



北京大学

博士研究生学位论文

题目: **USP4 调控 BRCA1 蛋白**
稳定性的作用机制及其与
乳腺癌发生发展的关系

姓 名: 郭雪媛
学 号: 1410305129
院 系: 基础医学院
专 业: 医学细胞生物学
研究方向: 去泛素化和 DNA 损伤修复
导师姓名: 邵根泽教授

二〇二二年 月

版权声明

任何收存和保管本论文各种版本的单位和个人, 未经本论文作者同意, 不得将本论文转借他人, 亦不得随意复制、抄录、拍照或以任何方式传播。否则, 引起有碍作者著作权之问题, 将可能承担法律责任。

中文摘要

BRCA1 是一个重要的乳腺癌抑癌基因, *BRCA1* 基因的胚系突变与表达水平下降与乳腺癌、卵巢癌等肿瘤的发生发展密切相关。*BRCA1* 及其功能复合物参与细胞的多种生物学功能, 包括同源重组途径的 DNA 损伤应答、细胞周期检验点调控、应激压力下的复制叉保护、染色质重塑、细胞有丝分裂以及转录调控等过程, 以确保基因组的稳定性。

BRCA1 蛋白的稳定性与剂量水平的调控是 *BRCA1* 及其复合物执行 DNA 损伤修复、应激条件下复制叉的保护等功能的关键, 在维持基因组稳定性以及抑制乳腺癌发生中发挥着重要的调控作用。细胞内 *BRCA1* 的蛋白质水平通过多种机制被严密调控。*BRCA1* 蛋白的表达 (转录水平、表观遗传调控)、分子间的相互作用和复合物形成以及翻译后修饰 (包括磷酸化、泛素化、类泛素化等) 均受到精细且严格的调控, 其中泛素化修饰是 *BRCA1* 蛋白质稳定性调节机制中最广泛存在且直接有效的方式之一。研究表明, *HERC2*、*FBXO44*、*HUWE1* 以及 *CRL4-DCAF8L1* 等多种 E3 泛素连接酶介导的对 *BRCA1* 分子的多聚泛素化修饰可导致 *BRCA1* 蛋白通过泛素-蛋白酶体途径被降解。泛素化修饰是一种可逆的修饰方式, 绝大多数泛素化酶对于蛋白质底物的泛素化修饰可以被去泛素化酶所逆转。研究表明, 去泛素化酶 *USP9X* 能够与 *BRCA1* 相互作用并稳定 *BRCA1* 蛋白, 正向调控 *BRCA1* 蛋白质水平, 但该调控是否是由 *USP9X* 对 *BRCA1* 进行去泛素化修饰所导致, 目前尚存在争议。因此, *BRCA1* 的去泛素化酶的鉴定仍是一个重要的科学问题。

为了探索能够特异性地去除 *BRCA1* 多聚泛素化修饰进而稳定 *BRCA1* 蛋白的去泛素化酶分子, 阐明 *BRCA1* 分子蛋白质稳定性调控的机制, 本论文采用分子生物学与细胞生物学实验技术, 进行了以下内容研究并取得结果: (1) 通过对含有 38 种人源去泛素化酶家族成员的蛋白文库进行筛选, 发现去泛素化酶 *USP4* 可以显著上调细胞内 *BRCA1* 蛋白质水平; (2) 通过 *USP4* 蛋白的过表达、敲低及回补实验, 证明了 *USP4* 可以正向调控 *BRCA1* 的蛋白质水平和稳定性; (3) 通过免疫共沉淀、GST pull-down 和细胞周期同步化实验证明了 *BRCA1* 与 *USP4* 能够相互作用, 并且二者相互作用随细胞周期的进展而变化; (4) 通过蛋白截断体 Mapping 实验, 确认了介导 *BRCA1* 与 *USP4* 相互作用的区域; (5) 利用泛素化实验进一步证明了 *USP4* 对于 *BRCA1* 的正向调控是通过拮抗 E3 泛素连接酶介导的对 *BRCA1* 分子的泛素-蛋白酶体降解。酶活突变型 *USP4* 研究表明, *USP4* 的去泛素化酶催化活性在 *USP4*-*BRCA1* 调控过程中是不可或缺的。

本研究利用乳腺癌细胞系、临床乳腺癌组织和标本, 开展了以下功能实验和相关

性研究,并得到以下研究结果:(1)乳腺癌细胞 DNA 损伤敏感性实验证明了缺失 USP4 的细胞对肿瘤化疗药物以及电离辐射等 DNA 损伤因素更加敏感,且该过程依赖 USP4 的去泛素化酶催化活性;(2)同源重组报告实验证明了 USP4 通过调节 BRCA1 的蛋白质水平进而影响细胞的同源重组修复;(3)染色体分析研究表明,USP4 的缺失会导致细胞基因组不稳定性增加,且该过程依赖 USP4 的去泛素化酶活性;(4)乳腺癌肿瘤组织免疫组化实验和生物信息学数据分析发现,USP4 和 BRCA1 在乳腺癌肿瘤组织中广泛地低表达,并且二者的表达存在显著正向相关关系;(5)通过对来自数据库临床乳腺癌患者 USP4 突变体的研究,发现乳腺癌中存在 USP4 的功能丧失型突变体。

综上所述,本研究发现了一个 BRCA1 蛋白的重要正向调控分子—去泛素化酶 USP4,揭示了 USP4 特异性对 BRCA1 进行去泛素化,调控 BRCA1 蛋白质稳定性的作用和分子机制,回答了 BRCA1 蛋白质稳态调节中一个长期未决的科学问题。USP4 通过去除 BRCA1 的 K48 连接多聚泛素化修饰,拮抗 BRCA1 的泛素-蛋白酶体途径降解,保证了 BRCA1 在细胞内的相对稳定,既有助于细胞 DNA 损伤修复等重要生理功能的维持,也为阐明 USP4-BRCA1 通路抑制乳腺癌发生中的作用和机理提供了新的线索。由于 BRCA1 功能缺陷所导致的同源重组缺陷往往导致乳腺癌对抗癌药物如 PARPi 的敏感性增高,因此,USP4 可能成为围绕 BRCA1 的乳腺癌治疗方案中的潜在干预靶点。

关键词: USP4, BRCA1, 去泛素化酶, 蛋白质稳定性, 乳腺癌

THE DEUBIQUITINATING ENZYME USP4 REGULATES BRCA1 STABILITY AND FUNCTION

ABSTRACT

BRCA1 (breast cancer susceptibility gene 1) has been identified as a key tumor suppressor involved in breast and ovarian cancers. BRCA1 regulates multiple cellular processes including homologous recombination and DNA replication repair, cell cycle and checkpoint, chromatin remodeling and mitosis. BRCA1 forms various distinct complexes with molecules, and disruption of each of these complexes can lead to genomic instability, which is a hall mark of cancer and malignancy.

The regulation of BRCA1 protein stability is critical to the execution of its cellular functions, which is crucial to maintain the genome integrity and to suppress breast tumorigenesis. Multiple mechanisms exist to supervise and maintain the stability of BRCA1 protein: intermolecular interaction, transcription, and post-translational modification (including protein ubiquitination, phosphorylation, and SUMOylation), among which ubiquitination is the most widespread and effective post-translational modification of BRCA1 protein. Several E3 ubiquitin ligases, such as HERC2, FBXO44, HUWE1 and CRL4-DCAF8L1 have been reported to promote the polyubiquitination of BRCA1 protein. Similar to other post-translational modifications, ubiquitination is also a modification that can be reversed by deubiquitinase enzymes (DUBs) to maintain the cellular homeostasis of a protein. So far, the DUBs responsible for regulating BRCA1 protein have rarely been reported. Previous study suggests that USP9X could deubiquitinate BRCA1 to maintain its protein stability, but later study showed that USP9X stabilizes BRCA1 mainly through regulating the mRNA level of BRCA1, and this process is independent of its deubiquitinase activity. To date, the identities of BRCA1 deubiquitinase still remain unclear.

To identify the DUBs that are responsible for deubiquitinating and stabilizing BRCA1, and to investigate their role and mechanism in regulating BRCA1 as well, we performed a series of studies and the following results were obtained.

First, we identified USP4 as the DUB of BRCA1 which can significantly upregulate the protein level of cellular BRCA1 through an unbiased screening of 38 human deubiquitinase members. We demonstrated that USP4 can positively regulate the protein level and stability of BRCA1 through exogenous overexpression or siRNA/shRNA mediated depletion of USP4

alongwith rescue assays. The interaction between USP4 and BRCA1 was verified using co-immunoprecipitation and GST pull-down assays. Further IP study using lysates from cells synchronized at different phase of the cell cylice proved that the protein level of BRCA1 coincides with that of USP4 during cell cycle progression and their interaction is closely associated with the phase of cell cycle, which is low in G1 and increases from entering S, and peaks at G2. Furthermore, pulldown assays using a series of protein truncations confirmed the regions mediating the interaction between BRCA1 and USP4.

Next, we further demonstrated that USP4 positively regulates the protein stability of BRCA1 through ubiquitin-proteasome system using endogenous ubiquitination assay and a series of Ni-NTA pull down experiments. The results showed that USP4 stablizes BRCA1 by antagonizing E3 enzyme-mediated degradation of BRCA1, and reconstitution of USP4 catalytic-inactive mutant further confirmed that the deubiquitinase function of USP4 is indispensable in this regulatory process.

To further investigate the biological role and underlying mechanism of USP4-mediated deubiquitination of BRCA1 in homologous recombination repair and other cellular processes, we performed functional experiments at different aspects and obtained the following results.

First, we demonstrated that USP4 depletion reduces the sensitivity of breast cancer cells to chemotherapeutic drugs and ionizing radiation, and this process depends on USP4 mediated positive regulation of BRCA1 protein.

Next, the homologous recombination reporter system proved that USP4 can positively regulate the homologous recombination efficiency through stablizing BRCA1, and reintroduction with wild-type USP4, but not the catalytic-inactive mutant, can reverse the impaired homologous recombination efficiency caused by USP4 depletion. Meanwhile, we demonstrated through metaphase spread assays that depletion of USP4 leads to genomic instability in cells and this process is dependent on the deubiquitinase activity of USP4.

Furthermore, we found that USP4 and BRCA1 protein are consistently low-expressed in breast cancer tissues, and a significant positive correlation between the expression level of USP4 and BRCA1 were observed in breast cancer tissue microarray. Besides, the expression level of USP4 is closely related to the prognostic risk of breast cancer patients through bioinformatic analysis of TCGA database.

Finally, we identified several loss-of-function USP4 mutations from clinic breast cancer database and their defective function in regulating BRCA1 was further verified by Western blotting. The Co-IP and Ni-NTA pull down assays showed that clinic USP4 mutations from human breast cancer are defective in deubiquitinating and stabilizing BRCA1, mainly due to

their inability to interact with BRCA1. These findings suggest that USP4 loss-of-function mutants are involved in breast tumorigenesis.

In conclusion, this study identified the deubiquitinase USP4 as an essential positive regulator of BRCA1, which may play an important role in the suppression of breast cancer. Our results suggest USP4 can specifically hydrolyze the polyubiquitination chains of BRCA1 and antagonize UPS-mediated degradation of BRCA1, and thus maintain the homeostasis of cellular BRCA1 protein.

Overall, our study addressed a previously unanswered question about BRCA1 protein level regulation and uncovered a critical role for USP4-BRCA1 pathway in breast carcinogenesis, suggesting that USP4 could be a potential therapeutic target for breast cancer treatment and prevention.

KEY WORDS: USP4, BRCA1, Deubiquitinating enzyme, Protein stability, Breast cancer

目录

缩略词表	1
第一章 引言	2
1.1 乳腺癌概述	2
1.2 BRCA1 分子概述.....	2
1.2.1 BRCA1 的结构和功能.....	2
1.2.2 BRCA1 的蛋白质水平及其与乳腺癌的关系.....	3
1.2.3 BRCA1 蛋白的表达调控.....	3
1.3 去泛素化酶及 USP4 分子概述.....	4
1.3.1 去泛素化的类型和功能.....	4
1.3.2 去泛素化酶与肿瘤发生发展.....	4
1.3.3 USP4 分子的结构和功能	5
1.4 本文的科学问题和研究内容.....	6
第二章 综述	7
2.1 引言	7
2.2 去泛素化酶研究概述.....	7
2.2.1 泛素化与去泛素化简介.....	8
2.2.2 去泛素化酶简介.....	9
2.2.3 去泛素化酶与肿瘤发生发展.....	17
2.3 USP4 分子概述.....	23
2.3.1 USP4 分子的结构与特性	23
2.3.2 USP4 参与的生物学功能	27
2.3.3 USP4 与肿瘤发生发展的关系	33
2.3.4 USP4 未来研究方向	35
2.4 BRCA1 蛋白概述.....	36
2.4.1 BRCA1 分子结构与特性.....	36
2.4.2 BRCA1 的生物学功能.....	39
2.4.3 BRCA1 的蛋白质水平调控.....	40
2.4.4 BRCA1 蛋白质水平的变化与乳腺癌的关系.....	41
第三章 材料与方法	42

3.1 实验材料	42
3.2 试剂及溶液配制	53
3.2.1 细胞培养相关试剂及溶液配制	53
3.2.2 细菌培养相关试剂及溶液配制	53
3.2.3 细胞裂解相关试剂及溶液配制	54
3.2.4 分子克隆相关试剂及溶液配制	54
3.2.5 Western blotting 相关试剂及溶液配制	54
3.2.6 蛋白纯化相关溶液配制	55
3.3 实验方法	56
3.3.1 质粒构建	56
3.3.2 细胞培养、传代、冻存及复苏	58
3.3.3 细胞转染	59
3.3.4 病毒制备及病毒感染	60
3.3.5 稳定细胞系的构建	60
3.3.6 细胞裂解、蛋白裂解液提取及定量	61
3.3.7 Western blotting 分析	61
3.3.8 内源性及 Flag/HA 标签蛋白免疫共沉淀	62
3.3.9 Ni-NTA pull-down	63
3.3.10 原核蛋白诱导表达、蛋白纯化及 GST pull-down	63
3.3.11 免疫组织化学	64
3.3.12 流式细胞技术	65
3.3.13 中期染色体断裂实验	66
3.3.14 体外细胞增殖实验	66
3.3.15 统计分析及绘图	66
第四章 结果	67
4.1 USP4 正向调控 BRCA1 蛋白的稳定性	67
4.2 USP4 与 BRCA1 存在直接相互作用	72
4.3 USP4 介导 BRCA1 的去泛素化	78
4.4 USP4 通过稳定 BRCA1 进而调控 DNA 损伤修复及基因组稳定性	82
4.5 USP4 在乳腺癌病人样本中低表达并与 BRCA1 蛋白表达正向相关	87
4.6 USP4 在乳腺癌患者中低表达并存在功能缺陷型基因突变	90
第五章 讨论	99
第六章 结论	105

参考文献	106
北京大学学位论文原创性声明和使用授权说明	124

缩略词表

缩写	全称	中文全称
BRCA1	Breast cancer susceptibility gene 1	乳腺癌易感基因 1
BARD1	BRCA1 associated RING domain protein 1	BRCA1 相关的 Ring 结构域蛋白 1
CHX	Cycloheximide	放线菌酮
CtIP	C-terminal binding protein interacting protein	CtBP 相互作用蛋白
Co-IP	Co-Immunoprecipitation	免疫共沉淀
DAB	Diaminobenzidine	二氨基联苯胺
DAPI	Diamidino-phenyl-indole	二脒基苯基吲哚
DDR	DNA damage repair	DNA 损伤修复
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Dulbecco 改良的 Eagle 培养基
DOX	Doxorubicin	阿霉素
DSBs	DNA double-strand breaks	DNA 双链断裂
DUBs	Deubiquitinating Enzymes	去泛素化酶
DUSP	Ubiquitin-specific proteases domain	泛素特异蛋白酶结构域
ETO	Etoposide	依托泊苷
JAMM	JAB1/MPN/MOV34 family	JAB1/MPN/MOV34 结构域相关金属蛋白酶家族
HR	Homologous recombination	同源重组
HU	Hydroxyurea	羟基脲
IHC	Immunohistochemistry	免疫组织化学
IR	Ionizing radiation	电离辐射
K48-Ubs	K48-linked ubiquitination chains	K48 连接的多聚泛素链
K63-Ubs	K63-linked ubiquitination chains	K63 连接的多聚泛素链
MJD	Machado-Joseph disease protein domain proteases	Machado-Joseph 病蛋白酶
miRNAs	microRNAs	微小核糖核酸
Mut	Mutation type	突变型
NHEJ	Non-homologous end joining	非同源末端连接
OTU	Ovarian tumor proteases	卵巢肿瘤相关蛋白酶
PARP	Poly ADP-ribose polymerase	聚 ADP 核糖聚合酶
PTMs	Post-translational modifications	翻译后修饰
RING	Really Interesting New Gene	RING 结构域
Ub	Ubiquitin	泛素分子
UBL	Ubiquitin-like domain	泛素样结构域
UPS	Ubiquitin- proteasome system	泛素-蛋白酶体系统
USP4	Ubiquitin specific protease 4	泛素特异性蛋白酶 4
WT	Wild-type	野生型

第一章 引言

1.1 乳腺癌概述

乳腺癌是常见的多发于女性的恶性肿瘤，2021年发布的美国癌症统计数据显示，乳腺癌的发病率与肿瘤相关死亡率分别居于女性恶性肿瘤的第一位和第二位^[1]。我国的乳腺癌发病率与死亡率近年来也持续上升，且呈现出发病年龄年轻化的趋势^[2,3]。过往研究已经充分证明 BRCA1 蛋白在抑制乳腺癌中发挥重要的功能，BRCA1 基因的胚系突变或表达水平不足与乳腺癌的发生发展密切相关^[4-7]。乳腺癌通常根据遗传易感性被划分为家族性遗传性乳腺癌和散发性乳腺癌，越来越多的证据表明 BRCA1 分子的常见异常表达类型在不同的乳腺癌遗传分型中存在差异。家族性遗传性乳腺癌占全体乳腺癌患者的约 20-30%，其发生发展与 BRCA1、BRCA2、TP53 和 PTEN 等多种抑癌分子的基因突变相关^[8,9]，其中 BRCA1/2 的胚系突变出现在超过一半的家族性遗传性乳腺癌患者中，是家族性遗传性乳腺癌患者的显著风险因素^[10]；而在占全体乳腺癌患者约 70-80%的散发性乳腺癌患者中，BRCA1 的异常多表现为蛋白质水平不足，而非 BRCA1 基因突变，且研究发现 BRCA1 的低表达水平与散发性乳腺癌的疾病进程、预后风险密切相关^[11-14]。

1.2 BRCA1 分子概述

1.2.1 BRCA1 的结构和功能

BRCA1 是一个在 1990 年被首次发现并克隆的乳腺癌抑癌基因，定位于人类第 17 号染色体上，该基因编码的乳腺癌抑癌蛋白 BRCA1 共含有 1863 个氨基酸，由氨基端的 RING 结构域(8-96)、NLS 结构域(503-614)，C 端的 Coiled-coil 结构域(1364-1437)和 BRCT 结构域(1646-1859)等结构域构成^[15]，其中 BRCT 结构域是 BRCA1 抑制乳腺癌的关键区域，也是在乳腺癌患者临床病例中出现 BRCA1 基因突变的高发区域^[16-20]。

作为一个具有多种生物学功能的肿瘤抑制蛋白，BRCA1 通过其 RING 结构域与 BARD1 构成异源二聚体，通过 BRCT 结构域与 RAP80、Abraxas、MRN(MRE11-RAD50-NBS1)复合物、CtIP 等多种分子形成不同的蛋白复合体，在维持细胞基因组稳定性、防止细胞恶性转化中发挥重要作用^[21-23]。BRCA1 参与同源重组途径的 DNA 损伤修复(DNA damage repair, DDR)、DNA 损伤诱导下的 S 期以及 G2/M 期细胞检验点调控、应激压力下的复制叉保护、细胞有丝分裂、染色质重塑以及转录调控等过程，进而维持机

体基因组的稳定性和完整性，抑制乳腺癌及卵巢癌的发生发展^[23]。

1.2.2 BRCA1 的蛋白质水平及其与乳腺癌的关系

研究发现，BRCA1 蛋白的表达剂量对于 BRCA1 及 BRCA1 相关蛋白复合物执行同源重组修复、应激条件下复制叉修复等功能的影响程度不同。复制叉修复对于 BRCA1 表达水平下调的敏感程度远高于同源重组修复，当 BRCA1 发生基因杂合突变或单倍剂量下降（蛋白质表达水平仅为正常水平的 50%）时，复制叉修复过程受阻，而同源重组修复仍可进行^[24, 25]。这提示 BRCA1 的蛋白质水平和稳定性在机体内必然受到精细且严格的调控，以确保 BRCA1 参与的各项重要的生物学过程能够正常进行。

BRCA1 蛋白表达水平的下调在散发性乳腺癌中普遍存在，而 *BRCA1/2* 的基因突变出现在超过一半的家族性遗传性乳腺癌患者中。有趣的是，BRCA1 突变携带者来源的小鼠胚胎成纤维细胞的基因组稳定性以及复制叉保护的功能缺陷可被外源野生型 BRCA1 的回补所逆转，而回补同等剂量的 BRCA1 突变体无法逆转上述功能缺陷，提示 BRCA1 基因突变在家族性遗传性乳腺癌中的作用很可能是由于野生型 BRCA1 蛋白水平不足，而非基因突变本身所致^[24]。因此，阐明 BRCA1 蛋白在乳腺癌患者中的表达水平下调对于揭示乳腺癌发生发展的机制具有重要的科学意义。

1.2.3 BRCA1 蛋白的表达调控

人体的 BRCA1 蛋白表达水平在多个不同层次受到精密调控，包括（1）分子间相互作用方面，BRCA1 与 BARD1 的蛋白-蛋白相互作用构成异源二聚体，二聚体形式对两个分子均起到稳定作用；（2）转录调控方面，多种转录因子以及 miRNAs 可以对 BRCA1 的转录水平进行正向或负向调控。研究发现，E2F1/RB/BRCA1 复合物、MiR-155-5p、miR17 均可以抑制 BRCA1 的转录水平，而 YY1、USP9X 可以提高 BRCA1 的转录水平^[26-30]；（3）表观遗传方面，*BRCA1* 基因启动子中 CpG 岛的甲基化修饰会负向调控 BRCA1 的转录水平，进而下调 BRCA1 蛋白水平^[14, 31, 32]；（4）翻译后修饰方面，常见的翻译后修饰类型如磷酸化、泛素化、类泛素化修饰均可发生于 BRCA1 蛋白，其中泛素化修饰是对 BRCA1 蛋白质水平及稳定性影响最显著的修饰类型之一。BRCA1 的多聚泛素化修饰导致 BRCA1 经由泛素-蛋白酶体途径降解，进而降低 BRCA1 在细胞内的水平和蛋白稳定性。与其他可以通过可逆性修饰-去修饰过程达成相对稳态的修饰类型一样，泛素化-去泛素化也是一种可以相互拮抗从而维持相对平衡的修饰方式，E3 泛素连接酶（E3 ubiquitin ligases）对于蛋白质底物的泛素化降解可以被相应的去泛素化酶（deubiquitinating enzymes, DUBs）所逆转。目前已报道的 BRCA1 的 E3 泛素连接酶包括 HERC2、FBXO44、HUWE1、DCAF8L1 等，然而 BRCA1 蛋白的特异性 DUB 却少有报道。研究表明，去泛素化酶 USP9X 能够与 BRCA1 相互作用并稳定

BRCA1 蛋白，正向调控 BRCA1 蛋白质水平，但该调控是否是由 USP9X 对 BRCA1 进行去泛素化修饰所导致，目前尚存在争议。有研究表明 USP9X 可以通过去泛素化影响 BRCA1 蛋白水平，也有研究表明 USP9X 通过调节 BRCA1 的 mRNA 丰度进而调控其蛋白质水平，而该过程与 USP9X 的去泛素化酶催化活性无关^[33-36]。

1.3 去泛素化酶及 USP4 分子概述

1.3.1 去泛素化的类型和功能

泛素化修饰是细胞内蛋白质翻译后修饰（post-translational modification, PTMs）的主要类型之一，在调控蛋白质的稳定性、细胞内定位、信号传递以及功能活性等过程中起到重要作用，并因此参与到细胞增殖、分化、细胞周期调控、损伤修复以及凋亡等多种细胞生物学过程中^[37-40]。

泛素（Ubiquitin, Ub）是一个由 76 个氨基酸构成的小分子，其分子中有 7 个赖氨酸残基。泛素分子之间可以通过赖氨酸残基相互连接进而形成泛素链。根据泛素分子之间赖氨酸连接位点的不同，泛素链可被划分为 K6、K11、K27、K29、K33、K48 和 K63 等不同类型，其中 K48 和 K63 多聚泛素化是最普遍存在、也是研究最深入的泛素化修饰类型。K48 多聚泛素化修饰（K48-Ubs）主要介导蛋白质底物的泛素-蛋白酶体途径降解，是调节蛋白质表达水平及稳定性的重要机制，细胞中超过 80% 的蛋白质是经此途径被降解的；K63 多聚泛素化修饰（K63-Ubs）主要调控蛋白质底物的细胞内定位和功能^[37, 41, 42]。

与磷酸化等其他翻译后修饰类似，泛素化-去泛素化修饰也是一种可逆的翻译后修饰方式，由 E3 泛素连接酶介导的泛素化修饰可以被 DUBs 所逆转。DUBs 是一个含有近百个成员的蛋白酶超级家族，根据催化结构域的不同，分为泛素特异性蛋白酶家族（USPs）、JAMM/MPN 结构域相关金属蛋白酶家族（JAMMs）、卵巢肿瘤相关蛋白酶家族（OUTs）、Machado-Josephin 结构域蛋白酶家族（MJDs）以及泛素竣基末端水解酶家族（UCHs）五个家族，其中以含有 50 多种蛋白酶成员的 USPs 家族最为庞大^[37]。

1.3.2 去泛素化酶与肿瘤发生发展

肿瘤的发生以及发展是一个受多层次、多因素、多步骤调控的复杂事件，改变的生物学过程涉及基因组完整性、肿瘤代谢、免疫肿瘤微环境、细胞分裂和死亡、肿瘤干细胞等^[43-45]。研究发现，DUBs 广泛参与到肿瘤发生发展相关的各项生物学过程，其中 USP1、USP3、USP4、USP7、USP11、USP13、USP15、USP21 等分子参与 DNA 损伤修复^[46-49]；USP13、USP28、USP37、CYLD 等分子参与细胞周期调控^[50-52]；USP7、USP10、USP13、OTUB1、OTUD3、OTUD7B 等分子参与肿瘤代谢通路调控^[44]；USP25、OTUD5、

OTUD7B 等分子参与肿瘤微环境调控^[53]。

由上述可知, DUBs 在肿瘤的发生发展过程中, 可以通过去泛素化过程调控众多抑癌蛋白或促癌蛋白, 而且 DUBs 本身的基因突变、蛋白异常表达都可能影响细胞的多项重要的生理活动, 如 DNA 损伤应答、代谢及免疫信号通路、细胞周期调控和细胞凋亡等过程, 从而调控肿瘤的发生发展、侵袭转移、预后等过程。因此, 去泛素化酶蛋白超家族是重要的肿瘤治疗靶标, 目前已有包括 USP1、USP2、USP7、USP8、USP9X、USP11、USP14 等多个特异性抑制剂处于抗肿瘤药物研发的阶段^[45]。

1.3.3 USP4 分子的结构和功能

USP4 (Ubiquitin specific protease 4) 是泛素特异性蛋白酶家族中的 DUB, 定位于人类染色体的 3p21.3, 编码 963 个氨基酸, 主要由氨基端的 DUSP 结构域、中间两段 UBL 结构域以及羧基端水解酶结构共同构成^[54]。目前报道的 USP4 蛋白质底物有十余种, 其中 USP4 能够移除的泛素化类型也呈现出多样性, 包括 Smad4、HAS2 以及 PDK1 的单泛素化修饰^[55-57], β -catenin、TRAF6、RIG-I 等的 K48 连接多聚泛素化修饰^[58-60], 以及 PRP3、RNPS1、TRAF2、TAK1 和 RIP1 的 K63 连接多聚泛素化修饰^[59, 61-64]。以上分子的去泛素化过程均依赖于 USP4 的 DUB 催化活性, 这意味着 USP4 通过去泛素化调控蛋白质底物来实现对细胞活动的调控。此外, USP4 还可以通过 DUB 催化活性非依赖的方式与 CtIP、S9 等蛋白相互作用, 在此过程中 USP4 对 CtIP、S9 等蛋白的泛素化修饰没有影响, 但仍可调节对应蛋白的细胞内定位、功能活性进而参与到相应的细胞活动中^[65]。

研究表明, USP4 参与调控 DNA 损伤修复、细胞增殖及分化、TGF- β 以及 Wnt/ β -catenin 等肿瘤代谢相关信号通路、NF- κ B、T 细胞免疫应答等免疫炎症相关信号通路^[66]。同时, USP4 在多种肿瘤组织中特异性地低表达或高表达, 其中 USP4 的低表达和基因突变与乳腺癌、非小细胞肺癌、肾细胞癌、食管癌、头颈鳞癌等肿瘤密切相关^[65]。此外, USP4 与 USP11 和 USP15 在分子结构和进化过程中存在高度同源性, USP11 和 USP15 均被证明能够通过发挥 DUB 功能来调控 DNA 损伤修复和基因组稳定性, 进而起到抑制乳腺癌发生的作用。以上研究成果均提示, USP4 可能与肿瘤, 尤其是乳腺癌的发生发展存在密切关系^[65]。但是, 作为一个去泛素化酶, USP4 在维持基因组稳定性以及乳腺癌发生发展过程中的具体机制是什么? 在此过程中 USP4 的去泛素化蛋白质底物是什么? USP4 能够去除其蛋白质底物的何种类型的泛素化修饰? 这些问题依然未被研究清楚。

1.4 本文的科学问题和研究内容

针对上述研究背景和科学问题,本研究开展了 BRCA1 的去泛素化酶筛选鉴定及其在乳腺癌发生发展过程中的作用机制研究,并且从以下三方面开展了工作。第一,通过在含有 38 种人源性 DUBs 的质粒文库中进行筛选,鉴定出能够特异性上调 BRCA1 蛋白质水平的 DUB;第二,阐明 USP4 调控 BRCA1 的蛋白质稳定性以及细胞内生物学功能的作用和机理。本研究在多种乳腺癌细胞系中瞬时敲低或过表达 USP4,检测 BRCA1 蛋白质水平。在稳定敲低或过表达 USP4 的乳腺癌细胞系中,通过 CHX 半衰期实验观察 USP4 对于 BRCA1 蛋白稳定性的影响。此外,通过一系列变性或非变性条件下的泛素化实验,在内源及外源性水平上检测 USP4 对于 BRCA1 的去泛素化水平的影响。第三,探究 USP4-BRCA1 通路在基因组稳定性以及乳腺癌发生发展过程中的作用。细胞水平上,在同源重组报告系统、中期染色体分析实验以及 DNA 损伤敏感性实验中观察并分析 USP4 的蛋白质水平及 DUB 催化活性与细胞基因组稳定性的关系。肿瘤组织水平上,通过乳腺癌组织芯片的免疫组化实验,分析 USP4 以及 BRCA1 在乳腺癌肿瘤组织中的表达程度和相关关系。同时,利用乳腺癌数据库获得乳腺癌患者临床突变体信息,构建临床突变体并进行检测,鉴定出乳腺癌中 USP4 的功能丧失型基因突变,并阐明 USP4 临床突变体对 BRCA1 的调控能力丧失与乳腺癌肿瘤抑制功能丧失之间的相关关系。

综上所述,本研究发现去泛素化酶 USP4 可以通过去除 BRCA1 的多聚泛素链,拮抗泛素-蛋白酶体系统对 BRCA1 蛋白的降解,从而上调 BRCA1 蛋白表达水平,稳定 BRCA1 蛋白,明确了 USP4 是 BRCA1 的正向调控分子。本研究首次阐明了 USP4-BRCA1 通路在抑制乳腺癌中的作用和可能机理,为以 BRCA1 异常为中心的乳腺癌靶向治疗提供了新的线索和思路。

第二章 综述

2.1 引言

泛素化修饰通过调控多种重要蛋白质底物，广泛参与到蛋白质的表达水平及稳定性、细胞内定位、信号传递以及功能活性的调控过程，从而在包括细胞增殖分化、转录调控、DNA 损伤应答、细胞周期调控以及细胞凋亡等几乎一切细胞生命活动^[38, 67]。

USP4 是泛素特异性蛋白酶家族的成员，可以对蛋白质底物的多种泛素化修饰进行切割，包括单泛素化、K48-连接类型多聚泛素化、K63-连接类型多聚泛素化。目前已报道的 USP4 去泛素化蛋白质底物已有十余种，USP4 通过调节蛋白质底物的稳定性、细胞内定位、功能活性进而参与到多种细胞活动中。近年来，大量研究发现 USP4 在许多恶性肿瘤中低表达或基因突变，表明 USP4 可以作为潜在的肿瘤治疗靶点。

BRCA1 是一个具有多种生物学功能的肿瘤抑制蛋白，可以通过其 BRCT 结构域与 Abraxas、MRN 复合物、CtIP 等多种分子构成蛋白复合体，在不同阶段、不同层次上对基因组稳定性、完整性进行调控，进而抑制细胞的致癌转化和恶变^[21-23]。BRCA1 参与同源重组途径的 DNA 损伤修复、DNA 损伤诱导下的 S 期以及 G2/M 期细胞检验点调控、应激压力下的复制叉保护、细胞有丝分裂、染色质重塑以及转录调控等过程，进而维持机体基因组的稳定性和完整性，抑制乳腺癌及卵巢癌的发生。

本综述中，首先简要介绍泛素化和去泛素化修饰过程，然后详细介绍去泛素化酶的类型、生物学功能以及在肿瘤发生发展过程中的作用，以及 USP4 分子的结构特性、对细胞内各类信号通路的调控机制以及 USP4 在肿瘤发生发展过程中的研究进展。

2.2 去泛素化酶研究概述

蛋白质翻译后修饰是细胞内重要的生物学过程，主要的修饰类型包括泛素化、类泛素化、磷酸化、乙酰化等，其中泛素化是细胞内最普遍存在的修饰之一。泛素化修饰通过对多种重要蛋白质底物的调控参与蛋白质稳定性、细胞内定位、信号传递以及功能活性等重要的细胞活动，从而在包括细胞增殖分化、转录调控、DNA 损伤应答、细胞周期以及细胞凋亡等几乎一切细胞生物学过程中^[37-40, 68, 69]。

蛋白质翻译后修饰多为可逆过程，泛素化修饰也不例外，由 E3 泛素连接酶介导的泛素化修饰可以被 DUBs 所逆转。DUBs 是一个含有 90 多个成员的蛋白酶家族，可对泛素分子的 76 位甘氨酸残基的肽键进行水解，从而去除蛋白质底物上的泛素化修饰，起到维持泛素稳态、精细化调控蛋白质稳定性及功能活性的作用。

2.2.1 泛素化与去泛素化简介

蛋白质翻译后修饰是细胞内调控蛋白质稳定性与活性的重要途径之一，其中，泛素化修饰可以通过对蛋白质底物的调控参与到包括泛素-蛋白酶体途径介导的蛋白质降解、蛋白-蛋白相互作用、蛋白质的细胞内定位以及功能活性等多种生物学过程中，几乎参与细胞的所有生命活动。

泛素化修饰是一种可逆的翻译后修饰，由 E3 泛素连接酶介导的泛素化修饰可以被去泛素化酶逆转，从而对蛋白质底物的稳定性和功能活性进行精细调控。

泛素是一个由 76 个氨基酸残基构成的小分子，在多种真核细胞中高度保守，由 *UBB*、*UBC*、*UBA52* 和 *RPS27A* 四个基因编码而成。泛素分子在第 6、11、27、29、33、48 和 63 位分别含有 7 个赖氨酸残基，泛素分子通过这些赖氨酸残基与其他泛素分子的羧基端甘氨酸或者靶蛋白赖氨酸的侧链氨基共价结合，最终形成多聚泛素链或对靶蛋白进行单泛素化修饰。

以泛素-蛋白酶体途径介导的蛋白质降解为例，泛素化修饰是一个多步骤、多层次调控的过程，该过程是在各个酶的依次作用下将泛素分子标记在蛋白质底物上，并被 26S 蛋白酶体识别进而降解蛋白质底物的过程^[41, 70, 71]。在 ATP 水解提供能量的前提下，E1 泛素活化酶（ubiquitin activating enzyme）的半胱氨酸残基与泛素分子羧基端的甘氨酸残基结合形成高能硫酯键，并将泛素分子激活。完成激活步骤的泛素分子被转移至 E2 泛素结合酶（ubiquitin conjugating enzyme）上，并与之结合。紧接着，E2 泛素结合酶与 E3 泛素连接酶(ubiquitin protein ligase)相互作用，在此过程中泛素分子被转移至 E3 泛素连接酶识别、结合的靶蛋白上，泛素分子的赖氨酸残基与靶蛋白上赖氨酸的侧链氨基共价结合，至此完成对于靶蛋白的泛素化修饰。被泛素分子标记的蛋白质底物能够被 26S 蛋白酶体识别，最终完成蛋白质降解过程（图 2.1）^[67, 72-74]。

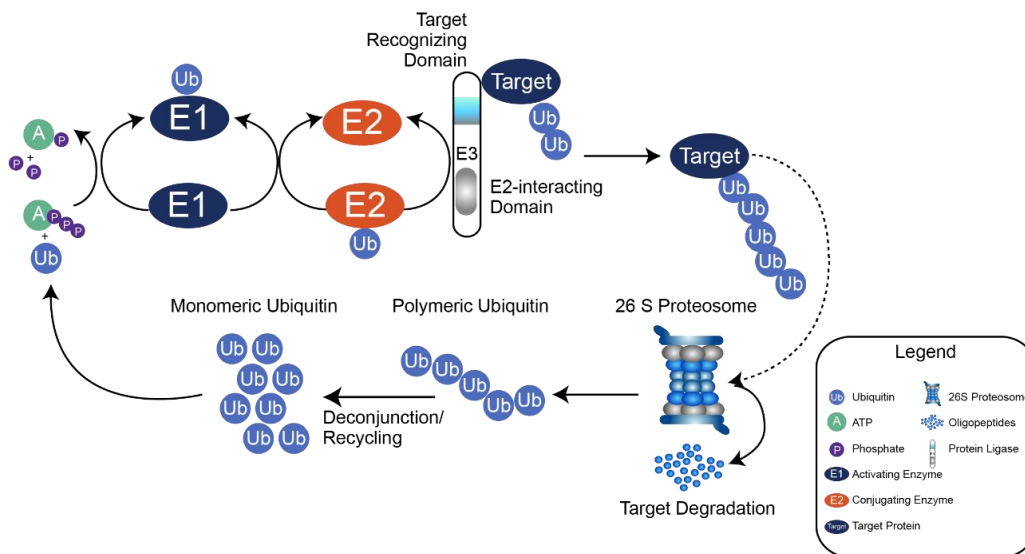


图 2.1 泛素-蛋白酶体系统概览^[67]

泛素分子在第 6、11、27、29、33、48 和 63 位共含有 7 个赖氨酸残基，均可作为泛素化位点，根据泛素连接的赖氨酸位点，泛素分子之间可分别形成 K6、K11、K27、K29、K33、K48 和 K63 等不同连接类型的泛素链。同时，根据泛素链连接方式的不同，泛素化修饰又可以被划分为单点泛素化、多位点单泛素化、多聚泛素化等形式。蛋白质底物的同一赖氨酸位点同时存在 2 种不同的泛素链时，可以形成多聚异质泛素链，异质泛素链可以进一步分为混合或者分支泛素链修饰^[75, 76]。总体而言，K48 和 K63 多聚泛素化是目前最普遍存在，也是研究最深入的泛素化修饰类型。其中，K48 多聚泛素化修饰主要介导蛋白质底物进行泛素-蛋白酶体途径降解，是调节蛋白质水平及稳定性的重要机制，细胞中超过 80% 的蛋白质是经由此途径被降解的；K63 多聚泛素化修饰主要通过改变蛋白质底物的细胞内定位和功能活性，从而参与到包括有丝分裂、DNA 损伤修复、囊泡运输、免疫调控以及上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 等多个重要的细胞生物学过程中 (图 2.2)^[77-81]。

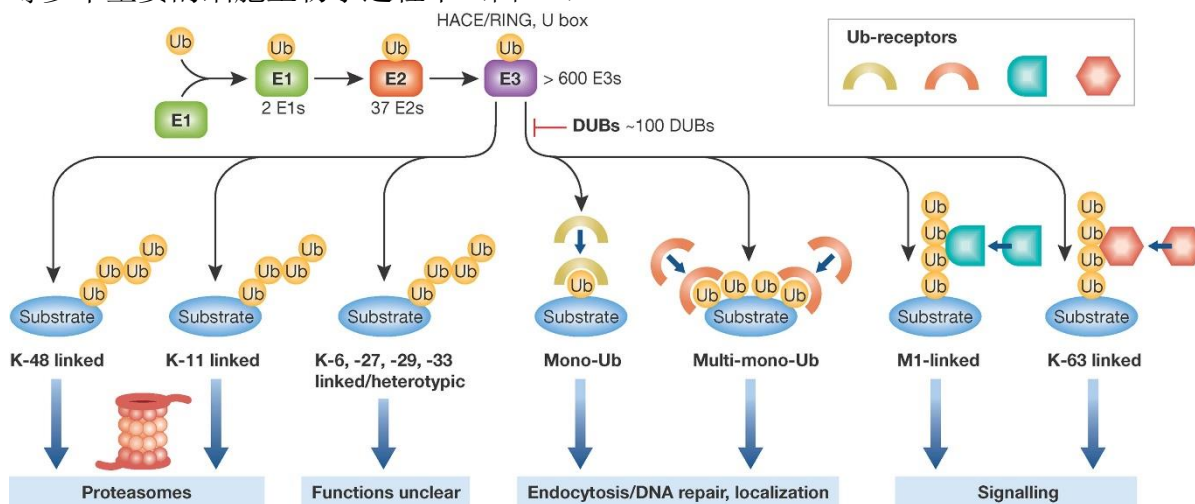


图 2.2 泛素-蛋白酶体系统概览^[82]

2.2.2 去泛素化酶简介

DUBs 是一个含有近一百个成员的蛋白酶超级家族，可将泛素羧基端的甘氨酸肽键从蛋白质底物上水解下来，从而调节泛素分子的前体加工和回收利用。根据催化结构域和保守性的不同，细胞中的 DUBs 被分为五个亚家族，分别是 USP、JAMM、OUT、MJD 以及 UCH，其中以含有 50 多种蛋白酶成员的 USP 家族最为庞大。DUBs 可以通过调控蛋白质底物的泛素化修饰参与到多个重要的细胞内生物学过程，因此，DUBs 本身的功能和活性也受到体内多种机制严格而精密的调控。

2.2.2.1 去泛素化酶类型

目前细胞中被鉴定出来的 DUBs 有近百个，根据催化结构域和序列保守性的不同，分为 5 个亚家族，分别是泛素特异性蛋白酶家族 (USPs)、JAMM/MPN 结构域相关金

属蛋白酶家族 (JAMMs)、卵巢肿瘤相关蛋白酶家族 (OUTs)、Machado-Josephin 结构域蛋白酶家族 (MJDs) 以及泛素羧基末端水解酶家族 (UCHs), 其中以含有 50 多种蛋白酶成员的 USP 家族最为庞大 (图 2.3) [67]。除了以上五大经典的亚家族成员, 近年来随着 DUBs 的进一步发现和鉴定, 新增了 MINDY 蛋白酶家族 (MINDYs) 以及 SUMO 特异性蛋白酶家族 (SENP) 两个新型亚家族。其中, 除了 JAMM 家族属于金属蛋白酶, 其他四大家族的 DUBs 均属于半胱氨酸蛋白酶; 除了 MJD 家族的成员不在酿酒酵母内表达, 其他家族的成员在包括人、果蝇、斑马鱼以及酵母菌等多个物种中保持高度保守 [37, 83]。

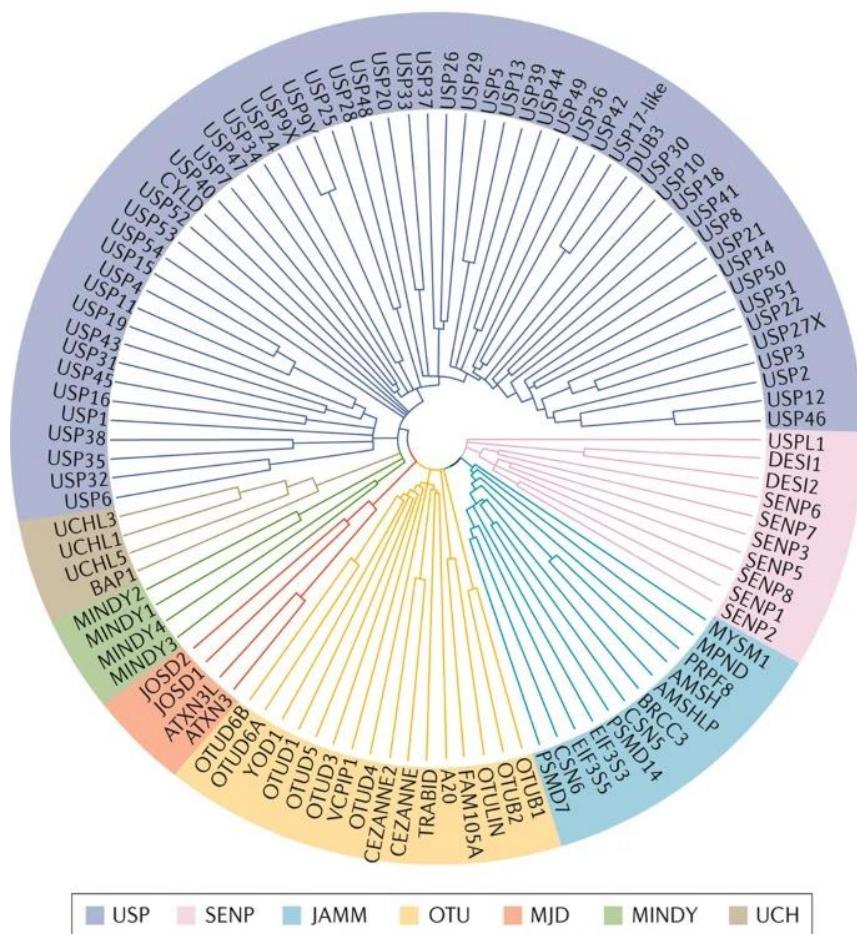


图 2.3 去泛素化酶分类概览^[45]

2.2.2.2 去泛素化酶参与的生理功能

DUBs 通过去除蛋白质底物上的泛素化修饰, 阻断蛋白质的泛素-蛋白酶体途径降解或改变蛋白质底物的细胞内定位, 从而调控蛋白质底物参与的一系列细胞活动, DUBs 也因此参与到 DNA 损伤应答、细胞周期调控、有丝分裂以及细胞凋亡等几乎一

切细胞生物学过程中。

(1) DUBs 在 DNA 损伤应答中的作用

内源及外源因素引发的 DNA 损伤每天都在发生,导致 DNA 单链断裂(single strand breaks, SSBs)、DNA 双链断裂(double strand breaks, DSBs)、碱基错配、DNA 交联等各类 DNA 损伤,细胞会因此启动 DNA 损伤应答以应对各类 DNA 损伤情况。细胞可以针对不同的 DNA 损伤类型选择不同的 DNA 损伤修复方式,以高效、迅速地应对可能导致基因组不稳定甚至进一步诱发细胞瘤变的风险。常见的 DNA 损伤修复方式包括核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)、碱基切除修复(base excision repair, BER)、错配修复(mismatch repair, MMR)、非同源末端连接(non-homologous end-joining, NHEJ)以及同源重组修复(homologous recombination repair, HR)。其中,对于 DNA 双链断裂这一最严重的损伤类型,细胞通常采取同源重组修复或非同源末端连接修复,而细胞在两种修复通路之间的选择主要取决于损伤时细胞所处的细胞周期以及 53BP1、BRCA1 等关键调控分子之间的拮抗结果^[84-88]。

以 DNA 双链断裂后启动同源重组修复过程为例,处于 S 或 G2 期的细胞发生 DNA 损伤后,蛋白激酶 ATM/ATR 磷酸化 Chk1 使得细胞周期阻滞,组蛋白变体 H2AX 发生磷酸化,形成 γ H2AX。 γ H2AX 随后被 MDC1 识别,蛋白激酶 ATM 对 MDC1 进行磷酸化,E3 泛素连接酶 RNF8 的 FHA 结构域与 MDC1 的磷酸化位点结合并因此定位到 DSB 位点,将 DSB 处的组蛋白泛素化。RNF8 还可通过其羧基端 RING 结构域与 E2 泛素结合酶 Ubc13 相互作用导致 H2A 的泛素化,并在此基础上招募 E3 泛素连接酶 RNF168。RNF168 与 Ubc13 的相互作用可进一步延伸 RNF8 启动的 H2A 泛素链,促进下游的效应蛋白如 BRCA1、53BP1、RAP80 等分子向 DNA 损伤位点处募集^[89-94]。

MRN 复合物识别 DSB 并将 CtIP 招募到 DNA 断裂位点,启动 DNA 末端切除,形成单链 DNA(single-stranded DNA, ssDNA)。ssDNA 一旦形成便迅速被 RPA 蛋白包裹并保护,随后 RAD51 置换 RPA 并形成单链 DNA 核纤丝。在 BRCA2 和 PALB2 的共同帮助下,RAD51 介导单链 DNA 对同源染色体的姐妹染色单体进行入侵。在姐妹染色单体的指导以及 DNA 聚合酶的作用下,ssDNA 得以高保真延伸。两个姐妹染色单体之间形成霍利迪结构(holiday junctions),该结构随后在核酸酶的作用下被解开,具有高保真度的同源重组修复就此完成^[95-100]。

研究表明,多种 DUBs 可以通过调控 DNA 损伤修复相关的关键蛋白质的稳定性或功能活性,进而调控 DNA 损伤应答过程。目前报道的能够参与 DNA 损伤修复的 DUBs 包括 USP1、USP2a、USP3、USP4、USP7、USP8、USP9X、USP10、USP11、USP14、USP20、USP24、USP28、USP38、USP52、BRCC36、OTUB1、OTUD3 和 POH1 等。下面选取一些具有代表性的 DUB 分子进行进一步的机制介绍^[41, 101, 102]。

USP1 可以通过调控 DNA 交联损伤(DNA interstrand crosslinks, ICL)和跨损伤修

复 (translesion synthesis, TLS) 通路中的关键蛋白, 参与 DNA 损伤修复通路。一方面, USP1 是范可尼贫血相关蛋白 2 (FANCD2) 的特异性去泛素化酶, 而 FANCD2 是范可尼贫血症 DNA 交联修复途径的关键蛋白, 可以与 FANCA/B/C/E/F/G/L/M 形成 FA 核心复合物、与 FANCI 形成 FANCD1 复合物, 进而启动包括 DNA 交联损伤和同源重组修复在内的多个 DNA 修复进程^[103]。此外, USP1 可以调控 FA 核心复合物在 DNA 损伤位点附近的积累, 并可通过细胞周期依赖的方式对 FANCD2-FANCI 复合物进行去泛素化^[104]。另一方面, USP1 还可以去除增殖细胞核抗原(PCNA)的单泛素修饰并调控其蛋白活性。在 DNA 复制过程中, PCNA 蛋白可围绕 DNA 形成环状三聚体以增强 DNA 合成的持续性, 当复制叉被 DNA 损伤位点阻挡时, PCNA 蛋白的泛素化修饰可启动跨损伤 DNA 合成途径, 进而帮助细胞规避更为严重的 DSB。当细胞处于紫外线损伤条件下时, RAD6 或 RAD18 等 E3 泛素连接酶对 PCNA 进行单泛素化修饰并激活 PCNA 从而启动跨损伤修复; 当紫外线损伤条件解除后, USP1 对 PCNA 进行去泛素化, 从而抑制过度的跨损伤修复^[105]。目前, 针对 USP1 的小分子抑制剂已处于临床研究阶段, 卵巢癌和三阴性乳腺癌的临床前研究数据表明, USP1 抑制剂可增强 PARP 抑制剂的疗效, USP1 有潜力作为肿瘤合成致死治疗途径的靶点之一^[106]。

USP3 能够特异性去除组蛋白 H2A 与其磷酸化形式 γ H2AX 的泛素化修饰, 并与 E3 泛素连接酶 RNF8/RNF168 相互拮抗, 减少 BRCA1 和 53BP1 在 DNA 损伤位点的聚集, 进而负向调控基因组稳定性。此外, USP3 还可去除组蛋白 H2B 的单泛素化和多聚泛素化修饰, 在体内敲低 USP3 可以观察到 H2A 和 H2B 泛素化水平的明显上升, 基因组不稳定性增加, 敲除 USP3 的小鼠可以自发成瘤^[107-109]。

USP4 和 USP52 可以通过调控 CtIP 促进 DNA 末端切除, 进而正向调控同源重组修复过程。其中, USP4 并不对 CtIP 进行去泛素化, 而是直接与 CtIP/MRN 复合物相互作用, 促进该复合物在 DNA 双链断裂位点的募集, 启动 DNA 末端切除。有趣的是, USP4 的自身泛素化水平影响其对于 CtIP 的调控^[110, 111]。USP52 可以特异性去除 CtIP 的 K782 位点的单泛素化修饰, 促进 CtIP 的 847 位苏氨酸的磷酸化, 进而激活 CtIP 活性, 促进 DNA 末端切除, 从而有利于后续的同源重组修复过程^[102]。

USP7 是 MDC1 的去泛素化酶, 它与 MRN/MDC1 复合体存在直接相互作用, MRN/MDC1 复合体为 USP7 更有效地去泛素化和稳定 MDC1 提供了平台。在 DNA 损伤条件下, MRN/MDC1 与 USP7 的相互作用进一步增强, MDC1 的稳定性随之上调, 从而有利于招募 BRCA1 和 53BP1, 促进细胞同源重组修复和非同源末端连接修复。研究表明, USP7 在宫颈癌中存在过表达, USP7 介导的 MRN/MDC1 复合体稳定性增强赋予了宫颈癌细胞抵抗 DNA 损伤的能力, 过表达 USP7 的宫颈癌患者预后可能更差^[112]。

MSH2 是错配修复途径的重要调控蛋白。研究发现, USP10 可以与 MSH2 相互作

用, 并通过去泛素化途径稳定 MSH2 蛋白。此外也有研究表明, 在肺癌细胞中敲低 USP10 可以降低肿瘤细胞对 DNA 损伤药物的敏感性^[113, 114]。

USP11 可以与 BRCA2 形成复合物, 促进 DNA 双链断裂情况下的同源重组修复途径。另外, BRCA1 与同源重组修复中的另一个关键蛋白 PALB2 之间的相互作用受泛素化控制, PALB2 的泛素化修饰会抑制其与 BRCA1 的相互作用, 而 USP11 可以特异性去除 PALB2 的泛素化修饰, 进而保护 BRCA1 与 PALB2 的蛋白相互作用, 最终正向调控同源重组修复过程^[115, 116]。

