

# BRCA1 蛋白参与 DNA 双链损伤应答\*

刘 敏 欧阳高亮 鲍仕登\*\*

(厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室  
厦门大学生命科学学院细胞生物学研究室 厦门 361005)

**摘 要** BRCA1 是乳腺癌易感基因,负责维持细胞基因组的稳定性,防止调控细胞增殖和肿瘤生长的基因突变的积累。BRCA1 基因蛋白产物结构复杂,功能多样,是细胞内重要的多功能蛋白,参与执行多种生理代谢过程。本文主要探讨了 BRCA1 蛋白应答 DNA 双链损伤过程中所伴随的一系列信号传导的历程,阐述了连续的生理生化反应中 BRCA1 蛋白所发挥的作用。

迄今为止,已知的癌症相关基因大致可以分为两类:第一类基因调控细胞增殖和肿瘤生长,如生长因子、细胞周期依赖性激酶、凋亡因子、肿瘤血管生成因子的基因,这些基因的突变或过量表达将导致细胞增殖的失控;第二类基因能维持基因组的稳定性,防止第一类基因突变的积累,包括 DNA 损伤修复基因、细胞周期检控点调控基因和维持染色体遗传高度精确性的基因。BRCA1 就属于第二类基因。

BRCA1 基因的蛋白产物主要参与 DNA 双链断裂(DNA double-strand break, DSB)损伤的应答和修复过程,调节损伤诱导的相关基因的表达和活性,引起细胞周期的阻滞和染色体构象的改变。早期研究发现 BRCA1 基因突变与家族性的乳腺癌、乳腺增生、卵巢癌、腹膜乳头状浆液癌和前列腺癌有关,其中因突变引起乳腺癌的风险高达 50% - 85%、罹患卵巢癌的风险为 20% - 40%<sup>[1]</sup>。

## 一、BRCA1 的结构特征和功能

BRCA1 蛋白由 1863 个氨基酸组成,分子量为 208kDa,其分子结构上有几个明显的特征,如图 1 所示。N 端含有一个锌指结构域,相似的结构在很多蛋白质中被找到,主要涉及损伤诱导的相关基因转录调控<sup>[2]</sup>;C 端含两个由 95 个氨基酸组成的 BRCT 结构域,主要涉及 DNA 修复和细胞周期调控<sup>[3]</sup>;中部含核内定位信号区(NLS),参与蛋白质的核内转运<sup>[4]</sup>。此外,BRCA1 中部外显子 11 编码区也是重要的功能区<sup>[5,6]</sup>。在 BRCA1 肿瘤相关的突变中,BRCT 结构域的折叠或稳定性多数发生改变,破坏了二聚体界面的形成。

由以上结构的复杂性可以看出 BRCA1 是一种多功能蛋白,在 DNA 双链损伤应答中发挥的作用



图 1 BRCA1 蛋白的结构特征  
(引自 Venkitaraman A. R. 论文<sup>[7]</sup>)

多种多样,涉及分子结构上不同功能域的活化和多种相关蛋白的调控,本文结合近年来的研究进展,对 BRCA1 参与 DNA 损伤应答的多重生物学效应作一综述。

## 二、BRCA1 参与细胞 DNA 损伤应答反应过程

双链断裂(DSB)是细胞内主要的 DNA 损伤,通常是由外源性的离子辐射、化疗药剂和内源性的氧自由基、染色体胁迫等因素造成的。损伤一旦发生,细胞内的感受器迅速识别损伤位点,并将损伤信号通过信号传导级联反应传递到一系列下游效应分子上,引起细胞周期的停滞,改变涉及 DNA 修复的基因的转录和转录后的活性。在特殊情况下,如果损伤严重到无法修复的程度,将引发细胞凋亡。

DNA 损伤后,许多因子迅速向核区汇集,组蛋白 H2AX 就是损伤早期出现在断裂位点上的因子之一。损伤发生后的 1-3 分钟内 H2AX 第 139 位丝氨酸大量磷酸化,使得损伤信号传导因子和修复因子易于富集<sup>[8]</sup>。目前认为磷脂酰肌醇激酶家族成员 PI3K、DNA-PK、ATM、ATR 都有可能涉及此过程,而在这一过程中起主要作用的是 ATM 和 ATR。ATM 主要应答离子辐射引起的损伤,而 ATR 通过另外一条平行的细胞信号通路介导了紫外线辐射的快速应答。

