

## 领域前沿 · 中国



张令强, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所、国家蛋白质科学中心(北京)、蛋白质组学国家重点实验室研究员, 博士生导师。2003年毕业于军事医学科学院细胞生物学专业, 目前的主要研究方向是蛋白质泛素化修饰与人类疾病。他带领课题组较为系统地回答了HECT型泛素连接酶Smurf1如何被激活与灭活、如何通过靶向泛素化进行骨质疏松治疗、抑癌蛋白p53与PTEN的稳定性与活性如何受到精细调控等科学与技术问题, 为骨质疏松和肿瘤治疗药物的研发提供了潜在靶点。作为通讯或共同通讯作者在Nat Cell Biol、Nat Med、Nat Commun、Cell Rep、Proc Natl Acad USA、EMBO J、EMBO Rep、Cell Res等著名刊物发表论文50余篇, 这些研究全部在国内完成, 并产生了重要的国际影响, 论文被Nature、Nat Med、Nat Rev Mol Cell Biol、Cell、Mol Cell等国际学术刊物较为广泛地正引与评论。基于这些研究成果, 先后获得北京市科学技术一等奖、中华医学科技二等奖、国家科技进步奖创新团队奖等, 曾获国家杰出青年基金、中国青年科技奖、中国科协求是杰出青年奖、树兰医学奖青年奖、贝时璋青年生物物理学家奖, 入选科技北京百名领军人才和全军学科拔尖人才。

## 去泛素化酶OTUD3通过稳定PTEN抑制癌症发生发展

李洪昌<sup>#</sup> 张鹏飞<sup>#</sup> 袁林 张令强<sup>\*</sup>

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京蛋白质组研究中心,  
蛋白质组学国家重点实验室, 肿瘤医学协同创新中心, 北京 100850)

**摘要** PTEN(phosphatase and tension homology, deleted in chromosome 10)是重要的抑癌分子, 其蛋白剂量水平的精细变化与肿瘤的发生发展密切相关。PTEN的蛋白水平调控研究一直是该领域的研究热点, 虽然已经发现了数个PTEN的泛素连接酶, 但能调控PTEN蛋白稳定性的去泛素化酶却一直不明确。该文介绍了PTEN泛素化修饰的最新进展, 去泛素化酶OTUD3(OTU domain-containing protein 3)通过去除PTEN的多聚泛素化维持其蛋白水平, 并发挥抑癌功能。这一研究进展弥补了通过拮抗泛素化降解从而稳定PTEN这一长期未被阐释的调控机制。

**关键词** PTEN; 去泛素化酶; OTUD3; 乳腺癌

## Deubiquitylase OTUD3 Regulates PTEN Stability and Suppresses Tumorigenesis

Li Hongchang<sup>#</sup>, Zhang Pengfei<sup>#</sup>, Yuan Lin, Zhang Lingqiang<sup>\*</sup>

(State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing Institute of Radiation Medicine, Collaborative Innovation Center for Cancer Medicine, Beijing 100850, China)

国家自然科学基金重点项目(批准号: 31330021)和北京市自然科学基金(批准号: 5142020)资助的课题

<sup>#</sup>共同第一作者

\*通讯作者。Tel: 010-66931216, E-mail: zhanglq@nic.bmi.ac.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31330021) and the Natural Science Foundation of Beijing (Grant No.5142020)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work

\*Corresponding author. Tel: +86-10-66931216, E-mail: zhanglq@nic.bmi.ac.cn

网络出版时间: 2016-06-24 16:19:55

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160624.1619.004.html>

**Abstract** PTEN (phosphatase and tension homology, deleted in chromosome 10) is one of the most important tumor suppressors and a small quantity of reduction in PTEN protein level can lead to occurrence and development of tumors. The regulation of PTEN protein stability has been an attractive hotspot. Although several ubiquitin ligases for PTEN have been identified, the deubiquitylase for de-polyubiquitylation and stabilization of PTEN is less defined. We recently report that OTUD3 (OTU domain-containing protein 3) acts as a deubiquitylase for PTEN, de-polyubiquitylates and stabilizes PTEN, then functions as a tumor suppressor in the regulation of breast cancer development. This progress revealed a molecular mechanism that stabilizes PTEN by antagonizing its ubiquitylation.

