

BRD7 结构功能域 Bromodomain 的研究 以及一个新的 BRD7 交互作用蛋白的鉴定*

彭 聪^{1)**} 李小玲^{1)**} 李夏雨³⁾ 刘华英¹⁾ 周 鸣¹⁾

张黎明¹⁾ 罗小敏¹⁾ 沈守荣²⁾ 李桂源^{1)***}

(¹⁾中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078; ²⁾中南大学湘雅三医院, 长沙 410008;

³⁾中南大学湘雅医学院, 长沙 410078)

摘要 溴区包含蛋白 7(BRD7)是采用 cDNA 代表性差异分析方法克隆的一个新基因. 研究证实了 BRD7 能够与乙酰化的组蛋白 3 结合, 其识别位点在组蛋白 3 的 14 位氨基酸; 并且证实了溴区结构域(Bromodomain)缺失型的 BRD7 突变体失去了与乙酰化组蛋白 3 的结合能力. Bromodomain 是在进化上高度保守的功能结构域, 该结构域在空间构象上具有鲜明的特征: 包括 4 个左手、呈反向平行排列的“螺旋(α_1 , α_2 , α_3 , α_4)”以及 2 个“连结环”(ZA loop, BC loop). 通过生物信息学等综合分析, 预测 BRD7 可能具有上述特征. 依据上述分析结果, 构建了 BRD7 的 Bromodomain 相关缺失突变体, 通过肽段结合实验分析上述突变体与乙酰化组蛋白 3 结合的能力. 结果表明, ZA loop 与 BC loop 的完整性对于 BRD7 结合乙酰化的组蛋白 3 有着重要的意义. 同时通过免疫荧光分析, 证实了 ZA loop 与 BC loop 的完整性能够影响 BRD7 的亚细胞定位. 最后, 证实了 BRD7 与 CBP 可能存在交互作用. CBP 不仅具有乙酰化转移酶活性(HATs), 能够对组蛋白末端进行乙酰化修饰, 并且作为一种重要的细胞转录因子广泛参与细胞的各种生物学活动.

关键词 溴区包含蛋白 7(BRD7), 溴区结构域(Bromodomain), 乙酰化组蛋白 3, CBP (CREB-binding protein)

学科分类号 R739

溴区包含蛋白 7(BRD7)是采用 cDNA 代表性差异分析方法克隆的一个新基因, 该基因全长为 2 317 bp, 开放阅读框(ORF)含 651 个氨基酸, 定位在 16q12.1-12.2, GenBank 登录号为 AF152604. 生物信息学分析显示: 该基因含有一个重要的结构域——溴区结构域(Bromodomain).

前期研究显示: 该基因在多数鼻咽癌组织及鼻咽癌细胞中表达缺失或明显下调. 采用酵母双杂交系统 (two-hybrid system) 筛选出 6 种与 BRD7 存在交互作用的蛋白质, 包括: 溴区包含蛋白 3 (Bromodomain-containing 3 protein, BRD3)、溴区包含蛋白 2 (Bromodomain-containing 2 protein, BRD2)等. 通过特异性酵母双杂交技术和免疫共沉淀技术, 证实了 BRD7 基因能与 BRD2、BRD3 蛋白发生交互作用^[1]. 将该基因转染到其表达下调的鼻咽癌细胞中, 结果显示, 软琼脂集落形成明显减少, 裸鼠致瘤性检测发现, 移植瘤形成的时间明显延长, 瘤体积减小, 表明能够较强烈地抑制移植瘤生

长的作用, 上述结果说明该基因能部分逆转鼻咽癌细胞的恶性表型^[2~4]. 应用流式细胞技术分析表明, BRD7 基因的高表达可阻滞鼻咽癌细胞的细胞周期 G1~S 的进程, 进一步发现, BRD7 基因能够通过下调 MEK1、p19、cyclinD1、cyclinE、E2F3、DP2 等分子参与细胞周期的调控^[5,6].

