

泛素E3连接酶接头蛋白SPOP和MDM2在DNA损伤修复中的作用

林子涵 曹心怡 金晓锋*

(宁波大学医学院生物化学与分子生物系, 浙江省病理生理学技术研究重点实验室, 宁波 315211)

摘要 DNA损伤修复是维持细胞基因组稳定性和完整性的基础, 越来越多的研究发现, E3泛素连接酶在DNA损伤修复中起着重要的作用。该文将介绍DNA损伤修复的机制、DNA损伤修复与疾病的关系、及E3泛素连接酶接头蛋白MDM2和SPOP在DNA损伤修复中的作用。重点围绕DNA损伤修复的两条通路: E3泛素连接酶接头蛋白SPOP与ATM/ATR信号通路以及MDM2/p53信号通路对DNA修复的分子机制进行总结, 以期对DNA损伤修复提供新思路。

关键词 DNA损伤修复; ATM/ATR; SPOP; MDM2; p53

The Roles of E3 Adaptor SPOP and MDM2 in the DNA Damage Repair

LIN Zihan, CAO Xinyi, JIN Xiaofeng*

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Pathophysiology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical School of Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract DDR (DNA damage repair) is the basis for maintaining the stability and integrity of the cell genome. More and more researches find that E3 ubiquitin-protein ligase plays an important role in DDR. This review analyzes the mechanisms of DDR, the relationships between DDR and diseases, and the roles of E3 ubiquitin-protein ligases, such as MDM2 and SPOP, in DDR. Moreover, the molecular mechanisms of DDR in two key signal pathways were summarized, including E3 ubiquitin-protein ligase SPOP and ATM (ataxia-telangiectasia mutated)/ATR (ATM and Rad3-related) pathway, as well as E3 ubiquitin-protein ligase MDM2 and p53 pathway. This review looks forward to providing new ideas for DDR.

Keywords DNA damage repair; ATM/ATR; SPOP; MDM2; p53

核DNA不断暴露于各种内源性或外源性DNA损伤剂中, 它们要么是物理的损伤剂(紫外线、电离和电磁辐射), 要么是生物的损伤剂(病毒, 某些植物毒素或细菌真菌代谢产物)或化学的损伤剂(亚硝酸类化合物、碱基类似物、烷基化和芳基烷基化剂、羟胺类)。绝大多数DNA损伤影响双螺旋的一级结

构, 即碱基被进行化学修饰。这些修饰反过来可以通过引入非天然化学键或不在标准双螺旋中的大体积加合物来破坏分子的规则螺旋结构, 因此这些病变导致DNA链断裂(单链或双链)、突变和染色体重排^[1]。这些改变最终可能导致单细胞生物的细胞死亡或多细胞生物的退化和衰老^[2]。

收稿日期: 2020-10-01 接受日期: 2020-11-16

浙江省自然科学基金(批准号: LY20C070001)、宁波市自然科学基金(批准号: 2018A610213)、国家自然科学基金(批准号: 31801165)和宁波大学王宽诚基金资助的课题

*通讯作者。Tel: 0574-87609951, E-mail: jinxiaofeng@nbu.edu.cn

Received: October 1, 2020 Accepted: November 16, 2020

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No. LY20C070001), the Natural Science Foundation of Ningbo (Grant No. 2018A610213), the Natural Science Foundation of China (Grant No. 31801165) and the K.C. Wong Magna Fund in Ningbo University

*Corresponding author. Tel: +86-574-87609951, E-mail: jinxiaofeng@nbu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5433>

据估计,细胞每天都会经历超过20 000次DNA损伤事件^[3]。为应对DNA损伤事件、维持基因组的稳定性,机体进化出了高度保守的应答体系,被称为DNA损伤应答,DNA损伤应答包括4个部分:DNA损伤修复(DNA damage repair, DDR)、DNA损伤检查点、转录反应和凋亡^[4]。DDR由一个全面的信号网络协调通过启动细胞周期检查点、DNA修复和程序化细胞死亡机制,对DNA损伤(内源性和外源性)作出反应。DDR的总体功能是消除或减少错误的DNA复制传递给子细胞的风险^[5]。一方面,最佳DDR的激活在早期肿瘤发生过程中起着重要的抗肿瘤屏障作用^[6];另一方面,最佳的DDR也负责细胞对DNA损伤剂的反应,如电离辐射(ionizing radiation, IR)和许多化疗药物^[7]。

DNA修复是一个复杂的生物学过程,它确保了细胞基因组的稳定性和完整性。DNA损伤修复通常由特定的DNA修复途径修复,常见的DNA修复途径分为5种:碱基切除修复(base excision repair, BER)、同源重组(homologous recombination, HR)、非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)、错配修复(mismatch repair, MMR)、核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)。碱基切除修复途径负责感知和修复DNA中的单链断裂(single-strand breaks, SSBs),而同源重组和非同源末端连接则用来修复双链断裂。错配修复途径纠正了不适当的核苷酸插入、缺失和单核苷酸不匹配的合并,核苷酸切除修复途径纠正紫外线辐射诱导的嘧啶二聚体和其他螺旋扭曲病变。另外,还有不常见的易位合成(translesion synthesis, TLS)途径和范科尼贫血(Fanconi anaemia, FA)途径。所有的DNA修复途径都是由超过150个人类DNA修复基因编码的^[8]。

