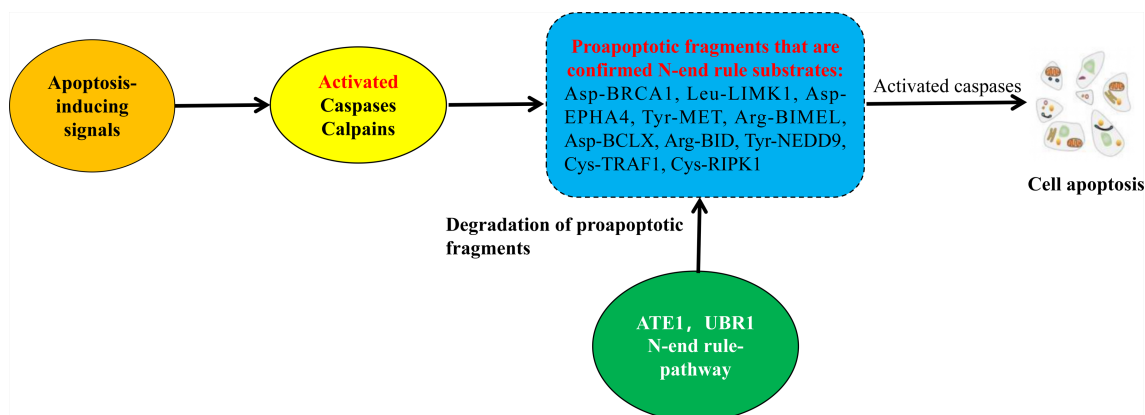


图 8. Arg/N 端规则通过降解凋亡蛋白片段起到抗凋亡作用

Fig. 8. The Arg/N end rule pathway terminates the antiapoptotic effect by degrading fragments of apoptosis proteins. ATE1: arginyl-tRNA-protein transferase 1; UBR1: ubiquitin protein ligase E3 component N-recogin 1.

4 展望

自 1986 年被首次发现以来, N 端规则通路已成为一种主要的细胞蛋白降解系统, 人体中大部分细胞蛋白在其生命周期中至少都短暂地携带过 N 端不稳定残基, 这意味着大多数蛋白都可能通过 N 端规则通路被加以调节。虽然数十年来对 N 端规则通路的研究取得了极大的进展, 但仍有许多潜藏的知识等待着人们去发掘。随着越来越多的 N 端规则通路被发现, 这个古老的系统中所藏着的许多还未被发现的生物学知识, 也终将陆续呈现在我们的眼前。

参考文献

- Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Neurodegener Dis* 2012; 10(1–4): 7–22.
- Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci* 2006; 31(1): 137–155.
- Hochstrasser M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 1996; 30(1): 405–439.
- Jentsch S. Ubiquitin-dependent protein degradation: a cellular perspective. *Trends Cell Biol* 1992; 2(4): 98–103.
- Roos-Mattjus P, Sistonen L. The ubiquitin-proteasome pathway. *Ann Med* 2004; 36(4): 285–295.
- Nakatogawa H. Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21(8): 439–458.
- Paudel RR, Lu D, Roy Chowdhury S, Monroy E Y, Wang J. Targeted protein degradation via lysosomes. *Biochemistry* 2023; 62(3): 564–579.
- Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R, Gu W. Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* 2003; 302(5652): 1972–1975.
- Lan QY (兰秋艳), Gao Y, Li Y, Hong X, Xu P. Progress in ubiquitin, ubiquitin chain and protein ubiquitination. *Chin J Biotechnol (生物工程学报)* 2016; 32(1): 14–30 (in Chinese).
- Satoh T, Sakata E, Yamamoto S, Yamaguchi Y, Sumiyoshi A, Wakatsuki S, Kato K. Crystal structure of cyclic Lys48-linked tetraubiquitin. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 400(3): 329–333.
- Varshavsky A. Naming a targeting signal. *Cell* 1991; 64(1): 13–15.
- Bachmair A, Finley D, Varshavsky A. *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 1986; 234(4773): 179–186.
- Bachmair A, Varshavsky A. The degradation signal in a short-lived protein. *Cell* 1989; 56(6): 1019–1032.
- Varshavsky A. The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Sci* 2011; 20(8): 1298–1345.
- Sriram S M, Kim B Y, Kwon Y T. The N-end rule pathway: emerging functions and molecular principles of substrate recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12(11): 735–747.
