

• 基础研究 •

SENPI在SPOP去SUMO化修饰中的作用研究

张赞豪, 韩博昂, 王瑜, 朱琴, 乐坤, 俞婷婷, 程雁*, 刘晨*

南京医科大学基础医学院医学遗传学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的: 研究小泛素相关修饰物 (small ubiquitin-related modifier, SUMO) 修饰对 SPOP (speckle type BTB/POZ protein) 蛋白水平和细胞定位的影响, 并尝试在肾透明细胞癌 (clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) 中探讨 SUMO 特异性蛋白酶 1 (senp1-specific proteases 1, SENPI) 和 SPOP 之间的相关性。方法: 利用野生型 (wild type, WT) 和 *Senp1* 敲除的小鼠胚胎成纤维细胞研究 *Senp1* 对 Spop 蛋白水平和细胞定位的影响, 并通过比较外源 WT-Spop 和 Spop 的 SUMO 修饰位点突变体的蛋白表达量, 进一步确认 SUMO 修饰对 Spop 蛋白水平的影响。后续通过邻近连接技术 (proximity ligation assay, PLA) 研究 WT-Spop 及其 SUMO 修饰位点突变体与 SUMO1 的结合能力。最后通过 ccRCC 患者的 RNA 表达数据和 ccRCC 细胞系探讨 SENPI 和 SPOP 在 ccRCC 中的相关性。结果: *Senp1* 敲除下调小鼠胚胎成纤维细胞中 Spop 的蛋白量和稳定性, 但不影响其细胞核定位。突变 Spop 的 SUMO 修饰位点后, 其与 Sumo1 的结合能力下降, 蛋白量也有所降低。SENPI 和 SPOP 的表达在 ccRCC 中呈正相关。结论: *Senp1* 通过去 SUMO 化修饰稳定 Spop 蛋白, SENPI 和 SPOP 的表达在 ccRCC 中呈正相关。

[关键词] SPOP; SENPI; SUMO 修饰; 肾透明细胞癌

[中图分类号] Q343

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2024)06-753-09

doi: 10.7655/NYDXBNSN240028

Study on the role of SENPI in the deSUMOylation modification of SPOP

ZHANG Yunhao, HAN Bo'ang, WANG Yu, ZHU Qin, YUE Shen, YU Tingting, CHENG Yan*, LIU Chen*

Department of Medical Genetics, School of Basic Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To elucidate the impact of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modification on the protein levels and cellular localization of speckle type BTB/POZ protein (SPOP) and explore the correlation between senp1-specific proteases 1 (SENPI) and SPOP in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). **Methods:** Using wild type (WT) and *Senp1* knockout murine embryonic fibroblasts (MEFs), we investigated the effects of *Senp1* on Spop protein level and cellular localization. By comparing the protein expression levels of WT-Spop and its SUMO modification site mutants, the effects of SUMO modification on Spop protein levels were further confirmed. Proximity ligation assay (PLA) was employed to study the impact of Spop SUMOylation site mutation on the binding ability with small ubiquitin-related modifier 1 (SUMO1). Finally, the correlation between SENPI and SPOP in ccRCC was examined utilizing datasets and ccRCC cell lines. **Results:** *Senp1* knockout down-regulated the protein level and stability of Spop in MEFs without affecting its nuclear localization. Mutating the SUMOylation modification site of Spop attenuated its binding affinity with Sumo1, consequently leading to diminished protein levels. Notably, the expression of SENPI and SPOP exhibited a positive correlation in ccRCC. **Conclusion:** *Senp1* stabilizes Spop protein through deSUMOylation modification. The expression of SENPI and SPOP is positively correlated in ccRCC.

[Key words] SPOP; SENPI; SUMO modification; clear cell renal cell carcinoma

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(06): 753-761]

[基金项目] 国家自然科学基金(81702747, 82172629)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: liuchen@njmu.edu.

cn; sycheng@njmu.edu.cn

小泛素相关修饰物 (small ubiquitin-related modifier, SUMO) 修饰是蛋白质翻译后修饰的一种, 其能够调控蛋白的相互作用、活性及亚细胞定位^[1], 从而调节多种细胞进程。与泛素化过程类似,

SUMO化修饰是一个动态可逆的过程, SUMO前体在泛素样蛋白加工酶(ubiquitin-like protein-specific protease, ULP)或SUMO特异性蛋白酶(sentrin-specific protease, SENP)的加工下产生SUMO-GG, 由SUMO E1酶(Aos1-Uba2)激活, 转移到SUMO E2酶(Ubc9), 并通过SUMO E3连接酶(PIAS)与底物结合, 最后, 修饰底物可通过ULP/SENP发生去SUMO化, 使蛋白质的SUMO化和去SUMO化处于动态平衡状态^[2-3]。

在哺乳动物中, 去SUMO化酶SENP共有6种, SENP1作为去SUMO化酶之一, 拥有广泛的特异性底物, 这些底物参与多种细胞生物学过程, 如信号转导、细胞增殖、凋亡等^[4-6]。近年来, 越来越多的研究发现SENP1在多种肿瘤中呈现出异常的高表达^[7-10], 促进肿瘤的发生发展, 如在乳腺癌中, 高表达的SENP1通过调控细胞周期素依赖性激酶p21、p27以及基质金属蛋白酶9的表达促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。由于SENP在肿瘤中的重要作用, 其已被确定为肿瘤治疗的分子靶标^[11]。

