

生化科技研究所微生物與細胞專題討論

題目: The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress

作者: Joanna R. Morris, Chris Boutell, Melanie Keppler, Ruth Densham, Daniel Weekes, Amin Alamshah, Laura Butler, Yaron Galanty, Laurent Pangon, Tai Kiuchi, Tony Ng & Ellen Solomon

文章來源: *Nature* Vol 462, 886-891, 2009

演講人: Han-Ting Chen 陳菡亭 R99B22046

指導老師: Li-Kwan Chang, PhD 張麗冠 博士

演講日期: December 27th, 2010

演講地點: The 6th Classroom

摘要

BRCA1 為泛素連接酶、參與了 DNA 受損反應，其突變和乳癌、卵巢癌有高度相關[1]，但其中的調控機制尚未明瞭。SUMO (small ubiquitin-like modifier) 是一種轉譯後修飾，本篇研究發現 BRCA1 在受到 genotoxic stress 後會被 SUMO 修飾，並且和 SUMO1、SUMO2/3 以及 Ubc9 (SUMO-E2 conjugating enzyme) 共存 (co-localize) 在 DNA 受損之處。PIAS SUMO 連接酶 (E3 ligase) 會和 BRCA1 共存並將其進行 SUMO 修飾，並經由 SUMO 修飾調控 BRCA1 的泛素連接酶活性。在生物體外，BRCA1/BARD1 heterodimer 經 SUMO 修飾後，其泛素連接酶活性大幅提升，故稱之為 SUMO-regulated ubiquitin ligase (SRUbL)。除此之外，RNF8 (一種 UbL) 增加後，PIAS SUMO 連接酶可使一群修補雙股 DNA 斷裂的蛋白質徹底聚積，精確地進行 DNA 修復。本篇研究證實在哺乳動物中，SUMO 修飾在 DNA 受損反應中扮演重要的角色。

Keywords: SUMO、BRCA1、PIAS SUMO ligase、SRUbL、Ubc9

前言

◆ 本研究之重要性

本研究發現 BRCA1 是一種受到 SUMO 修飾所調控的泛素連接酶 (SRUbL)，當細胞受到 genotoxic stress 後 BRCA1 會被 PIAS 進行 SUMO 修飾，並影響其泛素連接酶活性。

◆ 前人作過的研究

BRCA1 有許多轉譯後修飾，包括磷酸化、泛素化以及本篇研究所提到的 SUMO 修飾，另外 BRCA1 也具有泛素連接酶活性[2]，但其酵素受質與及作用機制尚未明瞭。在脊椎動物中 SUMO 有三個 isoform: SUMO1、SUMO2/3 (只有三個

胺基酸差異)，先前有研究發現 Ubc9 和 SUMO E3 ligase 參與了 DNA 受損反應 [3]。加上一些傾向演變成乳癌或卵巢癌的 *BRCA1* 突變，會抑制兩個 *BRCA1* 受 SUMO 修飾後調控的特性；泛素連接酶活性以及聚積在 DNA 受損處 [4]，故推論 SUMO 修飾和癌症的演變有高度的相關性。

◆ 本研究欲完成之項目

PIAS 為 SUMO E3 ligase，先前有研究發現它們與 DNA 受損反應有關 [5]，且分佈於核內，故本篇研究探討 PIAS SUMO E3 ligase 和 *BRCA1* 的交互作用及其中的機制。

材料與方法

◆ 細胞株與質體

293T 細胞由 293 細胞衍生，為人類腎臟上皮細胞，轉染腺病毒 E1A 基因，同時表達 SV-40 病毒的大 T 抗原轉型成不朽化的細胞株；293T 細胞被廣泛應用於轉染以表現各種目標蛋白，或是用以包裝病毒。HeLa 為實驗用增殖表皮癌細胞，源自一位美國婦女的子宮頸癌細胞株，常用作癌症模式細胞及研究細胞訊息傳導。此細胞株經人類乳突病毒第 18 型 (Human papillomavirus 18) 轉化，可以無限分裂下去，且跟其他癌細胞相比，增殖異常迅速。*BRCA1*、*SUMO1*、*SUMO-GA*、*Ub*、*BARD1* 以 myc-pcDNA3.1 或具有 RFP 的 pDNA3.1 為載體，*BRCA1*、*UBC9* 以具有 GFP 的 p-EGFP 為載體，Flag-His-MMS21 接進事先具有 3xFlag-His tag 的 pCH-NCX，而 PIAS4 接進具有 3xFlag-Stag 的 pCDNA3.1，最後以 site-directed 突變技術產生突變株。

◆ 蛋白質純化

將表現 6xHis tagged SUMO 的 HeLa 細胞以 lysis buffer (8M urea, 0.1 M

$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0.01 M Tris-HCl, pH 6.3, 10 mM β -mercaptoethanol, 5 mM

imidazole plus 0.2% Triton-X-100) 回溶，sonicate 打破後與 50 μl Ni^{2+} Talon

agarose beads 在 4°C 作用隔夜，再用 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

buffer 流洗得到純蛋白。

- ◆ **螢光標定與共軛焦顯微鏡**

蛋白質分別用 GFP 或 RFP 標定(詳見質體)，或者用利用帶了發光集團的二抗進行免疫螢光染色後以共軛焦顯微鏡觀察。

- ◆ **螢光生命週期顯微術 (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM)**

螢光分子受光激發後可以透過散發螢光返回基態，不同的螢光會展現不同的生命週期特性，可藉由 FLIM 辨認不同生物分子；但激態分子也可能將能量傳遞給別的螢光分子，稱為螢光共振能量遷移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)，FRET 的發生需要許多限制條件，包括供體和受體分子距離(約 10-100 Å)。當 FRET 發生時因為有部分能量轉移給紅色螢光分子，使綠色螢光的生命週期縮短，本研究利用多光子螢光生命週期顯微系統觀察 FRET[6]，藉此確認分子間交互作用。