USP14 可以拮抗 RNF168 依赖的泛素信号传导过程, 阻止 53BP1 等下游效应蛋白在 DNA 损伤位点的募集, 进而影响 HR 效率。此外, PTEN 通过阻碍 Ku70 与 DNA 的结合, 下调 NHEJ 修复效率, 而 USP14 可以通过去泛素化调控 Ku70, 影响 NHEJ 介导的 DNA 损伤修复过程^[117, 118]。

Chk2-p53-PUMA 通路是响应 DNA 双链断裂的主要调节因子之一, 也是促进 p53 介导的细胞凋亡的重要途径之一。USP28 可以去泛素化并稳定 Chk2 和 53BP1 以维持该通路所参与的 DNA 损伤应答和细胞凋亡^[119, 120]。

USP38 能够被募集到 DNA 损伤位点, 通过去除乙酰化酶 HDAC1 的 K63 多聚泛素化修饰, 上调 HDAC1 的去乙酰化酶活性并去除 H3K56 的乙酰化修饰, 提高 NHEJ 的修复效率。USP38 全身敲除小鼠在电离辐射后 20 天内全部死亡, 而野生型小鼠则能够长久存活, 进一步提示 USP38 在细胞基因组稳定性维持中发挥重要作用^[121, 122]。

JAMM 家族去泛素化酶 BRCC36 可以与 Abraxas、RAP80、NBA1 以及 BRE 形成去泛素化酶复合物。该复合物在 DNA 损伤条件下可以招募 BRCA1 到 DNA 损伤位点, 并参与调控 DSB 位点的 K63 类型泛素化修饰, 从而促进 HR 修复^[123-126]。

JAMM 家族去泛素化酶 POH1 被认为是调控 DNA 双链断裂修复方式选择的开关分子之一。POH1 可以促进 RAD51 招募到 DNA 损伤位点。另一方面, POH1 可以通过拮抗 RNF8/RNF168 介导的 53BP1 招募过程。以上均提示 POH1 可以限制 NHEJ 的效率, 促进细胞选择 HR 修复途径^[127, 128]。

(2) DUBs 在细胞周期调控中的作用

细胞周期调控蛋白如细胞周期蛋白 (Cyclins)、周期蛋白依赖性激酶 (Cyclin-dependent kinases, CDKs) 以及检查点激酶 (check point kinases, CHKs) 的蛋白表达水平和稳定性受到细胞的精密控制, 以确保细胞周期的正常进展。E3 泛素连接酶以及 DUBs 通过泛素-去泛素化过程对以上蛋白的表达水平、稳定性以及功能活性进行调控, 从而参与到细胞周期的调控过程中。目前报道的能够参与 DNA 损伤检查点的 DUBs 包括 USP1、USP3、USP7、USP10、USP11、USP16、USP17、USP21、USP22、USP28、BRCC36、ATXN3、MYSM1 和 BAP1 等^[129]。下面选取几个代表性 DUBs 进行详细的机制介绍。

原癌基因 *RAS* 羧基末端的 *CAAX* 基序对于 *RAS* 蛋白进行正确的膜定位并发挥促癌功能具有重要作用, 这一过程依赖于 *RAS* 转换酶 1(*RCE1*)对 *CAAX* 基序的切割。*USP17* 可以逆转 *RCE1* 的 K63 泛素化修饰, 从而对 *RCE1* 的功能活性进行负向调控, 阻断 *RAS* 蛋白的膜定位和激活, 从而抑制下游的细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制因子(*Cyclin-dependent kinase inhibitor, CKIs*)的磷酸化, 最终调控细胞增殖。敲除 *USP17* 可以显著抑制细胞增殖并引起 *CKIs* (例如 *p21Cip1*、*p27Kip1* 等) 积累, 从而导致 *G1/S* 细胞周期阻滞^[130, 131]。

USP22 可以去泛素化 *Cyclin D1* 并稳定其蛋白质水平, 进而促进细胞由 *G1* 期进入 *S* 期。此外, 果糖-1,6-二磷酸 1 (*FBP1*) 的 K63 泛素化修饰负向调控其对 *Cyclin/CDK* 复合物抑制剂 *p21* 的抑制作用, *USP22* 可以特异性去除 *FBP1* 的 K63 多聚泛素链, 进而下调 *p21* 的表达。类似地, *USP22* 也可通过调节 *Wnt/β-catenin* 通路上调 *FoxM1* 的表达水平, 从而下调 *p21* 和 *p27* 蛋白水平, 上调 *Cyclin D1*、*CDK4* 和 *CDK6* 的表达, 促进 *G1* 期转变复合物的形成, 加速 *G1/S* 细胞周期进程^[132-134]。

MJD 家族去泛素化酶 *ATXN3* 可拮抗 *E3* 泛素连接酶复合物 *DDB1/CUL4A* 以及 *FBXO6* 介导的 *Chk1* 多聚泛素化, 进而动态性地稳定 *Chk1*。在静息状态以及复制压力早期, *ATXN3* 与 *Chk1* 结合并促进其稳定。长期复制压力下, *ATXN3* 与 *Chk1* 解离, 并增强 *Chk1* 与其 *E3* 泛素连接酶复合物的结合, 导致 *Chk1* 的泛素化途径蛋白降解, 促进检验点调控终止、细胞周期恢复以及细胞存活^[135]。

(3) DUBs 在染色质功能中的作用

大多数组蛋白都可以进行多种类型的翻译后修饰, 包括乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化和 *SUMO* 化, 而组蛋白的翻译后修饰在染色质重塑以及表观遗传水平的调控中发挥着重要作用。目前报道的能够参与染色质功能调控的 *DUBs* 包括 *USP3*、*USP7*、*USP10*、*USP12*、*USP16*、*USP21*、*USP22*、*USP29*、*USP36*、*USP44*、*USP46*、*USP49*、*BRCC36*、*OTUB1* 和 *BAP1* 等, 下面对几个具有代表性 *DUB* 分子进行机制介绍。

在高等真核生物中, 约有 10-15% 的组蛋白 *H2A* 在其高度保守的 K119 位点被单泛素化修饰 (*H2A-K119ub*), 此类组蛋白 *H2A* 大量富集在不活跃的近着丝粒区、失活的 *X* 染色体和沉默的发育基因区域, 在染色质重塑过程中发挥重要作用。染色质重塑是在基因复制、转录、损伤修复、重组等过程中以一系列核小体变化为基本特征的生物学过程。以 *DNA* 复制过程为例, 核小体结构要先被打开, 使得 *DNA/RNA* 聚合酶能顺利通过核小体, 进而对其包裹的 *DNA* 进行复制、转录; 而聚合酶通过后的 *DNA* 要被重新组装形成核小体, 以保护 *DNA* 序列并维持该区域的表观遗传信息。最近的研究表明, *H2A-K119ub* 的泛素化修饰可以使组蛋白 *H2A* 通过空间位置效应对核小体外圈 *DNA* 形成栓子样的保护, 阻碍 *DNA* 从核小体上剥离, 最终达到稳定核小体的作用。*USP21* 可以去泛素化调控 *H2A-K119ub* 核小体, 进而恢复核小体的稳定性^[136, 137]。

研究发现 H2A-K119ub 在调控基因转录中也发挥着重要作用,其中包括对多种氧化应激反应相关基因(比如 *SLC7A11* 基因)的转录调控。*SLC7A11* 主要负责体内的胱氨酸摄入及谷胱甘肽(GSH)合成过程,GSH 合成量不足会导致细胞难以抵抗大量积累的过氧化物,最后促进细胞发生铁死亡并遏制肿瘤的生长。UCH 家族的去泛素化酶 BAP1 可以特异性移除 H2A 的 K119 单泛素化修饰,而 *SLC7A11* 基因上的 H2A-K119ub 正向调控其 mRNA 的转录,所以 BAP1 可以通过抑制 *SLC7A11* 的转录,调控肿瘤细胞的铁死亡过程^[138, 139]。

(4) DUBs 的其他生物学功能

除上述生物学功能外,DUBs 还可以通过调控细胞有丝分裂以保证子代细胞基因组的稳定性。有丝分裂是一个受精密调控的复杂有序的动态过程,在染色体列队、动粒-微管连接、纺锤体组装检验点以及胞质分裂等多个有丝分裂事件中,均有 DUBs 参与调控的身影。

以有丝分裂纺锤体组装检查点(spindle assembly checkpoint, SAC)为例,当动粒-微管未成功连接或连接出错时,SAC 激活,抑制有丝分裂从中期向后期转变,直到动粒和微管建立正确连接为止,此过程主要依赖检验点复合物 MCC 和促后期复合物 APC/C 发挥效应。APC/C 是一种 E3 泛素连接酶,可以通过泛素化 Securin 蛋白,介导姐妹染色单体分离、促进有丝分裂进入后期。MCC 复合物由 Mad2、Cdc20、Bub1、Bub3 和 Mad3 构成,可以有效抑制 APC/C 的活性。

研究发现,USP44、CYLD 等 DUBs 均可调节 SAC 激活过程。其中,USP44 能够直接去泛素化 MCC 复合物成员 Cdc20,最终导致染色体的错误分离。USP44 因此被认为是潜在的抑癌蛋白;也有研究进一步证明敲低 USP44 的小鼠可自发性形成肿瘤^[140, 141]。USP 家族的去泛素化酶 CYLD 可以特异性去除多个有丝分裂相关蛋白的 K63 多聚泛素链,进而影响相应蛋白质底物的细胞定位和活性。CYLD 可以去泛素化 Plk1 蛋白,促进细胞进入有丝分裂过程;CYLD 还可以去除 Dishevelled 蛋白的多聚泛素链,进而增强它与细胞核有丝分裂装置的相互作用,帮助细胞核有丝分裂装置和 dynein/dynactin 复合体在细胞皮层定位;CYLD 也可以与 PP2A 相互作用从而促进 PP2A 与有丝分裂激酶 Aurora B 的结合,达到抑制 Aurora B 活化的作用。另外也有研究发现,CYLD 蛋白能影响有丝分裂进程中纺锤体的定位,导致细胞分裂方向改变,并且出现多核化现象^[51, 142, 143]。

2.2.2.3 去泛素化酶的蛋白质水平调控

由于 DUBs 参与到多个重要的细胞内生物学过程,DUBs 本身的蛋白质表达水平、细胞内定位和催化活性也受到体内多种机制的严格而精密的调控^[81, 144, 145]。

第一,在转录水平上,多种转录因子可以对 DUBs 的 mRNA 丰度进行调控。USP37

的转录受 E2F 转录因子控制，并且该转录调控使得 USP37 蛋白水平在细胞周期 G1/S 阶段较高，这与 USP37 发挥去泛素化并稳定 Cyclin A 蛋白、促进细胞周期进展到 S 期的功能密切相关^[52]。

第二，蛋白-蛋白之间的相互作用是调控 DUBs 生物学功能的关键因素，这一调控机制可以影响 DUBs 的细胞内定位、底物识别和催化活性。JAMM 家族的去泛素化酶 POH1、半胱氨酸蛋白酶 USP7、USP14 和 UCHL5，都在与 19S 调节颗粒可逆性结合以后被激活催化活性，进而去泛素化相应的蛋白质底物^[70, 146-148]。另外，JAMM 家族的去泛素化酶 BRCC36 本身很大程度上是无活性的，但是它分别可以参与形成核 Abraxas 复合物 (ARISC) 和 BRCC36 异肽酶复合物 (BRISC) 两种蛋白复合物，ARISC 和 BRISC 复合物共享核心亚基 BRCC45 和 MERIT40，但此外它们还各自拥有特异性成分，即 BRISC 的 Abro1 和 ARISC 的 Abraxas。BRCC36 在不同的复合物中体现出不同的细胞内定位和生物学功能。在作为 BRISC 复合物的一部分时，BRCC36 能够被 Abro1 激活，通过去泛素化调节纺锤体组装因子 NuMA 的 K63 泛素化修饰，从而调控两极纺锤体的组装，也可以通过阻止 I 型干扰素受体的内吞和溶酶体降解稳定其蛋白质水平。在作为 ARISC 复合物的一部分时，BRCC36 的激活需要 Abraxas 和 RAP80 亚基的协同作用，随后在 DNA 损伤修复中发挥作用^[149-153]。

第三，一系列翻译后修饰如磷酸化、乙酰化、泛素化、SUMO 化等修饰方式也可以调节 DUBs 的蛋白质水平、细胞内定位以及功能活性。研究发现，磷酸化修饰可以调控 DUBs 的细胞定位和催化活性。Akt 对 USP4 的磷酸化导致 USP4 从细胞核穿梭到细胞质并对 T β RI 去泛素化，从而调节 TGF- β 通路的功能；Casein kinase 2 (CK2) 介导的 OTUD5 磷酸化促进 OTUD5 激活其 DUB 活性，进而在免疫应答过程中发挥负向调控作用；Akt 介导的 USP14 磷酸化可以激活其 DUB 活性，进而使其能够去除 Beclin-1 的 K63 类型多聚泛素链；E2 泛素结合酶 UBE2O 通过非典型途径介导 BAP1 的泛素化，抑制 BAP1 的核转运，而这一过程又可被 BAP1 的自身去泛素化所逆转。此外，USP10、USP37 和 USP9X 都可以被磷酸化进而被激活^[154-159]。

DUBs 也可以被 E3 泛素连接酶介导的泛素化修饰所调控，导致其泛素-蛋白酶体途径的降解、DUB 催化活性和底物结合能力的改变。例如，USP4 可以进行自身去泛素化抵消它的自身泛素化介导的蛋白质降解；USP7 可以进行不同连接方式的泛素化修饰，以二聚或多聚泛素化形式发挥其对 p53 的去泛素化作用，稳定 p53 蛋白；ATXN3 的 K117 位点泛素化导致其催化活性增加；而 UCHL1 的单泛素化会影响其泛素结合位点，抑制其与泛素化底物或游离泛素的结合，进而抑制 UCHL1 的催化活性，导致其蛋白功能受损^[154, 160-162]。

类似地，SUMO 化修饰也可以影响 DUBs 的活性。USP25 氨基端的 UBD 结构域 K99 位点可发生单泛素化进而激活该酶；此外，该结构域还包含一个 SUMO 相互作用

基序。USP25 的 K99 和 K141 位点均可被 SUMO 化修饰, K99 位点的 SUMO 化不影响 USP25 单泛素底物的加工, 但会抑制其与泛素分子的结合和解离。USP25 和 USP28 具有相似性, 研究表明 USP28 也存在类似 SUMO 化修饰。CYLD 的氨基端也可以发生 SUMO 化修饰, 该修饰抑制了 CYLD 对 TRAF2/6 的去泛素酶活性, 从而促进了 NF- κ B 通路的信号传导^[163-166]。

2.2.3 去泛素化酶与肿瘤发生发展

2.2.3.1 去泛素化酶通过调控重要的原癌/抑癌蛋白参与肿瘤发生发展

DUBs 可以通过调控一些在肿瘤发生发展过程中发挥重要促癌或抑癌功能的蛋白, 参与到肿瘤发生发展过程中。目前已报道的能够被 DUBs 调控的原癌/抑癌蛋白包括 p53、PTEN、BRCA1 等。

p53 作为一个重要的抑癌基因, 在细胞应激反应、细胞凋亡中起关键作用, 并且在多种肿瘤类型中发生突变或缺失。E3 泛素连接酶 Mdm2 能够泛素化并降解 p53 蛋白, 是 p53 的关键负调节因子。USP7 可以特异性去除 Mdm2 的多聚泛素链, 稳定 p53 的蛋白质水平^[167, 168]。此外, DNA 损伤事件发生时, USP10 可以入核并拮抗 Mdm2 介导的 p53 蛋白的泛素化降解, 稳定 p53 蛋白^[169, 170]。USP22 可以通过去泛素化 SIRT1, 增强 SIRT1 对 p53 的乙酰化修饰, 进而导致 p53 蛋白与 DNA 结合能力受损, 负向影响细胞凋亡过程^[171]。最近有报道表明 ATXN3 可以与 p53 相互作用并去泛素化 p53 蛋白, 进而稳定 p53 蛋白。ATXN3 的缺失导致 p53 不稳定, 而 ATXN3 的过表达可以上调 p53 的表达水平并促进细胞凋亡过程^[172]。USP28 可以与 53BP1 相互作用并促进 53BP1 依赖的 p53 下游反应, 包括细胞周期检查点以及 DNA 损伤应答等^[173]。

PTEN 是继 p53 之后被发现在多种肿瘤中频繁突变的抑癌基因, 与 p53 并称为基因组稳定性的两大守护者。USP7 可以去除 PTEN 蛋白的单泛素化, 促使 PTEN 从细胞核转移到细胞质, 但并不影响 PTEN 的蛋白质稳定性和蛋白质水平。USP13 和 OTUD3 均可以去除 PTEN 的多聚泛素化修饰, 进而稳定 PTEN 蛋白^[174-176]。

HIF1 α 是一种在缺氧条件下发挥功能的转录因子, 是细胞应答缺氧应激的关键分子。当细胞氧水平正常时, VHL 蛋白可以泛素化 HIF1 α 并使其降解。USP20 可以特异性去泛素化 HIF1 α , 阻止其泛素-蛋白酶体途径的降解, 从而允许低氧反应基因的转录。因此, USP20 抑制剂有潜力抑制缺氧肿瘤细胞增殖的潜力, 该药物已处于临床前研发阶段^[177, 178]。最新的研究表明, USP22 也可以在缺氧条件下去泛素化并稳定肝癌细胞中的 HIF1 α 蛋白, 而在 TP53 失活的肝癌细胞中, HIF1 α 可促进 USP22 的转录表达。USP22 与 HIF1 α 组成的正反馈调节通路可促进肝癌细胞的干性表型^[179]。

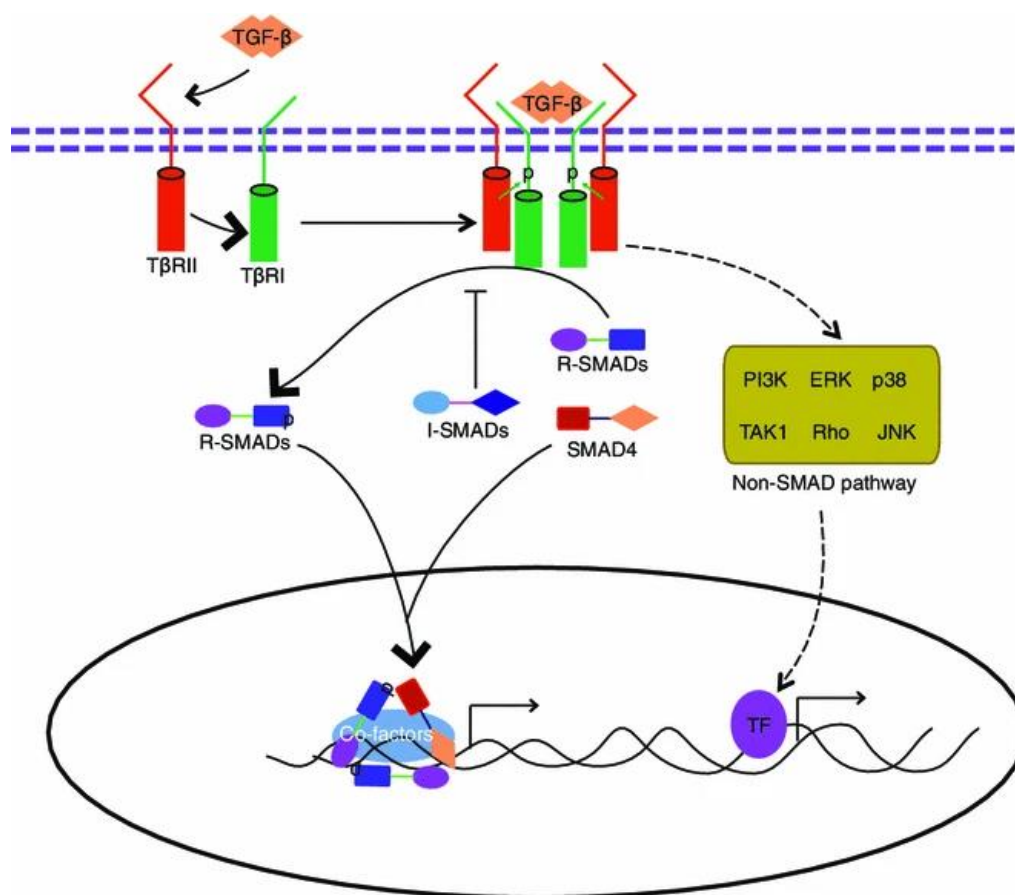
除了调控 p53 蛋白, USP28 还可以拮抗促癌蛋白 MYC 的泛素化降解, 进而表现出促癌潜力^[180]。

2.2.3.2 去泛素化酶通过调控肿瘤信号转导通路参与肿瘤发生发展

PI3K/Akt/mTOR 是一个调节细胞生长、增殖，抑制细胞自噬的信号通路。PI3K 激活后，细胞膜上产生第二信使 PIP3；PIP3 与 Akt 和 PDK1 结合，促使 PDK1 磷酸化 Akt，导致 Akt 的活化。活化的 Akt 通过磷酸化作用，激活或抑制其下游靶蛋白，形成一个信号级联复合物，最终调节细胞的增殖、分化、存活和迁移等过程。mTORC1 作为微环境中营养信号的感应器，能够感应微环境中的氨基酸、生长因子、葡萄糖等信号，进而调控细胞的糖、蛋白质、脂代谢以及细胞自噬等过程，在肿瘤微环境中起到重要作用^[181, 182]。

最新的研究报道，USP1 可以直接去除 Akt 的 K63 连接多聚泛素链，从而在长期饥饿的小鼠肌肉组织内抑制 PI3K-Akt-FoxO 信号传导，促进 PI3K-Akt-mTOR 通路介导的蛋白质代谢过程^[183]。USP9X 可以和 mTORC 复合物相互作用，特异性去除 mTOR 伴侣 RICTOR 的 K63 连接多聚泛素链，以促进其与 mTOR 的相互作用，从而促进 mTORC2 的组装和信号传导；另外，USP9X 还可以去泛素化 RAPTOR，拮抗其泛素-蛋白酶体途径，最终调节 mTOR1 信号通路的活性^[184-186]。Rheb 作为 mTORC1 的直接激活分子，对于 mTORC1 下游信号通路起着关键的作用。研究表明 E3 泛素连接酶 RNF152 可以对 Rheb 的 K8 位点进行泛素化修饰，促进 Rheb 与 TSC2 结合，进而抑制 mTORC1 的活性，影响到细胞增殖以及细胞自噬等过程。与此相反的是，USP4 可以拮抗 RNF152 对 Rheb 的泛素化修饰，从而参与到 mTORC1 感应微环境中生长因子的信号过程^[187]。

TGF- β 信号通路是细胞内信号转导的重要途径，协调着包括细胞生长、分化、迁移、侵袭和细胞外基质重塑在内的许多细胞过程（图 2.4）。该通路及其组分在多种肿瘤中呈失调状态，在正常细胞和早期肿瘤中，TGF- β 信号通路能够抑制细胞生长和细胞凋亡，从而抑制肿瘤形成。但随着肿瘤进展，细胞捕获 TGF- β 及其下游效应因子的突变，逃脱 TGF- β 的抑制作用，转而诱导 EMT，促进肿瘤细胞的迁移。目前已有多项研究表明泛素化与去泛素化调控在 TGF- β 信号通路中起到重要作用^[188, 189]。

图 2.4 TGF- β 信号通路概览^[189]

目前已报道与 T β RI 相关的 E3 泛素连接酶包括 Smurf1/2、WWP1 和 NEDD4-2 等，它们都能够对 T β RI 进行泛素化修饰导致 T β RI 蛋白的降解^[189]。USP4 能够直接结合细胞膜中的 T β RI 并对其进行去泛素化，进而稳定 T β RI，从而正向调节 TGF- β 诱导的 EMT、细胞侵袭迁移等过程，最终在乳腺癌进展过程中实现 TGF- β /Smad 通路依赖的肿瘤侵袭和转移。USP4 发挥这一功能依赖于 Akt 对其的磷酸化修饰，USP4 的 445 位点丝氨酸被磷酸化修饰后可以帮助 USP4 从细胞质转移到细胞膜，这表明 PI3K/Akt 通路的异常激活可能会重新定向 TGF- β 的细胞内信号传导，从而有助于其从肿瘤抑制因子转变为肿瘤促进因子^[154, 190]。与此类似的是，与 USP4 高度同源的去泛素化酶 USP11 和 USP15 也都能够通过去泛素化 TGF- β /Smad 通路的关键蛋白进而调控该通路。USP11 可以和 Smad7 相互作用，USP11 也因此被招募到 T β RI 处并对 T β RI 进行去泛素化，促进 TGF- β 下游信号传导^[191]。USP15 也可以被 Smad7 募集 T β RI 处，在此过程中 Smad7 充当复合体的支架，将 E3 泛素连接酶 Smurf2 和去泛素化酶 USP15 带到 T β RI 处。当细胞内 TGF- β 水平低时，Smurf2 引起的 T β RI 泛素化修饰被 USP15 快速地去掉。然而，当 TGF- β 信号增加时，反馈机制会诱导 Smad7 高表达，相对地 USP15 水平不足，从而限制 TGF- β /Smad 信号的持续激活^[192, 193]。此外，OTUB1 可以通过去除磷酸化活性形

式的 Smad2/3 的多聚泛素化修饰，增强 TGF- β 信号传导。OTUB1 对 Smad2/3 的调控不是经典的去泛素化途径，也不依赖于 OTUB1 的 DUB 活性，OTUB1 能与 E2 泛素结合酶 UBC13 相互作用，抑制泛素分子从 E2 转移到 E3，从而抑制 Smad2/3 被泛素化修饰^[194, 195]。CYLD 可以与 Smad7 相互作用，去泛素化 Smad7 的 K360 和 K374 的 K63 连接泛素链，这一过程是激活 TAK1 和 p38 信号传导的必要步骤。研究发现敲除 CYLD 会导致 TAK1 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶活性增强^[196]。Smad4 也是 TGF- β 信号通路的关键调控蛋白，研究发现 Smad4 的 K519 位点单泛素化修饰会削弱其与 R-Smad 的结合能力，USP9X 可以特异性去除该单泛素化修饰，恢复 Smad4 的细胞内活性^[197, 198]。

JAK-STAT3 信号通路可被白介素、表皮生长因子等多种细胞因子激活，促进 STAT3 的细胞核转位，从而启动下游靶基因如 *Bcl-2*、*Bcl-XL*、*c-Myc* 的转录，调控细胞生长、增殖分化、细胞凋亡以及细胞周期等过程。JAK-STAT3 通路的失调也与多种肿瘤的发生发展密切相关。研究发现 USP6 可以直接去泛素化调控 JAK1，稳定并激活 JAK1 蛋白以及下游的 STAT3，从而体现出潜在的致癌能力。USP6 的致癌潜力在敲除 JAK1 或 STAT3 后显著降低，进一步提示 USP6 可能是通过促进 JAK-STAT3 通路调控肿瘤的发生^[199]。此外，USP22 可以特异性去除 H2B 的单泛素化修饰，进而激活 JAK/STAT3 通路中的靶基因 *IRF1*，从而正向调控癌症进展^[200, 201]。

2.2.3.3 去泛素化酶通过 DNA 损伤修复以及细胞周期调控参与肿瘤的发生发展

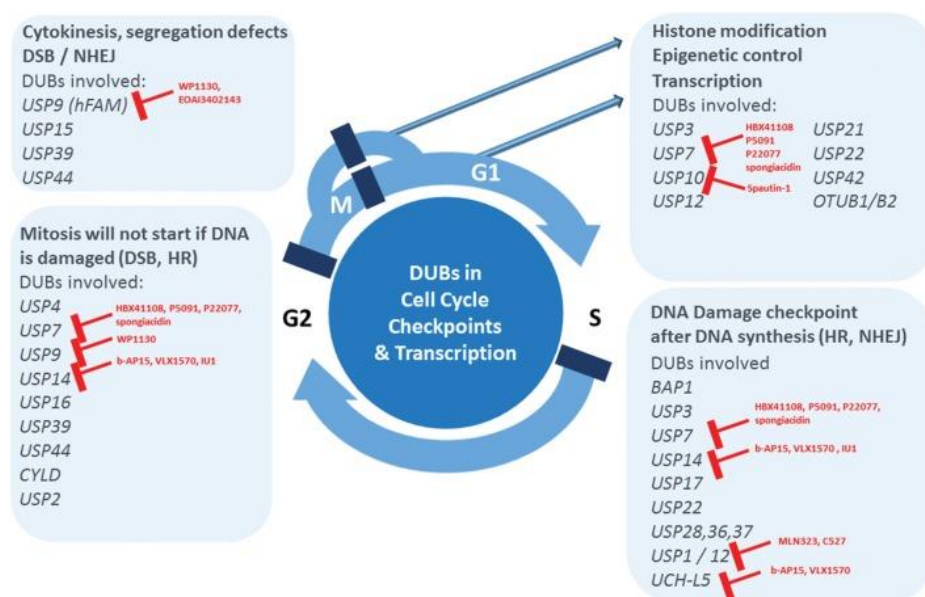
多种 DUBs 可以通过调节 DNA 损伤修复、细胞周期检验点相关蛋白进而调控 DNA 损伤应答过程。本综述已于 2.2.2.2 讨论过参与 DNA 损伤修复以及细胞周期调控的去泛素化酶，这里不再赘述。现以图表列示目前已报道的参与调控 DNA 损伤应答（表 2.1）及细胞周期检验点（图 2.5）的去泛素化酶。

表 2.1 参与 DNA 损伤修复通路的去泛素化酶

去泛素化酶	蛋白质底物	DNA 损伤修复通路	参考文献
USP1	FANCD2, FANCI, PCNA	DNA 交联损伤，跨损伤修 复，范可尼贫血	[103, 104, 202]
USP2a	Mdm2	p53 调控	[203]
USP4	CtIP/MRN	同源重组修复	[110, 111]
USP7	Mdm2, p53, Claspin, Chk1, RNF168	p53 调控，ATR-Chk1, γ - H2AX	[204-207]
USP8	BRIT1	BRIT1-SWI-SNF DNA 双链 断裂修复	[208]
USP9X	Claspin, BRCA1	ATR-Chk1，同源重组修复	[30, 209, 210]

续表 2.1 参与 DNA 损伤修复通路的去泛素化酶

去泛素化酶	蛋白质底物	DNA 损伤修复通路	参考文献
USP10	p53, MSH2	ATM-p53 调控, DNA 错配修复	[113, 169]
USP11	p53	p53 调控	[211]
USP20	Claspin	ATR-Chk1	[212]
USP24	p53, DDB2	p53-PUMA	[213]
USP28	Chk2, 53BP1	Chk2-p53-PUMA	[120]
USP29	p53, Claspin	p53 调控, ATR-Chk1	[214, 215]
USP38	HDAC1	非同源末端连接	[121]
USP52	CtIP	同源重组修复	[102]
OTUB1	p53	p53 调控	[216]
OTUD5	p53	p53 调控	[217]

图 2.5 参与细胞周期检验点调控的去泛素化酶^[101]

2.2.3.4 去泛素化酶通过调控免疫炎症应答过程参与肿瘤的发生发展

NF- κ B 信号通路在调控肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡和侵袭转移等方面发挥重要作用，而泛素化和去泛素化酶也可通过调控该通路的一些关键蛋白参与到调控肿瘤发生与转移的过程（图 2.6）。

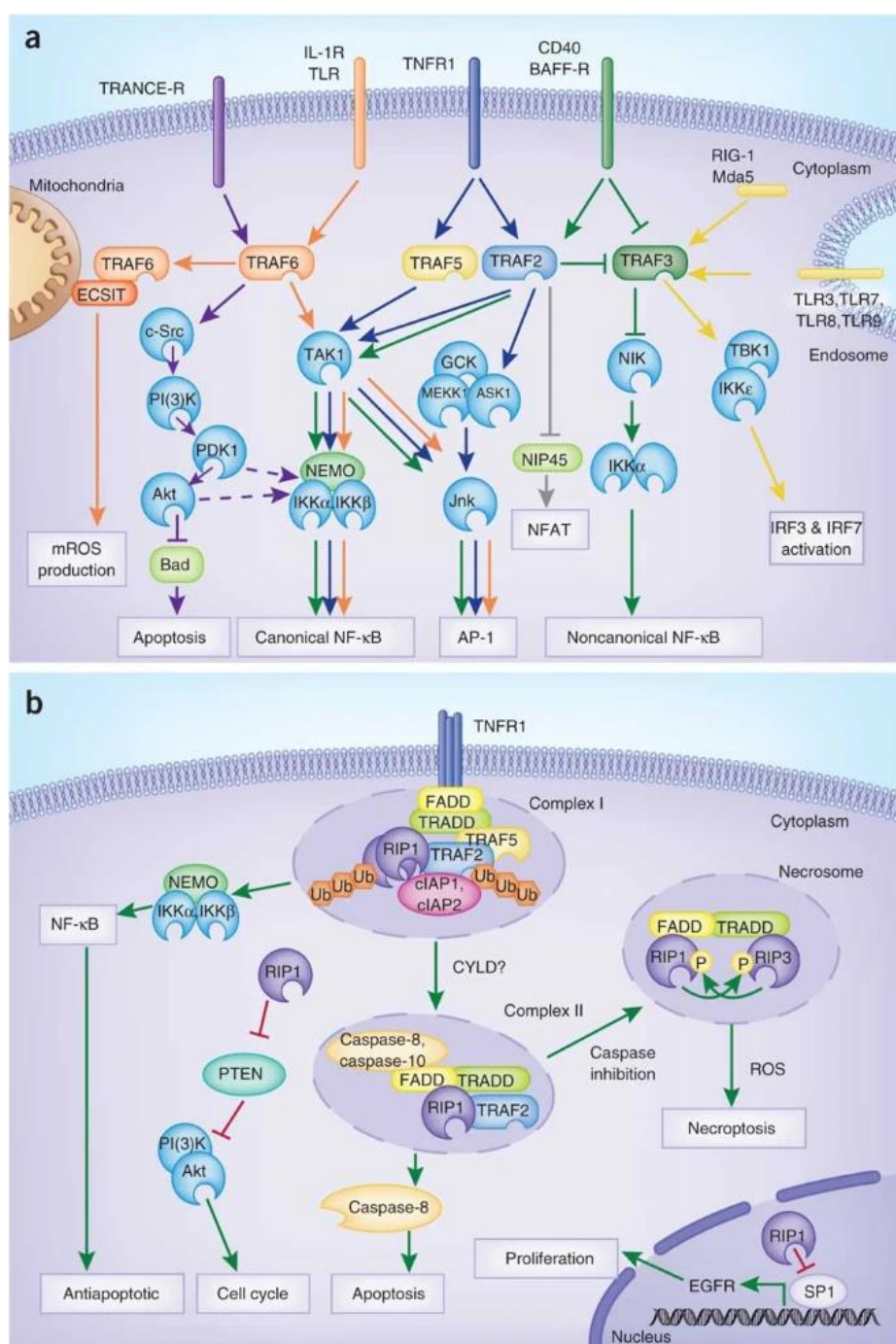


图 2.6 NF- κ B 信号通路概览^[218]

CYLD 可以通过去泛素化多个 NF- κ B 相关蛋白，进而负向调控不同途径的 NF- κ B 信号传导。CYLD 可以移除 TRAF2 的 K63 连接多聚泛素链并抑制 p65/p50 途径的 NF- κ B 信号传导，进而负向调控 TRAF2 依赖的细胞存活和炎症反应；CYLD 还可以与 Bcl-3 相互作用并对 Bcl-3 进行去泛素化，进而抑制 Bcl-3 的核积累及 Bcl-3 依赖性的细胞增殖和肿瘤生长^[219-221]。USP4 在 NF- κ B 通路中起到较为复杂的调控作用，一方面 USP4 可以去除 TAK1 的 K63 类型多聚泛素链，下调 TAK1 蛋白活性，从而抑制 TNF α 、IL-

1 β 、LPS 和 TGF β 诱导的 NF- κ B 信号传导；USP4 还可以直接去泛素化 HDAC2 并稳定 HDAC2 蛋白,从而抑制 TGF β 诱导的 NF- κ B 信号活化^[63,222]。另一方面,USP4 与 TRAF6 存在直接相互作用,正向调节 RLR 诱导的 NF- κ B 信号通路,最终调控宿主的病毒感染免疫应答^[223]。USP18 能够对 TAK1-TAB1 复合物进行去泛素化,调节 T 细胞活化和 Th17 细胞分化,从而抑制 IL-2 表达^[224]。最近有研究表明支架蛋白 p62 能够与非典型蛋白激酶 Cs 相互作用,促进该激酶在 TNF α 激活的 NF- κ B 信号通路中发挥作用。USP20 可以与 p62 特异性结合并去除其 K48 类型多聚泛素链,稳定 p62 蛋白并正向调节 TNF α 诱导的 NF- κ B 信号通路,最终有助于细胞存活^[225]。此外,OTUD7B、A20、USP35、USP15 等 DUBs 也都参与到 NF- κ B 信号通路的调控过程^[226-230]。

除了 NF- κ B 等与肿瘤免疫密切相关的信号通路,DUBs 也参与到 T 细胞的分化、活化过程。Foxp3 是控制 Treg 细胞分化的关键转录因子,Foxp3 下调可以负向调控 Treg 特征基因的表达和活性。研究发现,USP7 和 USP21 都可以特异性去除 Foxp3 的多聚泛素链,阻断 Foxp3 的泛素-蛋白酶体途径降解,从而调节 Treg 细胞的数量和功能,参与到免疫炎症应答过程中^[231,232]。

2.3 USP4 分子概述

USP4 是 1993 年首次被发现的 DUB,定位于人类染色体的 3p21.3,编码 963 个氨基酸,主要由氨基端的 DUSP 结构域、中间两段 UBL 结构域以及羧基端的水解酶结构共同构成^[54]。USP4 可以切割蛋白质底物的多种连接类型泛素链,包括单泛素化、K48 多聚泛素化、K63 多聚泛素链等。目前已报道的 USP4 去泛素化蛋白质底物已有十多种。此外,USP4 也可以在不依赖其 DUB 活性的情况下与 CtIP、S9 等蛋白相互作用,通过调节对应蛋白的细胞内定位或功能活性参与到多种细胞生命活动中^[66]。

研究表明,USP4 可以调控 DNA 损伤应答通路、细胞增殖及分化、TGF- β 以及 Wnt/ β -catenin 等肿瘤代谢相关通路、NF- κ B 以及 T 细胞免疫应答等免疫炎症相关通路的关键蛋白,从而在肿瘤发生发展、病毒感染性疾病、代谢性疾病、自身免疫疾病的多个生理或病理过程中发挥重要作用^[65]。

2.3.1 USP4 分子的结构与特性

2.3.1.1 USP4 催化结构域

USP4 是一种半胱氨酸蛋白酶,这类 DUBs 的共同特征是催化结构域内含有特征性的 Cys 和 His 残基。USP4 主要由氨基端的 DUSP 结构域、中间两段 UBL 结构域以及羧基端水解酶结构域共同构成,两段 UBL 结构域一个位于催化结构域的氨基远端,一个位于催化结构域内(图 2.7)。

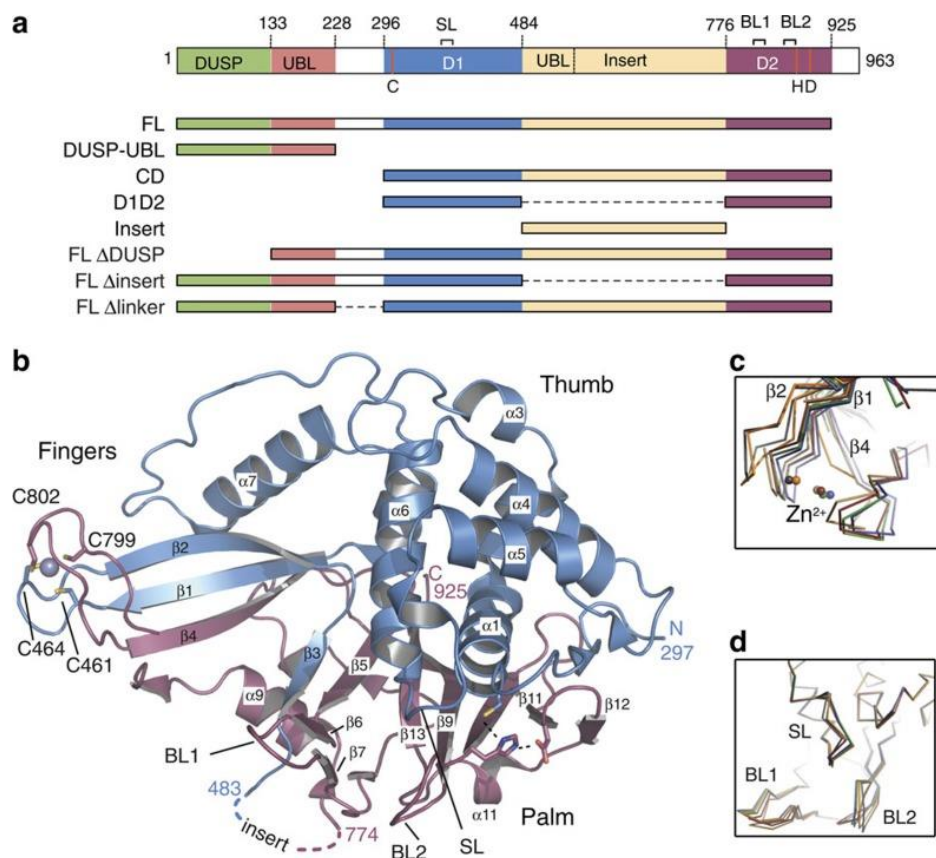


图 2.7 USP4 分子结构概览^[54]

USP4 的催化结构域是一个位于羧基末端的双组分结构域（296-925 氨基酸区域），包括 D1 结构域、D2 结构域和一个含有 UBL 的插入片段。整个催化结构域在空间上整体呈现出开放的右手形状，包括三个子区域，分别是“拇指”（thumb, T）、“手指”（finger, F）和“手掌”（palm, P），其中 D1 结构域构成拇指结构的主体，UBL 以及羧基端末尾 D2 结构域之前的区域构成手指结构的主体，羧基端末尾构成掌心的主体。作为一个半胱氨酸蛋白酶，右手结构是 USP4 催化结构的主体，也是其发挥去泛素化酶功能的核心区域。其中，D1 结构域包括催化活性位点 Cys 框（303-320 氨基酸区段）和 QQD 框（390-403 氨基酸区段），而 D2 结构域则包含 His 框（864-885、894-903 和 915-922 氨基酸区段）。

USP4 和其他半胱氨酸蛋白酶家族的 DUBs 具有类似的催化机制。首先，His 残基对 Cys 残基的硫醇基团进行去质子化；紧接着，Cys 残基对异肽键发起亲核攻击，释放 Lys 残基的 ϵ -胺，并与泛素分子产生共价酰基酶中间体；最后，在水分子的帮助下，USP4 通过二酰化释放出游离的泛素分子，为接下来的泛素分子动态周转提供条件。

2.3.1.2 DUSP-UBL 结构域

USP4 的 DUSP-UBL 结构域跨越了其氨基端的 1-228 氨基酸区域, 并通过无功能的 linker 区段 (229-295 氨基酸区段) 与催化结构域分开。DUSP-UBL 的晶体结构是一个由两个结构域亚基以反平行方向相互堆积而成的二聚体^[233]。这样的空间结构导致 DUSL 结构域以广泛平面的方式呈现, 而 UBL 结构域不受空间结构的约束, 具有独立运动的能力, 这个空间构象与两个结构域的功能密切相关。

DUSP-UBL 结构域对于 USP4 发挥去泛素化酶活性起到至关重要的作用。DUSP-UBL 区域可以增强泛素分子在 USP4 催化结合位点处的解离, 防止泛素分子在被水解后异常积累于催化结构域, 从而促进泛素分子的及时周转^[54]。DUSP-UBL 结构域不仅可以提高泛素分子在催化位点的解离速度, 还可以直接与 linker 区域结合并以此促进泛素分子与催化位点再次迅速结合。研究表明, 缺失 DUSP、UBL 或 DUSP-UBL 之间的 linker 区域, 都会显著降低 USP4 的催化活性, 这表明 DUSP-UBL 结构域对于 USP4 的 DUB 活性是必不可少的, 也意味着 USP4 的催化活性需要其所有功能域的共同协作^[54, 234, 235]。

2.3.1.3 USP4 的分子结构与 USP11、USP15 高度同源

USP4、USP15 和 USP11 是在分子结构和蛋白质序列上具有高度同源性的三种去泛素化酶, 都包括氨基端 DUSP 结构域、羧基端水解酶结构域和中间的两个 UBL 结构域, 三个分子在空间结构上都呈现手掌状结构 (图 2.8)^[236]。

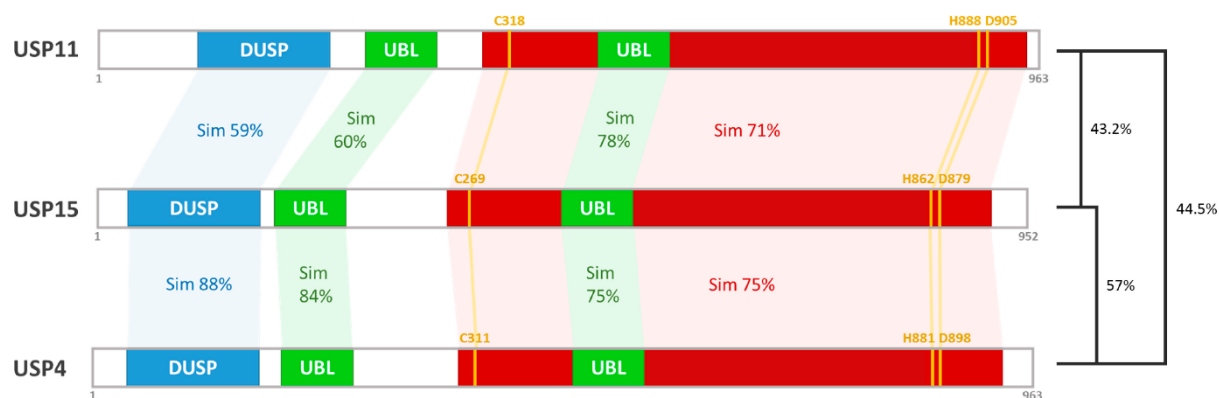


图 2.8 USP4 与 USP11、USP15 的分子结构高度同源^[236]

USP4、USP15 和 USP11 三个分子的高度同源性很可能是源自于其相似的谱系发育路径, 相似的结构和序列也导致它们在蛋白质底物的调控和生物学功能中存在一定的重叠 (图 2.9)。比如, USP4 和 USP15 都可以通过与 TGF- β 、Wnt/ β -catenin 和 NF- κ B 通路中的关键蛋白相互作用进而调节细胞生长、胚胎发育以及先天免疫过程; USP4 和 USP15 也是少有的可以与剪接体相互作用进而调节 mRNA 加工的去泛素化酶分子, 目前已报道的 USP4 和 USP15 剪接底物有超过 11 个是重叠的。值得注意的是, 英国剑桥

大学的 Ryotaro Nishi 研究团队通过大规模系统性筛选鉴定出 USP4、USP15 和 USP11 三个分子都能够参与调控 DNA 损伤修复过程，不过它们发挥 DNA 损伤应答功能的具体机制各不相同。USP15 是通过去泛素化 BARD1 的 K63 多聚泛素化修饰进而调控同源重组修复，USP4 可以通过与 CtIP 相互作用，促进 CtIP 被招募到 DNA 损伤位点处，启动 DNA 末端切除；USP11 则是可以去泛素化 p53 蛋白，对 DNA 损伤修复的路径选择进行调控。

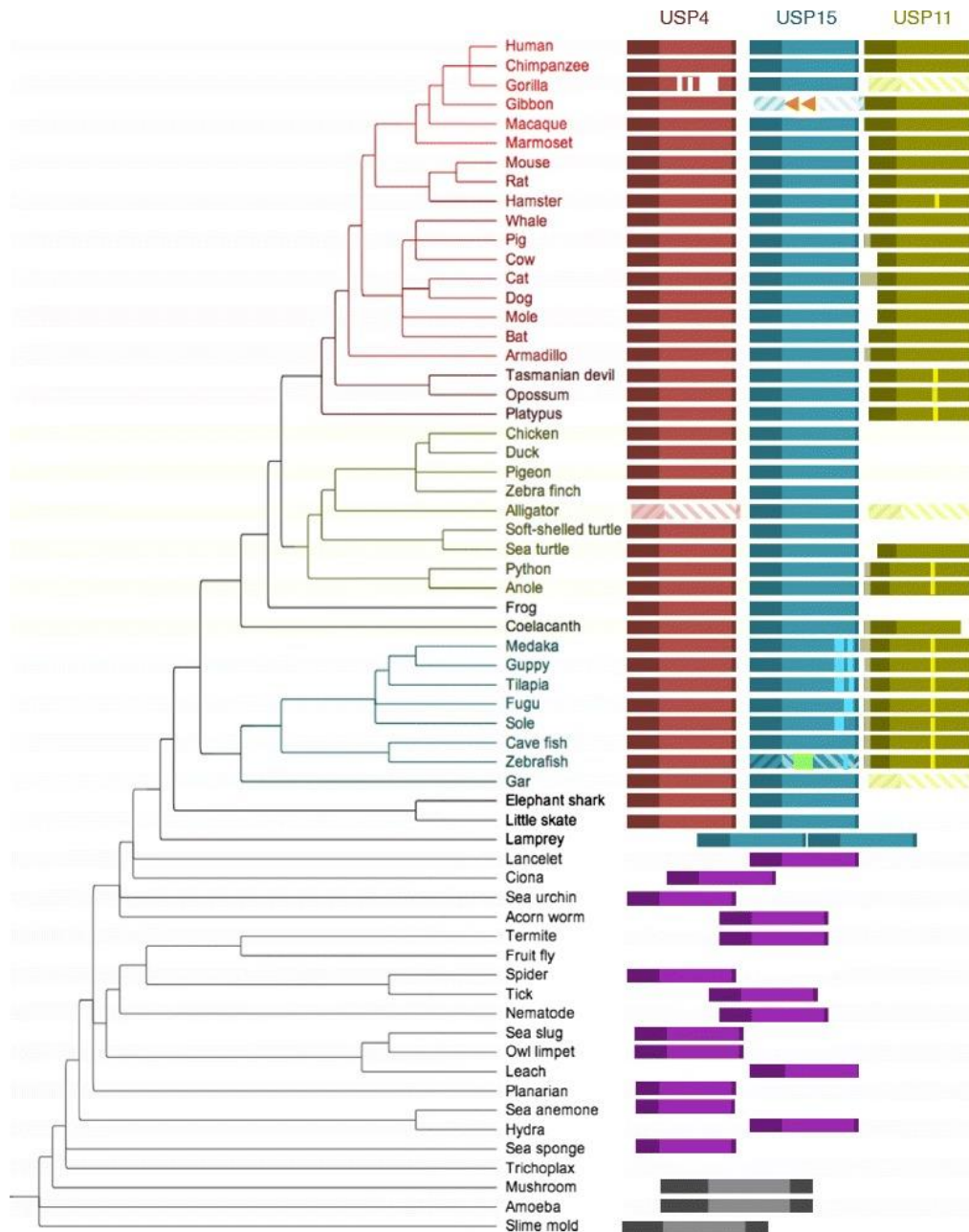


图 2.9 USP4、USP11、USP15 的谱系发育模式图^[237]

尽管在谱系发育过程、序列和结构上具有很高的同源性，USP4、USP15 和 USP11 在各自的结构和空间区域上仍存在独有的分子特征。3 个分子氨基端的 DUSP 和 UBL

结构域有不同的酶动力学模型、能够与不同的蛋白质底物相互作用，进而赋予 USP4、USP15 和 USP11 各自独特的细胞内生物学功能。例如，USP4 的 DUSP-UBL 结构域是以二聚化形式出现的，并且在体内始终保持平衡状态；但是 USP15 和 USP11 都不会在体内呈现 DUSP-UBL 二聚化^[234]。USP4 的 DUSP-UBL 结构域之间还有一段 linker 区域，使得 UBL 可以具备一定的独立运动能力，进而调节催化位点的结合动力学；但是 USP11 由于缺失 linker 区段的关键残基，并不具有这种调节功能^[54, 238]。

2.3.2 USP4 参与的生物学功能

USP4 通过去泛素化调控多个细胞信号通路中的关键蛋白，进而在 DNA 损伤修复、Wnt/ β -catenin 信号通路、TGF- β 信号通路、RIG-I 信号通路和 NF- κ B 信号通路等多个细胞生命活动中发挥重要作用。

2.3.2.1 USP4 与 DNA 损伤修复

2014 年，剑桥大学 Ryotaro Nishi 研究团队通过系统性筛选鉴定出 USP4、USP15 和 USP11 都能够参与调控 DNA 损伤修复过程，但是当时具体的调控机制并未被研究清楚。后来有研究表明，USP4 可以与 DNA 损伤修复、G2/M 细胞周期检查点的关键调控蛋白 CtIP 发生直接相互作用，与 CtIP 和 MRN 复合物形成超级复合物，促进 CtIP 被招募到 DNA 双链断裂位点处，进而启动 DNA 末端切除，从而正向调控同源重组修复通路（图 2.10）。值得注意的是，USP4 不会使 CtIP 发生去泛素化，只是通过直接的蛋白-蛋白相互作用对 CtIP 的细胞定位进行调控，并且 USP4 的自身泛素化会影响其与 CtIP 的相互作用能力^[110, 111]。

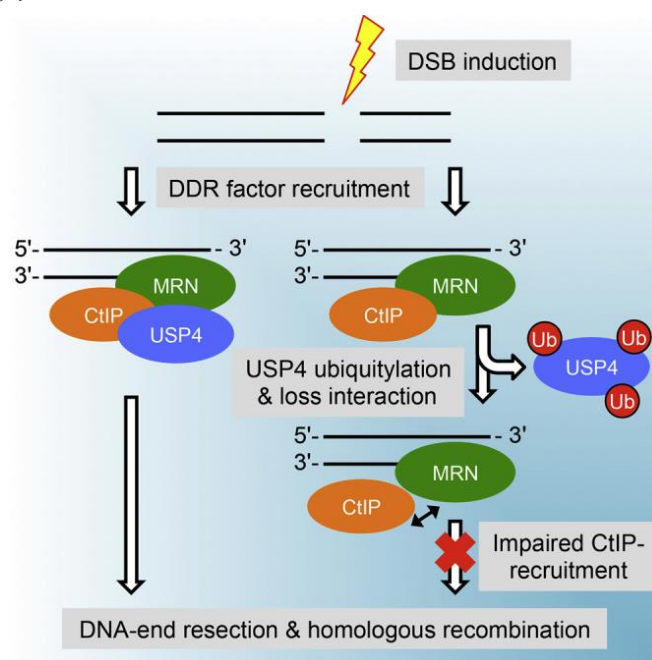


图 2.10 USP4 调控 CtIP 在 DSB 处的募集进而调控 DNA 末端切除^[111]