SPOP(speckle type BTB/POZ protein)是泛素连接酶E3家族成员Cul3结合底物的接头蛋白, 介导许多核蛋白的泛素化修饰, 导致蛋白降解, 从而调控细胞的多种生理过程^[12]。已有研究证实, SPOP的缺失或突变与多种肿瘤密切相关, 包括前列腺癌、乳腺癌、结直肠癌等^[13-14]。其中受SPOP影响最为显著的是肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)。SPOP蛋白在正常肾脏组织中表达量非常低, 但在99%的ccRCC组织中却大量表达, 表明SPOP蛋白是一个潜在的ccRCC分子标志物。由于SPOP在ccRCC中的重要作用, 其已被确定为ccRCC治疗的新靶点。前人根据SPOP所识别底物蛋白的晶体结构特点, 获得了能够与SPOP蛋白结合的小分子化合物, 并在体内和体外验证了其作用^[15-16]。ccRCC中SPOP的相关研究虽然很多, 但其在ccRCC中特异性高表达的机制还未见报道。

2022年Lee等^[17]发现, 去SUMO化酶SENP1在ccRCC中存在异常的高表达。本课题组通过实验发现, 在*Senp1*敲除的小鼠胚胎成纤维细胞(murine embryonic fibroblasts, MEFs)中, Spop的蛋白水平有所下降。因此, 本研究拟探讨去SUMO化酶Senp1是否参与Spop的蛋白水平调控, 并在ccRCC中初步探索SENP1与SPOP之间的相关性, 以期ccRCC的治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

WT和*Senp1*^{-/-} MEFs由上海交通大学医学院程金科教授馈赠; 肾上皮细胞HK-2和ccRCC细胞Caki-1、Caki-2、A498、786-O均购于武汉普诺赛公司; DMEM培养基、MEM培养基、RPMI-1640培养基、McCoy's 5A培养基、胎牛血清、0.25% EDTA-胰蛋白酶(Gibco公司, 美国); 青霉素/链霉素(苏州新赛美公司); RNAiso Plus细胞总RNA提取试剂(TaKaRa公司, 日本); HiScript II Q-RT SuperMix for qPCR(gDNA wiper)逆转录试剂盒及AceQ qPCR SYBR Green Master Mix荧光定量PCR试剂盒(南京诺唯赞公司); Duolink[®] PLA试剂盒(Sigma公司, 美国); 转染质粒试剂Plus[™] Reagent(Thermo公司, 美国); Lamin B1、 α -Tubulin、Spop、HA抗体(武汉三鹰); Sumo1抗体(CST公司, 美国); c-Myc抗体(Sigma公司, 美国); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠或抗兔IgG(Jackson ImmunoResearch公司, 美国); MG132、放线菌酮(cycloheximide, CHX)(Sigma公司, 美国); Myc-Senp1、Flag-Spop、Flag-Spop-K95R、Flag-Spop-K110R、Flag-Spop-K95/110R质粒均为本实验室自行构建。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

WT和*Senp1*^{-/-} MEFs使用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基, 肾上皮细胞HK-2和ccRCC细胞A498使用含10%胎牛血清的MEM培养基, ccRCC细胞Caki-1和Caki-2使用含10%胎牛血清的McCoy's 5A培养基, ccRCC细胞786-O使用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基, 置于37℃、5% CO₂培养箱中进行培养。取处于对数生长期的细胞进行后续实验。

1.2.2 细胞转染

细胞汇合度达70%~80%时, 加入质粒转染液, 转染6~8 h后, 换成正常的细胞培养液继续培养至36~48 h, 提取细胞总RNA和总蛋白进行后续实验, 或者是培养至一定时间, 收集瞬时转染的细胞, 进行后续的实验。

1.2.3 细胞总RNA和总蛋白的提取

细胞总RNA的提取: 收集细胞, 先将细胞用PBS清洗1遍, 加入RNAiso Plus, 冰上静置5 min, 加入1/5体积的氯仿, 4℃冰箱静置10 min, 4℃ 12 000 g离心10 min。离心后, 上清移至干净的RNase-Free

离心管中,加入等体积异丙醇,混匀-20℃冰箱冷冻1 h,4℃12 000 g离心10 min,弃上清,加入75%乙醇(DEPC水配制),4℃12 000 g离心5 min,弃上清,4℃晾干10 min,加入10 μL DEPC水,冰上溶解30 min,测定RNA浓度。

细胞总蛋白的提取:收集细胞,先将细胞用TBS清洗1~2遍,加入适量的RIPA裂解液,刮板快速刮下细胞,将裂解液收集于干净的1.5 mL离心管中,冰上裂解15~30 min,4℃14 000 r/min离心20 min,离心后,将上清移至新的1.5 mL离心管中,吸取适量蛋白液进行BCA蛋白浓度的检测。加入相应体积的5×上样缓冲液,95℃煮5 min,使蛋白完全变性。

1.2.4 免疫印迹实验(Western blot)

制备好的蛋白样品常温14 000 r/min离心1 min,在SDS-PAGE胶上进行电泳。经湿转法恒压80 V,转膜2 h,脱脂牛奶室温封闭1 h,加一抗4℃过夜。次日,TBST洗膜3次,每次15~20 min。室温孵育二抗2 h,洗膜后化学发光显影。

1.2.5 实时荧光定量PCR

使用RNAiso提取细胞总RNA,逆转录试剂盒进行反转录,取10 μL反转录产物稀释至100 μL,取1 μL做模板进行荧光定量PCR,软件Light Cycler 96分析数据。每个实验组有3个复孔,实验结果重复3次。引物序列:*GAPDH*上游5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3',下游5'-CCCTGTT GCTGTAGC-CAAAT-3';*Spop*上游5'-CCACCTCCGGCAGAAATGTC-3',下游5'-CCTCCCGCAAATAAAGT-3'。

1.2.6 邻位连接技术(proximity ligation assay, PLA)

细胞转染质粒24 h后,PBS清洗1遍,4%甲醛固定细胞,0.3% NP-40透化细胞,根据PLA试剂盒中的步骤进行封闭、一抗孵育、添加探针、连接、扩增、封片,最后用激光共聚焦显微镜进行拍照分析。