\* 本文得到国家自然科学基金(No. 30170463)资助。

\*\* 通讯作者。E-mail: sdbao26@yahoo.com

ATM 是一种多功能蛋白激酶,其下游的靶蛋白包括 BRCA1、p53、Mdm2、Chk1/2、Nbs1 和 c-Abl,磷酸化这些靶蛋白将产生相应的生物学效应。ATM 能使 BRCA1 数个 C 端的丝氨酸磷酸化,如用丙氨酸替换其中的两个(Ser1423 和 Ser1524),BRCA1 在辐射损伤应答中的功能将丧失<sup>[9]</sup>。而 ATM 缺失的细胞中 BRCA1 不能正常磷酸化,将诱发染色体组的不稳定和癌变倾向。

当损伤信号传递到 BRCA1 时,其上多个不同结构域开始活化,并通过与不同的蛋白分子相互作用进入各自的信号传导通路,最终到达相应的效应分子使细胞产生应答,如图 2 所示。

### 1. 细胞周期检控点的活化和周期阻滞

细胞周期进程的延迟是通过活化三个细胞周期检控点(包括 G1/S、S 期、G2/M 检控点)实现的,这些监控机制确保了基因组的完整性,使损伤的 DNA 模板在修复完成前不至于被分配到子细胞中。近来的研究表明 BRCA1 在这些过程中均起重要作用,其信号传导途径如图 3 所示。

BRCA1 上有多个磷酸化位点,其作用各不相同。ATM 的靶位点为第 1387、1423 和 1524 位丝氨酸,BRCA1 第 1423 位丝氨酸辐射突变诱导 G2/M 检控点丧失却不影响 S 期检控点,而第 1387 位丝氨酸突变后作用则相反。另外,后者不会影响辐射后细胞的存活,因此可能是 BRCA1 其他功能的改变影响了 DNA 损伤后的细胞存活能力<sup>[10]</sup>。

ATM 对细胞的活化作用至少部分是通过下游

效应子 Chk2 激酶介导的。Chk2 能直接磷酸化 BRCA1 第 988 位丝氨酸,由置换实验证实这种修饰在离子辐射后的细胞应答中很重要。然而,DNA 损伤时通常不在此位点发生突变而是伴随 BRCA1 的再分布,因此 Chk2 磷酸化作用影响 BRCA1 功能的发挥可能是通过改变 BRCA1 细胞内的定位实现的<sup>[11]</sup>。

BRCA1 能调控 G2/M 转变中关键性蛋白 Cdc25C 和 Cdc2/cyclin B 激酶表达、磷酸化和细胞中的定位<sup>[12]</sup>。G2 期与 M 期转换由 Cdc2/cyclin B 激酶抑制位点——第 15 位酪氨酸的磷酸化调控。在表达 BRCA1 的细胞中其活性降低,辐射后 Cdc2 的磷酸化比例会增加。稳定或短暂表达的 BRCA1 也会降低 cyclin B1 蛋白浓度,而 Cdc2 蛋白浓度不改变。

Cdc2 激酶能被具双重特异性磷酸酶活性的 Cdc25C 活化,切除 Cdc2 第 14 位苏氨酸和第 15 位酪氨酸上的磷酸可使细胞进入分裂期<sup>[13]</sup>。Cdc25C 的活化也是由蛋白浓度的改变、亚细胞定位和磷酸化状态决定的。BRCA1 的表达能使 Cdc25C 浓度降低,并影响其细胞内的定位。正常情况下 Cdc25C 分布在核内和细胞质中,BRCA1 表达后 Cdc25C 转移到细胞质中<sup>[14]</sup>。Cdc25C 活性的抑制是通过第 216 位丝氨酸的磷酸化,此过程通常由 Chk1 和/或 hCds1/Chk2 激酶执行<sup>[13,15]</sup>,但 hCds1/Chk2 活化和离子辐射后其磷酸化比例增加与 BRCA1 的表达之间无依赖性<sup>[16]</sup>。虽然 BRCA1 也能调控 hCds1/