1 DNA损伤修复与疾病关系

基因组不稳定是人类癌症的一个基本特征,DNA修复缺陷导致基因组持续受损,促进了许多人类癌症的发生^[9]。哺乳动物细胞维持基因组稳定性的关键在于是否能够产生一个最佳的DDR^[10]。在许多癌症类型中观察到未修复的DNA损伤和随后的DDR破坏,DNA损伤是基因组不稳定的基础,也是癌症的标志之一^[9],并伴随肿瘤的发生与发展^[11]。

多项研究发现在一种或多种癌症类型中,每一DDR过程都在某种程度上受到功能损害,这种模式

在已知DNA修复基因高频突变的家族性癌症中非常明显:乳腺癌中的*BRCA1*(BRCA1 DNA repair associated)和*BRCA2*(BRCA2 DNA repair associated)、结直肠癌(colorectal cancer, CRC)和卵巢癌(ovarian cancer, OC)中的MMR和聚合酶[*MLH1*(mutL homolog 1)、*MSH2*(mutS homolog 2)、*MSH6*(mutS homolog 6)、*PMS2*(PMS1 homolog 2)和极性基因]缺乏,OC中的*RAD51C*(RAD 51 paralog C)和*RAD51D*(RAD51 paralog D)的有害突变以及*BRCA1*突变^[12-17]。其他以DNA修复或DDR受损为特征的罕见遗传综合征导致罹患各种癌症,例如共济失调毛细血管扩张症伴ATM(ataxia-telangiectasia mutated)突变、Bloom综合征伴过度基因组不稳定、FA伴DNA双链断裂(DNA doubled-strand breaks, DSBs)修复同源重组部分缺陷、着色性干皮病伴内质网缺陷和对紫外线过敏。遗传综合征约占所有恶性肿瘤的2%^[18]。散发性癌症有多种病因,在恶性肿瘤中占绝大多数。DNA修复机制在这些癌症的发生和发展中起着重要作用^[19]。最近的一项研究综述了在33种癌症类型中DNA修复和DDR途径与癌症的发生、发展和患者治疗反应的关系,在33%的DNA修复和DDR基因中观察到突变伴随杂合性丢失^[20]。

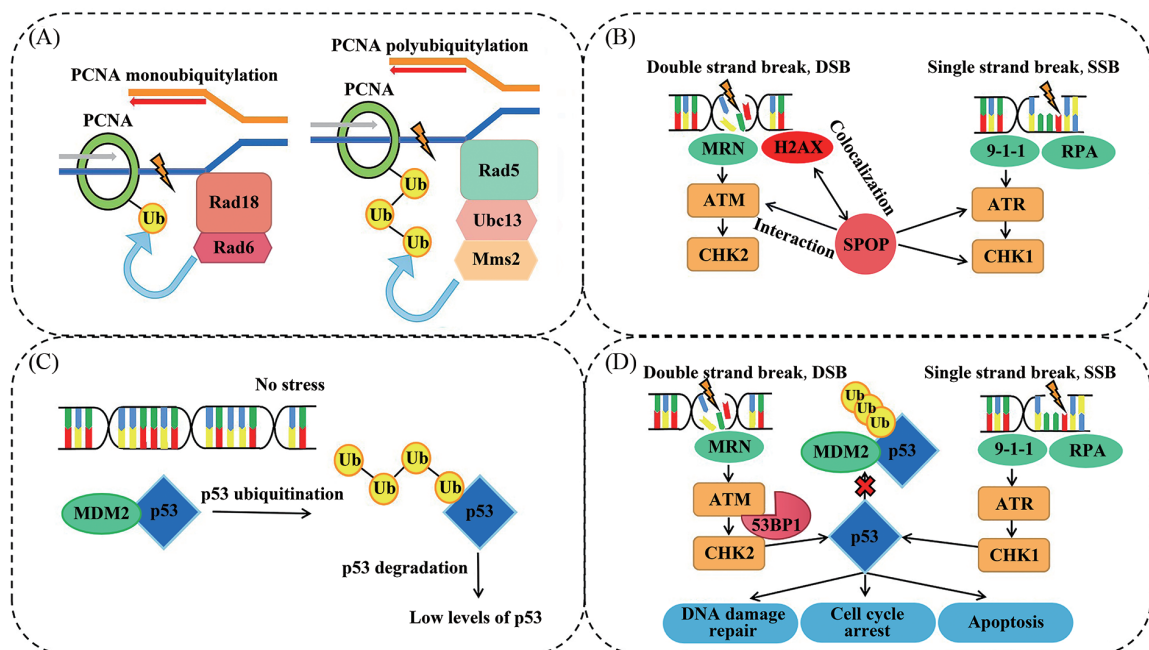
2 DNA损伤修复和UPS

正常人体中调控细胞增殖以及活力的蛋白需要通过及时表达并被准确的修饰来维持其正常功能,当这些蛋白表达或修饰异常时就有可能导致细胞的过度增殖并引发细胞癌变。因此,为了防止这一现象的发生,这些蛋白需要通过某一途径被有效地降解。人体中蛋白质降解有2种途径,溶酶体降解途径和蛋白酶体降解途径,其中蛋白酶体降解途径极为重要占有降解的80%,该途径通过泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)完成,UPS是一种存在于所有真核细胞中的多催化细胞质和细胞核蛋白的复合物,主要负责非溶酶体途径的蛋白水解并维持细胞中正常的蛋白质稳态^[21]。蛋白酶体降解系统由泛素(ubiquitin, Ub)、泛素活化酶(ubiquitin-activating enzyme, E1)、泛素结合酶(ubiquitin-conjugating enzyme, E2s)、泛素-蛋白连接酶(ubiquitin-protein ligase, E3s)、26S蛋白酶体和泛素解离酶(deubiquitinating enzymes, DUBs)等组成^[22]。其中,E1能够水解ATP,并在自身的活性位点半胱氨酸(Cys)和泛素C末端76号谷氨酸