1.2.7 免疫荧光染色

细胞转染后24 h,将细胞接种于用0.1%明胶包被的细胞爬片上,继续培养24 h后,PBS清洗1遍,4%甲醛固定细胞,使用抗体稀释液(3% BSA、0.3% Triton X-100,溶于PBS)4℃下封闭并透化细胞1 h,之后4℃孵育一抗过夜。使用TBST清洗细胞2次,每次3~5 min,之后室温条件下荧光二抗避光孵育1 h,不同荧光二抗使用的稀释比例均为1:200。TBST清洗细胞3次,每次3~5 min。最后使用封固剂(含DAPI)将细胞爬片固定在载玻片上。拍摄使用LSM900激光共聚焦显微镜图像,图像处理使用

ZEN 3.0(blue edition)软件。

1.2.8 蛋白周转速率检测

细胞接种于6孔板,待细胞长满后,用终浓度为20 μmol/L的蛋白合成抑制剂CHX分别处理细胞各种不同时间,在相应时间点,收取蛋白样品进行Western blot分析。

1.2.9 相关性分析

从GEO数据库中下载ccRCC患者的基因表达数据(GSE73731),利用GraphPad Prism 7.0对*SENP1*与*SPOP*的基因表达进行皮尔逊相关系数分析并作图。

1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 7.0进行统计分析并作图。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组内比较采用重复测量数据的方差分析,两组间比较采用*t*检验分析,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *Senp1*敲除下调Spop蛋白水平但不影响其mRNA水平

为了研究Senp1是否参与调控Spop,本研究提取了WT和*Senp1*^{-/-}MEFs的RNA和蛋白,检测*Senp1*敲除对于Spop表达的影响。结果显示,*Senp1*敲除后,Spop的蛋白水平显著下降(图1A、B),但其mRNA水平没有明显变化(图1C)。由于Senp1是去SUMO化酶,所以上述结果提示Senp1可能参与了Spop的SUMO化修饰过程。

随后,为了进一步确认Senp1对Spop蛋白水平的调控作用,在*Senp1*^{-/-}MEFs中梯度回补了Senp1蛋白。Western blot结果显示,随着Senp1蛋白水平的升高,Spop的蛋白水平也随之升高(图1D),进一步说明去SUMO化酶Senp1能够调节Spop的蛋白水平。

2.2 *Senp1*敲除后Spop蛋白稳定性下降

通常认为,影响底物蛋白的降解速率,即蛋白周转率,是SUMO化修饰对底物蛋白进行调控的重要手段。为了检测Senp1是否影响Spop的蛋白周转率,利用CHX(20 μmol/L)分别处理WT和*Senp1*^{-/-}MEFs不同时间后检测细胞中Spop的蛋白水平。结果显示,*Senp1*^{-/-}MEFs中的Spop含量下降到50%的时间要短于WT MEFs(图2A、B),表明*Senp1*敲除后,Spop的蛋白周转率变快,蛋白稳定性下降。

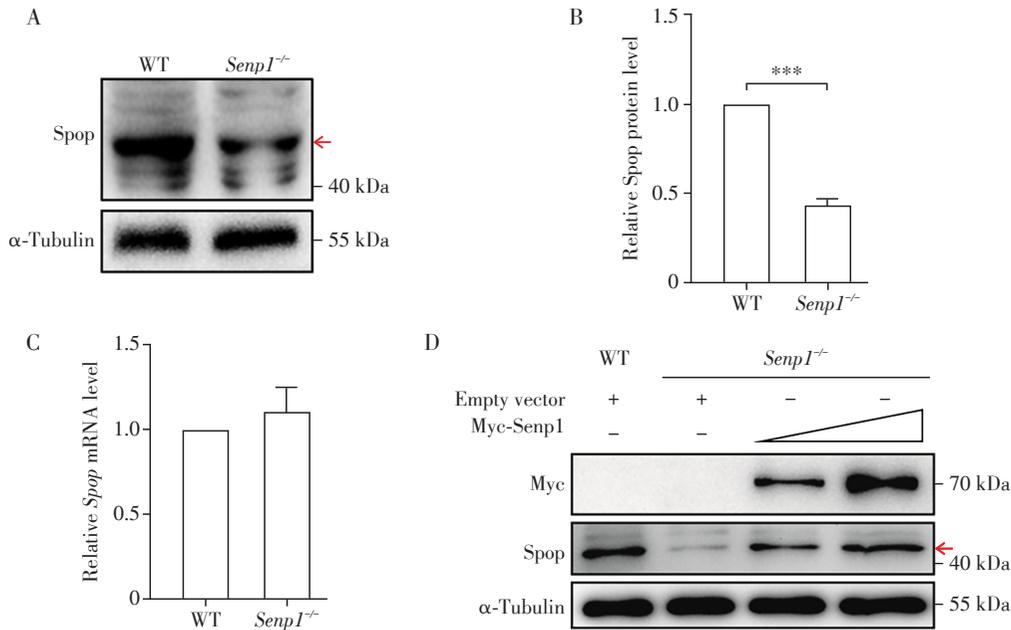
后续,为了研究Spop蛋白是否通过蛋白酶体途

径降解,利用蛋白酶体抑制剂MG132(20 μmol/L)处理 *Senp1*^{-/-} MEFs。WB结果显示,当用MG132抑制蛋白酶体活性后,细胞中的Spop有所升高(图2C),

