

· 基础研究 ·

血管内皮功能调节酶 *pCDH-Myc-UBR5* 分子克隆的构建

赵海静¹, 刘琪¹, 金蕊², 程龙², 刘昱圻³, 陈韵岱^{3*}

(¹ 解放军医学院, 北京 100853; ² 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院生物工程研究所, 北京 100071; ³ 中国人民解放军总医院第六医学中心心血管病医学部, 北京 100048)

【摘要】 目的 构建 *pCDH-Myc-UBR5* 重组质粒, 并探究泛素蛋白连接酶 E3 组分 N-识别蛋白 5 (UBR5) 在调控血管生成方面的生物学功能。**方法** 以人乳腺癌细胞 (MCF7) 的互补 DNA (cDNA) 为模板, 将 *UBR5* 基因编码区序列分为前后两段, 经聚合酶链式反应 (PCR) 扩增。两段扩增序列插入到真核表达载体 *pCDH-Myc* 中, 通过菌液 PCR 及 DNA 测序鉴定插入片段。将重组质粒瞬时转染至人胚胎肾细胞 (HEK293T) 中, 通过蛋白质印迹法检测 Myc-UBR5 蛋白的表达。为了验证 UBR5 蛋白的功能, 通过免疫共沉淀实验检测 UBR5 与先天性角化不良 1 (DKC1) 蛋白的相互作用。**结果** 成功构建 *pCDH-Myc-UBR5* 重组质粒。经菌液 PCR 及 DNA 测序证实 *UBR5* 扩增序列成功插入到 *pCDH-Myc* 载体中, 并在 HEK293T 中表达。免疫共沉淀实验发现 UBR5 与 DKC1 存在相互作用。**结论** 通过分子克隆技术可成功构建 *pCDH-Myc-UBR5* 质粒并在细胞中正确表达。UBR5 与血管生成调控蛋白 DKC1 存在相互作用。

【关键词】 泛素蛋白连接酶 E3 组分 N-识别蛋白 5; 重组质粒; 分子克隆; 先天性角化不良 1 蛋白; 血管生成

【中图分类号】 R34 **【文献标志码】** A **【DOI】** 10.11915/j.issn.1671-5403.2022.05.077

Construction of a recombinant plasmid encoding vascular endothelial functional regulator, *pCDH-Myc-UBR5*

ZHAO Hai-Jing¹, LIU Qi¹, JIN Rui², CHENG Long², LIU Yu-Qi³, CHEN Yun-Dai^{3*}

(¹ Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China; ² Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100071, China; ³ Senior Department of Cardiology, Sixth Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China)

【Abstract】 Objective To construct recombinant plasmid *pCDH-Myc-UBR5* and then explore the biological function of ubiquitin protein ligase E3 component N-recognin 5 (UBR5) in regulating angiogenesis. **Methods** Using the complementary DNA (cDNA) of Michigan cancer foundation-7 (MCF7) cells as a template, we divided the *UBR5* gene coding region into two segments and amplified them by polymerase chain reaction (PCR). Then the two amplified fragments were inserted into the eukaryotic expression vector *pCDH-Myc*. Bacterial liquid PCR and DNA sequencing were adopted to identify the inserted fragments. The recombinant plasmid was transiently transfected into human embryonic kidney cells 293 SV40 LT (HEK293T) and the expression of Myc-UBR5 protein was detected by Western blotting. Co-immunoprecipitation (Co-IP) assay was employed to verify whether UBR5 interacts with dyskeratosis congenita 1 (DKC1). **Results** The recombinant plasmid *pCDH-Myc-UBR5* was successfully constructed. The amplified sequence of *UBR5* was successfully inserted into *pCDH-Myc* vector and expressed in HEK293T cells, which was confirmed by bacterial liquid PCR and DNA sequencing. The results of Co-IP assay indicated the interaction between UBR5 and DKC1. **Conclusion** The plasmid *pCDH-Myc-UBR5* is successfully constructed by molecular cloning and expressed correctly in cells. UBR5 interacts with the angiogenic regulatory protein DKC1.

