

乳腺癌易感蛋白 BRCA1 的 BRCT1 结构域染色质伸展活性的定位

叶棋浓^{1*} 胡艳芬² 钟红君¹ 李 熔² 黄翠芬¹

¹(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

²(Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Virginia, VA 22908, USA)

摘 要 乳腺癌易感基因 *BRCA1* (Breast cancer susceptibility gene 1) 在乳腺癌的发生、发展中起重要作用。*BRCA1* C 末端含有 2 个 BRCT 结构域 (BRCT1 和 BRCT2), 许多乳腺癌易感突变发生在 *BRCA1* 的 BRCT 结构域中。利用染色质结构检测技术表明, BRCT 结构域具有染色质伸展活性。本文利用缺失突变技术构建了 6 种 BRCT1 结构域 (1642-1736 aa) 缺失突变体并将 BRCT1 结构域中与染色质伸展相关的重要区域定位到 1691-1721 之间的氨基酸残基; 用丙氨酸扫描技术构建了 10 种 BRCT1 结构域丙氨酸扫描突变体并将重要氨基酸残基序列定位到 1707-1711 之间的 IAGGK。利用定位的重要区域进行 Blast 分析, 结果找到一新型同源蛋白质。BRCT1 结构域的定位有助于预测 BRCT1 结构域突变后发生乳腺癌的风险, 也为进一步研究 BRCT1 结构域的功能机制提供了有用的材料。

关键词 *BRCA1*, BRCT 结构域, 乳腺癌, 染色质

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)06-0656-06

作为抑癌基因, 乳腺癌易感基因 *BRCA1* (Breast cancer susceptibility gene 1) 在乳腺癌的发生、发展中起重要作用^[1~6]。40% ~ 50% 的遗传性乳腺癌是由 *BRCA1* 突变引起的, 而 *BRCA1* 突变引起的遗传性乳腺癌和卵巢癌的比例至少为 80%。*BRCA1* 基因编码 1863 个氨基酸, 在氨基端包含锌指结构, 在羧基端包含 2 个转录激活结构域, 称为 AD1 (1293-1559 aa) 和 AD2 (1560-1863 aa)。AD2 包含 2 个串联的 BRCT 结构域, 其中一个位于 1642-1736 aa 之间 (称为 BRCT1), 另一个位于 1756-1852 aa 之间 (称为 BRCT2)。许多乳腺癌易感突变发生在 *BRCA1* 的锌指结构域和 BRCT 结构域中, 提示这两个结构域在乳腺癌中起重要的调节作用。

已有研究表明, *BRCA1* 与 DNA 损伤修复和转录调节有关。因此, *BRCA1* 是乳腺中维持基因组稳定性所必需的。*BRCA1* 可与 DNA 修复相关的蛋白质如 Rad51 和 Rad50 相互作用。*BRCA1* 也可与一些转录因子如雌激素受体 (ER) 和雄激素受体 (AR) 相互作用。尽管 *BRCA1* 羧基端具有明显的转录激活功能, 但因其缺乏明显的序列特异的 DNA 结合活性, 大多认为 *BRCA1* 是一些转录因子的辅助因子

(Cofactor)。*BRCA1* 的这些功能提示其可能通过调节染色质结构来调节不同的染色体事件, 染色质结构调控失衡必将增加乳腺癌发生的可能^[7]。

1999 年, Andrew S. Belmont 领导的实验室建立了哺乳动物细胞大规模染色质结构检测技术^[8]。利用 lac 阻遏物识别和结合 lac 操纵基因的原理, 将强病毒转录因子 VP16 的转录激活结构域与 lac 阻遏物融合, VP16 的转录激活结构域能诱导包括 lac 操纵基因在内的大规模染色质伸展 (Chromatin unfolding), 并使该伸展区域转录增强、组蛋白高度乙酰化和一些组蛋白乙酰化酶聚集 (Recruitment)。我们利用染色质结构检测技术观测到 *BRCA1* 能诱导大规模染色质伸展, 并发现 C 末端转录激活结构域中存在三个独立的能诱导染色质伸展的结构域, 即 AD1、BRCT1 和 BRCT2^[7]。由于 BRCT 结构域在乳腺癌抑制功能中的重要性, 本文利用缺失突变技术进一步定位了 BRCT1 结构域中与染色质伸展相关的区域, 并用丙氨酸扫描技术^[9]确定了与该活性相关的重要氨基酸残基, 从而有助于预测 BRCT1 结构域突变后发生乳腺癌的风险, 也为进一步研究 BRCT1 结构域的功能机制提供了有用的材料。