表明在 *Senp1*^{-/-} MEFs中Spop通过蛋白酶体途径降解。

2.3 *Senp1* 不影响Spop的亚细胞定位

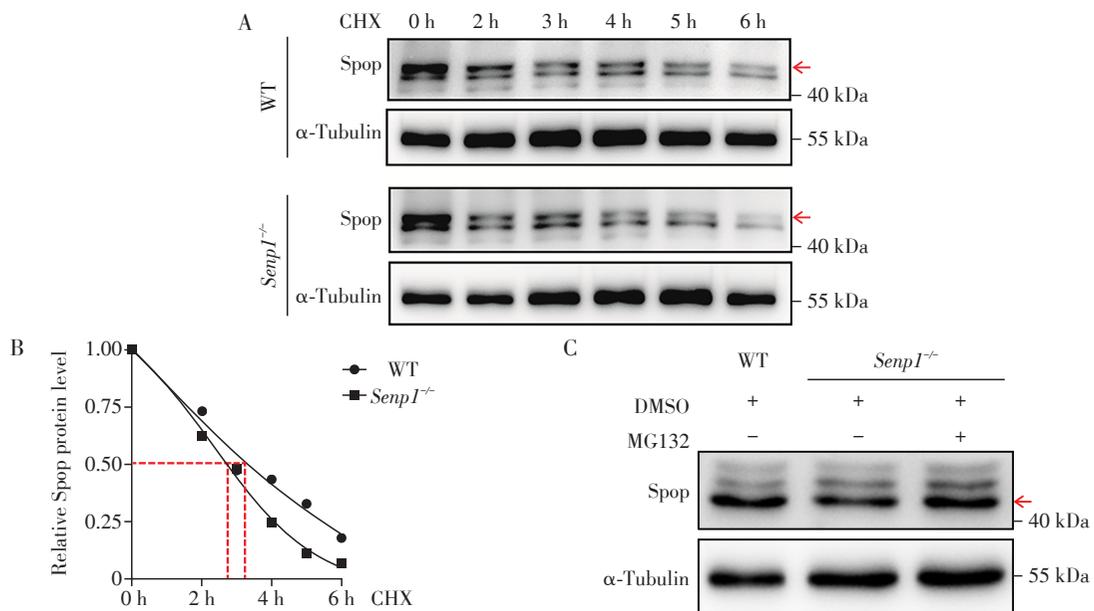
SUMO化修饰除影响底物蛋白的周转速率外,



A: Spop protein levels in WT and *Senp1*^{-/-} MEFs were measured by Western blot. B: Western blot results were quantified using Image J. C: *Spop* mRNA levels in WT and *Senp1*^{-/-} MEFs were measured by qPCR. D: Changes in Spop protein levels were detected after gradient overexpressing of *Senp1* in *Senp1*^{-/-} MEFs. Red arrows indicated Spop proteins. ****P* < 0.001 (*n*=3).

图1 敲除 *Senp1* 下调 Spop 蛋白水平, 但不影响其 mRNA 水平

Figure 1 *Senp1* knockout down-regulated Spop protein levels, but does not affect mRNA levels



A: After the cells were treated with CHX (20 μmol/L) for different times, the protein levels of Spop in the cells were determined by Western blot. B: Image J was used to normalize the results of panel A after quantification. C: After the cells were treated with MG132 (20 μmol/L), the protein level of Spop in the cells was determined by Western blot. Red arrows indicated Spop proteins.

图2 *Senp1* 敲除后 Spop 蛋白稳定性下降

Figure 2 The stability of Spop protein decreased after *Senp1* knockdown

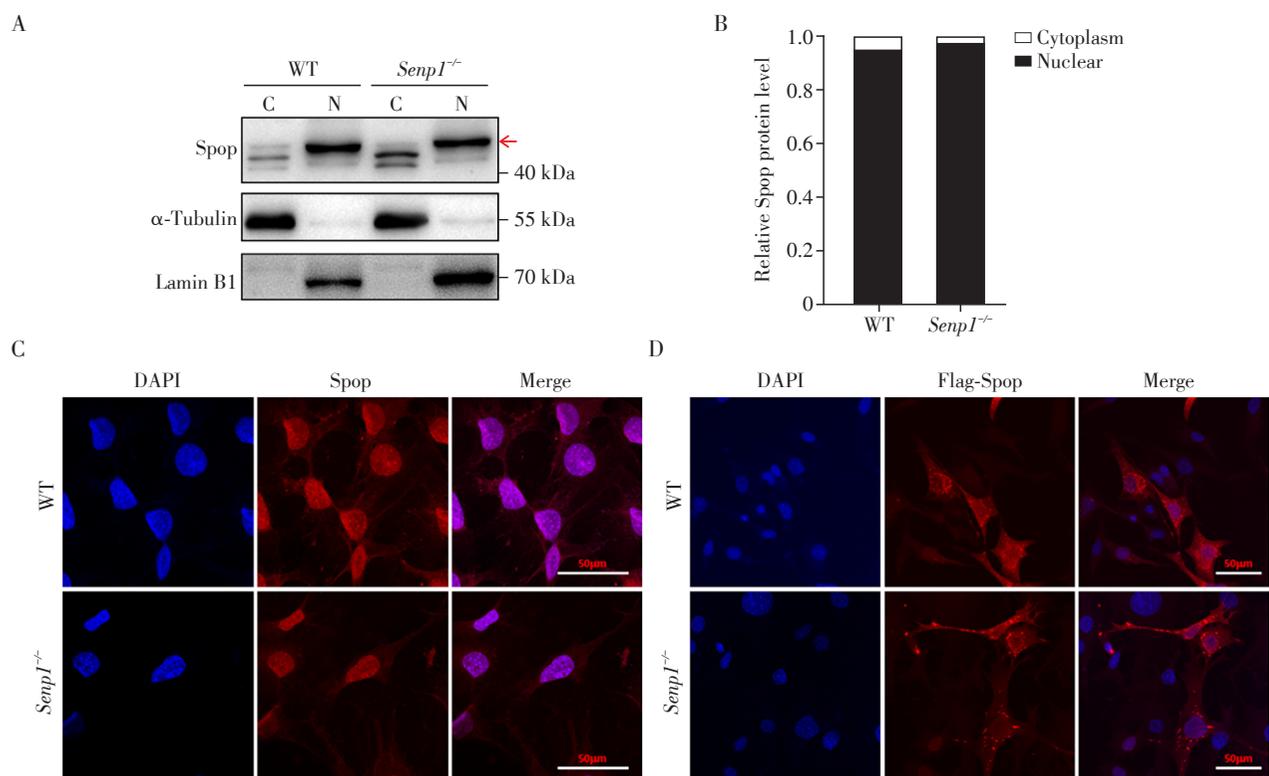
还可以调控底物蛋白在细胞中的定位^[18]。研究表明,在ccRCC中SPOP错误定位在胞质中并大量累积,靶向与细胞增殖和凋亡有关的底物降解,导致肿瘤增生^[15]。为了研究去SUMO化酶Senp1是否参与调控Spop的亚细胞定位,分离了WT和Senp1^{-/-}MEFs的胞核蛋白和胞浆蛋白,并分别检测其中的Spop蛋白水平。Western blot结果显示,在WT MEFs中,Spop蛋白主要定位在细胞核中,仅有少量蛋白存在于胞浆中;Senp1^{-/-}MEFs中Spop的分布情况与WT MEFs基本一致,表明Senp1的敲除并不影响

