

DOI: 10.13376/j.cbls/2017017

文章编号: 1004-0374(2017)02-0138-08

SENP抑制剂及其测试方法的研究进展

张建臣, 赵亚雪*

(上海交通大学药学院, 上海 200240)

摘要: SUMOs (small ubiquitin-like modifiers, 小泛素类调节蛋白) 是最近发现的一类重要的翻译后修饰蛋白, 通过共价修饰底物蛋白而调节细胞的功能。而 SENPs (SUMO-specific proteases, SUMO-特异性蛋白酶) 通过催化 SUMOs 前体的成熟启动 SUMO 化过程, 通过催化 SUMO 化蛋白上 SUMO 的去除实现去 SUMO 化。最近研究发现, SENPs 与癌症、发育缺陷、神经变性等疾病密切相关, 是潜在的药物靶标。SENP 抑制剂及其测试方法也因此受到了越来越多的关注。现主要总结了 SENPs 抑制剂的发展现状, 探讨了目前可行的 SENPs 抑制剂测试方法, 这些将为 SENPs 抑制剂的进一步发展和以 SENPs 为靶标的药物开发奠定坚实的基础。

关键词: SUMO; SENP; 抑制剂; 测试方法

中图分类号: Q555.7; R914 **文献标志码:** A

Research progress of SENP inhibitors and SENP inhibitor bioassay methods

ZHANG Jian-Chen, ZHAO Ya-Xue*

(School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: SUMOs (small ubiquitin-like modifiers) are discovered recently as a kind of proteins for post-translational modification, which can alter the function of cells through conjugation to substrate proteins. SENPs (SUMO-specific proteases) initiate the process of SUMOylation by catalyzing the maturation of SUMO precursors and remove SUMO from substrates to achieve deSUMOylation. Recent studies show that SENPs are associated with a number of diseases such as cancers, developmental defects, neurodegenerative diseases, indicating SENPs are potential drug targets. Thus the development of SENP inhibitors and bioassay methods for SENP inhibitors attract more and more attentions. We reviewed the present progress of SENP inhibitors and their available bioassay methods, which will lay a good foundation for further discovery of SENP inhibitors and drug development for SENP related diseases.

Key words: SUMO; SENP; inhibitor; bioassay method

蛋白质的共价修饰对其功能的发挥至关重要, 如磷酸化、乙酰化、泛素化等广泛地参与细胞的活动和生命的过程。近年, 人们陆续发现几种类泛素蛋白, 它们的结构与泛素类似, 但不介导蛋白酶体依赖的蛋白质降解过程。SUMOs (small ubiquitin-like modifier, 小泛素类调节蛋白) 即为其中重要的成员之一。SUMOs 通过共价修饰底物蛋白调节细胞功能, 已成为一类重要的翻译后修饰蛋白。SUMO 前体在 SENPs (SUMO-specific protease, SUMO-特异性蛋白酶) 的作用下剪掉 C 端, 裸露出“GG”

基序。成熟的 SUMO, 在 ATP 的存在下与活化酶 E1 催化半胱氨酸形成硫酯键中间体, 随后被转至结合酶 E2 上, 最后在连接酶 E3 的催化下连接至底物蛋白赖氨酸的 ϵ -氨基上, 实现 SUMO 化^[1](图 1)。SUMOs 可与 HDAC1、p300 等蛋白结合, 参与细胞分化、信号转导等细胞活动和生命过程^[2]。在哺

收稿日期: 2016-07-13; 修回日期: 2016-08-27

基金项目: 上海交通大学新进青年教师起步基金(14X-100040051)