【Key words】 UBR5 protein; recombinant plasmid; molecular cloning; dyskeratosis congenita 1; angiogenesis

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82070434) and Beijing Nova Plan for Science and Technology (Z191100001119020).

Corresponding author: CHEN Yun-Dai, E-mail: cyundai@vip.163.com

收稿日期: 2021-11-19; 接受日期: 2021-12-16

基金项目: 国家自然科学基金 (82070434); 北京市科技新星计划 (Z191100001119020)

通信作者: 陈韵岱, E-mail: cyundai@vip.163.com

泛素蛋白连接酶 E3 组分 N-识别蛋白 5 (ubiquitin protein ligase E3 component N-recognin 5, *UBR5*) 是果蝇增生盘的哺乳动物同源基因^[1], 与细胞增殖、衰老及肿瘤的产生相关。*UBR5* 参与细胞周期的调控, 具有介导核糖体 RNA 成熟^[2]、响应 DNA 损伤反应^[3]等功能。以往的研究多聚焦在 *UBR5* 与肿瘤的相关性上, *UBR5* 通过调控经典 Wnt 信号通路, 以糖原合酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β) 依赖的方式泛素化 β -连环蛋白 (β -catenin) 并上调其表达水平^[4]。*UBR5* 在乳腺癌、胰腺癌细胞中高表达^[5], 并能促进胰腺癌、黑色素瘤等肿瘤的增殖和转移^[6,7]。

近期研究发现, *UBR5* 在心血管系统中发挥重要作用。*UBR5* 能够促进 DNA 的修复并维持内皮细胞的稳态^[8], 减轻线粒体 DNA 的损伤, 并且能够改善血管祖细胞的功能^[9], 促进受损内皮细胞的修复。有报道 *UBR5*^{-/-} 小鼠存在血管缺陷, 并且发现在小鼠中动脉损伤可引起 *UBR5* 表达水平的降低^[10]。因此 *UBR5* 可能与冠心病等心血管疾病的发生及发展相关。为进一步探究 *UBR5* 在内皮细胞稳态及心血管疾病中的作用, 我们构建了人 *UBR5* 基因的真核表达质粒, 利用人胚胎肾细胞 (human embryonic kidney cells 293 SV40 LT, HEK293T) 鉴定 *UBR5* 蛋白的表达, 并证实了 *UBR5* 与血管生成调控蛋白先天性角化不良 1 (dyskeratosis congenita 1, DKC1) 存在相互作用, 为探究 *UBR5* 在心血管系统的生物学功能提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

克隆重组载体 *pCDH-EF1-Myc-puro* (*pCDH-Myc*)、*pCDH-Flag-DKC1* 质粒、HEK293T 细胞、人乳腺癌细胞 (Michigan cancer foundation-7, MCF7) 为军事医学科学院生物工程研究所惠赠; 高保真 DNA 聚合酶购自宝日医生物技术有限公司; 限制性核酸内切酶 (*Bam*H I 及 *Not* I) 购自美国纽英伦生物技术有限公司; 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 的引物合成及基因测序委托北京博迈德公司完成。化学发光仪购自美国伯乐公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MCF7 细胞及 HEK293T 细胞培养在含有 10% 胎牛血清 (fatal bovine serum, FBS) 的改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 中, 并置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中。当细胞约 80% 融合时 1:5 传代。