(Gly76)之间形成高能硫酯键,从而激活泛素;E2s能够结合泛素,并在E1和E3s之间往返,使三者的功能形成一个整体;E3s具有特异性识别底物的能力,并能够催化泛素分子从E2s转移到靶蛋白上,使靶蛋白被泛素化。因为泛素分子本身携带有7个赖氨酸残基,已经共价修饰到底物蛋白上的泛素分子的赖氨酸残基还可继续发生泛素化修饰,形成泛素链。因此,细胞中可存在由不同种泛素链导致的泛素化修饰:负责蛋白质降解的K11链,同为降解型负反馈调节蛋白质稳定性的K48链,调节信号事件、受体内吞作用和免疫应答的非降解型K63链以及功能尚不明确K6、K27、K29、K33链^[23]。

DNA损伤修复的关键在于许多激酶的激活,而UPS可被用来调控蛋白水平中极为重要的一环,具有特异性识别底物功能的E3泛素-蛋白连接酶,这提示我们E3泛素-蛋白连接酶和DNA损伤修复之间存在紧密联系。在复制后修复(postreplication repair, PRR)中起作用的酵母Rad6(E2 ubiquitin-conjugating protein Rad6)被证明是E2泛素结合酶,这也是DNA修复和泛素化之间出现的第一个联系^[24]。PRR是一种DNA损伤耐受途径,通过DNA聚合酶加工因

子PCNA(proliferating cell nuclear antigen)的泛素化和类泛素化来实现复制^[25]。酵母PRR的早期步骤是介导环型E3泛素-蛋白连接酶Rad18与E2泛素结合酶Rad6相结合的PCNA单泛素化^[26-27](图1A)。当复制叉遇到病变时,PCNA的Lys164上发生单泛素化,单链DNA由E3连接酶Rad18识别,它与E2泛素结合酶Rad6相互作用,泛素化PCNA^[25]。这种修饰被特殊的TLS聚合酶所识别,TLS聚合酶可以进行DNA损伤修复,但通常以保真度为代价,因此容易出错^[26,28]。酵母PCNA也可以通过E3连接酶Rad5在Lys164上进行多聚泛素化,与二聚体E2泛素结合酶Ubc13-Mms2相连,Rad5-Ubc13-Mms2在PCNA上产生由K63连接的非降解型泛素链,促进姐妹染色单体合成和与HR相关的模板切换机制^[29](图1A)。虽然酵母和人之间可能存在PRR的差异,但该途径在进化上通常是保守的,在许多物种中,Rad18的敲除或耗尽导致PRR、PCNA单泛素化缺陷以及TLS聚合酶在复制叉阻滞位置的积累^[30]。综上所述,泛素化修饰和DNA损伤之间有着密切的联系,接下来将从两条通路详细讲述SPOP(speckle-type POZ protein)和MDM2(mouse double minute 2)作为E3泛



A: PCNA的单泛素化和多聚泛素化; B: SPOP与ATM/ATR信号通路; C: 正常情况下MDM2对p53泛素化; D: DNA损伤情况下MDM2与p53在DDR中的调节。

A: the monoubiquitylation and polyubiquitylation of PCNA; B: SPOP and ATM/ATR signal pathway; C: MDM2 ubiquitinates p53 under normal conditions; D: regulation of MDM2 and p53 in DDR under DNA damage.

图1 泛素化在DNA损伤修复中的作用

Fig.1 The role of ubiquitination in DNA damage repair

素-蛋白连接酶的接头蛋白, 分别在DNA损伤修复的ATM(ataxia-telangiectasia mutated)/ATR(ATM and Rad3-related)和53BP1(P53-binding protein 1)/P53通路中起着重要的作用。

E3泛素连接酶可分为3个家族: RING(really interesting new gene)、HECT(homologous to E6AP carboxyl terminus)、U-box(UFD2 homology), RING家族是E3泛素连接酶中最大的家族^[31]。MDM2和SPOP都属于E3泛素连接酶中的RING家族, 但是MDM2倾向于形成异二聚体, 而SPOP属于多亚单位RING中的Cullin环连接酶(Cullin RING ligase, CRL)超家族^[31]。即便如此, MDM2和SPOP在功能上也存在着联系, 在前列腺癌中, MDM2和SPOP有共同的底物AR, 它们通过泛素化AR使其降解来抑制前列腺癌^[32]。