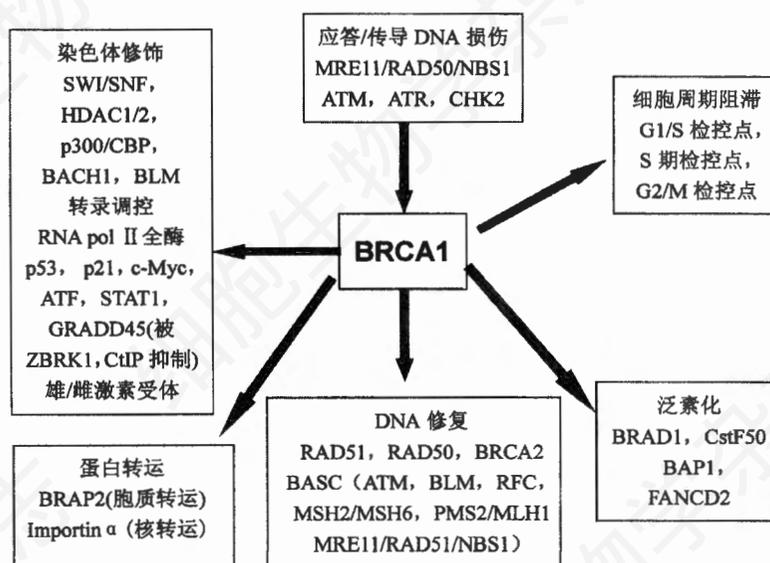


图 2 BRCA1 涉及的 DNA 损伤应答反应(改自 Venkitaraman A. R. 论文<sup>[7]</sup>)

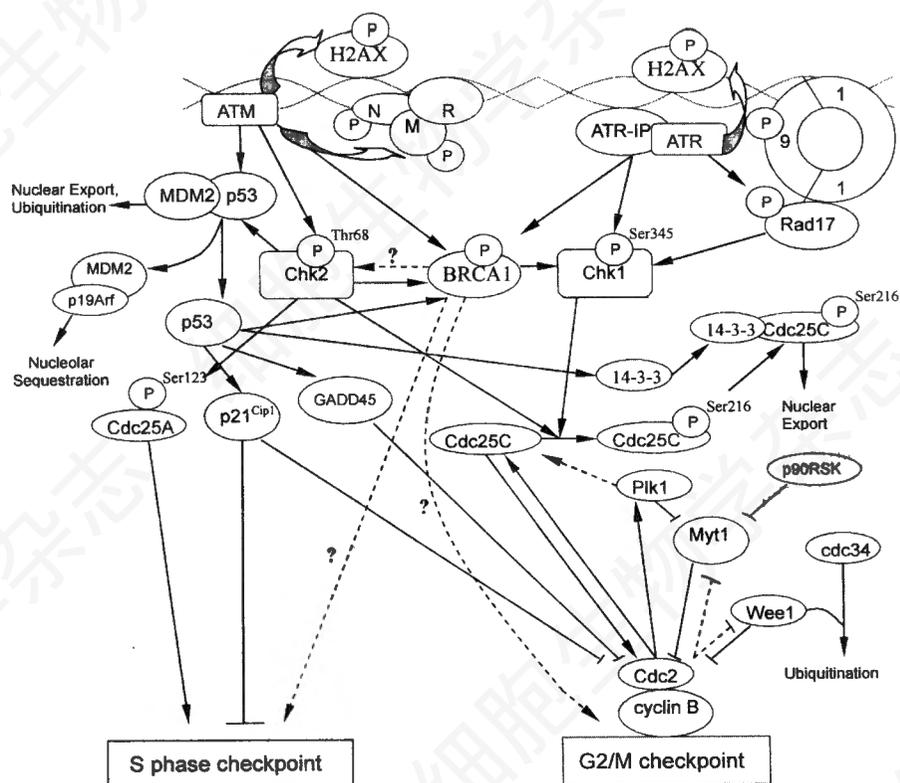


图3 BRCA1 涉及的细胞周期检控点活化途径(自绘)