**Keywords** PTEN; deubiquitylase; OTUD3; breast cancer

## 1 PTEN: 生理条件下的重要抑癌蛋白

PTEN(phosphatase and tension homology, deleted in chromosome 10)是1997年在人类第10号染色体上首次发现并克隆到的抑癌基因<sup>[1-2]</sup>, 通过近20年的研究, 发现PTEN在肿瘤的发生发展中起着至关重要的抑制作用。PTEN基因的生殖突变与体细胞突变与多种肿瘤的发生发展密切相关, PTEN在脑胶质瘤、前列腺癌、乳腺癌、肺癌<sup>[1-5]</sup>等多种肿瘤中具有很高的突变率或低表达率, 并且在Cowden综合征<sup>[6]</sup>、Bannayan-Zonana综合征<sup>[7]</sup>等肿瘤易感性疾病中同样存在很高的遗传性突变率。此外, PTEN基因纯合缺失的小鼠因细胞增殖过快、程序性死亡不足在胚胎的9.5 d出现死亡<sup>[8]</sup>, 而PTEN基因杂合缺失小鼠有半数在一年之内死亡, 剩下的一半也自发形成乳腺癌、淋巴瘤等多种癌症<sup>[9-10]</sup>。

PTEN具有脂质和蛋白双重磷酸酶活性, 它在细胞质中利用其脂质磷酸酶活性将细胞质中的磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸去磷酸化生成磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸, 从而抑制PI3K(phosphatidylinositol 3-kinase)-Akt通路, 发挥抑癌功能<sup>[11]</sup>。而在细胞核中, PTEN还可通过以下几种方式发挥抑癌功能: (1)PTEN通过促进P300介导的p53乙酰化响应DNA损伤, 控制细胞增殖<sup>[12]</sup>; (2)PTEN直接结合细胞后期促进复合物(anaphase-promoting complex or cyclosome, APC/C), 增强APC/C-CDH1复合物的相互作用, 增强其抑癌功能<sup>[13]</sup>; (3)PTEN结合着丝粒蛋白-C(centromeric protein-C, CENP-C), 提高基因组稳定性<sup>[14]</sup>; (4)PTEN通过上调与DNA双链断裂修复密切相关的关键分子RAD51维持基因组稳定性<sup>[14]</sup>。也正是由于PTEN在维持基因组稳定性上的重要作用, 在2007年,《Nature Reviews Molecular Cell Biology》将PTEN称为“a new guardian of the

genome”, 与p53并列为基因组稳定性的两大守护者。

## 2 PTEN蛋白稳定性的泛素化调控研究

由于PTEN在抑制肿瘤发生发展中发挥重要的作用, 因此, 对PTEN的蛋白稳定性调控研究一直是该领域内的研究热点。在细胞内, 泛素-蛋白酶体途径(ubiquitin-proteasome system)是一个重要的蛋白质降解调控系统, 通过泛素连接酶(protein ubiquitin ligase, E3)促进底物蛋白多聚泛素化进而促进蛋白底物降解。但同时, 泛素-蛋白酶体途径也是一个受严格调控并可逆的过程, 去泛素化酶(deubiquitylase, DUB)可介导底物蛋白去泛素化并稳定其蛋白水平。目前, 研究发现, 能够促进PTEN泛素化(包括单泛素化与多聚泛素化)的泛素连接酶已有5个[Nedd4-1(Neural precursor cell-expressed developmentally downregulated gene 4-1)、XIAP(X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein)、WWP2(WW domain-containing protein 2)、CHIP(C terminus of Hsc70-interacting protein)、TRIM27(tripartite motif-containing protein 27)/RFP(ret finger protein)]<sup>[15-19]</sup>。与p53半衰期很短不同, PTEN蛋白的半衰期相对较长, PTEN在细胞中的内源蛋白水平较高, 提示PTEN蛋白稳定性具有重要的维持机制, 我们推测, 去泛素化酶在其中担当了重要角色。但是, PTEN去泛素化酶的研究却极少。在我们开展调节PTEN蛋白稳定性的去泛素化酶的筛选与研究时, 仅有一个去泛素化酶HAUSP(herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease, 又称为USP7, ubiquitin-specific-processing protease 7)被报道能调节PTEN的去泛素化作用。然而, HAUSP只去除PTEN的单泛素化, 促进PTEN由细胞核移位至细胞质, 并没有调控PTEN蛋白稳定性的功能<sup>[20]</sup>。因此, 特异去除PTEN多聚泛素化、维持