2.3.2.2 USP4 与 p53 通路

转录因子 p53 能够对细胞应激或各类 DNA 损伤因素作出及时响应, 激活多种下游转录靶标, 调控包括细胞周期阻滞、DNA 损伤修复、细胞代谢、抗血管生成、细胞自噬、衰老以及细胞凋亡在内的多个重要细胞生物学进程, 从而阻止 DNA 受损的细胞进行有丝分裂, 并通过转录调控向这些细胞传导凋亡信号, 最终阻止肿瘤的形成。

作为一个极其重要的肿瘤抑制蛋白, p53 蛋白受到多种翻译后修饰的精密调节, 以严格调控其蛋白质水平、蛋白质稳定性以及亚细胞定位。泛素化和去泛素化修饰过程在 p53 调控机制中起到极为重要的作用。在正常情况下, p53 会受到持续的泛素-蛋白酶体途径降解, 以将该肿瘤抑制蛋白保持在低表达水平状态。在应激或 DNA 损伤压力条件下, 泛素-蛋白酶体途径的降解过程被抑制, p53 蛋白维持稳定状态。目前报道的与 p53 蛋白调节有关的 E3 泛素连接酶已有超过 4 种, 包括 Mdm2、ARF-BP1、COP1 和 Pirh2 等。以最初被报道的 Mdm2 为例, 它可以直接对 p53 蛋白进行泛素化修饰, 促进 p53 的核输出以及泛素-蛋白酶体途径降解。同时, Mdm2 也是 p53 的转录靶标, p53 可以诱导 Mdm2 的表达, 从而构成 p53/Mdm2 反馈环。研究发现, 约 17% 的肿瘤表现出 Mdm2 基因扩增, 导致相应的 p53 水平降低, 这部分肿瘤患者也面临着更差的预后情况。因此, 目前 Mdm2-p53 相互作用已经成为癌症治疗的关键靶标之一^[239-241]。

p53 蛋白的泛素化降解可以被许多 DUBs 所逆转。最早被报道的 p53 去泛素化酶是 USP7, 它能够直接去泛素化 p53 并抑制其蛋白酶体途径的降解进而稳定 p53 蛋白。此外, USP7 还可以与 Mdm2 相互作用并且去泛素化 Mdm2。在正常条件下, USP7 对 Mdm2 具有更高的亲和力并稳定 Mdm2 蛋白; 在 DNA 损伤压力下, 蛋白激酶 ATM 介导 Mdm2 磷酸化, 导致 USP7 的亲和力转换至 p53 这一方, 致使 Mdm2 不稳定、p53 稳定, 最终促进 p53 介导的细胞凋亡或 DNA 损伤修复过程, 这表明 USP7 对于 p53 的调控是一个较为复杂的反馈机制^[160, 167, 168, 203, 204, 242, 243]。

USP4 可以直接与 p53 的 E3 泛素连接酶 ARF-BP1 相互作用, 去泛素化并稳定 ARF-BP1, 从而导致 p53 的泛素化降解。研究发现, USP4 敲除小鼠的胚胎成纤维细胞表现出细胞凋亡增强、细胞生长减少和过早衰老的表型, 与 p53 水平升高呈现出一致趋势^[244]。但是也有研究表明, USP4 可以直接与 HDAC2 相互作用, 去泛素化并稳定 HDAC2; 而作为重要的去乙酰化酶, HDAC2 抑制 p53 的乙酰化水平, 进而抑制 p53 的激活和下游生物学效应, 这意味着 USP4 也可以通过去泛素化 HDAC2 抑制 p53 的转录激活以及 DNA 损伤后的细胞凋亡等过程^[222, 244]。

2.3.2.3 USP4 与 NF- κ B 通路

NF- κ B 信号通路在调控免疫炎症反应、细胞增殖分化和细胞凋亡方面发挥重要作用, USP4 已被报道能够通过去泛素化 NF- κ B 通路的多个关键蛋白, 广泛参与到调控

NF- κ B 通路的过程中。

TRAF2、TRAF6 和 TAK1 是 NF- κ B 的重要调控蛋白。TAK1 的 K63 连接多聚泛素化可以激活 I κ B 激酶，介导 TNF α 激活，最终促进 TNF α 诱导的 NF- κ B 信号通路，而这一过程可以被 USP4 逆转。USP4 能够水解 TAK1 的 K63 类型多聚泛素链，下调 TAK1 蛋白活性，从而抑制 TNF α 诱导的 NF- κ B 信号传导。TRAF2 和 TRAF6 的 K63 类型多聚泛素化对其在 TNF α 和 IL-1 β 诱导的 NF- κ B 激活中至关重要。研究发现，USP4 与 TRAF2 和 TRAF6 特异性相互作用并对二者进行去泛素化，最终负向调控 TNF α 和 IL-1 β 诱导的 NF- κ B 信号通路^[63, 245-248]。

此外，USP4 还可以通过 RIP1 蛋白调控 NF- κ B 信号通路。RIP1 经过 K63 多聚泛素化以后可以作为 TAK1 激酶的结合支架，促进 TNF α 诱导的 NF- κ B 信号传导。USP4 可以去除 RIP1 的 K63 连接多聚泛素化，进而负向调节 RIP1 介导的 NF- κ B 活化。此外，USP4 还可以通过去泛素化 HDAC2 进而影响 p65 的乙酰化修饰，最终负向调节 NF- κ B 通路^[64, 222]。

随着研究的深入，USP4 在 NF- κ B 通路中显示出复杂、多样的功能，可以在不同的情况下引发宿主的抗炎或促炎应答（图 2.11）。除了被广泛报道的负向调控 NF- κ B 通路，USP4 还可以通过去除 TRAF6 的 K48 连接多聚泛素化，正向调节 RLR 诱导的 NF- κ B 信号通路^[223]。

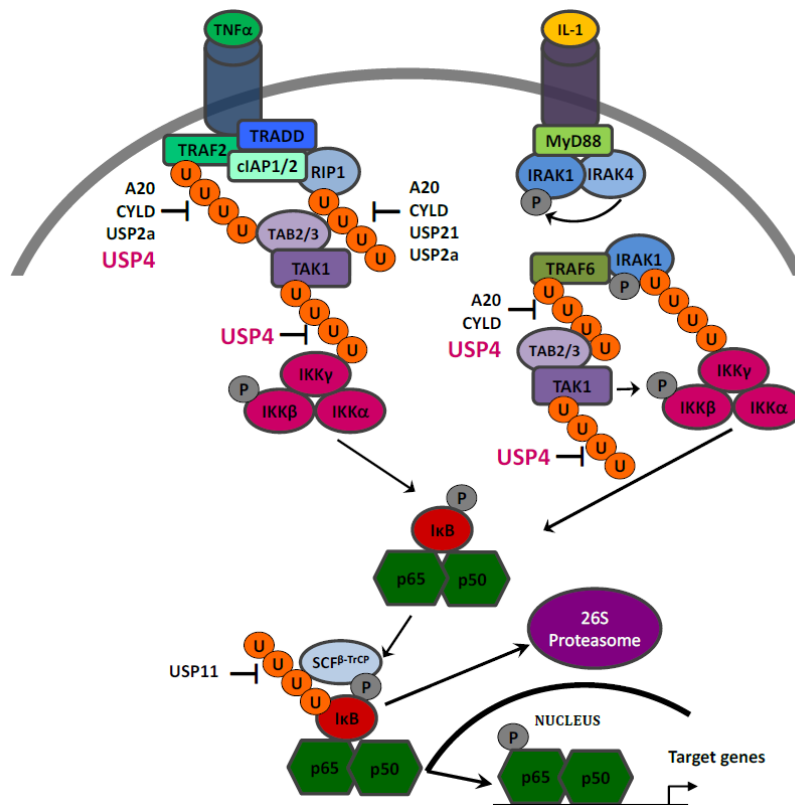


图 2.11 USP4 参与调控 NF- κ B 通路细胞内信号传导过程^[249]

2.3.2.4 USP4 与 Wnt/ β -catenin 通路

Wnt/ β -catenin 信号通路是一类在物种进化过程中高度保守的信号通路，在胚胎早期发育、器官形成、组织再生等生理过程中发挥着至关重要的作用。Wnt/ β -catenin 信号通路的关键蛋白的突变以及异常激活经常在肿瘤发生过程中同时存在，并能够和 TGF- β /BMP、Notch、Hippo 等其他信号通路在胚胎发育、组织再生和肿瘤形成等方面相互作用并进行协同调控^[250]。

在没有 Wnt 信号刺激时，细胞质内大部分的 β -catenin 与细胞膜上 Cadherin 蛋白结合，使之附着于细胞骨架蛋白肌动蛋白上，参与细胞的黏附过程；小部分的 β -catenin 被磷酸化后，与 GSK3 β 等蛋白形成降解复合物，经由泛素-蛋白酶体途径降解。当分泌型配体蛋白 Wnt 与膜表面受体蛋白 FZD 结合后，Wnt 信号传导启动，激活胞内蛋白 DVL。DVL 能够抑制 β -catenin/GSK3 β 降解复合物的降解活性，稳定细胞质中的游离 β -catenin。胞浆中稳定积累的 β -catenin 进入细胞核后可以结合 LEF/TCF 转录因子家族，启动下游 T 细胞因子（TCF）和淋巴增强因子（LEF）以及 c-Myc、Cyclin D1。等靶基因的转录调控^[251, 252]。

研究表明，USP4 可以直接与 NLK 相互作用并转移到细胞核，与核转录因子 TCF4 相互作用并去泛素化 TCF4 以抑制其转录活性，从而负向调控 Wnt/ β -catenin 信号通路^[253]。与此相反的是，USP4 还可以通过去泛素化 β -catenin，正向调控 Wnt/ β -catenin 信号通路。磷酸化的 β -catenin 可以被 F-box 家族的 E3 泛素连接酶 β TrCP 识别，并通过泛素-蛋白酶体途径降解；而 USP4 可以对 β -catenin 进行去泛素化，增强 β -catenin 的稳定性和并促进 β -catenin 转移到细胞核，正向调控 Wnt/ β -catenin 信号传导(图 2.12)^[58]。

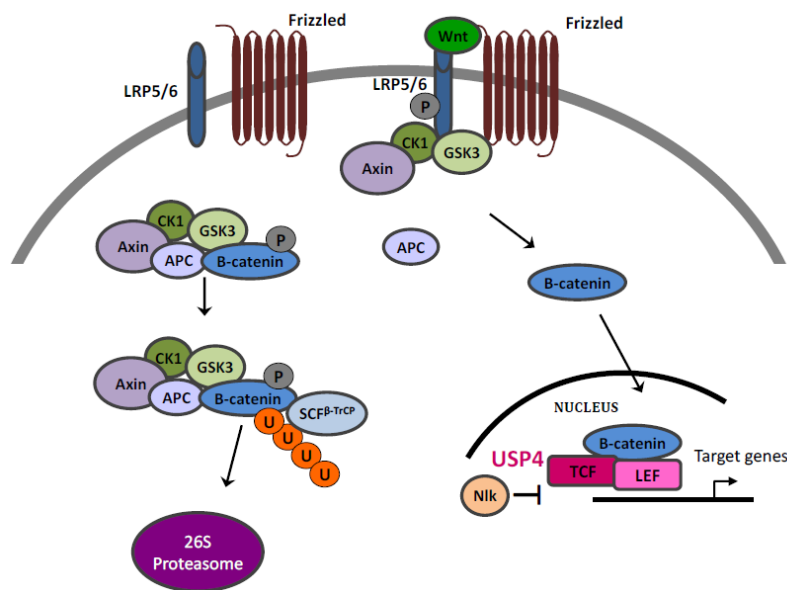


图 2.12 USP4 参与调控 Wnt/ β -catenin 通路细胞内信号传导过程^[249]

2.3.2.5 USP4 与 TGF- β 通路

TGF- β 信号通路参与调控细胞增殖分化、细胞粘连与迁移、胞外基质合成与重塑、EMT 以及细胞凋亡等多个重要的细胞生物学活动，该信号通路的失调与恶性肿瘤、心血管疾病、组织纤维化和自身免疫疾病等多种人类疾病密切相关。

TGF- β 家族可以分为 TGF- β 配体和 BMP 配体两个亚家族，TGF- β 共有 5 种异构体，即 TGF- β 1/2/3/4/5，TGF- β 受体(T β R)按照结构和功能特性可分为 T β RI、T β RII和 T β RIII；TGF- β 通路的下游信号分子主要是 Smad 蛋白，Smad 也可以进一步分为受体调节型 (Smad1/2/3/5/8/9)、共介导型 (Smad4) 和抑制型 (Smad6/7) 3 种类型。TGF- β 信号转导起始于配体诱导的丝氨酸/苏氨酸受体激酶寡聚化和胞浆信号转导分子的磷酸化，这些信号转导分子在 TGF- β /活化素通路中是 Smad2 和 Smad3，而在 TGF- β /BMP 通路中则是 Smad1/5/9。Smads 的羧基端被活化受体磷酸化后可以与 Smad4 结合并转运入细胞核，激活的 Smads 可通过与转录因子结合调节各种不同的生物学效应^[254, 255]。

Smurf1/2、WWP1 和 NEDD4-2 等 E3 泛素连接酶都能对 T β RI 进行泛素化修饰，并通过泛素-蛋白酶体途径降解 T β RI 分子^[189]。USP4 能够通过直接结合 T β RI 并对其去泛素化，拮抗 T β RI 的泛素-蛋白酶体途径降解以稳定 T β RI 的表达，从而正向调节 TGF- β 通路。USP4 本身是核定位蛋白，而 T β RI 分布于细胞膜，USP4 的出核入膜过程依赖于 Akt 对 USP4 的磷酸化修饰，提示 PI3K/Akt 通路的异常激活可能会重新定向 TGF- β 的细胞内信号传导，从而有助于其从肿瘤抑制因子转变为肿瘤促进因子^[154, 190]。此外，USP4 还可以通过调控 Smad4 影响 TGF- β 通路。Smad4 可以被其 E3 泛素连接酶 Smurf2 单泛素化修饰，而单泛素化会抑制 Smad4 的蛋白活性进而抑制 Smad4 下游的信号传导。USP4 可以拮抗 Smurf2 对 Smad4 的单泛素化修饰，直接去泛素化 Smad4 并进一步激活下游的 TGF- β /活化素通路以及 BMP 信号通路 (图 2.13) ^[55]。

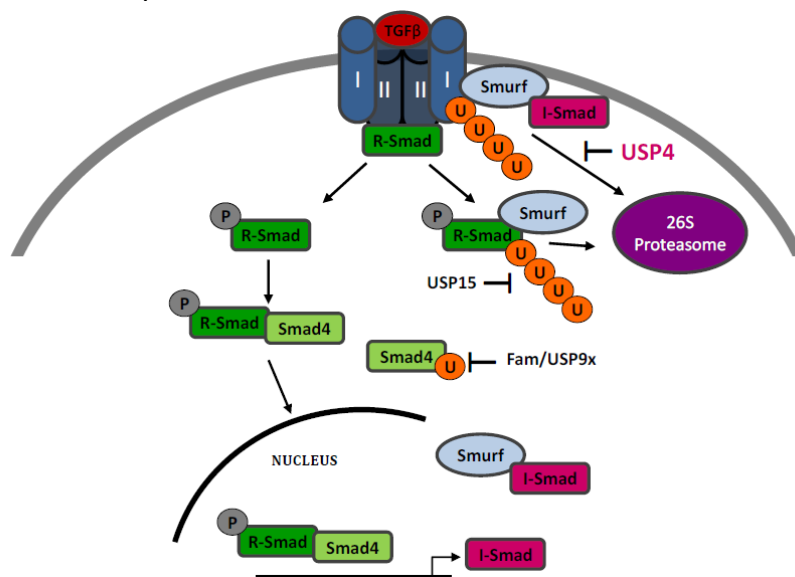


图 2.13 USP4 参与调控 TGF- β /SMAD 通路细胞内信号传导过程 ^[249]

2.3.2.6 USP4 参与的其他生物学功能

机体抗病毒感染免疫应答涉及多种信号传导通路，感染机体的病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) 可被 Toll 样受体 (Toll like receptors, TLR)、RIG-I 样受体 (RIG-I-like receptors, RLRs) 等关键受体识别，启动机体抗病毒感染免疫反应，发挥抗病毒感染和维持免疫稳态的作用。

RIG-I 样受体包括 RIG-I、MDA5 和 LGP2，此类受体是一种可以检测病毒 RNA 的胞浆 RNA 解旋酶，RIG-I 或 MDA5 分子结构类似，都是由氨基端的 CARDs 结构域、中间的 DECH 解旋酶结构域以及羧基端的 RD、CTD 结构域构成。

RIG-I 在无病毒感染的情况下一直处于自身抑制状态，RNA 病毒感染机体时，RIG-I 的 CTD 结构域可以识别并结合病毒 RNA，促使 RIG-I 构象改变并释放 CARDs 结构域，CARD 结构域之间的相互作用可以招募位于线粒体外膜的 MAVS 蛋白，MAVS 以接头蛋白的形式促进级联信号传递，导致下游的 IRF3、IRF7、NF- κ B 和 AP-1 等转录因子被磷酸化并活化，最终导致 I 型干扰素、促炎细胞因子表达上调以对抗病毒感染。

USP4 同样也可以通过对 RIG-I 信号通路中的重要蛋白进行去泛素化调控，进而参与到机体抗病毒感染的天然免疫应答过程中 (图 2.14)。研究发现，USP4 能够直接去除 RIG-I 的 K48 类型多聚泛素链并稳定 RIG-I 蛋白，促进 RIG-I 触发的 β 干扰素信号通路，进而正向调控细胞的抗病毒感染免疫应答^[60, 223]。

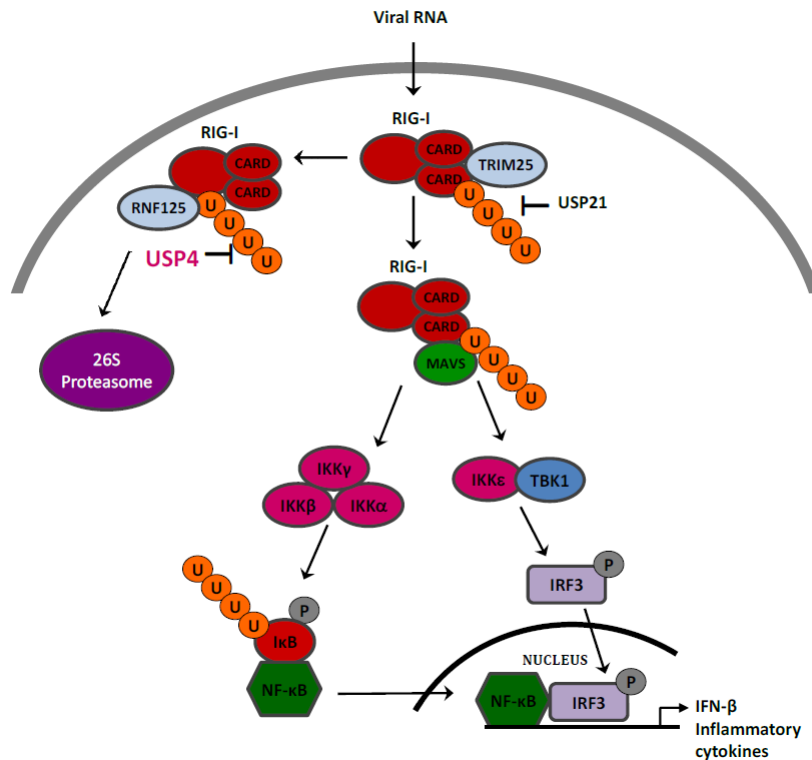


图 2.14 USP4 参与调控 RIG-I 介导的抗病毒感染免疫应答过程^[249]

USP4 在 mRNA 剪接过程中也发挥着重要作用, 多项研究报道称 USP4 可以通过调控 mRNA 剪接过程中的不同关键蛋白, 正向调控 mRNA 剪接过程。mRNA 剪接是基因转录、蛋白质合成过程的关键步骤之一, 在此过程中 mRNA 前体 (pre-mRNA) 经由剪接体移除非编码内含子、拼接外显子, 最终形成成熟 mRNA。剪接体的主要功能模块是一系列小核核糖核蛋白复合物 (snRNPs), 包括 U1、U2、U4、U5 和 U6 snRNPs。snRNPs 和 SF1、U2AF、Prp3、Prp19 复合物等 mRNA 剪接相关蛋白有序聚集在 pre-mRNA 基础上, 依次形成前剪接体 E、A、B 以及 C 复合物并最终形成成熟 mRNA^[256-258]。pre-mRNA 首先被 U1 snRNP 识别, 形成前剪接体 E 复合物; 早期复合物与 U2 snRNP 结合进一步形成前剪接体 A 复合物; 后者与预先组装好的 U4/U6.U5 三联体复合物结合, 形成前体剪接体 B 复合物; 随后 U1 和 U4 snRNP 从复合物中释放出来, 5' 剪接位点被剪接, 形成 C 复合物; 后续酶促反应促进可变剪接过程, 最终形成成熟的 mRNA。此时剪接体被分解, 其成分被回收用于后续的剪接, 这意味着剪接体组成成分在 mRNA 剪接过程中经历着循环利用, 相关蛋白质和 RNA 在剪接反应的特定阶段经历结合后又解离, 泛素化和去泛素化过程对于剪接体成分的快速变化进行着严格且精密的调控^[259-261]。

研究表明, 剪接体 Prp19 复合物可以对 U4 snRNP 的组成成分 Prp3 进行 K63 连接泛素化修饰, 而该泛素化修饰增加了 Prp3 对 U5 snRNP 组成成分 Prp8 的亲和力, 从而使 U4/U6.U5 snRNP 三联体复合物保持稳定。此外, USP4 可以与 Sart3 相互作用, 紧接着, USP4 在 Sart3 的帮助以及 USP4 核定位序列 (NLS) 的指引下进入细胞核, USP4/Sart3 共同将 Prp3 的 K63 连接多聚泛素链去除, 使 Prp3 能够从剪接体解离并释放, 让剪接反应得以循环进行, 因此正向调节剪接体的活性, 促进 pre-mRNA 剪接过程^[61]。此外, USP4 还可以直接去泛素化 RNPS1, 进而促进剪接位点的选择并激活 pre-mRNA 剪接过程^[62]。

2.3.3 USP4 与肿瘤发生发展的关系

癌症的发生是一个多因素、多阶段、多基因变异积累的复杂过程, 由多种信号通路共同调控。USP4 能够直接调节或通过 DUB 催化活性调节诸多肿瘤相关信号通路的关键蛋白, 越来越多的研究表明 USP4 可以参与到肿瘤的发生发展过程。USP4 在癌症中的基因突变以及表达失调已被多项研究广泛报道, 就现有研究成果看, USP4 作为原癌基因和抑癌基因的情况都有发生, 这可能与癌症的类型、阶段以及 USP4 在癌种中的主要蛋白质底物及其参与的肿瘤相关信号通路有关。

在 cBioPortal 肿瘤数据库中列示的 202 项癌症研究中, USP4 的基因突变或拷贝数异常出现在超过 186 项癌症研究中 (92%), USP4 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤、肾细胞癌、乳腺癌、皮肤鳞状细胞癌、黑色素瘤等癌症类型中的异常表达频率均超过 10%, 且异

常表达类型均以基因突变和拷贝数下调为主。相反,在结直肠癌、甲状腺癌、前列腺癌等癌症类型中,USP4 呈现出表达上调的状态。研究 USP4 与其蛋白质底物的相互作用、USP4 发挥其 DUB 功能调控各种肿瘤相关的细胞活动,可以为进一步明确 USP4 在不同癌症类型中呈现出促癌或抑癌能力的现象提供更为有利的理论证据。

对于乳腺癌,USP4 的功能较为复杂,一方面可以通过调控一些促癌或抑癌因子进而调控乳腺癌发生;另一方面,USP4 也可以通过调控 TGF- β 通路以及上皮间质转化等过程促进乳腺癌的侵袭转移。程序性细胞死亡因子 4 (PDCD4) 是一种肿瘤抑制因子,可以通过抑制 c-Jun 激活进而抑制 AP-1 依赖的转录调控,最终抑制肿瘤发生。有研究发现 USP4 可以通过上调 PDCD4 的表达水平,抑制乳腺癌发生。相比于正常组织,USP4 在乳腺癌肿瘤组织中显著下调。此外,USP4 还可以通过与 CtIP 相互作用并促进其在 DNA 损伤位点处的招募,促进同源重组修复,从而发挥抑制肿瘤发生的功能。大规模乳腺癌患者 Kaplan-Meier 生存曲线分析显示,USP4 低表达的乳腺癌患者具有显著更差的预后状况。相反,也有研究表明 USP4 可以直接去泛素化并稳定 HDAC2 和 ARF-BP1 进而负向调控 p53,而呈现出潜在的致癌风险。USP4 可以直接与 T β RI 相互作用并去泛素化 T β RI,促进 TGF- β 诱导的上皮间质转化和肿瘤转移过程^[65, 154, 222, 244, 262, 263]。

USP4 在结直肠癌中展现出致癌潜力。USP4 可以对 β -catenin 进行去泛素化,增强 β -catenin 的稳定性,正向调控 Wnt/ β -catenin 信号传导过程。结肠癌患者的肿瘤组织中也呈现出 USP4 和 β -catenin 蛋白表达水平升高,并且二者具有正向相关关系。此外,USP4 可以拮抗 RNF152 对 Rheb 的泛素化修饰,从而调控 mTORC1 感应肿瘤微环境中生长因子的信号传导过程,并且 USP4 的非特异性抑制剂 Vialinin A 可以抑制结直肠癌的生长。也有研究表明,USP4 通过与 PRL-3 相互作用,去泛素化 PRL-3 并使其稳定,进而导致 Akt 通路激活,促进结直肠癌的生长、侵袭和转移^[58, 187, 264]。

USP4 在肺腺癌、非小细胞肺癌等多种类型的肺癌中起到抑制肿瘤发生、抑制肿瘤侵袭迁移的作用。USP4 可以通过去除 TRAF2 和 TRAF6 的 K63 类型多聚泛素化,负向调控 TNF α 和 IL-1 β 诱导的 NF- κ B 信号通路;也可以去泛素化 TAK1 的 K63 类型多聚泛素链,下调 TAK1 蛋白活性,从而抑制 TNF α 诱导的 NF- κ B 信号传导,进而抑制肺癌发生和转移。有研究通过分析 TCGA 数据库发现,USP4 mRNA 水平在肺癌组织中显著下调,针对大规模肺癌患者的生存分析也证实了 USP4 高表达患者具有显著更好的预后情况^[59, 65, 247]。

USP4 在头颈鳞状细胞癌中起到肿瘤抑制作用。RIP1 经过 K63 多聚泛素化修饰以后可以作为 TAK1 激酶的结合支架,促进 TNF α 诱导的 NF- κ B 信号传导。USP4 可以去掉 RIP1 的 K63 连接多聚泛素链,进而负向调节 RIP1 介导的 NF- κ B 通路活化^[64]。

有研究发现,USP4 在食管癌肿瘤组织中的表达高于癌旁组织。然而,USP4 高表

达的食管癌患者却拥有更长的总生存期，在食管癌的小直径肿瘤（直径 $\leq 5\text{cm}$ ）和早期肿瘤亚组中，USP4 高表达的患者也有较好的生存表现^[64]。另有研究报道，在胶质母细胞瘤细胞中敲低 USP4 可以抑制 T β RI/p-Smad2 介导的经典 TGF- β 信号通路以及 T β RI/p-ERK1/2 介导的非经典 TGF- β 信号通路，进而阻碍细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡。在胶质母细胞瘤的肿瘤组织中，USP4 表达水平显著上调，并且 USP4 与胶质母细胞瘤患者的不良预后密切相关^[265]。

2.3.4 USP4 未来研究方向

越来越多的研究表明，USP4 对蛋白质底物的调控是一个复杂而动态的过程，所以 USP4 在 DNA 损伤应答、p53 调控通路、Wnt/ β -catenin 通路、TGF- β 通路、RIG-I 通路和 NF- κ B 通路以及细胞凋亡等多种细胞生命活动进程中发挥着重要而复杂的功能。USP4 通过这些细胞生物学功能与多种类型的恶性肿瘤、免疫性疾病、病毒感染性疾病、慢性纤维化疾病以及代谢性疾病密切相关。

USP4 未来研究的第一个挑战便是将已知的细胞生物学功能与临床实际情况相联系。目前已被报道的 USP4 相互作用蛋白以及去泛素化蛋白质底物已超过 10 种，能够去除的泛素化修饰类型也呈现出多样性，所以体现为 USP4 能够直接或间接参与协调多个重要的信号传导通路与细胞活动。但是，USP4 在以上细胞生物学过程中的作用在不同疾病、同一种疾病的不同阶段的重要程度、功能活性并不相同，这可能导致了 USP4 最终呈现出功能的复杂性、甚至是矛盾性。例如 USP4 既能促进又能抑制 NF- κ B 通路，进而可能在不同的情况下引发宿主的抗炎或促炎免疫应答；USP4 既能促进又能抑制 TGF- β 信号通路，进而在不同的诱导因素下促进或抑制上皮间质转化和肿瘤转移；USP4 既能促进又能抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路，进而正向或负向调控组织再生和肿瘤形成等过程；更重要的是，USP4 在肿瘤发生发展过程中也展现出促癌和抑癌两种潜力，在不同的肿瘤类型中其表达水平与预后风险也呈现出正向或负向的相关关系。这意味着在分析特定的疾病或细胞生命过程时，需要分析和理解 USP4 及其靶蛋白之间的相互作用以及去泛素化调控过程对于这些蛋白质的表达水平、细胞内定位以及功能活性有何影响，这些细胞和分子水平的研究将有助于理解 USP4 在疾病发生和进展过程中的意义。

现有研究已经证实 USP4 是一个核质穿梭蛋白，多数情况下定位于细胞核中，在受到磷酸化修饰以后可以从细胞核定位到细胞质或细胞膜处，并与相应靶蛋白相互作用，调控在细胞质或细胞膜中进行的细胞活动。研究表明，USP4 参与的 TGF- β 信号通路、PI3K/Akt/mTOR 通路、Wnt/ β -catenin 信号通路主要在细胞质和细胞膜进行，而 DNA 损伤修复和细胞周期调控过程主要在细胞核进行，加之 USP4 本身是一个核定位蛋白。那么，在什么情况下 USP4 会进行核质穿梭？哪些分子能够调控 USP4 的核质穿梭？USP4

如何进行核质穿梭？这些问题都是 USP4 的未来研究中可以进一步探究的方向。目前研究表明，在乳腺癌细胞的细胞质和细胞膜中存在磷酸化的 USP4，Akt 使 USP4 发生磷酸化修饰，磷酸化的 USP4 倾向于从细胞核输出到细胞质，发挥其去泛素化能力。例如，Akt 介导的 USP4 磷酸化可以去除 Rheb 的泛素化并使 Rheb 稳定，从而激活 mTOR1 介导的信号通路，影响肿瘤生长；同样的，Akt 介导 USP4 的 445 丝氨酸位点磷酸化，促使 USP4 从细胞核转移至细胞膜和细胞质，使得 USP4 能够结合细胞膜中的 T β RI 并对其去泛素化，进而稳定 T β RI，最终正向调节 TGF- β 诱导的 EMT、细胞侵袭迁移等过程^[154, 187]。此外，CDKs 也参与 USP4 磷酸化和细胞内定位转移过程，CDKs 抑制剂 purvalanol A 可以阻碍 USP4 的核质穿梭过程，与 USP4 高度同源的 USP15 也具备类似的 CDKs 依赖性磷酸化特征。USP4 的去磷酸化状态会导致其在细胞核内积累，从而增强其与 Sart3 的相互作用，USP4/Sart3 复合物可以去泛素化剪接体亚基 Prp3，促进 Prp3 从剪接体解离，从而使得剪接反应得以循环进行，促进 pre-mRNA 剪接过程^[61]。

2.4 BRCA1 蛋白概述

BRCA1 在上世纪 90 年代被确认为一个重要的乳腺癌抑癌基因，定位于人类第 17 号染色体上，该基因编码的乳腺癌抑癌蛋白 BRCA1 是一个约 220Kd 的大分子蛋白。研究表明，BRCA1 突变携带者患乳腺癌的终生风险超过 80%，患卵巢癌的终生风险为 40-65%，与没有 BRCA1 突变的个体相比，BRCA1 突变携带者患乳腺癌、卵巢癌的风险分别增加了 7、20 倍^[266-268]。

BRCA1 通过其 RING 结构域与 BARD1 形成异源二聚体，通过 BRCT 结构域与 Abraxas、BACH1、MRN/CtIP 复合物等多种分子构成蛋白复合体，在机体内多种生物学过程的不同阶段、不同层次上进行调控，参与同源重组途径的 DNA 损伤修复、DNA 损伤诱导下的 S 期以及 G2/M 期细胞检验点调控、应激压力下的复制叉保护、细胞有丝分裂、染色质重塑以及转录调控等过程，进而维持机体基因组的稳定性和完整性，抑制乳腺癌及卵巢癌的发生。人体内超过 70% 的 BRCA1 蛋白不是以单体形式游离存在，而是以 BRCA1/BARD1 异源二聚体的形式存在。一方面，BRCA1/BARD1 异源二聚体可以稳定彼此，避免 BRCA1 或 BARD1 经由泛素-蛋白酶体途径被降解；另一方面，BRCA1/BARD1 以整体形式发挥 E3 泛素连接酶的功能，参与到同源重组修复在内的多个重要细胞活动^[21, 268-271]。

2.4.1 BRCA1 分子结构与特性

BRCA1 蛋白共含有 1863 个氨基酸，由氨基端的 RING 结构域、NLS 结构域，羧

基端的 Coiled-coil 结构域和 BRCT 结构域等多个功能域构成^[15, 272]。

(1) BRCT 结构域

BRCA1 的 BRCT 结构域是由 2 段重复 BRCT 序列串联形成, 该区域的疏水性氨基酸构成一个磷酸化肽结合结构域, 能够识别 p-SPxF 基序, 介导 BRCA1 与多种含 p-SPxF 结构的磷酸化蛋白的相互作用, 形成不同的 BRCA1 功能复合物并参与到 DNA 损伤修复、复制叉调控等多个重要的细胞生命活动中 (图 2.15)。目前已有大量研究发现 BRCT 结构域对 BRCA1/BARD1 异源二聚体的肿瘤抑制活性非常重要, 乳腺癌的临床实践也进一步证实了 BRCT 结构域是 BRCA1 基因突变的高发区域^[273-275]。

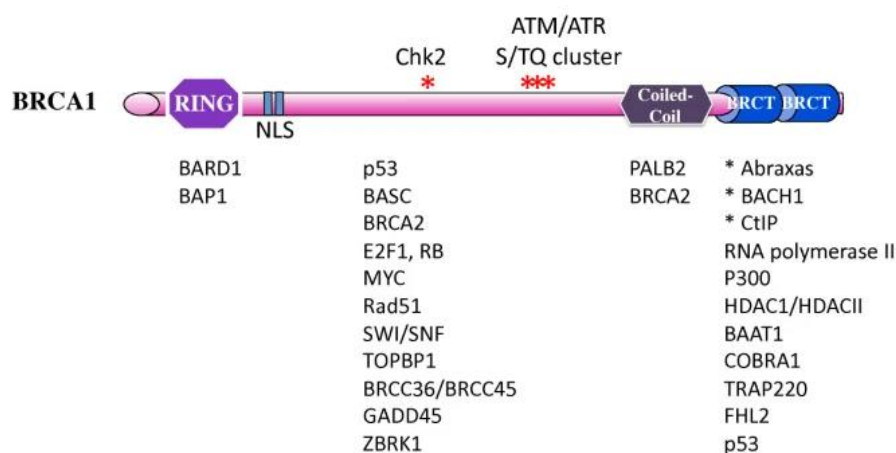


图 2.15 BRCA1/BARD1 异源二聚体分子结构模式图^[19]

BRCT 结构域能够介导 BRCA1 分子与 Abraxas、BACH1 以及 CtIP 等分子相互作用并形成 BRCA1-A、B、C 复合体, 这三种 BRCA1 复合物参与了多种 BRCA1 相关的肿瘤抑制功能 (图 2.16)。

BRCA1-A 复合物包含由 BRCA1、Abraxas、BRCC36、RAP80、Merit40/NBA1 以及 BRE 共同构成, 其中 Abraxas 一边通过其羧基末端的磷酸丝氨酸基团与 BRCA1 的 BRCT 结构域相互作用, 另一边与 RAP80 等分子相互作用, 充当 BRCA1-A 复合物的桥梁蛋白。DNA 发生双链断裂损伤后, ATM/ATR 诱导组蛋白 H2AX 在丝氨酸 139 位点磷酸化, 直接通过 MDC1 的 BRCT 结构域招募 MDC1。MDC1 本身也是 ATM/ATR 的底物, 其磷酸化导致 UBC13/RNF8/RNF168 陆续募集到 DNA 损伤位点, 介导受损染色质上组蛋白的一系列泛素化事件, 最终导致 BRCA1 和 53BP1 等 DNA 损伤修复蛋白定位于 DSB 处, 启动 DNA 修复过程。以 BRCA1 为例, BRCA1-A 复合物成员 RAP80 通过其 UIM 结构域与泛素化的组蛋白 H2AX 相互作用, 从而介导 BRCA1 定位到 DSB 处^[124, 276-281]。

BRCA1-B 复合物是 BRCA1 的 BRCT 结构域和 BACH1 的磷酸化丝氨酸 990 位点

相互作用形成的，BRCA1 和磷酸化 BACH1 之间的特异性相互作用受 CDKs 调控，呈现细胞周期依赖性。一方面，BACH1 是细胞 S 期和 G2 检验点的重要调控因子；另一方面，BACH1 与 TopBP1 的相互作用是细胞响应复制压力、启动复制检查点所不可或缺的。因此，BRCA1-B 复合物在细胞周期从 G2 期向 M 期过渡以及 DNA 损伤诱导的检查点控制过程中均起到调控作用^[282-285]。

BRCA1-C 复合物由 BRCA1 和 CtIP、MRN 复合物组成。CtIP 是同源重组修复的初始步骤 DNA 末端切除所必需的分子，CtIP 在 DNA 损伤位点处的定位以及 DNA 末端切除功能的发挥均依赖于 BRCA1-C 复合物成员之间的协调合作。MRN 复合物与 CtIP 的相互作用介导 CtIP 募集到 DSB 处，BRCA1 对 CtIP 的泛素化也能促进 CtIP 被招募到 DSB 处。紧接着，MRN 复合物的核酸酶活性帮助 CtIP 进行 DNA 末端切除形成 3'-ssDNA^[286-289]。

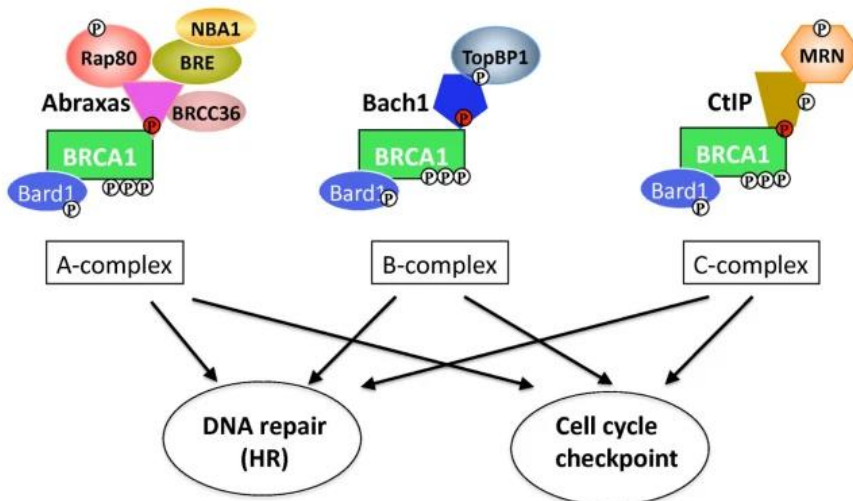
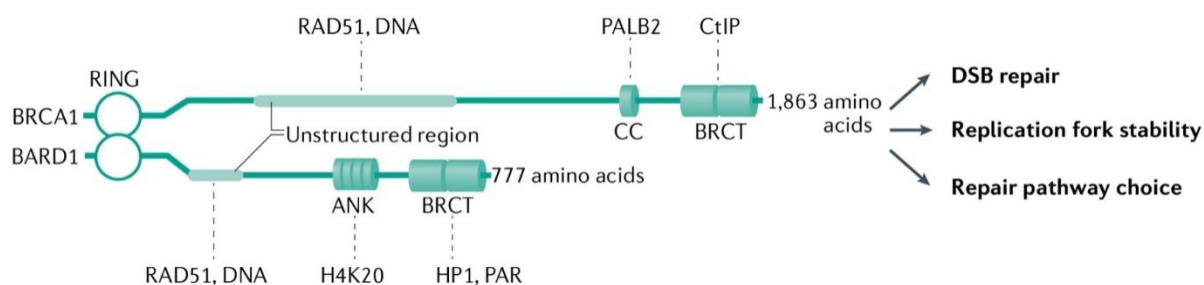


图 2.16 BRCA1-A/B/C 复合体在细胞周期检验点和 DNA 损伤修复发挥作用^[19]

(2) RING 结构域

BRCA1/BARD1 异源二聚体是机体内 BRCA1 蛋白的主要存在形式，占体内 BRCA1 蛋白总量的 70% 以上。BRCA1 和 BARD1 的氨基端各有一个 RING 结构域，该结构域介导 BRCA1 与 BARD1 相互作用形成二聚体，也是 BRCA1 发挥 E3 泛素连接酶催化活性不可或缺的结构域（图 2.17）^[16-20, 270, 290]。

图 2.17 BRCA1/BARD1 异源二聚体分子结构模式图^[291]

BRCA1/BARD1 可以与 UBC4 等多种 E2 泛素结合酶相互作用,对特定的蛋白质底物进行 K6 连接、K48 连接或 K63 连接的泛素化修饰,发挥 E3 泛素连接酶作用。值得注意的是, BRCA1/BARD1 相互作用形成二聚体时, BRCA1 的 E3 泛素连接酶活性会显著增强^[292-295]。

2.4.2 BRCA1 的生物学功能

BRCA1 分子能够通过参与同源重组途径的 DNA 损伤修复、DNA 损伤诱导下的 S 期以及 G2/M 期细胞检验点调控、应激压力下的复制叉保护、细胞有丝分裂、染色质重塑以及转录调控等过程,维持机体基因组的稳定性和完整性。下面以同源重组途径的 DNA 损伤修复为例,介绍 BRCA1 及其功能复合物在此过程中的具体调控机制。

DNA 在各类损伤因素的作用下发生双链断裂时,组蛋白 H2A 被 ATM/ATR 磷酸化,进而招募 MDC1, MDC1 的磷酸化导致 RNF8/RNF168 募集到 DNA 损伤位点并介导组蛋白的一系列泛素化事件。RAP80 的 UIM 结构域与泛素化 H2A 组蛋白相互作用,导致 BRCA1 以及 MRN 被招募到 DNA 损伤位点处,并协调 CtIP/MRN 复合物进行 DNA 末端切除形成 ssDNA。在 PALB2/BRCA2/DSS1 复合物的作用下,ssDNA 尾部被 RPA 包裹并保护起来, RPA 随后被重组酶 Rad51 取代。同时, BRCA1/BARD1 增强了 Rad51-ssDNA 核蛋白复合物捕获同源双链 DNA 的能力,紧接着启动链侵入过程,从而产生置换环(D-loop)。DNA 聚合酶介导 DNA 的合成,经扩展的 D-loop 可以经由合成依赖性单链退火(SDSA)、典型双链断裂修复(DSBR)、双霍利迪结构(dHJ)和断裂诱导的 DNA 复制(BIR)等四种不同的途径解聚,至此完成同源重组途径的 DNA 损伤修复(图 2.18) ^[269, 296, 297]。

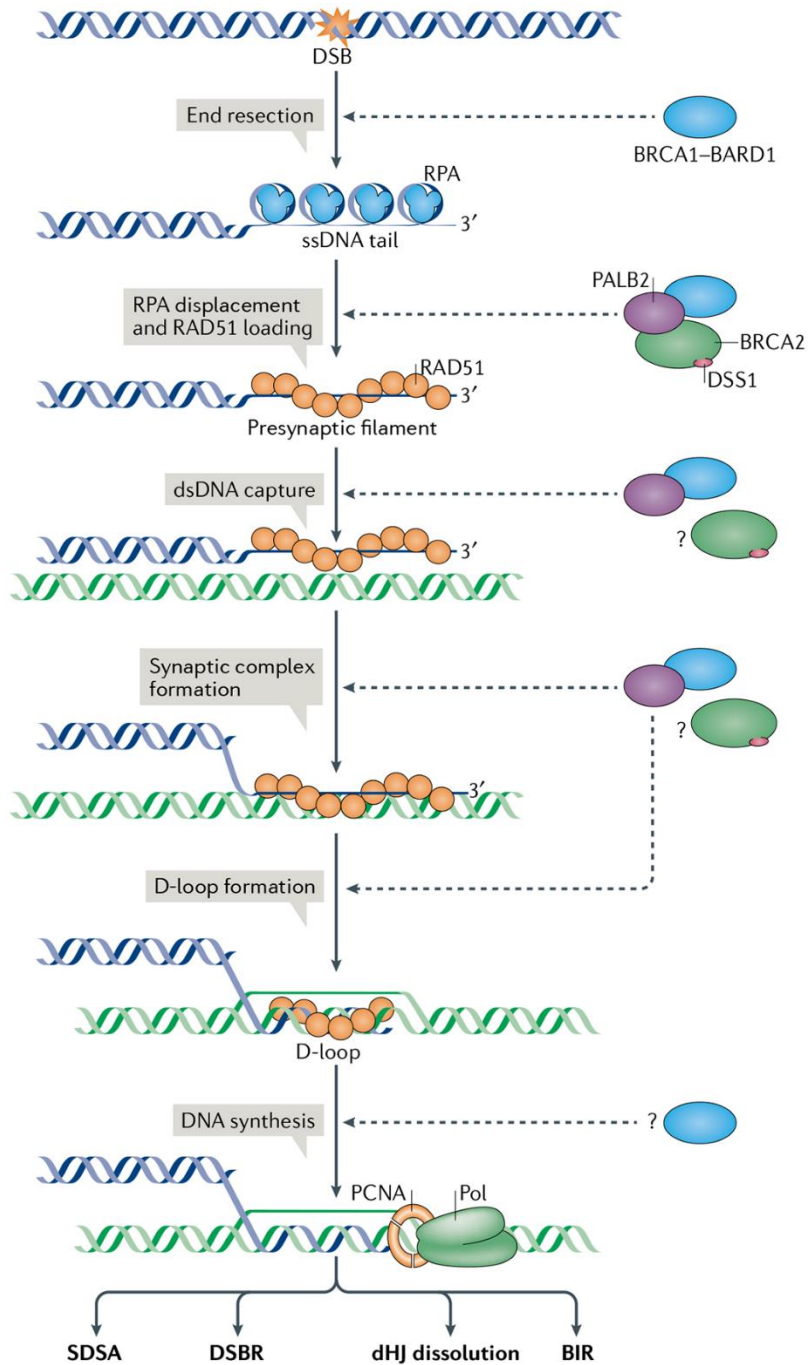


图 2.18 同源重组途径的 DNA 损伤修复过程^[291]

2.4.3 BRCA1 的蛋白质水平调控

人体的 BRCA1 蛋白表达水平及蛋白稳定性在多个不同层次受到精密调控。(1) 在蛋白-蛋白相互作用方面, BRCA1 与 BARD1 相互作用形成的异源二聚体对两个分子均起到稳定作用; (2) 在转录调控方面, 多种转录因子以及 miRNAs 可以对 BRCA1 的转录水平进行正向或负向调控。研究表明 E2F1、miR-155-5p、miR17 等可以抑制 BRCA1 的转录水平, 而 YY1、USP9X 可以提高 BRCA1 的转录水平; (3) 在表观遗传方面,

BRCA1 基因启动子的 CpG 岛的高甲基化状态会抑制 BRCA1 的转录；(4) 在翻译后修饰方面，磷酸化、泛素化、SUMO 化修饰均可发生于 BRCA1 蛋白，其中泛素化修饰是最普遍也最有效的 BRCA1 蛋白修饰方式。研究表明，HERC2、FBXO44、HUWE1、DCAF8L1 等 E3 泛素连接酶均可对 BRCA1 进行多聚泛素化修饰，导致 BRCA1 蛋白降解。然而，BRCA1 的去泛素化酶至今仍鲜有报道。有研究表明 USP9X 可能是 BRCA1 的去泛素化酶，也有研究表明 USP9X 对于 BRCA1 蛋白质水平的上调是通过上调 BRCA1 的 mRNA 水平，而不依赖于其 DUB 活性^[26-30, 34, 35, 94]。

2.4.4 BRCA1 蛋白质水平的变化与乳腺癌的关系

BRCA1 蛋白及其复合物通过调控 DNA 损伤修复、应激压力下的复制叉保护、染色体重塑、有丝分裂等重要细胞过程，起到维持机体基因组稳定性的关键作用，进而在乳腺癌中发挥着重要的抑癌作用。

乳腺癌通常根据遗传易感性被划分为家族性遗传性乳腺癌和散发性乳腺癌，家族性遗传性乳腺癌占全体乳腺癌患者的约 20-30%，其发生发展与 BRCA1、TP53 和 PTEN 等多种抑癌分子的基因突变相关^[8, 9]，其中 BRCA1/2 基因突变出现在超过 50% 的家族性遗传性乳腺癌患者中，是此类乳腺癌患者的显著风险因素^[10]。散发性乳腺癌患者占全体乳腺癌患者约 70-80%，散发性乳腺癌中 BRCA1 的异常多表现为蛋白表达水平不足，研究发现 BRCA1 的低表达水平与散发性乳腺癌的疾病进程、预后风险相关^[11-14]。

有研究表明，BRCA1 突变携带者的细胞(mut/wt)在 BRCA1 参与的同源重组修复、细胞周期检验点、有丝分裂等多种功能上均表现正常，但是应激压力下的复制叉保护表现为明显的功能缺陷，提示 BRCA1 虽然没有“单倍剂量不足”效应，但是 BRCA1 的剂量水平对于其调控基因组稳定性以及肿瘤抑制功能的影响更加精细。有趣的是，向 BRCA1 突变携带者细胞重新转入野生型 BRCA1，可以回补因 BRCA1 单个等位基因突变导致的缺陷，而转入突变型 BRCA1 则无法挽救该缺陷，这表明乳腺癌患者的 BRCA1 蛋白异常可能是由于野生型 BRCA1 蛋白水平不足，而非突变本身所致^[24]。综上所述，无论是家族性乳腺癌的野生型 BRCA1 蛋白剂量不足，还是散发性乳腺癌的 BRCA1 蛋白水平普遍下降，都表明 BRCA1 蛋白水平与乳腺癌密切相关，也意味着阐明机体的 BRCA1 蛋白水平及蛋白稳态调控机制对于理解乳腺癌的发生发展机制、研发以 BRCA1 为中心的乳腺癌治疗药物具有重大意义。

第三章 材料与方法

3.1 实验材料

本研究中所用的实验材料按表格列示，其中表 3.1.1 列示仪器设备；表 3.1.2 列示细胞株及感受态菌株；表 3.1.3 列示细胞培养相关试剂；表 3.1.4 列示抗体；表 3.1.5 列示 Western blotting 相关试剂；表 3.1.6 列示免疫共沉淀相关试剂；表 3.1.7 列示免疫组织化学相关试剂；表 3.1.8 列示分子克隆相关试剂；表 3.1.9 列示病毒系统相关质粒；表 3.1.10 列示原核系统表达载体及质粒；表 3.1.11 列示真核系统表达载体及质粒；表 3.1.12 列示 RNAi 序列；表 3.1.13 列示引物序列；表 3.1.14 列示 USP4 肿瘤患者临床突变体。

表 3.1.1 仪器设备

设备名称	公司/品牌
CO ₂ 培养箱	Thermo Fisher
超净工作台 SW-CJ-2F	苏净安泰
生物安全柜	海尔医疗
Q700 智能型超声波破碎仪	Qsonica
6405 紫外分光光度计	Jenway
流式细胞仪, Calibur1	BD 公司
流式细胞仪, Calibur2	BD 公司
生化培养箱	Boxun
振荡培养箱	上海旻泉仪器
电热恒温鼓风干燥箱	Boxun
落地式高速冷冻离心机	Hitachi
Olympus CK40 倒置显微镜	Olympus
5810R 高速冷冻式离心机	Eppendorf
5427R 高速冷冻式离心机	Eppendorf
ChemiDoc MP 全能型成像系统	Eppendorf
多功能酶标仪	Bio-rad
数字干式恒温器	Tecan
EPS300 电泳仪	Select BioProducts

表 3.1.2 细胞株及感受态菌株

细胞株	来源
HEK 293T	American Type Tissue Culture Collection
HeLa	American Type Tissue Culture Collection
MCF-10A	实验室保存
U2OS	American Type Tissue Culture Collection
MCF-7	American Type Tissue Culture Collection
MDA-MB-231	American Type Tissue Culture Collection
U2OS-DR	实验室保存
HeLa/MCF-10A/MDA-MB-231 Flag-control Cell line	作者构建
HeLa/MCF-10A/MDA-MB-231 Flag-USP4-WT Cell line	作者构建
HeLa/MCF-10A/MDA-MB-231 Flag-USP4-CA Cell line	作者构建
HeLa/MCF-10A/MDA-MB-231 sh-control Cell line	作者构建
HeLa/MCF-10A/MDA-MB-231 shUSP4-1 Cell line	作者构建
HeLa/MCF-10A/MDA-MB-231 shUSP4-2 Cell line	作者构建
DH5 α 感受态细胞	Shenzhen KT Life technology
Rosetta (DE3) 感受态细胞	Shenzhen KT Life technology
Stb13 感受态细胞	Shenzhen KT Life technology

表 3.1.3 细胞培养相关试剂

名称	品牌/公司
高糖 DMEM 培养基	中科迈晨
DMEM/Ham's F-12 培养基	中科迈晨
胎牛血清	HyClone
马血清	Gibco
表皮细胞生长因子 (EGF)	Sigma
氢化可的松	Sigma
霍乱毒素	Sigma
重组人胰岛素	翊圣生物
胰蛋白酶	Sigma
双抗 (青霉素 100 U/mL; 链霉素 100 g/mL)	中科迈晨
OPTI-MEM	Thermo Fisher
jetPRIM 多功能 DNA/siRNA 转染试剂	Polyplus
聚凝胺	索莱宝

续表 3.1.3 细胞培养相关试剂

名称	品牌/公司
Lipofectamine 2000 转染试剂	翌圣生物
Nocodazole	Sigma
Thymidine	Sigma
MG132	Selleck
Puromycin	Selleck
放线菌酮 (CHX)	Selleck
阿霉素(Doxorubicin)	Sigma
依托泊苷(Etoposide)	Sigma
Olaparib	Selleck

表 3.1.4 抗体

名称	货号	品牌
Anti-USP4	66822	Proteintech
Anti-BRCA1	sc-6954	Santa Cruz
Anti-BRCA1	ab16780	Abcam
Anti-BRCA1	ab191042	Abcam
Anti-BARD1	NB100	Novus
Anti-BARD1	sc-74559	Santa Cruz
Anti-Ub	3936S	Cell Signaling Technology
Anti-His	2366S	Cell Signaling Technology
Anti-Flag	4793S	Cell Signaling Technology
Anti-Flag	F3165	Sigma
Anti-HA	3924S	Cell Signaling Technology
Anti-Myc	M4439	Sigma
Anti- β -actin	AC026	ABclonal
Anti- α -tubulin	3873S	Cell Signaling Technology
Anti-GAPDH	5174S	Cell Signaling Technology