Spop在细胞中的定位(图3A、B)。

为了进一步确认上述结果,利用免疫荧光技术分别检测了内源Spop和外源Spop在WT和Senp1^{-/-}MEFs中的定位情况。结果显示,在WT和Senp1^{-/-}MEFs中,无论内源还是外源Spop的亚细胞定位都与胞核高度重合,进一步表明Senp1并不影响Spop在细胞核中的定位(图3C、D)。

2.4 Senp1通过参与Spop的去SUMO化修饰实现对Spop的蛋白调控

初步确定Senp1能够上调Spop的蛋白水平后,



A: Protein levels of Spop in WT and Senp1^{-/-} MEFs were determined by Western blot after isolation of cytoplasmic and nuclear proteins. C: cytoplasm; N: nuclear; Red arrow indicated Spop proteins. B: Western blot results were quantified and analyzed using Image J. C: Subcellular localization of endogenous Spop protein in WT and Senp1^{-/-} MEFs was determined by immunofluorescence. D: Immunofluorescence was used to detect the subcellular localization of exogenous Spop protein(Flag-Spop) in WT and Senp1^{-/-} MEFs. Scale bar=50 μ m.

图3 Senp1不影响Spop的亚细胞定位

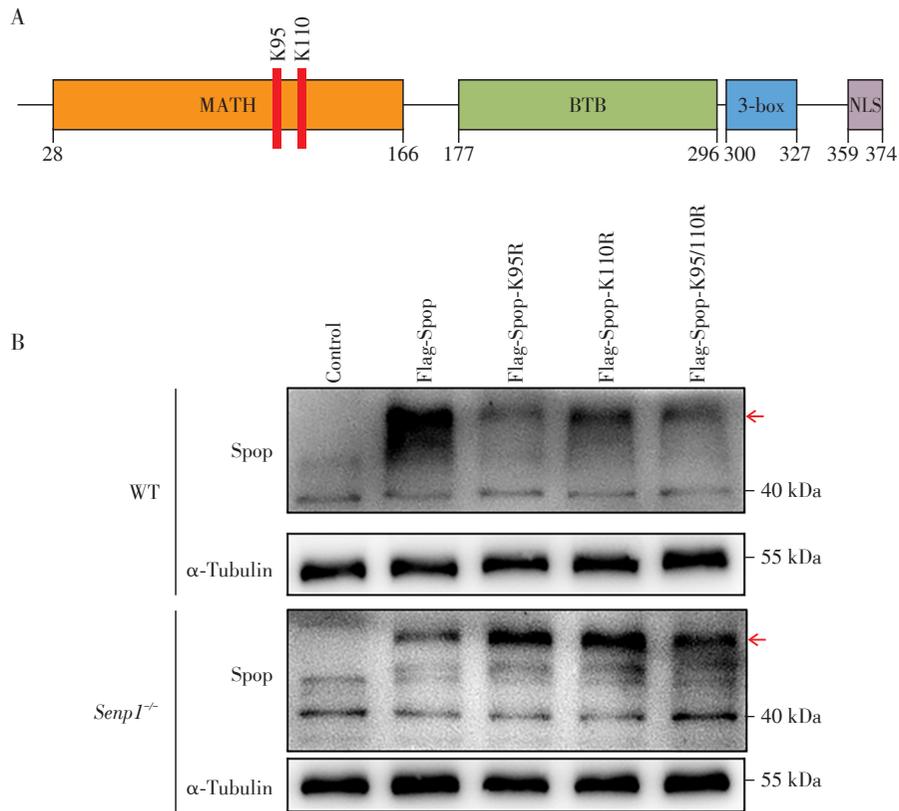
Figure 3 Senp1 did not affect subcellular localization of Spop

为了研究该过程是否通过影响Spop的SUMO化修饰实现,首先对Spop的氨基酸序列进行了分析,在其MATH结构域中发现了2个潜在的SUMO化修饰位点,分别是第95位和第110位的赖氨酸(图4A)。随后构建了单SUMO化位点突变质粒Flag-Spop-K95R、Flag-Spop-K110R和双SUMO化位点突变质粒Flag-Spop-K95/110R,并分别在WT和Senp1^{-/-}MEFs中进行过表达。结果显示,当在Senp1^{-/-}MEFs

中过表达野生型Spop时,其蛋白表达量较WT MEFs减少,说明Senp1敲除后,Spop的SUMO化修饰增加,影响Spop的蛋白水平。而当在Senp1^{-/-}MEFs中过表达Spop突变体时,即Spop不能进行SUMO化修饰时,其蛋白水平相比WT MEFs不再减少(图4B)。

2.5 SUMO化位点突变Spop与Sumo1在细胞核中结合变弱

为了进一步研究Spop蛋白的SUMO化修饰,分



A: Position of SUMOylation modification sites in the amino acid sequence map of Spop proteins. B: After overexpression of wild-type and mutant Spop in WT and *Senp1*^{-/-} MEFs, the protein levels of Spop in the cells were determined by Western blot. Red arrows indicated Spop proteins.