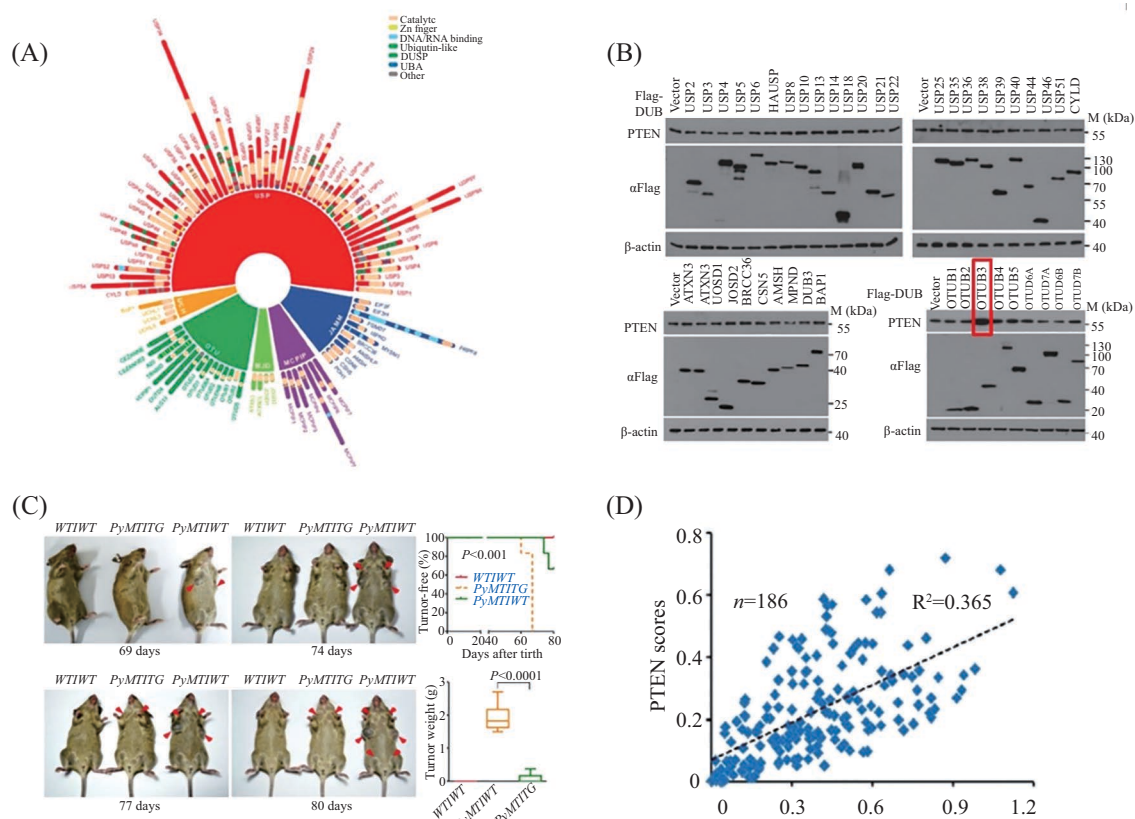
PTEN蛋白稳定性的去泛素化酶亟待鉴定。

### 3 OTUD3通过去除PTEN多聚泛素化维持其蛋白稳定性发挥抑癌功能

我们通过对人类去泛素化酶库中的接近90个去泛素化酶进行无偏性筛选,发现OTU亚家族中的OTUD3(OTU domain-containing protein 3)分子可以显著地上调PTEN蛋白水平(图1)。OTUD3定位于人类染色体1p36.13,是一个迄今研究极少的基因。进一步研究发现,OTUD3蛋白主要定位于细胞质, N-端含OTU结构域的区域直接参与PTEN的C2结构域的结合,通过去除PTEN的多聚泛素化修饰、拮抗PTEN的泛素蛋白酶体降解,从而稳定PTEN的蛋白水平。敲低细胞内源OTUD3的表达,PTEN的蛋白稳定性显著下降,Akt通路被过度激活;而在细胞中过表达野生型OTUD3,PTEN的半衰期延长,PI3K-Akt通路受到抑制。细胞功能上,在乳腺癌细胞系中