1.2.2 获取目的基因 采用细胞总 RNA 提取剂

提取 MCF7 细胞的信使 RNA (messenger RNA, mRNA), 反转录为互补 DNA (complementary DNA, cDNA)。反转录第一步: 5 $\times$ 基因组 DNA 清除缓冲液 (5 $\times$ gDNA eraser buffer) 2 μ l、基因组 DNA 清除剂 (gDNA eraser) 1 μ l、mRNA 模板 $\leq$ 1 μ g、二乙基焦磷酸胺 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水补至 10 μ l, 42 °C 2 min。反转录第二步: 反转录引物混合物 1 μ l、5 $\times$ 反转录缓冲液 4 μ l、反转录酶混合物 1 μ l、DEPC 水 4 μ l, 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 冷却至 4 °C, 获得 cDNA 模板。

根据目的基因 *UBR5* 编码区序列设计扩增引物。因 *UBR5* 编码区长达 8 397 bp, 直接扩增难度较大, 成功率较低, 所以在 4 566–4 587 位碱基处将 *UBR5* 编码区分为前后两个片段分别扩增。两基因片段进行 PCR 扩增的上下游引物分别为上游引物 1 (forward primer 1, F1): 5'-ATTGTGTTAAGAAAGAGAGGATCCACGTCCATCCATTTTCGTG-3'; 下游引物 1 (reverse primer 1, R1): 5'-TGCTGATTGAGGTATACTTGCT-3'; 上游引物 2 (forward primer 2, F2): 5'-GCAAGTATACCTCAATCAGCA-3'; 下游引物 2 (reverse primer 2, R2): 5'-CTGCCCTCAGCGCCGCCACAAAACCAAAATTCTTGGTCT-3', 其中片段 1 的下游引物 R1 与片段 2 的上游引物 F2 重叠互补, 作为两片段同源臂用以重组连接。分别以 MCF7 细胞的 cDNA 为模板, F1、R1 及 F2、R2 为引物进行 PCR 扩增 *UBR5* 目的基因, 条件为: 95 °C 预变性 1 min; 98 °C 变性 10 s, 54 °C 退火 15 s, 68 °C 延伸 2.5 min, 29 个循环; 68 °C 10 min, 冷却至 4 °C。使用 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物, 并回收目的条带。

1.2.3 构建 *pCDH-Myc-UBR5* 重组质粒 使用限制性核酸内切酶 *Bam*H I 及 *Not* I 将 *pCDH-Myc* 载体双酶切。体系: 10 $\times$ 酶切缓冲液 5 μ l、内切酶各 1.5 μ l、质粒 1~2 μ g、双蒸水补至 50 μ l, 37 °C 孵育 5 h。酶切产物及目的基因使用琼脂糖凝胶电泳分离并回收目的条带。载体与目的基因重组 (摩尔比 1:1), 体系为: 2 $\times$ 克隆重组混合物 5 μ l, 双蒸水补至 10 μ l, 50 °C 连接 60 min。连接产物转化至感受态细菌, 37 °C 过夜培养。挑取多个单克隆菌落, 通过菌液 PCR 及质粒酶切鉴定阳性克隆, 并将阳性克隆送公司测序。

1.2.4 蛋白质印迹法 (Western blotting) 鉴定 *Myc-UBR5* 蛋白表达 HEK293T 细胞转染质粒 *pCDH-Myc-UBR5* 或 *pCDH-Myc* (空白对照)。细胞样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 电泳、湿转、封闭后, 使用 *Myc*-辣根过氧化物酶

(Myc-horseradish peroxidase, Myc-HRP) 抗体(1:3 000)于4℃摇床孵育过夜,显影。

1.2.5 免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP)实验 HEK293T 细胞对照组转染质粒 *pCDH-Flag-DKC1*、*pCDH-Myc*, 实验组转染质粒 *pCDH-Flag-DKC1*、*pCDH-Myc-UBR5*。使用免疫共沉淀缓冲液裂解细胞样品。免疫共沉淀缓冲液配方如下: 50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶液(pH 值 7.4)、1%聚乙二醇辛基苯基醚、0.5 mmol/L 乙二胺四乙酸溶液、150 mmol/L 氯化钠溶液、10%甘油、40 mmol/L β-巯基乙醇。样品冰上裂解 30 min,加入抗-Flag 磁珠 4℃孵育过夜。样品 SDS-PAGE 电泳,经湿转、封闭后,使用 Myc-HRP 抗体(1:3000)及 Flag-辣根过氧化物酶(Flag-horseradish peroxidase, Flag-HRP)抗体(1:5 000) 4℃摇床孵育过夜,显影。