最新研究表明, BRD7 能够与乙酰化的组蛋白 3 结合, 其识别位点在组蛋白 3 的 14 位氨基酸, 同时也证实了 Bromodomain 缺失型的 BRD7 突变体失去了与乙酰化组蛋白 3 的结合能力, 说明 Bromodomain 对于 BRD7 与乙酰化染色质结合是必需的. 又发现 Bromodomain 缺失型的 BRD7 突变体, 失去了对靶基因 E2F3 启动子活性的调控能

*湖南省自然科学基金资助项目 (04JJ3097) 和国家自然科学基金资助项目 (30400528).

** 并列第一作者.

*** 通讯联系人. Tel: 0731-4805383, E-mail: Ligy@xysm.net

收稿日期: 2006-04-08, 接受日期: 2006-06-02

力, 以及对细胞周期的调控能力. 说明 Bromodomain 结构域与乙酰化组蛋白 3 结合对 BRD7 参与细胞周期的调控有着重要的作用^[7].

溴区结构域 (Bromodomain) 是在进化上高度保守的功能结构域^[8], 该结构域在空间构象上具有鲜明的特征: 它们含有 4 个左手、呈反向平行排列的螺旋, 称为 α_z , α_A , α_B 以及 α_C . 在 α_z 与 α_A 螺旋之间由一个长的环连结, 被称为 (ZA loop). 连结 α_B 与 α_C 之间的环被称为 (BC loop). 在 ZA loop 与 BC loop 中间存在着一些疏水氨基酸, 在 Bromodomain 的立体结构中, 这些疏水氨基酸彼此靠近, 形成一个疏水性的“口袋”, 这个疏水性的“口袋”正是 Bromodomain 与乙酰化组蛋白结合的位点^[9].

本文依据生物信息学的分析结果, 构建 BRD7 的 Bromodomain 不同缺失突变体, 研究上述不同突变体与乙酰化组蛋白 3 的结合, 以及对细胞定位的影响, 从而探讨 Bromodomain 的作用.

另外, 寻找 BRD7 的交互作用蛋白是研究 BRD7 功能的一个重要方向, 采用酵母双杂交系统 (two-hybrid system) 筛选出 6 种与 BRD7 蛋白相互作用的蛋白质, 通过特异性酵母双杂交技术和免疫共沉淀技术, 证实了 BRD7 基因与 BRD2、BRD3 等蛋白有着交互作用. 同时, 国外学者研究发现, BRD7 与 E1B-AP5、IRF-2 (interferon regulatory factor-2) 以及 dishevelled-1^[10-12] 存在交互作用. 以上的分析提示 BRD7 还有可能存在其他未发现的交互作用蛋白, 同时还暗示着 BRD7 可能有着广泛的生物学功能.

通过生物信息学以及综合其他信息, 预测 CBP (CREB-binding protein) 可能是 BRD7 的一个新的交互作用蛋白, 并且通过免疫共沉淀证实了这一结果.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞. COS7: 非洲绿猴肾细胞, 中南大学肿瘤研究所库存.

1.1.2 菌株和质粒载体. 大肠杆菌 JM109 为中南大学肿瘤研究所库存; pCMV-Myc 真核表达质粒: 表达 5' 端含有 Myc 靶的融合蛋白, 具有高度的免疫原性, 含有 Amp 抗性标志, 为 BD 公司产品; pCMV-Myc-BRD7、pCMV-myc-BRD7-BD-mut 为中南大学肿瘤研究所周鸣构建.

1.1.3 试剂. Taq 酶, 限制性内切酶, 蛋白酶 K, RNase (DNase free), 胰酶 (北京华美生物工程有限公司); T4 DNA 连接酶 (MBI 公司); DNase I (RNase free), N-glycosidase F (Roche 公司); Pyrobest DNA polymerase (大连宝生物 (TaKaRa) 公司). 质粒抽提试剂盒 (Minibest plasmid purification kit, TaKaRa 公司); 胶回收试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司); ECL 化学发光检测试剂盒 (Super signal west pico chemiluminescent substrate), 蛋白质浓度测定试剂盒 (BCA protein assay reagent kit) (Pierce 公司); RPMI 1640、DMEM、Lipofectamine、Trizol、ssDNA (Invitrogen 公司); PMSF (Ameresco 公司); Rabbit anti-CBP, peptide acetylated H3-K14 (Upstate 公司); mouse anti-c-myc (BD 公司); protein-A (or G) agarose beads (Santa Cruz 公司); goat anti-mouse IgG, Fc (HRP), goat anti-rabbit IgG, Fc (HRP) (US Biological 公司); anti-mouse IgG (whole molecule) CY3 conjugate antibody developed in Sheep, anti-rabbit IgG (whole molecule) FITC conjugate antibody developed in Sheep (Sigma 公司); DL2000 DNA marker (Takara 公司); λ DNA/Hind III DNA marker (北京华美生物工程有限公司); Broad range protein molecular mass markers (Promega 公司). 聚丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、琼脂糖、过硫酸胺、Tris 以及文中提到的普通试剂购自北京华美生物工程有限公司.