1 材料与方法

1.1 质粒

pRC-lac 载体由本实验室构建^[7],含有 lac 阻遏物编码序列,其下游含有一单一克隆位点 AscI。含有全长 BRCA1 编码序列的质粒由 Toru Ouchi 博士 (Mount Sina School of Medicine, USA)和 Ralph Scully (Harvard Medical School, USA)博士赠送。

1.2 抗体

抗 lac 阻遏物多克隆抗体购自 Stratagene 公司, Cy3 偶联的羊抗兔 IgG 购自 Amersham 公司,辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔 IgG 购自 Vector 公司。

1.3 分子生物学试剂

各种分子生物学试剂分别购自 NEB、Qiagen、Roche 及 Invitrogen 等公司。

1.4 细胞株

AO3-1 细胞株由 Andrew S. Belmont(University of Illinois, USA)博士赠送^[8]。该细胞株是由 CHO 细胞衍变而来,整合有 256 拷贝的 lac 操纵基因。在 lac 操纵基因上游含有 DHFR 基因,可用甲氨蝶呤 (MTX)进行基因共扩增。

1.5 重组质粒的构建

1.5.1 BRCT1 结构域缺失突变体的构建:利用常规 PCR 技术构建三种氨基端缺失突变体(1657-1736 aa、1672-1736 aa 和 1687-1736 aa)和三种羧基端缺失突变体(1642-1721 aa、1642-1706 aa 和 1642-1691 aa),以含有全长 BRCA1 编码序列的质粒作模板,以表 1 和 2 中所列的 PCR 引物扩增相应片段。将扩增的片段用 AscI 酶切后分别克隆于用 AscI 酶切的 pRC-lac 载体中。

1.5.2 BRCT1 最小结构域丙氨酸扫描突变体的构建:经检测 BRCT1 结构域缺失突变体染色质伸展活性表明,BRCT1 最小功能结构域位于 1687-1736 之间氨基酸残基,因此利用该区域进行丙氨酸扫描突变确定重要的氨基酸残基。共构建 10 种丙氨酸扫描突变体,依次命名为 A1-A10。利用重组 PCR(recombinant PCR)技术^[10]构建 A1-A10。共进行两轮 PCR 扩增。第一轮扩增中,以野生型 BRCA1 质粒为模板,以表 1 和 2 中所列相应引物(含有突变为丙氨酸的编码序列)扩增片段 1 和 2。在第二轮循环中,以片段 1 和片段 2 为模板,以表 1 和 2 中所列以扩增 1687-1736 区域的引物为引物扩增丙氨酸扫描突变体片段,将扩增的片段用 AscI 酶切后分别克隆于用 AscI 酶切的 pRC-lac 载体中。