- Liu Y, Liu C, Dong W, Li W. Physiological functions and clinical implications of the N-end rule pathway. *Front Med* 2016; 10(3): 258–270.
- Ellery KM, Erdman SH. Johanson-Blizzard syndrome: expanding the phenotype of exocrine pancreatic insufficiency. *JOP* 2014; 15(4): 388–390.
- Kwon YT, Kashina AS, Davydov IV, Hu RG, An JY, Seo J W, Du F, Varshavsky A. An essential role of N-terminal arginylation in cardiovascular development. *Science* 2002; 297(5578): 96–99.
- Zenker M, Mayerle J, Lerch MM, Tagariello A, Zerres K, Durie PR, Beier M, Hulskamp G, Guzman C, Rehder H, Beemer FA, Hamel B, Vanlieferinghen P, Gershoni-Baruch R, Vieira MW, Dumic M, Auslender R, Gil-Da-Silva-Lopes VL, Steinlicht S, Rauh M, Shalev SA, Thiel C, Ekici AB, Winterpacht A, Kwon YT, Varshavsky A, Reis A. Deficiency of UBR1, a ubiquitin ligase of the N-end rule path-

- way, causes pancreatic dysfunction, malformations and mental retardation (Johanson-Blizzard syndrome). *Nat Genet* 2005; 37(12): 1345–1350.
- 20 Hwang CS, Shemorry A, Auerbach D, Varshavsky A. The N-end rule pathway is mediated by a complex of the RING-type Ubr1 and HECT-type Ufd4 ubiquitin ligases. *Nat Cell Biol* 2010; 12(12): 1177–1185.
- 21 Kim BH, Kim MK, Oh SJ, Nguyen KT, Kim JH, Varshavsky A, Hwang CS, Song HK. Crystal structure of the Ate1 arginyl-tRNA-protein transferase and arginylation of N-degron substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022; 119(31): e2209597119.
- 22 Jeong DE, Lee HS, Ku B, Kim CH, Kim SJ, Shin HC. Insights into the recognition mechanism in the UBR box of UBR4 for its specific substrates. *Commun Biol* 2023; 6(1): 1214.
- 23 Gonda DK, Bachmair A, Wunning I, Tobias J W, Lane WS, Varshavsky A. Universality and structure of the N-end rule. *J Biol Chem* 1989; 264(28): 16700–16712.
- 24 Graciet E, Mesiti F, Wellmer F. Structure and evolutionary conservation of the plant N-end rule pathway. *Plant J* 2010; 61(5): 741–751.
- 25 Potuschak T, Stary S, Schlogelhofer P, Becker F, Nejinskaia V, Bachmair A. PRT1 of *Arabidopsis thaliana* encodes a component of the plant N-end rule pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(14): 7904–7908.
- 26 Tobias JW, Shrader TE, Rocap G, Varshavsky A. The N-end rule in bacteria. *Science* 1991; 254(5036): 1374–1377.
- 27 Hwang CS, Shemorry A, Varshavsky A. N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals. *Science* 2010; 327(5968): 973–977.
- 28 Lee KE, Heo J E, Kim JM, Hwang CS. N-terminal acetylation-targeted N-end rule proteolytic system: The Ac/N-end rule pathway. *Mol Cells* 2016; 39(3): 169–178.
- 29 Chen SJ, Wu X, Wadas B, Oh JH, Varshavsky A. An N-end rule pathway that recognizes proline and destroys gluconeogenic enzymes. *Science* 2017; 355(6323): eaal3655.
- 30 Dougan DA, Varshavsky A. Understanding the Pro/N-end rule pathway. *Nat Chem Biol* 2018; 14(5): 415–416.
- 31 Sherpa D, Chrutowicz J, Schulman BA. How the ends signal the end: Regulation by E3 ubiquitin ligases recognizing protein termini. *Mol Cell* 2022; 82(8): 1424–1438.
- 32 Matta-Camacho E, Kozlov G, Li FF, Gehring K. Structural basis of substrate recognition and specificity in the N-end rule pathway. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17(10): 1182–1187.
- 33 Tasaki T, Zakrzewska A, Dudgeon DD, Jiang Y, Lazo JS, Kwon YT. The substrate recognition domains of the N-end rule pathway. *J Biol Chem* 2009; 284(3): 1884–1895.
