

The Molecular Mechanisms and Physiological Roles of BRD4

Yin Liang Tao Wu*

China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu, 210009, China

Abstract

BRD4, a member of the Bromo and Extra-Terminal (BET) family, is essential for a diversity of physiological processes by binding to acetylated histones and non-histone proteins. Its aberrant functions are associated with various diseases. In this review, we summarize the molecular mechanisms of BRD4 in gene transcription and beyond, as well as their contribution to development and transcriptional memory. The roles of BRD4 in pathology, especially cancer and viral infection, are also discussed.

Keywords

BRD4; protein acetylation; gene transcription; development; cancer; viral infection

BRD4 的分子机制与生理作用

梁银 吴焘*

中国药科大学, 中国·江苏·南京 210000

摘要

BRD4 是 BET 蛋白家族的成员之一。它识别乙酰化的组蛋白和非组蛋白, 参与众多的生理过程, 因此它的不正常功能常导致多种疾病的发生发展。在这篇综述中, 我们总结了 BRD4 在基因转录调节和其他细胞过程中的分子机制, 以及这些机制在发育和转录记忆中的作用。此外我们还讨论了 BRD4 与疾病, 尤其是癌症和病毒感染的关系。

关键词

BRD4; 蛋白乙酰化; 基因转录; 发育; 癌症; 病毒感染

1 引言

赖氨酸乙酰化 (Kac) 是蛋白质中最常见的修饰之一。乙酰化的蛋白质可以被包含溴结构域 (BD) 的“阅读器”蛋白质识别。

在人类中, 有 46 种含 BD 的蛋白质基于其氨基酸序列相似性聚类为 8 个亚家族。其中之一是 BET (溴域和末端) 家族, 由四个成员组成, 即含溴结构域 2 (BRD2)、BRD3、BRD4 和溴结构域睾丸特异性蛋白 (BRDT)。每个 BET 成员都有两个同源 BD (BD1 和 BD2) 和一个将其与其他组区分开的末端 (ET) 域。BRD4 和 BRDT 有一个 C 端子模块 (CTM), 但 CTM 在 BRD2 和 BRD3 中不存在^[1]。

BRD2、BRD3 和 BRD4 存在于大多数正常组织中, 而

【作者简介】梁银 (1995-), 男, 中国江西高安人, 硕士研究生学历, 从事药理学研究。

【通讯作者】吴焘 (1984-), 男, 中国广东韶关人, 博士研究生学历, 副研究员, 从事分子生物学研究。

BRDT 在睾丸中特异性表达。其中 BRD4 由于参与了多种生理过程而受到越来越多的关注。BRD4 的功能异常与许多疾病有关。因此, 发现有效的化学物质来调节 BRD4 的活性已经引起了学术界和制药业的兴趣。在这篇综述中, 我们讨论了 BRD4 的分子机制及其在生理学和病理学中的功能的最新进展。我们认为, 彻底探究 BRD4 的功能将有助于我们设计基于机制的策略, 将 BETis 用于临床。

2 BRD4 调节基因转录

基因转录涉及起始, 延伸和终止, 每个步骤都受到严格和精细的控制。BRD4 是必不可少的转录调节因子。迄今为止的研究已经揭示了一系列与 BRD4 相互作用伙伴, 细胞通过 BRD4 可以在不同条件下将染色质上的基因转录。

2.1 BRD4 与染色质的结合

组蛋白乙酰化通常与活性基因转录相关, 是 BRD4 与染色质结合的决定因素之一。具有多个 Kac 的多肽通常比

具有单个 Kac 的多肽对 BD 具有更高的亲和力和选择性。与此相一致, BRD4 倾向于在体外结合二乙酰化的肽, 例如 H4K5acK8ac。Kac 附近的氨基酸残基和 PTM 会影响 BRD4 与乙酰化组蛋白之间的相互作用。体内研究证实了 BRD4 与乙酰化染色质的结合, 尽管 BD1 和 BD2 是同源的, 但 BD1 对乙酰化核小体的亲和力比 BD2 高。

BRD4 ChIP-Seq 研究表明, BRD4 在活性基因的调控区域富集, 例如启动子和增强子。这种分布模式与乙酰化组蛋白并不完全重叠, 表明在定义 BRD4 在染色质上的定位中还存在其他因素。BRD4 与在增强子和启动子上富集的多种转录因子 (TF) 相关联。其中一些 TF, 例如 NF κ B 和 TWIST, 被乙酰化并被 BRD4 的 BD 识别。为了与 P53 相互作用, 需要 BRD4 的 BID (富含基本残基的相互作用域) 或 PDID (磷酸化依赖性相互作用域)。尚未研究 BRD4 如何与许多其他 TF (包括 YAP / TAZ, MYC, OCT4, NANOG 和 YY1) 相互作用。