图4 *Senp1*通过参与Spop的SUMO化修饰实现对Spop的蛋白调控

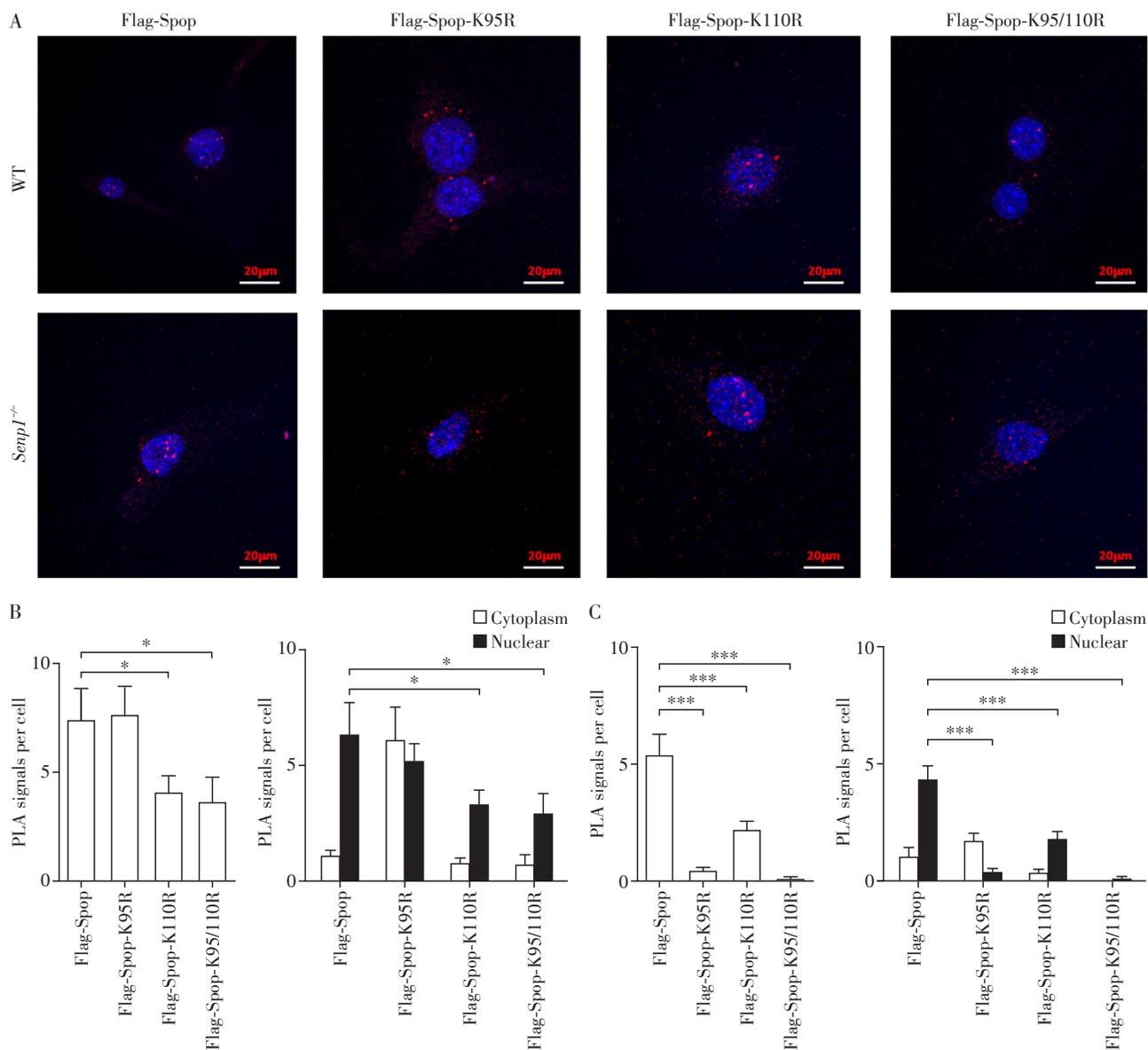
Figure 4 *Senp1* regulated Spop protein level by participating in SUMOylation modification of Spop

别在 WT 和 *Senp1*^{-/-} MEFs 中共表达 Sumo1 和野生型 Spop 或其 SUMO 修饰位点的突变体, 利用 PLA 实验检测 Spop 与 Sumo1 蛋白之间的相互作用(图 5A)。统计结果显示, 当细胞中存在 *Senp1* 蛋白时, 与过表达的 Flag-Spop 蛋白相比, 过表达的 Flag-Spop-K110R 蛋白和 Flag-Spop-K95/110R 蛋白与 Sumo1 蛋白的相互作用显著减少, 表明 K110 位点的突变能够影响 Spop 与 Sumo1 的相互作用。进一步统计这些相互作用在胞质、胞核中的分布情况, 结果显示, PLA 阳性信号主要集中在胞核中, 说明 Spop 蛋白主要在胞核中进行 SUMO 化修饰(图 5B)。而当细胞中无 *Senp1* 蛋白时, 野生型 Spop 与 Sumo1 的相互作用较 WT MEFs 有所下降, 这可能是 *Senp1* 的缺失导致 Spop 蛋白稳定性下降, 进而蛋白量减少所致; 除此之外, 和 WT MEFs 组一致, 与过表达的 Flag-Spop 蛋白相比, 过表达的 Flag-Spop-K110R 和 Flag-Spop-K95/110R 蛋白与 Sumo1 蛋白相互作用降低。有趣的是, Flag-Spop-K95R 与 Sumo1 的相互作用在 *Senp1*^{-/-} MEFs 中显著下降, 推测这可能是因为在一般