*通信作者: E-mail: yaxuezhao@sjtu.edu.cn

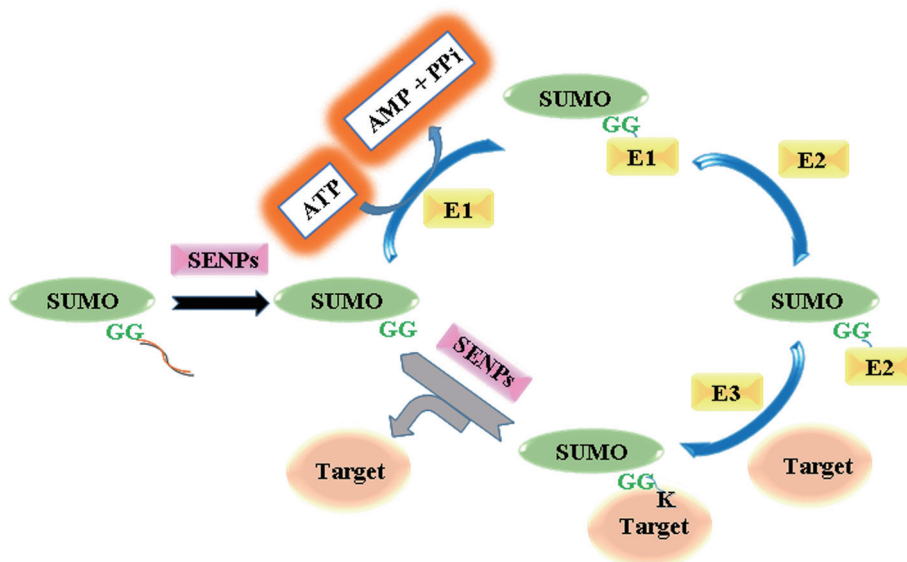


图1 SUMO化和去SUMO化循环过程

乳动物细胞中, 目前已确定的 SUMO 有 SUMO1、SUMO2、SUMO3 和 SUMO4^[3]。

SUMO 化是一个高度动态可逆的过程, 它在 SENPs 的催化下实现去 SUMO 化 (图 1)。作为一种半胱氨酸蛋白酶, SENPs 为 SUMO 化和去 SUMO 化过程中的关键蛋白: 一方面催化 SUMOs 前体的成熟, 启动 SUMO 化过程; 另一方面催化 SUMO 化蛋白上 SUMO 的去除, 使机体内 SUMO 化的蛋白处于平衡 (图 1)。在体内, SUMO 化的蛋白需达到平衡, 此平衡的破坏与癌症、病毒感染、发育缺陷、神经变性等疾病相关^[4]。

在哺乳动物细胞中, 人们已鉴定出 6 种 SENPs (SEN1、SEN2、SEN3、SEN5、SEN6 和 SEN7), 它们有不同的底物偏好性和亚细胞定位^[5]。SENPs 参与了许多不同的细胞过程, 如细胞的增殖与分化^[6-8]、转录调节^[9-14]、核糖体的生物合成^[15-16]、神经退行性过程^[17-18]、肿瘤的发生与发展^[14,19-33]等。其中, 越来越多的研究发现, SENPs 与肿瘤的生长、转移、侵袭、复发等病理过程密切相关, 如 SEN1 的表达与前列腺肿瘤的侵袭和复发直接相关^[19]; 在体外试验中, SEN2 通过抑制 MMP13 而抑制膀胱癌细胞的迁移和侵袭^[26]; SEN3 的过量表达促进了人宫颈癌 HeLa 细胞肿瘤移植模型中血管的生成^[27]; SEN5 在骨肉瘤组织和细胞中高表达, SEN5 表达沉默后, 能够导致人骨肉瘤 U2OS 和 Saos-2 细胞的增殖能力减弱^[31]; SEN7L (long SEN7 splice variant, SEN7 长剪切体) 能够通过促进基因表达而促进乳腺癌细胞的异常增殖以及上皮间质

转化^[14]。

以上研究表明, SENPs 为重要的潜在药物靶标, 其抑制剂将为治疗许多疾病, 尤其是癌症, 开辟一条崭新路径。因此, SENPs 抑制剂的研究引起了越来越多的关注。本文将综述 SENPs 抑制剂和 SENPs 抑制剂生物活性测试方法的研究现状, 这些成果将为 SENPs 抑制剂的进一步开发提供重要的分子基础和关键技术, 为以 SENPs 为靶标的相关疾病的治疗奠定坚实的基础。

1 SENPs的抑制剂

SEN1 和 SEN2 是目前研究相对较多的两个 SENPs 亚型。SENPs 抑制剂的研究也主要是以 SEN1 和 SEN2 为靶点进行。在 SENPs 抑制剂的研究过程中, 研究者的注意力最初集中在能与 SENPs 共价结合的多肽分子, 随后越来越注重小分子抑制剂的发现。这些抑制剂, 有些作为探针用于进一步探究 SENPs 相关的生物学功能, 有些作为先导化合物用于治疗以 SENPs 为靶点的相关疾病的药物的开发。

1.1 多肽类SENPs抑制剂

Hemelaar 等^[34]首次报道了多肽类 SENPs 抑制剂。他们基于 SUMO 化的机制和 SUMO 的结构特点, 利用内含肽的合成策略, 在 SUMO 的末端连接乙烯砜基团, 得到了多肽类 SENPs 抑制剂 A (图 2)。多肽 A 的乙烯砜基团通过与 SENP2 催化中心的半胱氨酸发生迈克尔加成反应而共价结合, 进而抑制 SENP2 的催化活性。他们还通过将 NEM

