

BORIS的功能及相关药物研究进展

徐东, 卢多*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 印记位点调节子的弟兄 (brother of regulator of imprinted sites, BORIS) 或者类 CCCTC 结合因子 (CCCTC binding factor-like, CTCFL) 是一个相对发现不久的癌症睾丸抗原。与之相关的药物研发已经在小分子、小 RNA、多肽药、疫苗以及细胞等多个方向展开。因独特的干扰基因组空间高级结构的能力, BORIS 可能代表着一类全新药物靶点。本综述系统梳理 BORIS 相关分子生物学研究结果, 包括 BORIS 基因产物的多样性, 由其介导的分子间互作, 受到影响的信号传导通路, 以及现有相关药物研发策略, 以期明了 BORIS 的上下游调控分子机制及可能进一步突破的研究方向。

关键词: BORIS; 三维基因组结构; 癌症睾丸抗原; 分子机制; 药物研发策略

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)07-1905-11

Research progress on the functions of BORIS and related drug development

XU Dong, LU Duo*

(State Key Laboratory of Active Substances and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Brother of regulator of imprinted sites (BORIS), also known as CCCTC binding factor-like (CTCFL), is a relatively newly discovered cancer-testis antigen. Drug development related to BORIS has been carried out in multiple directions, including small molecules, small RNA molecules, polypeptides, vaccines, and cellular therapies. Due to its unique ability to interfere with the higher-order spatial structure of the genome, BORIS may represent a new class of drug targets. Here we systematically review the molecular biology research results related to BORIS, including the diversity of its gene products, the multipartite interactions mediated by BORIS, the subsequent impact on signaling pathways, and current drug development strategies, in order to gain a better understanding of the molecular mechanisms of BORIS in both upstream and downstream regulation networks and to identify potential research directions for further breakthroughs.

Key words: BORIS; 3D genome; cancer-testis antigen; molecular mechanism; drug development strategy

BORIS 于 2002 年发现, 因其与辅助基因印记调控的 CTCF 蛋白在锌指部分高度相似, 通过基因分析认定两者为旁系同源蛋白, 遂将其命名为印记位点调节子的弟兄 (brother of regulator of imprinted sites, BORIS)。同时研究发现, BORIS 在睾丸特异性表达,

仅限于进行基因组再甲基化的 CTCF 阴性雄性生殖细胞^[1]。其后通过对人类细胞和组织中 BORIS 表达的分析, 揭示了表达这种蛋白质的其他几种细胞类型, 包括卵巢细胞、乳腺癌患者的白细胞和胚胎干细胞^[2]。目前认为 BORIS 主要在早期配子发生和多种癌症中表达, 而在分化的体细胞中几乎不表达。也有研究显示特定正常细胞中确实存在 BORIS 的广泛表达, 但表达量较低^[3,4]。因为 BORIS 的表达特征, 当前认定为一种

收稿日期: 2024-04-07; 修回日期: 2024-05-06.

基金项目: 中国医学科学院创新工程项目 (2022-I2M-2-002).

*通讯作者 Tel: 86-86-10-63039979, E-mail: luduo@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0321

癌症睾丸抗原,自然也成为一个很受关注的潜在药物靶点分子。

作为 CTCF 的唯一同源蛋白令 BORIS 更值得关注。CTCF 是一个关键的三维基因组构建因子,帮助稳定 86% 的结构单元——染色质环。肿瘤细胞中 BORIS 的出现,一方面干扰 CTCF 行使其正常功能,另一方面介导新的染色质环形成,在基因组层面影响下游基因表达的协同性,引起多个信号通路的异常。靶向 BORIS 则可以通过改变基因组空间结构来调整细胞功能,或许可以成为一类全新的药物靶点。虽然 BORIS 对基因组结构的影响多表现在与 CTCF 竞争脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 上,与其结合的各类分子及相关信号通路都可能成为有效的药物攻击靶点。基于此,本文试图汇总当前针对 BORIS 的分子生物学研究成果,以及靶向该蛋白的药物研发进展,希望由此能够更好地理解 BORIS 的功能及调控机制,为进一步精准靶向药物的研发提供帮助。

1 BORIS 基因表达产物

人类 BORIS 基因位于染色体 20q13 上,总长 29 kb,由 16 个外显子组成^[3]。BORIS 在睾丸、胚胎干细胞和癌细胞系中表达出多种蛋白质亚型,在 DNA 低甲基化增加的细胞中更为明显^[3]。

控制 BORIS 表达的启动子区域包含 3 种启动子 A、B、C,分别对应于第一个起始密码子 ATG 上游 1 447、899 和 658 碱基对的转录起始位点,并通过可变剪接产生至少 23 种信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA)^[3]。Pugacheva 等^[3]对这 23 个转录本变体进行了表征,得到 17 种蛋白质亚型。不同的亚型在其 DNA 结合结构域中含有不同数量的锌指,配以不同的氨基和羧基末端,并且在各种正常细胞和癌细胞中具有不同的表达谱。根据其 3' 末端序列特征可以将 23 个亚型分为 6 个亚家族 (subfamily1-6, sf1-6)。在各个亚家族中, sf2 存在免疫原性,可用于辅助肿瘤疫苗的研发^[5], sf6 参与宫颈癌细胞干性,在过继性 T 细胞疗法中具有治疗肿瘤潜力^[6]。

在蛋白翻译后修饰方面,当前仅观察到在响应细胞 DNA 损伤时 BORIS 会发生二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP)-核糖基化修饰,其他类型修饰尚无报道。用丙氨酸取代 BORIS 蛋白氨基端第 198 至第 228 位之间的 5 个保守谷氨酸残基,能够降低 ADP-核糖基化水平^[7],由此确定修饰位点主要位于这个区域内。

2 BORIS 介导的分子间相互作用

2.1 结合 DNA

成熟的 BORIS 蛋白由三部分组成:氨基端 (N 端)、

中间锌指区 (ZF 区) 和羧基端 (C 端),拥有和 CTCF 几乎一样的 11 个连续锌指^[1] (图 1)。虽然 BORIS 锌指与 DNA 结合模式的研究并不多,CTCF 锌指结合 DNA 已经得到深入研究。根据 CTCF 锌指片段与 DNA 结合复合物的晶体结构所示,全部 11 个锌指均保持经典 C2H2 锌指折叠模式,ZF3-7 和 ZF9-11 分别识别两段 DNA 双螺旋大沟中的碱基,而 ZF8 桥接在两段之间不参与碱基特异性识别^[8]。由于锌指的高度同源性,这意味着 BORIS 也能以相似的方式对 DNA 基序进行特异性识别。但基因组中两者共享不到 40% 的共同结合位点^[9],因此必然有其他的影响因素存在。更细致的分析发现,基因组中仅有 CTCF 或 BORIS 结合的位点在锌指 4 和 7 的 DNA 识别序列上有细微差异,而且结合位点周围的染色质折叠特性有所差别:CTCF 趋向于结合在规则排列的核小体之间,而 BORIS 趋向于结合在松散的核小体附近^[10]。此外,CTCF 趋向于结合在内含子或者基因间区域,而 BORIS 趋向于结合在启动子区域^[11]。在两个蛋白之间交换 N 和 C 末端序列而形成嵌合蛋白的实验表明,CTCF 和 BORIS 的 ZF 区决定它们各自的 DNA 基序特异性,而 N 和 C 末端序列影响蛋白质结合区域的偏好^[11]。