2 结果

2.1 *pCDH-Myc-UBR5* 重组质粒构建及鉴定

为鉴定 *pCDH-Myc-UBR5* 重组质粒是否构建成

功,将两段目的片段与线性 *pCDH-Myc* 载体连接重组,转化至感受态细胞,对单克隆菌落行菌液 PCR 及酶切鉴定,将阳性克隆送公司测序。*UBR5* 基因编码区序列分为前后两段分别扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳,在 4 118 bp 及 4 295 bp 处产生特异性条带,与预期目的片段大小一致(图 1A)。使用 F1、R1 引物进行菌液 PCR 扩增,阳性菌落在 4 118 bp 处出现特异性条带(图 1B)。阳性菌液提取质粒并经 *Bam*HI、*Not*I 双酶切,出现两条特异性条带,与目的基因和载体大小相同,约为 8 397 bp、7 095 bp(图 1C)。

将菌液 PCR 及酶切鉴定均阳性的菌落进行基因测序,测序结果与 *UBR5* 序列比对一致(图 1D),证明 *UBR5* 正确插入到 *pCDH-Myc* 载体中。

2.2 Western blotting 鉴定 Myc-UBR5 蛋白表达

为验证 *pCDH-Myc-UBR5* 重组质粒能否在细胞内正确表达,将其转染至 HEK293T 细胞中,Western blotting 鉴定 Myc-UBR5 蛋白表达情况。与对照组相比,转染 *pCDH-Myc-UBR5* 质粒的细胞在约 309 ku 处出现特异条带(图 2)。