- 34 Choi WS, Jeong BC, Joo YJ, Lee MR, Kim J, Eck MJ, Song HK. Structural basis for the recognition of N-end rule substrates by the UBR box of ubiquitin ligases. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17(10): 1175–1181.
- 35 Tasaki T, Kwon YT. The mammalian N-end rule pathway: new insights into its components and physiological roles. *Trends Biochem Sci* 2007; 32(11): 520–528.
- 36 Balzi E, Choder M, Chen WN, Varshavsky A, Goffeau A. Cloning and functional analysis of the arginyl-tRNA-protein transferase gene ATE1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1990; 265(13): 7464–7471.
- 37 Wang J, Han X, Wong CC, Cheng H, Aslanian A, Xu T, Leavis P, Roder H, Hedstrom L, Yates JR 3rd, Kashina A. Arginyltransferase ATE1 catalyzes midchain arginylation of proteins at side chain carboxylates *in vivo*. *Chem Biol* 2014; 21(3): 331–337.
- 38 Baker RT, Varshavsky A. Yeast N-terminal amidase. A new enzyme and component of the N-end rule pathway. *J Biol Chem* 1995; 270(20): 12065–12074.
- 39 Wang H, Piatkov KI, Brower CS, Varshavsky A. Glutamine-specific N-terminal amidase, a component of the N-end rule pathway. *Mol Cell* 2009; 34(6): 686–695.
- 40 Grigoryev S, Stewart A E, Kwon YT, Arfin SM, Bradshaw RA, Jenkins N A, Copeland NG, Varshavsky A. A mouse amidase specific for N-terminal asparagine. The gene, the enzyme, and their function in the N-end rule pathway. *J Biol Chem* 1996; 271(45): 28521–28532.
- 41 Heo AJ, Ji CH, Kwon YT. The Cys/N-degron pathway in the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Trends Cell Biol* 2023; 33(3): 247–259.
- 42 Lee MJ, Tasaki T, Moroi K, An JY, Kimura S, Davydov IV, Kwon YT. RGS4 and RGS5 are *in vivo* substrates of the N-end rule pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(42): 15030–15035.
- 43 Hu RG, Sheng J, Qi X, Xu Z, Takahashi TT, Varshavsky A. The N-end rule pathway as a nitric oxide sensor controlling the levels of multiple regulators. *Nature* 2005; 437(7061): 981–986.
- 44 Gibbs DJ, Lee SC, Isa NM, Gramuglia S, Fukao T, Bassel GW, Correia CS, Corbinea F, Theodoulou FL, Bailey-Serres J, Holdsworth MJ. Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature* 2011; 479(7373): 415–418.
- 45 Licausi F, Kosmacz M, Weits DA, Giuntoli B, Giorgi FM, Voesenek LA, Perata P, Van Dongen JT. Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature* 2011; 479(7373): 419–422.
- 46 Brower CS, Varshavsky A. Ablation of arginylation in the mouse N-end rule pathway: loss of fat, higher metabolic rate, damaged spermatogenesis, and neurological perturbations. *PLoS One* 2009; 4(11): e7757.
- 47 Giglione C, Ficulaine S, Meinnel T. N-terminal protein modifications: Bringing back into play the ribosome. *Biochimie* 2015; 114: 134–146.
- 48 Starheim KK, Gevaert K, Arnesen T. Protein N-terminal

- acetyltransferases: when the start matters. *Trends Biochem Sci* 2012; 37(4): 152–161.
- 49 Arnesen T, Van Damme P, Polevoda B, Helsens K, Evjenth R, Colaert N, Varhaug JE, Vandekerckhove J, Lillehaug JR, Sherman F, Gevaert K. Proteomics analyses reveal the evolutionary conservation and divergence of N-terminal acetyltransferases from yeast and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(20): 8157–8162.
 - 50 Polevoda B, Sherman F. N-terminal acetyltransferases and sequence requirements for N-terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J Mol Biol* 2003; 325(4): 595–622.
 - 51 Goetze S, Qeli E, Mosimann C, Staes A, Gerrits B, Roschitzki B, Mohanty S, Niederer EM, Laczkó E, Timmerman E, Lange V, Hafen E, Aebersold R, Vandekerckhove J, Basler K, Ahrens CH, Gevaert K, Brunner E. Identification and functional characterization of N-terminally acetylated proteins in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol* 2009; 7(11): e1000236.