1.2 方法

1.2.1 以 pCMV-BRD7 为模板, 在缺失序列的两侧沿相反方向手工设计缺失引物, 通过 Primer3 (www.genome.wi.mit.edu) 程序进行优化, 由大连 TaKaRa 公司合成. 一步法 PCR 扩增 pCMV-BRD7 的载体及插入基因的序列.

引物序列如下. 1: BRD7-ZA Δ ; 上游引物, 5' cca tga aag aaa aga tca aga, 下游引物: 5' tct gca att gtc tca tca gtt; 2: BRD7-BC Δ ; 上游引物, 5' tcc tat aaa gct gca aag aag ctg ttg cac, 下游引物, 5' tcc gta aat cat ggc att agt aca cat tag; 3: BRD7-A Δ ; 上游引物, 5' gga tcc aat gac tat cag tcc ata gaa gaa, 下游引物, 5' atc cat tgg gtg ttt aat gat cat gga gta; 4: BRD7-3AM; 上游引物, 5' gga tcc tca ttt cct tcc act ttt att gct cct, 下游引物, 5' agc act tgg atc ttt tct ctg caa ttg tct cat cag.

PCR 反应体系: 10 μ l 10 $\times$ 缓冲液, 8 μ l dNTP, 10 μ l model DNA (质粒 pCMV-BRD7),

4 μl 引物, 67.5 μl 双蒸水, 1 μl Pyrobest Taq 酶. 反应条件 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 315 s (30 个循环), 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min.

1.2.2 基因转染. 使用 6 孔板, 每孔加入 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 个细胞和 2 ml 完全培养液. 将 6 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中, 待细胞融合至 50%~80% 水平即可开始转染实验 (一般需要 18~24 h). 在无菌的离心管中准备好 A、B 两种溶液, 每一孔的用量为 A 溶液 (1~2 μg DNA + 100 μl 无血清培养液), B 溶液 (2~25 μl lipofectamine + 100 μl 无血清培养液). 将 A、B 两种溶液温和地混匀, 室温下放置 15~45 min, 使 DNA 与脂质体形成复合体. 用 2 ml 无血清培养液洗涤 6 孔板中的细胞. 往复合体中加入 0.8 ml 无血清培养液 (不含抗生素), 温和混匀, 加入到每个孔里. 将 6 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中, 放 12 h 左右. 换液, 加入新鲜的含血清培养液. 放置 24~48 h. 收获细胞.

1.2.3 蛋白质印迹. 根据待检测蛋白质的大小选择合适浓度的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 每泳道上样 50 μg , 先 80 V 2 h, 再 120 V 4~6 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷室中进行. 电泳结束后, 用电转移法或湿转移法将蛋白质转移到硝酸纤维膜上. 电转移法为 2 h, 湿转移法为 12~18 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷室中进行. 取下硝酸纤维膜用 S-丽春红染色, 观察转膜效率. 3% 脱脂牛奶-TBS 封闭硝酸纤维膜, 室温下摇 1 h. 用 TBS 洗 2 次. 加入一抗 (以 TBS 稀释, 浓度依抗体而定), 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇过夜, TBS 洗 4 次, 每次 5 min. 加入二抗 (以 TBS 稀释, 浓度依抗体而定), 室温摇 1~2 h, TBS 洗 4 次, 每次 5 min. 用 Pirece 公司的 ECL 试剂盒进行化学发光检测. X 光片压片、显影、定影.