情况下 K95 位点在 Spop 与 Sumo1 蛋白结合中的作用较小, 需要在 SUMO 修饰大量存在的情况下, 相互作用的微小变化才能显现出来。同样分别统计了 PLA 信号在 *Senp1*^{-/-} MEFs 细胞中的分布情况, 结果与 WT MEFs 组一致, SUMO 化修饰后的 Spop 蛋白主要定位在胞核中(图 5C)。

2.6 SPOP 和 SENP1 在肾癌中呈正相关

鉴于 SPOP 在 ccRCC 中高表达且具有核心作用, 为了研究其高表达是否与去 SUMO 化修饰相关, 首先利用 GEO 数据库中 ccRCC 患者的基因表达数据, 对 SPOP 和 SENP1 在 ccRCC 患者中的表达进行了相关分析。结果表明, ccRCC 患者的 SPOP 表达和 SENP1 表达呈明显的正相关关系($r=0.44, P < 0.001$, 图 6A)。同时, 还检测了肾上皮细胞 HK-2 和 ccRCC 细胞 Caki-1、Caki-2、A498、786-O 中的 SENP1 和 SPOP 表达情况, ccRCC 细胞中 SPOP 的蛋白水平高于正常肾上皮细胞。ccRCC 细胞中 SENP1 的表达也比正常细胞多, 与已有报道一致^[16], 提示 ccRCC 中 SPOP 的表达可能受 SENP1 的调控(图 6B)。



A: The interaction between Sumo1 and Spop or their SUMOylation modification site mutants was examined after co-expression in WT and *Senp1*^{-/-} MEFs. Scale bar=20 μ m. B, C: Quantitative analysis of PLA results in WT MEFs(B) and *Senp1*^{-/-} MEFs(C). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ ($n=50$).

图5 SUMO化位点突变下调Spop与Sumo1的相互作用

Figure 5 Mutations at the SUMOylation site down-regulated Spop-Sumo1 interaction

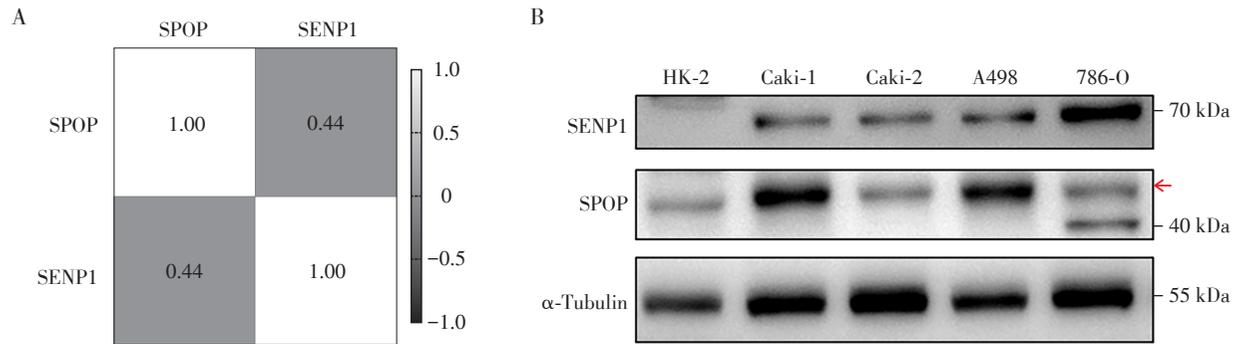
3 讨论

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是泌尿系统中的常见恶性肿瘤之一。全世界每年约有20.9万人确诊RCC,约10.2万人死于该疾病^[19]。ccRCC是RCC中最常见的病理亚型,约占75%^[20]。大约30%的RCC患者在确诊时已经发生了癌细胞的转移^[21],未转移的RCC患者在进行手术切除治疗后,约40%会复发,并且RCC对放疗、化疗均不敏感,患者的5年生存率<10%^[22]。因此探索RCC发病的分子机制,寻找RCC早期诊断和治疗的分子靶标迫在

眉睫。

作为泛素连接酶E3家族成员Cul3结合底物蛋白的接头蛋白,SPOP介导许多底物蛋白的泛素化修饰,导致蛋白降解,从而参与细胞的多种进程。在ccRCC中,SPOP的异常高表达与低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)密切相关,肿瘤内部的低氧微环境会活化HIF,SPOP作为HIF的下游靶基因被启动转录,SPOP错误定位在胞质中并大量累积,靶向与细胞增殖和凋亡有关的底物降解,最终导致肿瘤增生^[15]。

蛋白的翻译后修饰对于蛋白行使功能具有重



A: The data in GEO database (GSE73731) was used to analyze the Pearson correlation between *SPOP* mRNA expression and *SENP1* mRNA expression in ccRCC patients. B: The protein expression of *SENP1* and *SPOP* was detected in renal epithelial cells and ccRCC cells. Red arrow indicated *SPOP* proteins ($n=265$).