表 3.1.5 Western blotting 相关试剂

名称	品牌/公司
硝酸纤维素膜 (NC 膜)	GE Healthcare
30%凝胶贮备液	鼎国昌盛
40%凝胶贮备液	鼎国昌盛
丽春红	Amersco
ECL 化学发光液	Bioruler
蛋白预染 Marker	聚合美生物
过硫酸铵 (APS)	Amersco
Tween-20	Amersco
溴酚蓝	Sigma
TEMED	鼎国昌盛
β 巯基乙醇	Sigma
过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch
辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch
小鼠抗兔 IgG 轻链二抗	Abbkine
山羊抗小鼠 IgG 轻链二抗	Abbkine
十二烷基硫酸钠 (SDS)	鼎国昌盛
PMSF 蛋白酶抑制剂	Thermo Fisher
Cocktail 蛋白酶抑制剂	Selleck
磷酸酶抑制剂	Selleck

3.1.6 免疫共沉淀相关试剂

名称	品牌/公司
Protein A/G beads	博奥龙
Anti Flag M2 Agarose Beads	Sigma-Aldrich
Ni-NTA Agarose	Qiagen
GST Sepharose 4B	GE Healthcare
Normal Rabbit IgG	碧云天
Normal Mouse IgG	碧云天
考马斯亮蓝 G250	翌圣生物
IPTG	Sigma-Aldrich
溶菌酶	Sigma-Aldrich
咪唑	Amersco

表 3.1.7 免疫组织化学相关试剂

试剂名称	品牌（公司）
即时免疫组织化学试剂盒	博奥龙
Envision 免疫组化检测试剂	Qiagen
DAB 显色液试剂盒	博奥龙
中性树胶	中杉金桥
二甲苯	国药科兴
苏木素染液	中杉金桥
乙醇	通广精细化工
氨水	国药科兴
盐酸	国药科兴

表 3.1.8 分子克隆相关试剂

试剂名称	品牌
KOD One PCR Master Mix	TOBOYO
T4 DNA 连接酶	New England Biolabs
限制性核酸内切酶	New England Biolabs
高效无缝克隆试剂盒	碧云天
AxyPrep PCR 纯化试剂盒	Axygen
琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	Axygen
AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒	Axygen
AxyPrep 质粒中量提取试剂盒	Axygen
无内毒素质粒大量提取试剂盒	OMEGA BIO-TEK
DNA Maker	擎科生物

表 3.1.9 病毒系统相关质粒

名称	来源
psPAX2	本实验室保存
pCMV-VSVG	本实验室保存
pLVX-IRES-Puro-3xFlag	本实验室保存
pLVX-IRES-Puro-3xFlag-USP4-WT	作者构建
pLVX-IRES-Puro-3xFlag-USP4-CA	作者构建
GFP-IRES-gene TG006-Vector	本实验室保存
GFP-IRES-gene TG006-USP4-WT	作者构建

续表 3.1.9 病毒系统相关质粒

名称	来源
GFP-IRES-gene TG006-USP4-CA	作者构建
pLKO.1-Puro	本实验室保存
pLKO.1-Puro-shUSP4-1	作者构建
pLKO.1-Puro-shUSP4-2	作者构建

表 3.1.10 原核系统表达质粒

名称	来源
pGEX6-p2-Vector	本实验室保存
pGEX6-p2-USP4	作者构建

表 3.1.11 真核系统表达载体及质粒

载体名称	来源
PCMV6-AC-3xHA-Vector	本实验室保存
PCMV6-AC-3xHA-USP4-WT	作者构建
PCMV6-AC-3xHA-USP4-CA	作者构建
PCMV6-AC-3xHA-USP4-临床突变体（见 3.1.14）	作者构建
p3xFLAG-CMV-10-Vector	本实验室保存
p3xFLAG-CMV-10-USP4-WT	作者构建
p3xFLAG-CMV-10-USP4-CA	作者构建
PCMV6-AC-3xHA-BRCA1-F1(1-64)	本实验室保存
PCMV6-AC-3xHA-BRCA1-F2(65-167)	本实验室保存
PCMV6-AC-3xHA-BRCA1-F3(168-615)	本实验室保存
PCMV6-AC-3xHA-BRCA1-F4(616-1652)	本实验室保存
PCMV6-AC-3xHA-BRCA1-F5(1653-1863)	本实验室保存
pCMVN-HA-USP4-WT	军事科学院裴华东教授实验室馈赠
pCMVN-HA-USP4-M1	军事科学院裴华东教授实验室馈赠
pCMVN-HA-USP4-M2	军事科学院裴华东教授实验室馈赠
pCMVN-HA-USP4-M3	军事科学院裴华东教授实验室馈赠
pCMVN-HA-USP4-M4	军事科学院裴华东教授实验室馈赠
pCMVN-HA-USP4-M5	军事科学院裴华东教授实验室馈赠
pCMVN-HA-USP4-M6	军事科学院裴华东教授实验室馈赠
pCMVN-HA-USP4-M7	军事科学院裴华东教授实验室馈赠

续表 3.1.11 真核系统表达载体及质粒

载体名称	来源
pCMVN-HA-USP4-M8	军事科学院裴华东教授实验室馈赠
p3xFLAG-CMV-10-BRCA1	作者构建
p3xFLAG-CMV-10- BRCA1FS (65-772)	作者构建
PCMV6-AC-3xHA-BRCA1	本实验室保存
pcDNA4-Myc-His-Vector	本实验室保存
pcDNA4-Myc-His-BRCA1FS (65-772)	本实验室保存
pcDNA3.1-Flag-HA-Vector	本实验室保存
pcDNA3.1-Flag-HA-HUWE1	本实验室保存
p3xFLAG-CMV-HERC2	浙江大学杨月红教授实验室馈赠
pcDNA3.1-His-Ub	本实验室保存
pcDNA3.1-HA-Ub	本实验室保存
pcDNA3.1-HA-K48-Ub (K48 only)	本实验室保存
pcDNA3.1-HA-K63-Ub (K63 only)	本实验室保存

表 3.1.12 RNAi 序列

靶基因	RNAi (5'-3')序列
siUSP4-1	GGCAGACCUUGCAGUCAAAATT
siUSP4-2	CCUACGAGCAGUUGAGCAATT
siUSP4-3	CGAGGCGUGGAAUAAACUATT
siUSP4-UTR	UUAAACAGGUGGUGAGAAATT
shUSP4-1	CCCAACTGTAAGAAGCATCAA
shUSP4-2	GCCCAGAATGTGCTAAGGTTT
si-CtIP	GCUAAAACAGGAACGAAUCTT

表 3.1.13 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	质粒名称
Flag-USP4-F	TGACGATGACAAGCTTATGGCGGAAGGTGGAGGC	p3xFLAG-CMV-
Flag-USP4-R	GATGAATTCGCGGCCGCTCATCCAGCCACTCGGG	10-USP4-WT
HA-USP4-F	GCCAGATCTCAAGCTTATGGCGGAAGGTGGAGGC	PCMV6-AC-
HA-USP4-R	CGTATGGGTACTCGAGACCTCCCAGCCACTCGGG	3xHA-USP4-WT
Flag-USP4-F	GAGGATCTATTTCCGGTGAAGAGGAGATCTGCCGCCG	pLVX-IRES-Puro-
Flag-USP4-R	TCTAGAACTAGTCTCGAGGTTAAACCTTATCGTCGTC AT	3xFlag-USP4-WT
GST-USP4-F	GGGCCCTGGGATCCATGGCGGAA	pGEX6-p2-USP4
GST-USP4-R	ATGCGGCCGCTCGAGTTAGTTGGTGTCC	
TG006-USP4-F	ATTCGACATTTAAATACCGCCATGGCGGAAGGTG	GFP-IRES-gene
TG006-USP4-R	CCGATACCGTTCGAGATTAATTAATTAGTTGGTGTCCA	TG006-USP4-WT
Flag-BRCA1-F	GACGATGACAAGCTTGCCACCATGGATTTATCTGCTC	p3xFLAG-CMV-
Flag-BRCA1-R	ATGCCACCCGGGATCCTCAGTAGTGGCT	10-BRCA1
USP4 C311A-F	AACCTGGGAAACACCGCCTTCATGAACTCCGCTTTGC	USP4-CA mutant
USP4 C311A-R	AGCGGAGTTCATGAAGGCGGTGTTCCAGGTTTCCA	
Flag-BRCAFS-F	CCGCTCGAGAAGAATGATATAACCAAAGGAGCCTAC AAGA	p3xFLAG-CMV-
Flag-BRCAFS-R	CCCAAGCTTTCCTGAGTGCCATAATCAGTACCAGGT ACC	10-BRCA1FS
USP4-R8H-F	AAGGTGGAGGCTGCCATGAGCGACCG	PCMV-HA-USP4-
USP4-R8H-R	CGCATCCGGTTCGCTCATGGCAGCCTCC	R8H
USP4-Q81E-F	TTCAGATCCTGAGAGTGAGACCTTGAAAG	PCMV-HA-USP4-
USP4-Q81E-R	TGTTCTTTCAAGTCTCACTCTCAGGATCT	Q81E
USP4-S258F-F	CCTCAGTGTCTGCCTTTCTCATTGCA	PCMV-HA-USP4-
USP4-S258F-R	CACCATTTGCAATGAGAAAGGCAGACACT	S258F
USP4-S295C-F	TCAGGAGCCACCATCCTGTCATATACAAC	PCMV-HA-USP4-
USP4-S295C-R	CAGGTTGTATATGACAGGATGGTGGCT	S295C
USP4-L301R-F	ATACAACCTGGGCGCTGTGGACTTGAA	PCMV-HA-USP4-
USP4-L301R-R	AAGTCCACAGCGCCAGGTTGTATATGAG	L301R
USP4-S315C-F	CACCTGCTTCATGAACTGCGCTTTGCA	PCMV-HA-USP4-
USP4-S315C-R	ACACTGCAAAGCGCAGTTCATGAAGCAG	S315C
USP4-S468F-F	AATGTGCTAAGGTTTTTGACCTTTGAC	PCMV-HA-USP4-
USP4-S468F-R	ATGGGTCAAAGGTCACAAAACCTTAGCAC	S468F
USP4-I546V-F	CGATTCCACAAAGTTTTCCAATGGATGAA	PCMV-HA-USP4-
USP4-I546V-R	ACCTTCATCCATTTGGAAAACCTTTGTGGAAT	I546V

续表 3.1.13 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	质粒名称
USP4-R559W-F	AACCACATCATGCCTTGGGATGACATTTT	PCMV-HA-USP4-R559W
USP4-R559W-R	ACGAAAATGTCATCCCAAGGCATGATGTG	
USP4-R8C-F	GAGGCTGCTGTGAGCGACCGGAT	PCMV-HA-USP4-R8C
USP4-R8C-R	GTCGCTCACAGCAGCCTCCACCT	
USP4-F42C-F	CAGCCGGTGGTGCAAGCAGTGG	PCMV-HA-USP4-F42C
USP4-F42C-R	CTTCTTCCACTGCTTGACCACCGGCTG	
USP4-K186N-F	CGGCTCTGGAACAACACTACATGAGCAACAC	PCMV-HA-USP4-K186N
USP4-K186N-R	CTCATGTAGTTGTTCCAGAGCCGTGTTTC	
USP4-D428Y-F	CAATGGGCGGCCATATGCGGTGGT	PCMV-HA-USP4-D428Y
USP4-D428Y-R	CTTCCTTTGCCACCACCGCATATGGC	
USP4-L459V-F	TTCAAATCTACTGTGGGTTGCCCAGAATG	PCMV-HA-USP4-L459V
USP4-L459V-R	TGGGCAACCCACAGTAGATTTGAAGAGGCC	
USP4-R411Q-F	AGATCTGAACCAGGTAAAGAAAAAGCCC	PCMV-HA-USP4-R411Q
USP4-R411Q-R	TTTTTCTTTACCTGGTTCAGATCTTCATGC	
USP4-P480S-F	TAACGCTGTCACTGCCCTTGAAGA	PCMV-HA-USP4-P480S
USP4-P480S-R	AAGGGCAGTGACAGCGTTAGATAGC	
USP4-R501T-F	CCCTCACTGCACACCTACTCAGTACC	PCMV-HA-USP4-R501T
USP4-R501T-R	CTGAGTAGGTGTGCAGTGAGGGTCCAG	
USP4-Q667E-F	GAAATGGAGCATGAGGAAGAAGGCAAA	PCMV-HA-USP4-Q667E
USP4-Q667E-R	AAGCTGCTCTTTGCCTTCTTCCTCATGCTCCA	
USP4-I782T-F	TGAGAGACTGCACCGAGCTCTTCACCA	PCMV-HA-USP4-I782T
USP4-I782T-R	AAGAGCTCGGTGCAGTCTCTCAGGGCCA	
USP4-G4E-F	TGGCGGAAGGTGAAGGCTGCCGTGA	PCMV-HA-USP4-G4E
USP4-G4E-R	CGGCAGCCTTCACCTTCCGCCATGGTC	
USP4-R10Q-F	CTGCCGTGAGCAACCGGATGCGGAGA	PCMV-HA-USP4-R10Q
USP4-R10Q-R	GCATCCGTTGCTCACGGCAGCCTCC	
USP4-S72F-F	CAATAGACAACCTTTGGGCTATTTTCAG	PCMV-HA-USP4-S72F
USP4-S72F-R	GAAAATAGCCCAAAGTTGTCTATTGGGC	
USP4-E166D-F	ATTGCAACCATCGACAAAGAGAT	PCMV-HA-USP4-E166D
USP4-E166D-R	CGCATCTCTTTGTGCGATGGTTGCA	
USP4-Q227H-F	CATGGCCCAGGCACACCTTGCAGTCA	PCMV-HA-USP4-Q227H
USP4-Q227H-R	TTTTGACTGCAAGGTGTGCCTGGGC	
USP4-V538L-F	TGGTGGTCGCAGATCTGTATAATCACCG	PCMV-HA-USP4-V538L
USP4-V538L-R	TGATTATACAGATCTGCGACCACCATATTT	
USP4-P384S-F	GTAGGACGTTTTGCTTCTCAATTTTCTGG	PCMV-HA-USP4-P384S
USP4-P384S-R	TAGCCAGAAAATTGAGAAGCAAACGT	

续表 3.1.13 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	质粒名称
USP4-S598L-F	CTTCCTCCGCATTAGCGCTATATGGGC	PCMV-HA-USP4-
USP4-S598L-R	GGCTGCCCATATAGCGCTAATGCGGAG	S598L
USP4-Y822L-F	CAAGATCCTGCTGGTCCACCTCAAAC	PCMV-HA-USP4-
USP4-Y822L-R	CAAGATCCTGCTGGTCCACCTCAAAC	Y822L
USP4-A860S-F	TAACCTGTCAACAAGGCCTTATGTGTA	PCMV-HA-USP4-
USP4-A860S-R	ATAAGGCCTTGTTGACAGGTTACAGACA	A860S
USP4-S39Q-F	TATTGACGGCCGGTGGTTCAAGCAGTGG	PCMV-HA-USP4-
USP4-S39Q-R	CTTGAACCACCGGCCGTCAATAAGATAC	S39Q
USP4-D517N-F	GGGGCTGTGTCCAACCTGTGCGAGGC	PCMV-HA-USP4-
USP4-D517N-R	AGAGCCTCGCACAGGTTGGACACAGCC	D517N
USP4-V572M-F	TCTGCAGCACTTCCATGGATGGCTCGG	PCMV-HA-USP4-
USP4-V572M-R	GCCATCCATGGAAGTGCTGCAGACCT	V572M
USP4-P591Q-F	AGAGGAAGTCCAGGCAATCAAGCACTT	PCMV-HA-USP4-
USP4-P591Q-R	GTGCTTGATTGCCTGGACTTCTCTCCC	P591Q
USP4-Q769K-F	TGTTGCAGCCTAAGAAGAAGAAGAAGA	PCMV-HA-USP4-
USP4-Q769K-R	CTTCTTCTTCTTAGGCTGCAACATGCT	Q769K
USP4-D780Y-F	GCCCTGAGATACTGCATCGAGCTCTT	PCMV-HA-USP4-
USP4-D780Y-R	GCTCGATGCAGTATCTCAGGGCCACT	D780Y
USP4-A808Y-F	CATCAACAGGACACAAAAAAGTTTGAC	PCMV-HA-USP4-
USP4-A808Y-R	ACTTTTTTGTGTCCTGTTGATGCTTCTT	A808Y
USP4-A869T-F	GTGTACGACCTCATTACCGTGTCCAAT	PCMV-HA-USP4-
USP4-A869T-R	GACACGGTAATGAGGTCGTACACATAA	A869T
USP4-Q921K-F	ATGTGCTATTTTACAAACGTCGAGATGAT	PCMV-HA-USP4-
USP4-Q921K-R	AAAATTCATCATCTCGACGTTTGTAATAATAG	Q921K

表 3.1.14 USP4 肿瘤患者临床突变体

质粒名称	突变所在结构域
p3xFLAG-CMV-10-USP4-R8H	DUSP
p3xFLAG-CMV-10-USP4-S258F	Linker
p3xFLAG-CMV-10-USP4-S295C	Linker
p3xFLAG-CMV-10-USP4-L301R	D1
p3xFLAG-CMV-10-USP4-S315C	D1
p3xFLAG-CMV-10-USP4-S468F	D1
p3xFLAG-CMV-10-USP4-I546V	UBL2
p3xFLAG-CMV-10-USP4-R559W	UBL2

续表 3.1.14 USP4 肿瘤患者临床突变体

质粒名称	突变所在结构域
p3xFLAG-CMV-10-USP4-R8C	DUSP
p3xFLAG-CMV-10-USP4-F42C	DUSP
p3xFLAG-CMV-10-USP4-K186N	UBL1
p3xFLAG-CMV-10-USP4-D428Y	D1
p3xFLAG-CMV-10-USP4-L459V	D1
p3xFLAG-CMV-10-USP4-E463K	D1
p3xFLAG-CMV-10-USP4-P480S	D1
p3xFLAG-CMV-10-USP4-R501T	UBL2
p3xFLAG-CMV-10-USP4-Q667E	Insert
p3xFLAG-CMV-10-USP4-I782T	D2
p3xFLAG-CMV-10-USP4-G4E	DUSP
p3xFLAG-CMV-10-USP4-R10Q	DUSP
p3xFLAG-CMV-10-USP4-S72F	DUSP
p3xFLAG-CMV-10-USP4-E166D	UBL1
p3xFLAG-CMV-10-USP4-Q227H	UBL1
p3xFLAG-CMV-10-USP4-P384S	D1
p3xFLAG-CMV-10-USP4-V538L	UBL2
p3xFLAG-CMV-10-USP4-S598L	Insert
p3xFLAG-CMV-10-USP4-Y822L	D2
p3xFLAG-CMV-10-USP4-A860S	D2
p3xFLAG-CMV-10-USP4-S39Q	DUSP
p3xFLAG-CMV-10-USP4-R411Q	D1
p3xFLAG-CMV-10-USP4-D517N	UBL2
p3xFLAG-CMV-10-USP4-V572M	Insert
p3xFLAG-CMV-10-USP4-P591Q	Insert
p3xFLAG-CMV-10-USP4-Q769K	Insert
p3xFLAG-CMV-10-USP4-D780Y	D2
p3xFLAG-CMV-10-USP4-A808Y	D2
p3xFLAG-CMV-10-USP4-A869T	D2
p3xFLAG-CMV-10-USP4-Q921K	D2

3.2 试剂及溶液配制

3.2.1 细胞培养相关试剂及溶液配制

- 1) DMEM 高糖培养基: 高糖 DMEM+10%胎牛血清。
- 2) MCF-10A 细胞培养基 (500 mL 体系): DMEM 培养基: 250 mL, DMEM/Ham's F-12 培养基: 250 mL, 马血清: 25 mL, 表皮生长因子(100 mg/mL): 100 μ L, 氢化可的松(1 mg/mL): 250 μ L, 霍乱毒素(1 mg/mL): 50 μ L, 重组人胰岛素(10 mg/mL): 500 μ L。
- 3) MDA-MB-231 细胞培养基: Leibovitz's L-15 培养基+10%胎牛血清。
- 4) 细胞冻存液: 在超净工作台中, 按照 FBS (v/v) 90%, DMSO (v/v) 10%的比例配置, 保存于 50 mL 无菌离心管中, 用封口膜密封后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。
- 5) 10 \times PBS (2 L 体系): 称取 41.6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 5.4g KH_2PO_4 , 160 g NaCl, 4.0 g KCl 至 2 L 烧杯中, 加入 1.8 L 双蒸水, 搅拌至溶解后, 在继续搅拌的同时通过 NaOH 或 HCl 调 pH 值至 7.4, 定容至 2 L 后保存备用。
- 6) 1 \times PBS (500 mL 体系): 量取 10 \times PBS 50 mL, 加入 450 mL 双蒸水, 倒入 500 mL 试剂瓶中, 高压灭菌后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。
- 7) 0.25%胰酶溶液 (1 L 体系): 首先配置 0.5 mol/L EDTA 溶液, 称取 18.61 g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 加入双蒸水 160 mL, 搅拌至溶解后, 在继续搅拌的同时通过 NaOH 调 pH 至 8.0, 直至 EDTA 完全溶解时, 定容至 200 mL 并保存备用。称取 Sigma 胰酶粉末 2.50 g 至 1 L 的烧杯中, 加入 800 mL 1 \times PBS, 2 mL 0.5 mol/L EDTA 溶液, 搅拌至溶解后定容至 1 L, 在超净工作台内用微孔滤膜推滤除菌, 保存至高压灭菌的试剂瓶中置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

3.2.2 细菌培养相关试剂及溶液配制

- 1) LB 培养基 (100 mL 体系): 称取 0.5 g 酵母提取物, 1.0 g 胰蛋白胨, 1.0 g NaCl 至 100 mL 烧杯中, 加入 100 mL 双蒸水, 摇晃至溶解后, 转移到 250 mL 锥形瓶并用牛皮纸封口, 高压蒸汽灭菌后备用。
- 2) LA 固体培养基(100 mL 体系): 称取 0.5 g 酵母提取物, 1.0 g 胰蛋白胨, 1.0 g NaCl, 2.0 g 琼脂粉至 100 mL 烧杯中, 加入 100 mL 双蒸水摇晃至溶解后, 转移到 250 mL 锥形瓶并用牛皮纸封口, 高压蒸汽灭菌。灭菌后将锥形瓶置于室温, 待其温度降至 50 $^{\circ}$ C 左右时加入氨苄抗生素 (工作浓度 100 μ g/mL)。在超净工作台中制备固体培养基平板, 倒放平板待其凝固后用封口膜进行密封保存, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。
- 3) 保菌液 (100 mL 体系): 量取 40 mL 甘油, 60 mL 双蒸水, 二者混合均匀后置于 200 mL 试剂瓶, 高压蒸汽灭菌后备用。

3.2.3 细胞裂解相关试剂及溶液配制

- 1) NETENG-400 裂解液 (1000 mL 体系): 20 mmol/L Tris-HCl, 0.1% NP-40, 0.5 mmol/L EDTA, 1.5 mmol/L MgCl₂, 400 mmol/L NaCl, 10% Glycerol, 调节 pH 至 7.4。
- 2) NETENG-0 裂解液 (1000 mL 体系): 20 mmol/L Tris-HCl, 0.1% NP-40, 0.5 mmol/L EDTA, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0 mmol/L NaCl, 10% Glycerol, 调节 pH 至 7.4。
- 3) NETENG-150 裂解液 (1000 mL 体系): 20 mmol/L Tris-HCl, 0.1% NP-40, 0.5 mmol/L EDTA, 1.5 mmol/L MgCl₂, 150 mmol/L NaCl, 10% Glycerol, 调节 pH 至 7.4。
- 4) 尿素裂解液 B (1000 mL 体系): 8 mol/L 尿素, 10 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaH₂PO₄, 20 mmol/L 咪唑, 调节 pH 至 8.0。
- 5) 尿素裂解液 C (1000 mL 体系): 8 mol/L 尿素, 10 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaH₂PO₄, 20 mmol/L 咪唑, 调节 pH 至 6.3。
- 6) 尿素裂解液 E (1000 mL 体系): 8 mol/L 尿素, 10 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaH₂PO₄, 250 mmol/L 咪唑, 调节 pH 至 4.0。

3.2.4 分子克隆相关试剂及溶液配制

- 1) 50×TAE 电泳缓冲液 (500 mL 体系): 称取 121.14 g Tris base, 9.30 g Na₂EDTA, 30 mL 冰醋酸加入 1 L 烧杯中, 加双蒸水搅拌至溶解后, 定容至 500 mL, 保存备用。
- 2) 1×TAE (500 mL 体系) 电泳缓冲液: 量取 50×TAE 电泳缓冲液 10 mL 至 1 L 烧杯中。加入双蒸水并定容至 500 mL, 保存备用。

3.2.5 Western blotting 相关试剂及溶液配制

- 1) 30%以及 40%凝胶贮备液溶液 (500 mL): 购买自鼎国昌盛。
- 2) 1.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.8, 500 mL 体系): 称取 90.8 g Tris, 加入 400 mL 双蒸水搅拌至溶解后, 在搅拌的同时通过 HCl 调节 pH 至 8.8, 定容至 500 mL 后置于 4 °C 冰箱, 保存备用。
- 3) 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 6.8, 500 mL 体系): 称取 60.5g Tris, 加入 400 mL 双蒸水搅拌至溶解后, 在搅拌的同时通过 HCl 调节 pH 至 6.8, 定容至 500 mL 后置于 4 °C 冰箱, 保存备用。
- 4) 10% SDS 溶液 (100 mL 体系): 称取 10.0 g 十二烷基硫酸钠粉末, 加入 80 mL 双蒸水, 搅拌至溶解后, 定容至 100 mL 后保存备用。
- 5) 10%过硫酸铵溶液 (100 mL): 称取 10.0 g 过硫酸铵粉末, 加入 80 mL 双蒸水, 搅拌至溶解后, 定容至 100 mL 后依次分装至 1.5 mL EP 管, 置于-20 °C 冰箱备用。
- 6) 5×Sample Buffer (250 mL 体系): 量取 1 mol/L, pH 6.8 Tris-HCl 62.5 mL, 75 mL 甘油, 称取 25.0 g 十二烷基硫酸钠粉末, 0.05 g 溴酚蓝, 加入 200 mL 双蒸水, 搅拌

至溶解后，定容至 250 mL 后依次分装至 1.5 mL EP 管，置于 -20 °C 冰箱备用。使用前及时加入 125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ β -巯基乙醇，现配现用。

- 7) 10 \times 电泳缓冲液 (4 L 体系): 称取 121.2 g Tris base, 752.0 g 甘氨酸, 40.0 g SDS, 置于 4 L 烧杯中, 加入 3.5 L 双蒸水, 搅拌至溶解后, 定容至 4 L, 保存备用。
- 8) 10 \times 转膜缓冲液 (4 L 体系): 称取 121.2 g Tris base, 576.0 g 甘氨酸, 置于 4 L 烧杯中, 加入 3.5 L 双蒸水, 搅拌至溶解后, 定容至 4 L, 保存备用。
- 9) 1 \times 转膜缓冲液 (1 L 体系): 量取 10 \times 转膜液 100 mL, 双蒸水 700 mL, 甲醇 200 mL, 混匀后用试剂瓶预冷。
- 10) Tris-acetate 大分子胶 4 \times Sample Buffer: 250 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5, 2% w/v 十二烷基硫酸锂, 100 mmol/L DTT, 0.4 mmol/L EDTA, 10% v/v 甘油, 0.2 mmol/L 酚红, 0.2 mmol/L 溴酚蓝。
- 11) Tris-acetate 大分子胶 1 \times 电泳缓冲液: 50 mmol/L Tricine, 50 mmol/L Tris base, 0.1% w/v 十二烷基硫酸钠, 1.3 mmol/L 亚硫酸氢钠, 调节 pH 至 8.2。
- 12) Tris-acetate 大分子胶 1 \times 转膜缓冲液: 25 mmol/L Bicine, 25 mmol/L Bis-Tris, 1 mmol/L EDTA, 1.3 mmol/L 亚硫酸氢钠, 20% v/v 甲醇, 调节 pH 至 7.2。
- 13) 10 \times PBS (1 L 体系): 称取 24.23 g Tris base, 80.0 g NaCl, 置于 1 L 烧杯中。加入 800 mL 双蒸水, 边搅拌边通过 HCl 调节 pH 至 7.4, 定容至 1 L 后保存备用。
- 14) 1 \times PBST (1 L 体系): 量取 10 mL 10 \times PBS, 加入 1 mL Tween-20, 加入双蒸水定容至 1 L, 混匀后保存备用。
- 15) 封闭缓冲液 (200 mL 体系): 称取脱脂奶粉 10.0 g, 加入 200 mL 1 \times PBST, 充分涡旋混匀后即刻使用。
- 16) 丽春红染液 (200 mL 体系): 称取 Ponceau S 粉末 0.2 g, 加入 10 mL 乙酸, 200 mL 双蒸水, 搅拌混匀后保存备用。

3.2.6 蛋白纯化相关溶液配制

- 1) 1 mol/L Tris (100 mL 体系): 称取 12.1 g Tris, 加入 80 mL 双蒸水, 搅拌至溶解后, 边搅拌边通过 HCl 调节 pH 至 8.0, 定容至 100 mL 后置于 4 °C 冰箱, 保存备用。
- 2) 100 mmol/L 甘氨酸 (200 mL 体系): 称取 1.5 g 甘氨酸, 加入 150 mL 双蒸水, 边搅拌边通过 HCl 调节 pH 至 2.5, 定容至 200 mL 后置于 4 °C 冰箱, 保存备用。
- 3) 考马斯亮蓝染液 (100 mL 体系): 0.25% 考马斯亮蓝 G-250 粉末, 45% v/v 甲醇, 10% v/v 冰醋酸。搅拌至溶解后定容至 100 mL, 保存于室温备用。
- 4) 考马斯亮蓝脱色液 (1 L 体系): 量取 250 mL 甲醇, 80 mL 冰醋酸, 用双蒸水定容至 1 L, 保存于室温备用。

3.3 实验方法

3.3.1 质粒构建

1) 过表达质粒构建:

- a. 引物设计: 使用 SnapGene 软件设计引物, 并请睿博生物合成相应引物。
- b. 获取目的片段: 以质粒或 cDNA 为模板进行聚合酶链式反应获得目的片段, PCR 反应体系如下 (50 μL 体系):

组分	体积
模板cDNA/质粒	X μL (总量20 ng左右)
2 \times KOD PCR mix	25 μL
10 pmol/ μL 前向引物	1 μL
10 pmol/ μL 后向引物	1 μL
双蒸水	补齐至50 μL

c. 反应程序如下:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98 $^{\circ}\text{C}$	5 min	
变性	98 $^{\circ}\text{C}$	10 s	
退火	(T_m-5) $^{\circ}\text{C}$	30 s	30个循环
延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	30 s/kb	
终末延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	10 min	
保存	4 $^{\circ}\text{C}$	∞	

- d. 取 5 μL PCR 产物, 与模板 DNA 一起进行琼脂糖凝胶电泳验证。
- e. 对 PCR 产物进行纯化回收, 测定浓度。
- f. 载体酶切: 在 NEB enzyme finder 搜索相应的内切酶工作条件, 据此设定时间和温度, 并用相应的核酸内切酶切割载体, 反应体系如下:

组分	体积/质量
载体质粒	5 μg
核酸内切酶1	1 μL
核酸内切酶2	1 μL
10 \times Buffer	5 μL
双蒸水	补齐至50 μL

- g. 将酶切后的载体与模板载体质粒进行琼脂糖凝胶电泳，进行凝胶回收并测定浓度。
- h. 连接：使用 T4 DNA 连接酶对 PCR 产物目的片段和酶切载体片段进行连接，连接体系（10 μ L 体系）如下：

组分	体积
酶切后的载体片段	0.001 pmol
PCR产物目的片段	0.01 pmol
2 \times 无缝克隆Mix	5 μ L
双蒸水	补齐至10 μ L

- i. 根据载体特性选择合适的感受态细胞（非病毒载体选择 DH5 α 感受态细胞，病毒载体选择 Stb13 感受态细胞），对连接产物进行转化。
- j. 将连接产物轻轻加入感受态细胞并混合均匀，冰上孵育 30 min，转移至提前调节至 42 $^{\circ}$ C 的水浴锅中热激 90 s，再次转至冰上静置 3 min。
- k. 在超净工作台将转化后的感受态细胞加入 1 mL LB 培养基，放置于 37 $^{\circ}$ C 恒温震荡摇床，以 220 rpm 的速度活化 1 h。
- l. 以 3000 g 的速度离心 5 min，去除上清，重悬菌液，在超净工作台内将其涂在含有对应抗生素的 LA 固体培养基表面，倒放于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中进行培养。
- m. 12 h 后，挑取菌落，放入含有抗生素的 5 mL LB 培养基中扩大培养。
- n. 取等体积的菌液和细菌保存液，置于 -80 $^{\circ}$ C 保存菌种。对其余菌液进行质粒小提后进行 DNA 测序，鉴定质粒是否构建成功。对构建成功的质粒，进行质粒中量提取并保存备用，随后再次保菌。
- 2) shRNA 质粒构建：
- a. shRNA 设计：在 Invitrogen RNAi Designer 网站设计或参考已有文献，由睿博生物进行 DNA 序列合成。
- b. 对 pLKO.1-Puro 载体进行酶切，并对酶切后的载体进行琼脂糖凝胶电泳，回收酶切后片段，并进行浓度测定。
- c. 引物退火磷酸化（在 200 μ L EP 管中操作）：

组分	体积
Oligo1(100 μ mol/L)	1 μ L
Oligo2(100 μ mol/L)	1 μ L
10 \times T4 DNA 连接 Buffer	1 μ L
T4 PNK	0.5 μ L
双蒸水	6.5 μ L

- d. 在 PCR 仪中以 37 °C, 30 min, 95 °C, 5 min 处理上述体系, 之后维持 5 °C/min 的速度, 梯度降温至 25 °C。
- e. 对磷酸化并退火的产物进行稀释, 使用 T4 DNA 连接酶对酶切后胶回收的载体和稀释产物进行连接, 连接条件为 16 °C, 16 h。连接体系如下:

组分	体积
酶切载体	0.001 pmol
磷酸退火化后的产物	0.01 pmol
10×Buffer	1 μL
T4 DNA 连接酶	1 μL
双蒸水	补齐至 10 μL

- f. 将上述连接体系转化至 Stb13 感受态细胞。转化后在超净工作台中将上述体系涂在 LA 固体培养基表面, 倒放于 37 °C 恒温培养箱中培养。
- g. 12-16 h 后挑取菌落进行活化。
- h. 取等体积的菌液和细菌保存液, 置于 -80 °C 保存菌种。对其余菌液进行质粒小提后进行 DNA 测序, 鉴定质粒是否构建成功。对构建成功的质粒, 进行质粒中量提取并保存备用, 随后再次保菌。

3.3.2 细胞培养、传代、冻存及复苏

- 1) 细胞培养条件:
 - a. 人胚肾细胞 HEK 293T, 宫颈癌细胞 HeLa, 人骨肉瘤细胞 U2OS, 人乳腺癌细胞 MCF-7 以及正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 及相关稳定细胞系, 生长在如 3.2.1 所示的相应培养基中, 维持 5% CO₂, 37 °C 恒温培养。视细胞生长情况进行定期传代并更换培养基。
 - b. 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 及其相关稳定细胞系生长在如 3.2.1 所示的相应培养基中, 维持无 CO₂, 37 °C 恒温培养箱中培养。视细胞生长情况进行定期传代并更换培养基。
- 2) 细胞消化与传代: 细胞密度达到 90-100% 时, 将培养基、PBS 以及胰酶从预冷状态提前恢复至室温, 并按以下步骤对细胞进行传代。
 - a. 弃去培养液上清, 用已恢复室温的 PBS 清洗细胞。
 - b. 弃去 PBS, 加入适量 0.25% 胰酶进行消化, 将培养皿置于显微镜下观察。等待至 80-90% 的细胞皱缩、游离, 加入等体积培养基终止消化并转入 10 mL 离心管中, 以 1000 rpm 的速度离心 3 min。
 - c. 弃去上清, 用 1 mL 培养基重悬细胞, 按适当比例分种于培养皿中, 补足培养基

并做好标记。

- 3) 细胞冻存：细胞生长状态良好时对细胞进行及时冻存。
 - a. 用已恢复室温的 PBS 清洗生长状态良好的细胞，加入适量 0.25%胰酶消化，适当时间后用培养基终止消化处理。
 - b. 将终止消化的细胞转入 10 mL 离心管中，以 1000 rpm 的速度离心 3 min。
 - c. 吸去上清，吸取适量冻存液以重悬细胞，每管 1 mL 冻存液及细胞混合液分装至冻存管中并做标记。
 - d. 将冻存管置于已提前恢复室温的程序降温冻存盒中，先置于-20℃冰箱中 3 h，之后置于-80℃冰箱中，8 h 后将冻存管转入液氮罐中，长期保存。
- 4) 细胞复苏：
 - a. 从液氮罐中取出细胞冻存管，迅速置于 37℃水浴锅中，等待 1-2 min，等待冻存管内混合液解除冰冻状态。
 - b. 将细胞转入提前加好 10 mL PBS 的 15 mL 离心管，混匀后，以 1000 rpm 的速度离心 3 min。
 - c. 弃去培养液，用 1 mL 培养基重悬细胞，并转入已提前加入适量培养基的细胞培养皿，继续培养。

3.3.3 细胞转染

- 1) 真核及原核质粒脂质体转染（以 6 孔板为例）：
 - a. 在状态良好的细胞密度达到 80%-90%时，于超净工作台取 1.5 mL EP 管，取用适量质粒以及 250 μL optiMEM 配制成 A 液，8μL Lipofectamine2000 以及 250 μL optiMEM 配制成 B 液，各自在室温静置 5 min 后，将 A 液与 B 液混匀，再次在室温静置 20 min。
 - b. 将转染混合物轻轻加入已换过培养基的培养皿中，混合均匀后继续培养。
 - c. 转染 8 h 后换液，继续培养，转染 48 h 后收集细胞进行后续实验。
- 2) siRNA 转染（以 6 孔板为例）：
 - a. 将状态良好的细胞种植于培养皿，转染时密度不超过 20%。
 - b. 12-16 h 后，细胞密度达到 30%时进行 siRNA 转染。向 RNase-free 的 1.5 mL EP 管加入 200 μL jetPRIME buffer，加入 2 μL siRNA 以及 4 μL jetPRIME 转染试剂，混合均匀后室温孵育 15 min。
 - c. 将转染混合物轻轻加入已换过培养基的培养皿中，混合均匀后继续培养。
 - d. 转染 24 h 后换液，继续培养，72 h 后收集细胞进行后续实验。

3.3.4 病毒制备及病毒感染

- 1) 慢病毒制备:
 - a. 将状态良好的 HEK 293T 细胞种植于 10 cm 细胞培养皿,待细胞密度达到 80%-90% 时进行转染。
 - b. 在超净工作台内取 1.5 mL EP 管,加入 1 mL jetPRIME buffer,加入 4 μ g 相应的慢病毒载体质粒,3 μ g pCMV-VSVG,3 μ g psPAX2,20 μ L jetPRIME 转染试剂,将以上体系混合均匀后室温孵育 15 min。
 - c. 将转染混合物轻轻加入已换过培养基的培养皿,混合均匀后继续培养。
 - d. 转染 8 h 后换液,继续培养 24 h 后再次换液,继续培养。
 - e. 转染 72 h 后,收集上清至 15 mL 无菌离心管,以 1000 rpm 的速度离心 3 min。
 - f. 在生物安全柜中分装病毒上清,做好标记后放置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱,保存备用。
- 2) 慢病毒感染 (以 6 孔板为例):
 - a. 将需要进行病毒感染的细胞调至最好状态,在细胞密度约 30% 时进行病毒感染。
 - b. 更换培养液,按照 0.8 μ L/mL 比例加入聚凝胺,使其终浓度为 5 μ g/mL。
 - c. 向培养基中加入 200 μ L 病毒液,继续培养。
 - d. 病毒感染 12 h 后换液,感染 72 h 后收集细胞进行后续实验。

3.3.5 稳定细胞系的构建

- 1) shUSP4 稳定细胞系的构建:
 - a. 将 MDA-MB231、HeLa、MCF-10A 细胞以 20% 左右的密度种于六孔板中,12-16 h 后用含有 shUSP4 或 sh-Control 的病毒感染对应细胞。
 - b. 感染细胞 24 h 后更换培养基。
 - c. 感染后 48 h,以 1:10,000 或 1:20,000 的比例将细胞种于 10 cm 培养皿中,加入提前通过梯度杀伤曲线摸索出的合适浓度的 Puromycin,筛选阳性细胞,此后每隔 48 h 更换含有 Puromycin 的培养液。
 - d. 待细胞生长至肉眼可见的克隆时,挑取单克隆至 96 孔板。
 - e. 96 孔板细胞长满后,转移至 24 孔板,并继续培养。
 - f. 24 孔板细胞长满后,对细胞进行消化,取 2/3 进行 Western blotting 表达鉴定,选取成功敲低的细胞进行 DNA 测序。
 - g. 测序符合要求的稳定敲低细胞进行扩繁培养,并及时冻存。
- 2) Flag-USP4-WT/CA 或 Flag-Control 稳定过表达细胞系构建:
 - a. 将 MDA-MB231、HeLa、MCF-10A 细胞以 40% 左右的密度种于六孔板中,12-16 h 待细胞密度达到约 80-90% 时,用含有 Flag-USP4-WT,Flag-USP4-CA 或 Flag-Control 的病毒感染对应细胞。

- b. 感染细胞 24 h 后更换培养基。
- c. 感染后 48 h, 以 1:10,000 或 1:20,000 的比例将细胞种于 10 cm 培养皿中, 加入提前通过梯度杀伤曲线摸索出的合适浓度的 Puromycin, 筛选阳性细胞, 此后每隔 48 h 更换含有 Puromycin 的培养液。
- d. 待细胞生长至肉眼可见的克隆时, 挑取单克隆至 96 孔板。
- e. 96 孔板细胞长满后, 转移至 24 孔板, 并继续培养。
- f. 24 孔板细胞长满后, 对细胞进行消化, 取 2/3 进行 Western blotting 表达鉴定, 选取成功过表达的细胞进行 DNA 测序。
- g. 测序符合要求的稳定过表达细胞进行扩繁培养, 并及时冻存。

3.3.6 细胞裂解、蛋白裂解液提取及定量

- 1) 蛋白样品制备:
 - a. 收集细胞, 在 NETENG-400 裂解液中按照 1:100 的比例加入蛋白酶抑制剂以及磷酸酶抑制剂, 制成细胞裂解液。
 - b. 向细胞沉淀中加入细胞裂解液, 在冰上裂解 30 min。以 12,000 rpm 的速度在 4 °C 离心 20 min, 转移上清至新的 1.5 mL EP 管。
- 2) 蛋白样品定量:
 - a. 向比色杯内各加入 500 μ L Bradford 和双蒸水, 混合均匀后加入的蛋白裂解液测量蛋白质浓度, 加入 5 \times SDS Sample Buffer, 调节蛋白浓度至 1-2 μ g/ μ L。
 - b. 将样品置于 100 °C 加热模块中 5 min, 冷却至室温, 混合均匀后离心, 进行 SDS-PAGE 电泳。

3.3.7 Western blotting 分析

- 1) 电泳:
 - a. 根据蛋白质的分子量制备合适的聚丙烯酰胺凝胶。小分子实验选择 30% 聚丙烯酰胺凝胶, 大分子实验选择 40% 聚丙烯酰胺凝胶。
 - b. 组装电泳装置, 进行电泳, 每孔的蛋白上样量 10-30 μ g, 总体积不超过 25 μ L。
 - c. 电泳条件: 60 V 恒压维持约 20 min, 待蛋白电泳至分离胶后, 调节电压至 90 V, 待溴酚蓝指示剂距凝胶底部 1 cm 处, 停止电泳。
- 2) 转膜:
 - a. 提前配置转膜液, 并置于 -20 °C 冰箱预冷。
 - b. 湿转, 按照“三明治”法转膜, 即正极—海绵垫—2 层滤纸—胶—NC 膜—2 层滤纸—海绵垫—负极的方式组装转膜夹, 确保各层之间无气泡。
 - c. 组装转膜装置, 将转膜槽置于冰水混合物中。

- d. 转膜条件：恒流转膜，350 mA，150 min。
 - e. 转膜结束后进行丽春红染色，在丽春红条带指示下进行条带裁切。
 - f. PBST 洗膜 3 次，每次 5 min。用现配的封闭液进行封闭，室温低速摇晃 1 h。
 - g. 封闭后 PBST 洗膜 3 次，每次 5 min。
- 3) 抗体孵育：
- a. 按照抗体说明书稀释抗体，将抗体和 NC 膜置于抗体孵育盒中，置于摇床上，4 °C 低速摇晃过夜。
 - b. PBST 洗膜 3 次，每次 5 min。
 - c. 按照 1: 5000 的比例稀释对应抗性的二抗至 5% 的脱脂牛奶中，置于摇床上，室温低速摇晃孵育 1 h。
 - d. PBST 洗膜 3 次，每次 5 min。
- 4) 显影：配置 ECL 发光液，将混合好的发光液在避光条件下均匀加在 NC 膜上，再次确认合上护卡膜后发光液均匀，进入暗室显影。

3.3.8 内源性及 Flag/HA 标签蛋白免疫共沉淀

- 1) 内源性免疫共沉淀：
 - a. 按照 3.3.6 方法，用 NETENG-400 裂解液对细胞进行裂解。
 - b. 向裂解液加入上述 NETENG-400 的 1.67 倍体积的 NETENG-0 裂解液，混合均匀后以 12,000 rpm 的速度 4 °C 离心 20 min。
 - c. 利用 Bradford 进行蛋白定量后，用 NETENG-150 裂解液调整蛋白浓度至 1-2 μg/mL，取出 60 μL 作为 Input。
 - d. 其余 NETENG-150 及蛋白裂解液平均分成两份，一份加入对应特异性抗体 (2-4 μg)，一份加入等量对应抗性的 Normal IgG，两份同时放入 4 °C 展示柜的转盘，旋转结合 12 h。
 - e. 结合充分后向两份裂解液各加入 15-20 μL Protein A/G 磁珠并继续放入 4 °C 展示柜的转盘，再次旋转结合 2 h。
 - f. 取下两份结合充分的裂解液，补足 NETENG-150，以 550 g 的速度 4 °C 离心 3 min，去除上清。
 - g. 加入 NETENG-150 清洗磁珠，以 550 g 速度 4 °C 离心 3 min，重复 3-4 次。清洗结束后再次离心并去除上清。
 - h. 加入 27 μL 100 mmol/L 甘氨酸 (pH 2.5)，轻弹管壁悬浮磁珠，静置 2 min 后，以 550 g 的速度 4 °C 离心 3 min，吸取上清转入做好标记的 1.5 mL EP 管中，按上述步骤重复洗脱。
 - i. 向洗脱产物中加入 6 μL 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)，平衡酸碱度。

- j. 向洗脱产物和 Input 各加入 15 μL 5 \times Sample Loading, 放入加热模块中 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮 5 min, 冷却至室温, 混合均匀后离心, 进行 SDS-PAGE 电泳。
- 2) Flag/HA 标签蛋白免疫共沉淀:
 - a. 按照 3.3.6 方法, 用 NETENG-400 裂解液对有 Flag 标签蛋白的细胞进行裂解。
 - b. 向裂解液加入上述 NETENG-400 的 1.67 倍体积的 NETENG-0 裂解液, 混合均匀后以 12,000 rpm 的速度 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min。
 - c. 利用 Bradford 进行蛋白定量后, 用 NETENG-150 裂解液调整蛋白浓度至 1-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 取出 60 μL 作为 Input。
 - d. 剩余裂解液取 1000-1500 μg 蛋白, 加入 15-20 μL Anti-Flag M2 Agarose Beads 或 Anti-HA Affinity Gel, 4 $^{\circ}\text{C}$ 结合 4 h。
 - e. 剩余步骤同 3.3.8 内源性免疫共沉淀。

3.3.9 Ni-NTA pull-down

- 1) 按照 3.3.6 方法, 用 8 mol/L 尿素裂解液 B 对含 His 标签蛋白的细胞进行裂解, 裂解时间 10-20 min, 之后进行超声裂解。超声条件为 30 W, 工作 2 s, 间隔 4 s, 10 次为一组, 超声两组。
- 2) 以 12,000 rpm 的速度 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min, 对蛋白进行定量, 调节蛋白质至 1-2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。取 60 μL 作为 Input。
- 3) 剩余裂解液取 1000-1500 μg 蛋白, 加入 15-20 μL Ni-NTA agarose, 放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 展示柜的转盘, 旋转结合 4 h。
- 4) 加入 8 mol/L 尿素裂解液 C 1 mL 清洗磁珠, 以 550 g 的速度 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 3 min, 重复 3-4 次。清洗结束后再次离心并去除上清。
 - a. 吸净残液, 加入 8 mol/L 尿素裂解液 E, 轻弹管壁悬浮磁珠, 静置 2 min 后, 以 550 g 的速度 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 3 min, 吸取上清转入做好标记的 1.5 mL EP 管中, 按上述步骤重复洗脱。
 - b. 剩余步骤同 3.3.8 内源性免疫共沉淀。

3.3.10 原核蛋白诱导表达、蛋白纯化及 GST pull-down

- 1) 原核蛋白诱导表达及纯化:
 - a. 将 pGEX-6-p2 和连接 USP4 基因的 Rosetta 菌种接种至 250 mL 细菌液体培养基, 加入氨苄抗生素。
 - b. 在细菌培养箱内维持 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温, 以 220 rpm 的速度摇菌 2-4 h, 直至菌体处于对数生长期。

- c. 加入现配的 IPTG 试剂，在细菌培养箱内维持 16 °C 恒温，以 180 rpm 的速度摇菌 16 h，诱导蛋白表达。
- d. 将菌液在落地高速离心机中以 8000 rpm 的速度 4 °C 离心 10 min，弃上清。
- e. 现配细菌裂解液（50 mL PBS，0.1% Triton X-100，1 mmol/L 蛋白酶抑制剂，0.6 mg/mL 溶菌酶）并预冷。向沉淀物加入预冷过的细菌裂解液，混合均匀后置于冰盒内，将冰盒整体置于摇床上进行细菌裂解，裂解 30 min 后进行超声裂解。
- f. 超声裂解条件：功率 50 W，工作 2 s，间歇 6 s，总时间 2 min。超声裂解充分、菌液清亮后进行冰浴。
- g. 裂解后的菌体菌液以 12,000 rpm 的速度 4 °C 离心 30 min，收集上清。
- 5) 取 30 μ L GST 磁珠和细菌裂解上清一同加入新的 50 mL 离心管中，放入 4 °C 展示柜的转盘，旋转结合 4 h。
- 6) 取下上述混合液体，以 550 g 的速度 4 °C 离心 3 min，弃上清，将磁珠转至 1.5 mL 离心管中。
 - a. 以 550 g 的速度 4 °C 离心 3 min，弃上清。用 PBS 重复清洗磁珠 4 次吸干残液。
 - b. 用等体积的 10 mmol/L 谷胱甘肽（pH 8.0）洗脱三次。
 - c. 测定蛋白浓度，进行后续实验。
- 2) GST pull-down 实验：
 - a. 取 1000-1500 μ g 蛋白液（细胞裂解、蛋白提取于定量参照 3.3.6，共沉淀处理参照 3.3.8）。
 - b. 加入 20 μ L 上述已经结合蛋白的 GST 磁珠。
 - c. 放入 4 °C 展示柜的转盘，旋转结合 4 h。
 - d. 免疫共沉淀步骤参考 3.3.8。
 - e. 各加入 60 μ L 1 \times SDS Sample Loading，100 °C 加热模块煮 10 min，涡旋后快速离心，取上清液进行 SDA-PAGE 电泳。

3.3.11 免疫组织化学

- 1) 烤片：将组织芯片置于 60 °C 烘箱，烤片 3 h。
- 2) 脱蜡入水：将组织芯片依次放入二甲苯 I，处理 10 min \rightarrow 二甲苯 II，处理 10 min \rightarrow 无水乙醇 I，处理 3 min \rightarrow 无水乙醇 II，处理 3 min \rightarrow 95% 无水乙醇，处理 3 min \rightarrow 90% 无水乙醇，处理 3 min \rightarrow 80% 无水乙醇，处理 3 min \rightarrow 70% 无水乙醇，处理 3 min \rightarrow 蒸馏水 I，处理 3 min \rightarrow 蒸馏水 II，处理 3 min。
- 3) 在 PBS 缓冲液中润洗组织芯片 3 min，重复 3 次。
- 4) 抗原修复：将组织芯片浸入柠檬酸钠溶液修复盒中，微波炉加热至微沸，停止加热。约 10 min 后再次加热至微沸，缓慢冷却至室温。

- 5) 封闭内源性过氧化物酶：将组织芯片浸入 3%过氧化氢中，避光处理 30 min，弃去过氧化氢。在 PBS 缓冲液中润洗组织芯片 3 min，重复 3 次。
- 6) 封闭：去除多余 PBS 缓冲液，将组织芯片置于湿盒内并以 10%山羊血清进行完全覆盖地封闭，室温封闭 30 min 后弃去封闭液。
- 7) 一抗孵育：根据抗体说明书的指示用封闭液稀释一抗(USP4 按 1:200 稀释, BRCA1 按 1:300 稀释)，用稀释好的一抗完全覆盖组织置于湿盒内，4 °C 过夜孵育。
- 8) 在 PBS 缓冲液中润洗组织芯片 3 min，重复 3 次，洗去一抗。
- 9) 二抗孵育：去除多余洗涤缓冲液，向组织芯片加入生物素化抗体，使其完全覆盖切片，在湿盒内室温孵育 30 min。
- 10) 在 PBS 缓冲液中润洗组织芯片 3 min，重复 3 次，洗去二抗。
- 11) 亲和素-HRP 孵育：去除多余洗涤液，加入亲和素-HRP，使其完全覆盖组织，湿盒室温孵育 30 min。在 PBS 缓冲液中润洗组织芯片 3 min，重复 3 次。
- 12) 显色：按照 DAB 显色试剂盒的指示进行显色，在显微镜下观察显色程度，及时用蒸馏水终止。
- 13) 复染细胞核：将组织芯片浸入苏木素染液 1-3 min。
- 14) 将组织芯片放入蒸馏水中润洗直至润洗液澄清无色。
- 15) 盐酸酒精分化：将组织芯片短暂浸入 1%的盐酸酒精溶液中进行分化，之后浸入蒸馏水中润洗 3-5 次，每次 1 min。
- 16) 蓝化：用 0.5%-1%的氨水覆盖组织芯片 2-3 min。在组织芯片变蓝后将其浸入蒸馏水中润洗 3-5 次，每次 1 min。
- 17) 脱水：将组织芯片依次浸入 70%无水乙醇，处理 3 min→80%无水乙醇，处理 3 min→90%无水乙醇，处理 3 min→95% 无水乙醇，处理 3 min→无水乙醇I，处理 3 min→无水乙醇II，处理 3 min。
- 18) 透明：将组织芯片依次浸入二甲苯 A 液，处理 10 min→二甲苯 B 液，处理 10 min。
- 19) 中性树胶封片后在显微镜下观察，送至病理中心进行扫描读片。