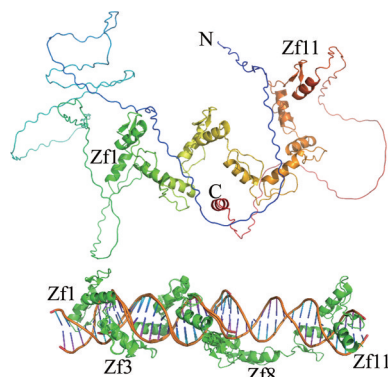


Figure 1 Predicted structure of brother of regulator of imprinted sites (BORIS) by AlphaFoldII and the crystal structure of CTCF zinc-fingers in complex with DNA. BORIS structure is in rainbow colours with its N-terminus in blue and C-terminus in red

DNA 的甲基化修饰会影响 CTCF 的结合,然而是否会影响 BORIS,目前存在一些不同的看法。针对父系印记基因 *H19* 差异甲基化位点,有研究认为 BORIS 可以结合,也有研究认为不能^[2]。在对乳腺癌细胞的研究中发现,丙酮酸激酶 M1/2 (pyruvate kinase M1/2, PKM) 基因 10 号外显子的甲基化引起 BORIS 的结合以及 RNA 聚合酶 II 在该位点的富集,导致差异剪接由保留 9 号外显子向保留 10 号转变^[12]。可以看出 DNA 甲基化可以影响 BORIS 的结合,但该影响是以直接方

式抑或间接方式实施, 还需进一步的研究来明确。

BORIS 在细胞中的异位表达会导致其在大量基因的启动子上结合, 通过直接调控、替换 CTCF 和招募其他因子等多种方式影响下游基因的表达, 其中大部分基因与癌症相关, 如黑色素瘤抗原家族成员 A1 基因 (melanoma antigen family member A1, *MAGE-A1*)、乳腺癌易感基因 1 (breast cancer gene 1, *BRCA1*)、细胞因子信号转导抑制因子 3 (suppressor of cytokine signaling 3, *SOCS3*) 基因等^[2,11,13-19]。

BORIS 可以结合一些具有特殊功能的 DNA 序列, 如前面提到存在争论的甲基化胰岛素样生长因子 2/H19 (insulin like growth factor 2/H19, *Igf2/H19*) 的印记调控区域 (imprinting control region, ICR), 通过调控染色质环的变化影响基因表达^[2]。BORIS 还可以结合能够在基因组中转座的“SINE、VNTR、ALU” (SVA) 复杂重复序列家族的数目可变串联重复序列 (variable number of tandem repeats, VNTR) 区域^[20], 抑制其活性。

对 DNA 重复序列进行研究, 揭示出 BORIS 和 CTCF 结合 DNA 的 3 种形式: 仅有 CTCF 结合、仅有 BORIS 结合及 BORIS 和 CTCF 共结合^[20]。这与已发现的两类功能和结构不同的 CTCF 靶向结合位点 (CTCF target site, CTS)——2xCTS 和 1xCTS 一致^[9]。在癌细胞和精子中, 具有至少两个相邻 CTS 且有 BORIS 结合的位点 (2xCTS) 主要位于启动子和增强子, 而单基序 CTS (1xCTS) 更多出现在基因之间位置并与非活性转录区有关^[9]。BORIS 与 CTCF 竞争 2xCTS 位点, 导致完全占有该位点或者与 CTCF 共享, 进而诱导转录调节模式的改变, 引起癌症的发生发展。

BORIS 可以通过影响基因组空间结构来调控下游基因表达。基因组空间结构在很大程度上由关键因子 CTCF 和黏连蛋白 (cohesin) 协同构建的染色质环通过复杂的组合及嵌套而形成, 且两个因子之间存在直接的相互作用^[21]。BORIS 并没有发现与 cohesin 直接作用, 但有研究显示 BORIS 与减数分裂特异的黏连蛋白复合物共定位 (有丝分裂与减数分裂黏连蛋白的组成亚基有所不同), 与癌症的发生有关^[22]。研究还发现当 CTCF 介导的染色质环节点位置上出现 BORIS 与 CTCF 重叠结合的时候, 原有染色质环的强度下降, 同时环内基因的表达会出现变化^[11]。除了影响 CTCF 形成的染色质环, BORIS 可以介导新的染色质环形成。在表现出对 ALK 抑制剂耐药的神经母细胞瘤中, 许多新发染色质环节点上可以检测到 BORIS 与 cohesin, 而没有 CTCF。这些环大量参与耐药相关的超级增强子对下游基因的调控。敲降 BORIS 导致节点上 cohesin 及染色质环的消失^[23]。

2.2 结合 RNA

与 CTCF 相似, BORIS 同样具备结合 RNA 的能力。研究发现在神经干细胞 (hNP1) 和由其分化产生的神经元 (6dN) 细胞中分别有 863 和 771 个独特 mRNA 转录本与 BORIS 结合, 其中 88 个共同出现在两类细胞中^[24]。此外, BORIS 能与 28S 核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA) 和 18S rRNA 结合。进一步研究表明 BORIS 能够与功能性核糖体缔合, 包括多核糖体^[24], 这意味着 BORIS 在转录后水平参与基因表达调控。另一 BORIS 结合 RNA 的证据是在调节环状 RNA (circular RNA, circRNA) 的表达中。BORIS 在邻近 circRNA 剪接位点的区域识别相对特异的 RNA 基序, 增强 circRNA 的生成, 且 BORIS 识别的 RNA 基序与 CTCF 不同^[25]。总的来说, BORIS 与 RNA 分子之间存在广泛结合, 但目前尚缺少对其结合特定 RNA 并调节具体功能的研究。

2.3 结合蛋白

蛋白间互作已经成为药物研发的热点靶标。BORIS 锌指主要用于核酸结合, 有研究显示 N/C 两端区域无特定结构^[26], 或许更适用于蛋白结合。当前药物研发策略也主要针对这两个区域。下文对与 BORIS 相互作用的蛋白质、结合 BORIS 部位和功能进行总结 (表 1)。

早在 2008 年 Nguyen 等^[27]就已经通过酵母双杂交实验鉴定出了多种与 BORIS 的 N 端序列相互作用的蛋白, 并将它们分为 4 个功能组: 睾丸特异性蛋白、染色质相关蛋白、解旋酶相关蛋白、转录因子等。

进一步研究显示, BORIS 的 N 端与人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) B 关联转录本 3 蛋白 (HLA-B associated transcript 3, BAT3) 互作, 联合 SET 结构域蛋白 1A (SET domain-containing protein 1A, SET1A) 在原癌基因 *MYC* 和 *BRCA1* 启动子上形成蛋白复合物, 增加组蛋白 H3 的第 4 位赖氨酸二甲甲基化 (H3K4me2) 并促进基因表达, 导致癌症发生^[27]。类似表观遗传修饰也出现在 *Notch3* 及 *MAGEA* 启动子区域, BORIS 在 *Notch3* 的结合与 H3K4 的三甲甲基化 (H3K4me3) 上调相关, 而敲降 BORIS 导致 H3K4me3 水平下降及表现抑制作用的组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸三甲甲基化 (H3K27me3) 水平上升^[28]。BORIS 结合在 *MAGEA* 启动子区域除了与 H3K4me3 相关外, 还与 H3K9 及 H3K14 的乙酰化相关^[29]。至于哪些蛋白完成这些修饰以及相关蛋白是否与 BORIS 之间存在互作并不清楚。BORIS 与 SNF2 相关 CBP 激活蛋白 (SNF2-related CBP activator protein, SRCAP) 的结合帮助 H2A.Z 在核小体中替换 H2A, 其作用类似 H3K4me2

Table 1 List of protein partners of BORIS. ATF7: Activating transcription factor 7; CHD8: Chromodomain helicase DNA binding protein 8; CSTA: Cystatin A; FHL2: Four and a half LIM domains protein 2; ELF2: ETS-related transcription factor 2; HCFC1: Host cell factor 1; MGA: MAX gene-associated protein; MKL2: Megakaryoblastic leukemia-2; NFAT5: Nuclear factor of activated T-cells 5; POGZ: Pogo transposable element with ZNF domain; TLK2: Tousled like kinase 2; ZNF518: Zinc finger protein 518; IP: Immunoprecipitation; Co-IL: Co-immunolocalization; ISPLA: *In situ* proximity ligation assay; IVP-PIA: *In vitro* protein-protein interaction assays; nk: Not known