3 E3泛素连接酶接头蛋白SPOP与ATM/ATR信号通路

在哺乳动物细胞中, ATM、ATR和DNA依赖性蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase, DNA-PK)是最上游的DDR激酶, 它们通过激活CHK1(serine/threonine protein kinase CHK1)、CHK2(checkpoint kinase 2)来激活第二波磷酸化。DSBs发生后, ATM迅速定位于DNA损伤部位并且它的激酶活性增加^[33-34]。DSBs激活ATM可导致多种底物磷酸化, 如BRCA1、CHK2和p53, 从而介导ATM对DNA修复、细胞周期阻滞、凋亡和其他下游过程的影响^[35-36]。ATM的激活需要一个关键调节器, 即MRN(Mre11-Rad50-Nbs1)复合体。在体外, 纯化的MRN复合体可直接与dsDNA结合, 其对于ATM在DSBs中的快速定位及其在细胞中的激活是必要的, 在dsDNA存在下纯化的MRN复合体足以直接刺激二聚的或寡聚的ATM激酶。纯化蛋白的体外研究表明, MRN激活ATM需要游离dsDNA的末端^[37]。紧接着, ATM在DNA末端最初被激活之后, ATM在染色质标记的DSBs上触发一系列DDR事件。驱动这一过程的关键是组蛋白变体H2AX通过ATM磷酸化, DNA损伤后几分钟内, 发生由DSB诱导的H2AX的磷酸化, 它会迅速扩散到大的染色质域(>500 Kb)内破坏DNA断裂^[38-39]。

与ATM不同的是, ATR通过与单链DNA(single-stranded DNA, ssDNA)相互作用而对各种类型的DNA损伤作出反应。ATR与ATR相互作用蛋白(ATR interacting protein, ATRIP)形成稳定的专性复合物

ATR-ATRIP, ATR-ATRIP识别与RPA结合的ssDNA, 而结合ssDNA的RPA具有较高的亲和力, 可定位于DNA损伤部位^[40]。类似于ATM, ATR的激活也需要复合体的参与, 研究发现9-1-1(Rad9-Rad1-Hus1)复合体参与ATR的激活^[40-41]。虽然RPA-ssDNA在将ATR-ATRIP招募到DNA损伤部位时起着关键作用, 在这些部位它可以识别并磷酸化一些底物, 但仅此结构不足以完全激活ATR信号通路。研究表明, 至少有3种调节机制有助于ATR通路的完全激活。第一, ATR和它的一些底物独立定位于受损的DNA, 增加了这些蛋白质在DNA损伤部位的局部浓度。第二, ATR的激酶活性受到损伤DNA上的特异性调节因子的刺激。第三, 通过一系列磷酸化介导的蛋白质-蛋白质相互作用, ATR与其底物形成动态信号复合物, 所有这些机制都受到受损DNA的调控, 并且相互交织^[33](图1B)。

DNA损伤修复中的ATM/ATR通路如上所述, E3泛素连接酶SPOP在其中扮演着重要的角色。 γ -H2AX是组蛋白变体H2AX的磷酸化形式和DSB的标记物, ZHANG等^[42]的研究观察到SPOP和 γ -H2AX在细胞内明显的共定位, 因此, 这些观察表明SPOP被招募到DSBs处以应对DNA损伤。在IR作用下, SPOP和共济失调-毛细ATM相互作用被招募到DSBs处, 而SPOP的敲低则会影响DNA损伤修复的过程^[42](图1B)。除了与DNA损伤共定位外, HJORTH-JENSEN等^[43]发现, SPOP在抵抗复制压力中起着重要的作用, SPOP通过促进DNA修复和复制因子的转录表达来抵抗复制压力和基因组的不稳定。野生型SPOP与多数参与转录、mRNA剪接和出核的蛋白有关, 例如BRCA2、ATR、CHK1和RAD51等。SPOP促进这些基因的转录表达, 起到减少复制压力的作用, 而SPOP的敲低或者功能的丧失会促进自发复制压力和基因组不稳定, 尤其是对基因RAD51的影响, SPOP的敲低影响RAD51的形成, 使之不能应对复制压力以及失去让细胞从复制停滞中恢复的能力, 从而引起自发的复制压力和细胞周期进程异常^[43](图1B)。

不仅如此, BOYSEN等^[44]的研究还表明, SPOP可通过调节DSB修复来维持基因组稳定性。SPOP突变改变了DNA修复过程, 削弱了同源定向修复(homology-directed repair, HDR), 反而促进了容易出错的非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)而导致细胞基因组不稳定, 进而驱动前列腺

癌发生。RAD51和53BP1分别是HDR途径和NHEJ途径的标记物^[45]。53BP1是NHEJ的正调节因子,阻断5'DNA末端切除,如果53BP1不被HDR组分从DSB的位点清除,就会增强容易出错的NHEJ^[46]。值得注意的是,有SPOP-F133V表达的前列腺细胞显示出从DSB位点清除53BP1的延迟,在前列腺癌中常见的另一种SPOP突变(F102C)也有类似的影响,而且相较于WT-SPOP, SPOP-F133V减少了RAD51的形成,这与敲除SPOP的情况相似,说明SPOP-F133V在HDR中有选择性功能丧失。最后为了验证SPOP在DSB中的作用,分别对HDR和NHEJ做了功能读数, siRNA敲除SPOP可使人上皮细胞的HDR能力降低到类似的BRCA1敲除水平。相反,表达SPOP-F133V的上皮细胞中NHEJ活性增加,而敲除SPOP和敲除BRCA1均增加NHEJ^[44]。EL BEZAWY等^[47]的研究也表明, SPOP基因敲除后通过下调RAD51和CHK1来影响同源重组过程的进行。