2.2 BRD4 对染色质的影响

尽管 BRD4 在许多组织中普遍表达, 但它要控制细胞和条件特异性基因的表达还需要启动子和增强子之间的协调。增强子可以刺激远距离启动子的活性。尽管还不清楚增强子如何以这种方式工作, 但是中介体复合物可能是必不可少的。中介体复合物主要定位于增强子, 桥接了谱系特异性和信号依赖的 TF 以及 RNA 聚合酶 II (RNA PolII), 使增强子与启动子接近。另外, 许多 TF 不能直接与 RNA PolIII 结合, 需要中介体复合物的组装。BRD4 是许多基因增强子上中介体复合物的组成部分。BRD4 抑制作用可从这些顺式调节区域中清除中介体复合物。

BRD4 对基因转录过程中的暂停释放是必需的。在大约 30% 的哺乳动物基因上转录 mRNA 的前 20–60 个核苷酸后, RNA PolIII 暂停。为了继续转录, pTEFb 复合物使 NELF, DSIF 和 RNA PolIII 磷酸化。细胞中存在两种形式的 pTEFb 复合物, 其中一种是包含 CYCLIN T, CDK9, HEXIM1 和 7SK snRNA 的阻抑形式。另一个是活性的, 包含 CYCLIN T, CDK9 和 BRD4。BRD4 与 pTEFb 复合物通过两种方式相互作用。首先 BRD4 的第二个 BD 与乙酰化 CYCLIN T 结合并稳定 pTEFb/BRD4 复合物^[2]。BRD4 的结合不仅使抑制蛋白 HEXIM1 与非活性复合物解离, 还募集了有活性的基因启动子并刺激 pTEFb 激酶活性。在基因体中的转录延伸过程中,

BRD4 与剪接机制 FUS, hnRNPM 和 hnRNPL 相互作用, 以调节 mRNA 选择性剪接, 特别是外显子跳跃^[3]。因此, 抑制 BRD4 的功能导致转录暂停。

2.3 BRD4 的调节

BRD4 活性受其 PTM 调节。CDK9 引起的 BRD4 过度磷酸化可能会增加其在 NUT 中线癌 (NMC) 中的致癌活性^[4]。CK2 还介导乳腺癌中 BRD4 的磷酸化, 而 PP2A 使 BRD4 脱磷酸化。BRD4 磷酸化会增加其稳定性和核定位, 此外, BRD4 磷酸化还增强了 BRD4 与介体复合物的缔合, 并调节 BRD4–P53 相互作用^[5, 6]。在前列腺癌细胞中, BRD4 的丰度由泛素化调节。SPOP 是负责 BRD4 泛素化和降解的 E3 连接酶, 而 DUB3 从 BRD4 中去除泛素并拮抗 SPOP 的功能。在胃癌细胞中, 脯氨酰异构酶 PIN1 直接识别磷酸化的 BRD4, 并通过防止其泛素化来增强其稳定性, 提示磷酸化泛素化串扰可调节 BRD4 活性。PIN1 还催化 BRD4 异构化, 从而改变 BRD4 构象并促进其与 CDK9 的相互作用^[7]。除了被异构化外, BRD4 中的脯氨酸 536 (P536) 还可被 PHD2 羟基化。BRD4 羟基化不会干扰其稳定性, 但对于其与转录激活因子 (如 pTEFb) 的相互作用和基因转录的调控是不可避免的。

BRD4 是细胞对细胞外信号 (例如氧化应激, 热休克应激以及炎症刺激) 的反应的一个整体模块。尽管 BRD4 在大多数细胞中连续表达, 但动态 PTM 可能将细胞信号转导事件与不同生物学环境中的 BRD4 活性联系起来。

3 BRD4 调节转录之外的功能

最近研究揭示了 BRD4 与基因转录无关的一些功能。BRD4 促进细胞周期发展至 S 期, 而 BRD4 抑制则使细胞停滞在 G1 期^[8]。除了调节细胞周期相关基因的转录外, BRD4 还通过调节 CDC6 的活性来参与细胞周期, 从而保证 DNA 复制的启动。一旦与 CDC6 结合, BRD4 就会干扰 CDK2 介导的 CDC6 磷酸化并阻止异常的 DNA 复制^[8]。BRD4 识别乙酰化的 SNAIL, 并使其免受 FBXL14 / β -TRCP1 介导的泛素化和蛋白质降解的影响^[9]。敲低 BRD4 可缩短端粒的长度, 尽管基本机制仍然不清楚, 但 BRD4 可能会减轻端粒酶进入端粒的作用。