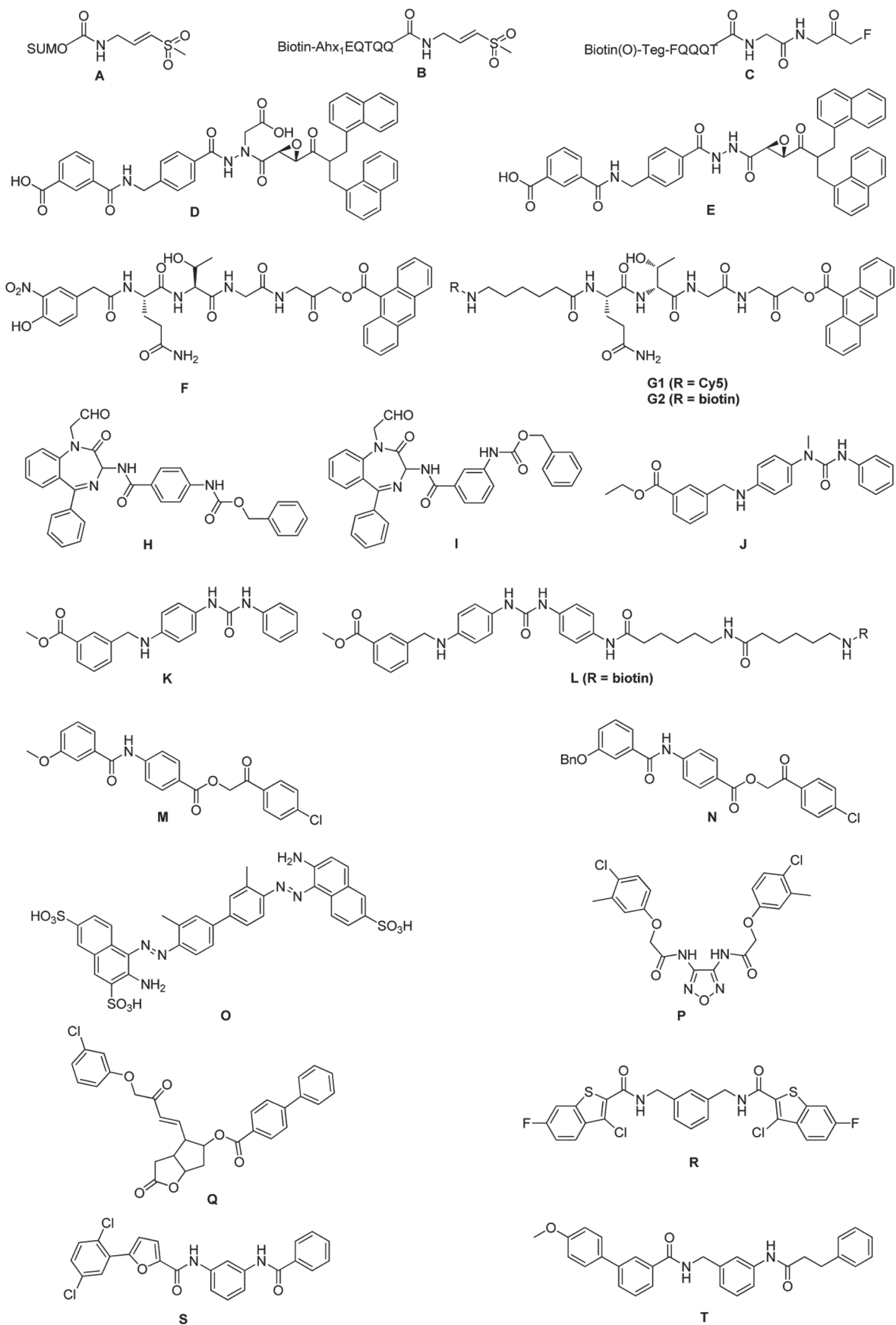


图2 SENPs抑制剂的化学结构

(N-ethyl maleimide, 广谱半胱氨酸蛋白酶抑制剂, 烷基化试剂) 与 SENP2 提前孵育而阻断多肽 A 与 SENP2 之间的不可逆的加成反应, 验证了 SENP2 的半胱氨酸结合多肽 A 时的重要性。多肽 A 可作为分子探针用于研究 SUMO 化和去 SUMO 化的机制, 如检测在不同细胞条件下的 SENPs 活性。

Borodovsky 等^[35] 利用类似于 Hemelaar 等^[34] 的策略报道了泛素样蛋白 Nedd8、SUMO1、FAT10、Fau 和 APG12 的 C 端多肽连接乙烯砜基团的多肽化合物, 其中, 3 个不同长度的 SUMO1 的 C 端肽链 (5 肽、9 肽、13 肽) 连接乙烯砜基团的多肽化合物在鼠胸腺瘤 EL-4 细胞裂解液中能与一系列蛋白结合。后续竞争实验表明, 5 肽化合物 B (图 2) 至少能够结合一个 SUMO1 蛋白酶。此研究表明, 只有几个氨基酸组成的多肽也能特异性地结合 SENPs。