Chk2 活性,但 hCds1/Chk2 不可能单独应答 BRCA1 介导的 G2/M 检控点活化,因而更有可能是通过 Chk1 实现此项功能。BRCA1 和 Chk1 定位于相同的核区域,虽然  $\gamma$  辐射能使之分散,但两种蛋白仍维持空间结构的重叠分布。BRCA1 表达诱导 Chk1 激酶活化并增加 Cdc25C 的磷酸化,同时离子辐射后 Chk1 激酶活化仅在 BRCA1 蛋白表达时出现。Cdc25C 磷酸化后能被 14-3-3 家族的蛋白结合,从而使 Cdc25C 从核内释放出来。在表达 BRCA1 的细胞中,14-3-3 家族蛋白将全面增加,结合、调控磷酸化的 Cdc2 和 Cdc25C 细胞内定位的 14-3-3 $\delta$  蛋白也特异性增加。14-3-3 家族蛋白阻止了细胞质内 Cdc25C 和 Cdc2/cyclin B 激酶的磷酸化。另一个 Cdc2/cyclin B 激酶抑制剂 Wee1 激酶也会与 Cdc2 第 15 位酪氨酸磷酸化的比例同步增加。此外,其他 Cdc2 调控子如 Myt1 和 PLK 的活性也会发生变化<sup>[17]</sup>。这些变化都发生辐射后一小时之内,因此不可能是细胞 G2/M 转换过程中二次积累的。

总之, BRCA1 是将 DNA 损伤信号传给了 Chk1,从而调控了 Cdc2 激酶、Cdc25C 和 Wee1,并和 14-3-3 蛋白一起调控了细胞周期的不同阶段。此外, BRCA1 在检控点完整的细胞中调控细胞周期可能就是在行使其肿瘤抑制子的功能。虽然 BR-

CA1 自身不直接作用于细胞转化,但缺失后会使得细胞绕过 G2/M 检控点,积累 DNA 损伤。

## 2. DNA 损伤修复

哺乳动物细胞修复 DSB 有数种方式,主要是非同源末端结合(non-homologous end-joining, NHEJ)、同源重组(homologous recombination, HR)和单链退火(single-strand annealing, SSA)<sup>[18]</sup>。NHEJ 不考虑末端序列的同源性直接连接断裂的 DNA 片段,因此容易造成潜在的错误倾向,它主要依赖于 DNA 依赖性蛋白激酶(DNA-PK)与辅助分子 Ku70 和 Ku80 共同作用;单链退火则局限于 DSB 中某条链伸出的短的单链和另一同源双链 DNA 配对后不经过重组直接连接,当末端交错的单链小于 30bp 时则易引起序列的缺失或重排。而同源重组则是一种保守的无误修复,遗传信息在姐妹染色单体间发生了交换,重组酶 RAD51 在此过程发挥了重要的作用<sup>[19]</sup>。

RAD51 能有效地包被 ssDNA 形成规则的核蛋白纤丝,侵入同源的 DNA 双链,进行配对并启动 DNA 分子间的交换反应<sup>[20]</sup>。研究显示 BRCA1 蛋白上 781-1064 残基包含的区域涉及与 RAD51 的相互作用<sup>[21]</sup>,然而细胞提取物的免疫共沉淀反应证实其相互作用很弱,并且两者是否能直接结合在一

起至今仍不清楚。有证据表明是另一种乳腺癌易感基因 BRCA2 蛋白产物介导了 BRCA1 与 RAD51 之间的相互作用。BRCA2 上 8 个特异的高度保守的 BRC 重复序列是结合 RAD51 的核心区域,并且它与 BRCA1 有相似的亚细胞的定位和表达特征, DNA 损伤时向相同的区域汇集。BRCA2 还可通过 BRCA1 上 1314-1863 残基包含的区域与其结合在一起<sup>[22]</sup>,负责将 RAD51 从合成的部位向活化部位转运,并调节 RAD51 的酶活性。