表 1 PCR 扩增所用引物的序列

Table 1 Primer sequences used for the PCR amplification	
Name	sequence
P1	5'-TTGGCGCGCGCCAACTGACCCAGAAATTTATG -3'
P2	5'-TTGGCGCGCGCCAAACACCACATCATTTAACATAATC -3'
P3	5'-TTGGCGCGCGCCAAAGTTGTATGAAAAACAGATGCTG -3'
P4	5'-TTGGCGCGCCAAATCAACAGAAAGGGTCAACAAAAG-3'
P5	5'-TTGGCGCGCCTGGACTTCAAAATCATGCTCAATTC -3'
P6	5'-TTGGCGCGCCTGCTGGGTCAACCCAGAAATAG -3'
P7	5'-TTGGCGCGCCTGTCTAGAAAAATATTTTCAGTG -3'
P8	5'-TTGGCGCGCCTGTGTTTTTCATAACAACATGAG -3'
P9	5'-TTGGCGCGCCAAAGCTGCTGCGGCAGCAGATGCTGAGTTTGTG-3'
P10	5'-TTGGCGCGCCAAAGGAACCCCTTACCTGGAATC -3'
P11	5'-CGCAGCGCAGCAGCTGTTTTTCATAACAACATG -3'
P12	5'-ATGAAAAACAGCTGCTGCGGCTGCGTGTGAACGGAGACTG-3'
P13	5'-TTGGCGCGCCTGGTAGTGGCTGTGGGGGATC -3'
P14	5'-CGCTGCCGCTGCAGCCACAAACTCAGCATCTG-3'
P15	5'-GAGTTTGTGGCTGCAGCGGCAGCGAAATATTTTCTAGGAATG -3'
P16	5'-TGCTGCAGCAGCTGCCAGTGTCCGTTTCACAC-3'
P17	5'-CGGACACTGGCAGCTGCTGCAGCAATTGCGGGAGGAAAATG -3'
P18	5'-TGCTGCTGCCGAGCTCCTAGAAAAATATTTTCAGTG -3'
P19	5'-TTTCTAGGAGCTGCCGCAGCAGCATGGGTAGTTAGCTATTTTC -3'
P20	5'-AGCGGCAGCTGCCGCTTTTCTCTCCGCAATTC-3'
P21	5'-GGAGCAAAAAGCGGCAGCTGCCGCTTTCTGGGTGACCCAGTC-3'
P22	5'-CGCGGCCCGCGCGGCATAGCTAACTACCCATTTTC -3'
P23	5'-GTTAGCTATGCCGCGCGCGCGCTCTATTAAAGAAAGAAAAATG -3'
P24	5'-TGCTGCTGCAGCAGCCTGGGTCACCCAGAAATAG -3'
P25	5'-GTGACCCAGGCTGCTGCAGCAGCAAAAATGCTGAATGAGCATG -3'
P26	5'-CGCAGCGCGCGCTGCTCTTTCTTTAATAGACTGG -3'
P27	5'-AAAGAAAGAGCAGCGCGCGCTGCGCATGATTTTGAAGTCAG -3'
P28	5'-TTGGCGCGCCTGGGCTGCAGCAGCAGCCTCATTCAGCAATTTTCT -3'

表 2 PCR 扩增所用引物

Table 2 Primers used for the PCR amplification		
Construct	Primers for fragment 1	Primers for fragment 2
1657-1736	P1, P5	
1672-1736	P2, P5	
1687-1736	P3, P5	
1642-1721	P4, P6	
1642-1706	P4, P7	
1642-1691	P4, P8	
A1	P9, P5	
A2	P10, P11	P12, P13
A3	P10, P14	P15, P13
A4	P10, P16	P17, P13
A5	P10, P18	P19, P13
A6	P10, P20	P21, P13
A7	P10, P22	P23, P13
A8	P10, P24	P25, P13
A9	P10, P26	P27, P13
A10	P3, P28	

由于所有 PCR 片段克隆于 pRC-lac 载体的 lac 阻遏物编码序列下游的单一 AscI 位点,因此我们用 PCR 鉴定插入方向。PCR 所用上游引物为 lac 阻遏

物中的序列(TGCTGCAACTCTCTCAG),下游引物与扩增突变体片段时所用的下游引物相同。若用上述引物扩增后得到预期的 PCR 产物,即为正相插入,反之,若无 PCR 产物,即为阴性。所有重组质粒均经 DNA 序列分析,证明插入方向和突变序列正确。

1.6 PCR 扩增

本文扩增 BRCA1 片段所用 PCR 扩增条件如下: 94℃ 变性 2 min 后,按以下参数进行 25 次循环: 94℃ 变性 1 min, 55℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min。最后 72℃ 延伸 7 min。鉴定插入方向所用 PCR 条件除复性温度为 49℃ 外,其余条件与扩增 BRCA1 片段所用条件相同。PCR 扩增所用酶为 pfu DNA 聚合酶(Stratagene)。

1.7 细胞转染

用 FuGENE 6 (Roche)转染 AO3-1 细胞。AO3-1 细胞接种密度为 4×10^5 /35 mm 平皿。将 1 μg DNA 与 100 μL 不含胸苷和次黄嘌呤的 F12 培养基(Invitrogen)混合,加入 7 μL FuGENE 6,室温放置 30 min,逐滴加入到含有 2 mL F12 和 10% 透析过的胎牛血清(Hyclone)的 35 mm 细胞培养皿中。24 h 后换成新鲜培养基,并加入浓度为 0.3 mmol/L MTX 进行基因扩增。

1.8 Western blot 分析

样品进行 SDS-PAGE 后,电转移至硝酸纤维素膜,然后用 5% 脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜,弃溶液,加入用 5% 脱脂奶粉稀释的抗 lac 阻遏物多克隆抗体,室温轻摇 1 h, TBST 洗膜 3 次后,加入用 5% 脱脂奶粉稀释的辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔 IgG,室温轻摇 1 h, TBST 洗膜 3 次后,用化学发光法显色 5 min,压片显影。