过表达野生型OTUD3而非酶活突变型C76A可以抑制细胞增殖;裸鼠体内接种实验证明,OTUD3可以抑制肿瘤的形成。相反,在乳腺癌细胞系中敲低内源OTUD3的表达可以促进肿瘤细胞的增殖与侵袭转移能力,接种裸鼠后则加速肿瘤形成及转移。而在正常乳腺上皮细胞中敲低内源OTUD3的表达会使细胞发生转化,在裸鼠皮下注射该细胞可形成肿瘤。这些证据表明,OTUD3抑制乳腺癌的发生、发展与转移。重要的是,在PTEN表达缺陷的乳腺癌细胞系中,敲低OTUD3表达对细胞的增殖及成瘤能力没有显著影响,表明OTUD3调控肿瘤的发生发展依赖于PTEN的存在。

为在体内研究OTUD3的抑癌功能,我们构建了OTUD3转基因小鼠模型,研究发现,OTUD3转基因小鼠的多种组织器官以及MEF细胞中PTEN都呈高表达,PTEN的稳定性增强,泛素化水平显著降低,Akt通路受到抑制。将OTUD3转基因小鼠与MMTV-

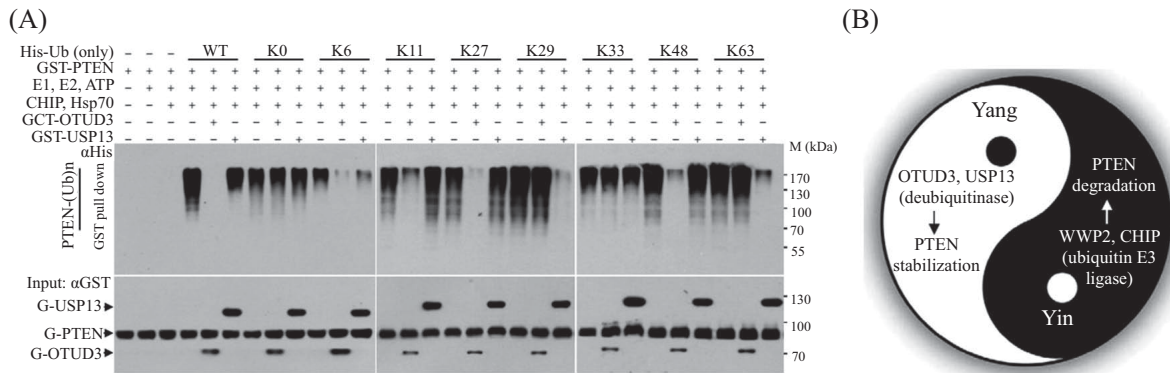


A: 去泛素化酶的各个家族及成员<sup>[21]</sup>; B: 通过无偏性筛选鉴定出PTEN的去泛素化酶OTUD3; C: OTUD3在生理条件下抑制乳腺癌发生发展; D: OTUD3与PTEN在乳腺癌病例中呈正相关。

A: the deubiquitinase families and members<sup>[21]</sup>; B: identifying OTUD3 as deubiquitinase of PTEN through unbiasedness screening; C: OTUD3 physiologically suppresses the occurrence and development of breast cancer; D: positive correlation of OTUD3 with PTEN protein levels in breast cancer.

图1 去泛素化酶OTUD3通过稳定PTEN抑制乳腺癌发生发展(根据参考文献[22]修改)

Fig.1 Deubiquitylase OTUD3 suppresses tumorigenesis by stabilizing PTEN (modified from reference [22])



A: OTUD3与USP13在去除PTEN多聚泛素化链类型上存在差异; B: PTEN的蛋白水平调控的“阴阳”平衡示意图。

A: The discrepancy between OTUD3 and USP13 in removing polyubiquitylation chains of PTEN; B: A “yin-yang” control model of PTEN protein at the post-translational level.