 - 52 Polevoda B, Norbeck J, Takakura H, Blomberg A, Sherman F. Identification and specificities of N-terminal acetyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 1999; 18(21): 6155–6168.
 - 53 Aksnes H, Hole K, Arnesen T. Molecular, cellular, and physiological significance of N-terminal acetylation. *Int Rev Cell Mol Biol* 2015; 316: 267–305.
 - 54 Dorfel MJ, Lyon GJ. The biological functions of Naa10 - From amino-terminal acetylation to human disease. *Gene* 2015; 567(2): 103–131.
 - 55 Kalvik TV, Arnesen T. Protein N-terminal acetyltransferases in cancer. *Oncogene* 2013; 32(3): 269–276.
 - 56 Ferrandez-Ayela A, Micol-Ponce R, Sanchez-Garcia AB, Alonso-Peral MM, Micol JL, Ponce MR. Mutation of an Arabidopsis NatB N-alpha-terminal acetylation complex component causes pleiotropic developmental defects. *PLoS One* 2013; 8(11): e80697.
 - 57 Menssen R, Schweiggert J, Schreiner J, Kusevic D, Reuther J, Braun B, Wolf DH. Exploring the topology of the Gid complex, the E3 ubiquitin ligase involved in catabolite-induced degradation of gluconeogenic enzymes. *J Biol Chem* 2012; 287(30): 25602–25614.
 - 58 Hammerle M, Bauer J, Rose M, Szallies A, Thumm M, Dusterhus S, Mecke D, Entian KD, Wolf DH. Proteins of newly isolated mutants and the amino-terminal proline are essential for ubiquitin-proteasome-catalyzed catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1998; 273(39): 25000–25005.
 - 59 Maitland MER, Ona G, Chiasson CA, Wang X, Ma J, Moor SE, Barber KR, Lajoie GA, Shaw GS, Schild-Poulter C. The mammalian CTLH complex is an E3 ubiquitin ligase that targets its subunit muskellin for degradation. *Sci Rep* 2019; 9(1): 9864.
 - 60 Chen SJ, Kim L, Song HK, Varshavsky A. Aminopeptidases trim Xaa-Pro proteins, initiating their degradation by the Pro/N-degron pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021; 118(43): e2115430118.
 - 61 Li B, Qiu B, Lee DS, Walton ZE, Ochocki JD, Mathew LK, Mancuso A, Gade TP, Keith B, Nissim I, Simon MC. Fructose-1,6-bisphosphatase opposes renal carcinoma progression. *Nature* 2014; 513(7517): 251–255.
 - 62 Balsa-Martinez E, Puigserver P. Cancer cells hijack gluconeogenic enzymes to fuel cell growth. *Mol Cell* 2015; 60(4): 509–511.
 - 63 Dong C, Chen SJ, Melnykov A, Weirich S, Sun K, Jeltsch A, Varshavsky A, Min J. Recognition of nonproline N-terminal residues by the Pro/N-degron pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; 117(25): 14158–14167.
 - 64 Timms RT, Zhang Z, Rhee DY, Harper JW, Koren I, Elledge SJ. A glycine-specific N-degron pathway mediates the quality control of protein N-myristoylation. *Science* 2019; 365(6448): eaaw4912.
 - 65 Yan X, Li Y, Wang G, Zhou Z, Song G, Feng Q, Zhao Y, Mi W, Ma Z, Dong C. Molecular basis for recognition of Gly/N-degrons by CRL2(ZYG11B) and CRL2(ZER1). *Mol Cell* 2021; 81(16): 3262–3274.e3.
 - 66 Liu X, Li Y, Castro L, Yu Z, Cheng Y, Daugherty MD, Gross JD. Structure of the E3 ligase CRL2-ZYG11B with substrates reveals the molecular basis for N-degron recognition and ubiquitination. *bioRxiv [Preprint]*. 2024 Jun 24: 2024.06.24.600508. doi: 10.1101/2024.06.24.600508.
 - 67 Wright MH, Heal WP, Mann DJ, Tate EW. Protein myristoylation in health and disease. *J Chem Biol* 2010; 3(1): 19–35.
 - 68 Das U, Kumar S, Dimmock JR, Sharma RK. Inhibition of protein N-myristoylation: a therapeutic protocol in developing anticancer agents. *Curr Cancer Drug Targets* 2012; 12(6): 667–692.
 - 69 Felsted RL, Glover CJ, Hartman K. Protein N-myristoylation as a chemotherapeutic target for cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(21): 1571–1573.