BORIS-partner	BORIS site	Detection method	Molecular function
ATF7 ^[27]	N	Yeast two-hybrid	Chromatin regulator
BAT3 ^[27]	N	Yeast two-hybrid	Molecular chaperone
CHD8 ^[27]	N	Yeast two-hybrid	DNA helicase
CSTA ^[27]	N	Yeast two-hybrid	Cysteine protease inhibitor
FHL2 ^[27]	N	Yeast two-hybrid	Assembling extracellular membranes
ELF2 ^[27]	N	Yeast two-hybrid	Transcription factor
HCFC1 ^[27]	N	Yeast two-hybrid	Transcription coactivator
HCFC2 ^[27]	N	Yeast two-hybrid	Interacting with virus protein (VP16)
H1 ^[31]	N	GST pull down	Nucleosome component
H2A ^[31]	N	GST pull down	Nucleosome component
H3 ^[31]	N	GST pull down	Nucleosome component
MGA ^[27]	N	Yeast two-hybrid	Transcription factor
MKL2 ^[27]	N	Yeast two-hybrid	Transcription coactivator
NFAT5 ^[27]	N	Yeast two-hybrid	Transcription factor
POGZ ^[27]	N	Yeast two-hybrid	Chromatin structure regulation
PRMT7 ^[31]	N	GST pull down, Co-IP	Methyltransferase
SRCAP ^[27]	N	Yeast two-hybrid	Chromatin-remodeling
TLK2 ^[27]	N	Yeast two-hybrid	Chromatin assembly
ZNF518 ^[27]	N	Yeast two-hybrid	Methyltransferase association
UBF ^[32]	ZF	Co-IP	Transcription activator
RB2/p130 ^[33]	nk	Co-IP, Co-IL	Heterochromatin formation
SET1A ^[27]	nk	Reciprocal IP	Histone methyltransferase
Sp1 ^[35,36]	nk	IVP-PIA, Co-IP	Transcription factor
TAF7L ^[34]	nk	Co-IP, ISPLA	General transcription factor
hTBP ^[35]	nk	IVP-PIA	General transcription factor

修饰, 同样引起核小体处于松散形式, 由此暴露出新的转录起始位点^[30]。此外, 在印迹基因 *H19* 位点 BORIS 的 N 端结合组蛋白 H1、H2A、H3 以及蛋白质精氨酸甲基转移酶 7 (protein arginine methyltransferase 7, PRMT7)^[31], 由此增强 PRMT7 对组蛋白 H2A 和 H4 的甲基转移酶活性, 并与 DNMT 一起在父系印迹基因甲基化中起作用^[31]。

除了靶向 N 端, 一些蛋白质能够与 BORIS 的 ZF 区相互作用。比如上游结合因子 (upstream binding factor, UBF) 通过与 BORIS 的 ZF 区结合, 帮助组织核糖体 DNA (ribosomal DNA, rDNA) 重复序列区域的染色质结构^[32]。

另有一些蛋白目前已知与 BORIS 存在相互作用, 但尚不知道结合 BORIS 的具体区域, 包括可能响应内质网应激而存留于内质网的视网膜母细胞瘤样蛋白 2 (retinoblastoma-like protein 2, Rb2/p130)^[33]、参与调节雄配子相关基因表达的类 TATA 盒结合蛋白关联因子 7 蛋白 (TBP-associated factor 7-like, TAF7L)^[34]、调控 *MAGE-A1* 启动子活性的人类 TATA 结合蛋白 (human TATA binding protein, hTBP)^[35] 以及在肺癌发生过程中

介导癌症睾丸抗原 1B 基因 (cancer/testis antigen 1B, *NY-ESO-1*) 去抑制的转录因子 Sp1^[36] 等。

3 BORIS 相关的上下游调控机制

BORIS 在癌症发生发展中的作用机制非常复杂, 包括但不限于 *BORIS* 基因的异常扩增^[37]、竞争性抑制 CTCF、超级增强子的形成^[23]、癌症相关基因的激活、肿瘤抑制基因的超甲基化^[38]。丰富 BORIS 的上下游调控网络可能是揭开癌症相关分子机制的一种方式。根据已有研究, 本综述总结了 BORIS 上游表达调控因素, 并对下游调控网络从信号通路的角度进行了整理 (图 2)。

3.1 BORIS 的表达调控

在正常睾丸中 *BORIS* 使用所有 3 个启动子激活转录, 但在已经测试的 30 种癌细胞系中有 84% 仅使用启动子 A 和/或 C, 而剩下的癌细胞系主要使用启动子 B 和 C。正常细胞和癌细胞之间启动子使用的不同表明它们受到差异调节^[39]。对 *BORIS* 表达启动子区域的分析发现, 在 3 个启动子区块中, GATA/CCAAT 盒被确定为启动子的关键元件。在启动子之间存在一个 CpG 岛, 位于 *BORIS* 第一个 ATG 编码上游 1 096~

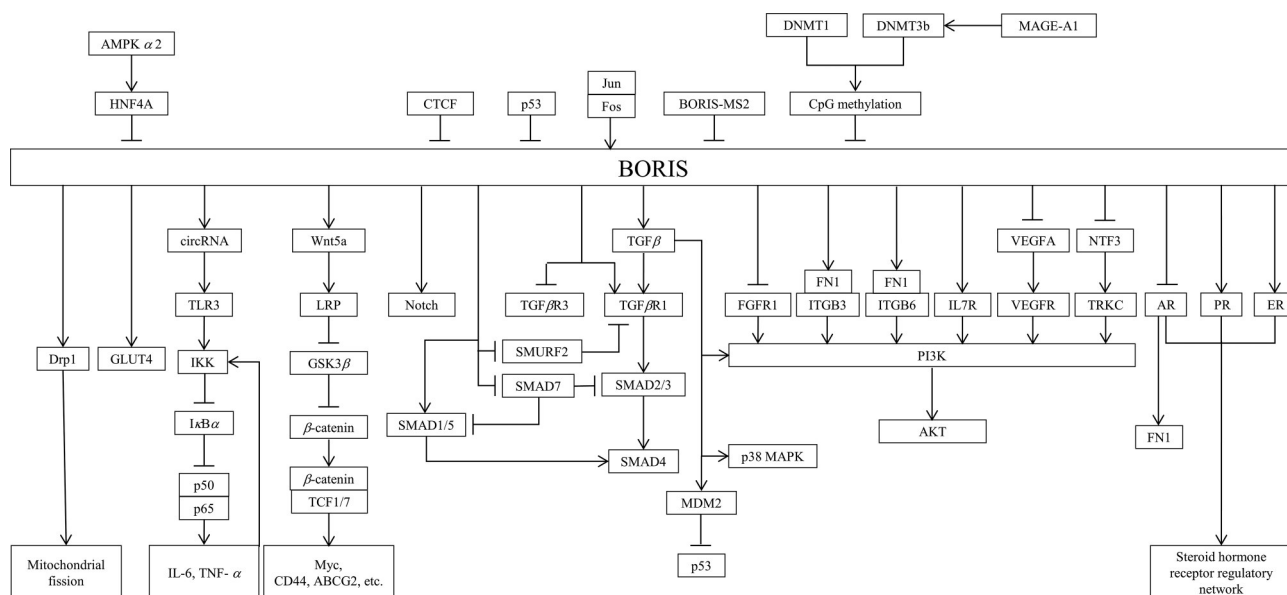


Figure 2 BORIS related signaling pathways. IKK: I κ B kinase; ABCG2: ATP binding cassette subfamily G member 2; TRCK: NTF3 growth factor receptor