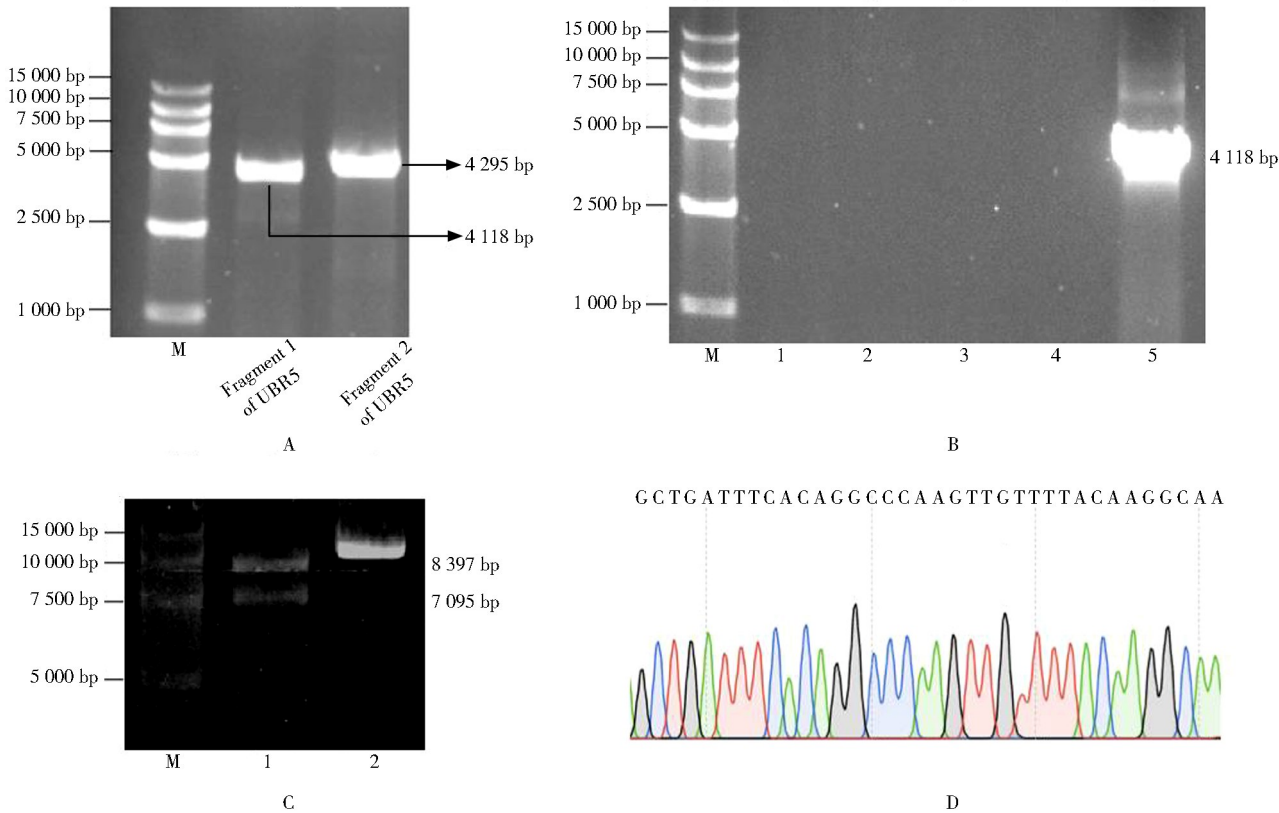


图 1 *pCDH-Myc-UBR5* 重组质粒构建及鉴定

Figure 1 Construction and identification of *pCDH-Myc-UBR5* recombinant plasmid

A: gel electrophoresis of *UBR5* gene PCR products. The *UBR5* sequence was amplified into two fragments (fragment 1 of *UBR5* and fragment 2 of *UBR5*), and the amplified products were identified by gel electrophoresis. B: gel electrophoresis of *pCDH-Myc-UBR5* bacteria liquid PCR products. '1-5' were selected as the clone colonies, and '5' were identified as positive colony. C: endonuclease identification of *pCDH-Myc-UBR5*. 1, recombinant plasmid *pCDH-Myc-UBR5* after double enzyme digestion; 2, recombinant plasmid *pCDH-Myc-UBR5* without enzyme digestion. D: *pCDH-Myc-UBR5* partial sequence, after DNA sequencing. *pCDH-Myc-UBR5*: *pCDH-EF1-Myc-puro-ubiquitin* protein ligase E3 component N-recogin 5; PCR: polymerase chain reaction; M: DNA marker DL15000.

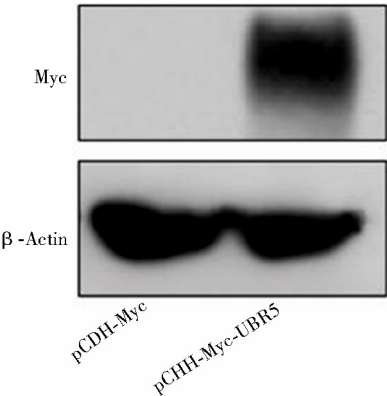


图 2 Myc-UBR5 蛋白表达鉴定

Figure 2 Expression of Myc-UBR5

Myc-UBR5: Myc-ubiquitin protein ligase E3 component N-recognin 5; *pCDH-Myc*: pCDH-EF1-Myc-puro; *pCDH-Myc-UBR5*: pCDH-EF1-Myc-puro-ubiquitin protein ligase E3 component N-recognin 5.