3.3.12 流式细胞技术

- 1) 胰酶消化收集细胞，以 1000 rpm 的速度离心 3 min。
- 2) 离心弃上清，用预冷过的 PBS 缓冲液重悬细胞沉淀，以 1000 rpm 的速度离心 3 min，收集细胞沉淀。
- 3) 离心弃上清，1 mL 预冷过的 PBS 重悬细胞，轻轻逐滴加入 3 mL 预冷的乙醇，放入 -20 °C 冰箱，固定过夜。
- 4) 离心收集细胞沉淀，用预冷过的 PBS 清洗细胞沉淀，再次离心后用 500 μ L 预冷的 PBS 重悬细胞沉淀，然后加入 5 μ L RNase。将上述体系在 37 °C 水浴 1 h。

- 5) 加入 20 μL PI 染液混合均匀，上机检测。

3.3.13 中期染色体断裂实验

- 1) 向 HeLa 细胞中加入 200 ng/mL 的 Nocodazole 继续培养 16 h。
- 2) 按照 3.3.6 所示方法收集裂解细胞、进行蛋白定量。
- 3) 向细胞沉淀中加入 5 mL 预冷过的 0.40% 的氯化钾溶液重悬细胞，置于水浴锅中，37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴孵育 15 min，以 1200 rpm 的速度离心 3 min，弃上清。
- 4) 向细胞沉淀中加入 5 mL 预冷的固定液，轻吹细胞并重悬，室温固定 10 min，以 1200 rpm 的速度离心 3 min，弃上清。
- 5) 重复上述操作。
- 6) 向细胞沉淀中加入 100 μL 固定液重悬细胞，用 tip 头吸取细胞悬液，在距离预冷的载玻片约 50~60 cm 处，将细胞悬液滴在载玻片上。将液滴滴至载玻片后，迅速将液滴吹散，并立即用酒精灯外焰烘烤几下，以便染色体在载玻片上扩散与固定。
- 7) 用含 DAPI 的封片剂进行封片，避光干燥，待封片剂完全凝固后，用显微镜观察染色体形态。

3.3.14 体外细胞增殖实验

- 1) 将稳定过表达或稳定敲低目标基因的细胞按照 1000-2000 个细胞/孔的密度种植于 96 孔板。
- 2) 24 h 后去除培养基，加入含阿霉素等 DNA 损伤药物或 Olaparib 药物的培养基进行药物处理。
- 3) 去除含有药物的培养基，加入含 10% CCK8 的培养基，继续培养 1-4 h。
- 4) 放入酶标仪中，在 490 nm 波长下检测吸光值。

3.3.15 统计分析及绘图

所有实验均进行至少三次生物学重复，Western blotting 条带灰度值计算所用软件为 Image J，统计分析所用软件为 SPSS Statistics 28，作图软件为 GraphPad Prism 8.0，实验结果以 Mean \pm SD 的方式表示。其中*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$ ，***表示 $p < 0.001$ ，****表示 $p < 0.0001$ ，均表示具有统计学差异。

第四章 结果

4.1 USP4 正向调控 BRCA1 蛋白的稳定性

BRCA1 是一个在乳腺癌、卵巢癌等癌症的发生发展过程中发挥重要作用的肿瘤抑制分子，在同源重组途径的 DNA 损伤修复、细胞周期检验点、染色体重塑、细胞有丝分裂等诸多细胞活动中发挥重要作用。在家族遗传性乳腺癌中，超过一半的患者带有 *BRCA1/2* 基因种系突变或缺失；在散发性乳腺癌中，BRCA1 常表现为蛋白水平下降。以上两种情况均表明维持 BRCA1 蛋白在细胞内的稳态对于维持基因组稳定性有非常重要的作用。

泛素化修饰能够对 BRCA1 蛋白表达水平及蛋白稳态起到关键的调控作用。多项研究表明，HERC2、FBXO44、HUWE1、DCAF8L1 等 E3 泛素连接酶都可以对 BRCA1 进行泛素-蛋白酶体途径降解，降低 BRCA1 蛋白稳定性^[33-36]；此外，TUSC4 可以通过与 HERC2 竞争性结合 BRCA1，从而拮抗 HERC2 对于 BRCA1 的泛素化降解，最终稳定 BRCA1 蛋白^[298]。理论上，泛素化与去泛素化修饰对于蛋白质底物的表达水平以及稳定性调控处于一个动态平衡的过程，这意味着 BRCA1 至少存在一种能与其 E3 泛素连接酶相互拮抗的 DUB，阻断 BRCA1 的泛素-蛋白酶体途径降解，从而上调其蛋白水平。然而，能够对 BRCA1 进行去泛素化的 DUB 鲜有报道。那么，能够特异性去除 BRCA1 的多聚泛素化修饰，进而拮抗 BRCA1 的 E3 泛素连接酶对其进行的泛素-蛋白酶体途径的降解，从而维持 BRCA1 在机体内蛋白稳态的 DUBs 有哪些？它是如何对 BRCA1 分子的蛋白质水平以及稳定性进行调控的？它是否可以通过影响 BRCA1 分子的细胞内蛋白质水平进而影响 BRCA1 参与的多种重要的细胞生物学功能？由于 BRCA1 在乳腺癌发生发展过程中起到重要的抑制性作用，特异性调控 BRCA1 蛋白的 DUBs 是否在乳腺癌的发生发展中起作用？

围绕 BRCA1 的去泛素化酶鉴定这一科学问题，本研究在一个含有 38 种 DUBs 的质粒表达文库中进行筛选。在 HEK 293T 细胞中瞬时转入含有 Flag 或者 HA 标签的外源 DUB 质粒，转染 48 h 后收取细胞进行裂解，进行 Western blotting 实验，检测细胞内源性 BRCA1 蛋白水平（图 4.1.1 a）。通过 Image J 软件对三次独立实验的 BRCA1 蛋白条带进行灰度分析，发现去泛素化酶 USP4 的过表达可以特异地引起细胞内源性 BRCA1 表达水平明显上升（图 4.1.1 b）。

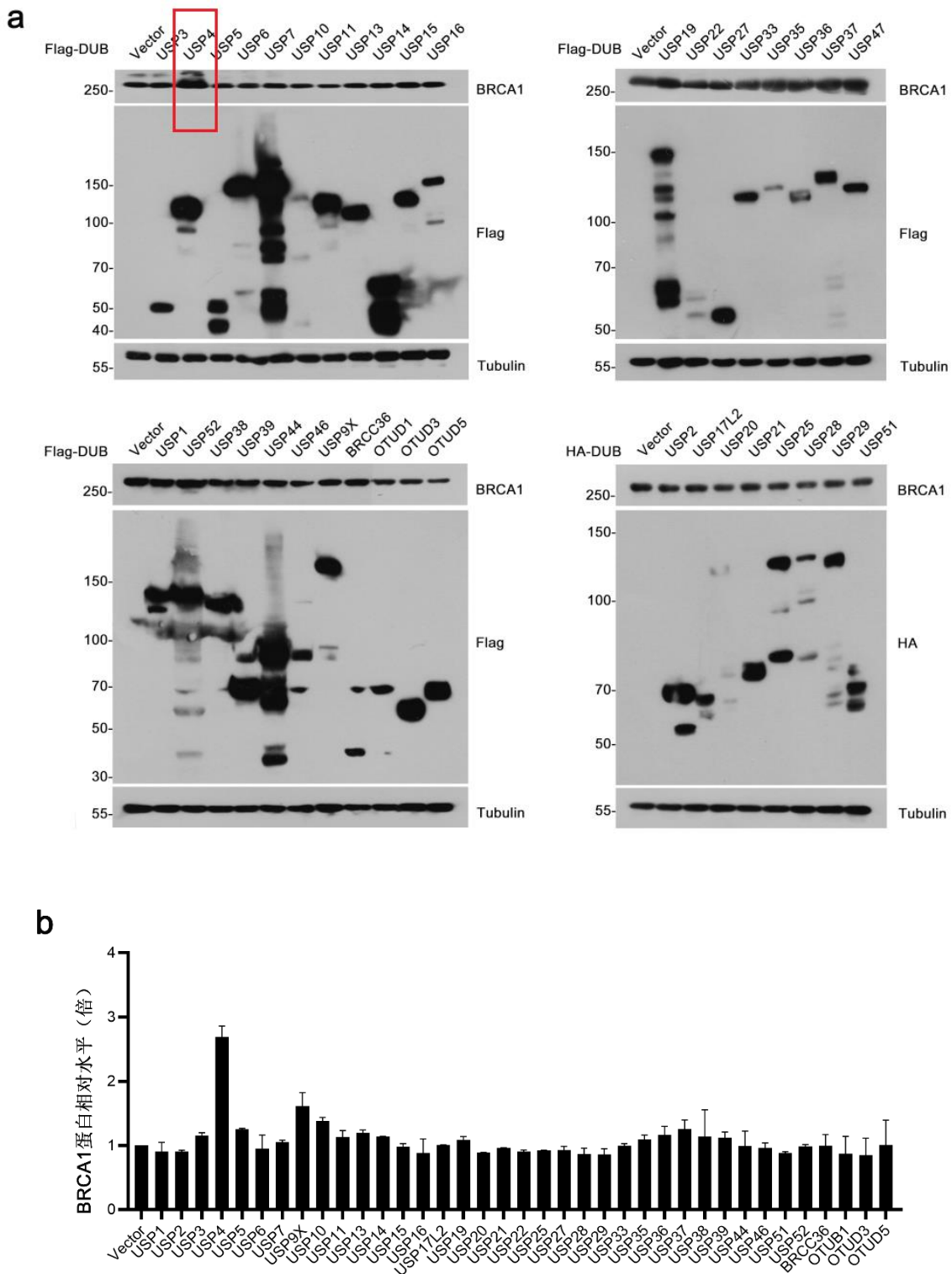


图 4.1.1 DUBs 表达文库筛选显示 USP4 是 BRCA1 的去泛素化酶

(a) 在 HEK 293T 细胞中瞬时表达 Flag-DUBs 或 HA-DUBs 质粒，转染 48 h 后收集细胞裂解，并进行 Western blotting 分析。(b) 以空载质粒对应的 BRCA1 蛋白水平为参照，利用 Image J 软件对 BRCA1 蛋白条带进行灰度值分析并进行标准化，数据为三次独立实验结果的统计。

为进一步探索去泛素化酶 USP4 和 BRCA1 的蛋白质水平之间的关系,本研究在乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中梯度过表达野生型 USP4,结果显示(图 4.1.2 a),BRCA1 蛋白水平呈梯度性上升,提示 USP4 对于 BRCA1 蛋白水平的调控是剂量依赖性的。USP4 C311A 突变体破坏了其经典的 USP 结构域,使其丧失了对底物的去泛素化能力,被公认为 USP4 的酶活突变体^[65]。在 MDA-MB-231 细胞中过表达 USP4-C311A 突变体无法上调 BRCA1 蛋白水平,提示 USP4 对于 BRCA1 蛋白水平的调控可能是依赖于其 DUB 活性的。

为了进一步验证 USP4 对于 BRCA1 的蛋白质水平调控,本研究设计了靶向 USP4 的 siRNA。在人正常乳腺上皮细胞系 MCF-10A、人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 以及人宫颈癌细胞系 HeLa 内瞬时转染 USP4 靶向性 siRNA,转染 72 h 后收取细胞进行裂解,并通过 Western blotting 实验对内源性 BRCA1 的蛋白质水平进行检测。结果显示(图 4.1.2 b),在三种细胞内敲低 USP4 均可导致 BRCA1 的蛋白质水平明显下降,此结果也进一步证明 USP4 与 BRCA1 的蛋白质水平存在正向相关性。

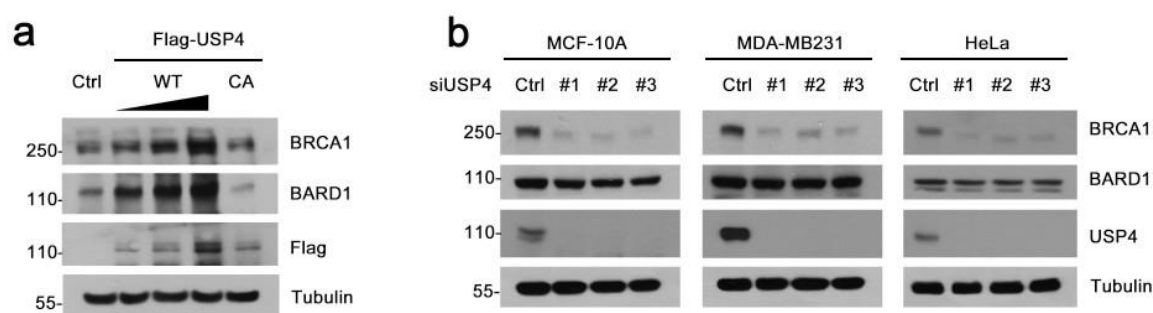


图 4.1.2 USP4 正向调控 BRCA1 蛋白水平

(a) 在 MDA-MB-231 细胞中分别瞬时表达 Flag-空载质粒或 1 μ g、2 μ g、4 μ g Flag-USP4 质粒,转染 48 h 后收集细胞裂解,并进行 Western blotting 实验。(b) 在 MCF-10A、MDA-MB-231 以及 HeLa 细胞中分别瞬时转染 siRNA control 或者三种 USP4 siRNA,转染 72 h 后收集细胞裂解,并进行 Western blotting 实验。

此外,本研究设计并构建了病毒载体的 USP4 质粒以及靶向 USP4 的 shRNA,并在此基础上构建了稳定过表达野生型或酶活突变型 USP4、稳定敲低 USP4 的多种细胞系,包括 MCF-10A 稳定细胞系、MCF-7 稳定细胞系、MDA-MB-231 稳定细胞系以及 HeLa 稳定细胞系,以方便后续的功能性探究实验。本研究通过 Western blotting 实验对稳定细胞系内 BRCA1 蛋白水平进行了检测。以 MCF-10A 细胞为例(图 4.1.3),稳定过表达野生型 USP4 导致细胞内 BRCA1 的蛋白质水平明显上调,反之亦然。

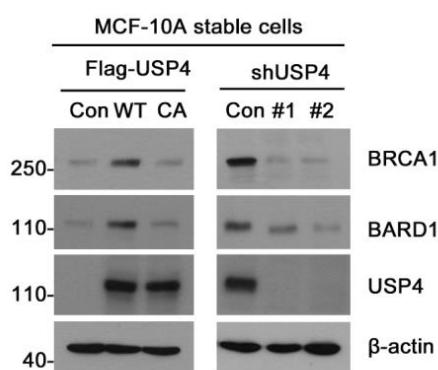


图 4.1.3 在 MCF-10A 细胞内稳定敲低 USP4 可引起 BRCA1 蛋白水平下降

用 pLVX-lenti-Flag-USP4-WT, pLVX-lenti-Flag-USP4-CA 或 pLVX-lenti-Flag-ctrl 慢病毒感染 MCF-10A 细胞, 通过 Puromycin 筛选并构建稳定过表达 USP4 的细胞系, 收取不同的克隆细胞进行 Western blotting 验证。用 pLKO.1-shUSP4 和 pLKO.1-shctrl 慢病毒感染 MCF-10A 细胞, 通过 Puromycin 筛选并构建稳定敲低 USP4 的细胞系, 收取不同的克隆细胞进行 Western blotting 验证, 检测细胞内 USP4 和 BRCA1 蛋白水平。

上文提到 USP4 对于 BRCA1 蛋白水平的上调依赖于其 DUB 活性, 而 USP4 是一个去泛素化酶, 那么 USP4 对于 BRCA1 的蛋白质水平调控是否与泛素-蛋白酶体途径有关? 为了验证这一推测, 本研究首先在 MCF-10A 以及 HeLa 细胞中敲低 USP4, 细胞内源性 BRCA1 水平随之明显下降, 而在敲低 USP4 的细胞内加入蛋白酶体抑制剂 MG132, 转染 68 h 后收细胞裂解进行 Western blotting 检测, 结果显示 (图 4.1.4), 敲低 USP4 导致的 BRCA1 蛋白水平的下降在经过 MG132 处理后得到了明显的回补。这说明在 USP4 水平较低时, BRCA1 的泛素化降解尤为强烈, 而 USP4 水平的提高阻断了 BRCA1 被降解的过程。这个实验结果提示 USP4 对于 BRCA1 蛋白水平的正向调控可能是通过泛素-蛋白酶体途径。

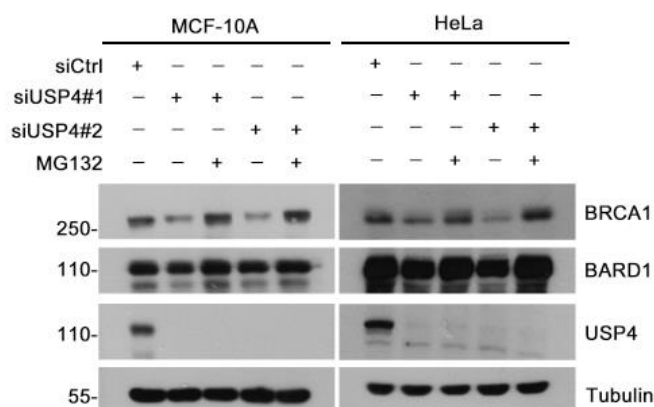


图 4.1.4 MG132 处理可回补 USP4 敲低所导致的 BRCA1 水平下调

在 MCF-10A 和 HeLa 细胞中瞬时转染 siCtrl 和 siUSP4, 转染后 68 h 用 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 MG132 试剂处理细胞 4 h, 收取细胞进行裂解, 并通过 Western blotting 对细胞内 BRCA1 蛋白水平进行检测。

尽管上述结果表明 USP4 的蛋白质水平与 BRCA1 蛋白表达水平密切相关,但是该变化是否依赖于 USP4 仍然未知。为此,本研究利用回补实验进行验证。利用靶向 USP4 非编码区的 siRNA (siUSP4-UTR, 它可以敲低内源性 USP4, 但对外源性 USP4 表达无敲低效果) 敲低 MCF-10A、MDA-MB-231 以及 HeLa 细胞中内源性 USP4, 之后再次向细胞转染野生型或酶活突变型 USP4, 然后观察转入质粒对于 USP4 所导致的 BRCA1 蛋白质水平的降低是否存在回补效应。结果表明, 在三种细胞系中, siUSP4-UTR 均能够敲低内源性 USP4, 并显著降低 BRCA1 的蛋白质水平。在此基础上, 野生型 USP4 能显著回补 BRCA1 蛋白水平, 而酶活突变体却不具备该能力。

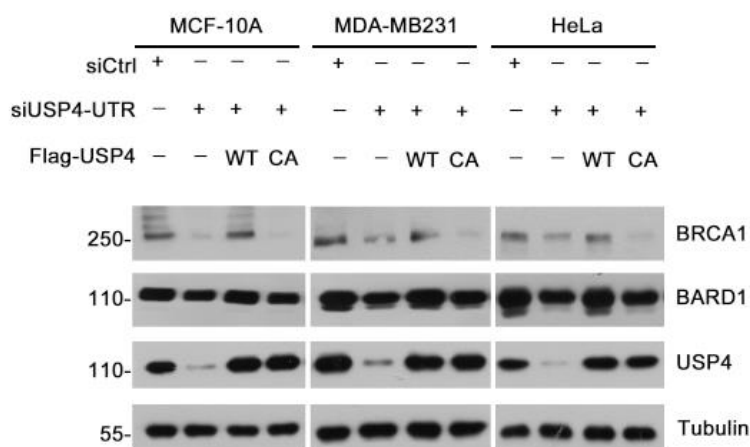


图 4.1.5 野生型 USP4 可回补 BRCA1 蛋白水平

在 MCF-10A、MDA-MB-231 以及 HeLa 细胞中转染 siCtrl 或 siUSP4-UTR, 24 h 后重新过表达外源的 Flag-USP4-WT 或 Flag-USP4-CA 质粒, 转染质粒 48 h 后收集细胞进行裂解, 通过 Western blotting 检测 BRCA1 蛋白水平。

上述结果表明 USP4 可以正向调控 BRCA1 蛋白质水平, 并且该调控过程可能与泛素-蛋白酶体途径有关。为进一步证实这一结果, 本研究利用已构建的稳定细胞系进行蛋白质半衰期实验。用放线菌酮 (CHX) 处理稳定过表达野生型或酶活突变型 USP4 的 MCF-10A 细胞, 在不同时间点收取细胞并通过 Western blotting 实验检测细胞内的 BRCA1 蛋白水平。结果显示 (图 4.1.6 a-b), 在细胞内过表达野生型 USP4 明显延长了细胞内 BRCA1 的半衰期, 使其从原本的不足 5 h 延长至 8 h 以上, 增强了细胞内 BRCA1 的蛋白质稳定性; 而 USP4 的 C311A 酶活突变体却不具有这种作用。除此之外, 本研究还对 USP4 稳定 BRCA1 蛋白这一结论进行了反向验证。结果显示 (图 4.1.6 c-d), 在两种由不同的 USP4 shRNA 构建出的稳定敲低 USP4 细胞系中, BRCA1 蛋白的半衰期相比于 shCtrl 组明显缩短, 从原来的 6 h 缩短到不足 3 h, 这一现象再次说明 USP4 可阻断 BRCA1 的泛素化降解过程, 从而延长 BRCA1 蛋白半衰期, 最终正向调控细胞内 BRCA1 的蛋白质稳态。

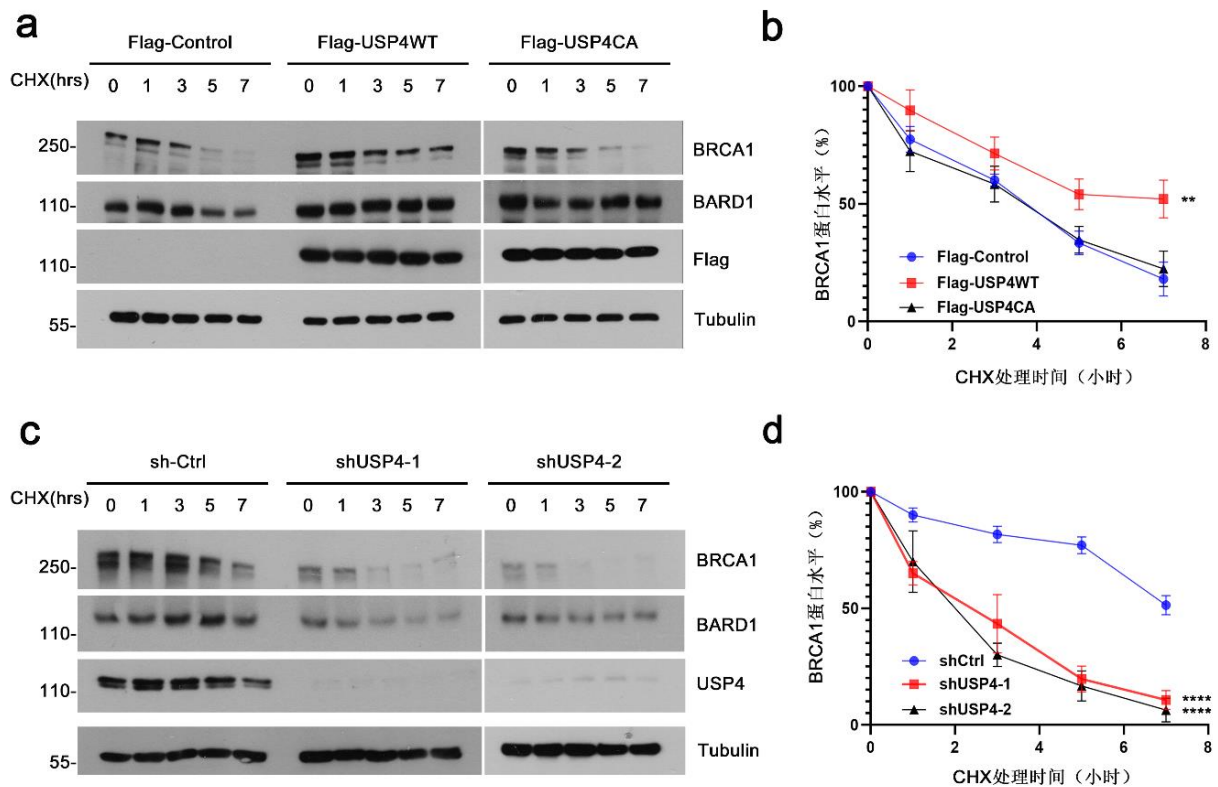


图 4.1.6 USP4 正向调控 BRCA1 蛋白的半衰期

(a) 在稳定过表达 Flag-USP4-WT 或 Flag-USP4-CA 的 MCF-10A 细胞中, 用 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CHX 处理细胞, 在 0、1、3、5、7 h 等不同的时间点收取细胞进行裂解, 并通过 Western blotting 对细胞内 BRCA1 蛋白水平进行检测。(b) 利用 Image J 软件对 (a) 图的 BRCA1 蛋白条带进行灰度分析, 以 0 时刻 BRCA1 蛋白水平为标准值, 绘制 BRCA1 蛋白水平随时间变化的半衰期曲线。三次独立实验数据以 Mean \pm SEM 表示, 采用 two-way ANOVA test 统计, $** p < 0.01$ 。(c) 在稳定敲低 USP4 的 MCF-10A 细胞中, 用 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CHX 处理细胞, 在 0、1、3、5、7 h 等不同的时间点收取细胞进行裂解, 并通过 Western blotting 对细胞内 BRCA1 蛋白水平进行检测。(d) 利用 Image J 软件对 (c) 图的 BRCA1 蛋白条带进行灰度分析, 以 0 时刻 BRCA1 蛋白水平为标准值, 绘制 BRCA1 蛋白水平随时间变化的半衰期曲线。三次独立实验数据以 Mean \pm SEM 表示, 采用 two-way ANOVA test 统计, $**** p < 0.0001$ 。

4.2 USP4 与 BRCA1 能够发生相互作用

为了阐明 USP4 调控 BRCA1 蛋白质稳定性的分子机制, 本研究首先进行了内源性和外源性免疫共沉淀实验, 以探索 USP4 与 BRCA1 之间是否存在相互作用。在 HEK 293T 细胞中瞬时转染 Flag-BRCA1、HA-USP4 或者 Flag-USP4、HA-BRCA1 质粒, 继续培养 48 h 后, 收集细胞进行免疫共沉淀并通过 Western blotting 对沉淀物进行检测。结果显示 (图 4.2.1), 外源性 USP4 可与外源性 BRCA1 相互作用。

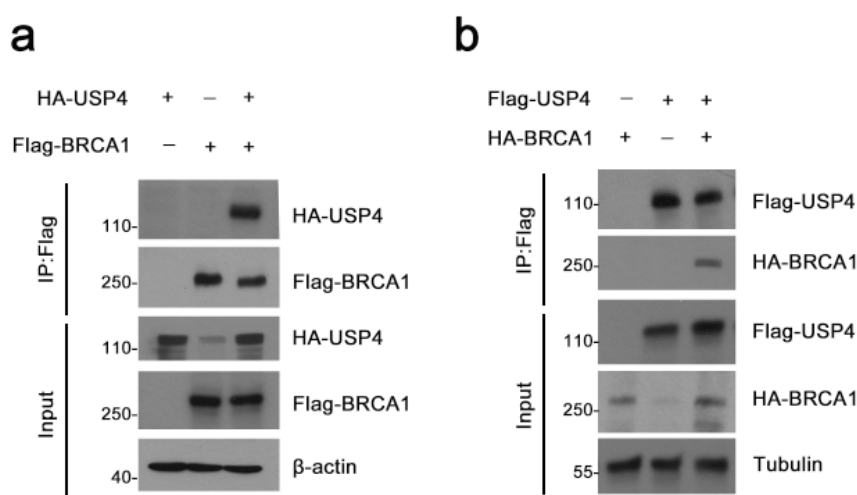


图 4.2.1 外源表达的 BRCA1 与 USP4 在细胞内相互作用

(a) 在 HEK 293T 细胞内瞬时转入 Flag-BRCA1 以及 HA-USP4 质粒，转染后 48 h 收细胞，进行免疫共沉淀实验，并通过 Western blotting 对沉淀物进行检测。(b) 在 HEK 293T 细胞内瞬时转入 Flag-USP4 以及 HA-BRCA1 质粒，转染后 48 h 收细胞，进行免疫共沉淀实验，并通过 Western blotting 对沉淀物进行检测。

为了进一步证实 BRCA1 与 USP4 的相互作用，本研究在 HEK 293T 细胞中过表达外源性野生型或突变体 USP4 质粒，培养 48 h 后，收集细胞进行免疫共沉淀并通过 Western blotting 实验检测细胞内源 BRCA1 蛋白是否与外源 USP4 结合。结果显示（图 4.2.2），细胞内源的 BRCA1 可与外源性表达的 USP4 相互作用。考虑到细胞中约 70% 的 BRCA1 不是单独存在的，而是与 BARD1 结合，以 BRCA1/BARD1 异源二聚体形式存在。因此，本研究同样检测 BARD1，结果显示 USP4 同样可以与 BARD1 相互作用。

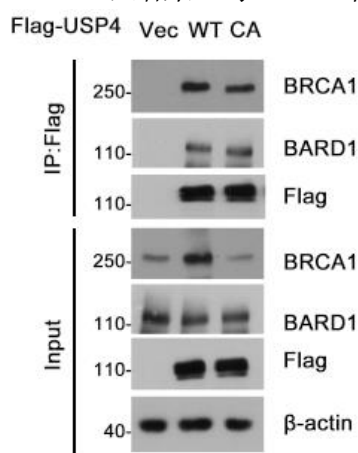


图 4.2.2 外源性 USP4 与细胞内源 BRCA1 相互作用

在 HEK 293T 细胞内瞬时转入 Flag-USP4-WT 或 Flag-USP4-CA 质粒，转染后 48 h 收细胞，进行免疫共沉淀实验，并通过 Western blotting 对沉淀物进行检测。

为了避免因外源性蛋白表达量过高导致蛋白-蛋白间的非特异结合，本研究进一步

采用内源性免疫共沉淀验证了 USP4 和 BRCA1 之间是否存在相互作用。在 MCF-10A 中通过 USP4 特异性抗体去结合细胞内源的 BRCA1 蛋白，并通过 Western blotting 在共沉淀的蛋白中检测 BRCA1。如图 4.2.3 a 所示，细胞内源的 BRCA1 与 USP4 确实能够相互作用。另一方面，如图 4.2.3 b 所示，利用 BRCA1 特异性抗体进行免疫共沉淀，也能够在免疫沉淀物中检测到 USP4 蛋白。

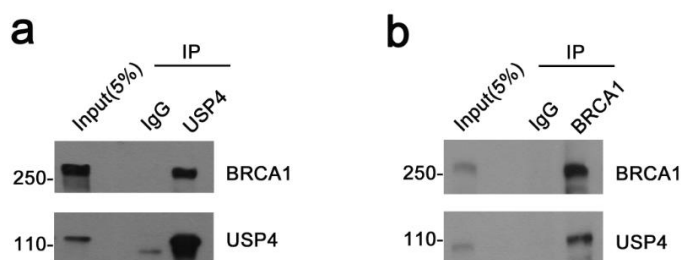


图 4.2.3 USP4 与 BRCA1 存在内源性相互作用

(a) 收取适量 MCF-10A 细胞进行裂解，利用 USP4 特异性抗体进行免疫共沉淀实验，并通过 Western blotting 对沉淀产物进行检测分析。(b) 收取适量 MCF-10A 细胞进行裂解，利用 BRCA1 特异性抗体进行免疫共沉淀实验，并通过 Western blotting 实验对沉淀产物进行检测分析。

为了进一步明确 USP4 与 BRCA1 之间相互作用的位点，本研究构建了不同的 USP4 和 BRCA1 截断体，以鉴定 USP4 和 BRCA1 相互作用的区域。USP4 基因编码 963 个氨基酸的多肽，其氨基端包括一个 DUSP 结构域，中间穿插有两段 UBL 结构域，羧基端包含一段水解酶结构域，其酶活区域由 UBL 以及羧基端共同构成。本研究将一系列带有 HA 标签的 USP4 截断体（如图 4.2.4 a）与 Flag-BRCA1 共转入 HEK 293T 细胞，转染后 48 h 收细胞进行免疫共沉淀实验，检测不同的 USP4 截断体与 BRCA1 相互作用的具体位置。结果显示（图 4.2.4 b），缺失羧基末端 776-963 氨基酸区域的截断体失去了与 BRCA1 相互作用的能力，证明该区段是介导 USP4 与 BRCA1 相互作用的核心区域。

BRCA1 基因编码 1863 个氨基酸的多肽，其氨基端包含一段 RING 结构域，是 BRCA1 发挥 E3 泛素连接酶活性的功能域，也是其与 BARD1 结合并形成异源二聚体的关键结构域。中间含有两段 NLS 结构域以及 Coiled-coil 结构域，可与 BRCA2、PALB2 等分子结合发挥功能。BRCA1 羧基端的 BRCT 结构域可与 Abraxas、BACH1、CtIP 以及 p53 等蛋白相互作用，参与包括 DNA 损伤修复、转录调节、肿瘤抑制等重要的细胞生理功能。据此，本研究构建了一系列 BRCA1 蛋白截断体（图 4.2.5 a），并与 Flag-USP4 共转入 HEK 293T 细胞，转染 48 h 后收细胞进行免疫共沉淀实验。Western blotting 实验结果表明（图 4.2.5 b），BRCA1 通过氨基端 64-615 氨基酸区域与 USP4 相互作用。

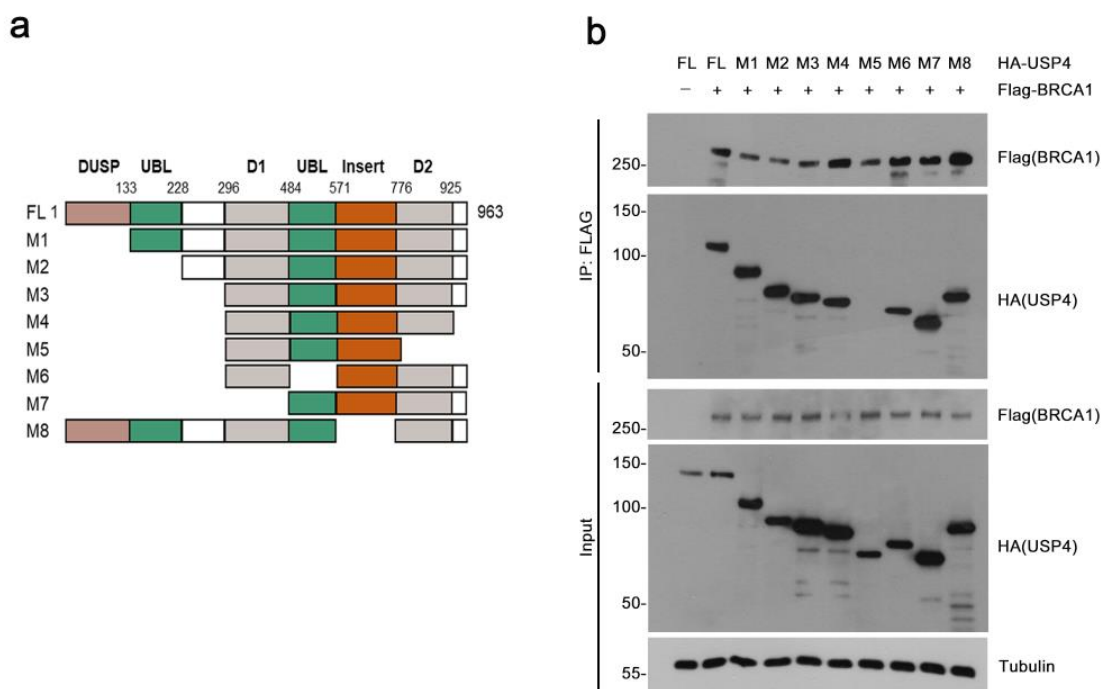


图 4.2.4 USP4 蛋白的 776-963 氨基酸区域介导其与 BRCA1 相互作用

(a) USP4 蛋白截断体示意图。(b) 在 HEK 293T 细胞内瞬时转入 Flag-BRCA1 以及各 HA-USP4 截断体，转染后 48 h 收细胞，利用 anti-FLAG 琼脂糖磁珠进行免疫共沉淀实验，并通过 Western blotting 对沉淀物进行检测。

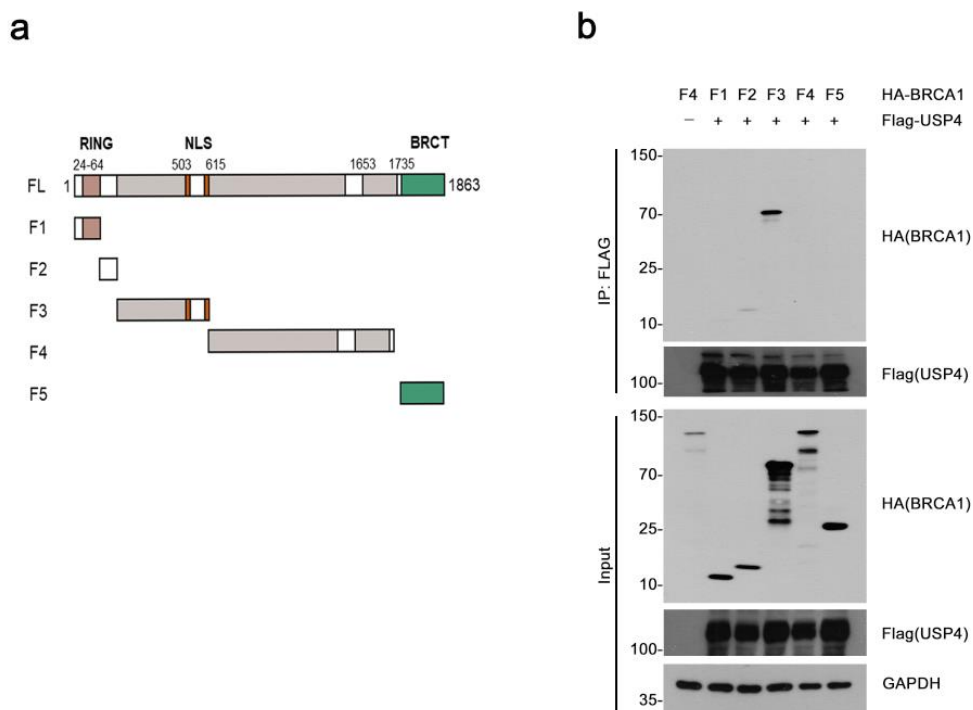


图 4.2.5 BRCA1 蛋白的 64-615 氨基酸区域介导其与 USP4 相互作用

(a) BRCA1 蛋白截断体示意图。(b) 在 HEK 293T 细胞内瞬时转入 Flag-USP4 以及各 HA-BRCA1 截断体, 转染后 48 h 收细胞, 利用 anti-FLAG 琼脂糖磁珠进行免疫共沉淀实验, 并通过 Western blotting 实验检测沉淀物。

为了进一步验证 USP4 与 BRCA1 的相互作用, 本研究构建了 GST-USP4 融合蛋白原核表达质粒, 在 Rosseta 细菌中诱导表达, 随后进行蛋白纯化, 并与含有过表达 BRCA1 的 HEK 293T 细胞裂解液进行 GST pull-down 实验。结果表明 (图 4.2.6), GST-USP4 融合蛋白与 BRCA1 蛋白的确存在相互作用。

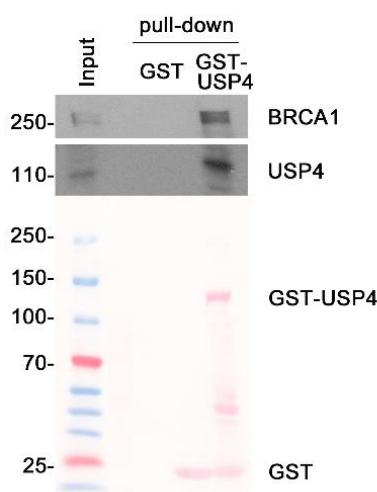


图 4.2.6 GST-USP4 融合蛋白能够与 BRCA1 蛋白相互作用

在 GST 或 GST-USP4 的大肠杆菌处于对数生长期时, 加入 IPTG, 16 °C 诱导表达 16 h, 经蛋白纯化后与 GST beads 结合 4 h, 再与过表达 HA-BRCA1 的 HEK 293T 细胞裂解液一起进行 GST pull-down 实验, 通过 Western blotting 实验对 pull-down 产物进行检测。

综上, 本研究验证了 USP4 与 BRCA1 之间能够发生相互作用, 并且确认了介导二者相互作用的主要区域为 USP4 的羧基末端 D2 结构域(776-963 氨基酸区域)和 BRCA1 的氨基端 RING 结构域与 NLS 结构域中间的片段 (64-615 氨基酸区域)。

已有研究表明, BRCA1 的蛋白质水平随细胞周期时相进展而变化, 在 G1 期以及 S 期前期极低, 在 S 期后期逐渐上调, 直至 G2 及 M 期达到顶峰, 此后 BRCA1 表达水平开始下降, 到下一细胞周期 G1 期再次达到低谷^[299]。BRCA1 蛋白水平随细胞周期循环往复的变化由多种机制所调控。已有研究表明, 转录调控以及 HERC2 介导的 BRCA1 泛素化降解对此过程起调控作用。那么, USP4 作为潜在的 BRCA1 蛋白水平调控分子, 在细胞周期进展过程中, USP4 与 BRCA1 的相互作用是否同样呈现出周期相关性? 为回答这一问题, 本研究利用 HeLa 细胞研究细胞周期的不同时相 USP4 与 BRCA1 的相互作用。首先, 利用 Thymidine 双阻断法将细胞同步化至 G1/S 期, 随后将各组经同步化处理的细胞在 0、4、8、10、12、14 h 等不同时间点释放, 即可获得处于不同细胞周期阶段的细胞 (图 4.2.7 a), 收集细胞并裂解后, 用 USP4 特异性抗体进行内源性免疫

共沉淀实验并通过 Western blotting 检测免疫沉淀物。如图 4.2.7 b 所示，在全细胞裂解液中，BRCA1 蛋白与 USP4 蛋白均表现出明显的细胞周期相关性，且二者表达水平呈现一致的波动，均在 G1 期低表达，在 S 期逐渐上升，在 G2/M 期达到表达水平的高峰，之后开始降低，直到再次达到 G1 期的表达低谷。重要的是，USP4 与 BRCA1 蛋白之间的相互作用也呈现出相同趋势，二者的相互作用强度在 G1 期非常微弱以至于几乎不能被检测到，在 S 期逐渐增强，在 G2 期最为强烈，之后相互作用的强度减弱直至 G1 期降低至最弱。这一结果提示 USP4 与 BRCA1 的相互作用可能与 BRCA1 的生理功能密切相关，因为二者的相互作用在 S/G2 期较高，而此阶段正是 BRCA1 发挥同源重组修复、细胞周期检验点调控、转录调控等各类细胞内重要功能的关键时期。

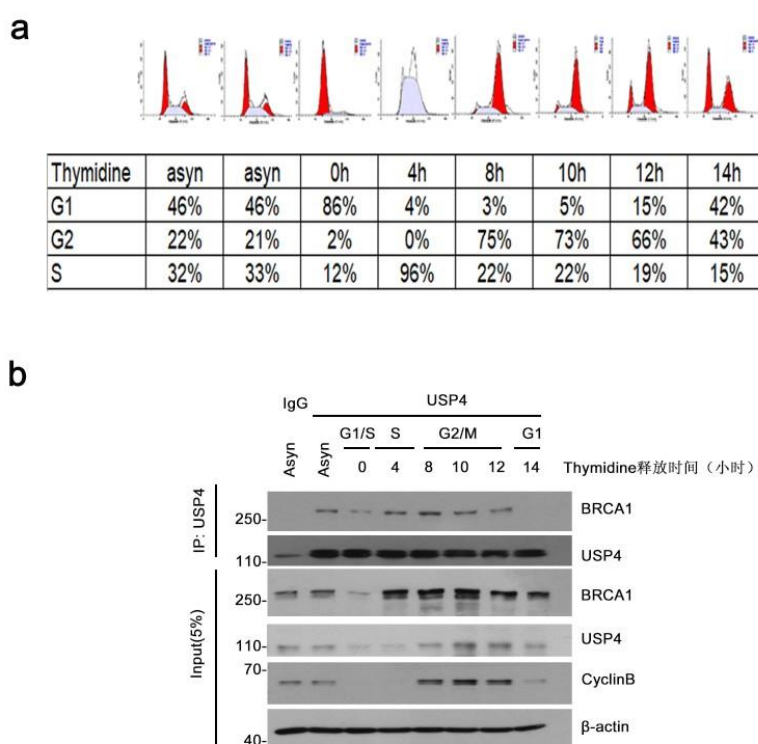


图 4.2.7 USP4 与 BRCA1 的相互作用与细胞周期相关

(a) 流式细胞分析显示细胞周期时相。(b) 利用 2 mmol/L Thymidine 处理 HeLa 细胞 16 h，洗脱释放 8 h 后进行第二次阻断，再次洗脱后分别在 0、4、8、10、12、14 h 等不同时间点释放，收获并裂解细胞后，用 USP4 特异性抗体进行内源性 IP，通过 Western blotting 检测免疫沉淀物。

研究表明，USP4 可与 CtIP 相互作用，使 CtIP/MRN 复合物招募至 DNA 双链断裂位点处，从而促进 DNA 末端切除过程；而 BRCA1 也可以与 CtIP 相互作用促进同源重组修复过程^[110,111]。那么，USP4 与 BRCA1 的相互作用是否与 CtIP 有关？在 CtIP 缺失的情况下，USP4 是否仍然可以与 BRCA1 相互作用并调节其蛋白水平？为了回答这一问题，本研究设计了靶向 CtIP 的 siRNA，在敲低 CtIP 的情况下用 USP4 特异性抗体进

行内源性免疫共沉淀，以考察 USP4-BRCA1 相互作用是否依赖于 CtIP。结果显示（图 4.2.8），在敲低 CtIP 的细胞中，内源性 USP4 仍然可以与 BRCA1 相互作用，且二者的相互作用强度并未由于 CtIP 的敲低而减弱，证明二者的相互作用是独立于 USP4 与 CtIP 的相互作用的，也意味着 USP4 对于同源重组的调控很有可能还有另外一种机制，即通过调节同源重组通路的重要调控因子 BRCA1 蛋白稳定性间接调节同源重组修复。

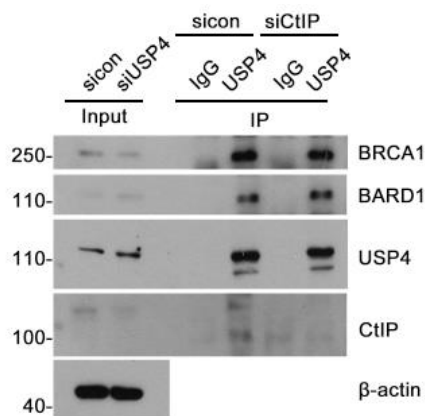


图 4.2.8 USP4 与 BRCA1 的相互作用不依赖 CtIP

在 MCF-10A 细胞内瞬时转染 siCtIP 或 si-control，72 h 后收获并裂解细胞后，用 USP4 特异性抗体进行内源性 IP 实验并进行 Western blotting 检测。

4.3 USP4 介导 BRCA1 的去泛素化

前期结果表明，USP4 可以正向调控 BRCA1 的蛋白质水平，通过阻断 BRCA1 的泛素-蛋白酶体途径降解，进而增强 BRCA1 的蛋白质稳定性。USP4 主要通过水解底物的泛素链来发挥功能，因此，本研究推测 USP4 可能通过对 BRCA1 进行去泛素化来拮抗 E3 泛素连接酶对它的泛素化降解从而稳定 BRCA1 蛋白。为了验证这一推测，本研究设计并进行了一系列细胞内泛素化实验，以检测 USP4 对 BRCA1 泛素化水平的影响。首先，本研究检测了 USP4 对外源性 BRCA1 的去泛素化情况。在 HEK 293T 细胞内瞬时转染 HA-BRCA1、Flag-USP4 以及 His-Ub，转染 44 h 后用 MG132 处理细胞 4 h，收集细胞裂解后在变性条件下进行 Ni-NTA pull-down，并通过 Western blotting 检测 BRCA1 的泛素化水平。如图 4.3.1 a 所示，野生型 USP4 显著降低了 BRCA1 蛋白的泛素化水平，而 USP4-CA 酶活突变体对此几乎没有影响。这一结果说明，USP4 对 BRCA1 的调节依赖于 USP4 的 DUB 催化活性。

为进一步探索 USP4 对 BRCA1 的去泛素化调控能力，本研究检测了 USP4 是否能够水解内源性 BRCA1 的泛素链。在 HEK 293T 细胞中瞬时转入 Flag-USP4 以及 His-Ub，转染 44 h 后用 MG132 处理细胞 4 h，收集细胞裂解后，在变性条件下进行 Ni-NTA

pull-down, 并通过 Western blotting 检测内源性 BRCA1 的泛素化情况。如图 4.3.1 b 所示, 当过表达野生型 USP4 时, 细胞内源 BRCA1 的泛素化水平明显下调, 而酶活突变体不具有降低 BRCA1 泛素化水平的作用。这一结果表明, USP4 可以有效地去除细胞内源 BRCA1 蛋白的泛素化修饰, 并且该过程依赖于 USP4 的 DUB 催化活性。

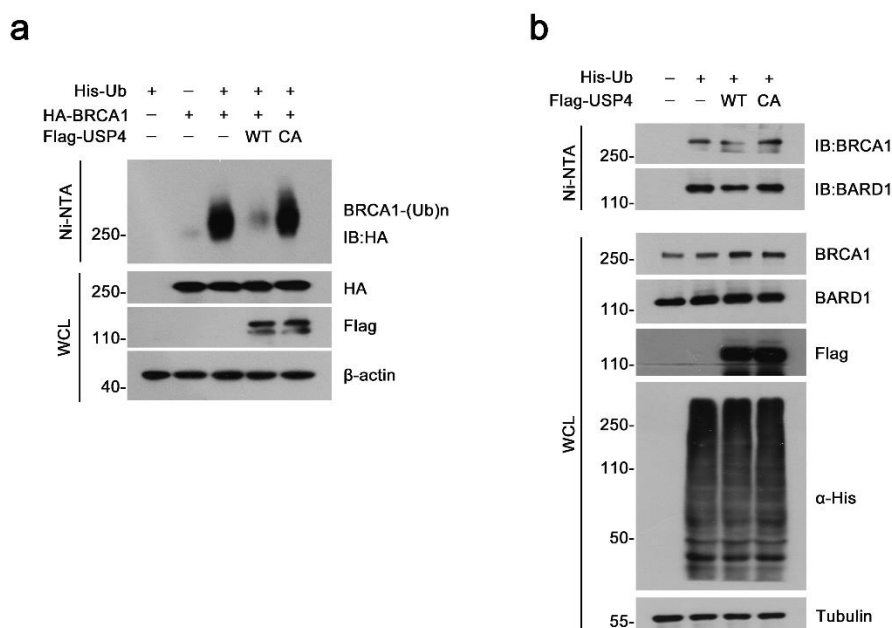


图 4.3.1 USP4 能对 BRCA1 进行去泛素化

(a) USP4 可抑制外源性 BRCA1 的泛素化水平。在 HEK 293T 细胞中瞬时转染 His-Ub、HA-BRCA1、Flag-USP4-WT 或 Flag-USP4-CA, 44 h 左右加入 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 MG132 处理 4 h, 收集细胞进行 Ni-NTA pull-down, 通过 Western blotting 检测 BRCA1 的泛素化情况。(b) USP4 可抑制细胞内源性 BRCA1 的泛素化水平。在 HEK 293T 细胞中瞬时转染 His-Ub、Flag-USP4-WT 或 Flag-USP4-CA, 44 h 左右加入 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 MG132 处理 4 h, 收集细胞进行 Ni-NTA pull-down, 通过 Western blotting 检测 BRCA1 的泛素化情况。

为了进一步探究去泛素化酶 USP4 对 BRCA1 的调节, 本研究在 MCF-10A 细胞中瞬时敲低 USP4, 利用内源性 IP 观察 BRCA1 分子的泛素化情况。结果显示(图 4.3.2), 敲低 USP4 后 BRCA1 蛋白的泛素化水平明显上升, 证明 USP4 降低导致 BRCA1 泛素化水平增强, BRCA1 的泛素-蛋白酶体途径降解增多, 最终导致 BRCA1 蛋白水平降低。

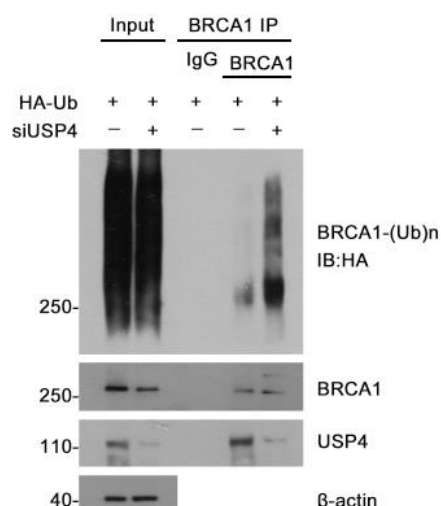


图 4.3.2 敲低 USP4 后内源性 BRCA1 的泛素化水平上升

在 MCF-10A 细胞瞬时转染 siUSP4 或 si-control, 转染 24 h 后再次向细胞转染 HA-Ub 质粒, 48 h 后收集细胞并裂解, 用 BRCA1 特异性抗体进行内源性 IP, 进行 Western blotting 检测。

由于 BRCA1 分子量大, 内源性 BRCA1 的泛素化修饰条带或迁移条带很难被检测到。已有报道表明, BRCA1 缺失 RING 结构域的蛋白截断体 (BRCA1FS 片段, 65-780 氨基酸区域) 可以有效地与 BRCA1 的 E3 泛素连接酶 HERC2 相互作用并被泛素化修饰, 适合作为观察 BRCA1 蛋白泛素化水平的替代性底物^[33]。当本研究以 BRCA1FS 片段为底物时, 仍然可以观察到野生型 USP4 可以有效去除 BRCA1FS 的泛素化修饰 (图 4.3.3)。

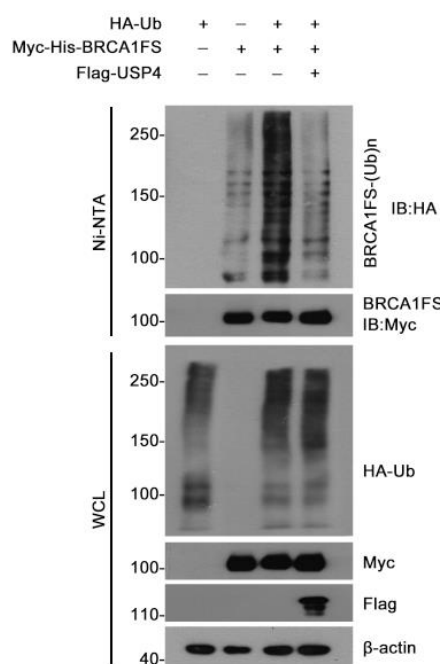


图 4.3.3 USP4 可以对 BRCA1FS 片段进行去泛素化

在 HEK 293T 细胞内转入 HA-Ub、Myc-His-BRCA1FS、Flag-USP4 等质粒，转染后 48 h 收细胞裂解，进行 Ni-NTA pull-down，通过 Western blotting 检测 BRCA1FS 的泛素化水平。