1.9 染色质伸展技术

参照参考文献 [8] 进行。在 35 mm 细胞培养皿中,放入盖玻片,接种 AO3-1 细胞。24 h 后,用 FuGENE 6 将重组质粒转染 AO3-1 细胞。48 h 后,取出盖玻片,进行免疫荧光染色。先用含有 1.6% 多聚甲醛的 PBS 液室温固定细胞 30 min。用含有 0.2% Triton X-100 的 PBS 液通透 5 min,然后用含 1% 正常羊血清的 PBS 封闭 1 h。加入 1:20 000 用 1% 正常羊血清稀释的抗 lac 阻遏物多克隆抗体,室温孵育 1 h,用含 1% 正常羊血清的 PBS 洗涤 10 min,共 3 次,然后用 1:10 000 稀释的 Cy3 偶联的羊抗兔 IgG 室温孵育 1 h,用 PBS 洗 3 次后,用浓度为 0.2 μg/mL DAPI 染色细胞核 5 min,封片。用荧光显微镜(Nikon Microphot-SA)观察染色质伸展活性。用 CCD 照相机

(Hamamatsu ORCA)进行摄影。

2 结果

2.1 BRCT1 缺失突变体的克隆及表达

BRCT1 含有 95 个氨基酸(1642-1736 aa),其不同缺失突变体如图 1 所示。本文共构建 3 种 N 端缺失突变体(1657-1736 aa、1672-1736 aa 和 1687-1736 aa)和 3 种 C 末端缺失突变体(1642-1721 aa、1642-1706 aa 和 1642-1691 aa)。最小缺失突变体含有 BRCT1 中的 50 个氨基酸。为研究染色质伸展活性,所有缺失突变片段均在下游以正确相位与 lac 阻遏物融合,构建成融合蛋白。将这些缺失突变体转染哺乳动物细胞 AO3-1 后,收集细胞总蛋白,用抗 lac 阻遏物抗体进行 Western blot 检测表明(图 1), pRC-lac 空载体表达了分子量约为 42 kD 的 lac 阻遏物,而这些缺失突变体均表达了相应的融合蛋白,与预期结果一致。

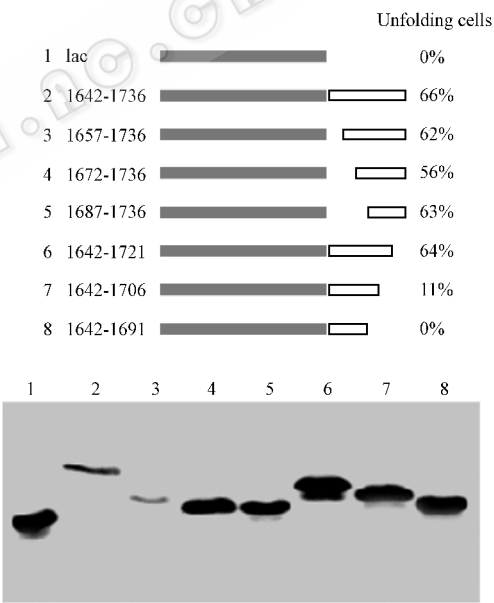


图 1 BRCT1 缺失突变体的结构及其表达

Fig.1 Structure and expression of different BRCT1 deletion mutants

2.2 BRCT1 缺失突变体染色质伸展活性检测

为评价 BRCA1 转录激活区不同重组体对哺乳动物细胞中大规模染色质结构的影响,本文利用由 CHO 细胞衍生的 AO3-1 细胞株^[8]。该细胞株整合有 lac 操纵基因,经 DHFR 基因共扩增,产生 90 Mb 的基因组异染色质区。将含 lac 阻遏物或其融合蛋白的编码序列的重组质粒转染 AO3-1 细胞后,表达的 lac 阻遏物或其融合蛋白通过与 lac 操纵基因的结合将这些蛋白靶向到上述异染色质区,经免疫荧

光染色 lac 阻遏物 ,可观察大规模染色质结构的改变。

与报道结果一致^[8] ,只表达 lac 阻遏物的细胞显示致密的点状染色质结构(图 2 ,最亮的白色) ,说明 lac 阻遏物无染色质伸展活性 ,而强病毒转录因子 VP16 的转录激活结构域与 lac 阻遏物融合后的融合