Dobrota 等^[36] 设计合成了多肽化合物 C (图 2), 多肽化合物 C 的一端包含一个甘氨酸衍生的氟甲基酮基团, 可与 SENPs 的半胱氨酸共价结合。实验结果显示多肽 C 能与 SENP1 和 SENP2 结合, 且多肽 C 能够从 SENP1-SUMO1 复合物中竞争出 SUMO1, 表明了此化合物同 SENP1 的结合力强于自然状态下的 SUMO1 分子。

1.2 小分子类 SENPs 抑制剂

Bogyo 课题组率先发现了小分子类 SENPs 抑制剂^[37-38]。他们利用恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*, Pf) 细胞裂解液中的重组 SUMO 前肽水解成熟阻滞实验, 通过筛选半胱氨酸蛋白酶抑制剂库, 发现化合物 D (图 2) 具有 PfSENP1 抑制活性。化合物 D 含有一个活性环氧三元环和一个非天然的多肽骨架, 对 PfSENP1 的 IC₅₀ (半数抑制浓度) 为 17.9 μmol/L, 对人源 SENP1、SENP2 的 IC₅₀ 分别为 9.0 和 4.7 μmol/L。将化合物 D 的天冬氨酸侧链去除后, 得到合成易得的化合物 E (图 2), 它对人源 SENP1、SENP2 的 IC₅₀ 分别为 7.1 和 3.7 μmol/L。随后, 他们利用固相合成的策略合成了一系列化合物 E 类似物, 但是这些化合物对于人源 SENP1 和 SENP2 的抑制活性都比化合物 E 差。最后, 他们在化合物 E 和 SUMO 分子结构的基础上, 设计合成了一类含有酰氧基甲基酮基团的化合物, 这类化合物展现出较好的 SENPs 抑制活性, 其中化合物 F (图 2) 的活性最佳, 它对人源 SENP1 和 SENP2 的 IC₅₀ 分别为 3.6 和 0.25 μmol/L。此外, 在加入了重组的人源 SENP1 的 HEK293 细胞裂解液中, 化合物 G1

和 G2 (图 2) 对 SENP1 展现出良好的选择性。

考虑到多肽化合物可能存在较差药代动力学性质, 我们课题组的 Qiao 等^[39] 设计合成一类苯二氮草为母核的 SENP1 抑制剂。这类化合物可能通过其甲酰基与 SENP1 催化口袋的半胱氨酸共价结合而抑制 SENP1 的活性。抑制活性最好的两个化合物 H 和 I (图 2) 对 SENP1 的 IC₅₀ 分别为 15.5 和 9.2 μmol/L, 对 SENP1 过表达的前列腺癌 PC3 细胞的 IC₅₀ 分别为 13.0 和 35.7 μmol/L。

Uno 等^[40] 根据 HIF-1α 抑制剂 K (图 2) 设计合成了 3-[(4-苯基胍) 苯基]-胺亚甲基苯乙酯衍生物 J (图 2), 化合物 J 为选择性 SENP1 抑制剂, 对其他蛋白酶无活性, 对 SENP1 的 IC₅₀ 为 29.6 μmol/L。他们利用化合物 K 设计的连接有生物素的探针 L (图 2) 进行蛋白质体外结合实验, 验证了此类化合物与 SENP1 的直接结合。

Chen 等^[41] 根据 SENP1-SUMO1-RanGAP1 的晶体结构, 第一次利用虚拟筛选的方法筛选了 SPECS 化合物库中的 1.8 万个化合物, 从对接打分前 100 个化合物中挑选出 38 个化合物进行生物活性测试, 发现化合物 M (图 2) 具有 SENP1 抑制活性, 其 IC₅₀ 值为 2.39 μmol/L。随后, 他们依据化合物 M 与 SENP1 的对接结合模式, 设计合成了一系列化合物 M 的类似物, 其中化合物 N (图 2) 对 SENP1 的 IC₅₀ 为 1.08 μmol/L。

Madu 等^[42] 利用 GLIDE 程序筛选了 2.5 万个化合物, 并测试了筛选出的 40 个化合物的 SENP1、SENP2 和 SENP7 的抑制活性。测试结果表明, 磺酰苯衍生物为一类非共价结合的 SENPs 抑制剂, 活性最好的化合物 O (图 2) 对 SENP1、SENP2、SENP7 的 IC₅₀ 分别为 2.1、2.0 和 2.7 μmol/L。定量酶动力学实验和 NMR (磁共振) 表征结合实验数据表明, 这些化合物是非竞争性的抑制剂, 与 SENPs 及 SENPs-底物复合物都存在结合。

Kumar 等^[43] 首先从含 400 万个小分子的化合物库中筛选出结构和电性都类似于 SUMO1 的 C 端 TGGK 的分子, 随后将筛选得到的分子对接至 SENP2 的催化活性口袋, 最后对挑选出的 49 个恶二唑类衍生物进行生物活性测试。这类衍生物具有 SENP1 和 SENP2 抑制活性, 而无木瓜蛋白酶和胰蛋白酶等蛋白酶抑制活性。抑制活性最好的化合物 P (图 2) 对 SENP2 的 IC₅₀ 为 3.7 μmol/L, 对 SENP1 的 IC₅₀ 大于 30 μmol/L, 具有一定的 SENP2 亚型选择性。