目前已报道的 BRCA1 的 E3 泛素连接酶包括 HERC2、FBXO44、HUWE1 以及 DCAF8L1。为了进一步验证 USP4 对于 BRCA1 的去泛素化作用，本研究设计了外源性泛素化实验以探究 USP4 是否可以拮抗 BRCA1 的 E3 泛素连接酶对它的泛素化修饰。如图 4.3.4 所示，HUWE1 以及 HERC2 均可以明显上调 BRCA1FS 的泛素化水平，而野生型 USP4 有效逆转了两种 E3 泛素连接酶介导的 BRCA1FS 泛素化水平上调；但是 USP4 酶活突变体对于 BRCA1FS 泛素化水平的影响非常轻微。这一结果也进一步证明了 USP4 能够通过拮抗 BRCA1 蛋白的 E3 泛素连接酶所介导的泛素化，进而稳定 BRCA1，且这一作用依赖于 USP4 的 DUB 活性。

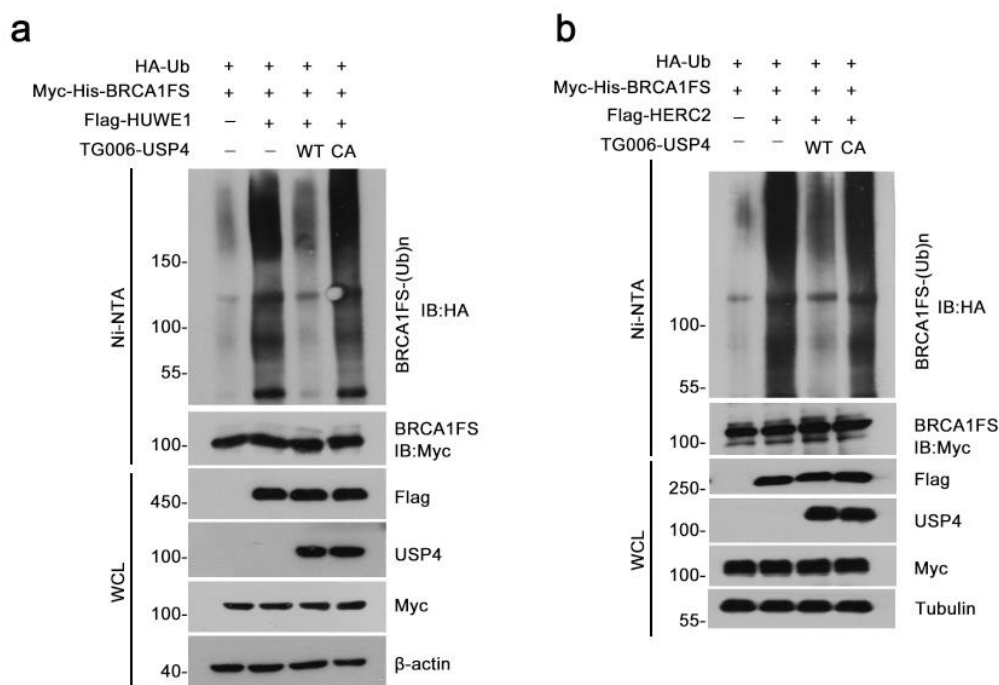


图 4.3.4 USP4 可以拮抗 BRCA1 的 E3 泛素连接酶介导的 BRCA1 泛素化修饰

(a) 在 HEK 293T 细胞内转入 HA-Ub、Myc-His-BRCA1FS、Flag-HUWE1 以及 TG006-USP4 等质粒，转染后 48 h 收细胞裂解，进行 Ni-NTA pull-down，通过 Western blotting 检测 BRCA1FS 的泛素化水平。(b) 在 HEK 293T 细胞内转入 HA-Ub、Myc-His-BRCA1FS、Flag-HERC2 以及 TG006-USP4 等质粒，转染后 48 h 收细胞裂解，进行 Ni-NTA pull-down，通过 Western blotting 检测 BRCA1FS 的泛素化水平。

泛素分子是一个由 76 个氨基酸构成的小分子多肽，在氨基酸序列中的第 6、11、27、29、33、48、63 位分别有一个赖氨酸残基 (K)，赖氨酸残基与下一个泛素分子羧基端的甘氨酸残基形成异肽键，多个泛素分子按照此方法连接，分别能够构成 K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63 等多聚泛素链。各类型的泛素化修饰具有不同的功能，其中最为常见的分别是调控蛋白质底物降解的 K48 类型泛素化修饰以及调控靶蛋白细胞

内定位以及功能活性的 K63 类型泛素化修饰。已有文献报道称 USP4 可以移除的泛素化修饰类型包括单泛素化、K11、K48、K63 等^[66]，那么 USP4 对 BRCA1 的去泛素化调节是否存在修饰类型的特异性呢？为了进一步确认 USP4 对于 BRCA1 去泛素化的类型，本研究利用 HA-Ub 突变体进行体内泛素化实验。结果显示（图 4.3.5），在 HEK 293T 细胞内转染野生型、K48-only 型（只保留 48 位的 K，其他位点上的 K 全部突变为 R）、K63-only 型（只保留 63 位的 K，其他位点上的 K 全部突变为 R）HA-Ub 的情况下，BRCA1FS 的泛素化在野生型和 K48-only 泛素分子存在的情况下明显下降，而 K63-only 实验组变化不明显，提示 USP4 主要去除 BRCA1K48 类型泛素化修饰，一定程度上也能去除 K63 类型泛素化修饰。

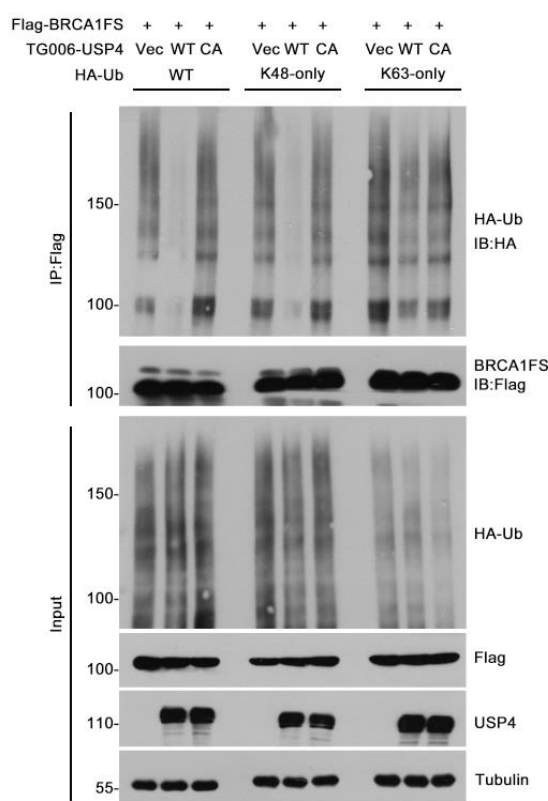


图 4.3.5 USP4 去除 BRCA1 的 K48 类型多聚泛素链

在 HEK 293T 细胞内转入 HA-Ub 及其突变体、Flag-BRCA1FS 以及 TG006-USP4 等质粒，转染后 48 h 收细胞裂解，进行 Ni-NTA pull-down，通过 Western blotting 检测 BRCA1FS 的泛素化水平。

4.4 USP4 通过稳定 BRCA1 进而调控 DNA 损伤修复及基因组稳定性

当 DNA 双链断裂时，细胞启动 DNA 损伤应答过程，其中，同源重组修复通路是具有高保真度的修复方式，对于维持基因组稳定性至关重要。在此过程中，BRCA1 能够通过 BARD1 同源二聚体、与 CtIP/MRN 复合物、PALB2/BRCA2、RAP80、Abraxas、

BACH1 等不同的蛋白形成蛋白复合物，进而在 DNA 损伤修复的不同环节中发挥重要的调控作用。当 BRCA1 缺失或表达量过低时，同源重组途径的 DNA 损伤修复功能往往会出现缺陷，导致细胞对于一系列 DNA 损伤事件的敏感性增强。本研究的前期结果表明 USP4 可以调控 BRCA1 蛋白的 K48 多聚泛素化修饰，阻断 BRCA1 蛋白的泛素化降解，从而正向调控 BRCA1 蛋白表达水平以及稳定性。那么，USP4 是否可以通过稳定 BRCA1 参与到 DNA 损伤修复以及调节基因组稳定性的过程中呢？为了回答这一问题，本研究设计并开展了一系列细胞敏感性实验以及同源重组功能实验。

首先，本研究在稳定过表达或敲低 USP4 的乳腺癌细胞系 MDA-MD-231 内进行一系列 DNA 损伤处理，之后采用体外细胞增殖实验测定细胞的生存活力，从而判断细胞对于各类 DNA 损伤药物的敏感程度。如图 4.4.1 所示，用不同浓度的阿霉素(doxorubicin, DOX)或依托泊苷(etoposide, ETO)处理细胞后，稳定过表达野生型 USP4 的细胞表现出显著更高的细胞存活率，而稳定过表达酶活突变型 USP4 的细胞与对照组相比没有统计学差异。这一现象表明，过表达野生型 USP4 可以显著降低乳腺癌细胞对化疗药物阿霉素和依托泊苷的敏感性。同样的，用不同剂量的 X 射线照射处理后，过表达野生型 USP4 的乳腺癌细胞也表现出明显高于其他两组细胞的细胞存活率，意味着 USP4 的过表达同样可以降低细胞对于 X 射线带来的 DNA 损伤的敏感性。

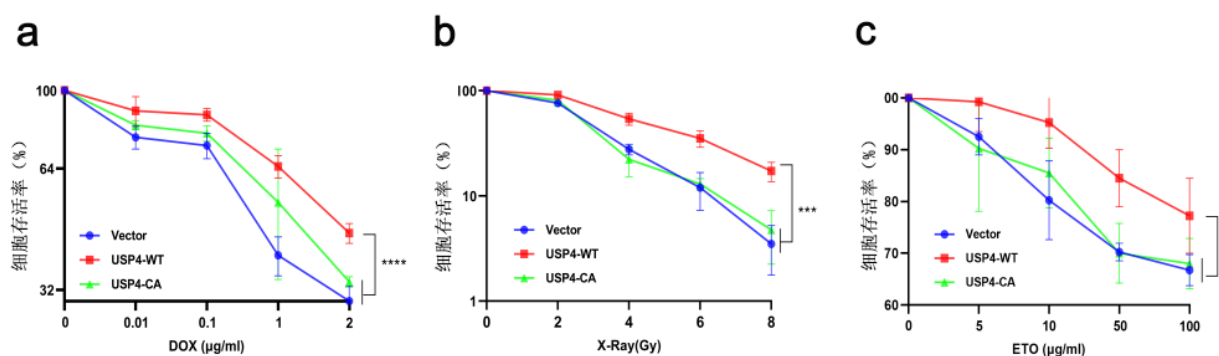


图 4.4.1 过表达 USP4 后，细胞对 DNA 损伤因素抵抗能力增强

(a) 用不同浓度的 DOX 处理细胞 16 h，(b) 用不同剂量的 X 射线处理细胞，(c) 用不同浓度的 ETO 处理细胞 16 h，随后进行 CCK8 细胞增殖活力检测，统计分析各组细胞存活率。所有数据均以 Mean±SEM 表示，**** $p < 0.0001$ ，*** $p < 0.001$ ，* $p < 0.05$ 。

为进一步探索 USP4 在 DNA 损伤中的作用，本研究对 USP4 调控细胞的 DNA 损伤敏感性进行了反向验证。在稳定敲低 USP4 的 MDA-MB-231 细胞中，用不同浓度的 DOX、ETO 处理细胞或者用不同剂量 X 射线照射细胞后，进行 CCK8 实验检测细胞的存活率。结果显示（图 4.4.2），两组 USP4 敲低细胞的存活率明显低于对照组，这表明敲低 USP4 可以使细胞对 DOX 和 ETO 更加敏感，反向证实了 USP4 在细胞内起到帮助细胞抵抗 DNA 损伤因素的作用。

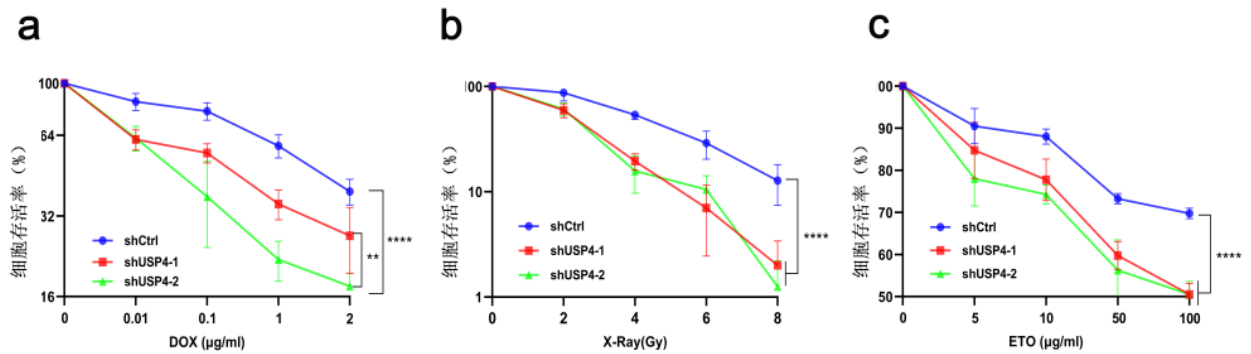


图 4.4.2 敲低 USP4 后，细胞对 DNA 损伤因素更加敏感

(a) 用不同浓度的 DOX 处理细胞 16 h, (b) 用不同剂量的 X 射线处理细胞, (c) 用不同浓度的 ETO 处理细胞 16 h, 随后进行 CCK8 细胞增殖活力检测, 统计分析各组细胞存活率。所有数据均以 Mean±SEM 表示, **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ 。

研究表明, BRCA1 突变或表达量不足的细胞对 PARP 抑制剂敏感^[300]。PARP1 通过与 DNA 单链断裂位点相结合并催化多聚 ADP 核糖链在蛋白质底物上的合成, 募集其它 DNA 修复蛋白定位到损伤位点, 促进修复 DNA 损伤。PARP 抑制剂通过与 PARP1 催化位点结合, 导致 PARP 蛋白无法从 DNA 损伤位点上脱落。在 BRCA1 突变或缺陷的细胞中, PARP 抑制剂叠加同源重组修复缺陷导致细胞合成致死。

基于前期实验结果, USP4 可以通过调节 BRCA1 蛋白水平进而调控细胞的 DNA 损伤敏感性, 本研究进一步探索 USP4 是否可以影响细胞对 PARP 抑制剂的敏感性。在稳定过表达或敲低 USP4 的乳腺癌细胞中, 用不同浓度的 PARP 抑制剂 Olaparib 处理细胞, 24 h 后进行 CCK8 细胞增殖活力检测, 并比较各组细胞的存活率。结果显示 (图 4.4.3), 稳定过表达野生型 USP4 的细胞表现出显著更高的细胞存活率, 而稳定过表达酶活突变型 USP4 没有这种功能。与此相反, 敲低 USP4 的两组细胞均显示出比对照组更低的细胞存活率, 进一步验证了敲低 USP4 可以提高乳腺癌细胞对 PARP 抑制剂的敏感性。

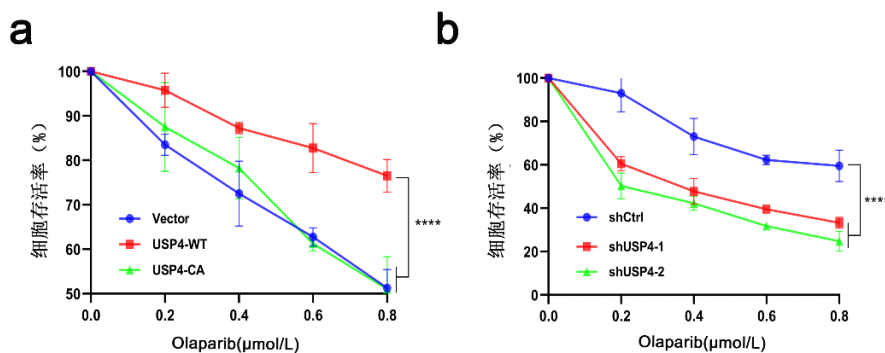


图 4.4.3 USP4 调控乳腺癌细胞对 PARP 抑制剂 Olaparib 的敏感性

用不同浓度的 PARP 抑制剂 Olaparib 处理 (a) 稳定过表达 USP4 或 (b) 稳定敲低 USP4 的 MDA-MB-231 细胞 16 h, 进行 CCK8 细胞增殖活力检测, 统计分析各组细胞存活率。所有数据均以 Mean \pm SEM 表示, **** $p < 0.0001$ 。

为了进一步验证 USP4 对于 DNA 损伤的敏感性的调控是通过其对于 BRCA1 的去泛素化调控进而稳定 BRCA1 蛋白水平而达成的, 本研究进行了一系列回补实验。在敲低 USP4 的乳腺癌细胞 MDA-MB-231 内, 重新转染外源性 BRCA1 并观察细胞对于 DNA 损伤处理的敏感程度是否改变, 以判断 USP4 是否是通过调控 BRCA1 蛋白在 DNA 损伤修复中起作用。如图 4.4.4 所示, 在敲低 USP4 后, 无论是 DOX、ETO 还是 X 射线照射处理, 细胞均呈现出显著的细胞活力降低、敏感性增强; 而向细胞内重新转入 BRCA1 后, 细胞活力又呈现出显著增强, 意味着细胞表型被成功回转。

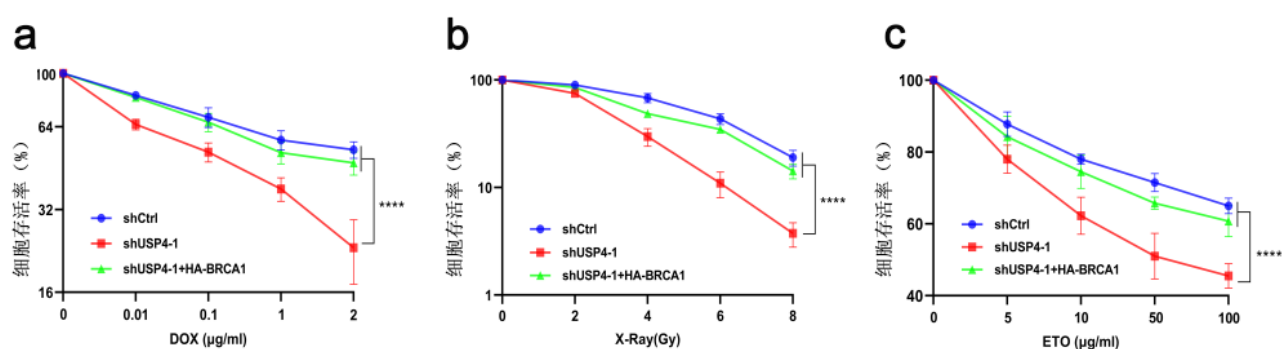


图 4.4.4 BRCA1 可以回补 USP4 敲低导致的 DNA 损伤敏感性表型

在 MDA-MB-231 细胞中转染 shUSP4 或 shCtrl, 24 h 后再次转染 HA-BRCA1 质粒, 随后 (a) 用不同浓度的 DOX、(b) 用不同剂量的 X 射线、(c) 用不同浓度的 ETO 处理细胞 16 h, 进行 CCK8 细胞增殖活力检测, 统计分析各组细胞存活率。所有数据均以 Mean \pm SEM 表示, **** $p < 0.0001$ 。

已有大量研究表明, 细胞面临多种内因或外因的 DNA 损害时会发生 DNA 双链断裂, 细胞会在出现 DNA 双链断裂后启动 DNA 修复机制, 包括同源重组、非同源末端连接、核苷酸切除修复、碱基切除修复以及错配修复。其中, 同源重组修复是以姐妹染色单体为模板进行的高保真修复, 而 BRCA1 已被确认在同源重组修复过程中起关键性作用。BRCA1 蛋白水平不足或基因突变都被认为与同源重组修复缺陷所导致的基因组不稳定有关, 进而可能与乳腺癌的发生发展相关。

本研究前期实验证明, 去泛素化酶 USP4 能拮抗 BRCA1 的泛素-蛋白酶体途径的降解, 从而促进 BRCA1 的蛋白质稳定性, 维持其蛋白质水平。那么, USP4 是否可以通过调节 BRCA1 的蛋白质水平来调控同源重组修复过程呢? 为了回答这一问题, 本研究利用经典的 U2OS-DR 同源重组报告系统检测了 USP4 对于同源重组的效率是否有影响。结果显示 (图 4.4.5 a), 在 U2OS-DR 细胞中敲低 USP4 可以明显下调细胞的同源重组效率; 而在此基础上重新转染野生型 USP4 可以大幅度地回补细胞的同源重组效

率，但是酶活突变型 USP4 不具备这一能力。这表明 USP4 可以调控细胞的同源重组效率，并且该调控能力依赖于 USP4 的 DUB 活性。

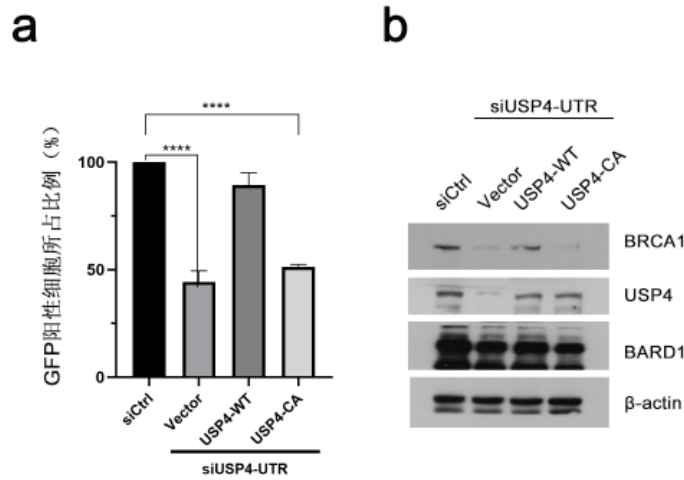


图 4.4.5 USP4 正向调控细胞的同源重组效率

(a) 向 U2OS-DR 细胞瞬时转染 siCtrl 或 siUSP4-UTR，转染 24 h 后向细胞转染 I-SceI 以及 USP4 质粒，转染 48 h 收细胞进行流式分析，比较各组 GFP 阳性细胞占全体细胞的比例。所有数据均以 Mean \pm SEM 表示，**** $p < 0.0001$ 。(b) 通过 Western blotting 验证细胞的 USP4 表达情况。

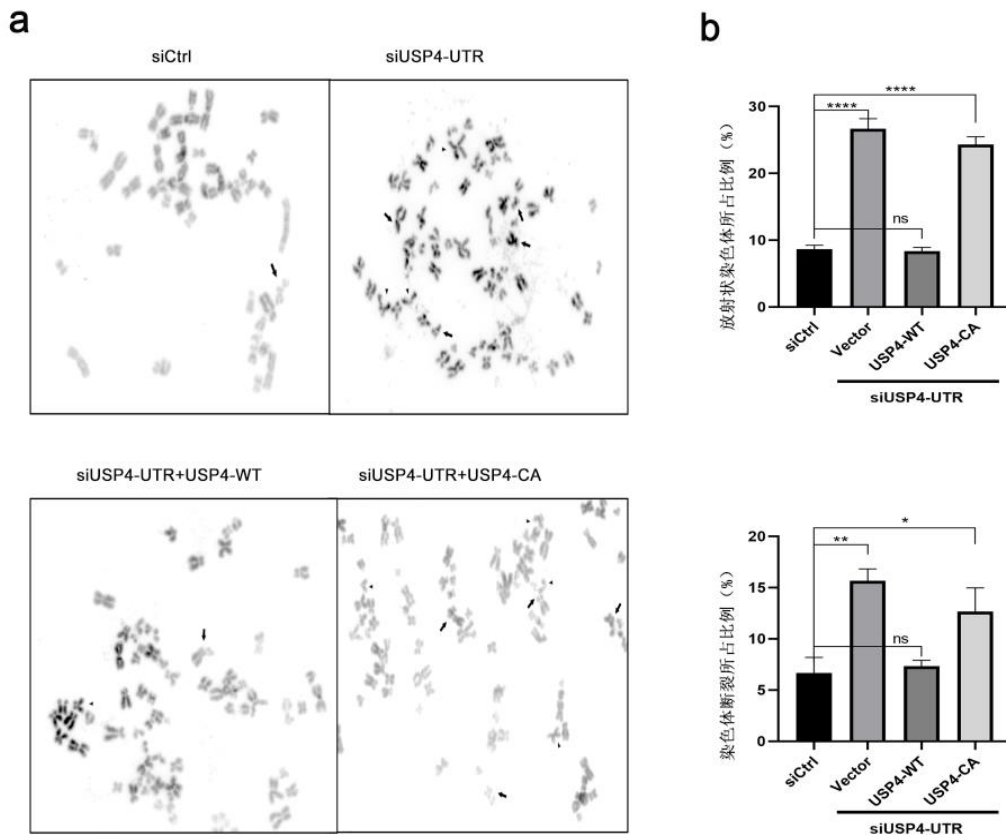


图 4.4.6 USP4 调控染色体结构的稳定性

(a) 在 HeLa 细胞瞬时转染 siCtrl 或 siUSP4-UTR, 24 h 后向细胞转染 USP4 质粒, 40 h 后用 5 mmol/L HU 处理细胞 3 h。PBS 洗涤后用 100 ng/mL 的 Nocodazole 处理细胞 16 h 使细胞处于分裂中期, 收集中期细胞进行染色体核型分析, 箭头所示代表染色体断裂, 三角形所示代表放射状染色体。(b) 统计分析放射状染色体以及断裂染色体所占比例。所有数据均以 Mean \pm SD 表示, **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns 代表无统计学意义。

接下来, 本研究使用中期染色体分析实验, 检测细胞染色体断裂及结构异常的情况, 以评估 USP4 对基因组稳定性的影响。已有文献表明, DNA 损伤修复缺陷的后果主要包括基因组不稳定、不完整, 可以体现为染色体断裂、染色体结构异常以及染色体融合等情况, 此类染色体异常表型可以在细胞分裂中期时观察。本研究在敲低 USP4 的 HeLa 细胞中重新表达野生型或酶活突变型 USP4 质粒, 在 DNA 损伤药物处理细胞后, 使用 Nocodazole 继续处理 HeLa 细胞使其处于分裂中期, 观察并统计分析细胞的染色体异常情况。如图 4.4.6 所示, HeLa 细胞在敲低 USP4 后, 放射状染色体以及染色体断裂的比例显著增高; 重新过表达外源性野生型 USP4 可以降低放射状染色体和断裂染色体发生的比例, 而酶活突变型 USP4 的重新表达则对该表型几乎没有影响。这一结果证明, USP4 对于维持染色体的正常结构具有重要的正向调控作用, 且该能力依赖于 USP4 的 DUB 活性。

4.5 USP4 在乳腺癌病人样本中低表达并与 BRCA1 蛋白表达正向相关

前期研究结果提示 USP4 通过调控 BRCA1 的蛋白质水平以及稳定性在 DNA 损伤修复以及基因组稳定性中发挥重要功能, 而 BRCA1 在抑制乳腺癌、卵巢癌的发生中发挥重要功能。基于此, 我们不禁思考: USP4 的表达水平与乳腺癌有什么关系? USP4 表达水平在乳腺癌患者中与 BRCA1 的表达又有怎样的关联性?

为了进一步探索 USP4 与 BRCA1 在乳腺癌中的关系, 本研究在乳腺癌患者组织中检测 USP4 和 BRCA1 的蛋白表达水平。首先, 本研究对 90 例的癌和癌旁组织成对陈列的乳腺癌肿瘤组织芯片进行免疫组织化学染色, 对每对癌和癌旁乳腺组织中的 USP4 和 BRCA1 进行染色和统计分析。免疫组化的评分标准遵循 H-SCORE 评分原则, 即根据组织的染色部分所占全体组织比例以及阳性组织染色深浅分 0、1、2、3 四个级别, 分别代表阴性染色、低表达、中等表达和高表达。结果显示(图 4.5.1), USP4 和 BRCA1 在乳腺癌病人的癌组织中显著低表达, 而在癌旁组织中表达水平较高。值得注意的是, USP4 的表达水平与乳腺癌患者的肿瘤分期和肿瘤分级呈现出负相关的趋势。在根据肿瘤 TNM 分级列示的免疫组织化学染色代表性示例中可以观察到, 早期/低级别乳腺癌患者(Stage I)的癌组织中 USP4 以及 BRCA1 的表达量明显高于晚期/高级别(Stage III)乳腺癌患者。

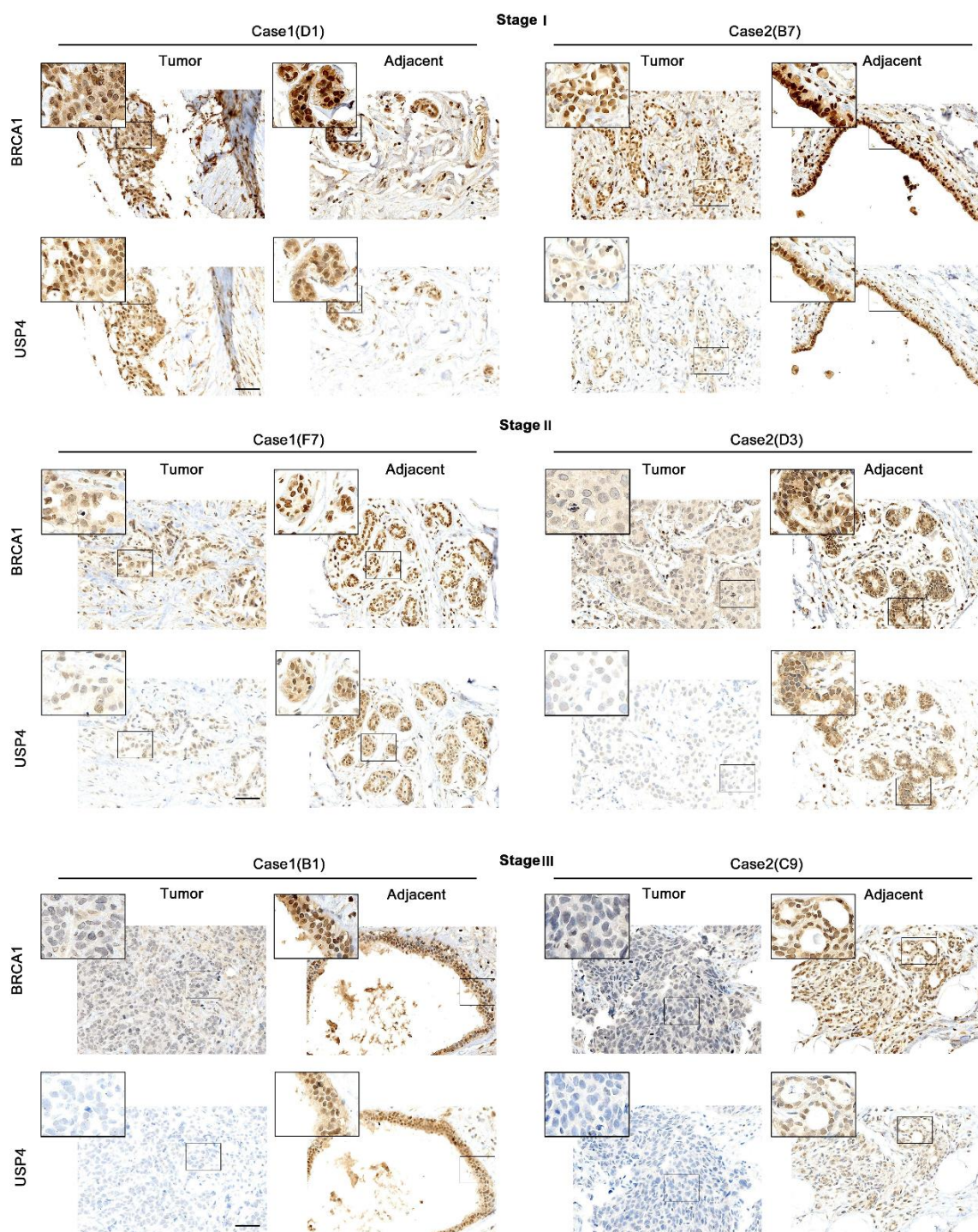


图 4.5.1 USP4 和 BRCA1 在乳腺癌组织中低表达

对 90 例乳腺癌肿瘤组织芯片进行免疫组化染色，对乳腺癌队列中配对的癌和癌旁组织内的 USP4 和 BRCA1 蛋白表达量进行检测，并根据乳腺癌患者的肿瘤分级陈列对应的 USP4 和 BRCA1 染色代表性图片。Bar, 50 μ m。

为了分析这一现象是否具备统计学差异，本研究纳入了更大的乳腺癌组织芯片队列，将乳腺癌组织例数扩大至 226 例，并对各级别乳腺癌中 USP4 的表达水平进行归纳统计，如图 4.5.2 所示，USP4 的表达水平的确与乳腺癌患者的肿瘤组织学分级密切相关，乳腺癌的恶性程度越高，USP4 的表达水平越低。

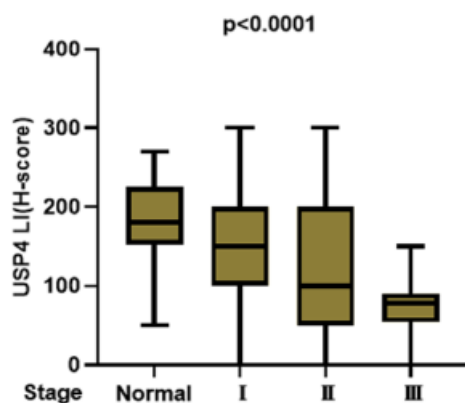


图 4.5.2 USP4 在乳腺癌组织中的表达与乳腺癌肿瘤分级呈负相关

对 226 例乳腺癌组织芯片进行免疫组化染色，检测 USP4 和 BRCA1 蛋白的表达量，根据 H-SCORE 打分规则进行统计分析。**** $p < 0.0001$ 。

接下来看，本研究进一步比较 USP4 和 BRCA1 在乳腺癌组织中的表达是否具有相关性。USP4 和 BRCA1 在癌组织中的 H-SCORE 分值 0 和 1 划分为低表达，2 为中等表达，3 为高表达，据此进行线性关系统计（图 4.5.3）或者卡方统计（表 4.5.1）分析，结果表明 USP4 和 BRCA1 在乳腺癌中呈显著正相关性。

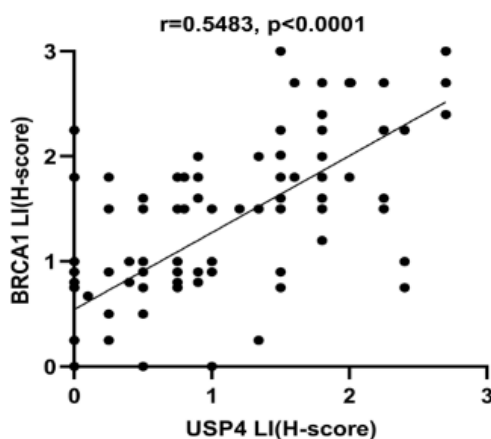


图 4.5.3 USP4 和 BRCA1 蛋白在乳腺癌组织中的表达正向相关

对 226 例乳腺癌组织芯片进行免疫组化染色，检测 USP4 和 BRCA1 蛋白的表达量，根据 H-SCORE 打分规则进行线性统计分析。**** $p < 0.0001$ 。

在本研究检测的 226 例乳腺癌组织中，有 143 例（63%）表现为 USP4 表达水平降低，134 例（59%）表现为 BRCA1 蛋白水平降低，USP4 与 BRCA1 的共同低表达出现在 102（45%）的乳腺癌病例中。这项统计数据表明在乳腺癌组织中 USP4 与 BRCA1 都呈现出低表达水平，并且二者的蛋白表达水平之间存在着显著的正向相关关系。

表 4.5.1 USP4 和 BRCA1 蛋白在乳腺癌组织中低表达且具有正相关关系

USP4 蛋白 质水平	BRCA1 蛋白质水平			总体	p 值
	-/+	++	+++		
-/+	102(45%)	33(15%)	8(4%)	143(63%)	p<0.0001
++	28(12%)	30(13%)	7(3%)	65(29%)	
+++	4(2%)	6(3%)	8(4%)	18(8%)	
总体	134(59%)	69(31%)	23(10%)	226(100%)	

对 226 例乳腺癌组织芯片进行免疫组化染色，检测 USP4 和 BRCA1 蛋白的表达量，根据 H-SCORE 打分规则进行卡方统计分析。**** p<0.0001。

4.6 USP4 在乳腺癌患者中低表达并存在功能缺陷型基因突变

本研究前期结果在细胞水平证实了 USP4 水解 BRCA1 的泛素链，进而稳定 BRCA1 的蛋白质水平，促进 BRCA1 在 DNA 损伤修复以及基因组稳定性中发挥作用。随后，本研究在肿瘤组织层面证明了 USP4 与 BRCA1 同步低表达，且与乳腺癌的发生、肿瘤分期密切相关，提示 USP4 可能通过调控 BRCA1 这一重要的肿瘤抑制因子而在乳腺癌的发生发展中起到抑癌作用。基于此，本研究推测，USP4 可能在乳腺癌中起到类似抑癌基因的作用。多项研究表明，抑癌因子在肿瘤组织中经常出现表达水平不足、基因突变、基因杂合缺失等情况，以 BRCA1 为例，BRCA1 在乳腺癌、卵巢癌组织中经常出现低表达，BRCA1/2 基因突变出现在约 50% 的家族性遗传性乳腺癌。那么，作为一个乳腺癌中潜在的抑癌基因，本研究提出两个问题并依次寻求答案：（1）USP4 是否在乳腺癌患者中低表达？（2）USP4 是否在乳腺癌患者中存在基因突变？

为了深入探索 USP4 与乳腺癌的关系，本研究从细胞、组织以及患者三个层面进行分析。首先，在细胞水平层面，本研究分析了 USP4 和 BRCA1 在多种乳腺癌细胞系和正常乳腺上皮细胞之间的表达水平。结果显示（图 4.6.1），相对于正常乳腺上皮细胞 MCF-10FA、MCF-10F，乳腺癌细胞系 SUM159、MDA-MB-231、MCF-7、LCC2、MDA-MB-436、BT20、BT549、HCC1395 以及 HCC1954 细胞中的 USP4 表达水平明显下降，且 BRCA1 的蛋白质水平与 USP4 表达水平呈现出一致的降低。尤其值得注意的是，luminal 型的乳腺癌细胞系 MCF-7 和 LCC2 的 USP4 蛋白水平略高于其他（均为 TNBC

型) 乳腺癌细胞系。这一结果表明, 在乳腺癌细胞系中 USP4 确实呈现出与 BRCA1 一致的普遍低表达状态, 且预后程度更差的 TNBC 型乳腺癌中 USP4 的表达水平有更低的趋势。

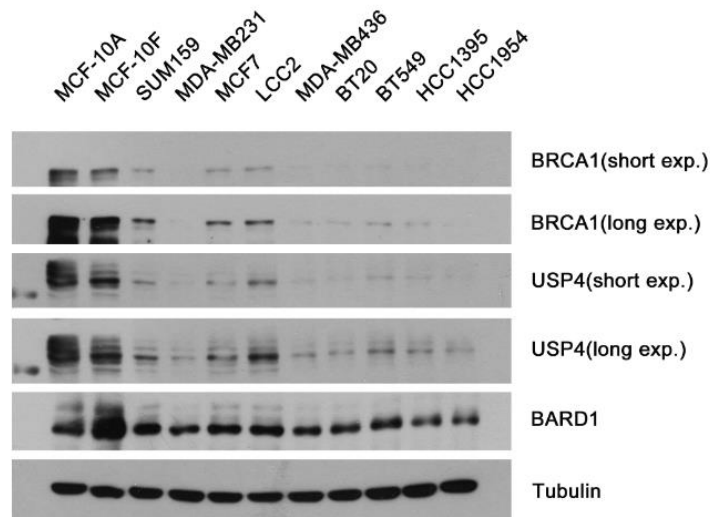


图 4.6.1 USP4 在乳腺癌细胞系中低表达

提取不同类型乳腺癌细胞及正常乳腺上皮细胞的全细胞裂解液, 通过 Western blotting 检测各类乳腺癌细胞系中 USP4 与 BRCA1 以及其他相关分子的蛋白含量水平。

在组织层面, 本研究通过免疫组织化学染色证实了 USP4 在乳腺癌肿瘤组织中呈现出明显的低表达状态, 且与 BRCA1 呈现出具有统计学意义的正向相关关系。

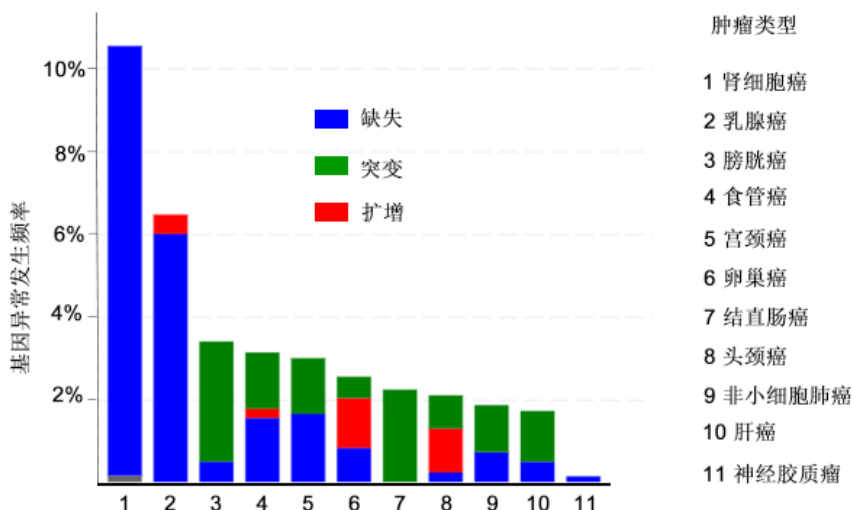


图 4.6.2 USP4 在多种肿瘤中存在突变和缺失情况

生物信息学分析 TCGA 等肿瘤数据库中各肿瘤类型 USP4 异常表达情况

在乳腺癌临床层面，本研究综合应用生物信息学方法对多个肿瘤数据库进行检索和数据分析，探索 USP4 基因异常与肿瘤发生的相关性；同时筛选获得临床相关的 USP4 突变体，在细胞水平验证这些突变体对 BRCA1 调控的作用。在 cBioPortal、Oncomine 以及 TCGA 肿瘤数据库中检索 USP4 基因的异常表达，如图 4.6.2 所示，USP4 基因的缺失和突变在包含肾细胞癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食管癌等多种类型的肿瘤患者中普遍发生。聚焦到乳腺癌中，在纳入共计 11,248 例乳腺癌患者的研究队列中，USP4 的缺失/低表达比例高达 6%，而 USP4 的扩增或过表达的比例不足 0.5%，提示 USP4 在乳腺癌中发挥着类似抑癌基因的作用。

本研究继续通过 TCGA 肿瘤数据库样本的 RNA 测序结果分析 USP4 的基因表达水平，以探究 USP4 在乳腺癌患者的肿瘤组织和正常人乳腺组织中是否有表达差异。结果显示（图 4.6.3），USP4 在乳腺癌组织中的表达远低于正常人的乳腺组织。

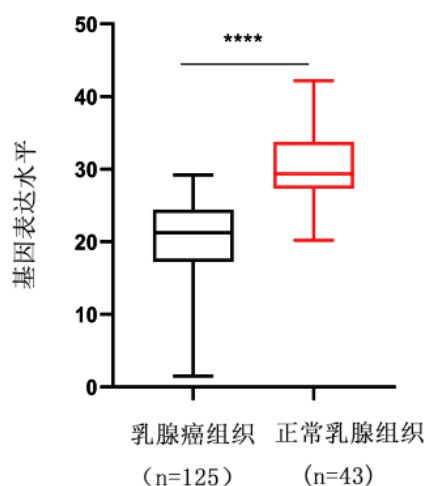


图 4.6.3 USP4 在乳腺癌中低表达

生物信息学分析 TCGA 肿瘤数据库中 USP4 在正常乳腺组织以及乳腺癌组织中的基因表达情况，并以 Graphpad 8.0 进行统计绘图，**** $p < 0.0001$ 。

此外，本研究发现，USP4 的表达水平与乳腺癌患者的预后风险密切相关。本研究在 TCGA 等肿瘤数据库中，利用 Kaplan–Meier 生存曲线分析了 USP4 与乳腺癌患者预后的关系。如图 4.6.4 所示，USP4 表达水平低的乳腺癌患者的总生存期显著低于 USP4 表达水平正常组；类似地，USP4 表达水平高的患者所对应的总生存期也更长。这一结果表明 USP4 的表达水平与乳腺癌患者的预后情况相关，提示 USP4 可能作为潜在的乳腺癌预后风险评估指标之一。

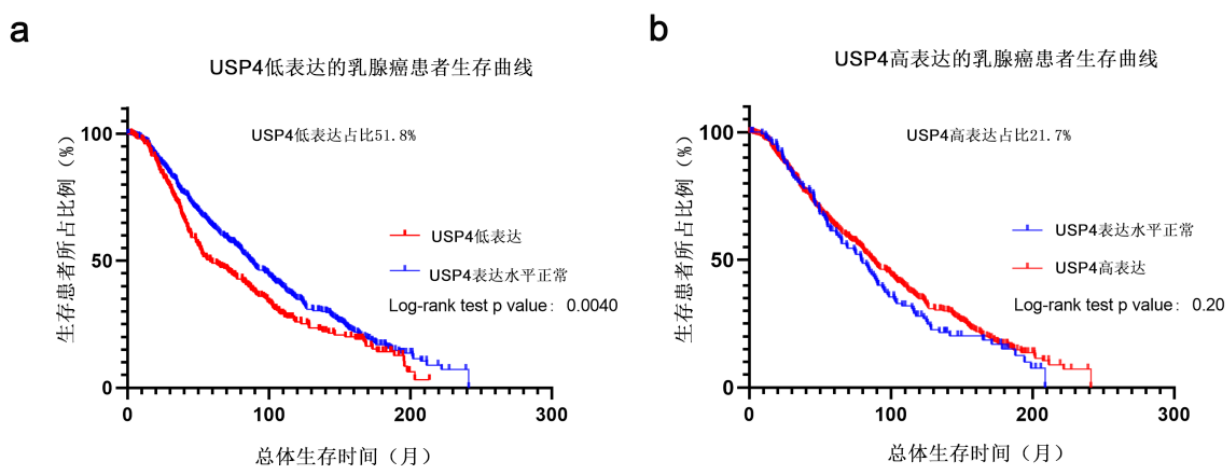


图 4.6.4 USP4 表达水平低的乳腺癌患者预后更差

生物信息学分析 cBioPortal 肿瘤数据库中 USP4 表达水平与乳腺癌患者总生存期的关系，并以 Graphpad 8.0 进行统计绘图，*** $p < 0.001$ 。

对于 USP4 在乳腺癌组织中的突变的情况，本研究通过检索 cBioPortal、Oncomine 以及 TCGA 肿瘤数据库，发现肿瘤患者中存在 USP4 基因突变，并从乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌等癌症类型中检索出 46 个 USP4 错义突变体（表 4.6.1），克隆并构建到 HA-PCMV 真核表达载体上，并以此进行细胞实验验证这些突变体的功能。

表 4.6.1 USP4 肿瘤患者临床突变体

USP4 临床突变体	所在结构域	是否影响 USP4 对 BRCA1 的 DUB 活性	是否影响 USP4 与 BRCA1 的相互作用	是否影响同源重组修复效率
USP4-R8H	DUSP	否	否	否
USP4-S258F	Linker	否	否	否
USP4-S295C	Linker	否	否	否
USP4-L301R	D1	是	是	是
USP4-S315C	D1	是	是	是
USP4-S468F	D1	否	否	否
USP4-I546V	UBL2	否	否	否
USP4-R559W	UBL2	是	是	是
USP4-R8C	DUSP	否	否	否
USP4-F42C	DUSP	否	否	否
USP4-K186N	UBL1	否	否	否
USP4-D428Y	D1	否	否	否
USP4-L459V	D1	否	否	否

续表 4.6.1 USP4 肿瘤患者临床突变体

USP4 临床突变体	所在结构域	是否影响 USP4 对 BRCA1 的 DUB 活性	是否影响 USP4 与 BRCA1 的相互作用	是否影响同源重组修复效率
USP4-E463K	D1	否	否	否
USP4-P480S	D1	否	否	否
USP4-R501T	UBL2	否	否	否
USP4-Q667E	Insert	否	否	否
USP4-I782T	D2	否	否	否
USP4-G4E	DUSP	否	否	否
USP4-R10Q	DUSP	否	否	否
USP4-S72F	DUSP	否	否	否
USP4-E166D	UBL1	否	否	否
USP4-Q227H	UBL1	否	否	否
USP4-P384S	D1	否	否	否
USP4-V538L	UBL2	否	否	否
USP4-S598L	Insert	否	否	否
USP4-Y822L	D2	否	否	否
USP4-A860S	D2	否	否	否
USP4-S39Q	DUSP	否	否	否
USP4-R411Q	D1	否	否	否
USP4-D517N	UBL2	否	否	否
USP4-V572M	Insert	否	否	否
USP4-P591Q	Insert	否	否	否
USP4-Q769K	Insert	否	否	否
USP4-D780Y	D2	否	否	否
USP4-A808Y	D2	否	否	否
USP4-A869T	D2	否	否	否
USP4-Q921K	D2	否	否	否

首先, 本研究在 HEK 293T 细胞过表达 BRCA1 质粒以及 USP4 野生型或 46 个突变体, 以检测各突变体对 BRCA1 蛋白水平的影响。结果显示(图 4.6.5), USP4 的 L301R、S315C 和 R559W 突变体无法上调外源性 BRCA1 蛋白水平, 而野生型 USP4 和其他 43 种 USP4 突变体均能够明显上调外源性 BRCA1 蛋白水平。

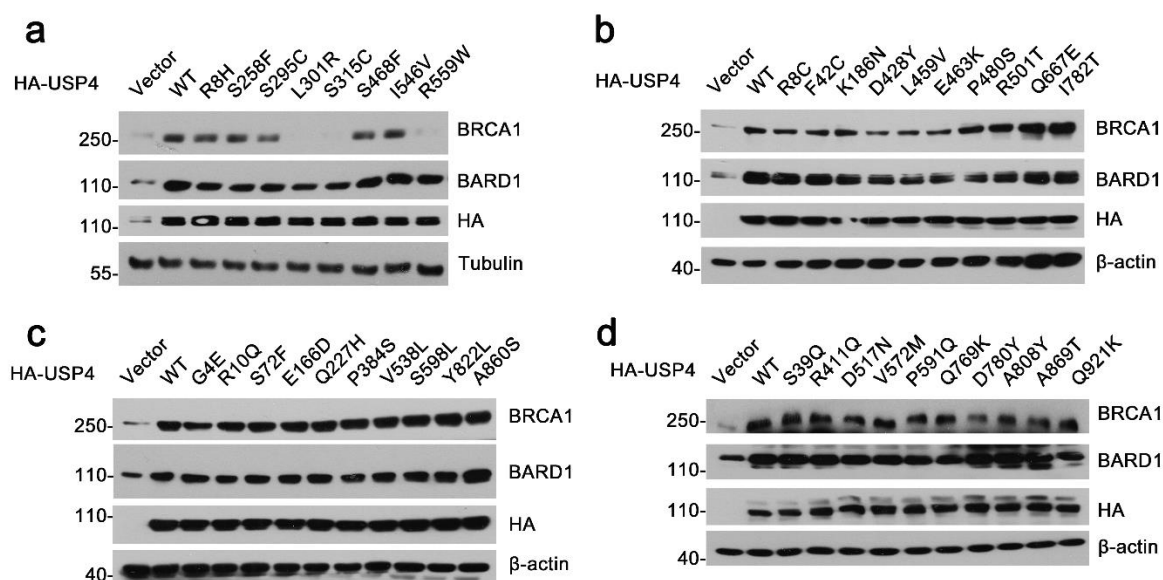


图 4.6.5 乳腺癌 USP4 L301R、S315C 和 R559W 突变体无法上调外源性 BRCA1 蛋白水平

(a-d) 在 HEK 293T 细胞中分别瞬时表达野生型或 HA-USP4 突变体以及 Flag-BRCA1，转染 48 h 后收集细胞裂解，并进行 Western blotting 检测。

为了进一步验证这些突变体是否能够影响内源性 BRCA1 的稳定性，本研究在 HEK 293T 细胞中过表达 USP4 野生型或第一组乳腺癌中的 8 个突变体质粒，Western blotting 检测内源性 BRCA1 蛋白的水平。如图 4.6.6 所示，与外源性结果一致，野生型 USP4 和其他 5 种 USP4 突变体能够显著上调细胞内源 BRCA1 的蛋白质水平，而转入 L301R、S315C 和 R559W 突变体的细胞中难以检测到内源性 BRCA1 蛋白，这表明这三种突变体丧失了对 BRCA1 蛋白水平的调控能力。