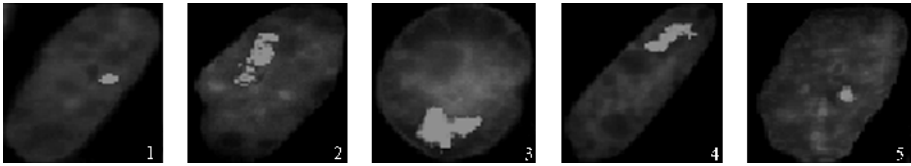


图 2 BRCT1 缺失突变体染色质伸展活性检测

Fig.2 Determination of the chromatin unfolding activity of different BRCT1 deletion mutants

1. lac ; 2. Vp16 ; 3. 1642-1736 ; 4. 1687-1736 ; 5. 1642-1691

对 BRCT1 不同缺失突变体染色质伸展活性检测表明(图 2) ,缺失 BRCT1 C 末端 45 个氨基酸的突变体(1642-1691 aa)使 BRCT1 染色质伸展活性丧失 ,而缺失 BRCT1 N 端 46 个氨基酸的突变体(1687-1736 aa)仍保留染色质伸展活性。与完整 BRCT1 (1642-1736 aa)相似 ,在表达缺失 BRCT1 N 端 46 个氨基酸的突变体的转染细胞中 ,63 % 的细胞具有染色质伸展活性(图 1)。上述结果说明 ,BRCT1 C 末端决定 BRCT1 的染色质伸展活性。比较所有缺失突变体染色质伸展活性百分数可以看出(图 1) ,BRCT1 的 1691-1721 之间氨基酸残基在决定 BRCT1 的染色质伸展活性中起更重要的作用。

2.3 BRCT1 最小功能结构域同源蛋白的检索

由于 BRCT1 的 1691-1721 之间氨基酸残基在决定 BRCT1 的染色质伸展活性中起重要的作用 ,因此利用该区域进行 Blast(www. ncbi. nlm. nih. gov)分析搜索其同源的蛋白质 ,结果发现一新型蛋白质(Gen-Bank 登录号为 AK022909) ,该新型蛋白亦具有染色质伸展活性(另文发表)。

2.4 BRCT1 最小结构域丙氨酸扫描突变体的克隆及表达

由于 BRCT1 的 1687-1736 aa 仍保留与完整 BRCT1 相似的染色质伸展活性。本文在该区域中构建以 5 个丙氨酸为一组的丙氨酸扫描突变体 ,以便进一步确定 BRCT1 中重要的氨基酸残基(图 3)。如材料与方法中所述 ,利用重组 PCR 技术构建 10 种丙氨酸扫描突变体 ,依次命名为 A1-A10。将这些突变体转染哺乳动物细胞 AO3-1 后 ,收集细胞总蛋白 ,用抗 lac 阻遏物抗体进行 Western blot 检测表明(图 3) ,这些缺失突变体均表达了相应的融合蛋白 ,与预

蛋白(阳性对照)则能诱导大规模染色质伸展(最亮的白色) ,该图中 ,较暗部分是用 DAPI 染色后显示的细胞核结构。在表达 VP16 融合蛋白的转染细胞中 ,60 % 的细胞具有这种活性(每次实验至少计数 100 个转染细胞)。