此外, BRCA1 还能通过其上所含的多个结构域与其他修复相关蛋白的作用对 DNA 的 DSB 损伤进行重组修复。例如, BASC 是由 BRCA1 和一系列相关蛋白组成的基因组监控复合体能高效修复 DNA 损伤, 它包括 MRE11/RAD50/NBS1 修复复合体(NMR), 错配修复的蛋白 MSH2/MSH6 和 PMS2/MLH1 异二聚体, DNA 损伤信号激酶 ATM, BLM 螺旋酶和 RFC<sup>[23]</sup>。NMR 复合体能感应 DSB 的产生并将信号向下游传导, BRCA1 通过直接结合 DNA, 抑制了由 MRE11 介导的 NMR 复合体在 DSB 位点切除的单链 DNA 的核酸外切酶活性, 从而调控这条途径。

### 3. 染色质重构和修饰及相伴的转录活性的改变

BRCA1 能通过 C 末端结构域与染色质和 DNA 结构酶相互作用, 使核小体结构发生变化, 诱导相关基因转录活性的改变。BRCA1 许多突变的致癌倾向是由于 BRCA1 与染色质修饰蛋白亲和性降低造成的, 因此, 染色质重构可能在 BRCA1 介导的肿瘤抑制中发挥作用。

首先, BRCA1 能与组蛋白修饰酶 p300 和 HDAC 1/2<sup>[24-26]</sup> 及 ATP 依赖性的染色质重构复合体(hSNF/SWI)<sup>[27]</sup> 相互作用, 调控组蛋白的乙酰化和去乙酰化反应。p53 介导的 BRCA1 协同活化作用就是通过 hSNF/SWI 复合体完成的。其次, BRCA1 能与 DNA 螺旋酶 BACH1<sup>[28]</sup> 和 RecQ 螺旋酶家族成员 BLM<sup>[23]</sup> 相互作用, 改变染色体的折叠和三维空间构象, 影响染色体上结构域的拓扑异构形式, 参与 DNA 修复调控。

另外, BRCA1 还可通过 RNA 螺旋酶 A 调控 RNA 聚合酶 II 全酶的转录活性<sup>[29]</sup>, 并与很多具特异位点的转录因子如 p53<sup>[30]</sup>、c-Myc<sup>[23]</sup>、ATF1<sup>[31]</sup>、STAT1<sup>[32]</sup> 和雌激素受体<sup>[33]</sup> 等相互作用调节它们的基因活性。而且, BRCA1 也可直接作用于这些转录因子下游靶基因如 p53 信号传导途径中的细胞周期

依赖性激酶抑制因子 p21<sup>WAF1/CIP1</sup><sup>[34]</sup> 和肿瘤抑制因子 GADD45<sup>[35]</sup>。例如, c-Myc 能通过 GADD45 启动子上的 C/EBP 序列抑制 GADD45 的表达<sup>[36]</sup>, 而 BRCA1 在诱导 GADD45 表达过程中可能通过某种方式解除了 c-Myc 的抑制作用。BRCA1 也能通过与细胞内广泛表达的转录因子 Oct-1 和 NF-YA 直接作用活化 GADD45 启动子<sup>[37]</sup>, 然而新近发现 BRCA1 同时也能与含 6 个锌指结构和一个 N 端 KRAB 结构域的 ZBRK1 转录因子形成共抑制复合体下调 GADD45 的表达<sup>[38]</sup>。显然作为转录调控机制中的核心组分, BRCA1 在应答 DNA 损伤的过程表现出极其复杂的功能, 有时甚至起完全相反的作用。

因此, DNA 损伤后 BRCA1 介导的转录调控作用存在某种机制, 即 BRCA1 没有单独、直接地与 DNA 发生相互作用, 而是作为 DNA 损伤应答途径中特异的下游靶基因转录的共活化子或共抑制子行使功能。例如, 离子辐射后, BRCA1 与转录共抑制因子 CtIP 都能被 ATM 激酶磷酸化, 导致 BRCA1 从 CtIP 上解离, 降低 CtIP 产生的转录抑制作用<sup>[39]</sup>。

### 4. 泛素化过程

泛素化是细胞内重要的生化过程, 通过 E3 泛素连接酶识别特异的底物, 降解信号传导过程中富集的关键性的调控蛋白, 维持细胞内的代谢和生理平衡。BRCA1 通过与泛素或类泛素分子的结合对蛋白底物的寿命和活性产生极大的影响且效果不尽相同, 这也反映了 BRCA1 功能多样性的特点。