1.2.4 肽段结合实验. 将 PCMV-BRD7-myc 以及构建的相关缺失突变体瞬时转染 Cos-7 细胞, 30 h 后收获、裂解细胞 (20% 甘油, 3 mmol/L MgCl_2 , 50 mmol/L HEPES (pH 7.9), 500 mmol/L KCl, 0.1% NP40, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)), 冰上 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃沉淀, 将上清与 2 μg 生物素标记的乙酰化组蛋白 3 的肽段孵育, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 加入孵育液 (20% 甘油, 3 mmol/L MgCl_2 , 50 mmol/L HEPES (pH 7.9), 500 mmol/L KCl, 0.1% NP40, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)) 与链霉亲和素球 (streptavidin beads) 室温孵育 2 h, bead 用孵育液洗涤 30 min, 蛋白质印迹检测.

1.2.5 细胞免疫荧光实验. 将转染细胞接种在盖玻片上, 以冰 PBS 温和地摇荡洗涤 2 次, 自然风干. 以固定液 (1:1 甲醇/丙酮) 固定 30 min. 以冰 PBS 温和地摇荡洗涤 3 次, 每次 2 min. 以 0.25% Triton X-100 浸泡 30 min. 以冰 PBS 温和地摇荡洗涤 3 次, 每次 2 min. 正常血清 (与一抗、二抗不同种属) 封闭 30 min. 一抗 (稀释程度依抗体而定) 孵育, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜. 以冰 PBS 温和地摇荡洗涤 4 次, 每次 10 min. 二抗 (稀释程度依抗体而定) 孵育, 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h. 以冰 PBS 温和地摇荡洗涤 4 次, 每次 10 min. 荧光显微镜下观察.

1.2.6 免疫共沉淀. 往待测蛋白质 (约 500 μl , 400 μg) 中加入 15 μl protein-G (or A) 吸附珠 (agarose beads) (Santa Cruz 公司), 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇荡 1 h. 2 500 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 1.5 min, 离心后将上清转移至另一个离心管. 加入适量抗体至上清中, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇荡 6~12 h. 再加入 20 μl protein-G (or A) 吸附珠, 继续在 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇荡 1~2 h. 2 500 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 1.5 min 离心后将上清弃掉. 往沉淀中加入 250 μl 缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 1% Nonidet P-40, 0.25% 脱氧胆酸钠, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 1 mmol/L NaF, 1 g/L Aprotinin, 1 g/L Leupeptin, 1 g/L Pepstatin), 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇荡 5 min, 离心后将上清弃掉. 往沉淀中加入 250 μl 缓冲液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇荡 5 min, 离心后将上清彻底弃掉. 再重复 2 次. 往沉淀中加入 25 μl 1 $\times$ SDS 样品缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 冰上骤冷. 点样. 余下步骤同蛋白质印迹.

2 结 果

2.1 ZA loop 与 BC loop 的完整性对于 BRD7 结合乙酰化的组蛋白 3 有重要意义

近年来许多研究者采用晶体学研究方法对 Bromodomain 家族的典型成员, 如 CBP、P/CAF、GCN5 等蛋白质的空间构象进行了研究, 结果显示, 这些基因的 Bromodomain 蛋白在空间构象上具有以下特征: 含有 4 个左手、呈反向平行排列的螺旋, 称为 α_z , α_A , α_B 以及 α_C . 在 α_z 与 α_A 螺旋之间有一个长的环连结, 被称为 ZA loop. 连结 α_B 与 α_C 之间的环被称为 BC loop. 在 ZA loop 与 BC loop 中间存在着一些疏水氨基酸, 在 Bromodomain 的立体结构中, 这些疏水氨基酸彼此靠近, 形成一个疏水性的“口袋”, 这个疏水性的“口袋”正是 Bromodomain 与乙酰化的组蛋白结合的位点. 图 1 显示了 P/CAF

基因 Bromodomain 的空间构象模式图, 这有助于更好地了解 Bromodomain 的空间构象.