Wen 等^[44]利用虚拟筛选方式,首先,从含有200 万个小分子的 SPECS 库中筛选出10 万个类药性分子;其次,利用 SENP1-SUMO1 的复合晶体结构通过对接的方式评价10 万个类药性小分子与 SENP1 的结合模式和强弱;最后,从排名前500 的小分子中挑选出117 个小分子进行生物活性筛选和测试,发现化合物 Q (图2)对 SENP1 的 IC_{50} 为1.29 $\mu\text{mol/L}$ 。化合物 Q 具有细胞穿透性和 SENP1 抑制选择性,它对其他半胱氨酸蛋白酶,如组织蛋白酶 B、组织蛋白酶 D 的抑制效应很弱。此外,用化合物 Q 处理前列腺癌 PC3 细胞之后,细胞内的 SUMO 化蛋白增多,而 UBC9、SENP1、SENP2、SENP3 的蛋白水平并未出现明显的变化。

2016 年,我们课题组 Zhao 等^[45]利用虚拟筛选的方法发现了10 余个不同骨架的 SENP1 抑制剂。我们通过分析这些抑制剂的结构和其在 SENP1 中的对接结合模式,从具有代表性的化合物 R 和 S (图2)出发,设计合成了具有新骨架的 SENP1 小分子抑制剂,并进行了构效关系研究,获得了抑制活性更佳的化合物 T (图2),其对 SENP1 的 IC_{50} 为3.5 $\mu\text{mol/L}$ 。本研究极大地丰富了 SENPs 抑制剂的结构类型。

2 SENPs抑制剂的测试方法

稳定可靠的生物测试体系是 SENPs 抑制剂不断发现和发展的基础。截至目前,研究者已建立了多种 SENPs 抑制剂的测试体系:依赖 SENPs 的水解酶和异肽酶活性,通过测定荧光底物的变化、底物去 SUMO 的数量以及 SUMO 前体的剪切数量来衡量 SENPs 在抑制剂存在情况下的酶活性,从而达到测试抑制剂活性的目的。

2.1 基于荧光底物变化的 SENPs 抑制剂测试体系

Bogyo 课题组报道了基于荧光底物的 SENPs 抑制剂活性测试体系^[37-38]。AMC (4-甲基-7-氨基香豆素)作为一个潜在的荧光基团可融合入 SUMO 中形成 SUMO-AMC。在 SENPs 酶的催化下,AMC 可从 SUMO-AMC 中游离并产生荧光,通过检测 AMC 的荧光值可监测 SENPs 酶与 SUMO-AMC 的反应情况。SENP1 抑制剂可抑制 SENPs 酶活性,减少 AMC 的释放,通过与不加 SENPs 抑制剂的对照组的荧光值比较,可确定 SENPs 抑制剂的抑制活性^[46]。测试过程中,首先将化合物与 SENP1 孵育,然后加入 SUMO1-AMC 孵育,待孵育完成后,检测荧光值,并根据荧光扫描结果计算化合物的抑制

活性。Uno 等^[40]也报道了类似的 SENPs 抑制剂生物活性测试方法。

我们课题组 Qiao 等^[39]利用以荧光底物检测为基础的方法^[47]筛选获得了 SENPs 抑制剂。该方法利用商业化试剂盒 SUMO-CHOP-Reporter kit (LifeSensor Inc.),根据 SENPs 能够水解 SUMO 融合蛋白的原理,监测化合物的 SENPs 抑制活性。该试剂盒中的融合蛋白由 SUMO 分子和 PLA₂ (磷脂酶 A₂) 报告酶组成,融合蛋白中的 PLA₂ 无催化活性,但 SENPs 催化水解出的游离 PLA₂ 具有酶活性,游离的 PLA₂ 能使体系中的无荧光底物分子转变为荧光产物,因此,可通过检测产物的荧光值来评价化合物对 SENPs 的抑制活性。

Madu 等^[42]采用含荧光发生系统的测试体系进行 SENP7 抑制剂的评价。该测试体系使用了含有荧光素分子 (luciferin) 的融合多肽。融合多肽在水解前不产生荧光,但在 SENP7 催化下,融合多肽水解释放出荧光素,荧光素在荧光素酶 (luciferase) 的催化下发出可被检测器检测的荧光。通过检测体系中荧光的强度,可评价化合物对 SENP7 的抑制活性。