图6 SPOP和SENP1的表达在肾透明细胞癌中呈正相关

Figure 6 The expression of *SPOP* and *SENP1* were positively correlated in clear cell renal cell carcinoma

要作用, SUMO化修饰作为蛋白翻译后修饰的一种已被证实可以调控蛋白的活化、功能和亚细胞定位。近年来人们发现,参与SUMO化修饰的酶在肿瘤中存在异常表达,如在*SPOP*发生突变的前列腺癌患者中,去SUMO化酶*SENP7*呈现出高表达。*SENP7*通过减少异染色质蛋白1 α (heterochromatin protein 1 α , HP1 α)的SUMO化修饰和沉默与HP1 α 相关的基因来延缓细胞衰老。抑癌因子*SPOP*突变后,失去诱导*SENP7*降解的能力,细胞过度增殖最终导致肿瘤发生^[23]。

以上研究表明*SPOP*的SUMO化修饰过程可能在ccRCC中具有重要作用,但作为调控SUMO化修饰的关键分子之一,*SENP1*与*SPOP*之间的关系还不清楚。本研究发现,MEFs中去SUMO化酶*Senp1*参与*Spop*的表达调控,*Senp1*敲除后,*Spop*蛋白的稳定性下降并通过蛋白酶体途径降解,这一现象可能与*Senp1*敲除,改变*Spop*的SUMO化修饰状态有关。除此之外,还发现敲除*Senp1*后,*Spop*在MEFs细胞核中的定位并没有发生改变,说明*Senp1*可能并不参与调控*Spop*的亚细胞定位。另外,生物信息学分析和Western blot结果也表明,ccRCC患者的*SPOP*表达和*SENP1*表达呈明显的正相关关系,提示*SPOP*的表达在一定程度上受*SENP1*的调控。综上,*SENP1*可能成为ccRCC新的潜在治疗靶点。

[参考文献]

[1] VERTEGAAL A C O. Signalling mechanisms and cellular functions of SUMO[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022, 23(11): 715-731

- [2] CHANG H M, YEH E T H. SUMO: from bench to bedside[J]. Physiol Rev, 2020, 100(4): 1599-1619
- [3] TALAMILLO A, BARROSO-GOMILA O, GIORDANO I, et al. The role of SUMOylation during development[J]. Biochem Soc Trans, 2020, 48(2): 463-478
- [4] LARA-UREÑA N, JAFARI V, GARCÍA-DOMÍNGUEZ M. Cancer-associated dysregulation of sumo regulators: proteases and ligases[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(14): 8012
- [5] KUKKULA A, OJALA V K, MENDEZ L M, et al. Therapeutic potential of targeting the SUMO pathway in cancer[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(17): 4402
- [6] ZHAO Q, MA Y, LI Z, et al. The function of SUMOylation and its role in the development of cancer cells under stress conditions: a systematic review[J]. Stem Cells Int, 2020, 2020: 8835714
- [7] WEI M, HUANG X, LIAO L, et al. *SENP1* decreases RNF168 phase separation to promote DNA damage repair and drug resistance in colon cancer[J]. Cancer Res, 2023, 83(17): 2908-2923
- [8] GAO C, XIAO F, ZHANG L, et al. *SENP1* inhibition suppresses the growth of lung cancer cells through activation of A20-mediated ferroptosis[J]. Ann Transl Med, 2022, 10(4): 224
- [9] WEI H, GUO J, SUN X, et al. Discovery of natural ursane-type *SENP1* inhibitors and the platinum resistance reversal activity against human ovarian cancer cells: a structure-activity relationship study[J]. J Nat Prod, 2022, 85(5): 1248-1255
- [10] HAO L, DONG Y, ZHANG J J, et al. Melatonin decreases androgen-sensitive prostate cancer growth by suppressing *SENP1* expression[J]. Transl Androl Urol, 2022, 11(1):

- 91-103
- [11] TOKARZ P, WOŹNIAK K. SENP proteases as potential targets for cancer therapy[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(9): 2059
- [12] CLARK A, BURLESON M. SPOP and cancer: a systematic review[J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(3): 704-726
- [13] BLATTNER M, LIU D, ROBINSON B D, et al. SPOP mutation drives prostate tumorigenesis in vivo through coordinate regulation of PI3K/mTOR and AR signaling[J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(3): 436-451
- [14] LI C, AO J, FU J, et al. Tumor-suppressor role for the SPOP ubiquitin ligase in signal-dependent proteolysis of the oncogenic co-activator SRC-3/AIB1 [J]. *Oncogene*, 2011, 30(42): 4350-4364
- [15] LI G, CI W, KARMAKAR S, et al. SPOP promotes tumorigenesis by acting as a key regulatory hub in kidney cancer[J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(4): 455-468
- [16] GUO Z Q, ZHENG T, CHEN B, et al. Small-molecule targeting of E3 ligase adaptor SPOP in kidney cancer[J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(3): 474-484
- [17] LEE M H, SUNG K, BEEBE D, et al. The SUMO protease SENP1 promotes aggressive behaviors of high HIF2 α expressing renal cell carcinoma cells [J]. *Oncogenesis*, 2022, 11(1): 65
- [18] GAREAU J R, LIMA C D. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(12): 861-871
- [19] BUKAVINA L, BENSALAH K, BRAY F, et al. Epidemiology of renal cell carcinoma: 2022 update[J]. *Eur Urol*, 2022, 82(5): 529-542
- [20] NETTO G J, AMIN M B, BERNEY D M, et al. The 2022 World Health Organization classification of tumors of the urinary system and male genital organs - part B: prostate and urinary tract tumors[J]. *Eur Urol*, 2022, 82(5): 469-482
- [21] TRAN J, ORNSTEIN M C. Clinical review on the management of metastatic renal cell carcinoma [J]. *JCO Oncol Pract*, 2022, 18(3): 187-196
- [22] KASE A M, GEORGE D J, RAMALINGAM S. Clear cell renal cell carcinoma: from biology to treatment[J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(3): 665
- [23] ZHU H, REN S, BITLER B G, et al. SPOP E3 ubiquitin ligase adaptor promotes cellular senescence by degrading the SENP7 deSUMOylase [J]. *Cell Rep*, 2015, 13(6): 1183-1193

[收稿日期] 2024-01-09

(本文编辑: 蒋 莉)