 - 70 Wang B, Dai T, Sun W, Wei Y, Ren J, Zhang L, Zhang M, Zhou F. Protein N-myristoylation: functions and mechanisms in control of innate immunity. *Cell Mol Immunol* 2021; 18(4): 878–888.
 - 71 De Jonge HR, Hogema B, Tilly BC. Protein N-myristoylation: critical role in apoptosis and salt tolerance. *Sci STKE* 2000; 2000(63): pe1.
 - 72 Rajala RV, Kakkar R, Kanthan R, Radhi JM, Wang X, Wang R, Datla R S, Sharma RK. Altered expression and localization of N-myristoyltransferase in experimentally induced rat model of ischemia-reperfusion. *J Cell Biochem* 2002; 86(3): 509–519.
 - 73 Sonnevile R, Gonczy P. Zyg-11 and cul-2 regulate progression through meiosis II and polarity establishment in *C. elegans*. *Development* 2004; 131(15): 3527–3543.

- 74 Liu J, Vasudevan S, Kipreos ET. CUL-2 and ZYG-11 promote meiotic anaphase II and the proper placement of the anterior-posterior axis in *C. elegans*. *Development* 2004; 131(15): 3513–3525.
- 75 Vasudevan S, Starostina NG, Kipreos ET. The *Caenorhabditis elegans* cell-cycle regulator ZYG-11 defines a conserved family of CUL-2 complex components. *EMBO Rep* 2007; 8(3): 279–286.
- 76 Balachandran RS, Heighington CS, Starostina NG, Anderson JW, Owen DL, Vasudevan S, Kipreos ET. The ubiquitin ligase CRL2^{ZYG11} targets cyclin B1 for degradation in a conserved pathway that facilitates mitotic slippage. *J Cell Biol* 2016; 215(2): 151–166.
- 77 Long PA, Larsen BT, Evans JM, Olson TM. Exome sequencing identifies pathogenic and modifier mutations in a child with sporadic dilated cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc* 2015; 4(12): e002443.
- 78 Zhang B, Li Y, Feng Q, Song L, Dong C, Yan X. Structural insights into ORF10 recognition by ZYG11B. *Biochem Biophys Res Commun* 2022; 616: 14–18.
- 79 Mena EL, Donahue CJ, Vaites LP, Li J, Rona G, O'leary C, Lignitto L, Miwatani-Minter B, Paulo JA, Dhabaria A, Ueberheide B, Gygi SP, Pagano M, Harper JW, Davey RA, Elledge SJ. ORF10-Cullin-2-ZYG11B complex is not required for SARS-CoV-2 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021; 118(17): e2023157118.
- 80 Feral C, Wu YQ, Pawlak A, Guellaen G. Meiotic human sperm cells express a leucine-rich homologue of *Caenorhabditis elegans* early embryogenesis gene, Zyg-11. *Mol Hum Reprod* 2001; 7(12): 1115–1122.
- 81 Nouel J, White EA. ZER1 contributes to the carcinogenic activity of high-risk HPV E7 proteins. *mBio* 2022; 13(6): e0203322.
- 82 Robinson KS, Teo D E T, Tan KS, Toh GA, Ong HH, Lim CK, Lay K, Au BV, Lew TS, Chu JJH, Chow VTK, Wang Y, Zhong FL, Reversade B. Enteroviral 3C protease activates the human NLRP1 inflammasome in airway epithelia. *Science* 2020; 370(6521): eaay2002.
- 83 Li Y, Zhao Y, Yan X, Ye C, Weirich S, Zhang B, Wang X, Song L, Jiang C, Jeltsch A, Dong C, Mi W. CRL2(ZER1/ZYG11B) recognizes small N-terminal residues for degradation. *Nat Commun* 2022; 13(1): 7636.
- 84 Hu RG, Wang H, Xia Z, Varshavsky A. The N-end rule pathway is a sensor of heme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(1): 76–81.
- 85 Sultana R, Theodoraki MA, Caplan AJ. UBR1 promotes protein kinase quality control and sensitizes cells to Hsp90 inhibition. *Exp Cell Res* 2012; 318(1): 53–60.
- 86 Driscoll DF. Clinical issues regarding the use of total nutrient admixtures. *DICP* 1990; 24(3): 296–303.