期结果一致。

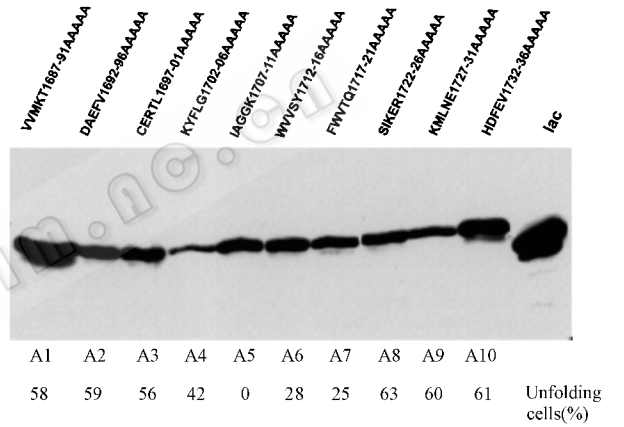


图 3 BRCT1 丙氨酸扫描突变体的结构及其表达

Fig.3 Structure and expression of different BRCT1 alanine scanning mutants

2.5 丙氨酸扫描突变体的染色质伸展活性检测

将 10 种丙氨酸扫描突变体转染 AO3-1 细胞后 ,经免疫荧光染色 lac 阻遏物观察染色质结构的改变。结果表明(图 3) ,BRCT1 功能结构域中 1707-1711 之间的氨基酸序列由 IAGGK 突变为 5 个丙氨酸后(突变体 A5) ,其染色质伸展活性丧失。与比较所有缺失突变体染色质伸展活性百分数的结果相似 ,比较所有丙氨酸扫描突变体染色质伸展活性百分数可以看出(图 3) ,BRCT1 中 1702-1721 之间氨基酸残基在决定 BRCT1 的染色质伸展活性中起更重要的作用。

3 讨论

近几年的研究表明 ,大规模的染色质结构改变在基因转录调节中起重要作用^[11] ,它可能与细胞生

长、静止、老化和分化有关,因此,染色质结构的改变与生命活动息息相关。BRCA1 在 DNA 损伤修复和转录调节中起重要作用,而这些功能的发挥主要取决于 C 末端转录激活结构域。BRCA1 C 末端转录激活结构域含有 2 个串联但不重复的 BRCT 结构域。目前发现含有 BRCT 结构域的蛋白已有几十种^[12],但很多蛋白的功能还不清楚。一般认为, BRCT 结构域与 DNA 修复、细胞周期和转录调节有关。我们利用染色质结构检测技术观测到 BRCA1 的 BRCT 结构域能诱导大规模染色质伸展,提示 BRCA1 可能通过调节染色质结构来调节 BRCA1 的其它功能。染色质结构调控的失衡必将增加乳腺癌发生的可能。

从我们所构建的 BRCT 结构域突变体(缺失突变体和丙氨酸扫描突变体)来看,染色质伸展活性似乎与其蛋白质的稳定性无关。如图 3 中, A5 突变体的表达水平高于 A4,前者无染色质伸展活性,而后者具有较高的染色质伸展活性;又如 A2 突变体的表达水平与 A5 相似,但 A2 具有较高的染色质伸展活性。

组蛋白酰基化是核小体水平染色质修饰的常见形式,它是染色质转录活跃的标志之一。病毒转录因子 VP16 诱导的染色质伸展伴随着组蛋白酰基化酶聚集和局部组蛋白的高度酰基化,但 BRCT 结构域诱导的染色质伸展区没有组蛋白酰基化(数据未显示),说明 BRCT 诱导的染色质伸展不同于 VP16 诱导的染色质伸展。另外,也不排除其它的组蛋白修饰(如磷酸化)与 BRCT 诱导的染色质伸展有关。

目前已发现几百种 BRCA1 的基因突变,大约 36% 的 BRCA1 突变为错义突变,其中 5.2% 为良性多态性,7.8% 是恶性的,而 87% 还未分类^[13],因此对这些未分类的突变体表型的预测对于预防和治疗乳腺癌具有非常重要的意义。由于许多乳腺癌易感突变发生在 BRCA1 的锌指结构域和 BRCT 结构域,因此,对 BRCA1 BRCT 结构域中的重要区域及氨基酸残基的确定有助于预测该区域突变后乳腺癌发生的风险。从 BRCT1 染色质伸展活性看(图 2 和图 3),BRCT1 的 1691-1721 之间氨基酸残基是发挥其功能的重要区域。可以想象,该区域的重要氨基酸的突变导致乳腺癌发生的危险性或恶性程度可能比 BRCT1 的其它区域(1642-1690)的突变更大或更高。丙氨酸扫描突变体的染色质伸展活性检测表明, BRCT1 中 1707-1711 之间的氨基酸序列由 IAGGK 突变为 5 个丙氨酸后,其染色质伸展活性丧失。由于

缺乏 BRCT1 结构域不同基因型与表现型一一对应的临床资料, BRCT1 的 1691-1721 之间氨基酸残基突变后的表型有待进一步研究。已有资料表明, BRCT1 中 1708 位由 A 突变为 E 后的病人易发生乳腺癌^[14],而该位点正好位于上述提到的重要丙氨酸扫描突变体中。