4 MDM2与P53在DDR中的调节作用

MDM2是一种E3泛素-蛋白连接酶,在DNA损伤修复中有着重要的作用。组蛋白H2B的泛素化参与调节各种细胞功能:染色质重组、DNA复制等^[48]。H2B的泛素化也被证明与人类细胞中的DNA损伤反应有关^[49]。人类Mps1(human Mps1, hMps1)是一种蛋白激酶,可被DNA损伤激活,在Thr68处磷酸化CHK2,使CHK2在G₂/M处停止细胞周期^[50]。YU等^[51]的研究表明, hMps1和MDM2之间存在相互作用,这种相互作用通过hMps1对MDM2进行磷酸化进而促进MDM2介导的组蛋白H2B泛素化, hMps1-MDM2信号通路的缺陷使突变积累,损伤不断积累在磷酸化缺陷的细胞中,导致突变增加。前文说到,常见的DNA修复途径有5种, BER、HR、NHEJ、MMR、NER, MDM2能与这些通路上的多种DNA修复蛋白相互作用,通过泛素化修饰调控这些蛋白进而影响DNA损伤修复, DNA损伤的积累和修复损伤或修复错误的功能将人类细胞引向致癌表型,伴随着细胞退化,最终导致癌症^[52]。

53BP1作为DDR的主要介导因子之一,在调控DSB修复途径的选择中起着关键作用,并包含了众多DSB反应蛋白的相互作用^[53]。53BP1与DDR组分的相互作用主要表现在下面几点。53BP1与DDR传感器相互作用, ATM是DDR中DSB信号的主要传

感器,由DSB激活。这种激活有2种方式,一种依赖于MRN复合物的激活,另一种依赖于由53BP1介导的染色质结构的变化^[54],另外一项研究表明,在乳腺癌中53BP1羧基末端重复序列与MRN复合物之间的相互作用增加了磷酸化激活ATM的速率以及随后下游分子如CHK2的激活率。53BP1、MRN复合物和ATM的联合作用对最佳的DDR以及DSB修复是必要的^[55]。不仅如此,53BP1在调控DNA单链断裂中也具有重要作用。RPA复合物是DDR单链损伤途径中的DNA损伤传感器, YOO等^[56]的研究表明,该复合物与53BP1之间存在重要的相互作用,53BP1参与了DNA损伤后RPA2的磷酸化。ATR在单链DNA损伤信号中相当于ATM,它通过影响下游传感器CHK1发挥作用。已有研究表明,53BP1介导了CHK1和ATR在复制压力下的相互作用,从而保护复制叉。53BP1的缺失导致ATR-CHK1-p53信号转导缺陷,进而导致体外B细胞凋亡率增加^[57]。

p53是DDR的核心,激活下游信号通路,决定了DNA损伤细胞的最终命运^[58]。p53具有严格的转录活性,其依赖于53BP1的功能^[59]而且受到各种过程的严格调控,包括转录和翻译控制以及翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)^[60]。例如, p53被以下几种PTM激活,包括在丝氨酸-15被ATM磷酸化以及被ATR激活,或在丝氨酸-20上被CHK2激活^[36,61]。而在健康细胞或非应激状态下, p53维持在较低水平,以防止凋亡和衰老途径的不必要激活,这依赖于p53的负调节因素。虽然已经发现了许多p53的负调节因素,包括15种以上的E3泛素连接酶,它们通过泛素蛋白酶体降解途径促进p53蛋白的快速转化^[62],而MDM2被认为是其中最重要的一个E3,原因有2个:一是MDM2基因敲除小鼠在胚胎发生过程中由于p53水平升高而死亡,然而,如果p53基因被共同敲除,就不会产生这种胚胎致死性^[63-64];二是p53-MDM2相互作用的抑制剂,如Nutlin-3a,可以恢复p53活性,在野生型p53癌细胞中触发凋亡和细胞周期阻滞^[65]。MDM2通过2种方式抑制p53;它通过与p53的反式激活域结合从物理上阻断p53的转录活性,并促进p53蛋白降解^[66]。重要的是, p53还诱导MDM2基因的表达^[67],这表明MDM2和p53形成了一个自我调节反馈通路以达到MDM2控制p53的效果。最重要的是,研究证实MDM2的蛋白质半衰期急剧缩短是DNA损伤后发生的主要变化之一,这种现象源自于多种激酶(例如ATM、ATR)对MDM2

的磷酸化、MDM2在DNA损伤后自泛素化的降解^[68]。综上所述,在正常情况下,p53被E3泛素连接酶MDM2迅速泛素化,从而进入UPS被降解(图1C),但是当p53被多种DNA损伤修复组分激活时,干扰MDM2对p53的抑制作用,使p53稳定积累^[58],并发挥其在DNA损伤修复中的作用(图1D)。

p53在DNA损伤中的作用主要表现为以下几点。首先,可诱导细胞周期阻滞,细胞周期阻滞允许细胞有时间修复损伤,在此期间p53增强了几种DNA修复途径,以促进DNA损伤的清除^[69]。其次参与多种DNA损伤修复途径,p53参与NER途径通过转录上调着色性干皮病补体组C(xeroderma pigmentosum complementation group C, XPC)和损伤特异性DNA结合蛋白2(DNA binding protein 2, DDB2),这2种蛋白都是重要的损伤识别因子,是启动NER所必需的^[70-71],同时p53也与MMR途径的组分人类MutS同源物2(human MutS homolog 2, hMSH2)的转录有关^[72-73]。除了转录调控外,p53还以独立转录的方式调节BER,关键的BER酶8-oxoguanine糖基化酶和AP内切酶的活性通过与p53直接作用而增强,从而提高了BER途径清除氧化性DNA损伤的效率^[74]。然而,在不可修复的损伤中,p53也可诱导细胞衰老,从而使细胞永久性地退出循环,同时保持其代谢活性^[75]。如果不能在DNA损伤中暂时或永久地使细胞周期阻滞,可能会增加基因的突变率,从而促进肿瘤的发生^[58](图1D)。