762 bp。另外,在启动子上游还发现两个小卫星等位基因位点,分别在第一个 ATG 上游 5 936~5 734 bp 和 2 586~1 812 bp 位置上,被称为 BORIS-MS1 和 BORIS-MS2。CpG 岛和 BORIS-MS2 被发现可以充当转录调节剂,并且 BORIS-MS2 被鉴定为负调控因子^[40]。此外,研究发现, BORIS 在很大程度上受启动子甲基化修饰的调节^[41]。DNA 甲基转移酶 1 或 3b (DNA methyltransferase 1 或 3b, DNMT1 或 DNMT3b) 失活会引起 CpG 甲基化减少,导致 *BORIS* 表达上调^[42],而 MAGE-A1 通过驱动 DNMT3a 甲基化 *BORIS* 启动子来抑制其表达^[41]。

除了通过 DNA 上的调控外, *BORIS* 的表达还受到一些转录因子的调控,包括 CTCF、p53、肝细胞核因子 4 α (hepatocyte nuclear factor 4-alpha, HNF4A)、激活蛋白 1 (the activator protein-1, AP-1) 二聚体家族成员 Jun 和 Fos^[43]。其中 CTCF^[39]、p53^[39] 和 HNF4A^[44] 可以直接作用于 *BORIS* 抑制其表达, Jun 和 Fos 结合 *BORIS* 启动子增强其转录^[43]。

3.2 信号通路

3.2.1 TGF β 信号通路

BORIS 会引起转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF β) 表达的上升,这在神经母细胞瘤^[45]、高级别浆液性卵巢癌^[18]、小鼠胚胎干细胞中得到了检验。在神经母细胞瘤和干细胞中认为 BORIS 主要激活 TGF β 通路,而在卵巢癌中认为主要是激活磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 通路。在卵巢癌细胞中还观察到 BORIS 和 CTCF 同时结合在 TGF β 基因的启动子上^[18]。在神

经母细胞瘤中研究人员细致检测了 TGF β 通路的其他多个因子 (图 2)^[45]。异位表达 BORIS 会导致 sma 和 mad 相关蛋白 2/3 (sma- and mad-related protein 2/3, SMAD2/3)、SMAD1/5、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 蛋白 p38 表达上升, SMAD2 和 p38 磷酸化水平提高,且 SMAD3 和 SMAD4 的 mRNA 半衰期延长。敲降 BORIS 会引起 TGF β 受体 I (TGF β R1)、SMAD2/3、SMAD4 表达下降, SMAD2 磷酸化水平降低,抑制因子 SMAD7 和 SMAD 泛素化调节因子 2 (SMAD ubiquitination regulatory factor 2, SMURF2) 表达水平上升。所以 BORIS 主要通过经典 SMAD 途径调节 TGF β 通路,非经典途径中 MAPK 也可能参与调控。此外,敲降 BORIS 的细胞中抑癌基因 p53 表达上升,其抑制因子 MDM2 癌蛋白表达下降,这被认为是 TGF β 调控 MDM2 的结果。在卵巢癌细胞中敲降 BORIS 还发现 TGF β R3 表达水平上升^[18]。

3.2.2 Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 信号通路

BORIS 参与调节在上皮细胞-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 及肿瘤干细胞 (CSC) 中有重要作用的 Wnt/ β -catenin 通路^[46]。使用神经母细胞瘤细胞研究 BORIS 调控 TGF β 通路的课题组对所用细胞做进一步筛选,得到表现肿瘤干性的 CD44/CD133 阳性细胞用于信号通路分析。研究发现 BORIS 可以调节多个 Wnt/ β -catenin 通路关键因子,包括 Wnt5a、 β -catenin、T 细胞因子 1/7 (T cell factor 1/7, TCF1/7)、磷酸化的低密度脂蛋白受体相关蛋白 (LDL receptor-related protein, LRP) 和糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase

3 β , GSK3 β)。同时, 敲降 BORIS 可以引起间质标记物波形蛋白 (vimentin)、神经钙粘蛋白 (N-cadherin)、Twist 蛋白、Snail 和 Slug 蛋白水平下降。因此, BORIS 可能通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调节 CSC 的 EMT 以及转移^[47]。

此外, 在 BORIS 基因敲除的小鼠结直肠组织中同样会发现 Wnt 通路的 β -catenin 在细胞核内减少, MAPK 通路的细胞外调节 MAP 蛋白激酶 (extracellular regulated MAP kinase, ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK)、p38 磷酸化水平降低, 以及 γ H2AX 的磷酸化和 DNA 损伤的显著提升。鉴于以往有研究表明 Wnt 和 MAPK 通路参与 DNA 损伤修复, 研究人员认为 BORIS 可能通过这两个通路提升癌细胞的 DNA 损伤修复能力^[48]。

3.2.3 Notch 信号通路 BORIS 在急性 T 淋巴细胞白血病中被认为是 Notch 途径的诱导剂。BORIS 结合癌细胞中 NOTCH3 未甲基化的启动子, 与 H3K4me3 水平上升相关; 敲降 BORIS 则与 H3K27me3 上升、H3K4me3 下降相关, 即 BORIS 可能通过诱导并维持允许转录状态的染色质构象, 促进 NOTCH3 的转录表达^[28], 异常激活 Notch 途径。此外, 研究人员认为 Notch 蛋白可能与 TGF β 、WNT/ β -连环蛋白信号通路相互作用, 在维持肿瘤干性方面发挥关键作用, 并增加肿瘤干细胞的数量^[47]。

3.2.4 能量代谢通路 BORIS 通过多个途径调节肿瘤糖代谢。在对低葡萄糖肿瘤微环境与肝癌侵袭/转移之间内在调控机制的研究中发现, 敲降腺苷活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 的 α 2 催化亚基可以抑制下游靶分子 HNF4A 对低水平葡萄糖环境的响应, HNF4A 又可以结合在 BORIS 启动子区域抑制其表达, 而 BORIS 直接作用于葡萄糖转运体 4 (glucose transporter type 4, GLUT4) 基因, 提升其表达水平, 导致 EMT 标记物 N-cadherin 和 vimentin 水平上升, 增强肝癌细胞运动和转移^[44]。研究还发现 HNF4A 激动剂 (苯氟雷司) 和 GLUT4 抑制剂 (抗病毒药物利托那韦) 可以抑制肝癌细胞增殖和葡萄糖摄取^[44], 表明信号通路中的关键分子可能成为治疗肿瘤的药物靶标。

此外, 如前所述, BORIS 能够通过转换差异剪接模式提升 PKM2 的表达水平。PKM 是一个调节糖酵解的关键酶。PKM2 的出现会导致细胞乳酸产量及葡萄糖摄取水平的上升, 表现出 Warburg 效应^[44]。在神经母细胞瘤细胞中还发现, BORIS 引起线粒体裂变因子动力蛋白相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, Drp1) 的表达及磷酸化水平上升, 线粒体融合标志物

视神经萎缩蛋白 1 (optic atrophy 1, OPA1) 表达下降。鉴于线粒体裂变与肿瘤糖酵解代谢特征相关, 研究人员检查了糖酵解标志物己糖激酶 2 (hexokinase 2, HK2)、溶质载体家族 2 成员 1 (solute carrier family 2 member 1, SLC2A1)、果糖-2,6-二磷酸酶 3 (6-phospho-fructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3, PFKFB3)、丙酮酸脱氢酶激酶 1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1, PDK1), 且均发现表达上升^[45]。