Kumar 等^[43]采用 FRET (荧光共振能量转移) 方法评价化合物对 SENPs 的抑制活性。FRET 的原理是,激发态的荧光供体分子发出荧光,当受体分子与供体分子足够接近时,这部分能量转移到受体分子上,激发受体分子也产生荧光。GFP (绿色荧光蛋白) 和 YFP (黄色荧光蛋白) 作为荧光供体和受体分子被分别连接到 SENPs 催化的底物的两端,当底物被 SENPs 催化水解成两段时,GFP 和 YFP 距离增大,荧光共振信号减弱。当化合物能够抑制 SENPs 酶活性时,其荧光共振变化相对于不加抑制剂的对照组要大,可根据荧光变化强度评价化合物对 SENPs 的抑制活性。此方法还可应用于融合多肽和异肽的水解,进而测试化合物对 SENPs 的抑制活性^[48]。

荧光系统具有信号读取快速,可自动化检测等优点,适合平行试验,且有些试剂盒可通过商业途径购买,因此,上述的 SENPs 抑制剂测试方法理论上可用于大量化合物的高通量筛选,但这些方法存在的一些缺点也限制了它们的广泛使用,如测试体系中的底物都为修饰过的荧光产物,相比生理条件下原始底物更复杂,表现出的特性也与原始底物不尽相同;测试体系中含多个组分,容易造成互相之间的干扰,如 Madu 等^[42]发现 SENPs 抑制剂能

对 FRET 信号能产生干扰; 荧光测量时易受到其他实验因素的影响, 如日光暴露、荧光底物降解等, 造成重现性降低。

2.2 基于底物去SUMO化的SENPs抑制剂测试体系

2016年, 我们课题组提出基于 SENPs 对 RanGAP-SUMO 去 SUMO 化的测试方法^[49]。RanGAP-SUMO 作为 SENPs 的底物蛋白, 可在 SENPs 催化下, 被水解为 RanGAP 和 SUMO, 通过 SDS-PAGE 分离蛋白, 考马斯染色表征蛋白, 检测未被水解的 RanGAP-SUMO 蛋白的量, 根据 SENPs 对 RanGAP-SUMO 的去 SUMO 化程度表征化合物对 SENPs 酶的抑制活性。我们课题组运用此方法, 发现了多个 SENP1 小分子抑制剂^[39,45]。

该测试体系中的 RanGAP 为第一个确定的 SUMO 化的底物^[50]。不同的 SENPs 亚型具有不同的底物偏好性, 在测试化合物对 SENPs 亚型的抑制活性时, 可构建不同的 SUMO 亚型修饰的底物分子的去 SUMO 化体系, 理论上能解决目前 SENPs 抑制剂测试方法适用度较窄的问题, 对于选择性 SENPs 抑制剂的发现具有重要意义。此外, 此类测试体系的组分简单, 只有 SENPs 和底物, 避免了较多组分之间可能造成的互相干扰, 避免了昂贵的荧光材料的使用, 避免了易出错的荧光系统的使用等问题。

2.3 基于SUMO前肽的剪切成熟的SENPs抑制剂测试体系

Madu 等^[42] 基于 SENP1 和 SENP2 对 SUMO1 和 SUMO2 前肽的水解酶活性, 分别评价了化合物对 SENP1 和 SENP2 的抑制活性。他们发现, 化合物对 SENPs 酶的抑制活性不仅依赖于 SENPs 亚型, 而且依赖于 SUMO 亚型前肽。此外, 酶动力学和 NMR 表征结合实验还发现该类化合物同酶和酶-底物复合物都存在相互作用。此研究提示, 在进行 SENPs 抑制剂活性测试时, 除因抑制剂本身对 SENPs 抑制作用产生的实验结果影响外, 还需避免其他能对实验结果造成影响的因素。在选择测试方法时, 也需先验证 SENPs 抑制剂对测试体系中除 SENPs 之外的各个因素是否存在影响, 然后选择无影响的测试方法。

3 小结

作为一种半胱氨酸蛋白酶, SENPs 通过催化 SUMOs 前体的成熟或催化 SUMO 化蛋白上 SUMO 的去除, 在 SUMO 化过程中扮演至关重要的角色,

与癌症在内的很多疾病密切相关, 是重要的潜在药物靶标。SENPs 抑制剂的研究和 SENPs 抑制剂测试方法的建立也因此而受到了广泛的关注。然而, SENPs 抑制剂的发现目前仍处于起步阶段。虽然, 研究者运用高通量筛选和虚拟筛选等方法发现了一系列多肽类和小分子类 SENPs 抑制剂, 但目前报道的 SENPs 抑制剂活性较低, 且不具有对 SENPs 亚型的选择性。稳定可靠的生物测试体系是 SENPs 抑制剂不断发现和发展的基础。截至目前, 研究者已建立了多种 SENPs 抑制剂的测试体系, 但各有其优缺点, 并不存在完全适用的方法, 因此, 选择测试方法时, 需考虑方法的适用性, 选择合适的测试方法, 使实验结果只受 SENPs 抑制剂单因素影响, 才能保证测试结果的准确性和重复性。综上, 开发具有更好活性和更高亚型选择性的 SENPs 抑制剂, 完善 SENPs 抑制剂的测试方法将成为既充满挑战又具有潜力的课题。