2.3 Co-IP 检测 UBR5 与 DKC1 的相互作用

UBR5 与 H/ACA 核糖核蛋白复合物 (H/ACA ribonucleoprotein complex, H/ACA RNP) 存在相互作用^[2]。为验证 Myc-UBR5 与 H/ACA RNP 复合物催化蛋白 DKC1 存在相互作用, HEK293T 细胞同时转染 *pCDH-Myc-UBR5* 及 *pCDH-Flag-DKC1*, 经 Co-IP 实验表明 Myc-UBR5 与 Flag-DKC1 在细胞内可能存在相互作用 (图 3)。

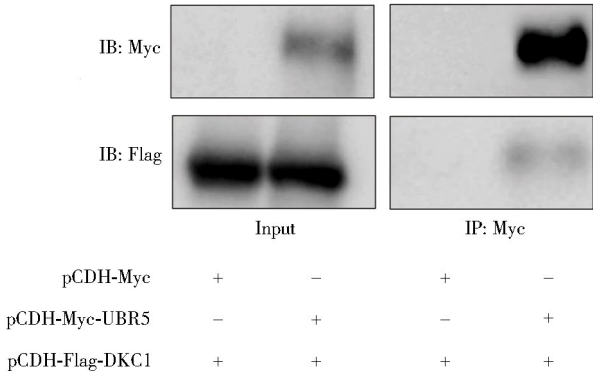


图 3 UBR5 与 DKC1 存在相互作用

Figure 3 Interaction between UBR5 and DKC1

HEK293T cells transfected with *pCDH-Myc-UBR5* and *pCDH-Flag-DKC1*, and immunoprecipitated with anti-Myc beads. Western blotting was performed using anti-Myc and anti-Flag antibodies. UBR5: ubiquitin protein ligase E3 component N-recognin 5; DKC1: dyskeratosis congenita 1; HEK293T: human embryonic kidney cells 293 SV40 LT. IP: immunoprecipitation; IB: immunoblotting; pCDH-Myc: pCDH-EF1-Myc-puro; pCDH-Myc-UBR5: pCDH-EF1-Myc-puro-ubiquitin protein ligase E3 component N-recognin 5; pCDH-Flag-DKC1: pCDH-EF1-Flag-puro-dyskeratosis congenita 1.

3 讨论

泛素-蛋白酶体系统是参与细胞信号传导且具有高度选择性的蛋白质降解途径, 是最为广泛的蛋

白质翻译后修饰方式之一。作为蛋白质稳态调节剂^[11], 泛素化系统在维持细胞正常生理功能中有着至关重要的地位。UBR5 属于 E6AP C 末端同源 (homologous to E6AP C terminus, HECT) E3 泛素连接酶, 主要负责识别特异性底物和泛素链拓扑结构^[12], 能识别 N-端规则通路^[13, 14], 与心脏发育、血管生成、DNA 修复、减数分裂、神经发育等相关。UBR5 在胚胎干细胞中高表达, 其表达量随细胞分化而降低^[15]。UBR5 参与维持 DNA 损伤后的泛素信号稳态, 可调控 DNA 损伤检查点激酶 2 (check-point kinase 2, CHK2) 的活性, 参与细胞周期中 DNA 合成前期/DNA 复制期 (G1/S 期) 及 DNA 复制期 (S 期) DNA 损伤检查点的激活, 及双链 DNA 断裂后 DNA 合成后期/细胞分裂期 (G2/M 期) 的阻滞^[16], 间接调节磷酸化 H2A. X 变体组蛋白 (γ H2A. X variant histone, γ H2AX) 的泛素化^[17], 促进 DNA 双链断裂位点的修复, 从而维持基因组稳定。此外, UBR5 还参与细胞的糖异生过程。高糖通过刺激磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 1 (phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, PEPCK1) 的乙酰化加强其与 UBR5 HECT 结构域的相互作用, 从而促进 PEPCK1 的泛素化降解和细胞糖异生过程^[18]。