3.2.5 PI3K-Akt 信号通路 在敲低和过表达 BORIS 的 OVCAR3 卵巢癌细胞中研究转录谱的变化发现, 大量差异表达基因参与细胞运动、膜转运和胞外基质相关过程。其中, BORIS 诱导的 32 个差异表达蛋白与一个附加蛋白一起可以组成一个大型蛋白互作网络, 主要由 PI3K-蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt) 信号通路和细胞外基质基因两部分组成。参与 PI3k-Akt 信号传导途径的蛋白包括成纤维细胞生长因子受体 1 (fibroblast growth factor receptor 1, FGFR1)、整联蛋白 β 3 (integrin beta 3, ITGB3)、ITGB6、纤连蛋白 1 (fibronectin 1, FN1)、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、神经营养素 3 (neurotrophin 3, NTF3) 和白细胞介素 7 受体 (interleukin 7 receptor, IL7R)^[18]。鉴于有研究显示 BORIS 过表达与肿瘤耐药相关, 而一些针对 PI3k-Akt 信号传导途径的药物治疗效果不佳, 研究人员认为联合靶向 BORIS 治疗或许能有所帮助。此外, 使用神经母细胞瘤细胞研究 BORIS 调控 TGF β 通路的研究中, PI3K 也被提及可能作为 TGF β 的非经典调控途径参与调控, 在 BORIS 敲降时可以观察到 PI3K 表达水平的下降^[45]。

3.2.6 NF- κ B 信号通路 如前所述, BORIS 可通过影响 RNA 剪接增强 circRNA 的形成。从 CaCO-2 癌细胞提取总 circRNA 并转染小鼠单核/巨噬细胞 RAW264.7 后可以发现, circRNA 通过诱导上调 Toll 样受体 3 (Toll-like receptor 3, TLR3) 刺激下游核因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 信号传导途径活化, 观察到核因子 κ B 抑制蛋白 (inhibitor of NF- κ B, I κ B) 和 p65 磷酸化水平的上升^[25]。此外, BORIS 过表达也能引起 RAW264.7 细胞中的 NF- κ B 信号传导途径的激活, 并且促进炎症因子白介素 6 (IL-6)、白介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、双链 RNA 活化蛋白激酶 (double stranded RNA activated protein kinase, PKR)、视黄酸诱导基因 I 蛋白 (retinoic acid-inducible gene I protein RIG1) 和黑色素瘤分化相关蛋白 5 (melanoma differentiation-associated protein 5, MDA5) 的表达^[25]。相对应的, 敲降 BORIS 会引起 I κ B 和 p65 磷酸化水平下降, 抑制 NF- κ B 通路^[48]。

4 BORIS 关联的生物学功能

正常生理状态下, BORIS 在基因组全面甲基化重构的精子细胞中表达, 因此不难发现两者存在相关性^[1]。同样, BORIS 在多种肿瘤细胞中异常表达, 几乎与肿瘤所有特征功能相关, 包括肿瘤发生、增殖、外周血管生成、抗凋亡、DNA 损伤修复、耐药、迁移侵袭、肿瘤干性等。肿瘤的发生一般归因于原癌基因的表达与抑癌基因的沉默。如上所述, BORIS 通过上调 *MDM2* 的表达, 破坏了重要抑癌基因 *p53* 的表达^[45]; 通过作用在 *MYC* 等原癌基因的启动子上, BORIS 帮助该基因的表达^[27]。*MYC* 基因同时也具有很强的细胞增殖作用。*VEGFA* 是一个重要的血管生成因子, 在关于 *PI3K* 通路的研究中发现与 BORIS 的表达相关^[18]。促凋亡因子 *RB2/p130* 在内质网与 BORIS 结合, 使其无法入核引起细胞凋亡^[33]。BORIS 作用于 *Wnt* 和 *MAPK* 通路帮助 DNA 损伤修复^[48]。抗凋亡与提升损伤修复能力都可以帮助肿瘤耐药, 特别是针对顺铂一类破坏 DNA 稳定性的抗肿瘤药物^[49]。BORIS 通过 *Wnt* 通路调节 *EMT*, 进而影响肿瘤侵袭^[47]; 通过 *Wnt*、*Notch*、*TGF β* 通路协同作用维持肿瘤干性^[47]。此外, BORIS 在胚胎干细胞中表达, 与一些干性因子相关, 比如 *OCT4* 等^[2]。

5 BORIS 相关的癌症诊疗方法

5.1 BORIS 作为肿瘤标志物

研究显示, BORIS 表达在子宫癌^[50]、前列腺癌^[51]、食管癌^[52]、肝细胞癌^[53]等癌症中均有成为诊断癌症进展或判断预后的生物标志物的潜力。在肝细胞癌中的进一步研究发现, BORIS 和 *SOCS3* 的表达存在一定的负相关性。高表达 BORIS 和/或低表达 *SOCS3*, 与术后生存率低相关, 而同时有 BORIS 高表达与 *SOCS3* 低表达的患者预后效果最差^[54]。

BORIS 基因的相关变异也可以用于临床预测。研究发现, 肝细胞癌组织中 *BORIS* 的去甲基化频率显著高于其相邻非肿瘤组织, 并且与肿瘤大小和临床 *TNM* 分期相关, 表明 *BORIS* 低甲基化是肝细胞癌预后的生物标志物^[55]。同样, *BORIS* 低甲基化也可作为上皮性卵巢癌预后的生物标志物^[56]。

在乳腺癌早期研究中曾认为 *BORIS* 突变和高表达有可能被用作生物标志物^[57]。但进一步研究发现, 良/恶性乳腺肿瘤患者的外周血中性粒细胞中, BORIS 表达均增加, 无法区分良性和恶性病变, 这排除了 BORIS 作为乳腺癌标志物的可能^[58]。尽管如此, *BORIS-MS2* 的短稀有等位基因的出现还是可用于识别年轻患者患乳腺癌的风险^[59]。*MS* 位点属于可变重复序列。常见的 *MS2* 具有 14 或 15 次重复, 高于或者低于此数值认为是长或短稀有等位基因。除了乳腺

癌, 有证据表明 *BORIS-MS2* 的短稀有等位基因也可用于识别肺癌^[40]和膀胱癌风险^[60]。

5.2 与 BORIS 相关的化学药物

在分析敲降 BORIS 所引起的基因表达谱变化特征时发现, 使用单一化合物苍术苷处理结直肠癌细胞会导致类似变化。苍术苷明确靶向线粒体, 干扰能量代谢, 并引起 DNA 损伤的增加。苍术苷联合 5-氟尿嘧啶使用, 可以抑制结直肠癌细胞的生长^[61]。鉴于敲降 BORIS 与苍术苷作用的相似性, 在针对 BORIS 的药物研发中或许可以借鉴苍术苷的相关经验。有意思的是在非小细胞肺癌中, BORIS 的过表达可以通过抑制顺铂诱导的 DNA 损伤, 帮助癌细胞对顺铂产生耐药性^[49]。这表明 *BORIS* 基因敲除可能与目前的化疗方案协同作用, 以促进癌症患者的治愈。

除了苍术苷和顺铂与 BORIS 相关以外, 制蚜菌素和多西紫杉醇联合治疗转移性乳腺癌细胞, 会驱动 BORIS 表达并促进高迁移率族蛋白 1 (high mobility group protein 1, *HMGB1*) 的释放, 可以作为潜在的抗肿瘤免疫应答诱导剂^[62]; 另外, 姜黄素通过调节 *DNMT3b* 活性导致 *PKM* 基因 DNA 甲基化减少, 引起 BORIS 和 RNA 聚合酶 II 在该位点占有率降低, 改变差异剪接模式, 将 mRNA 产物由癌症特异性 *PKM2* 亚型恢复为正常细胞的 *PKM1* 亚型, 纠正头颈癌细胞能量代谢异常^[63]。