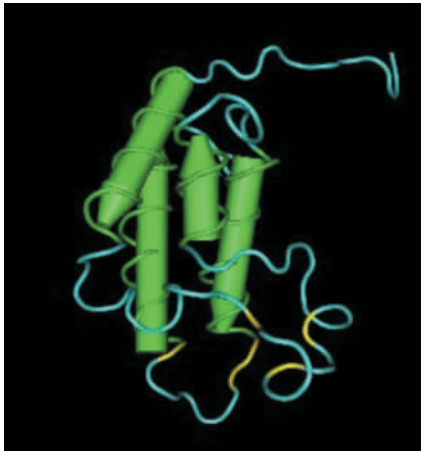


Fig. 1 3-D model of bromodomain (P/CAF)
It contains four α -helices and hydrophobic pocket (yellow part).



Fig. 2 Structure-based sequence alignment of BRD7
The sequences were aligned based on the experimentally determined structures of three Bromodomains, highlighted in red. The predicted secondary structures in BRD7 Bromodomain are in blue. Bromodomain are grouped on the basis of the predicted structural similarities. Residue numbers of the P/CAF Bromodomain are indicated above its sequence. The conserved residues in ZAloop are shaded.

2.1.2 依据生物信息学分析结果, 构建 BRD7 的 Bromodomain 的相关缺失突变体.
依据生物信息学的分析结果, 我们分别构建了 BRD7 的 Bromodomain 的相关缺失突变体, 包括缺失 ZAloop, BCloop, A 螺旋以及突变 ZAloop 中的 3 个氨基酸, 将 “FF...V” 突变为 “GS...S”, 如图 3 中红色斜体所示. 图 3 表明, 采用肽段结合实验检测相关缺失突变体与乙酰化组蛋白 3 的关系, 从而证实生物信息学的分析结果. 在构建 BCloop 以及 A 螺旋缺失突变体时, 为了便于载体的构建与筛选, 引入了 *Bam*H I (GGA, TCC)酶切位点, 它所对应的氨基酸序列为 “GS”. 以上各缺失突变体的载体构建测序结果见图 4.

2.1.1 采用生物信息学对 BRD7 的 Bromodomain 分析, 我们推测其结构域可能具有典型 Bromodomain 家族所具有的空间结构特征.
将 BRD7 的 Bromodomain 序列在蛋白质结构数据库 PDB (protein database) 进行搜索, 发现 hsP/CAF, ScGCN5, hsTAF2d2 具有较高的得分, 并且都是 Bromodomain 家族的典型成员. 通过对 BRD7 的 Bromodomain 二级结构的分析及对 hsP/CAF, ScGCN5, hsTAF2d2 相关文献的复习, 推测 BRD7 的 Bromodomain 可能具有典型 Bromodomain 家族所具有的空间结构特征, 如图 2 所示. 另外, ZAloop 在不同的 Bromodomain 中长度可能有所不同, 但是总是包含有一些保守的氨基酸, 例如 hsP/CAF 中 Phe748, Pro751, Pro758, Tyr760 等就是在 ZAloop 中的保守氨基酸^[7] (图 2 中阴影部分所示).



Fig. 3 Construction of Bromodomain mutation
Construct the mutation including: ZAloop, BCloop, A helix and three residues. The residues “FF...V” were stand for “GS...S” which are indicated by red.



Fig. 4 The Bromodomain mutations was detected by sequencing

(a) BRD7-ZAloopΔ. (b) BRD7-3AM. (c) BRD7-AΔ. (d) BRD7-BCloopΔ.

2.1.3 肽段结合实验检测 Bromdomain 相关缺失突变体与乙酰化组蛋白 3 的结合能力

将上述突变缺失体瞬时转染到 Cos7 细胞中, 采用第 14 氨基酸被乙酰化修饰的组蛋白 3 的肽段, 检测其结合能力, 如图 5 所示, 结果显示: 缺失

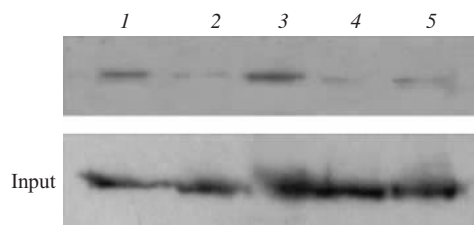


Fig. 5 The interaction between BRD7 or mutant BRD7 and acetylated histone H3 by using histone tail peptides

Wild-type BRD7 and mutants of BRD7 were transiently transfected into COS-7 cells. Twenty-four hours post-transfection, extracts were prepared and subjected to peptide pull-down assay using beads bound to mono-acetylated(Ac) histone H3 N-terminal tails. Proteins retained on the beads were then analyzed by Western blotting using an anti-myc antibody. 1: BRD7-AΔ; 2: BRD7-BCΔ; 3: BRD7; 4: BRD7-ZAΔ; 5: BRD7-3AM.