5 展望

综上,在DNA损伤修复中E3泛素连接酶在DDR中发挥着重要作用。*SPOP*的突变改变了DNA修复的过程,使基因组不稳定。*SPOP*和ATM之间的互动可能提供关于*SPOP*如何参与DDR的线索。同时,研究发现*SPOP*在调节辐射敏感性方面也起着至关重要的作用,尽管*SPOP*的敲除只会引起轻微的细胞死亡,但是能极大地使HeLa细胞对IR敏感^[42]。在前列腺癌案例中*SPOP*突变使其对电离辐射敏感,该过程主要抑制同源重组影响前列腺癌细胞的辐射响应^[47]。同样的情况也发生在肺腺癌(lung adenocarcinoma, LUAD)细胞中,*SPOP*基因敲除显著提高其放射敏感性,*SPOP*基因敲除对LUAD细胞的致敏作用,说明*SPOP*是一种潜在的放射治疗靶点^[76]。*SPOP*突变改变了DNA修复过程HDR,反而促进了容易出错的NHEJ而导致细胞基因组不稳定,进而驱动前列腺

癌发生^[44]。其次,关于MDM2与P53在DDR中的调节,在DNA损伤时p53在其反式激活域内磷酸化,从而降低其与MDM2的结合亲和力,然而,这不足以完全阻断MDM2和p53的结合亲和力。有研究发现,DNA损伤时MDM2的磷酸化也有助于p53的稳定^[77],ATM介导的MDM2磷酸化已被证明发生在DNA损伤后p53稳定之前^[78],磷酸化的作用位点在MDM2的6个残基(S386、S395、S407、T419、S425和S429)上^[79],这种磷酸化最终导致MDM2的降解^[77]。

但是,目前关于E3泛素-蛋白连接酶在DNA损伤修复中的作用仍然存在诸多问题和挑战。其一,*SPOP*突变体具体是如何影响DNA损伤修复的,其具体的分子机制尚不清楚;其二,是否存在*SPOP*的泛素化底物蛋白负责正确的DNA修复进程,需要进一步的蛋白质组分析来识别在DNA修复过程中起作用的*SPOP*的真正底物;其三,仍然不清楚磷酸化是如何促进MDM2降解的,以及在存在6个磷酸化位点的情况下,磷酸化是以什么样的机制发挥作用的,Nutlin-3a作为MDM2与p53的相互作用抑制剂,在临床上是否可以被用来应对DNA损伤修复;其四,是否存在其他E3泛素连接酶参与DNA损伤修复,*SPOP*和MDM2在DNA损伤修复中会不会有什么联系,这些问题亟待研究和解决。

参考文献 (References)

- [1] VODICKA P, VODENKOVA S, OPATTOVA A, et al. DNA damage and repair measured by comet assay in cancer patients [J]. *Mutat Res*, 2019, 843: 95-110.
- [2] SANCAR A, LINDSEY-BOLTZ LA, UNSAL-KAÇMAZ K, et al. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints [J]. *Annu Rev Biochem*, 2004, 73: 39-85.
- [3] LINDAHL T, WOOD R D. Quality control by DNA repair [J]. *Science*, 1999, 286(5446): 1897-905.
- [4] ZHOU B B, ELLEDGE S J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective [J]. *Nature*, 2000, 408(6811): 433-9.
- [5] MOTOYAMA N, NAKA K. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, 14(1): 11-6.
- [6] BARTKOVA J, HOREJSÍ Z, KOED K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis [J]. *Nature*, 2005, 434(7035): 864-70.
- [7] ZHOU B S, ANDERSON H J, ROBERGE M. Targeting DNA checkpoint kinases in cancer therapy [J]. *Cancer Biol Ther*, 2003, 2(sup1): 15-22.
- [8] CHAE Y K, ANKER J F, CARNEIRO B A, et al. Genomic landscape of DNA repair genes in cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(17): 23312-21.
- [9] HANAHAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next

- generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-74.
- [10] HARPER J W, ELLEDGE S J. The DNA damage response: ten years after [J]. *Mol Cell*, 2007, 28(5): 739-45.
- [11] PEARL L H, SCHIERZ A C, WARD S E, et al. Therapeutic opportunities within the DNA damage response [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(3): 166-80.
- [12] CARETHERS J M, JUNG B H. Genetics and genetic biomarkers in sporadic colorectal cancer [J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(5): 1177-90.
- [13] GRADY W M, MARKOWITZ S D. The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening [J]. *Dig Dis Sci*, 2015, 60(3): 762-72.
- [14] HERNÁNDEZ G, RAMÍREZ M J, MINGUILLÓN J, et al. Decapping protein EDC4 regulates DNA repair and phenocopies BRCA1 [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1-11.
- [15] NIELSEN F C, VAN OVEREEM HANSEN T, SØRENSEN C S. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(9): 599-612.
- [16] NISKAKOSKI A, PASANEN A, LASSUS H, et al. Molecular changes preceding endometrial and ovarian cancer: a study of consecutive endometrial specimens from Lynch syndrome surveillance [J]. *Mod Pathol*, 2018, 31(8): 1291-301.
- [17] SONG H, DICKS E, RAMUS S J, et al. Contribution of germline mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D genes to ovarian cancer in the population [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(26): 2901-7.
- [18] HOULSTON R S. COGENT (COlorectal cancer GENeTics) revisited [J]. *Mutagenesis*, 2012, 27(2): 143-51.
- [19] CURTIN N J. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(12): 801-17.
- [20] KNIJNENBURG T A, WANG L H, ZIMMERMANN M T, et al. Genomic and molecular landscape of DNA damage repair deficiency across The Cancer Genome Atlas [J]. *Cell Rep*, 2018, 23(1): 239-54.
- [21] COUX O, TANAKA K, GOLDBERG A L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes [J]. *Annu Rev Biochem*, 1996, 65: 801-47.
- [22] 倪晓光, 赵平. 泛素-蛋白酶体途径的组成和功能 [J]. *生理科学进展* (NI X G, ZHAO P. The components and functions of the ubiquitin-proteasome pathway [J]. *Progress in Physiological Sciences*), 2006(3): 255-8.
- [23] 兰秋艳, 高媛, 李衍常, 等. 泛素、泛素链和蛋白质泛素化研究进展 [J]. *生物工程学报* (LAN Q Y, GAO Y, LI Y C, et al. Progress in ubiquitin, ubiquitin chain and protein ubiquitination [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*), 2016, 32(1): 14-30.
- [24] JENTSCH S, MCGRATH J P, VARSHAVSKY A. The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme [J]. *Nature*, 1987, 329(6135): 131-4.
- [25] JACKSON S P, DUROCHER D. Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO [J]. *Mol Cell*, 2013, 49(5): 795-807.
- [26] HOEGE C, PFANDER B, MOLDOVAN G L, et al. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO [J]. *Nature*, 2002, 419(6903): 135-41.
- [27] STELTER P, ULRICH H D. Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation [J]. *Nature*, 2003, 425(6954): 188-91.
- [28] LEHMANN A R. Ubiquitin-family modifications in the replication of DNA damage [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(18): 2772-9.
- [29] ZEMAN M K, CIMPRICH K A. Finally, polyubiquitinated PCNA gets recognized [J]. *Mol Cell*, 2012, 47(3): 333-4.
- [30] LEE K Y, MYUNG K. PCNA modifications for regulation of post-replication repair pathways [J]. *Mol Cells*, 2008, 26(1): 5-11.
- [31] METZGER M B, PRUNEDA J N, KLEVIT R E, et al. RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(1): 47-60.
- [32] BALLAR KIRMIZIBAYRAK P, ERBAYKENT-TEPEDELEN B, GOZEN O, et al. Divergent modulation of proteostasis in prostate cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1233: 117-51.
- [33] MARÉCHAL A, ZOU L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(9): a012716.
- [34] MATSUOKA S, HUANG M, ELLEDGE S J. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase [J]. *Science*, 1998, 282(5395): 1893-7.
- [35] LAVIN M F. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(10): 759-69.
- [36] SHILOH Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(3): 155-68.
- [37] LEE J, PAULL T T. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex [J]. *Science*, 2005, 308(5721): 551-4.
- [38] MEIER A, FIEGLER H, MUÑOZ P, et al. Spreading of mammalian DNA-damage response factors studied by ChIP-chip at damaged telomeres [J]. *EMBO J*, 2007, 26(11): 2707-18.
- [39] SAVIC V, YIN B, MAAS N L, et al. Formation of dynamic gamma-H2AX domains along broken DNA strands is distinctly regulated by ATM and MDC1 and dependent upon H2AX densities in chromatin [J]. *Mol Cell*, 2009, 34(3): 298-310.
- [40] MA M, RODRIGUEZ A, SUGIMOTO K. Activation of ATR-related protein kinase upon DNA damage recognition [J]. *Curr Genet*, 2019, 66(2): 327-33.
- [41] YAZINSKI S A, ZOU L. Functions, regulation, and therapeutic implications of the ATR checkpoint pathway [J]. *Annu Rev Genet*, 2016, 50(1): 155-73.
- [42] ZHANG D, WANG H B, SUN M, et al. Speckle-type POZ protein, SPOP, is involved in the DNA damage response [J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(8): 1691-7.
- [43] HJORTH-JENSEN K, MAYA-MENDOZA A, DALGAARD N, et al. SPOP promotes transcriptional expression of DNA repair and replication factors to prevent replication stress and genomic instability [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(18): 9484-95.
- [44] BOYSEN G, BARBIERI C E, PRANDI D, et al. SPOP mutation leads to genomic instability in prostate cancer [J]. *eLife*, 2015, 4: e09207.
- [45] BAUMANN P, BENSON F E, WEST S C. Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions *in vitro* [J]. *Cell*, 1996, 87(4): 757-66.
- [46] PANIER S, BOULTON S J. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1): 7-18.
- [47] EL BEZAWY R, TRIPARI M, PERCIO S, et al. SPOP deregulation improves the radiation response of prostate cancer models by