- 87 Rao H, Uhlmann F, Nasmyth K, Varshavsky A. Degradation of a cohesin subunit by the N-end rule pathway is essential for chromosome stability. *Nature* 2001; 410(6831): 955–959.
- 88 Piatkov KI, Brower CS, Varshavsky A. The N-end rule pathway counteracts cell death by destroying proapoptotic protein fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(27): E1839–E1847.
- 89 Eldeeb MA, Ragheb MA, Soliman MH, Fahlman RP. Regulation of neurodegeneration-associated protein fragments by the N-degron pathways. *Neurotox Res* 2022; 40(1): 298–318.
- 90 Ross EM, Wilkie TM. GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 795–827.
- 91 Neves SR, Ram PT, Iyengar R. G protein pathways. *Science* 2002; 296(5573): 1636–1639.
- 92 Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 2006; 99(12): 1293–1304.
- 93 Kehat I, Molkentin JD. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation* 2010; 122(25): 2727–2735.
- 94 Li J, Han X, Jiang J, Zhong R, Williams GM, Pickering JG, Chow LH. Vascular smooth muscle cells of recipient origin mediate intimal expansion after aortic allotransplantation in mice. *Am J Pathol* 2001; 158(6): 1943–1947.
- 95 Berger M, Bergers G, Arnold B, Hammerling GJ, Ganss R. Regulator of G-protein signaling-5 induction in pericytes coincides with active vessel remodeling during neovascularization. *Blood* 2005; 105(3): 1094–1101.
- 96 Rogers JH, Tamirisa P, Kovacs A, Weinheimer C, Courtois M, Blumer KJ, Kelly DP, Muslin AJ. RGS4 causes increased mortality and reduced cardiac hypertrophy in response to pressure overload. *J Clin Invest* 1999; 104(5): 567–576.
- 97 Hendriks-Balk MC, Hajji N, Van Loenen PB, Michel MC, Peters SL, Alewijnse AE. Sphingosine-1-phosphate regulates RGS2 and RGS16 mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 2009; 606(1–3): 25–31.
- 98 Lee MJ, Kim DE, Zakrzewska A, Yoo YD, Kim SH, Kim ST, Seo JW, Lee YS, Dorn GW 2nd, Oh U, Kim BY, Kwon YT. Characterization of arginylation branch of N-end rule pathway in G-protein-mediated proliferation and signaling of cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2012; 287(28): 24043–24052.
- 99 Kurosaka S, Leu NA, Pavlov I, Han X, Ribeiro PA, Xu T, Bunte R, Saha S, Wang J, Cornachione A, Mai W, Yates JR 3rd, Rassier DE, Kashina A. Arginylation regulates myofibrils to maintain heart function and prevent dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2012; 53(3): 333–341.
- 100 Park SE, Kim JM, Seok OH, Cho H, Wadas B, Kim SY, Varshavsky A, Hwang CS. Control of mammalian G pro-

- tein signaling by N-terminal acetylation and the N-end rule pathway. *Science* 2015; 347(6227): 1249–1252.
- 101 Aksnes H, Drazic A, Arnesen T. (Hyper)tension release by N-terminal acetylation. *Trends Biochem Sci* 2015; 40(8): 422–424.
 - 102 Johanson A, Blizzard R. A syndrome of congenital aplasia of the alae nasi, deafness, hypothyroidism, dwarfism, absent permanent teeth, and malabsorption. *J Pediatr* 1971; 79(6): 982–987.
 - 103 Zenker M, Mayerle J, Reis A, Lerch MM. Genetic basis and pancreatic biology of Johanson-Blizzard syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2006; 35(2): 243–253, vii–viii.
 - 104 Sukalo M, Schaflein E, Schanze I, Everman D B, Rezaei N, Argente J, Lorda-Sanchez I, Deshpande C, Takahashi T, Kleger A, Zenker M. Expanding the mutational spectrum in Johanson-Blizzard syndrome: identification of whole exon deletions and duplications in the UBR1 gene by multiplex ligation-dependent probe amplification analysis. *Mol Genet Genomic Med* 2017; 5(6): 774–780.
 - 105 An JY, Seo J W, Tasaki T, Lee MJ, Varshavsky A, Kwon YT. Impaired neurogenesis and cardiovascular development in mice lacking the E3 ubiquitin ligases UBR1 and UBR2 of the N-end rule pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(16): 6212–6217.