ZAloop 和 BCloop 后, BRD7 结合乙酰化 H3 能力非常微弱; 突变 3 个氨基酸后, BRD7 结合乙酰化组蛋白 3 能力也有所降低; 而缺失 A 螺旋以后, 对 BRD7 结合乙酰化 H3 能力影响不明显. 上述结果提示我们 ZA loop 与 BC loop 的完整性对于 BRD7 结合乙酰化的组蛋白 3 有着重要的意义.

2.1.4 免疫荧光检测 Bromdomain 相关缺失突变体在细胞中的定位变化

将上述 Bromodomain 相关突变体瞬时转染到 Cos7 细胞中, 与 myc 抗体孵育过夜, PBS 漂洗, 采用 cy3(红色)标记 BRD7-myc, DAPI(蓝色)染色细胞核, 如图 6. 结果显示: 野生型 BRD7 定位在细胞核, 呈细颗粒状均匀分布, Bromodomain 缺失型 BRD7 在细胞核呈聚集粗颗粒状分布, 与前部分结果相一致. 而 BRD7-BCΔ、BRD7-ZAΔ 以及 BRD7-3AM 分别出现了不同程度的核膜聚集现象, BRD7-AΔ 在核内的分布与野生型 BRD7 区别不大. 这说明 BRD7 在细胞核内的分布与其功能有着密切的关系.