- iImpairing DNA damage repair [J]. *Cancers*, 2020, 12(6): 1462.
- [48] TRUJILLO K M, OSLEY M A. A role for H2B ubiquitylation in DNA replication [J]. *Mol Cell*, 2012, 48(5): 734-46.
- [49] MOYAL L, LERENTHAL Y, GANA-WEISZ M, et al. Requirement of ATM-dependent monoubiquitylation of histone H2B for timely repair of DNA double-strand breaks [J]. *Mol Cell*, 2011, 41(5): 529-42.
- [50] WEI J H, CHOU Y F, OU Y H, et al. TTK/hMps1 participates in the regulation of DNA damage checkpoint response by phosphorylating CHK2 on threonine 68 [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(9): 7748-57.
- [51] YU Z C, HUANG Y F, SHIEH S Y. Requirement for human Mps1/TTK in oxidative DNA damage repair and cell survival through MDM2 phosphorylation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(3): 1133-50.
- [52] LEHMAN J A, MAYO L D. Integration of DNA damage and repair with murine double-minute 2 (Mdm2) in tumorigenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(12): 16373-86.
- [53] MIRZA-AGHAZADEH-ATTARI M, MOHAMMADZADEH A, YOUSEFI B, et al. 53BP1: a key player of DNA damage response with critical functions in cancer [J]. *DNA Repair*, 2019, 73: 110-9.
- [54] ZGHEIB O, HUYEN Y, DITULLIO R A, et al. ATM signaling and 53BP1 [J]. *Radiother Oncol*, 2005, 76(2): 119-22.
- [55] LEE J, GOODARZI A A, JEGGO P A, et al. 53BP1 promotes ATM activity through direct interactions with the MRN complex [J]. *EMBO J*, 2010, 29(3): 574-85.
- [56] YOO E, KIM B U, LEE S Y, et al. 53BP1 is associated with replication protein A and is required for RPA2 hyperphosphorylation following DNA damage [J]. *Oncogene*, 2005, 24(35): 5423-30.
- [57] HER J, RAY C, ALTSHULER J, et al. 53BP1 mediates ATR-Chk1 signaling and protects replication forks under conditions of replication stress [J]. *Mol Cell Biol*, 2018, 38(8): e00472-17.
- [58] OU H, SCHUMACHER B. DNA damage responses and p53 in the aging process [J]. *Blood*, 2018, 131(5): 488-95.
- [59] IWABUCHI K, LI B, MASSA H F, et al. Stimulation of p53-mediated transcriptional activation by the p53-binding proteins, 53BP1 and 53BP2 [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(40): 26061-8.
- [60] VOGELSTEIN B, LANE D, LEVINE A J. Surfing the p53 network [J]. *Nature*, 2000, 408(6810): 307-10.
- [61] OU Y, CHUNG P, SUN T, et al. p53 C-terminal phosphorylation by CHK1 and CHK2 participates in the regulation of DNA-damage-induced C-terminal acetylation [J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(4): 1684-95.
- [62] JAIN A K, BARTON M C. Making sense of ubiquitin ligases that regulate p53 [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(7): 665-72.
- [63] JONES S N, ROE A E, DONEHOWER L A, et al. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53 [J]. *Nature*, 1995, 378(6553): 206-8.
- [64] MONTES DE OCA LUNA R, WAGNER D S, LOZANO G. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53 [J]. *Nature*, 1995, 378(6553): 203-6.
- [65] VASSILEV L T, VU B T, GRAVES B, et al. *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2 [J]. *Science*, 2004, 303(5659): 844-8.
- [66] HAUPT Y, MAYA R, KAZAZ A, et al. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53 [J]. *Nature*, 1997, 387(6630): 296-9.
- [67] BARAK Y, JUVEN T, HAFFNER R, et al. mdm2 expression is induced by wild type p53 activity [J]. *EMBO J*, 1993, 12(2): 461-8.
- [68] LI J Q, KUROKAWA M. Regulation of MDM2 stability after DNA damage [J]. *J Cell Physiol* 2015, 230(10): 2318-27.
- [69] WILLIAMS A B, SCHUMACHER B. p53 in the DNA-damage-repair process [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016, 6(5): a026070.
- [70] ADIMOOLAM S, FORD J M. p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(20): 12985-90.
- [71] HWANG B J, FORD J M, HANAWALT P C, et al. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(2): 424-8.
- [72] SCHERER S J, MAIER S M, SEIFERT M, et al. p53 and c-Jun functionally synergize in the regulation of the DNA repair gene hMSH2 in response to UV [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(48): 37469-73.
- [73] SCHERER S J, WELTER C, ZANG K D, et al. Specific *in vitro* binding of p53 to the promoter region of the human mismatch repair gene hMSH2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 221(3): 722-8.
- [74] ACHANTA G, HUANG P. Role of p53 in sensing oxidative DNA damage in response to reactive oxygen species-generating agents [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(17): 6233-9.
- [75] JOHMURA Y, NAKANISHI M. Multiple facets of p53 in senescence induction and maintenance [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(11): 1550-5.
- [76] DONG Y P, ZHANG D, CAI M J, et al. SPOP regulates the DNA damage response and lung adenocarcinoma cell response to radiation [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(7): 1469-83.
- [77] MAGNUSSEN H M, AHMED S F, SIBBET G J, et al. Structural basis for DNA damage-induced phosphoregulation of MDM2 RING domain [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2094.
- [78] KHOSRAVI R, MAYA R, GOTTLIEB T, et al. Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(26): 14973-7.
- [79] CHENG Q, CHEN L H, LI Z Y, et al. ATM activates p53 by regulating MDM2 oligomerization and E3 processivity [J]. *EMBO J*, 2009, 28(24): 3857-67.