另外, BRCT1 中染色质伸展活性重要区域和重要残基的确定,缩小了寻找与其相互作用的靶分子的范围,为准确搜索同源蛋白质奠定了坚实的基础,也为进一步研究 BRCT1 结构域的功能机制提供了有用的对照。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Rahman N, Stratton M R. The genetics of breast cancer susceptibility. *Annu Rev Genet*, 1998 **32** 95 ~ 121
- [2] Venkitaraman A R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 2002 **108** 171 ~ 182
- [3] Scully R, Livingston D M. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature*, 2000 **408** 429 ~ 432
- [4] Kerr P, Ashworth A. New complexities for BRCA1 and BRCA2. *Curr Biol*, 2001 **11** R668 ~ R676
- [5] Zheng L, Li S, Boyer T G. Lessons learned from BRCA1 and BRCA2. *Oncogene*, 2000 **19** 6159 ~ 6175
- [6] Hu Y F, Miyake T, Ye Q *et al.* Characterization of a novel trans-activation domain of BRCA1 that functions in concert with the BRCA1 C-terminal (BRCT) domain. *J Biol Chem*, 2000 **275** 40910 ~ 40915
- [7] Ye Q, Hu Y F, Zhong H *et al.* BRCA1-induced large-scale chromatin unfolding and allele-specific effects of cancer-predisposing mutations. *J Cell Biol*, 2001 **155** 911 ~ 921
- [8] Tumber T, Sudlow G, Belmont A S. Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain. *J Cell Biol*, 1999 **145** 1341 ~ 1354
- [9] Miyake T, Loch C M, Li R. Identification of a multifunctional domain in autonomously replicating sequence-binding factor 1 required for transcriptional activation, DNA replication, and gene silencing. *Mol Cell Biol*, 2002 **22** 505 ~ 16
- [10] Jayakumar A, Huang W Y, Raetz B. Cloning and expression of the multifunctional human fatty acid synthase and its subdomains in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996 **93** 14509 ~ 14514
- [11] Belmont A S, Dietzel S, Nye A C *et al.* Large-scale chromatin structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, 1999 **11** 307 ~ 11
- [12] Huyton T, Bates P A, Zhang X *et al.* The BRCA1 C-terminal domain: structure and function. *Mut Res*, 2000 **460** 319 ~ 332
- [13] Ruffner H, Joazeiro C A, Hemmati D *et al.* Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001 **24** 5134 ~ 5139
- [14] Hu Y F, Hao Z L, Li R. Chromatin remodeling and activation of chromosomal DNA replication by an acidic transcriptional activation domain from BRCA1. *Genes Dev*, 1999 **13** 637 ~ 642

Mapping of BRCT1 Domain of BRCA1 with Chromatin Unfolding Activity

YE Qi-Nong^{1*} HU Yan-Fen² ZHONG Hong-Jun¹ LI Rong² HUANG Cui-Fen¹

¹(Beijing Institute of Biotechnology ,Beijing 100850 , China)

²(Department of Biochemistry and Molecular Genetics , University of Virginia ,VA 22908 , USA)

Abstract Breast cancer susceptibility gene 1(BRCA1) plays an important role in breast cancer development and progression. BRCA1 encodes a 1863-amino acid protein with two BRCA1 C-terminal(BRCT) domains at its C-terminus , BRCT1 and BRCT2. Many cancer-predisposing mutations are located in the BRCT domains , which have been shown to induce chromatin unfolding by use of an approach that allows visualization of large-scale chromatin structure through lac repressor/lac operator recognition. To map the important region of BRCT domain (amino acid residues 1642-1736) , six deletion mutant constructs were made. The chromatin structure assay showed that amino acid residues 1691-1721 are involved in the induction of chromatin unfolding. To further localize the critical amino acid residues , ten alanine scanning mutant constructs were made. The chromatin structure assay demonstrated that the ¹⁷⁰⁷IAGGK¹⁷¹¹ region is critical for the chromatin unfolding activity. Based on the mapped important region , Blast analysis identified a novel homologous protein. Mapping of the BRCT1 domain may aid in the presymptomatic risk assessment and provide a valuable tool for further study on the BRCT1 structure and function.

Key words BRCA1 , BRCT domain , breast cancer , chromatin

Received : 05-16-2002

* Corresponding author. Tel : 86-10-66931830 ; Fax : 86-10-68248045 ; E-mail : yeqn@yahoo.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>