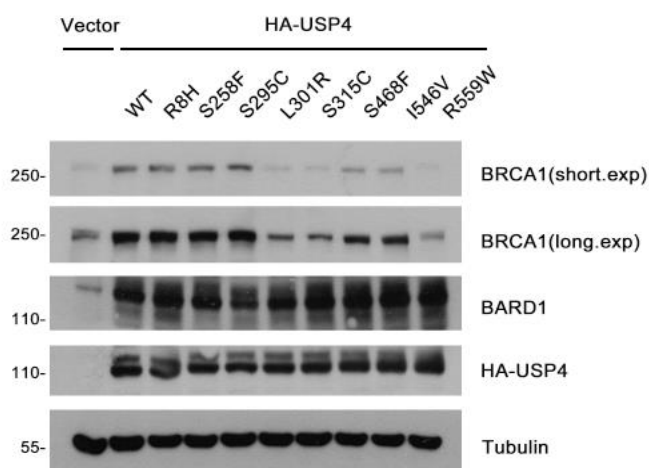


图 4.6.6 乳腺癌 USP4 L301R、S315C 和 R559W 突变体无法上调内源性 BRCA1 蛋白水平

在 HEK 293T 细胞中分别瞬时表达野生型或 HA-USP4 突变体质粒，转染 48 h 后收集细胞裂解，并进行 Western blotting 检测。

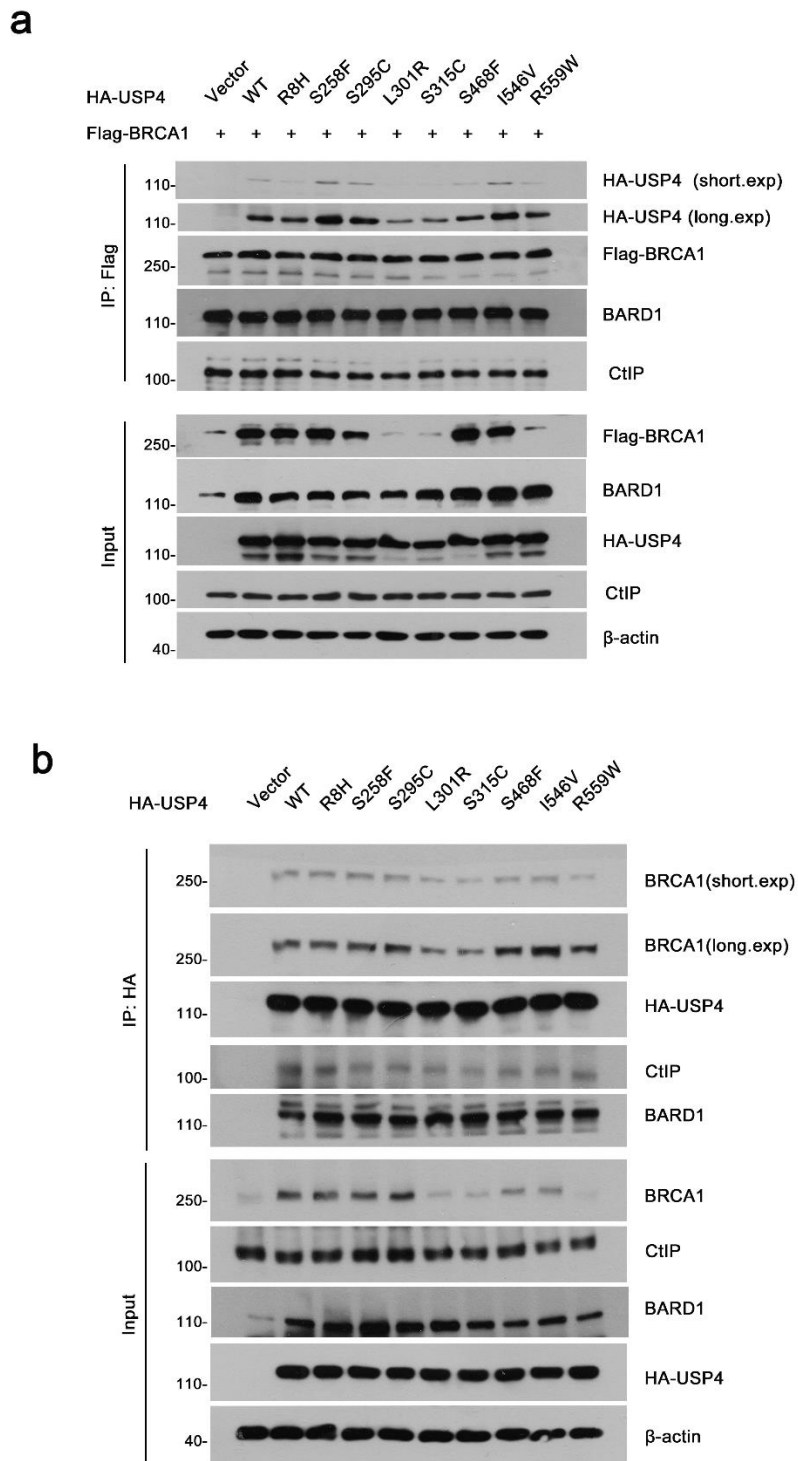


图 4.6.7 USP4 L301R、S315C 和 R559W 突变体无法与 BRCA1 蛋白相互作用

在 HEK 293T 细胞中分别瞬时表达 Flag-BRCA1 以及野生型或各 HA-USP4 突变体质粒，转染 48 h 后收集细胞裂解，利用 (a) anti-FLAG 琼脂糖珠子或 (b) anti-HA 琼脂糖珠子进行免疫共沉淀实验，并通过 Western blotting 对沉淀物进行检测。

为了探究 USP4 的 L301R、S315C 和 R559W 这三种突变体丧失对 BRCA1 蛋白水平和稳定性的调控能力的原因,本研究首先检测了这些突变体与 BRCA1 的相互作用情况。在 HEK 293T 细胞中瞬时转染 Flag-BRCA1 和 HA-USP4,继续培养 48 h 后,收集细胞分别进行 Flag-IP 以及 HA-IP 并通过 Western blotting 对沉淀物进行检测,以验证各突变体 USP4 与 BRCA1 的相互作用是否受影响。结果显示(图 4.6.7),野生型 USP4 以及其他 USP4 突变体均可以与 BRCA1 发生相互作用,而 L301R、S315C 两种 USP4 突变体结合 BRCA1 的能力几乎完全丧失。R559W 突变体结合 BRCA1 的能力则显著下降。这一结果表明,以上三种 USP4 突变体对于 BRCA1 调控能力的丧失可能与 BRCA1 的结合能力下降有关。

前面的研究已经证明 USP4 的 L301R、S315C 和 R559W 三种突变体无法与 BRCA1 相互作用,本研究据此推测:以上三种突变体对于 BRCA1 的调控功能丧失可能是由于其无法与 BRCA1 相互作用后,进而影响了 USP4 对 BRCA1 蛋白进行去泛素化的功能。为了验证这一推测,本研究对全长 BRCA1 和 BRCA1FS 片段分别开展了 Ni-NTA pull-down 实验以进行双重验证。结果显示(图 4.6.8),无论是对全长 BRCA1 还是 BRCA1FS 片段,野生型 USP4 以及其他 5 种突变体均能明显降低其泛素化修饰,而 L301R、S315C 和 R559W 三种突变体对两类 BRCA1 底物的泛素化水平都几乎没有影响。

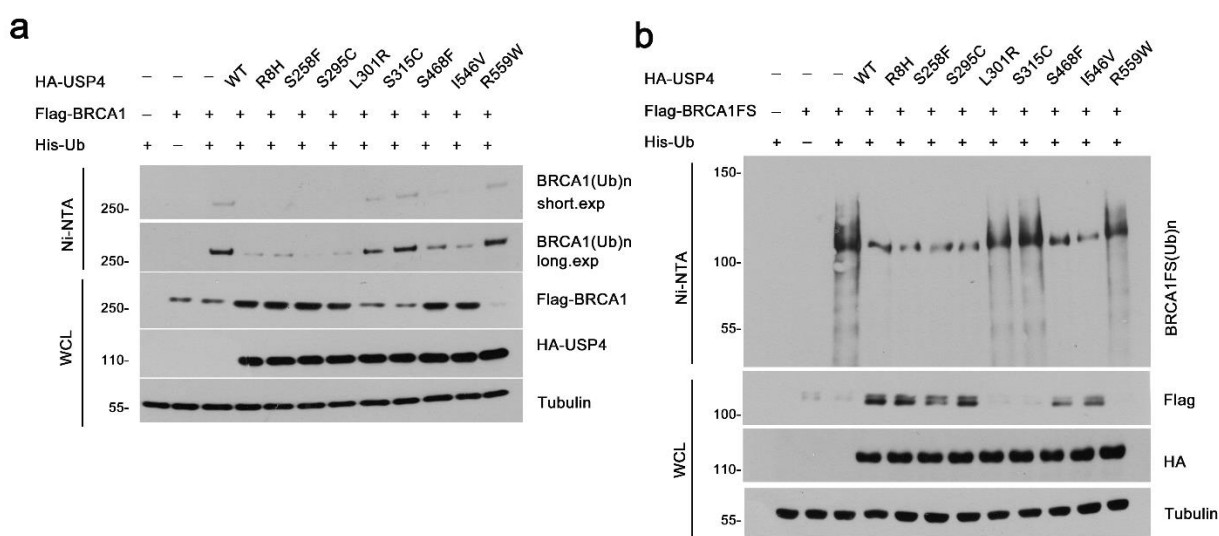


图 4.6.8 USP4 L301R、S315C 和 R559W 突变体无法对 BRCA1 蛋白进行去泛素化

(a) 在 HEK 293T 细胞内瞬时转入 His-Ub、Flag-BRCA1、以及野生型或各 HA-USP4 突变体等质粒,转染后 48 h 收细胞裂解,进行 Ni-NTA pull-down,通过 Western blotting 检测 BRCA1 的泛素化水平。(b) 在 HEK 293T 细胞内瞬时转入 His-Ub、Flag-BRCA1FS、以及野生型或各 HA-USP4 突变体等质粒,转染后 48 h 收细胞裂解,进行 Ni-NTA pull-down,通过 Western blotting 检测 BRCA1FS 的泛素化水平。

上述结果证明了 USP4 的 L301R、S315C 和 R559W 三种突变体无法与 BRCA1 的相互作用，进而无法通过去泛素化调控对 BRCA1 蛋白进行稳定。为了进一步探究以上突变体对 BRCA1 所参与的细胞活动的影响，本研究利用 U2OS-DR 同源重组报告系统检测了各个乳腺癌 USP4 突变体对于细胞同源重组效率是否有影响。结果显示(图 4.6.9 a)，在细胞内敲低内源性 USP4 时，细胞的同源重组效率会明显下调，而在此基础上重新过表达野生型 USP4 可以很大程度上回补细胞的同源重组效率，但是重新过表达 L301R、S315C 和 R559W 突变体则不能对同源重组效率进行回补。

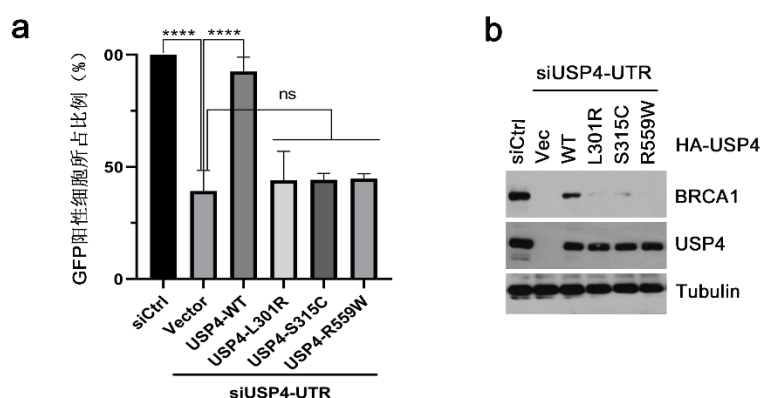


图 4.6.9 USP4 L301R、S315C 和 R559W 突变体无法正向调控同源重组修复效率

(a) 在同源重组报告系统细胞 (U2OS-DR) 中瞬时转染 siCtrl 或 siUSP4-UTR，转染 24 h 后向细胞转染 I-SceI 质粒以及 USP4 野生型或各突变体质粒，转染后 48 h 收细胞进行流式分析，比较各组间 GFP 阳性细胞占全体细胞的比例。(b) 通过 Western blotting 验证 U2OS-DR 细胞的 USP4 敲低情况。

通过对以上乳腺癌患者的临床突变体的探索分析，本研究发现 L301R、S315C 和 R559W 三种 USP4 突变体能够通过影响 USP4 与 BRCA1 的相互作用，进而使得 USP4 丧失了对 BRCA1 蛋白的去泛素化保护，导致 BRCA1 功能缺陷，最终使 BRCA1 参与的 DNA 损伤修复过程受损，导致机体的基因组稳定性下降。

第五章 讨论

BRCA1 是一个被广泛报道的乳腺癌抑癌蛋白。BRCA1 基因突变出现在超过 50% 的家族性遗传性乳腺癌患者中,携带 BRCA1 基因突变的女性一生中患乳腺癌的风险高达 80%。此外,研究发现 BRCA1 的低表达水平与散发性乳腺癌的疾病进程、预后风险密切相关^[5, 11]。作为如此重要的一个抑癌蛋白, BRCA1 蛋白的表达水平受到细胞精密且严格的调控,而泛素化修饰是其中最为普遍存在、有效的调控手段之一。目前研究表明 HERC2、FBXO44、HUWE1 以及 CRL4-DCAF8L1 等多种 E3 泛素连接酶可以对 BRCA1 进行多聚泛素化修饰,导致 BRCA1 蛋白降解^[33-36]。作为一个可逆的翻译后修饰手段,泛素化修饰导致的蛋白降解可以被相应的 DUBs 所逆转,这意味着 BRCA1 在细胞中的表达水平和蛋白稳态依赖于 DUBs 拮抗 BRCA1 的 E3 泛素连接酶功能。而在我们开展本课题时,能够特异性去除 BRCA1 的多聚泛素化修饰,进而促进 BRCA1 蛋白稳定性的去泛素化酶仍鲜有报道。

作为调控同源重组途径 DNA 损伤修复的重要分子, BRCA1 参与同源重组修复的多个环节,发挥着重要的调控功能。BRCC36、USP9X 和 BAP1 在内的几种 DUBs 已被证明能够通过影响 BRCA1 参与同源重组修复过程,但它们均非主要通过调控 BRCA1 的泛素化修饰而发挥功能的,它们可能不是主要的、直接调控 BRCA1 的去泛素化酶。其中, BAP1 最初被认为是 BRCA1 相互作用蛋白,后来的研究表明 BAP1 主要是结合 BARD1 并干扰 BRCA1/BARD1 异源二聚体的形成,抑制 BRCA1/BARD1 的 E3 泛素连接酶活性,因此抑制 BRCA1/BARD1 参与的细胞功能。需要注意的是, BAP1 对于 BRCA1/BARD1 的调控并不依赖于其 DUB 催化活性^[100]。BRCC36 是 BRCA1-A 复合物的一个蛋白亚基,对于调控 DSB 位点 K63 类型的泛素化修饰水平至关重要,但是 BRCC36 的敲低或过表达对于 BRCA1 蛋白的稳定性似乎没有太大影响^[151, 277]。与 BAP1 和 BRCC36 不同, USP9X 可以直接影响 BRCA1 的表达水平,但此影响是否是通过 USP9X 去泛素化调控 BRCA1 所介导的,目前尚存争议。有研究表明, USP9X 能够与 BRCA1 相互作用,敲低 USP9X 可以导致外源 BRCA1 泛素化水平增加,提示它可以对 BRCA1 进行去泛素化而稳定后者^[210];也有研究表明 USP9X 是通过调节 BRCA1 的 mRNA 丰度进而调控其蛋白水平,该过程与 USP9X 的 DUB 活性无关^[30]。以上研究成果提示 BRCA1 的去泛素化酶鉴定仍是一个需要进一步探究的科学问题。

本研究通过筛选去泛素化酶家族成员,鉴定出 USP4 分子可以显著上调细胞内 BRCA1 蛋白水平,并通过一系列细胞及功能学实验证实 USP4 能够直接与 BRCA1 相互作用,去除 BRCA1 的 K48 连接多聚泛素链,拮抗 BRCA1 蛋白的泛素-蛋白酶体途

径降解，最终对 BRCA1 蛋白的稳定性和生物学功能起到至关重要的作用。

泛素化与去泛素化修饰过程广泛参与到 DNA 损伤修复应答以及细胞周期检验点等 BRCA1 相关细胞生物学功能，在本研究揭示 USP4 通过调控 BRCA1 蛋白质稳定性进而影响 DNA 损伤修复之前，USP4 在同源重组修复中的作用已被多项研究证明，只是具体的蛋白质底物以及调控机制不同。这表明 USP4 能够通过调控同源重组修复通路中不同的关键蛋白，对 DNA 损伤修复过程进行多层次、多环节的调控。剑桥大学 Ryotaro Nishi 研究团队通过大规模、系统性筛选，鉴定出 USP4、USP15 和 USP11 三个分子都能够参与调控 DNA 损伤修复过程。值得注意的是，USP4、USP15 和 USP11 是三个在进化过程、氨基酸序列、分子结构方面具有高度同源性的去泛素化酶分子，但是它们参与 DNA 损伤修复的机制当时并不清楚。接下来的多项研究陆续揭示了三种去泛素化酶调控 DNA 损伤应答过程的具体机制。USP11 可以通过去泛素化 p53，对 DNA 损伤修复的路径选择进行调控^[211, 301]；USP15 是通过去泛素化 BARD1 的 K63 多聚泛素链进而调控同源重组修复^[302]；USP4 可以与 CtIP/MRN 复合物相互作用，促进 CtIP 被招募到 DNA 损伤位点处，启动 DNA 末端切除过程并促进同源重组修复。值得注意的是，USP4 通过调控 CtIP 进而调控 DNA 末端切除的过程中，USP4 对 CtIP 的泛素化并没有影响，USP4 对 CtIP 的定位调控也不依赖于 USP4 的 DUB 活性^[110, 111]；而研究也发现 USP4 的 DUB 活性也是细胞同源重组所必需^[111]，这些结果强烈提示 USP4 参与 HR 修复可能还另有其他途径或机制。本研究证实，USP4 还可以通过去除 BRCA1 的 K48 连接多聚泛素链来稳定 BRCA1 蛋白，进而促进同源重组修复过程。本研究在敲除 CtIP 的细胞中进行验证性实验，证明了 USP4-BRCA1 之间的相互作用是独立于 USP4-CtIP 通路的。这表明，USP4-BRCA1 调控同源重组修复的信号通路是一种不同于 USP4-CtIP 的独特途径。至此，本研究为 USP4 对于 DNA 损伤修复的调控机制提供了一条新的证据，拓展了对于 USP4 在 DNA 损伤修复中作用机制的认知。

协同的亚细胞定位是 DUBs 对蛋白质底物实施去泛素化调控的前提，BRCA1 和 USP 都主要分布于细胞核，这与 USP4 通过直接去泛素化 BRCA1 调节其蛋白水平及稳定性的功能相符。更重要的是，BRCA1 的蛋白质水平和功能本身就在细胞周期的不同阶段呈现出周期依赖性的差异，其蛋白表达水平的高峰以及主要的细胞生物学功能均在 S/G2 期^[299]。作为机体内如此重要的抑癌蛋白，泛素化以及去泛素化修饰对 BRCA1 蛋白的调控应该具有严格的时空依赖性，以确保 BRCA1 在细胞周期内的蛋白质水平与其生物学功能相匹配。考虑到肿瘤细胞内的信号通路、代谢环境可能已经发生变化，本研究在正常的乳腺上皮细胞中开展了内源性的 BRCA1 以及 USP4 在时空层面的关联性研究，证实了 BRCA1 和 USP4 的表达水平以及相互作用强度呈现出显著的细胞周期相关性，二者均在 S 期和 G2 期达到峰值，这一结果表明 USP4 在细胞周期进程中调节细胞 BRCA1 蛋白稳态的生理作用。

此外, 多项研究表明 USP4 是一个核质穿梭蛋白, 多数情况下定位于细胞核中。但是在 TGF- β 等刺激条件下, USP4 受到磷酸化修饰, 从细胞核定位到细胞质或细胞膜, 并与相应靶蛋白相互作用以调控在细胞质或细胞膜中进行的细胞活动。例如, USP4 参与的 TGF- β 信号通路、PI3K/Akt/mTOR 信号通路、Wnt/ β -catenin 信号通路主要在细胞质和细胞膜进行, 而 USP4 参与的 DNA 损伤修复、细胞周期调控以及 pre-mRNA 剪接过程主要在细胞核内进行, 这意味着 USP4 在细胞内受到严格的时空调控以协调其在各项细胞活动内对相应蛋白质底物的调控。现有研究表明, USP4 的核质穿梭可以被磷酸化修饰过程所调控, 例如在 USP4 调节 TGF- β 通路的过程中, Akt 介导 USP4 的磷酸化并促进 USP4 从细胞核转移到细胞膜, 对细胞膜上的 T β RI 发挥去泛素化功能^[154]; 在 USP4 调节 pre-mRNA 剪接体的过程中, CDKs 参与调节 USP4 的磷酸化和核质穿梭过程, 去磷酸化状态的 USP4 倾向于在细胞核内积累^[61]。那么, USP4 在磷酸化或其他翻译后修饰的调控下进行细胞内转位的过程是否与其在细胞周期内与 BRCA1 呈现出相似的波动性有关? 此外, 多项研究结果表明, 磷酸化状态的 USP4 倾向于定位于细胞质、细胞膜并调控发生于细胞质及细胞膜的生物学过程, 而去磷酸化状态的 USP4 主要定位于细胞核, 并调控细胞核内发生的细胞活动, 那么 USP4 的磷酸化修饰对于其调控 BRCA1 蛋白去泛素化修饰、表达水平及蛋白质稳定性的影响是怎样的? USP4 的磷酸化修饰是否能够通过影响同源重组修复等细胞生命活动影响乳腺癌的发生发展? 这一系列问题需要后续研究予以验证。

BRCA1 在抑制乳腺癌中的关键作用已被广泛认可, 基于 USP4 可以通过去泛素化调控 BRCA1 蛋白稳定性, 本研究推测在乳腺癌患者中应该可以观察到 USP4 基因突变、缺失等异常表达, 并且 USP4 的异常表达可能与 BRCA1 水平的改变相关。本研究在细胞、组织、临床患者三个层面做了 USP4 与乳腺癌关系的探索性试验。在细胞水平, 本研究发现 USP4 在多种乳腺癌细胞内低表达, 并且三阴性乳腺癌细胞内 USP4 的表达水平明显低于 luminal 型乳腺癌细胞以及正常乳腺上皮细胞, 这初步表明 USP4 的表达水平可能与乳腺癌的分子分型及预后风险相关。此外, 通过对一系列 USP4 稳定乳腺癌细胞进行药物敏感性实验, 本研究发现 USP4 可以通过调控 BRCA1 参与的细胞功能介导细胞对肿瘤化疗药物以及 PARP 抑制剂的应答。在肿瘤组织层面, 本研究在超过 200 例乳腺癌患者的肿瘤组织中进行 USP4 以及 BRCA1 免疫组织化学染色, 统计数据显示, 63% 的乳腺癌组织中出现了 USP4 表达降低, 59% 的乳腺癌组织中出现了 BRCA1 表达降低, 并且 USP4 和 BRCA1 的表达水平之间存在显著的正向相关关系。值得注意的是, 低级别 (stage I) 乳腺癌患者的癌组织中 USP4 以及 BRCA1 的表达量明显高于高级别 (stage II, III) 乳腺癌患者, 这意味着 USP4 的表达水平与乳腺癌患者的肿瘤分期和肿瘤分级呈现反向相关关系。在临床患者层面, 通过检索 TCGA 等肿瘤数据库, 本研究证明 USP4 表达水平低的乳腺癌患者的总生存期显著低于 USP4 表达水平

正常组，说明 USP4 的表达水平与乳腺癌患者的预后相关。综合上述看来，USP4 极有可能影响乳腺癌发生发展，且可能是潜在的乳腺癌化疗生物学靶点。

然而机制研究和临床应用之间还存在很大的距离，一个关键原因就是 USP4 对蛋白质底物的调控是一个复杂而动态的过程，在机体内 USP4 所参与的各项生物学活动可能在肿瘤发生发展过程中扮演完全不同的角色，所以细胞组织层面的研究成果尚不足以解释临床患者层面的结果。目前已被报道的 USP4 相互作用蛋白以及去泛素化蛋白质底物已超过 10 种，能够去除的泛素化修饰类型也呈现出多样性，所以体现为 USP4 能够直接或间接参与协调多个重要的信号传导通路与细胞活动。已有的研究成果表明 USP4 具有多样性、复杂性的功能，有潜力通过调控不同的蛋白质底物参与协调多个重要的信号传导通路与细胞活动，而 USP4 在细胞生物学过程中的作用在不同疾病、同一种疾病的不同阶段的变化，都可能导致 USP4 最终呈现出功能的复杂性、甚至是矛盾性。例如 USP4 既能促进又能抑制 NF- κ B 通路、TGF- β 信号通路以及 Wnt/ β -catenin 信号通路，进而在免疫炎症应答、上皮间质转化以及肿瘤形成等过程中发挥正向或负向调控作用。更重要的是，USP4 在肿瘤发生发展过程中也展现出促癌和抑癌两种潜力，在不同的肿瘤类型中其表达水平与预后风险也呈现出正向或负向的相关关系。这意味着在分析特定的疾病或细胞生命过程时，需要分析和理解 USP4 及其靶蛋白之间的相互作用以及去泛素化调控过程对于这些蛋白质的表达水平、细胞内定位以及功能活性有何影响，这将有助于理解 USP4 在疾病发生和进展过程中的意义。

对于肿瘤发生过程，USP4 可以通过调控 BRCA1 蛋白稳定性以及促进 CtIP 募集到 DNA 损伤位点，最终促进 DNA 损伤修复，起到维持基因组稳定性、抑制肿瘤发生的作用^[110,111]；另一方面，USP4 可以通过 HDAC2 以及 ARF-BP1 负向调控 p53 蛋白这一重要的抑癌因子，在此层面 USP4 又似乎存在一定的促癌潜力^[222,244]。在 TCGA 数据库中分析各类型肿瘤中 USP4 的 mRNA 表达水平可以发现，USP4 在乳腺癌、卵巢癌、肾癌、肺癌、尿路上皮癌、头颈鳞癌等多种恶性实体瘤中呈现出普遍低表达水平(图 5.1)。

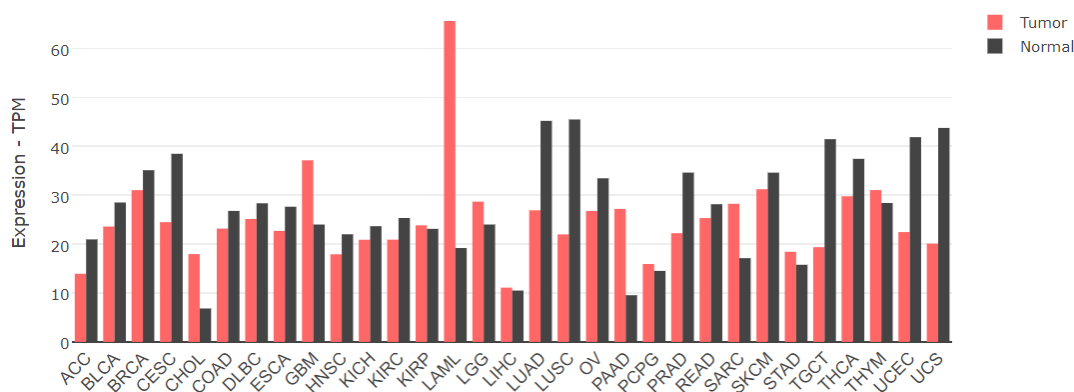


图 5.1 USP4 在多种恶性实体肿瘤中低表达

生物信息学分析 TCGA 肿瘤数据库中乳腺癌、肾细胞癌、肺癌、卵巢癌等各种肿瘤类型中, USP4 在肿瘤组织以及相应正常组织中的 mRNA 表达水平。

在肿瘤的发展进程中, USP4 同样发挥着重要作用。USP4 可以直接参与或作为去泛素化酶调控蛋白质底物进而参与到包括 TGF- β 通路介导的 EMT 以及细胞凋亡过程、Wnt/ β -catenin 通路介导的胚胎发育、组织再生和肿瘤形成过程以及 NF- κ B 通路和 RIG-I 通路介导的免疫炎症反应、细胞增殖分化和细胞凋亡等多种细胞生命活动。临床实践也表明, USP4 与肿瘤的侵袭转移潜能以及患者预后风险都密切相关。如图 5.2 所示, 在乳腺癌、乳头状肾细胞癌、肾透明细胞癌以及肺腺癌中, USP4 表达水平高的肿瘤患者具有显著更好的预后状况。

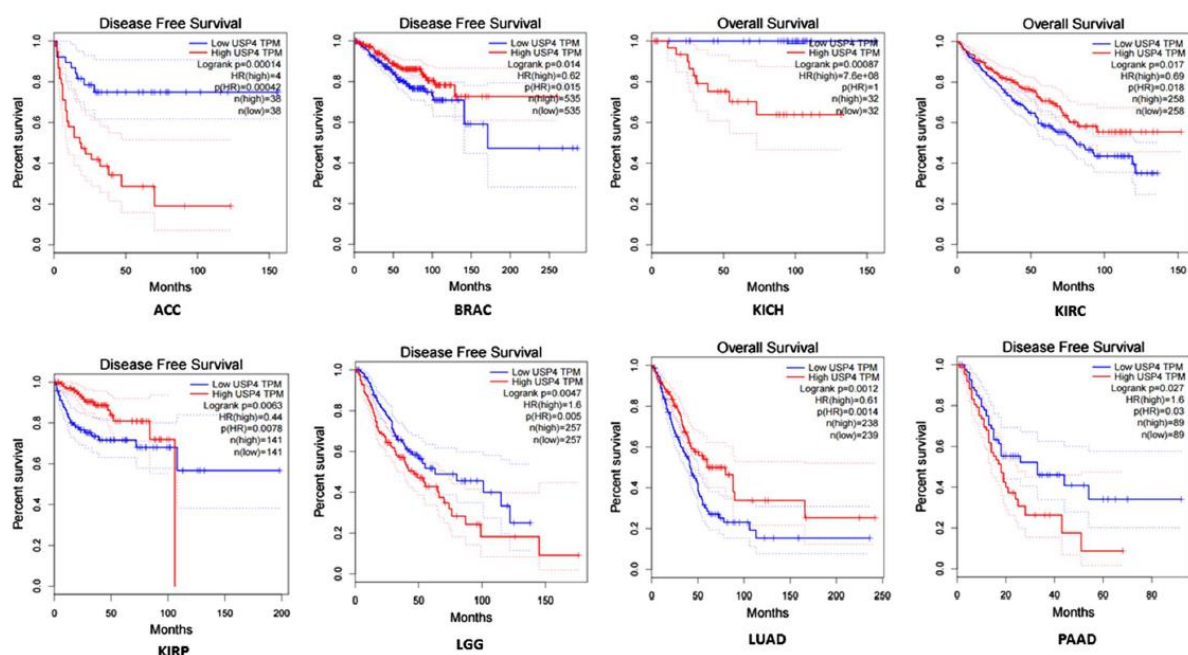


图 5.2 USP4 表达水平与各类癌症的预后情况^[65]

Kaplan–Meier 生存曲线分析在乳腺癌、肾细胞癌、肺癌、卵巢癌等各类肿瘤类型中, USP4 的表达水平与肿瘤患者无病生存期(Disease-free survival, DFS)的相关关系。

为了更好地阐明 USP4 在维持基因组稳定性以及抑制乳腺癌的作用, 本研究还将在未来研究中构建 USP4 特异性敲除的乳腺癌小鼠模型, 一方面研究小鼠的乳腺癌成瘤能力和预后风险等表型, 另一方面对小鼠的细胞、组织进行提取, 构建 MEF 细胞并研究敲除 USP4 对于小鼠细胞 BRCA1 蛋白水平、稳定性以及 BRCA1 参与的同源重组修复、复制叉保护和基因组稳定性等细胞功能的影响。此外, 本研究还计划构建人源异种移植模型(PDX)小鼠模型, 将乳腺癌病人来源的肿瘤组织或细胞处理后移植到免疫缺陷小鼠, 最大程度上模拟人体内肿瘤细胞的生长状况、代谢环境、分子机制、形态特征以及生理病理通路等, 更深入、直观地去评价 USP4 介导的乳腺癌细胞化疗药物抵抗能力、PARP 抑制剂应答能力, 进一步丰富对于 USP4 调控乳腺癌发生发展的认识, 对

于 USP4 潜在的临床应用价值有较大的指导意义。

USP4 的临床转化面临的另一个挑战就是目前尚无特异性针对 USP4 的抑制剂进入临床试验阶段。目前研究中使用的 USP4 抑制剂是 Vialinin A, 一种小分子抑制剂, 能够非特异地作用于 USP4、USP5、UCH-L1 和 SENP1, 并且 Vialinin A 还可以显著降低机体内 TNF- α 的 mRNA 表达量, 并以剂量依赖的方式抑制 TNF- α 的产生和释放^[303, 304]。这意味着目前多项研究中对于 USP4 的药物抑制缺乏 DUB 分子特异性, 甚至对于 TNF- α 参与的细胞免疫炎症应答过程有影响, 尽管可能会对肿瘤发生发展相关过程存在有益影响, 但也可能会对 USP5、UCH-L1、SENP1 以及 TNF- α 调控的多种细胞进程产生不利影响, 从而导致临床相关毒副作用。

此外, 本研究在 TCGA 数据库对 USP4 的基因突变进行检索, 发现 USP4 基因突变及拷贝数降低在癌症病例中富集, 本研究选取了乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌等几个癌种中的共计 46 个 USP4 突变体, 并通过 Western blotting 检测、免疫共沉淀实验、蛋白半衰期实验以及一系列泛素化实验, 从中鉴定出 L301R、S315C 以及 R559W 等 3 个 USP4 功能丧失型突变体。这 3 种 USP4 突变体丧失了与 BRCA1 相互作用并对 BRCA1 蛋白进行去泛素化的能力, 导致 BRCA1 蛋白水平显著降低。更重要的是, 表达以上 USP4 突变体的乳腺癌细胞在调控同源重组修复方面也存在缺陷。有趣的是, 目前发现的 USP4 功能丧失突变体均位于 USP4 的催化结构域, 这表明突变体的功能丧失可能影响了 USP4 的去泛素化酶催化活性。但是根据现有研究结果还无法下这样的结论, 催化结构域的点突变是如何影响 USP4 催化活性的, 是否影响了催化中心的空间结构或空间构象稳定性? 是否影响了泛素分子的结合或解离能力? 这些都是今后本研究将进一步研究和验证的问题。

第六章 结论

本研究发现并证实了乳腺癌抑癌蛋白 BRCA1 的特异性去泛素化酶 USP4，明确了 USP4 通过去泛素化调控 BRCA1 蛋白质的稳定性，进而正向调控同源重组修复等 BRCA1 相关的功能。同时，本研究发现 USP4 在乳腺癌患者肿瘤组织中普遍低表达，并且与 BRCA1 表达水平呈现显著正向相关关系。本研究具体结论如下：

1. USP4 是一种 BRCA1 特异性去泛素化酶，能够去除 BRCA1 蛋白的 K48 连接多聚泛素化修饰，拮抗 BRCA1 经由泛素-蛋白酶体途径降解，正向调控 BRCA1 蛋白的稳定性；
2. USP4 与 BRCA1 蛋白存在直接相互作用，二者均在细胞周期内呈现同步性、波动性表达，在 S 以及 G2 期达到表达水平和相互作用强度的峰值。这一现象提示了 USP4 在细胞周期进程中的生理功能；
3. USP4 正向调控 BRCA1 介导的同源重组，进而影响细胞对电离辐射、肿瘤化疗药物以及 PARP 抑制剂的敏感性；
4. USP4 在乳腺癌细胞和组织中呈现低表达，且其表达与 BRCA1 的表达水平显著正向相关；
5. 乳腺癌中 USP4 异常还表现为基因突变。乳腺癌临床 USP4 突变体 L301R、S315C 以及 R559W 被证明是 USP4 的功能丧失型突变体，与 BRCA1 相互作用降低或缺失，不能对 BRCA1 进行去泛素化，因而缺乏调控 BRCA1 蛋白质稳定性的功能。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Fuchs H E and Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021, 71(3):209-249
- [2] Chen W, Zheng R, Baade P D, Zhang S, Zeng H, Bray F, Jemal A, Yu X Q and He J. Cancer statistics in China, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2016, 66(2): 115-132
- [3] Feng R-M, Zong Y-N, Cao S-M and Xu R-H. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? *Cancer Communications (London, England)*. 2019, 39(1): 22
- [4] Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal P A, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett L M and Ding W. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science (New York, NY)*. 1994, 266(5182): 66-71
- [5] Kwong A, Shin V Y, Ho J C W, Kang E, Nakamura S, Teo S-H, Lee A S G, Sng J-H, Ginsburg O M, Kurian A W, Weitzel J N, Siu M-T, Law F B F, Chan T-L, Narod S A, Ford J M, Ma E S K and Kim S-W. Comprehensive spectrum of BRCA1 and BRCA2 deleterious mutations in breast cancer in Asian countries. *Journal of Medical Genetics*. 2016, 53(1): 15-23
- [6] Rosen E M, Fan S and Ma Y. BRCA1 regulation of transcription. *Cancer Letters*. 2006, 236(2): 175-185
- [7] Zheng W, Luo F, Lu J J, Baltayan A, Press M F, Zhang Z F and Pike M C. Reduction of BRCA1 expression in sporadic ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. 2000, 76(3): 294-300
- [8] Somasundaram K. Breast cancer gene 1 (BRCA1): role in cell cycle regulation and DNA repair--perhaps through transcription. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2003, 88(6): 1084-1091
- [9] Yoshida K and Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Science*. 2004, 95(11): 866-871
- [10] Venkitaraman A R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*. 2002, 108(2): 171-182
- [11] Yoshikawa K, Honda K, Inamoto T, Shinohara H, Yamauchi A, Suga K, Okuyama T, Shimada T, Kodama H, Noguchi S, Gazdar A F, Yamaoka Y and Takahashi R. Reduction of BRCA1 protein expression in Japanese sporadic breast carcinomas and its frequent loss in BRCA1-associated cases. *Clinical Cancer Research*. 1999, 5(6): 1249-1261
- [12] Thompson M E, Jensen R A, Obermiller P S, Page D L and Holt J T. Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. *Nature Genetics*. 1995, 9(4): 444-450
- [13] Staff S, Isola J and Tanner M. Haplo-insufficiency of BRCA1 in sporadic breast cancer. *Cancer Research*. 2003, 63(16): 4978-4983
- [14] Birgisdottir V, Stefansson O A, Bodvarsdottir S K, Hilmarsdottir H, Jonasson J G and Eyfjord J E. Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2006, 8(4): R38
- [15] Clark S L, Rodriguez A M, Snyder R R, Hankins G D V and Boehning D. Structure-Function Of The Tumor Suppressor BRCA1. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2012, 1(1): e201204005
- [16] Lee M S, Green R, Marsillac S M, Coquelle N, Williams R S, Yeung T, Foo D, Hau D D, Hui B, Monteiro A N A and Glover J N M. Comprehensive analysis of missense variations in the BRCT domain of

- BRCA1 by structural and functional assays. *Cancer Research*. 2010, 70(12): 4880-4890
- [17] Williams R S, Chasman D I, Hau D D, Hui B, Lau A Y and Glover J N M. Detection of protein folding defects caused by BRCA1-BRCT truncation and missense mutations. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278(52): 53007-53016
- [18] Kim H, Huang J and Chen J. CCDC98 is a BRCA1-BRCT domain-binding protein involved in the DNA damage response. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2007, 14(8): 710-715
- [19] Wang B. BRCA1 tumor suppressor network: focusing on its tail. *Cell & bioscience*. 2012, 2(1): 6
- [20] Elia A E H and Elledge S J. BRCA1 as tumor suppressor: lord without its RING? *Breast Cancer Research*. 2012, 14(2): 306
- [21] Roy R, Chun J and Powell S N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nature Reviews Cancer*. 2011, 12(1): 68-78
- [22] Deng C-X. BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Research*. 2006, 34(5): 1416-1426
- [23] Silver D P and Livingston D M. Mechanisms of BRCA1 tumor suppression. *Cancer Discovery*. 2012, 2(8): 679-684
- [24] Pathania S, Bade S, Le Guillou M, Burke K, Reed R, Bowman-Colin C, Su Y, Ting D T, Polyak K, Richardson A L, Feunteun J, Garber J E and Livingston D M. BRCA1 haploinsufficiency for replication stress suppression in primary cells. *Nature Communications*. 2014, 5: 5496
- [25] Sedic M and Kuperwasser C. BRCA1-haploinsufficiency: Unraveling the molecular and cellular basis for tissue-specific cancer. *Cell Cycle*. 2016, 15(5): 621-627
- [26] De Siervi A, De Luca P, Byun J S, Di L J, Fufa T, Haggerty C M, Vazquez E, Moiola C, Longo D L and Gardner K. Transcriptional autoregulation by BRCA1. *Cancer Research*. 2010, 70(2): 532-542
- [27] Elton T S, Selemon H, Elton S M and Parinandi N L. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene*. 2013, 532(1): 1-12
- [28] De Summa S, Pinto R, Pilato B, Sambiasi D, Porcelli L, Guida G, Mattioli E, Paradiso A, Merla G, Micale L, De Nittis P and Tommasi S. Expression of base excision repair key factors and miR17 in familial and sporadic breast cancer. *Cell Death & Disease*. 2014, 5: e1076
- [29] Khachigian L M. The Yin and Yang of YY1 in tumor growth and suppression. *International Journal of Cancer*. 2018, 143(3): 460-465
- [30] O'dea R and Santocanale C. Non-canonical regulation of homologous recombination DNA repair by the USP9X deubiquitylase. *Journal of Cell Science*. 2020, 133(3): jcs233437
- [31] Xu X, Gammon M D, Zhang Y, Bestor T H, Zeisel S H, Wetmur J G, Wallenstein S, Bradshaw P T, Garbowski G, Teitelbaum S L, Neugut A I, Santella R M and Chen J. BRCA1 promoter methylation is associated with increased mortality among women with breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2009, 115(2): 397-404
- [32] Catteau A and Morris J R. BRCA1 methylation: a significant role in tumour development? *Seminars in Cancer Biology*. 2002, 12(5): 359-371
- [33] Wu W, Sato K, Koike A, Nishikawa H, Koizumi H, Venkitaraman A R and Ohta T. HERC2 Is an E3 Ligase That Targets BRCA1 for Degradation. *Cancer Research*. 2010, 70(15): 6384-6392
- [34] Lu Y, Li J, Cheng D, Parameswaran B, Zhang S, Jiang Z, Yew P R, Peng J, Ye Q and Hu Y. The F-box protein FBXO44 mediates BRCA1 ubiquitination and degradation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012, 287(49): 41014-41022
- [35] Wang X, Lu G, Li L, Yi J, Yan K, Wang Y, Zhu B, Kuang J, Lin M, Zhang S and Shao G. HUWE1 interacts with BRCA1 and promotes its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochemical*

- and Biophysical Research Communications. 2014, 444(3): 290-295
- [36] Liu F, Han Q, Zhang T, Chang F, Deng J, Huang X, Wang W, Xu Y, Li Q, Xu L, Zhang B, Li W, Li L, Su Y, Li Y and Shao G. CRL4-DCAF8L1 Regulates BRCA1 and BARD1 Protein Stability. *International Journal of Biological Sciences*. 2022, 18(4): 1434-1450
- [37] Clague M J, Urbé S and Komander D. Breaking the chains: deubiquitylating enzyme specificity begets function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019, 20(6): 338-352
- [38] Snyder N A and Silva G M. Deubiquitinating enzymes (DUBs): Regulation, homeostasis, and oxidative stress response. *The Journal of Biological Chemistry*. 2021, 297(3): 101077
- [39] Craney A and Rape M. Dynamic regulation of ubiquitin-dependent cell cycle control. *Current Opinion in Cell Biology*. 2013, 25(6): 704-710
- [40] Yau R and Rape M. The increasing complexity of the ubiquitin code. *Nature Cell Biology*. 2016, 18(6): 579-586
- [41] Selvaraju K, Mazurkiewicz M, Wang X, Gullbo J, Linder S and D'arcy P. Inhibition of proteasome deubiquitinase activity: a strategy to overcome resistance to conventional proteasome inhibitors? *Drug Resistance Updates*. 2015, 21-22: 20-29
- [42] Varshavsky A. The Ubiquitin System, Autophagy, and Regulated Protein Degradation. *Annual Review of Biochemistry*. 2017, 86: 123-128
- [43] Lai K P, Chen J and Tse W K F. Role of Deubiquitinases in Human Cancers: Potential Targeted Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21(7): 2548
- [44] Deng L, Meng T, Chen L, Wei W and Wang P. The role of ubiquitination in tumorigenesis and targeted drug discovery. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020, 5(1): 11
- [45] Harrigan J A, Jacq X, Martin N M and Jackson S P. Deubiquitylating enzymes and drug discovery: emerging opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2018, 17(1): 57-78
- [46] Li Y and Yuan J. Role of deubiquitinating enzymes in DNA double-strand break repair. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2021, 22(1): 63-72
- [47] Kee Y and Huang T T. Role of Deubiquitinating Enzymes in DNA Repair. *Molecular and Cellular Biology*. 2016, 36(4): 524-544
- [48] Fraile J M, Quesada V, Rodríguez D, Freije J M P and López-Otín C. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene*. 2012, 31(19): 2373-2388
- [49] Al-Hakim A, Escribano-Diaz C, Landry M-C, O'donnell L, Panier S, Szilard R K and Durocher D. The ubiquitous role of ubiquitin in the DNA damage response. *DNA Repair*. 2010, 9(12): 1229-1240
- [50] Richter K, Paakkola T, Mennerich D, Kubaichuk K, Konzack A, Ali-Kippari H, Kozlova N, Koivunen P, Haapasaari K-M, Jukkola-Vuorinen A, Teppo H-R, Dimova E Y, Bloigu R, Szabo Z, Kerkelä R and Kietzmann T. USP28 Deficiency Promotes Breast and Liver Carcinogenesis as well as Tumor Angiogenesis in a HIF-independent Manner. *Molecular Cancer Research*. 2018, 16(6): 1000-1012
- [51] Stegmeier F, Sowa M E, Nalepa G, Gygi S P, Harper J W and Elledge S J. The tumor suppressor CYLD regulates entry into mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007, 104(21): 8869-8874
- [52] Huang X, Summers M K, Pham V, Lill J R, Liu J, Lee G, Kirkpatrick D S, Jackson P K, Fang G and Dixit V M. Deubiquitinase USP37 is activated by CDK2 to antagonize APC(CDH1) and promote S phase entry. *Molecular Cell*. 2011, 42(4): 511-523
- [53] González-Navajas J M, Law J, Nguyen K P, Bhargava M, Corr M P, Varki N, Eckmann L, Hoffman H M, Lee J and Raz E. Interleukin 1 receptor signaling regulates DUBA expression and facilitates Toll-like receptor 9-driven antiinflammatory cytokine production. *The Journal of Experimental Medicine*.

- 2010, 207(13): 2799-2807
- [54] Clerici M, Luna-Vargas M P A, Faesen A C and Sixma T K. The DUSP-Ubl domain of USP4 enhances its catalytic efficiency by promoting ubiquitin exchange. *Nature Communications*. 2014, 5: 5399
- [55] Zhou F, Xie F, Jin K, Zhang Z, Clerici M, Gao R, Van Dinther M, Sixma T K, Huang H, Zhang L and Ten Dijke P. USP4 inhibits SMAD4 monoubiquitination and promotes activin and BMP signaling. *The EMBO Journal*. 2017, 36(11): 1623-1639
- [56] Mehić M, De Sa V K, Hebestreit S, Heldin C H and Heldin P. The deubiquitinating enzymes USP4 and USP17 target hyaluronan synthase 2 and differentially affect its function. *Oncogenesis*. 2017, 6(6): e348
- [57] Uras I Z, List T and Nijman S M B. Ubiquitin-specific protease 4 inhibits mono-ubiquitination of the master growth factor signaling kinase PDK1. *PloS One*. 2012, 7(2): e31003
- [58] Yun S-I, Kim H H, Yoon J H, Park W S, Hahn M-J, Kim H C, Chung C H and Kim K K. Ubiquitin specific protease 4 positively regulates the WNT/ β -catenin signaling in colorectal cancer. *Molecular Oncology*. 2015, 9(9): 1834-1851
- [59] Xiao N, Li H, Luo J, Wang R, Chen H, Chen J and Wang P. Ubiquitin-specific protease 4 (USP4) targets TRAF2 and TRAF6 for deubiquitination and inhibits TNF α -induced cancer cell migration. *The Biochemical Journal*. 2012, 441(3): 979-986
- [60] Wang L, Zhao W, Zhang M, Wang P, Zhao K, Zhao X, Yang S and Gao C. USP4 positively regulates RIG-I-mediated antiviral response through deubiquitination and stabilization of RIG-I. *Journal of Virology*. 2013, 87(8): 4507-4515
- [61] Song E J, Werner S L, Neubauer J, Stegmeier F, Aspden J, Rio D, Harper J W, Elledge S J, Kirschner M W and Rape M. The Prp19 complex and the Usp4Sart3 deubiquitinating enzyme control reversible ubiquitination at the spliceosome. *Genes & Development*. 2010, 24(13): 1434-1447
- [62] Kwon S-K, Kim E-H and Baek K-H. RNPS1 is modulated by ubiquitin-specific protease 4. *FEBS Letters*. 2017, 591(2): 369-381
- [63] Fan Y H, Yu Y, Mao R F, Tan X J, Xu G F, Zhang H, Lu X B, Fu S B and Yang J. USP4 targets TAK1 to downregulate TNF α -induced NF- κ B activation. *Cell Death and Differentiation*. 2011, 18(10): 1547-1560
- [64] Hou X, Wang L, Zhang L, Pan X and Zhao W. Ubiquitin-specific protease 4 promotes TNF- α -induced apoptosis by deubiquitination of RIP1 in head and neck squamous cell carcinoma. *FEBS Letters*. 2013, 587(4): 311-316
- [65] Wang Y, Zhou L, Lu J, Jiang B, Liu C and Guo J. USP4 function and multifaceted roles in cancer: a possible and potential therapeutic target. *Cancer Cell International*. 2020, 20: 298
- [66] Hu B, Zhang D, Zhao K, Wang Y, Pei L, Fu Q and Ma X. Spotlight on USP4: Structure, Function, and Regulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021, 9: 595159
- [67] Komander D, Clague M J and Urbé S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009, 10(8): 550-563
- [68] Chen L, Liu S and Tao Y. Regulating tumor suppressor genes: post-translational modifications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020, 5(1): 90
- [69] Han Z-J, Feng Y-H, Gu B-H, Li Y-M and Chen H. The post-translational modification, SUMOylation, and cancer (Review). *International Journal of Oncology*. 2018, 52(4): 1081-1094
- [70] Park J, Cho J and Song E J. Ubiquitin-proteasome system (UPS) as a target for anticancer treatment. *Archives of Pharmacal Research*. 2020, 43(11): 1144-1161
- [71] Weissman A M. Themes and variations on ubiquitylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001, 2(3): 169-178

- [72] Harper J W, Ordureau A and Heo J-M. Building and decoding ubiquitin chains for mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018, 19(2): 93-108
- [73] Ordureau A, Münch C and Harper J W. Quantifying ubiquitin signaling. *Molecular Cell*. 2015, 58(4): 660-676
- [74] Randles L and Walters K J. Ubiquitin and its binding domains. *Frontiers in Bioscience*. 2012, 17: 2140-2157
- [75] Ohtake F and Tsuchiya H. The emerging complexity of ubiquitin architecture. *Journal of Biochemistry*. 2017, 161(2): 125-133
- [76] Wong E and Cuervo A M. Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010, 2(12): a006734
- [77] Clague M J, Heride C and Urbé S. The demographics of the ubiquitin system. *Trends in Cell Biology*. 2015, 25(7): 417-426
- [78] Vere G, Kealy R, Kessler B M and Pinto-Fernandez A. Ubiquitomics: An Overview and Future. *Biomolecules*. 2020, 10(10): 1453
- [79] Komander D and Rape M. The ubiquitin code. *Annual Review of Biochemistry*. 2012, 81: 203-229
- [80] Bard J a M, Goodall E A, Greene E R, Jonsson E, Dong K C and Martin A. Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annual Review of Biochemistry*. 2018, 87: 697-724
- [81] Mevissen T E T and Komander D. Mechanisms of Deubiquitinase Specificity and Regulation. *Annual Review of Biochemistry*. 2017, 86: 159-192
- [82] Fulda S, Rajalingam K and Dikic I. Ubiquitylation in immune disorders and cancer: from molecular mechanisms to therapeutic implications. *EMBO Molecular Medicine*. 2012, 4(7): 545-556
- [83] Nishi R, Wijnhoven P, Le Sage C, Tjeertes J, Galanty Y, Forment J V, Clague M J, Urbé S and Jackson S P. Systematic characterization of deubiquitylating enzymes for roles in maintaining genome integrity. *Nature Cell Biology*. 2014, 16(10): 1016-26
- [84] Baretti M and Le D T. DNA mismatch repair in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. 2018, 189: 45-62
- [85] Chatterjee N and Walker G C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2017, 58(5): 235-263
- [86] Huang R-X and Zhou P-K. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020, 5(1): 60
- [87] Kass E M, Moynahan M E and Jasin M. Loss of 53BP1 is a gain for BRCA1 mutant cells. *Cancer Cell*. 2010, 17(5): 423-425
- [88] Bunting S F, Callén E, Wong N, Chen H-T, Polato F, Gunn A, Bothmer A, Feldhahn N, Fernandez-Capetillo O, Cao L, Xu X, Deng C-X, Finkel T, Nussenzweig M, Stark J M and Nussenzweig A. 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell*. 2010, 141(2): 243-254
- [89] Stucki M, Clapperton J A, Mohammad D, Yaffe M B, Smerdon S J and Jackson S P. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*. 2005, 123(7): 1213-1226
- [90] Mailand N, Bekker-Jensen S, Faustrup H, Melander F, Bartek J, Lukas C and Lukas J. RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell*. 2007, 131(5): 887-900
- [91] Huen M S Y, Grant R, Manke I, Minn K, Yu X, Yaffe M B and Chen J. RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell*. 2007, 131(5): 901-914

- [92] Kolas N K, Chapman J R, Nakada S, Ylanko J, Chahwan R, Sweeney F D, Panier S, Mendez M, Wildenhain J, Thomson T M, Pelletier L, Jackson S P and Durocher D. Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science*. 2007, 318(5856): 1637-1640
- [93] Jungmichel S, Clapperton J A, Lloyd J, Hari F J, Spycher C, Pavic L, Li J, Haire L F, Bonalli M, Larsen D H, Lukas C, Lukas J, Macmillan D, Nielsen M L, Stucki M and Smerdon S J. The molecular basis of ATM-dependent dimerization of the Mdc1 DNA damage checkpoint mediator. *Nucleic Acids Research*. 2012, 40(9): 3913-3928
- [94] Bekker-Jensen S, Rendtlew Danielsen J, Fugger K, Gromova I, Nerstedt A, Lukas C, Bartek J, Lukas J and Mailand N. HERC2 coordinates ubiquitin-dependent assembly of DNA repair factors on damaged chromosomes. *Nature Cell Biology*. 2010, 12(1): 80-6
- [95] West S C. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003, 4(6): 435-445
- [96] Williams R S, Dodson G E, Limbo O, Yamada Y, Williams J S, Guenther G, Classen S, Glover J N M, Iwasaki H, Russell P and Tainer J A. Nbs1 flexibly tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to coordinate DNA double-strand break processing and repair. *Cell*. 2009, 139(1): 87-99
- [97] Parsons C A, Stasiak A, Bennett R J and West S C. Structure of a multisubunit complex that promotes DNA branch migration. *Nature*. 1995, 374(6520): 375-378
- [98] He Z, Henricksen L A, Wold M S and Ingles C J. RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair. *Nature*. 1995, 374(6522): 566-569
- [99] Van Komen S, Petukhova G, Sigurdsson S, Stratton S and Sung P. Superhelicity-driven homologous DNA pairing by yeast recombination factors Rad51 and Rad54. *Molecular Cell*. 2000, 6(3): 563-572
- [100] Zhao W, Steinfeld J B, Liang F, Chen X, Maranon D G, Jian Ma C, Kwon Y, Rao T, Wang W, Sheng C, Song X, Deng Y, Jimenez-Sainz J, Lu L, Jensen R B, Xiong Y, Kupfer G M, Wiese C, Greene E C and Sung P. BRCA1-BARD1 promotes RAD51-mediated homologous DNA pairing. *Nature*. 2017, 550(7676): 360-365
- [101] Pinto-Fernandez A and Kessler B M. DUBbing Cancer: Deubiquitylating Enzymes Involved in Epigenetics, DNA Damage and the Cell Cycle As Therapeutic Targets. *Frontiers in Genetics*. 2016, 7: 133-133
- [102] Gao M, Guo G, Huang J, Kloeber J A, Zhao F, Deng M, Tu X, Kim W, Zhou Q, Zhang C, Yin P, Luo K and Lou Z. USP52 regulates DNA end resection and chemosensitivity through removing inhibitory ubiquitination from CtIP. *Nature Communications*. 2020, 11(1): 5362
- [103] Nijman S M B, Huang T T, Dirac A M G, Brummelkamp T R, Kerkhoven R M, D'andrea A D and Bernards R. The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Molecular Cell*. 2005, 17(3): 331-339
- [104] Castella M, Jacquemont C, Thompson E L, Yeo J E, Cheung R S, Huang J-W, Sobeck A, Hendrickson E A and Taniguchi T. FANCI Regulates Recruitment of the FA Core Complex at Sites of DNA Damage Independently of FANCD2. *PLoS Genetics*. 2015, 11(10): e1005563
- [105] Huang T T, Nijman S M B, Mirchandani K D, Galardy P J, Cohn M A, Haas W, Gygi S P, Ploegh H L, Bernards R and D'andrea A D. Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. *Nature Cell Biology*. 2006, 8(4): 339-347
- [106] Shenker S, Gannon H, Carlson A, Grasberger P, Sullivan P, Middleton C, Dodson A, Bullock C, Mcguire M, Tobin E, Sinkevicius K, Schlabach M, Stegmeier F, Cadzow L and Wylie A. Abstract 1337: Functional genomic characterization of the USP1 inhibitor KSQ-4279 reveals a distinct mechanism of action and resistance profile relative to other DDR targeting drugs. 2021, 81: 1337-1337