 - 106 Richburg JH, Myers JL, Bratton SB. The role of E3 ligases in the ubiquitin-dependent regulation of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 30: 27–35.
 - 107 Leblond CP, Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci* 1952; 55(4): 548–573.
 - 108 Mills NC, Van NT, Means AR. Histones of rat testis chromatin during early postnatal development and their interactions with DNA. *Biol Reprod* 1977; 17(5): 760–768.
 - 109 Chen HY, Sun JM, Zhang Y, Davie JR, Meistrich ML. Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *J Biol Chem* 1998; 273(21): 13165–13169.
 - 110 Rajapurohitam V, Bedard N, Wing SS. Control of ubiquitination of proteins in rat tissues by ubiquitin conjugating enzymes and isopeptidases. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282(4): E739–E745.
 - 111 Liu Z, Miao D, Xia Q, Hermo L, Wing SS. Regulated expression of the ubiquitin protein ligase, E3(Histone)/LASU1/Mule/ARF-BP1/HUWE1, during spermatogenesis. *Dev Dyn* 2007; 236(10): 2889–2898.
 - 112 Melino G, Gallagher E, Aqeilan R I, Knight R, Peschiaroli A, Rossi M, Scialpi F, Malatesta M, Zocchi L, Browne G, Ciechanover A, Bernassola F. Itch: a HECT-type E3 ligase regulating immunity, skin and cancer. *Cell Death Differ* 2008; 15(7): 1103–1112.
 - 113 Lui WY, Lee WM. cAMP perturbs inter-Sertoli tight junction permeability barrier *in vitro* via its effect on proteasome-sensitive ubiquitination of occludin. *J Cell Physiol* 2005; 203(3): 564–572.
 - 114 Guardavaccaro D, Kudo Y, Boulaire J, Barchi M, Busino L, Donzelli M, Margottin-Goguet F, Jackson P K, Yamasaki L, Pagano M. Control of meiotic and mitotic progression by the F box protein beta-Trcp1 *in vivo*. *Dev Cell* 2003; 4(6): 799–812.
 - 115 Kanarek N, Horwitz E, Mayan I, Leshets M, Cojocaru G, Davis M, Tsuberi BZ, Pikarsky E, Pagano M, Ben-Neriah Y. Spermatogenesis rescue in a mouse deficient for the ubiquitin ligase SCFbeta-TrCP by single substrate depletion. *Genes Dev* 2010; 24(5): 470–477.
 - 116 Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, Hung MC. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 2004; 6(10): 931–940.
 - 117 Sarikas A, Hartmann T, Pan ZQ. The cullin protein family. *Genome Biol* 2011; 12(4): 220.
 - 118 Kopanja D, Roy N, Stoyanova T, Hess RA, Bagchi S, Raychaudhuri P. Cul4A is essential for spermatogenesis and male fertility. *Dev Biol* 2011; 352(2): 278–287.
 - 119 Yin Y, Lin C, Kim ST, Roig I, Chen H, Liu L, Veith GM, Jin RU, Keeney S, Jasin M, Moley K, Zhou P, Ma L. The E3 ubiquitin ligase Cullin 4A regulates meiotic progression in mouse spermatogenesis. *Dev Biol* 2011; 356(1): 51–62.
 - 120 Kolas NK, Chapman JR, Nakada S, Ylanko J, Chahwan R, Sweeney FD, Panier S, Mendez M, Wildenhain J, Thomson TM, Pelletier L, Jackson SP, Durocher D. Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* 2007; 318(5856): 1637–1640.
 - 121 Huen MS, Grant R, Manke I, Minn K, Yu X, Yaffe MB, Chen J. RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell* 2007; 131(5): 901–914.
 - 122 Li L, Halaby MJ, Hakem A, Cardoso R, El Ghamrasni S, Harding S, Chan N, Bristow R, Sanchez O, Durocher D, Hakem R. Rnf8 deficiency impairs class switch recombination, spermatogenesis, and genomic integrity and predisposes for cancer. *J Exp Med* 2010; 207(5): 983–997.
 - 123 Lu LY, Wu J, Ye L, Gavrilina GB, Saunders TL, Yu X. RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Dev Cell* 2010; 18(3): 371–384.
 - 124 Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(3): 231–241.
 - 125 Philchenkov A A. Caspases as regulators of apoptosis and other cell functions. *Biochemistry (Mosc)* 2003; 68(4): 365–376.
 - 126 Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* 2009; 284(33): 21777–21781.