[参 考 文 献]

- [1] Geiss-Friedlander R, Melchior F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8: 947-56
- [2] Kim JH, Baek SH. Emerging roles of desumoylating enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792: 155-62
- [3] Dohmen RJ. SUMO protein modification. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1695: 113-31
- [4] Zhao J. Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64: 3017-33
- [5] Drag M, Salvesen GS. DeSUMOylating enzymes—SENPs. *IUBMB Life*, 2008, 60: 734-42
- [6] Cimarosti H, Ashikaga E, Jaafari N, et al. Enhanced SUMOylation and SENP-1 protein levels following oxygen and glucose deprivation in neurones. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012, 32: 17-22
- [7] Yang Y, Fu W, Chen J, et al. SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol*, 2007, 9: 1253-62
- [8] Li X, Luo Y, Yu L, et al. SENP1 mediates TNF-induced desumoylation and cytoplasmic translocation of HIPK1 to enhance ASK1-dependent apoptosis. *Cell Death Differ*, 2008, 15: 739-50
- [9] Cheng J, Wang D, Wang Z, et al. SENP1 enhances androgen receptor dependent transcription through desumoylation of histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 6021-8
- [10] Cheng J, Perkins ND, Yeh ET. Differential regulation of c-Jun-dependent transcription by SUMO-specific proteases. *J Biol Chem*, 2005, 280: 14492-8
- [11] Best JL, Ganiatsas S, Agarwal S, et al. SUMO-1 protease-1 regulates gene transcription through PML. *Mol Cell*, 2002, 10: 843-55
- [12] Gregoire S, Yang XJ. Association with class IIa histone