随着研究的深入, UBR5 与心血管系统的相关证据逐渐浮出水面。UBR5 通过修复 DNA 损伤维持内皮细胞稳态。Li 等^[8]发现肺动脉高压患者的肺动脉内皮细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ) 与 UBR5 的相互作用中断, DNA 损伤且内皮细胞稳态丧失。UBR5 与 DNA 损伤感应子存在相互作用^[19], 可响应内皮细胞的 DNA 损伤反应。PPAR γ /UBR5 通路的激活能够抑制线粒体 DNA 损伤, 改善内皮祖细胞功能^[9]。此外, UBR5 还能结合并稳定转录共激活因子心肌素, 上调平滑肌特异性基因的转录, 在血管发育中起关键作用^[10]。然而, UBR5 在维持内皮细胞稳态、调节血管功能及心血管相关疾病中发挥的作用仍不明确。

本实验通过 Co-IP 发现 UBR5 与血管生成调节蛋白 DKC1 存在相互作用。DKC1 可能通过直接激活缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 的转录促进血管生成^[20]。转录因子 HIF-1 α 由缺氧激活, 表达水平受氧浓度调控, 并可以诱导下游靶基因血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达。HIF-1 α 可以改善急性心肌梗死大鼠的心功能, 提高心脏毛细血管密度^[21]。DKC1 增强 HIF-1 α 的转录, 靶向内皮细胞生长因子促进血管生成, 改善心肌重构及心脏功能。目前 UBR5 调控内皮细胞稳态, 促进平滑肌细胞分化及参与血管生成方面的功能仍需后续实验进一步研究。

本研究通过 PCR 技术克隆 *UBR5* 编码区序列,经菌液 PCR、酶切及测序鉴定,成功将 *UBR5* 插入到 *pCDH-Myc* 载体中。将 *pCDH-Myc-UBR5* 瞬转至 HEK293T 细胞中,证实 Myc-UBR5 在细胞中成功表达。重组质粒具有生物学功能,Co-IP 证实 UBR5 与血管生成调控蛋白 DKC1 存在相互作用,为下一步研究 UBR5 在心血管系统的功能奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Qiao X, Liu Y, Prada ML, *et al.* UBR5 is coamplified with MYC in breast tumors and encodes an ubiquitin ligase that limits MYC-dependent apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2020, 80 (7): 1414–1427. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1647.
- [2] Saez I, Gerbracht JV, Koyuncu S, *et al.* The E3 ubiquitin ligase UBR5 interacts with the H/ACA ribonucleoprotein complex and regulates ribosomal RNA biogenesis in embryonic stem cells[J]. *FEBS Lett*, 2020, 594 (1): 175–188. DOI: 10.1002/1873-3468.13559.
- [3] Gudjonsson T, Altmeyer M, Savic V, *et al.* TRIP12 and UBR5 suppress spreading of chromatin ubiquitylation at damaged chromosomes[J]. *Cell*, 2012, 150 (4): 697–709. DOI: 10.1016/j.cell.2012.06.039.
- [4] Song M, Yeku OO, Rafiq S, *et al.* Tumor derived UBR5 promotes ovarian cancer growth and metastasis through inducing immunosuppressive macrophages[J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 6298. DOI: 10.1038/s41467-020-20140-0.
- [5] Chen L, Yuan R, Wen C, *et al.* E3 ubiquitin ligase UBR5 promotes pancreatic cancer growth and aerobic glycolysis by downregulating FBP1 *via* destabilization of C/EBP α [J]. *Oncogene*, 2021, 40 (2): 262–276. DOI: 10.1038/s41388-020-01527-1.
- [6] Li J, Zhang W, Gao J, *et al.* E3 ubiquitin ligase UBR5 promotes the metastasis of pancreatic cancer *via* destabilizing F-actin capping protein CAPZA1 [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 634167. DOI: 10.3389/fonc.2021.634167.
- [7] Zhang Y, Hou J, Shi S, *et al.* CSN6 promotes melanoma proliferation and metastasis by controlling the UBR5-mediated ubiquitination and degradation of CDK9 [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12 (1): 118. DOI: 10.1038/s41419-021-03398-0.
- [8] Li CG, Mahon C, Sweeney NM, *et al.* PPAR γ interaction with UBR5/ATMIN promotes DNA repair to maintain endothelial homeostasis [J]. *Cell Rep*, 2019, 26 (5): 1333–1343. e7. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.01.013.
- [9] Kókény G, Calvier L, Legchenko E, *et al.* PPAR γ is a gatekeeper for extracellular matrix and vascular cell homeostasis; beneficial role in pulmonary hypertension and renal/cardiac/pulmonary fibrosis [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2020, 29 (2): 171–179. DOI: 10.1097/MNH.0000000000000580.