图2 去泛素化酶OTUD3与USP13在去除PTEN多聚泛素化机制上的异同(根据参考文献[22]修改)

Fig.2 The discrepancy and synergy in stabilizing PTEN between OTUD3 and USP13 (modified from reference [22])

PyMT转基因小鼠(一种乳腺癌自发成瘤小鼠模型)交配、观察发现, OTUD3转基因小鼠对MMTV-PyMT诱导的乳腺癌发生表现出显著的抑制效应。这从遗传学上证明, OTUD3是PTEN的一个重要的稳定调控因子, 在体内OTUD3发挥重要的抑癌功能(图1)。

此外, 我们通过大规模临床乳腺癌病人样本检测发现, 与癌旁组织相比, OTUD3在乳腺癌组织(*PTEN*基因的突变率低, 但蛋白异常低表达率高)中低表达, 并且PTEN的蛋白水平与OTUD3的表达呈正相关性, 且OTUD3的表达与病人的预后有明显相关性。OTUD3表达越高, 病人出现淋巴结转移的概率越小, 生存期越长, 预后越好。同时, 我们在乳腺癌样本的筛查过程中发现, OTUD3在乳腺癌中存在功能性丧失的基因突变(如E86K等), OTUD3的突变体(OTUD3-E86K)丧失了对PTEN的去泛素化修饰能力, 从而失去了维持PTEN的蛋白稳定性的功能。在正常乳腺上皮细胞中过表达OTUD3-E86K突变体会促进细胞恶性转化, 说明E86K突变将OTUD3从一个抑癌基因转变为了癌基因。

在研究的过程当中, 美国德州大学MD Anderson肿瘤中心的Li Ma实验室在《Nature Cell Biology》杂志发表了一篇与我们的工作非常相近的论文, 报道另一个去泛素化酶USP13可稳定PTEN、抑制Akt通路, 同时在乳腺癌组织中低表达<sup>[23]</sup>。为阐释清楚OTUD3与USP13在乳腺癌中对PTEN的调控关系, 我们设计实验对其进行系列研究。体外泛素化实验表明, OTUD3对PTEN的去泛素化修饰能力强于USP13。进一步分析发现, OTUD3主要去除PTEN

的K6/K11/K27/K48型泛素链修饰, 而USP13主要去除PTEN的K6/K29/K63型泛素链修饰(图2)。细胞水平上, 单敲低OTUD3细胞的增殖能力、迁移能力都强于单敲低USP13时相应的细胞学效应; 双敲低OTUD3/USP13表达时, 相应的细胞学效应进一步增强, 表明在细胞中OTUD3和USP13在功能上有一定的协同效应。这一结论进一步在裸鼠成瘤模型和组织芯片的免疫组化实验中得到验证。

我们的研究表明, OTUD3分子是PTEN蛋白稳定性的重要正调控因子, OTUD3-PTEN通路在肿瘤的抑制过程中发挥着重要作用。总之, 我们的研究回答了PTEN领域中一个长期没有解决的重大问题, 弥补了通过拮抗泛素化降解从而促进对PTEN稳定性调控这一机制长期未被解决的缺憾。从我们的研究中可见, PTEN泛素化与去泛素化的双向调控可以决定细胞命运, PTEN除了在细胞增殖与迁移中发挥功能外, 在细胞代谢、衰老以及干细胞的自我更新中也发挥着重要作用, 那在小鼠中敲除OTUD3基因后PTEN的蛋白水平会出现什么样的变化? 细胞功能会发生什么变化? OTUD3的主要生理功能是什么? 这些问题都需要通过基因敲除小鼠的研究来揭示。

对于去泛素化酶的研究, 这几年逐渐成为泛素化修饰研究领域的热点问题。越来越多去泛素化酶的功能被揭示, 但关于利用基因敲除小鼠模型揭示去泛素化酶的生理功能的报道却不多。究其原因, 一方面是由于对去泛素化酶的研究还不够深入; 但更重要的是, 目前在人体发现的去泛素化酶数量仅有100个左右, 与泛素连接酶的数量相