新生的信使 RNA 必须在核酸内切酶的作用下去除 3' 端的 polyA 尾巴, 然而在离体条件下 DNA 的损伤能短暂而强烈地抑制这个过程。研究表明一种新的蛋白 BARD1 能通过其 N 末端 RING 锌指结构与 BRCA1 结合形成复合体并和多聚腺苷酸化因子 CstF50 一起执行抑制效应<sup>[40,41]</sup>。其具体的作用机制暂不清楚, 但 BARD1/BRCA1 异二聚体的泛素连接酶活性可能涉及此过程, 因为其执行了降解 RNA 加工蛋白的功能。像其他含 RING 锌指结构的蛋白一样, 到目前为止并未确定 BARD1/BRCA1 复合体 E3 泛素连接酶活性的特异性<sup>[42,43]</sup>。BARD1/BRCA1 泛素连接酶活性的一个可能的靶蛋白是范可尼综合症贫血蛋白 FANCD2。DNA 损伤后 FANCD2 和 BRCA1 一起重新分布到局部区域, FANCD2 单独泛素化<sup>[44]</sup>。然而 BRCA1 的磷酸化或其他诱因也能改变其底物特异性, 针对不同的刺

激物引发特异的生理应答。有趣的是, BRCA1 也能结合泛素水解酶 BAP1 阻碍蛋白的降解<sup>[45]</sup>。因为 BAP1 和 BARD1 都能结合 BRCA1 上的 RING 锌指结构域, 所以竞争性地调控了泛素介导的蛋白降解过程。

总之, DNA 损伤发生后, BRCA1 迅速产生应答, 引起细胞周期的阻滞, 使得细胞能有充足的时间完成修复过程; 同时 BRCA1 直接或间接地参与了 DNA 的修复过程, 并作为转录调控因子, 改变染色体的构象, 调控损伤诱导的相关基因的表达和活性, 以协同参与细胞周期的调控和执行 DNA 的修复功能; 另外, BRCA1 还可通过参与泛素化过程降解多余的效应分子, 并且在修复完成后, 恢复细胞内的代谢和生理平衡。