5.3 与 BORIS 相关的生物药

5.3.1 基于 BORIS 的疫苗研究 BORIS 具有免疫原性, 并且已经被纳入高优先级人肿瘤相关抗原列表^[64]。然而由于 BORIS 具有 DNA 结合、基因激活及表观遗传重编程功能, 完整野生型 BORIS 蛋白的使用可能加速癌症进展。为了规避安全性风险, 使用柔性结构氨基酸链替代锌指区连接 N 和 C 两段区域, 产生突变 BORIS 分子 (命名为 *mBORIS*) 作为靶抗原开发疫苗成为关注焦点。研究人员检测了多种方法递送 *mBORIS*, 包括蛋白疫苗、DNA 疫苗、不同的佐剂、不同的递送载体等。蛋白疫苗是在大肠杆菌中表达 *mBORIS*, 通过分离纯化获得蛋白。DNA 疫苗是将蛋白编码基因插入 *pORF* 质粒的 *hEF1-HTLV* 启动子之后, 形成被称为 *pmBORIS* 的质粒作为疫苗。腺病毒疫苗是将编码基因插入 *AdEasy XL* 病毒载体, 产出被称为 *AdBORIS* 的重组腺病毒载体。

对疫苗效果的检测是在接种了 4T1 乳腺癌细胞的 BALB/c 小鼠上完成的。最初使用的是 DNA 疫苗, 以 CD80 为佐剂, 同时在首次接种以后使用腺病毒载体疫苗做增强免疫。产生的免疫反应以主要组织相容性复合体 I (major histocompatibility complex I, *MHC I*) 类

依赖性方式介导对广泛的组织学无关肿瘤(乳腺癌、神经胶质瘤、浆细胞瘤)的细胞毒性^[65]。其后使用IL12/IL18为DNA疫苗佐剂,同时对比以QuilA为佐剂的蛋白疫苗。这两种疫苗未进行后续增强免疫。结果显示DNA疫苗优于蛋白疫苗。DNA疫苗引起Th1类免疫反应,诱导细胞毒性T淋巴细胞产生;而尽管QuilA是一种强烈的Th1型佐剂,蛋白疫苗引起Th2类反应,诱导mBORIS特异性抗体产生^[66]。疫苗递送也尝试了使用树突状细胞,本文稍后将做介绍。近期,研究人员使用类病毒复制子小体(virus-like replicon particle, VRP)进行疫苗递送,并得到较好的结果。构建VRP是通过将编码mBORIS的mRNA插入改造过的委内瑞拉马脑炎病毒载体,与辅助RNA分子一起通过电击送入宿主细胞,进而得到类病毒小体(VRP-mBORIS)。使用该疫苗免疫接种了13762-MAT-B-III乳腺癌细胞的大鼠,50%显示肿瘤消失,且表现出免疫记忆能力^[67]。

5.3.2 基于BORIS的细胞免疫疗法 树突状细胞可以作为疫苗递送载体。使用载有BORIS突变形式(mBORIS)的树突状细胞接种小鼠,可以诱导强烈的抗癌免疫力、抑制肿瘤生长并显著降低自发性克隆形成转移的数量(50%的小鼠保持无转移)。与对照动物相比,实验组接种小鼠的肿瘤位置有更多的免疫效应CD4和CD8阳性T细胞浸润,同时髓源性抑制细胞的数量在浸润肿瘤部位显著减少,但是在接种动物脾脏中却未见减少。鉴于此,与药剂组合以减弱肿瘤相关的免疫抑制可能会更有效^[68]。

两项细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)靶向特异BORIS蛋白C端的研究得到了比较好的结果。研究人员通过分析患者样本确定可以结合HLA I型的BORIS相关天然肽段,筛选得到可以识别一个sf2亚家族C端9肽(序列:KLHGILVEA)的高亲和力T细胞。并明确其携带的相关T细胞受体(T cell receptor, TCR)的DNA序列。使用逆转录病毒载体加载该TCR进入CD8阳性T细胞而形成的过继性CTL,可以成功识别源于患者的卵巢癌细胞及DNA甲基化酶抑制剂地西他滨处理过的卵巢癌细胞系^[69]。另一项研究借助HLA-A2四聚体从sf6亚家族蛋白C端筛选出一个高亲和力9肽(序列:LLFIGTIKV),用于刺激健康志愿者捐献的外周血单个核细胞,分离得到靶向该9肽的CTL克隆。该T细胞克隆对sf6阳性的人源宫颈癌细胞系显示出细胞毒性^[6]。

5.3.3 BORIS相关的其他潜在生物药 小RNA常用于在细胞中敲降BORIS表达水平。如靶向BORIS锌指10编码mRNA序列的小干扰RNA(small interfering

RNA, siRNA)分子(OCM-8054编码序列:GGAAATACCACGATGCAAATT),在MDA-MB-231乳腺癌细胞系中导致BORIS表达的浓度依赖性降低和癌细胞的凋亡^[70]。又如Rao等^[71]研究中包含4个靶向BORIS的短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)分子,其中4号分子发现在神经母细胞瘤中可以有效地降低BORIS表达水平,增加DNA损伤,进而引起凋亡。有意思的是,敲降BORIS使得顺铂和多柔比星的IC₅₀值明显降低,说明瘤细胞药物敏感性提升^[71]。

同样是RNA分子,从癌细胞中提取的circRNA可以作为癌症预防的疫苗。如前所述BORIS能够刺激circRNA的产生,激活NF- κ B通路。在BALB/c裸鼠中注射细胞来构建皮下异种移植肿瘤的研究发现,经circRNA免疫的动物,其存留肿瘤体积显著小于未经治疗的对照组^[25]。

Zhang等^[7]通过噬菌体展示技术筛选出与BORIS蛋白N末端具有最高亲和力的多肽分子,在与HIV-1TAT肽融合以后,构建出BORIS靶向肽(BTA_{pep}-TAT)。进一步研究发现,BTA_{pep}-TAT可以抑制BORIS的ADP-核糖基化,破坏BORIS与DNA修复酶Ku70蛋白的结合及相继的DNA损伤修复,从而抑制非小细胞肺癌异种移植肿瘤进展。

6 结语与展望

自发现BORIS以来二十载有余,相关研究在多个方向展开,覆盖基因结构组成、基因产物多样性、BORIS蛋白与其他分子的互作以及有关蛋白参与的各种调控机制和相关的功能。总的来说,基因构成方面的研究相对比较完整,发现了许多能够与BORIS互作的蛋白,部分蛋白间互作明确到BORIS的N端和ZF段区域。从精准靶向药物设计的角度考虑,更精确的蛋白区域定位可能会有更大的价值。在与RNA分子互作方面,相关的研究还比较少。参考旁系同源蛋白CTCF的研究成果,BORIS与RNA的互作可能是一个非常具有潜力的研究方向。在调控功能方面,当前研究主要针对细胞增殖、侵袭、能量代谢、抗凋亡等方面。虽然无限制增殖是肿瘤细胞的一个显著特征,对耐药细胞的研究表明细胞增殖与药物敏感细胞相比有所下降^[23]。这从某种程度上似乎暗示增殖不是BORIS的一个主要功能,更多关注或许可以投射到能量代谢、凋亡等其他方向。

鉴于BORIS仅局限于少数几类正常细胞中表达,而在多种肿瘤中异常表达,使其成为一个理想的药物靶点。相关药物研发在多个方向开展,包括小分子化合物、小RNA、多肽、疫苗以及细胞药物,然而均未进入临床试验阶段。其中,疫苗相关研究占绝大多数,其