- deacetylases upregulates the sumoylation of MEF2 transcription factors. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 2273-87
- [13] Choi SJ, Chung SS, Rho EJ, et al. Negative modulation of RXR α transcriptional activity by small ubiquitin-related modifier (SUMO) modification and its reversal by SUMO specific protease SUSP1. *J Biol Chem*, 2006, 281: 30669-77
- [14] Bawa-Khalifea T, Lub LS, Zuo Y, et al. Differential expression of SUMO-specific protease 7 variants regulates epithelial-mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 17466-71
- [15] Vethantham V, Rao N, Manley JL. Sumoylation modulates the assembly and activity of the pre-mRNA 3' processing complex. *Mol Cell Biol*, 2007, 27: 8848-58
- [16] Haindl M, Harasim T, Eick D, et al. The nucleolar SUMO-specific protease SENP3 reverses SUMO modification of nucleophosmin and is required for rRNA processing. *EMBO Rep*, 2008, 9: 273-9
- [17] Sarge KD, Park-Sarge OK. Sumoylation and human disease pathogenesis. *Trends Biochem Sci*, 2009, 34: 200-5
- [18] Fu J, Yu HM, Chiu SY, et al. Disruption of SUMO-specific protease 2 induces mitochondria mediated neurodegeneration. *PLoS Genet*, 2014, 10: e1004579
- [19] Wang Q, Xia N, Li T, et al. SUMO-specific protease 1 promotes prostate cancer progression and metastasis. *Oncogene*, 2013, 32: 2493-8
- [20] Cheng J, Bawa T, Leey P, et al. Role of desumoylation in the development of prostate cancer. *Neoplasia*, 2006, 8: 667-76
- [21] Li T, MD, Huang S, et al. Prognostic impact of SUMO-specific protease 1 (SENP1) in prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy. *Urol Oncol*, 2013, 31: 1539-45
- [22] Ma C, Wu B, Huang X, et al. SUMO-specific protease 1 regulates pancreatic cancer cell proliferation and invasion by targeting MMP-9. *Tumour Biol*, 2014, 35: 12729-35
- [23] Wang RT, Zhi XY, Zhang Y, et al. Inhibition of SENP1 induces radiosensitization in lung cancer cells. *Exp Ther Med*, 2013, 6: 1054-8
- [24] Xu Y, Li J, Zuo Y, et al. SUMO-specific protease 1 regulates the *in vitro* and *in vivo* growth of colon cancer cells with the upregulated expression of CDK inhibitors. *Cancer Lett*, 2011, 309: 78-84
- [25] Jacques C, Baris O, Prunier-Mirebeau D, et al. Two-step differential expression analysis reveals a new set of genes involved in thyroid oncocytic tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90: 2314-20
- [26] Tan M, Gong H, Wang J, et al. SENP2 regulates MMP13 expression in a bladder cancer cell line through SUMOylation of TBL1/TBLR1. *Sci Rep*, 2015, 5: 13996
- [27] Huang C, Han Y, Wang Y, et al. SENP3 is responsible for HIF-1 transactivation under mild oxidative stress via p300 de-SUMOylation. *EMBO J*, 2009, 28: 2748-62
- [28] Han Y, Huang C, Sun X, et al. SENP3-mediated deconjugation of sumo2/3 from promyelocytic leukemia is correlated with accelerated cell proliferation under mild oxidative stress. *J Biol Chem*, 2010, 285: 12906-15
- [29] Sun Z, Hu S, Luo Q, et al. Overexpression of SENP3 in oral squamous cell carcinoma and its association with differentiation. *Oncol Rep*, 2013, 29: 1701-6
- [30] Ding XJ, Sun J, Wang LZ, et al. Overexpression of SENP5 in oral squamous cell carcinoma and its association with differentiation. *Oncol Rep*, 2008, 20: 1041-5
- [31] Wang K, Zhang XC. Inhibition of SENP5 suppresses cell growth and promotes apoptosis in osteosarcoma cells. *Exp Ther Med*, 2014, 7: 1691-5
- [32] Song JG, Xie HH, Li N, et al. SUMO-specific protease 6 promotes gastric cancer cell growth via deSUMOylation of FoxM1. *Tumour Biol*, 2015, 36: 9865-71
- [33] Zhu H, Ren S, Bitler BG, et al. SPOP E3 ubiquitin ligase adaptor promotes cellular senescence by degrading the SENP7 deSUMOylase. *Cell Rep*, 2015, 13: 1183-93
- [34] Hemelaar J, Borodovsky A, Kessler BM, et al. Specific and covalent targeting of conjugating and deconjugating enzymes of ubiquitin-like proteins. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 84-95
- [35] Borodovsky A, Ovaa H, Meester WJN, et al. Small-molecule inhibitors and probes for ubiquitin and ubiquitin like specific proteases. *Chembiochem*, 2005, 6: 287-91
- [36] Dobrota C, Fasci D, Hadade ND, et al. Glycine fluoromethylketones as SENP-specific activity based probes. *Chembiochem*, 2012, 13: 80-4
- [37] Ponder EL, Albrow VE, Leader BA, et al. Functional characterization of a SUMO deconjugating protease of *Plasmodium falciparum* using newly identified small molecule inhibitors. *Chem Biol*, 2011, 18: 711-21
- [38] Albrow VE, Ponder EL, Fasci D, et al. Development of small molecule inhibitors and probes of human SUMO deconjugating proteases (SENPs). *Chem Biol*, 2011, 18: 722-32
- [39] Qiao Z, Wang W, Wang L, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of benzodiazepine-based SUMO-specific protease 1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21: 6389-92
- [40] Uno, Koma, Ban HS, et al. Discovery of 1-[4-(N-benzylamino)phenyl]-3-phenylurea derivatives as non-peptidic selective SUMO-sentrin specific protease (SENP) 1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22: 5169-73
- [41] Chen Y, Wen D, Huang Z, et al. 2-(4-Chlorophenyl)-2-oxoethyl 4-benzamidobenzoate derivatives, a novel class of SENP1 inhibitors: virtual screening, synthesis and biological evaluation. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22: 6867-70
- [42] Madu IG, Namanja AT, Su Y, et al. Identification and characterization of a new chemotype of noncovalent SENP inhibitors. *ACS Chem Biol*, 2013, 8: 1435-41
- [43] Kumar A, Ito A, Takemoto M, et al. Identification of 1,2,5-oxadiazoles as a new class of SENP2 inhibitors using structure based virtual screening. *J Chem Inf Model*, 2014, 54: 870-80
- [44] Wen D, Xu Z, Xia L, et al. Important role of SUMOylation of spliceosome factors in prostate cancer cells. *J Proteome Res*, 2014, 13: 3571-82
- [45] Zhao Y, Wang Z, Zhang J, et al. Identification of SENP1

- inhibitors through *in silico* screening and rational drug design. *Eur J Med Chem*, 2016, 122: 178-84
- [46] Wilkinson KD, Gan-Erdene T, Kolli N. Derivatization of the C-terminus of ubiquitin and ubiquitin-like proteins using intein chemistry. *Methods Enzymol*, 2005, 399: 37-51
- [47] Ulrich HD. Detection and characterization of SUMO protease activity using a sensitive enzyme-based reporter assay. *Methods Mol Biol*, 2009, 497: 269-81
- [48] Tatham MH, Hay RT. FRET-based *in vitro* assays for the analysis of SUMO protease activities. *Methods Mol Biol*, 2009, 497: 253-68
- [49] Xie W, Wang Z, Zhang J, et al. Development and evaluation of a highly reliable assay for SUMO-specific protease inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26: 2124-8
- [50] Matunis MJ, Coutavas E, Blobel G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, 1996, 135: 1457-70