- ◆ **免疫沉澱與西方墨點法**

使用 Ni²⁺ beads 抓下 6xHis tagged SUMO，若有其他蛋白質與 6xHis tagged SUMO 結合，則可被西方墨點法偵測到。

結果與討論

- ◆ **DNA 損傷引發 BRCA1 受到 SUMO 修飾**

用 genotoxic agents(irradiation, cisplatin,hydroxyurea)處理後，DNA 受損處會有 γ -H2AX 和 BRCA1 聚集，作者發現 SUMO1 與 SUMO2/3 與其共存。同時(GFP-)BRCA1 和(RFP-)SUMO1 產生螢光共振能量遷移(FRET)，表示兩蛋白質交互作用大幅增加；而發生 FRET 的位置，與 γ -H2AX 的分佈位置一致，表示 BRCA1-SUMO 交互作用發生在有 γ -H2AX 的染色體附近，但是當作者將 SUMO 突變(GG→GA)，降低 BRCA1-SUMO 交互作用後會造成 FRET 減少。將細胞處理後對內生的 BRCA1 進行免疫沉澱，隨後利用西方點墨法偵測到 SUMO，表示 BRCA1 會和 SUMO 或與某些和 SUMO 連接的蛋白質有交互作用，作者最後找到 GFP-Ubc9(SUMO E2 ligase)和 γ -H2AX、BRCA1 皆有共存現象，而且與 RFP-BRCA1 發生 FRET。由這些現象可知，在哺乳動物中，SUMO 修飾參與了 DNA 受損反應，作者在這發現了 Ubc9 和受 SUMO 修飾的 BRCA1。

- ◆ **PIAS SUMO 連接酶對 BRCA1 進行 SUMO 修飾**

用 HU 處理細胞後，作者發現以 siRNA 抑制 PIAS1 和 PIAS4 時，會降低 BRCA1 受到 SUMO1、SUMO2 修飾的情形。表現外源 PIAS1、PIAS4 時，不論是 GFP-BRCA1 和 RFP-SUMO1 間的 FRET 情形，或 His-SUMO-conjugated BRCA1 量都會增加，代表增加外源 PIAS1、PIAS2 可以增加 SUMO-BRCA1 交互作用。另外，抑制 PIAS1 和 PIAS4 表現時，會減少 BRCA1 和 γ -H2AX 共存的能力。加上 SUMO 突變(GG→GA)，降低 BRCA1-SUMO 交互作用後會抑制 BRCA1 聚集到正常位置。這些結果表示 BRCA1 必須經由 PIAS1 和 PIAS4 SUMO ligase 的調控，才能正常聚集到 DNA 受損處，但是作者也發現 BRCA1 的聚集還間

接受到一些早期聚集在受損處的蛋白質調控。

◆ **BRCA1 的泛素連接酶活性會受 SUMO 修飾所調控**

先前的研究發現 BRCA1 參與了 FK2 泛素化的路徑[7]，但原本 Ub-FK2 聚集在 γ -H2AX 或 BRCA1 附近的現象，會在 PIAS1 和 PIAS4 的表現受抑制時消失，代表在缺乏 PIAS1 和 PIAS4 的情況下，BRCA1 的泛素連接酶活性受到抑制。另外將 BRCA1 上受 SUMO 修飾的位置(Ψ KxE)突變後，K119R/E121A 兩個突變株可降低 GFP-BRCA1 和 RFP-SUMO 的交互作用，同時降低 BRCA1 對 FK2 進行泛素化的能力，且將 BRCA1 用來與 Ub E2 結合的 RNIG domain[8]進行突變(C61G)也可得到相同的效果，應證了 BRCA1 的泛素連接酶活性會受 SUMO 修飾影響。實際的 BRCA1/BARD1 heterodimer[9]經 SUMO 修飾後，其 UbL 活性大幅提升。

參考文獻

1. Morris, J.R., et al., *Genetic analysis of BRCA1 ubiquitin ligase activity and its relationship to breast cancer susceptibility*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(4): p. 599-606.
2. Doil, C., et al., *RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins*. Cell, 2009. **136**(3): p. 435-46.
3. Zhao, X. and G. Blobel, *A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(13): p. 4777-82.
4. Morris, J.R. and E. Solomon, *BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(8): p. 807-17.
5. Mabb, A.M., S.M. Wuerzberger-Davis, and S. Miyamoto, *PIASy mediates NEMO sumoylation and NF-kappaB activation in response to genotoxic stress*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(9): p. 986-93.
6. Wallrabe, H. and A. Periasamy, *Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy*. Curr Opin Biotechnol, 2005. **16**(1): p. 19-27.
7. Sawada, H., et al., *Extracellular ubiquitination and proteasome-mediated degradation of the ascidian sperm receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1223-8.
8. Lorick, K.L., et al., *RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11364-9.
9. Hashizume, R., et al., *The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation*. J Biol Chem, 2001.

276(18): p. 14537-40.