他方向都才刚刚开始。究其原因可能是 BORIS 相关基础理论研究的缺乏。基因组在细胞核内的狭小三维空间里高度组织并系统性调控。许多细胞功能的变化(如氧化应激、DNA 损伤修复等)很大程度上是对三维基因组的调控^[72]。BORIS 是基因组空间构建关键因子 CTCF 唯一的旁系同源蛋白,且表现出与 CTCF 或协作或竞争调控基因组三维结构的能力。启动子与超级增强子之间可以由 BORIS 介导的染色质环相联系,且多项研究发现另一个基因组构建关键因子 cohesin 与 BORIS 在环节点上共定位,尽管没有发现像 CTCF 那样与 cohesin 的直接结合,不能排除 BORIS 通过其他中介因子与 cohesin 一起形成多元复合物,由此建立起染色质环结构的可能性。因此针对 BORIS 的药物极有可能在基因组空间结构层面产生作用,或许可以开启一类全新药物靶标的大门。

作者贡献: 徐东、卢多共同收集材料并撰写。

利益冲突: 本文无利益冲突。

References

- [1] Loukinov DI, Pugacheva E, Vatolin S, et al. BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99: 6806-6811.
- [2] de Necochea-Campion R, Ghochikyan A, Josephs SF, et al. Expression of the epigenetic factor BORIS (CTCFL) in the human genome [J]. *J Transl Med*, 2011, 9: 213.
- [3] Pugacheva EM, Suzuki T, Pack SD, et al. The structural complexity of the human BORIS gene in gametogenesis and cancer [J]. *PLoS One*, 2010, 5: e13872.
- [4] Jones TA, Ogunkolade BW, Szary J, et al. Widespread expression of BORIS/CTCFL in normal and cancer cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e22399.
- [5] Qin L, Liu ZJ, Xian LJ, et al. Establishment and evaluation of cell and animal models expressing BORIS subfamily 2 variant [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10: 632.
- [6] Asano T, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. Brother of the regulator of the imprinted site (BORIS) variant subfamily 6 is involved in cervical cancer stemness and can be a target of immunotherapy [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 11223-11237.
- [7] Zhang Y, Fang M, Li S, et al. BTapep-TAT peptide inhibits ADP-ribosylation of BORIS to induce DNA damage in cancer [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21: 158.
- [8] Yin M, Wang J, Wang M, et al. Molecular mechanism of directional CTCF recognition of a diverse range of genomic sites [J]. *Cell Res*, 2017, 27: 1365-1377.
- [9] Pugacheva EM, Rivero-Hinojosa S, Espinoza CA, et al. Comparative analyses of CTCF and BORIS occupancies uncover two distinct classes of CTCF binding genomic regions [J]. *Genome Biol*, 2015, 16: 161.
- [10] Sleutels F, Soochit W, Bartkuhn M, et al. The male germ cell gene regulator CTCFL is functionally different from CTCF and binds CTCF-like consensus sites in a nucleosome composition-dependent manner [J]. *Epigenetics Chromatin*, 2012, 5: 8.
- [11] Nishana M, Ha C, Rodriguez-Hernaez J, et al. Defining the relative and combined contribution of CTCF and CTCFL to genomic regulation [J]. *Genome Biol*, 2020, 21: 108.
- [12] Singh S, Narayanan SP, Biswas K, et al. Intragenic DNA methylation and BORIS-mediated cancer-specific splicing contribute to the Warburg effect [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114: 11440-11445.
- [13] Soltanian S, Dehghani H. BORIS: a key regulator of cancer stemness [J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 154.
- [14] Kouprina N, Noskov VN, Pavlicek A, et al. Evolutionary diversification of SPANX-N sperm protein gene structure and expression [J]. *PLoS One*, 2007, 2: e359.
- [15] Yao H, Shao Q, Shao Y. Transcription factor CTCFL promotes cell proliferation, migration, and invasion in gastric cancer via activating DPPA2 [J]. *Comput Math Methods Med*, 2021, 2021: 9097931.
- [16] He JY, Liu QY, Wei L, et al. BORIS regulates SOCS3 expression through epigenetic mechanisms in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Sichuan Univ (Med Sci) (四川大学学报(医学版))*, 2018, 49: 1-7.
- [17] Wei L, Liu Z, Qin L, et al. BORIS variant SF2(C2/A4) promotes the malignant development of liver cancer by activating epithelial-mesenchymal transition and hepatic stellate cells [J]. *Mol Carcinog*, 2023, 62: 731-742.
- [18] Salgado-Albarran M, Spath J, Gonzalez-Barrios R, et al. CTCFL regulates the PI3K-Akt pathway and it is a target for personalized ovarian cancer therapy [J]. *NPJ Syst Biol Appl*, 2022, 8: 5.
- [19] Janssen SM, Moscona R, Elchebly M, et al. BORIS/CTCFL promotes a switch from a proliferative towards an invasive phenotype in melanoma cells [J]. *Cell Death Discov*, 2020, 6: 1.
- [20] Pugacheva EM, Teplyakov E, Wu Q, et al. The cancer-associated CTCFL/BORIS protein targets multiple classes of genomic repeats, with a distinct binding and functional preference for humanoid-specific SVA transposable elements [J]. *Epigenetics Chromatin*, 2016, 9: 35.
- [21] Li Y, Haarhuis JHI, Cacciatori AS, et al. The structural basis for cohesin-CTCF-anchored loops [J]. *Nature*, 2020, 578: 472-476.
- [22] Boukaba A, Liu J, Ward C, et al. Ectopic expression of meiotic cohesin generates chromosome instability in cancer cell line [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119: e2204071119.
- [23] Debruyne DN, Dries R, Sengupta S, et al. BORIS promotes chromatin regulatory interactions in treatment-resistant cancer