- [10] Hu G, Wang X, Saunders DN, *et al.* Modulation of myocardin function by the ubiquitin E3 ligase UBR5 [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (16): 11800–11809. DOI: 10.1074/jbc.M109.079384.
- [11] Seaborne RA, Hughes DC, Turner DC, *et al.* UBR5 is a novel E3 ubiquitin ligase involved in skeletal muscle hypertrophy and recovery from atrophy [J]. *J Physiol*, 2019, 597 (14): 3727–3749. DOI: 10.1113/JP278073.
- [12] Shearer RF, Ionomou M, Watts CK, *et al.* Functional roles of the E3 ubiquitin ligase UBR5 in cancer [J]. *Mol Cancer Res*, 2015, 13 (12): 1523–1532. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0383.
- [13] Muñoz-Escobar J, Matta-Camacho E, Kozlov G, *et al.* The MLL domain of the ubiquitin ligase UBR5 binds to its catalytic domain to regulate substrate binding [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290 (37): 22841–22850. DOI: 10.1074/jbc.M115.672246.
- [14] Li C, Beauregard-Lacroix E, Kondratyev C, *et al.* UBR7 functions with UBR5 in the notch signaling pathway and is involved in a neurodevelopmental syndrome with epilepsy, ptosis, and hypothyroidism [J]. *Am J Hum Genet*, 2021, 108 (1): 134–147. DOI: 10.1016/j.ajhg.2020.11.018.
- [15] Koyuncu S, Saez I, Lee HJ, *et al.* The ubiquitin ligase UBR5 suppresses proteostasis collapse in pluripotent stem cells from Huntington's disease patients [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 2886. DOI: 10.1038/s41467-018-05320-3.
- [16] Cipolla L, Bertolotti F, Maffia A, *et al.* UBR5 interacts with the replication fork and protects DNA replication from DNA polymerase η toxicity [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47 (21): 11268–11283. DOI: 10.1093/nar/gkz824.
- [17] Sanchez A, De Vivo A, Uprety N, *et al.* BMI1-UBR5 axis regulates transcriptional repression at damaged chromatin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113 (40): 11243–11248. DOI: 10.1073/pnas.1610735113.
- [18] Jiang W, Wang S, Xiao M, *et al.* Acetylation regulates gluconeogenesis by promoting PEPCK1 degradation *via* recruiting the UBR5 ubiquitin ligase [J]. *Mol Cell*, 2011, 43 (1): 33–44. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.04.028.
- [19] Zhang T, Cronshaw J, Kanu N, *et al.* UBR5-mediated ubiquitination of ATMIN is required for ionizing radiation-induced ATM signaling and function [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111 (33): 12091–12096. DOI: 10.1073/pnas.1400230111.
- [20] Hou P, Shi P, Jiang T, *et al.* DKC1 enhances angiogenesis by promoting HIF-1 α transcription and facilitates metastasis in colorectal cancer [J]. *Br J Cancer*, 2020, 122 (5): 668–679. DOI: 10.1038/s41416-019-0695-z.
- [21] Peng JQ, Zhang P, Fan XM, *et al.* Expression of hypoxia-inducible factor 1 α ameliorate myocardial ischemia in rat [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 465 (4): 691–695. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.08.046.