- [107] Sharma N, Zhu Q, Wani G, He J, Wang Q-E and Wani A A. USP3 counteracts RNF168 via deubiquitinating H2A and γ H2AX at lysine 13 and 15. *Cell Cycle*. 2014, 13(1): 106-114
- [108] Nicassio F, Corrado N, Vissers J H A, Areces L B, Bergink S, Marteijn J A, Geverts B, Houtsmuller A B, Vermeulen W, Di Fiore P P and Citterio E. Human USP3 is a chromatin modifier required for S phase progression and genome stability. *Current Biology*. 2007, 17(22): 1972-1977
- [109] Lancini C, Van Den Berk P C M, Vissers J H A, Gargiulo G, Song J-Y, Hulsman D, Serresi M, Tanger E, Blom M, Vens C, Van Lohuizen M, Jacobs H and Citterio E. Tight regulation of ubiquitin-mediated DNA damage response by USP3 preserves the functional integrity of hematopoietic stem cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2014, 211(9): 1759-1777
- [110] Liu H, Zhang H, Wang X, Tian Q, Hu Z, Peng C, Jiang P, Wang T, Guo W, Chen Y, Li X, Zhang P and Pei H. The Deubiquitylating Enzyme USP4 Cooperates with CtIP in DNA Double-Strand Break End Resection. *Cell Reports*. 2015, 13(1): 93-107
- [111] Wijnhoven P, Konietzny R, Blackford A N, Travers J, Kessler B M, Nishi R and Jackson S P. USP4 Auto-Deubiquitylation Promotes Homologous Recombination. *Molecular Cell*. 2015, 60(3): 362-373
- [112] Su D, Ma S, Shan L, Wang Y, Wang Y, Cao C, Liu B, Yang C, Wang L, Tian S, Ding X, Liu X, Yu N, Song N, Liu L, Yang S, Zhang Q, Yang F, Zhang K and Shi L. Ubiquitin-specific protease 7 sustains DNA damage response and promotes cervical carcinogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2018, 128(10): 4280-4296
- [113] Zhang M, Hu C, Tong D, Xiang S, Williams K, Bai W, Li G-M, Bepler G and Zhang X. Ubiquitin-specific Peptidase 10 (USP10) Deubiquitinates and Stabilizes MutS Homolog 2 (MSH2) to Regulate Cellular Sensitivity to DNA Damage. *The Journal of Biological Chemistry*. 2016, 291(20): 10783-10791
- [114] Prolla T A, Abuin A and Bradley A. DNA mismatch repair deficient mice in cancer research. *Seminars in Cancer Biology*. 1996, 7(5): 241-247
- [115] Schoenfeld A R, Apgar S, Dolios G, Wang R and Aaronson S A. BRCA2 is ubiquitinated in vivo and interacts with USP11, a deubiquitinating enzyme that exhibits prosurvival function in the cellular response to DNA damage. *Mol Cell Biol*. 2004, 24(17): 7444-7455
- [116] Orthwein A, Noordermeer S M, Wilson M D, Landry S, Enchev R I, Sherker A, Munro M, Pinder J, Salsman J, Dellaire G, Xia B, Peter M and Durocher D. A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells. *Nature*. 2015, 528(7582): 422-426
- [117] Sharma A, Alswillah T, Singh K, Chatterjee P, Willard B, Venere M, Summers M K and Almasan A. USP14 regulates DNA damage repair by targeting RNF168-dependent ubiquitination. *Autophagy*. 2018, 14(11): 1976-1990
- [118] Sharma A, Alswillah T, Kapoor I, Debjani P, Willard B, Summers M K, Gong Z and Almasan A. USP14 is a deubiquitinase for Ku70 and critical determinant of non-homologous end joining repair in autophagy and PTEN-deficient cells. *Nucleic Acids Research*. 2020, 48(2): 736-747
- [119] Wang X, Liu Z, Zhang L, Yang Z, Chen X, Luo J, Zhou Z, Mei X, Yu X, Shao Z, Feng Y, Fu S, Zhang Z, Wei D, Jia L, Ma J and Guo X. Targeting deubiquitinase USP28 for cancer therapy. *Cell Death & Disease*. 2018, 9(2): 186
- [120] Zhang D, Zaugg K, Mak T W and Elledge S J. A role for the deubiquitinating enzyme USP28 in control of the DNA-damage response. *Cell*. 2006, 126(3): 529-542
- [121] Yang Y, Yang C, Li T, Yu S, Gan T, Hu J, Cui J and Zheng X. The Deubiquitinase USP38 Promotes NHEJ Repair through Regulation of HDAC1 Activity and Regulates Cancer Cell Response to Genotoxic Insults. *Cancer Research*. 2020, 80(4): 719-731
- [122] Shao L-W, Peng Q, Dong M, Gao K, Li Y, Li Y, Li C-Y and Liu Y. Histone deacetylase HDA-1

- modulates mitochondrial stress response and longevity. *Nature Communications*. 2020, 11(1): 4639
- [123] Her J, Soo Lee N, Kim Y and Kim H. Factors forming the BRCA1-A complex orchestrate BRCA1 recruitment to the sites of DNA damage. *Acta Biochimica Biophysica Sinica*. 2016, 48(7): 658-664
- [124] Wang B and Elledge S J. Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brc1/Brcc36 complex in response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007, 104(52): 20759-20763
- [125] Ng H-M, Wei L, Lan L and Huen M S Y. The Lys63-deubiquitylating Enzyme BRCC36 Limits DNA Break Processing and Repair. *The Journal of Biological Chemistry*. 2016, 291(31): 16197-16207
- [126] Rabl J, Bunker R D, Schenk A D, Cavadini S, Gill M E, Abdulrahman W, Andrés-Pons A, Luijsterburg M S, Ibrahim A F M, Branigan E, Aguirre J D, Marceau A H, Guérillon C, Bouwmeester T, Hassiepen U, Peters A H F M, Renatus M, Gelman L, Rubin S M, Mailand N, Van Attikum H, Hay R T and Thomä N H. Structural Basis of BRCC36 Function in DNA Repair and Immune Regulation. *Molecular Cell*. 2019, 75(3): 483-497
- [127] Butler L R, Densham R M, Jia J, Garvin A J, Stone H R, Shah V, Weekes D, Festy F, Beesley J and Morris J R. The proteasomal de-ubiquitinating enzyme POH1 promotes the double-strand DNA break response. *The EMBO Journal*. 2012, 31(19): 3918-3934
- [128] Kakarougkas A, Ismail A, Katsuki Y, Freire R, Shibata A and Jeggo P A. Co-operation of BRCA1 and POH1 relieves the barriers posed by 53BP1 and RAP80 to resection. *Nucleic Acids Research*. 2013, 41(22): 10298-10311
- [129] Lim K-H, Song M-H and Baek K-H. Decision for cell fate: deubiquitinating enzymes in cell cycle checkpoint. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016, 73(7): 1439-1455
- [130] Burrows J F, Kelvin A A, Mcfarlane C, Burden R E, Mcgrattan M J, De La Vega M, Govender U, Quinn D J, Dib K, Gadina M, Scott C J and Johnston J A. USP17 regulates Ras activation and cell proliferation by blocking RCE1 activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009, 284(14): 9587-9595
- [131] De La Vega M, Burrows J F, Mcfarlane C, Govender U, Scott C J and Johnston J A. The deubiquitinating enzyme USP17 blocks N-Ras membrane trafficking and activation but leaves K-Ras unaffected. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010, 285(16): 12028-12036
- [132] Ning Z, Wang A, Liang J, Xie Y, Liu J, Feng L, Yan Q and Wang Z. USP22 promotes the G1/S phase transition by upregulating FoxM1 expression via β -catenin nuclear localization and is associated with poor prognosis in stage II pancreatic ductal adenocarcinoma. *International Journal of Oncology*. 2014, 45(4): 1594-1608
- [133] Atanassov B S and Dent S Y R. USP22 regulates cell proliferation by deubiquitinating the transcriptional regulator FBP1. *EMBO Reports*. 2011, 12(9): 924-930
- [134] Gennaro V J, Stanek T J, Peck A R, Sun Y, Wang F, Qie S, Knudsen K E, Rui H, Butt T, Diehl J A and McMahon S B. Control of CCND1 ubiquitylation by the catalytic SAGA subunit USP22 is essential for cell cycle progression through G1 in cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018, 115(40): E9298-E9307
- [135] Tu Y, Liu H, Zhu X, Shen H, Ma X, Wang F, Huang M, Gong J, Li X, Wang Y, Guo C and Tang T-S. Ataxin-3 promotes genome integrity by stabilizing Chk1. *Nucleic Acids Research*. 2017, 45(8): 4532-4549
- [136] Xiao X, Liu C, Pei Y, Wang Y-Z, Kong J, Lu K, Ma L, Dou S-X, Wang P-Y, Li G, Chen P and Li W. Histone H2A Ubiquitination Reinforces Mechanical Stability and Asymmetry at the Single-Nucleosome Level. *Journal of the American Chemical Society*. 2020, 142(7): 3340-3345
- [137] Barbour H, Daou S, Hendzel M and Affar E B. Polycomb group-mediated histone H2A

- monoubiquitination in epigenome regulation and nuclear processes. *Nature Communications*. 2020, 11(1): 5947
- [138] Zhang Y, Shi J, Liu X, Feng L, Gong Z, Koppula P, Sirohi K, Li X, Wei Y, Lee H, Zhuang L, Chen G, Xiao Z-D, Hung M-C, Chen J, Huang P, Li W and Gan B. BAP1 links metabolic regulation of ferroptosis to tumour suppression. *Nature Cell Biology*. 2018, 20(10): 1181-1192
- [139] Murphy M P. Metabolic control of ferroptosis in cancer. *Nature cell biology*. 2018, 20(10): 1104-1105
- [140] Stegmeier F, Rape M, Draviam V M, Nalepa G, Sowa M E, Ang X L, McDonald E R, Li M Z, Hannon G J, Sorger P K, Kirschner M W, Harper J W and Elledge S J. Anaphase initiation is regulated by antagonistic ubiquitination and deubiquitination activities. *Nature*. 2007, 446(7138): 876-881
- [141] Holland A J and Cleveland D W. The deubiquitinase USP44 is a tumor suppressor that protects against chromosome missegregation. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012, 122(12): 4325-4328
- [142] Gomez-Ferreria M A, Bashkurov M, Mullin M, Gingras A-C and Pelletier L. CEP192 interacts physically and functionally with the K63-deubiquitinase CYLD to promote mitotic spindle assembly. *Cell Cycle*. 2012, 11(19): 3555-3558
- [143] Yang Y, Liu M, Li D, Ran J, Gao J, Suo S, Sun S-C and Zhou J. CYLD regulates spindle orientation by stabilizing astral microtubules and promoting dishevelled-NuMA-dynein/dynactin complex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014, 111(6): 2158-2163
- [144] Leznicki P and Kulathu Y. Mechanisms of regulation and diversification of deubiquitylating enzyme function. *Journal of Cell Science*. 2017, 130(12): 1997-2006
- [145] Sahtoe D D and Sixma T K. Layers of DUB regulation. *Trends in Biochemical Sciences*. 2015, 40(8): 456-467
- [146] Borodovsky A, Kessler B M, Casagrande R, Overkleeft H S, Wilkinson K D and Ploegh H L. A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14. *The EMBO Journal*. 2001, 20(18): 5187-5196
- [147] Qiu X-B, Ouyang S-Y, Li C-J, Miao S, Wang L and Goldberg A L. hRpn13/ADRM1/GP110 is a novel proteasome subunit that binds the deubiquitinating enzyme, UCH37. *The EMBO Journal*. 2006, 25(24): 5742-5753
- [148] Yao T, Song L, Xu W, Demartino G N, Florens L, Swanson S K, Washburn M P, Conaway R C, Conaway J W and Cohen R E. Proteasome recruitment and activation of the Uch37 deubiquitinating enzyme by Adrm1. *Nature Cell Biology*. 2006, 8(9): 994-1002
- [149] Feng L, Wang J and Chen J. The Lys63-specific deubiquitinating enzyme BRCC36 is regulated by two scaffold proteins localizing in different subcellular compartments. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010, 285(40): 30982-30988
- [150] Zeqiraj E, Tian L, Piggott C A, Pillon M C, Duffy N M, Ceccarelli D F, Keszei A F A, Lorenzen K, Kurinov I, Orlicky S, Gish G D, Heck A J R, Guarné A, Greenberg R A and Sicheri F. Higher-Order Assembly of BRCC36-KIAA0157 Is Required for DUB Activity and Biological Function. *Molecular Cell*. 2015, 59(6): 970-983
- [151] Shao G, Lilli D R, Patterson-Fortin J, Coleman K A, Morrissey D E and Greenberg R A. The Rap80-BRCC36 de-ubiquitinating enzyme complex antagonizes RNF8-Ubc13-dependent ubiquitination events at DNA double strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009, 106(9): 3166-3171
- [152] Zheng H, Gupta V, Patterson-Fortin J, Bhattacharya S, Katlinski K, Wu J, Varghese B, Carbone C J, Aressy B, Fuchs S Y and Greenberg R A. A BRISC-SHMT complex deubiquitinates IFNAR1 and

- regulates interferon responses. *Cell Reports*. 2013, 5(1): 180-193
- [153] Yan K, Li L, Wang X, Hong R, Zhang Y, Yang H, Lin M, Zhang S, He Q, Zheng D, Tang J, Yin Y and Shao G. The deubiquitinating enzyme complex BRISC is required for proper mitotic spindle assembly in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology*. 2015, 210(2): 209-224
- [154] Zhang L, Zhou F, Drabsch Y, Gao R, Snaar-Jagalska B E, Mickanin C, Huang H, Sheppard K-A, Porter J A, Lu C X and Ten Dijke P. USP4 is regulated by AKT phosphorylation and directly deubiquitylates TGF- β type I receptor. *Nature Cell Biology*. 2012, 14(7): 717-726
- [155] Huang O W, Ma X, Yin J, Flinders J, Maurer T, Kayagaki N, Phung Q, Bosanac I, Arnott D, Dixit V M, Hymowitz S G, Starovasnik M A and Cochran A G. Phosphorylation-dependent activity of the deubiquitinase DUBA. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2012, 19(2): 171-175
- [156] Xu D, Shan B, Lee B-H, Zhu K, Zhang T, Sun H, Liu M, Shi L, Liang W, Qian L, Xiao J, Wang L, Pan L, Finley D and Yuan J. Phosphorylation and activation of ubiquitin-specific protease-14 by Akt regulates the ubiquitin-proteasome system. *eLife*. 2015, 4: e10510
- [157] Deng M, Yang X, Qin B, Liu T, Zhang H, Guo W, Lee S B, Kim J J, Yuan J, Pei H, Wang L and Lou Z. Deubiquitination and Activation of AMPK by USP10. *Molecular Cell*. 2016, 61(4): 614-624
- [158] Naik E and Dixit V M. Usp9X Is Required for Lymphocyte Activation and Homeostasis through Its Control of ZAP70 Ubiquitination and PKC β Kinase Activity. *Journal of Immunology*. 2016, 196(8): 3438-3451
- [159] Mashtalir N, Daou S, Barbour H, Sen N N, Gagnon J, Hammond-Martel I, Dar H H, Therrien M and Affar E B. Autodeubiquitination protects the tumor suppressor BAP1 from cytoplasmic sequestration mediated by the atypical ubiquitin ligase UBE2O. *Molecular Cell*. 2014, 54(3): 392-406
- [160] Lee H-J, Kim M-S, Kim Y-K, Oh Y-K and Baek K-H. HAUSP, a deubiquitinating enzyme for p53, is polyubiquitinated, polyubiquitinated, and dimerized. *FEBS Letters*. 2005, 579(21): 4867-4872
- [161] Zhou Y-F, Liao S-S, Luo Y-Y, Tang J-G, Wang J-L, Lei L-F, Chi J-W, Du J, Jiang H, Xia K, Tang B-S and Shen L. SUMO-1 modification on K166 of polyQ-expanded ataxin-3 strengthens its stability and increases its cytotoxicity. *PloS One*. 2013, 8(1): e54214
- [162] Osaka H, Wang Y-L, Takada K, Takizawa S, Setsue R, Li H, Sato Y, Nishikawa K, Sun Y-J, Sakurai M, Harada T, Hara Y, Kimura I, Chiba S, Namikawa K, Kiyama H, Noda M, Aoki S and Wada K. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Human Molecular Genetics*. 2003, 12(16): 1945-1958
- [163] Denuc A, Bosch-Comas A, González-Duarte R and Marfany G. The UBA-UIM domains of the USP25 regulate the enzyme ubiquitination state and modulate substrate recognition. *PloS One*. 2009, 4(5): e5571
- [164] Zhen Y, Knobel P A, Stracker T H and Reverter D. Regulation of USP28 deubiquitinating activity by SUMO conjugation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014, 289(50): 34838-34850
- [165] Meulmeester E, Kunze M, Hsiao H H, Urlaub H and Melchior F. Mechanism and consequences for paralog-specific sumoylation of ubiquitin-specific protease 25. *Molecular cell*. 2008, 30(5): 610-619
- [166] Kobayashi T, Masoumi K C and Massoumi R. Deubiquitinating activity of CYLD is impaired by SUMOylation in neuroblastoma cells. *Oncogene*. 2015, 34(17): 2251-2260
- [167] Li M, Chen D, Shiloh A, Luo J, Nikolaev A Y, Qin J and Gu W. Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature*. 2002, 416(6881): 648-653
- [168] Li M, Brooks C L, Kon N and Gu W. A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. *Molecular Cell*. 2004, 13(6): 879-886
- [169] Yuan J, Luo K, Zhang L, Chevillat J C and Lou Z. USP10 regulates p53 localization and stability by

- deubiquitinating p53. *Cell*. 2010, 140(3): 384-396
- [170] Liu J, Xia H, Kim M, Xu L, Li Y, Zhang L, Cai Y, Norberg H V, Zhang T, Furuya T, Jin M, Zhu Z, Wang H, Yu J, Li Y, Hao Y, Choi A, Ke H, Ma D and Yuan J. Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell*. 2011, 147(1): 223-234
- [171] Ma S, Sun L, Wu W, Wu J, Sun Z and Ren J. USP22 Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury via the SIRT1-p53/SLC7A11-Dependent Inhibition of Ferroptosis-Induced Cardiomyocyte Death. *Frontiers in Physiology*. 2020, 11: 551318
- [172] Liu H, Li X, Ning G, Zhu S, Ma X, Liu X, Liu C, Huang M, Schmitt I, Wüllner U, Niu Y, Guo C, Wang Q and Tang T-S. The Machado-Joseph Disease Deubiquitinase Ataxin-3 Regulates the Stability and Apoptotic Function of p53. *Plos Biology*. 2016, 14(11): e2000733
- [173] Cuella-Martin R, Oliveira C, Lockstone H E, Snellenberg S, Grolmusova N and Chapman J R. 53BP1 Integrates DNA Repair and p53-Dependent Cell Fate Decisions via Distinct Mechanisms. *Molecular Cell*. 2016, 64(1): 51-64
- [174] Man X, Piao C, Lin X, Kong C, Cui X and Jiang Y. USP13 functions as a tumor suppressor by blocking the NF- κ B-mediated PTEN downregulation in human bladder cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2019, 38(1): 259
- [175] Yuan L, Lv Y, Li H, Gao H, Song S, Zhang Y, Xing G, Kong X, Wang L, Li Y, Zhou T, Gao D, Xiao Z-X, Yin Y, Wei W, He F and Zhang L. Deubiquitylase OTUD3 regulates PTEN stability and suppresses tumorigenesis. *Nature Cell Biology*. 2015, 17(9): 1169-1181
- [176] Song M S, Salmena L, Carracedo A, Egia A, Lo-Coco F, Teruya-Feldstein J and Pandolfi P P. The deubiquitylation and localization of PTEN are regulated by a HAUSP-PML network. *Nature*. 2008, 455(7214): 813-817
- [177] Li Z, Wang D, Messing E M and Wu G. VHL protein-interacting deubiquitinating enzyme 2 deubiquitinates and stabilizes HIF-1 α . *EMBO Reports*. 2005, 6(4): 373-378
- [178] Yee Koh M, Spivak-Kroizman T R and Powis G. HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends in Biochemical Sciences*. 2008, 33(11): 526-534
- [179] Ling S, Shan Q, Zhan Q, Ye Q, Liu P, Xu S, He X, Ma J, Xiang J, Jiang G, Wen X, Feng Z, Wu Y, Feng T, Xu L, Chen K, Zhang X, Wei R, Zhang C, Cen B, Xie H, Song P, Liu J, Zheng S and Xu X. USP22 promotes hypoxia-induced hepatocellular carcinoma stemness by a HIF1 α /USP22 positive feedback loop upon TP53 inactivation. *Gut*. 2020, 69(7): 1322-1334
- [180] Diefenbacher M E, Popov N, Blake S M, Schülein-Völk C, Nye E, Spencer-Dene B, Jaenicke L A, Eilers M and Behrens A. The deubiquitinase USP28 controls intestinal homeostasis and promotes colorectal cancer. *The Journal of Clinical Investigation*. 2014, 124(8): 3407-3418
- [181] Aoki M and Fujishita T. Oncogenic Roles of the PI3K/AKT/mTOR Axis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2017, 407: 153-189
- [182] Ediriweera M K, Tennekoon K H and Samarakoon S R. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance. *Seminars in Cancer Biology*. 2019, 59: 147-160
- [183] Goldbraikh D, Neufeld D, Eid-Mutlak Y, Lasry I, Gilda J E, Parnis A and Cohen S. USP1 deubiquitinates Akt to inhibit PI3K-Akt-FoxO signaling in muscle during prolonged starvation. *EMBO Reports*. 2020, 21(4): e48791
- [184] Agrawal P, Chen Y-T, Schilling B, Gibson B W and Hughes R E. Ubiquitin-specific peptidase 9, X-linked (USP9X) modulates activity of mammalian target of rapamycin (mTOR). *The Journal of Biological Chemistry*. 2012, 287(25): 21164-21175

- [185] Wrobel L, Siddiqi F H, Hill S M, Son S M, Karabiyik C, Kim H and Rubinsztein D C. mTORC2 Assembly Is Regulated by USP9X-Mediated Deubiquitination of RICTOR. *Cell Reports*. 2020, 33(13): 108564
- [186] Bridges C R, Tan M-C, Premarathne S, Nanayakkara D, Bellette B, Zencak D, Domingo D, Geetz J, Murtaza M, Jolly L A and Wood S A. USP9X deubiquitylating enzyme maintains RAPTOR protein levels, mTORC1 signalling and proliferation in neural progenitors. *Scientific Reports*. 2017, 7(1): 391
- [187] Deng L, Chen L, Zhao L, Xu Y, Peng X, Wang X, Ding L, Jin J, Teng H, Wang Y, Pan W, Yu F, Liao L, Li L, Ge X and Wang P. Ubiquitination of Rheb governs growth factor-induced mTORC1 activation. *Cell Research*. 2019, 29(2): 136-150
- [188] Iyengar P V. Regulation of Ubiquitin Enzymes in the TGF- β Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, 18(4): 994-1002
- [189] Zhang J, Zhang X, Xie F, Zhang Z, Van Dam H, Zhang L and Zhou F. The regulation of TGF- β /SMAD signaling by protein deubiquitination. *Protein & Cell*. 2014, 5(7): 503-517
- [190] Zhang L, Huang H, Zhou F, Schimmel J, Pardo C G, Zhang T, Barakat T S, Sheppard K-A, Mickanin C, Porter J A, Vertegaal A C O, Van Dam H, Gribnau J, Lu C X and Ten Dijke P. RNF12 controls embryonic stem cell fate and morphogenesis in zebrafish embryos by targeting Smad7 for degradation. *Molecular Cell*. 2012, 46(5): 650-661
- [191] Al-Salihi M A, Herhaus L, Macartney T and Sapkota G P. USP11 augments TGF β signalling by deubiquitylating ALK5. *Open Biology*. 2012, 2(6): 120063
- [192] Aggarwal K and Massagué J. Ubiquitin removal in the TGF- β pathway. *Nature Cell Biology*. 2012, 14(7): 656-657
- [193] Eichhorn P J A, Rodón L, González-Juncà A, Dirac A, Gili M, Martínez-Sáez E, Aura C, Barba I, Peg V, Prat A, Cuartas I, Jimenez J, García-Dorado D, Sahuquillo J, Bernards R, Baselga J and Seoane J. USP15 stabilizes TGF- β receptor I and promotes oncogenesis through the activation of TGF- β signaling in glioblastoma. *Nature Medicine*. 2012, 18(3): 429-435
- [194] Wiener R, Zhang X, Wang T and Wolberger C. The mechanism of OTUB1-mediated inhibition of ubiquitination. *Nature*. 2012, 483(7391): 618-622
- [195] Herhaus L, Al-Salihi M, Macartney T, Weidlich S and Sapkota G P. OTUB1 enhances TGF β signalling by inhibiting the ubiquitylation and degradation of active SMAD2/3. *Nature Communications*. 2013, 4: 2519
- [196] Zhao Y, Thornton A M, Kinney M C, Ma C A, Spinner J J, Fuss I J, Shevach E M and Jain A. The deubiquitinase CYLD targets Smad7 protein to regulate transforming growth factor β (TGF- β) signaling and the development of regulatory T cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011, 286(47): 40520-40530
- [197] Dupont S, Mamidi A, Cordenonsi M, Montagner M, Zacchigna L, Adorno M, Martello G, Stinchfield M J, Soligo S, Morsut L, Inui M, Moro S, Modena N, Argenton F, Newfeld S J and Piccolo S. FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell*. 2009, 136(1): 123-135
- [198] Al-Hakim A K, Zagorska A, Chapman L, Deak M, Peggie M and Alessi D R. Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys(29)/Lys(33)-linked polyubiquitin chains. *The Biochemical Journal*. 2008, 411(2): 249-260
- [199] Quick L, Young R, Henrich I C, Wang X, Asmann Y W, Oliveira A M and Chou M M. Jak1-STAT3 Signals Are Essential Effectors of the USP6/TRE17 Oncogene in Tumorigenesis. *Cancer Research*. 2016, 76(18): 5337-5347

- [200] Xu G, Cai J, Wang L, Jiang L, Huang J, Hu R and Ding F. MicroRNA-30e-5p suppresses non-small cell lung cancer tumorigenesis by regulating USP22-mediated Sirt1/JAK/STAT3 signaling. *Experimental Cell Research*. 2018, 362(2): 268-278
- [201] Chipumuro E and Henriksen M A. The ubiquitin hydrolase USP22 contributes to 3'-end processing of JAK-STAT-inducible genes. *FASEB Journal*. 2012, 26(2): 842-854
- [202] Kim M and Kim J M. The role of USP1 autocleavage in DNA interstrand crosslink repair. *FEBS Letters*. 2016, 590(3): 340-348
- [203] Stevenson L F, Sparks A, Allende-Vega N, Xirodimas D P, Lane D P and Saville M K. The deubiquitinating enzyme USP2a regulates the p53 pathway by targeting Mdm2. *The EMBO Journal*. 2007, 26(4): 976-986
- [204] Brooks C L, Li M, Hu M, Shi Y and Gu W. The p53--Mdm2--HAUSP complex is involved in p53 stabilization by HAUSP. *Oncogene*. 2007, 26(51): 7262-7266
- [205] Faustrup H, Bekker-Jensen S, Bartek J, Lukas J and Mailand N. USP7 counteracts SCFbetaTrCP- but not APCdh1-mediated proteolysis of Claspin. *The Journal of Cell Biology*. 2009, 184(1): 13-19
- [206] Brooks C L and Gu W. p53 regulation by ubiquitin. *FEBS Letters*. 2011, 585(18): 2803-2809
- [207] Alonso-De Vega I, Martín Y and Smits V a J. USP7 controls Chk1 protein stability by direct deubiquitination. *Cell Cycle*. 2014, 13(24): 3921-3926
- [208] Ge C, Che L, Ren J, Pandita R K, Lu J, Li K, Pandita T K and Du C. BRUCE regulates DNA double-strand break response by promoting USP8 deubiquitination of BRIT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015, 112(11): E1210-E1219
- [209] Mcgarry E, Gaboriau D, Rainey M D, Restuccia U, Bachi A and Santocanale C. The Deubiquitinase USP9X Maintains DNA Replication Fork Stability and DNA Damage Checkpoint Responses by Regulating CLASPIN during S-Phase. *Cancer Research*. 2016, 76(8): 2384-2393
- [210] Lu Q, Zhang F-L, Lu D-Y, Shao Z-M and Li D-Q. USP9X stabilizes BRCA1 and confers resistance to DNA-damaging agents in human cancer cells. *Cancer Medicine*. 2019, 8(15): 6730-6740
- [211] Ke J-Y, Dai C-J, Wu W-L, Gao J-H, Xia A-J, Liu G-P, Lv K-S and Wu C-L. USP11 regulates p53 stability by deubiquitinating p53. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2014, 15(12): 1032-1038
- [212] Yuan J, Luo K, Deng M, Li Y, Yin P, Gao B, Fang Y, Wu P, Liu T and Lou Z. HERC2-USP20 axis regulates DNA damage checkpoint through Claspin. *Nucleic Acids Research*. 2014, 42(21): 13110-13121
- [213] Zhang L, Lubin A, Chen H, Sun Z and Gong F. The deubiquitinating protein USP24 interacts with DDB2 and regulates DDB2 stability. *Cell Cycle*. 2012, 11(23): 4378-4384
- [214] Liu J, Chung H-J, Vogt M, Jin Y, Malide D, He L, Dundr M and Levens D. JTV1 co-activates FBP to induce USP29 transcription and stabilize p53 in response to oxidative stress. *The EMBO Journal*. 2011, 30(5): 846-858
- [215] Martín Y, Cabrera E, Amoedo H, Hernández-Pérez S, Domínguez-Kelly R and Freire R. USP29 controls the stability of checkpoint adaptor Claspin by deubiquitination. *Oncogene*. 2015, 34(8): 1058-1063
- [216] Sun X-X, Challagundla K B and Dai M-S. Positive regulation of p53 stability and activity by the deubiquitinating enzyme Otubain 1. *The EMBO Journal*. 2012, 31(3): 576-592
- [217] Luo J, Lu Z, Lu X, Chen L, Cao J, Zhang S, Ling Y and Zhou X. OTUD5 regulates p53 stability by deubiquitinating p53. *Plos One*. 2013, 8(10): e77682
- [218] Oeckinghaus A, Hayden M S and Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nature Immunology*. 2011, 12(8): 695-708
- [219] Lork M, Verhelst K and Beyaert R. CYLD, A20 and OTULIN deubiquitinases in NF- κ B signaling and

- cell death: so similar, yet so different. *Cell Death and Differentiation*. 2017, 24(7): 1172-1183
- [220] Massoumi R, Chmielarska K, Hennecke K, Pfeifer A and Fässler R. Cylid inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling. *Cell*. 2006, 125(4): 665-677
- [221] Sun S C. CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF-kappaB activation and diverse biological processes. *Cell Death and Differentiation*. 2010, 17(1): 25-34
- [222] Li Z, Hao Q, Luo J, Xiong J, Zhang S, Wang T, Bai L, Wang W, Chen M, Wang W, Gu L, Lv K and Chen J. USP4 inhibits p53 and NF-κB through deubiquitinating and stabilizing HDAC2. *Oncogene*. 2016, 35(22): 2902-2912
- [223] Xu C, Peng Y, Zhang Q, Xu X-P, Kong X-M and Shi W-F. USP4 positively regulates RLR-induced NF-κB activation by targeting TRAF6 for K48-linked deubiquitination and inhibits enterovirus 71 replication. *Scientific Reports*. 2018, 8(1): 13418
- [224] Liu X, Li H, Zhong B, Blonska M, Gorjestani S, Yan M, Tian Q, Zhang D-E, Lin X and Dong C. USP18 inhibits NF-κB and NFAT activation during Th17 differentiation by deubiquitinating the TAK1-TAB1 complex. *The Journal of Experimental Medicine*. 2013, 210(8): 1575-1590
- [225] Ha J, Kim M, Seo D, Park J S, Lee J, Lee J and Park S H. The Deubiquitinating Enzyme USP20 Regulates the TNFα-Induced NF-κB Signaling Pathway through Stabilization of p62. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21(9): 3116
- [226] Hu H, Brittain G C, Chang J-H, Puebla-Osorio N, Jin J, Zal A, Xiao Y, Cheng X, Chang M, Fu Y-X, Zal T, Zhu C and Sun S-C. OTUD7B controls non-canonical NF-κB activation through deubiquitination of TRAF3. *Nature*. 2013, 494(7437): 371-374
- [227] Wertz I E, O'Rourke K M, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, Wu P, Wiesmann C, Baker R, Boone D L, Ma A, Koonin E V and Dixit V M. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*. 2004, 430(7000): 694-699
- [228] Wolfrum S, Teupser D, Tan M, Chen K Y and Breslow J L. The protective effect of A20 on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice is associated with reduced expression of NF-kappaB target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007, 104(47): 18601-18606
- [229] Liu C, Wang L, Chen W, Zhao S, Yin C, Lin Y, Jiang A and Zhang P. USP35 activated by miR let-7a inhibits cell proliferation and NF-κB activation through stabilization of ABIN-2. *Oncotarget*. 2015, 6(29): 27891-27906
- [230] Zhou L, Jiang H, Du J, Li L, Li R, Lu J, Fu W and Hou J. USP15 inhibits multiple myeloma cell apoptosis through activating a feedback loop with the transcription factor NF-κBp65. *Experimental & Molecular Medicine*. 2018, 50(11): 1-12
- [231] Li Y, Lu Y, Wang S, Han Z, Zhu F, Ni Y, Liang R, Zhang Y, Leng Q, Wei G, Shi G, Zhu R, Li D, Wang H, Zheng S G, Xu H, Tsun A and Li B. USP21 prevents the generation of T-helper-1-like Treg cells. *Nature Communications*. 2016, 7: 13559
- [232] Van Loosdregt J, Fleskens V, Fu J, Brenkman A B, Bekker C P J, Pals C E G M, Meerding J, Berkens C R, Barbi J, Gröne A, Sijts A J a M, Maurice M M, Kalkhoven E, Prakken B J, Ovaas H, Pan F, Zaiss D M W and Coffier P J. Stabilization of the transcription factor Foxp3 by the deubiquitinase USP7 increases Treg-cell-suppressive capacity. *Immunity*. 2013, 39(2): 259-271
- [233] Harper S, Besong T M D, Emsley J, Scott D J and Dreveny I. Structure of the USP15 N-terminal domains: a β-hairpin mediates close association between the DUSP and UBL domains. *Biochemistry*. 2011, 50(37): 7995-8004
- [234] Elliott P R, Liu H, Pastok M W, Grossmann G J, Rigden D J, Clague M J, Urbé S and Barsukov I L.

- Structural variability of the ubiquitin specific protease DUSP-UBL double domains. *FEBS Letters*. 2011, 585(21): 3385-3390
- [235] Vlasschaert C, Xia X and Gray D A. Selection preserves Ubiquitin Specific Protease 4 alternative exon skipping in therian mammals. *Scientific Reports*. 2016, 6: 20039
- [236] Chou C-K, Chang Y-T, Korinek M, Chen Y-T, Yang Y-T, Leu S, Lin I L, Tang C-J and Chiu C-C. The Regulations of Deubiquitinase USP15 and Its Pathophysiological Mechanisms in Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, 18(3): 483
- [237] Vlasschaert C, Xia X, Coulombe J and Gray D A. Evolution of the highly networked deubiquitinating enzymes USP4, USP15, and USP11. *BMC Evolutionary Biology*. 2015, 15: 230
- [238] Harper S, Gratton H E, Cornaciu I, Oberer M, Scott D J, Emsley J and Dreveny I. Structure and catalytic regulatory function of ubiquitin specific protease 11 N-terminal and ubiquitin-like domains. *Biochemistry*. 2014, 53(18): 2966-2978
- [239] Dai C and Gu W. p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends in Molecular Medicine*. 2010, 16(11): 528-536
- [240] Nag S, Qin J, Srivenugopal K S, Wang M and Zhang R. The MDM2-p53 pathway revisited. *Journal of Biomedical Research*. 2013, 27(4): 254-271
- [241] Bieging K T, Mello S S and Attardi L D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nature Reviews Cancer*. 2014, 14(5): 359-370
- [242] Meulmeester E, Pereg Y, Shiloh Y and Jochemsen A G. ATM-mediated phosphorylations inhibit Mdmx/Mdm2 stabilization by HAUSP in favor of p53 activation. *Cell Cycle*. 2005, 4(9): 1166-1170
- [243] Tavana O and Gu W. Modulation of the p53/MDM2 interplay by HAUSP inhibitors. *Journal of Molecular Cell Biology*. 2017, 9(1): 45-52
- [244] Zhang X, Berger F G, Yang J and Lu X. USP4 inhibits p53 through deubiquitinating and stabilizing ARF-BP1. *The EMBO Journal*. 2011, 30(11): 2177-2189
- [245] Wu C-J, Conze D B, Li X, Ying S-X, Hanover J A and Ashwell J D. TNF-alpha induced c-IAP1/TRAF2 complex translocation to a Ubc6-containing compartment and TRAF2 ubiquitination. *The EMBO Journal*. 2005, 24(10): 1886-1898
- [246] Yamazaki K, Gohda J, Kanayama A, Miyamoto Y, Sakurai H, Yamamoto M, Akira S, Hayashi H, Su B and Inoue J-I. Two mechanistically and temporally distinct NF-kappaB activation pathways in IL-1 signaling. *Science Signaling*. 2009, 2(93): ra66
- [247] Fan Y, Yu Y, Shi Y, Sun W, Xie M, Ge N, Mao R, Chang A, Xu G, Schneider M D, Zhang H, Fu S, Qin J and Yang J. Lysine 63-linked polyubiquitination of TAK1 at lysine 158 is required for tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-induced IKK/NF-kappaB and JNK/AP-1 activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010, 285(8): 5347-5360
- [248] Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C and Chen Z J. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*. 2000, 103(2): 351-361
- [249] Bromby H J. The role and regulation of ubiquitin-specific protease 4 in nuclear factor kappa B signalling[D]. City: Newcastle University, 2015: 15-36
- [250] Berndt J D and Moon R T. Cell biology. Making a point with Wnt signals. *Science*. 2013, 339(6126): 1388-1389
- [251] Clevers H and Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell*. 2012, 149(6): 1192-1205
- [252] Huang P, Yan R, Zhang X, Wang L, Ke X and Qu Y. Activating Wnt/beta-catenin signaling pathway for disease therapy: Challenges and opportunities. *Pharmacology & Therapeutics*. 2019, 196: 79-90

- [253] Zhao B, Schlesiger C, Masucci M G and Lindsten K. The ubiquitin specific protease 4 (USP4) is a new player in the Wnt signalling pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2009, 13(8B): 1886-1895
- [254] Ikushima H and Miyazono K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*. 2010, 10(6): 415-424
- [255] Horbelt D, Denkis A and Knaus P. A portrait of Transforming Growth Factor β superfamily signalling: Background matters. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2012, 44(3): 469-474
- [256] Lee Y and Rio D C. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annual Review of Biochemistry*. 2015, 84: 291-323
- [257] Montes M, Sanford B L, Comiskey D F and Chandler D S. RNA Splicing and Disease: Animal Models to Therapies. *Trends in Genetics : TIG*. 2019, 35(1): 68-87
- [258] Petasny M, Bentata M, Pawellek A, Baker M, Kay G and Salton M. Splicing to Keep Cycling: The Importance of Pre-mRNA Splicing during the Cell Cycle. *Trends in Genetics : TIG*. 2021, 37(3): 266-278
- [259] Nottrott S, Urlaub H and Lührmann R. Hierarchical, clustered protein interactions with U4/U6 snRNA: a biochemical role for U4/U6 proteins. *The EMBO Journal*. 2002, 21(20): 5527-5538
- [260] Jurica M S and Moore M J. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Molecular cell*. 2003, 12(1):
- [261] Maeder C and Guthrie C. Modifications target spliceosome dynamics. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2008, 15(5): 426-428
- [262] Li Y, Jiang D, Zhang Q, Liu X and Cai Z. Ubiquitin-specific protease 4 inhibits breast cancer cell growth through the upregulation of PDCD4. *International Journal of Molecular Medicine*. 2016, 38(3): 803-811
- [263] Wang Y, Zhang J, Wu L, Liu W, Wei G, Gong X, Liu Y, Ma Z, Thiery J P and Chen L. Tricho-rhino-phalangeal syndrome 1 protein functions as a scaffold required for ubiquitin-specific protease 4-directed histone deacetylase 2 de-ubiquitination and tumor growth. *Breast Cancer Research*. 2018, 20(1): 83
- [264] Xing C, Lu X-X, Guo P-D, Shen T, Zhang S, He X-S, Gan W-J, Li X-M, Wang J-R, Zhao Y-Y, Wu H and Li J-M. Ubiquitin-Specific Protease 4-Mediated Deubiquitination and Stabilization of PRL-3 Is Required for Potentiating Colorectal Oncogenesis. *Cancer Research*. 2016, 76(1): 83-95
- [265] Zhou Y, Liang P, Ji W, Yu Z, Chen H and Jiang L. Ubiquitin-specific protease 4 promotes glioblastoma multiforme via activating ERK pathway. *OncoTargets and Therapy*. 2019, 12: 1825-1839
- [266] Hall J M, Lee M K, Newman B, Morrow J E, Anderson L A, Huey B and King M C. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*. 1990, 250(4988): 1684-1689
- [267] Steichen-Gersdorf E, Gallion H H, Ford D, Girodet C, Easton D F, Dicioccio R A, Evans G, Ponder M A, Pye C and Mazoyer S. Familial site-specific ovarian cancer is linked to BRCA1 on 17q12-21. *American Journal of Human Genetics*. 1994, 55(5): 870-875
- [268] King M-C, Marks J H and Mandell J B. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*. 2003, 302(5645): 643-646
- [269] Zhao W, Wiese C, Kwon Y, Hromas R and Sung P. The BRCA Tumor Suppressor Network in Chromosome Damage Repair by Homologous Recombination. *Annual Review of Biochemistry*. 2019, 88: 221-245
- [270] Russi M, Marson D, Fermeglia A, Aulic S, Fermeglia M, Laurini E and Pricl S. The fellowship of the RING: BRCA1, its partner BARD1 and their liaison in DNA repair and cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. 2021: 108009
- [271] Ayi T C, Tsan J T, Hwang L Y, Bowcock A M and Baer R. Conservation of function and primary structure in the BRCA1-associated RING domain (BARD1) protein. *Oncogene*. 1998, 17(16): 2143-2148

- [272] Murphy C G and Moynahan M E. BRCA gene structure and function in tumor suppression: a repair-centric perspective. *Cancer Journal*. 2010, 16(1): 39-47
- [273] Drost R, Bouwman P, Rottenberg S, Boon U, Schut E, Klarenbeek S, Klijn C, Van Der Heijden I, Van Der Gulden H, Wientjens E, Pieterse M, Catteau A, Green P, Solomon E, Morris J R and Jonkers J. BRCA1 RING function is essential for tumor suppression but dispensable for therapy resistance. *Cancer Cell*. 2011, 20(6): 797-809
- [274] Shakya R, Reid L J, Reczek C R, Cole F, Egli D, Lin C-S, Derooij D G, Hirsch S, Ravi K, Hicks J B, Szabolcs M, Jasin M, Baer R and Ludwig T. BRCA1 tumor suppression depends on BRCT phosphoprotein binding, but not its E3 ligase activity. *Science*. 2011, 334(6055): 525-528
- [275] Yu X, Wu L C, Bowcock A M, Aronheim A and Baer R. The C-terminal (BRCT) domains of BRCA1 interact in vivo with CtIP, a protein implicated in the CtBP pathway of transcriptional repression. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998, 273(39): 25388-25392
- [276] Wang B, Hurov K, Hofmann K and Elledge S J. NBA1, a new player in the Brca1 A complex, is required for DNA damage resistance and checkpoint control. *Genes & Development*. 2009, 23(6): 729-739
- [277] Liu Z, Wu J and Yu X. CCDC98 targets BRCA1 to DNA damage sites. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2007, 14(8): 716-720
- [278] Hu X, Kim J A, Castillo A, Huang M, Liu J and Wang B. NBA1/MERIT40 and BRE interaction is required for the integrity of two distinct deubiquitinating enzyme BRCC36-containing complexes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011, 286(13): 11734-11745
- [279] Ismail I H, Andrin C, McDonald D and Hendzel M J. BMI1-mediated histone ubiquitylation promotes DNA double-strand break repair. *The Journal of Cell Biology*. 2010, 191(1): 45-60
- [280] Sobhian B, Shao G, Lilli D R, Culhane A C, Moreau L A, Xia B, Livingston D M and Greenberg R A. RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science*. 2007, 316(5828): 1198-1202
- [281] Yan J, Kim Y-S, Yang X-P, Albers M, Koegl M and Jetten A M. Ubiquitin-interaction motifs of RAP80 are critical in its regulation of estrogen receptor alpha. *Nucleic Acids Research*. 2007, 35(5): 1673-1686
- [282] Yu X and Chen J. DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Molecular and Cellular Biology*. 2004, 24(21): 9478-9486
- [283] Gong Z, Kim J-E, Leung C C Y, Glover J N M and Chen J. BACH1/FANCD1 acts with TopBP1 and participates early in DNA replication checkpoint control. *Molecular Cell*. 2010, 37(3): 438-446
- [284] Cantor S B, Bell D W, Ganesan S, Kass E M, Drapkin R, Grossman S, Wahrer D C, Sgroi D C, Lane W S, Haber D A and Livingston D M. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell*. 2001, 105(1): 149-160
- [285] Cantor S B and Guillemette S. Hereditary breast cancer and the BRCA1-associated FANCD1/BACH1/BRIP1. *Future Oncology*. 2011, 7(2): 253-261
- [286] Chen L, Nievera C J, Lee A Y-L and Wu X. Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008, 283(12): 7713-7720
- [287] Limbo O, Chahwan C, Yamada Y, De Bruin R a M, Wittenberg C and Russell P. Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination. *Molecular Cell*. 2007, 28(1): 134-146
- [288] Sartori A A, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J and Jackson S P. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*. 2007, 450(7169): 509-514

- [289] Yuan J and Chen J. N terminus of CtIP is critical for homologous recombination-mediated double-strand break repair. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009, 284(46): 31746-31752
- [290] Wu L C, Wang Z W, Tsan J T, Spillman M A, Phung A, Xu X L, Yang M C, Hwang L Y, Bowcock A M and Baer R. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nature Genetics*. 1996, 14(4): 430-440
- [291] Tarsounas M and Sung P. The antitumorigenic roles of BRCA1-BARD1 in DNA repair and replication. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020, 21(5): 284-299
- [292] Ruffner H, Joazeiro C A, Hemmati D, Hunter T and Verma I M. Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001, 98(9): 5134-5139
- [293] Lorick K L, Jensen J P, Fang S, Ong A M, Hatakeyama S and Weissman A M. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999, 96(20): 11364-11369
- [294] Xia Y, Pao G M, Chen H-W, Verma I M and Hunter T. Enhancement of BRCA1 E3 ubiquitin ligase activity through direct interaction with the BARD1 protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278(7): 5255-5263
- [295] Baer R and Ludwig T. The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2002, 12(1): 86-91
- [296] Prakash R, Zhang Y, Feng W and Jasin M. Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015, 7(4): a016600
- [297] Chen C-C, Feng W, Lim P X, Kass E M and Jasin M. Homology-Directed Repair and the Role of BRCA1, BRCA2, and Related Proteins in Genome Integrity and Cancer. *Annual Review of Cancer Biology*. 2018, 2: 313-336
- [298] Peng Y, Dai H, Wang E, Lin C C, Mo W, Peng G and Lin S Y. TUSC4 functions as a tumor suppressor by regulating BRCA1 stability. *Cancer Res*. 2015, 75(2): 378-386
- [299] Choudhury A D, Xu H and Baer R. Ubiquitination and proteasomal degradation of the BRCA1 tumor suppressor is regulated during cell cycle progression. *The Journal of biological chemistry*. 2004, 279(32): 33909-33918
- [300] Dziadkowiec K N, Gąsiorowska E, Nowak-Markwitz E and Jankowska A. PARP inhibitors: review of mechanisms of action and BRCA1/2 mutation targeting. *Przegląd menopauzalny Menopause review*. 2016, 15(4): 215-219
- [301] Yu M, Liu K, Mao Z, Luo J, Gu W and Zhao W. USP11 Is a Negative Regulator to γ H2AX Ubiquitylation by RNF8/RNF168. *The Journal of Biological Chemistry*. 2016, 291(2): 959-967
- [302] Peng Y, Liao Q, Tan W, Peng C, Hu Z, Chen Y, Li Z, Li J, Zhen B, Zhu W, Li X, Yao Y, Song Q, Liu C, Qi X, He F and Pei H. The deubiquitylating enzyme USP15 regulates homologous recombination repair and cancer cell response to PARP inhibitors. *Nature Communications*. 2019, 10(1): 1224
- [303] Yoshioka Y, Ye Y Q, Okada K, Taniguchi K, Yoshida A, Sugaya K, Onose J-I, Koshino H, Takahashi S, Yajima A, Yajima S and Abe N. Ubiquitin-specific peptidase 5, a target molecule of vialinin A, is a key molecule of TNF- α production in RBL-2H3 cells. *Plos One*. 2013, 8(12): e80931
- [304] Okada K, Ye Y Q, Taniguchi K, Yoshida A, Akiyama T, Yoshioka Y, Onose J-I, Koshino H, Takahashi S, Yajima A, Abe N and Yajima S. Vialinin A is a ubiquitin-specific peptidase inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2013, 23(15): 4328-4331

学位论文答辩委员会名单

论文题目				
作 者				
专 业				
研究方向				
答 辩 委 员 会	姓 名	职 称	学科专业	工作单位

- 注：1. “*”为学位论文评阅人；
2. 答辩委员会委员全部为论文评阅人。

致 谢

时光荏苒，转眼已到八年求学光阴的挥别时刻。蓦然回首，心中唯余感激。

首先，感谢我的导师邵根泽教授，邵老师从选题、实验设计、操作技术到论文修改与投递等各方面悉心指导我进行本课题的研究工作。邵老师毫无疑问充当着我们科学道路上的引路人，邵老师给予我们极大的自由空间，鼓励我们心无旁骛地探索生命科学的未知领域；同时，邵老师也会在课题交流讨论中给出建设性意见，帮助我们解决难题、渡过难关。在此，向邵老师致以最诚挚的敬意和感谢！

感谢李莉老师在科研和课题进展上的指导和在生活上对我的鼓励和关心。在课题遇到挫折时，李老师总是认真聆听，在我困惑时帮我指出问题、缕清思路，继而给我专业知识上的指导、实验设计上的建议，每每都令我茅塞顿开、柳暗花明。在生活中焦虑失意时，李老师总是给予我温暖的鼓励、真切的关怀；同样的，李老师也在我课题进展时、工作落定时分享喜悦。在此，向李莉老师致以最诚挚的谢意！

感谢林明老师将实验室试剂订购、仪器维修、财务报销等各项事务打理的井井有条，为我课题的顺利进行提供了重要保障。在此向您表达由衷的感谢！

感谢宋青老师、曹继祥老师、张小燕老师对我教学实践、学系事务的帮助以及生活的关心！

感谢军事科学院裴华东老师课题组、浙江大学杨月红老师课题组、军事科学院张令强老师课题组、放射系王嘉东老师课题组、人体解剖与组织胚胎学系的张宏权教授对我课题研究的帮助！

感谢基础医院研究生办公室李平风老师、杨笑菡老师、舒丹毅老师以及徐兰老师在我研究生学习、学工以及毕业申请、就业准备等各个方面对我的关心与帮助！

特别感谢常芬师兄对我课题研究的指导以及生活的关心。虽然师兄已经毕业，但师兄仍然会在我的课题遇到难题时积极地帮助我寻找解决办法、在我生活和学习上遇到困扰时耐心聆听和解惑。衷心祝愿师兄以后在工作岗位、家庭生活上一切顺利！特别感谢李琴师姐对我课题的帮助、生活的关心以及一路以来的支持和陪伴。我们一起加油做实验，一起欢乐追剧，一起寻觅美食；师姐陪伴着我经历焦虑迷茫的时期，又终于迎来互相分享喜悦的时刻，相信我们的故事未来也会在苏州和上海继续。特别感谢马燕芳对我科研、学习和生活的帮助与关心，希望你的博士研究生涯可以一切顺利！

感谢实验室的张婷师姐、邓靖程师兄、段军毅、刘润宇、燕星月、韩倩影、胡雨萌、对我的关心和帮助！

感谢我的舍友张心培、张雨祺，从初入燕园到告别北医，我们三人朝夕相处了八年时光，有太多共同的美好回忆。感谢你们在我失落时鼓励我，在我懈怠时鞭策我，更感

谢你们八年来润物细无声的关心、包容和陪伴！

感谢我亲爱的朋友买瑞、丹磊、悦悦、娟儿，纵使相隔千里，你们的存在本身就足够让我心安。

最后，我要感谢我的父母，我的家人。求学二十载，爸爸妈妈一如既往的支持与鼓励，你们永远是最坚实的后盾，亲人永远是我前进的动力，也是我保持乐观积极的精神源泉。