- cells [J]. *Nature*, 2019, 572: 676-680.
- [24] Ogunkolade BW, Jones TA, Aarum J, et al. BORIS/CTCF is an RNA-binding protein that associates with polysomes [J]. *BMC Cell Biol*, 2013, 14: 52.
- [25] Xu H, Fang M, Li C, et al. BORIS-mediated generation of circular RNAs induces inflammation [J]. *Transl Oncol*, 2022, 18: 101363.
- [26] Campbell AE, Martinez SR, Miranda JJ. Molecular architecture of CTCFL [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396: 648-650.
- [27] Nguyen P, Bar-Sela G, Sun L, et al. BAT3 and SET1A form a complex with CTCFL/BORIS to modulate H3K4 histone dimethylation and gene expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28: 6720-6729.
- [28] Zampieri M, Ciccarone F, Palermo R, et al. The epigenetic factor BORIS/CTCF regulates the NOTCH3 gene expression in cancer cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1839: 813-825.
- [29] Bhan S, Negi SS, Shao C, et al. BORIS binding to the promoters of cancer testis antigens, MAGEA2, MAGEA3, and MAGEA4, is associated with their transcriptional activation in lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 4267-4276.
- [30] Pugacheva EM, Bhatt DN, Rivero-Hinojosa S, et al. BORIS/CTCF epigenetically reprograms clustered CTCF binding sites into alternative transcriptional start sites [J]. *Genome Biol*, 2024, 25: 40.
- [31] Jelinic P, Stehle JC, Shaw P. The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation [J]. *PLoS Biol*, 2006, 4: e355.
- [32] van de Nobelen S, Rosa-Garrido M, Leers J, et al. CTCF regulates the local epigenetic state of ribosomal DNA repeats [J]. *Epigenetics Chromatin*, 2010, 3: 19.
- [33] Macaluso M, Caracciolo V, Rizzo V, et al. Integrating role of T antigen, Rb2/p130, CTCF and BORIS in mediating non-canonical endoplasmic reticulum-dependent death pathways triggered by chronic ER stress in mouse medulloblastoma [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11: 1841-1850.
- [34] Rivero-Hinojosa S, Kang S, Lobanenko VV, et al. Testis-specific transcriptional regulators selectively occupy BORIS-bound CTCF target regions in mouse male germ cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41279.
- [35] Schwarzenbach H, Eichelscher C, Steinbach B, et al. Differential regulation of MAGE-A1 promoter activity by BORIS and Sp1, both interacting with the TATA binding protein [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 796.
- [36] Kang Y, Hong JA, Chen GA, et al. Dynamic transcriptional regulatory complexes including BORIS, CTCF and Sp1 modulate NY-ESO-1 expression in lung cancer cells [J]. *Oncogene*, 2007, 26: 4394-4403.
- [37] Tabach Y, Kogan-Sakin I, Buganim Y, et al. Amplification of the 20q chromosomal arm occurs early in tumorigenic transformation and may initiate cancer [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e14632.
- [38] Liu Q, Chen K, Liu Z, et al. BORIS up-regulates OCT4 *via* histone methylation to promote cancer stem cell-like properties in human liver cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2017, 403: 165-174.
- [39] Renaud S, Pugacheva EM, Delgado MD, et al. Expression of the CTCF-paralogous cancer-testis gene, brother of the regulator of imprinted sites (BORIS), is regulated by three alternative promoters modulated by CpG methylation and by CTCF and p53 transcription factors [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: 7372-7388.
- [40] Yoon SL, Roh YG, Chu IS, et al. A polymorphic minisatellite region of BORIS regulates gene expression and its rare variants correlate with lung cancer susceptibility [J]. *Exp Mol Med*, 2016, 48: e246.
- [41] Zhao J, Wang Y, Liang Q, et al. MAGEA1 inhibits the expression of BORIS *via* increased promoter methylation [J]. *J Cell Sci*, 2019, 132: jcs218628.
- [42] Woloszynska-Read A, James SR, Link PA, et al. DNA methylation-dependent regulation of BORIS/CTCF expression in ovarian cancer [J]. *Cancer Immun*, 2007, 7: 21.
- [43] Xian L, Xiong Y, Qin L, et al. Jun/Fos promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by enhancing BORIS promoter activity [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2024, 169: 106540.
- [44] Huang Y, Xian L, Liu Z, et al. AMPK α 2/HNF4A/BORIS/GLUT4 pathway promotes hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis in low glucose microenvironment [J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 203: 115198.
- [45] Makani VKK, Mendonza JJ, Edathara PM, et al. BORIS/CTCF expression activates the TGF β signaling cascade and induces Drp1 mediated mitochondrial fission in neuroblastoma [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 176: 62-72.
- [46] Takebe N, Miele L, Harris PJ, et al. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2015, 12: 445-464.
- [47] Garikapati KR, Patel N, Makani VKK, et al. Down-regulation of BORIS/CTCF efficiently regulates cancer stemness and metastasis in MYCN amplified neuroblastoma cell line by modulating Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484: 93-99.
- [48] Zuo BW, Yao WX, Fang MD, et al. Boris knockout eliminates AOM/DSS-induced *in situ* colorectal cancer by suppressing DNA damage repair and inflammation [J]. *Cancer Sci*, 2023, 114: 1972-1985.
- [49] Zhang Y, Song Y, Li C, et al. Brother of regulator of imprinted sites inhibits cisplatin-induced DNA damage in non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20: 251.
- [50] Risinger JI, Chandramouli GV, Maxwell GL, et al. Global expression analysis of cancer/testis genes in uterine cancers reveals a high incidence of BORIS expression [J]. *Clin Cancer*

- Res, 2007, 13: 1713-1719.
- [51] Cheema Z, Hari-Gupta Y, Kita GX, et al. Expression of the cancer-testis antigen BORIS correlates with prostate cancer [J]. *Prostate*, 2014, 74: 164-176.
- [52] Okabayashi K, Fujita T, Miyazaki J, et al. Cancer-testis antigen BORIS is a novel prognostic marker for patients with esophageal cancer [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103: 1617-1624.
- [53] Chen K, Huang W, Huang B, et al. BORIS, brother of the regulator of imprinted sites, is aberrantly expressed in hepatocellular carcinoma [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2013, 17: 160-165.
- [54] Zhao R, Chen K, Zhou J, et al. The prognostic role of BORIS and SOCS3 in human hepatocellular carcinoma [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96: e6420.
- [55] He J, Huang Y, Liu Z, et al. Hypomethylation of BORIS is a promising prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma [J]. *Gene*, 2017, 629: 29-34.
- [56] Woloszynska-Read A, Zhang W, Yu J, et al. Coordinated cancer germline antigen promoter and global DNA hypomethylation in ovarian cancer: association with the BORIS/CTCF expression ratio and advanced stage [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 2170-2180.
- [57] Akhtar MS, Akhter N, Talat A, et al. Association of mutation and expression of the brother of the regulator of imprinted sites (BORIS) gene with breast cancer progression [J]. *Oncotarget*, 2023, 14: 528-541.
- [58] El-Sharkawy NM, Radwan WM, Essa ES, et al. Increased expression of brother of the regulator of imprinted sites in peripheral blood neutrophils is associated with both benign and malignant breast lesions [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2017, 92: 355-360.
- [59] Yoon SL, Kim DC, Cho SH, et al. Susceptibility for breast cancer in young patients with short rare minisatellite alleles of BORIS [J]. *BMB Rep*, 2010, 43: 698-703.
- [60] Kim TN, Kim WT, Jeong MS, et al. Short rare minisatellite variant of BORIS-MS2 is related to bladder cancer susceptibility [J]. *Genes Genomics*, 2019, 41: 249-256.
- [61] Fang M, Song Y, Ren J, et al. Atractyloside mimics BORIS knockdown to induce DNA damage in colorectal cancer cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11: 3286-3293.
- [62] Buoncervello M, Borghi P, Romagnoli G, et al. Apicidin and docetaxel combination treatment drives CTCFL expression and HMGB1 release acting as potential antitumor immune response inducers in metastatic breast cancer cells [J]. *Neoplasia*, 2012, 14: 855-867.
- [63] Yadav S, Bhagat SD, Gupta A, et al. Dietary-phytochemical mediated reversion of cancer-specific splicing inhibits Warburg effect in head and neck cancer [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19: 1031.
- [64] Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, et al. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15: 5323-5337.
- [65] Loukinov D, Ghochikyan A, Mkrtichyan M, et al. Antitumor efficacy of DNA vaccination to the epigenetically acting tumor promoting transcription factor BORIS and CD80 molecular adjuvant [J]. *J Cell Biochem*, 2006, 98: 1037-1043.
- [66] Mkrtichyan M, Ghochikyan A, Loukinov D, et al. DNA, but not protein vaccine based on mutated BORIS antigen significantly inhibits tumor growth and prolongs the survival of mice [J]. *Gene Ther*, 2008, 15: 61-64.
- [67] Loukinov D, Anderson AL, Mkrtichyan M, et al. A therapeutic vaccine targeting rat BORIS (CTCFL) for the treatment of rat breast cancer tumors [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 5976.
- [68] Mkrtichyan M, Ghochikyan A, Davtyan H, et al. Cancer-testis antigen, BORIS based vaccine delivered by dendritic cells is extremely effective against a very aggressive and highly metastatic mouse mammary carcinoma [J]. *Cell Immunol*, 2011, 270: 188-197.
- [69] van Amerongen RA, Tuit S, Wouters AK, et al. PRAME and CTCFL-reactive TCRs for the treatment of ovarian cancer [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1121973.
- [70] Dougherty CJ, Ichim TE, Liu L, et al. Selective apoptosis of breast cancer cells by siRNA targeting of BORIS [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 370: 109-112.
- [71] Rao GK, Makani VKK, Mendonza JJ, et al. Downregulation of BORIS/CTCFL leads to ROS-dependent cellular senescence and drug sensitivity in MYCN-amplified neuroblastoma [J]. *FEBS J*, 2022, 289: 2915-2934.
- [72] Hou CY, Lu D. Oxygen impact on genome structure and chemistry [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1744-1753.