虽然经历 10 余年的研究, 关于 BRCA1 蛋白应答 DNA 损伤多阶段效应的过程已经被普遍认知, 但是其精确的调控机制仍需进一步探讨。随着认识的逐步深入, 寻找这些过程中的关键靶分子将为治疗与 BRCA1 相关的癌症提供了新的思路。针对这些过程中关键性的事件设计相应的治疗方案, 将为 BRCA1 相关的癌症治疗提供广阔的前景。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Novak k. , 2002, *Nature Reviews Cancer* , **2**: 483.
- [ 2 ] Wu L C. , et al. , 1996, *Nat Genet* , **14**: 430 - 440.
- [ 3 ] Koonin E V. , et al. , 1996, *Nat Genet* , **13**: 266 - 268.
- [ 4 ] Heidi G E. , 2001, *Hum. Mol. Genet.* , **10**: 1995 - 2011.
- [ 5 ] Hogervorst F B L. , et al. , 1995, *Nature Genet* , **10**: 208 - 212.
- [ 6 ] Xu X. , et al. , 1999, *Molec. Cell* , **3**: 389 - 395.
- [ 7 ] Venkitaraman A R. , 2001, *J. Cell Sci.* , **114**: 3591 - 3598.
- [ 8 ] Burma S. , et al. , 2001, *J. Biol. Chem.* , **276**: 42462 - 42467.
- [ 9 ] Cortez D. , et al. , 1999, *Science* , **286**: 1162 - 1166.
- [ 10 ] Xu B. , et al. , 2002, *Cancer Res.* , **62**: 4588 - 4591.
- [ 11 ] Lee J S. , et al. , 2000, *Nature* , **404**: 201 - 204.
- [ 12 ] Yarden R I. , et al. , 2002, *Nat Genet* , **30**: 285 - 289.
- [ 13 ] Furnari B. , et al. , 1997, *Science* , **277**: 1495 - 1497.
- [ 14 ] Lopez-Girona A. , et al. , 1999, *Nature* , **397**: 172 - 175.
- [ 15 ] Sanchez Y. , et al. , 1997, *Science* , **277**: 1497 - 1501.
- [ 16 ] Matsuoka S. , et al. , 1998, *Science* , **282**: 1893 - 1897.
- [ 17 ] Khanna K K. , et al. , 2001, *Nat Genet* , **27**: 247 - 254.
- [ 18 ] Venkitaraman A R. , 2002, *Cell* , **108**: 171 - 182.
- [ 19 ] Kowalczykowski S C. , 2000, *Trends Biochem. Sci.* , **25**: 156 - 165.
- [ 20 ] Baumann P. , et al. , 1996, *Cell* , **87**: 757 - 766.
- [ 21 ] Scully R. , et al. , 1997, *Cell* , **88**: 265 - 275.
- [ 22 ] Chen J. , et al. , 1998, *Mol. Cell* , **2**: 317 - 328.
- [ 23 ] Wang Y. , et al. , 2000, *Genes & Dev.* , **14**: 927 - 939.
- [ 24 ] Neish A S. , et al. , 1998, *Nucleic Acids Res.* , **26**: 847 - 853.
- [ 25 ] Yarden R I. , et al. , 1999, *PNAS* , **96**: 4983 - 4988.
- [ 26 ] Pao G M. , et al. , 2000, *PNAS* , **97**: 1020 - 1025.
- [ 27 ] Bochar D A. , et al. , 2000, *Cell* , **102**: 257 - 265.
- [ 28 ] Cantor S B. , et al. , 2001, *Cell* , **105**: 149 - 160.
- [ 29 ] Anderson S F. , et al. , 1998, *Nat Genet* , **19**: 254 - 256.
- [ 30 ] Ouchi T. , et al. , 1998, *PNAS* , **95**: 2302 - 2306.
- [ 31 ] Houvras Y. , et al. , 2000, *J. Biol. Chem.* , **275**: 36230 - 36237.
- [ 32 ] Ouchi T. , et al. , 2000, *PNAS* , **97**: 5208 - 5213.
- [ 33 ] Fan S. , et al. , 1999, *Science* , **284**: 1354 - 1356.
- [ 34 ] Somasundaram K. , et al. , 1997, *Nature* , **389**: 187 - 190.
- [ 35 ] Jin S. , et al. , 2000, *Oncogene* , **19**: 4050 - 4057.
- [ 36 ] Amundson S A. , et al. , 1998, *Oncogene* , **17**: 2149 - 2154.
- [ 37 ] Fan W. , et al. , 2002, *J. Biol. Chem.* , **277**: 8061 - 8067.
- [ 38 ] Zheng L. , et al. , 2000, *Mol. Cell* , **6**: 757 - 768.
- [ 39 ] Li S. , et al. , 2000, *Nature* , **406**: 210 - 215.
- [ 40 ] Kleiman F E. , et al. , 1999, *Science* , **285**: 1576 - 1579.
- [ 41 ] Kleiman F E. , 2001, *Cell* , **104**: 743 - 753.
- [ 42 ] Hashizume R. , et al. , 2001, *J. Biol. Chem.* , **276**: 14537 - 14540.
- [ 43 ] Ruffner H. , et al. , 2001, *PNAS* , **98**: 5134 - 5139.
- [ 44 ] Garcia-Higuera I. , 2001, *Mol. Cell* , **7**: 249 - 262.
- [ 45 ] Jensen D E. , 1998, *Oncogene* , **16**: 1097 - 1112.

## 真核细胞的核纤层及其相关结构的研究\*

李艺松 李俊纲

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

**摘 要** 核纤层由 A 和 B 两种核纤层蛋白及核纤层蛋白结合蛋白组成。越来越多的证据显示: A、B 两种核纤层蛋白与内核膜蛋白在细胞完成各项生理功能过程中发挥着重要的作用, 如: 细胞核的装配、遗传物质的复制、转录以及维持细胞结构和

\* 国家自然科学基金(No. 30270160)资助项目。  
联系人: E-mail: fkgu@bio.ecnu.edu.cn