DNA 损伤修复 (DDR) 需要 BRD4。乙酰化的组蛋白 H4 通过双链断裂 (DSB) 富集 BRD4 并将其置于 DNA 上。

一旦到达这些位置, BRD4 就会募集 53BP1, 通过 NHEJ (非同源末端连接) 途径促进 DDR。缺乏 BRD4 会导致修复辐射 (IR) 引起 DNA 损伤的缺陷, 并显著增强 γ -H2AX 病灶在前列腺癌中的形成。哺乳动物的 BRD4 有两种同工型, 长的同工型 (BRD4L) 和短的同工型 (BRD4S)。U2OS 骨肉瘤细胞中 BRD4S 的特异性消耗也显著促进了 IR 诱导的 γ -H2AX 灶的形成。这种现象是由于没有 BRD4S 而不是 DDR 不足导致的 Hyper-DDR。在这种情况下, BRD4S 将 Condensin 复合物募集到断裂位点, 并使 DSB 与 DDR 机械隔离。这些研究中观察到差异的原因目前未知, 在不同情况下 BRD4 亚型在 DDR 中的功能可能不同。

4 BRD4 的生理功能

4.1 BRD4 在胚胎发育中

通过控制细胞特异性转录程序, BRD4 可以定义细胞身份并调节胚胎发育。由于缺乏多能内部细胞团 (ICM), BRD4 无效小鼠具有胚胎致死性^[10], 这表明 BRD4 在胚胎干细胞 (ESC) 中必不可少。实际上, BRD4 与核心多能性因子 OCT4 和 NANOG 相互作用以维持 ESC 的身份。有趣的是, 当 ESCs 在无血清但有糖原合酶激酶 3 (GSK3) 和有丝分裂原激活的蛋白激酶 (MEK) 抑制剂的培养基中培养时, BRD4 不需要自我更新和多能性^[4]。GSK3 和 MEK 抑制剂可能会创造转录允许的染色质环境, 以补偿 BRD4 的损失, 没有 BRD4 的 ESC 倾向于获得神经外胚层的命运。这可能是由于 OCT4 的减少所致, 它抑制了神经外胚层的分化而促进了中胚层的分化。

受精后, 精子和卵母细胞结合形成合子, 并且它们的基因组最初在转录上是惰性的。通过称为母体到合子的过程, 发生了合子基因组激活 (ZGA)。ZGA 开始合子基因转录, 对于将两个分化的配子重新编程为全能合子至关重要。控制 ZGA 的机制尚不清楚。斑马鱼中的最新发现表明, 对 BRD4 的抑制会导致合子转录的显著减少并阻断胃形成, 而该蛋白的过表达则为基因组的转录激活做好了准备。

4.2 BRD4 在产后生长和生理中的作用

BRD4 杂合小鼠表现出出生前和产后生长受损。大约一半的杂合子在出生后的前两周内死亡。存活的个体表现出几种类型的解剖异常, 从头部畸形, 皮下脂肪缺失, 白内障到不规则肝细胞。据报道, 通过与谱系特异性 TF 和增强子相互作用, BRD4 是成骨细胞分化、脂肪形成和肌生成所必需的。

BRD4 还可以维持成人肠道上皮的功能性干细胞和体内平衡。

BRD4 在神经系统中起关键作用。当神经元祖细胞 (NPC) 分化时, BRD4 表达下调。抑制 BRD4 可以促进 NPC 向神经元的分化, 但会损害星形胶质细胞和少突胶质细胞的分化。在发育中的小脑中有条件地缺失 BRD4 会导致小脑形态缺陷和共济失调。在学习和记忆形成过程中, 一组立即早期基因 (IEG) 在神经元中迅速激活, 破坏该过程导致异常的神经元活动和神经发育障碍。BRD4 通过释放暂停的 RNA PolII 立即打开这些 IEG。

4.3 转录记忆中的 BRD4

细胞身份由其特定的基因表达谱和染色质结构定义。细胞分裂会挑战细胞身份, 因为在细胞有丝分裂过程中, 大多数转录因子会从浓缩的染色质上解离。但是 BRD4 通过与乙酰化组蛋白结合并保留在染色体上, 并标记了许多 M / G1 期的基因, 这些基因对于在新分裂的细胞中建立基本细胞功能很重要。通过使染色质去紧实并募集 pTEFb, BRD4 在有丝分裂结束时或有丝分裂后立即加速这些基因表达的重新初始化。因此, BRD4 介导的细胞分裂过程中的转录记忆对于维持子代细胞的身份至关重要。