去甚远, 意味着一个去泛素化酶可能调控多个底物, 相应的, 一个底物也将受多个去泛素化酶共同调节, 这给去泛素化酶的生理功能研究带来极大的困难。然而, 作为泛素化修饰调控系统的重要组成部分, 去泛素化酶的研究亟待加强, 随着新技术的出现与改进, 动物模型构建效率的提升以及信息化技术的演进, 去泛素化酶的研究很可能迎来一个新的高峰。

### 参考文献 (References)

- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, *et al.* PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275(5308): 1943-7.
- Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, *et al.* Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997; 15(4): 356-62.
- Cairns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Esteller M, Herman JG, *et al.* Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res* 1997; 57(22): 4997-5000.
- Feilolter HE, Nagai MA, Boag AH, Eng C, Mulligan LM. Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas. *Oncogene* 1998; 16(13): 1743-8.
- Risinger JI, Hayes AK, Berchuck A, Barrett JC. PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. *Cancer Res* 1997; 57(21): 4736-8.
- Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, *et al.* Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* 1997; 16(1): 64-7.
- Marsh DJ, Dahia PL, Zheng Z, Liaw D, Parsons R, Gorlin RJ, *et al.* Germline mutations in PTEN are present in Bannayan-Zonana syndrome. *Nat Genet* 1997; 16(4): 333-4.
- Cristofano AD, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* 1998; 19(4): 348-55.
- Suzuki A, de la Pompa JL, Stambolic V, Elia AJ, Sasaki T, del Barco Barrantes I, *et al.* High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr Biol* 1998; 8(21): 1169-78.
- Podsypanina K, Ellenson LH, Nemes A, Gu J, Tamura M, Yamada KM, *et al.* Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(4): 1563-8.
- Hamada K, Sasaki T, Koni PA, Natsui M, Kishimoto H, Sasaki J, *et al.* The PTEN/PI3K pathway governs normal vascular development and tumor angiogenesis. *Genes Dev* 2005; 19(17): 2054-65.
- Tang Y, Eng C. PTEN autoregulates its expression by stabilization of p53 in a phosphatase-independent manner. *Cancer Res* 2006; 66(2): 736-42.
- Song MS, Carracedo A, Salmena L, Song SJ, Egia A, Malumbres M, *et al.* Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. *Cell* 2011; 144(2): 187-99.
- Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi PP, *et al.* Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* 2007; 128(1): 157-70.
- Wang X, Trotman LC, Koppie T, Alimonti A, Chen Z, Gao Z, *et al.* NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell* 2007; 128(1): 129-39.
- van Themsche C, Leblanc V, Parent S, Asselin E. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) regulates PTEN ubiquitination, content, and compartmentalization. *J Biol Chem* 2009; 284(31): 20462-6.
- Maddika S, Kavela S, Rani N, Palicharla VR, Pokorny JL, Sarkaria JN, *et al.* WWP2 is an E3 ubiquitin ligase for PTEN. *Nat Cell Biol* 2011; 13(6): 728-33.
- Ahmed SF, Deb S, Paul I, Chatterjee A, Mandal T, Chatterjee U, *et al.* The chaperone-assisted E3 ligase C terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) targets PTEN for proteasomal degradation. *J Biol Chem* 2012; 287(19): 15996-6006.
- Lee JT, Shan J, Zhong J, Zhou B, Zhou A, Parsons R, *et al.* RFP-mediated ubiquitination of PTEN modulates its effect on AKT activation. *Cell Res* 2013; 23(4): 552-64.
- Song MS, Salmena L, Carracedo A, Egia A, Lo-Coco F, Teruya-Feldstein J, *et al.* The deubiquitinylation and localization of PTEN are regulated by a HAUSP-PML network. *Nature* 2008; 455(7214): 813-7.
- Fraile J, Quesada V, Rodriguez D, Freije J, López-Otín C. Deubiquitinases in cancer: New functions and therapeutic options. *Oncogene* 2012; 31(19): 2373-88.
- Yuan L, Lv Y, Li H, Gao H, Song S, Zhang Y, *et al.* Deubiquitylase OTUD3 regulates PTEN stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 2015; 17(9): 1169-81.
- Zhang J, Zhang P, Wei Y, Piao HL, Wang W, Maddika S, *et al.* Deubiquitylation and stabilization of PTEN by USP13. *Nat Cell Biol* 2013; 15(12): 1486-94.