5 BRD4 与疾病

5.1 BRD4 与癌症

由于发现 BRD4 是癌症治疗的靶标, 因此 BRD4 在肿瘤中的研究一直在蓬勃发展。在一些肿瘤中观察到 Brd4 的遗传改变。NMC 的大多数情况是由染色体易位引起的 BRD4-NUT 融合蛋白驱动的。挖掘 COSMIC 数据库时, 在癌症患者中发现了两个 BRD4 的错义突变, 但在这些情况下它们是否是驱动程序突变尚不清楚。BRD4 调节剂 (例如 SPOP 和 PP2A) 的突变在许多肿瘤中都很常见, 这可能通过调节其 PTM 导致 BRD4 功能障碍。尽管有这些发现, 在大多数恶性肿瘤中, 使 BRD4 发生故障的原因仍然是未知的。

异常的 BRD4 驱动致癌转录网络。许多癌基因, 如 cMYC 都在富含 BRD4 的癌症特异性超级增强剂的控制下, 胃肠道间质瘤中 BRD4 的上调激活 NF κ B 以增加 CCL2 表达, 从而将巨噬细胞募集到肿瘤组织中以促进肿瘤生长。另外, BRD4 通过防止细胞死亡和维持端粒长度来支持癌细胞的生长。通过调节 DDR, BRD4 促进了伯基特淋巴瘤中的 IgH / cMYC 易位以及前列腺癌中的 TMPRSS2-ERG 重排。BRD4

还通过转录或转录后控制上皮-间质转化 (EMT) 程序和其他与转移相关的基因, 如 AHNAK, 来调节肿瘤转移。

5.2 BRD4 与病毒感染

早在被公认是有效的癌症调节剂之前, 就已发现 BRD4 参与病毒感染。BRD4 与人乳头瘤病毒 (HPV) E2 蛋白相互作用, 将 HPV 基因组束缚在有丝分裂染色体上, 以调节它们在宿主基因组中的转录, 复制、分离和维持。BRD4 还介导卡波济氏病的复制和持续感染肉瘤相关疱疹病毒。BRD4 与 1 型人类 T 淋巴病毒 (HTLV-1) 的 Tax 蛋白竞争结合 pTEFb, 后者是导致成人 T 细胞白血病的逆转录病毒。同样 BRD4 使潜伏感染细胞中的 HIV 原病毒转录沉默, 并延长了 HIV 潜伏期。

6 展望

全面了解 BRD4 在生理学和病理学中的功能和机制不仅有助于确定 BET 适用的医疗条件, 而且有助于设计合理的治疗方案, 以最大程度地受益于 BETis。为此, 我们需要仔细研究 BRD4 相互作用组, 因为 BRD4 活性是细胞特异性的, 并且 BRD4 本身的遗传改变不能解释与 BRD4 相关的所有疾病。值得注意的是, 已经确定了庞大的 BRD4 合作伙伴, 但需要明确他们在 BRD4 相关病理中的作用。这对于开发新一代 BETis 并应用适当的 BETis 来精确治疗疾病可能至关重要。

参考文献

- [1] WANG C Y, FILIPPAKOPOULOS P. Beating the odds: BETs in disease [J]. *Trends Biochem Sci*, 2015, 40(8): 468–479.
- [2] SCHRÖDER S, CHO S, ZENG L, et al. Two-pronged binding with bromodomain-containing protein 4 liberates positive transcription elongation factor b from inactive ribonucleoprotein complexes [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(2): 1090–1099.
- [3] DEVAIAH B N, LEWIS B A, CHERMAN N, et al. BRD4 is an atypical kinase that phosphorylates serine2 of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(18): 6927–6932.
- [4] WANG R, CAO X J, KULEJ K, et al. Uncovering BRD4 hyperphosphorylation associated with cellular transformation in NUT midline carcinoma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(27): 5352–5361.
- [5] WU S Y, LEE A Y, LAI H T, et al. Phospho switch triggers Brd4 chromatin binding and activator recruitment for gene-specific targeting [J]. *Mol Cell*, 2013, 49(5): 843–857.
- [6] SHU S, LIN C Y, HE H H, et al. Response and resistance to BET bromodomain inhibitors in triple-negative breast cancer [J]. *Nature*, 2016, 529(7586): 413–417.
- [7] HU X, DONG S H, CHEN J, et al. Prolyl isomerase PIN1 regulates the stability, transcriptional activity and oncogenic potential of BRD4 [J]. *Oncogene*, 2017, 36(36): 5177–5188.
- [8] ZHANG J, DULAK A M, HATTERSLEY M M, et al. BRD4 facilitates replication stress-induced DNA damage response [J]. *Oncogene*, 2018, 37(28): 3763–3777.
- [9] QIN Z Y, WANG T, SU S, et al. BRD4 Promotes Gastric Cancer Progression and Metastasis through Acetylation-Dependent Stabilization of Snail [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(19): 4869–4881.
- [10] HOUZELSTEIN D, BULLOCK S L, LYNCH D E, et al. Growth and early postimplantation defects in mice deficient for the bromodomain-containing protein Brd4 [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(11): 3794–3802.