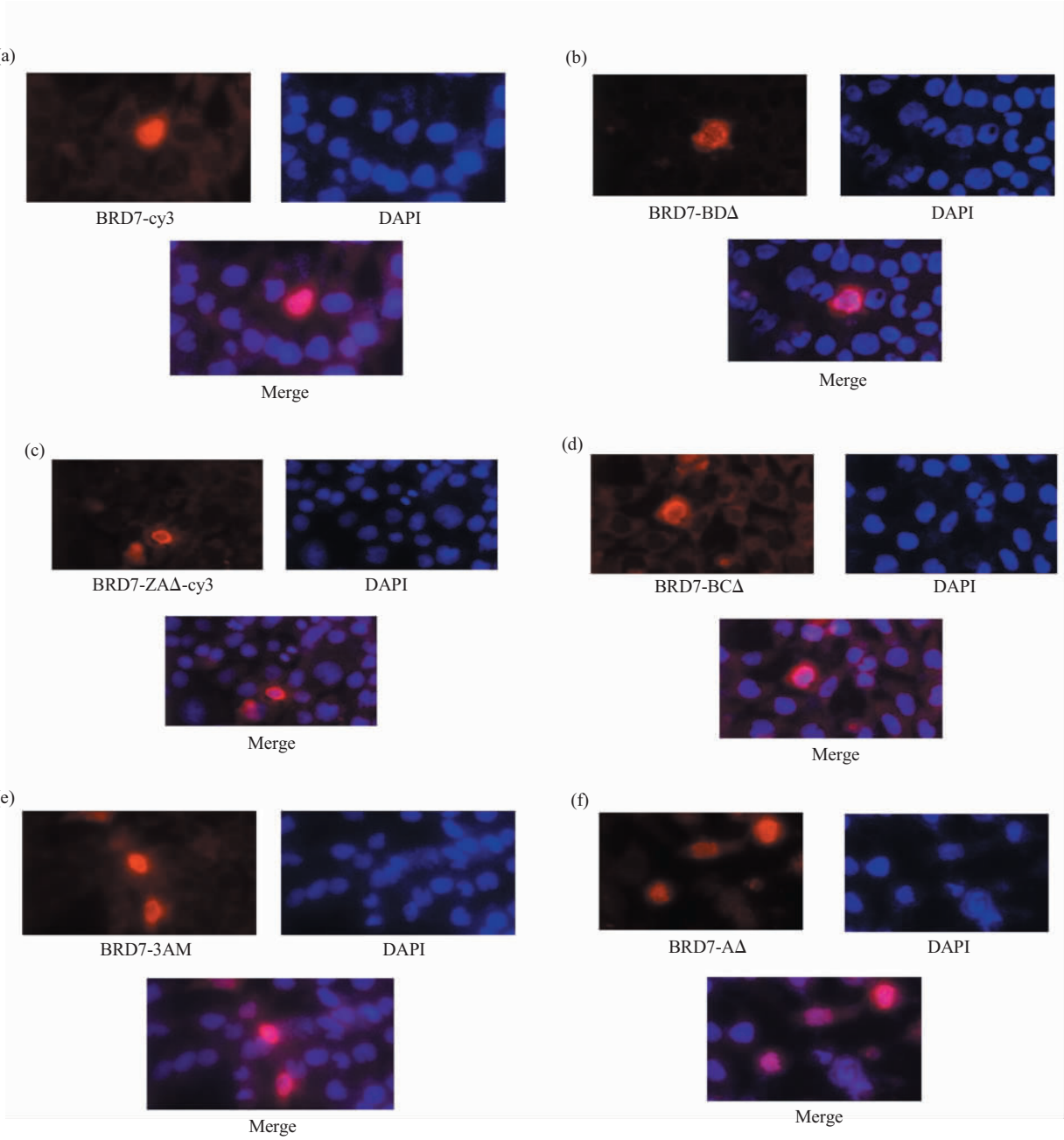


Fig. 6 The effects of wild type BRD7 and mutants of BRD7 on sub-cellular location
(a)Wild type BRD7. (b)BRD7-BDΔ. (c)BRD7-ZAΔ. (d)BRD7-BCΔ. (e)BRD7-3AM. (f)BRD7-AΔ.

2.2 BRD7 的一个交互作用蛋白的初步鉴定

蛋白质与蛋白质、蛋白质与其他分子的相互作用是生物调控的基本单元，对于理解生物调控机制具有重要意义，这也是后基因组时代生命科学与其他学科交叉研究的热点. 为了寻找 BRD7 可能的交互作用蛋白，我们首先采用生物信息学预测 BRD7

可能的交互作用蛋白，如图 7. 经资料的综合分析，推测 CBP 可能是 BRD7 的一个新的交互作用蛋白. 最后，采用免疫共沉淀证实了上述推测 (图 8a)，并且 BRD7 与 CBP 发生交互作用的部位不在 BRD7 的 Bromodomain (图 8b).

Human			Entry information	
potential interactors	score	evi	Entry name	CBP_HUMAN
sws Q92831	1	1	Primary accession number	Q92793
gi 5552299	2	1	Secondary accession numbers	000147 Q16376
gi 479854	1	1	Entered in Swiss-Prot in	Release 36, July 1998
gi 2136248	1	1	Sequence was last modified in	Release 36, July 1998
gi 279714	1	1	Annotations were last modified in	Release 48, September 2005
sws Q92793	1	1	Name and origin of the protein	
gi 5552299	1	1	Protein name	CREB-binding protein
gi 544257	1	1	Synonym	EC 2.3.1.48
gi 4557291	1	1	Gene name	Name: CREBBP
gi 2134877	1	1	Synonyms: CBP	
gi 88893	1	1	From	Homo sapiens (Human) [TaxID: 9606]
gi 4505137	1	1	Taxonomy	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Euarchontoglires; Primates; Catarrhini;
gi 71864	1	1	References	
gi 1209699	1	1	dip 191E	gi 2136308 (2.0e-08)
sws P21675	1	1	dip 40075E	gi 20357588 (2.0e-08)
gi 8400738	1	1	dip 6E	P21675 (1.1e-08)
gi 1363982	1	1	dip 172E	gi 627657 (2.6e-08)
gi 74182	1	1	dip 228E	gi 2136308 (2.0e-08)
			dip 228E	gi 2136308 (2.0e-08)

Fig. 7 Prediction of a potential interaction protein with BRD7

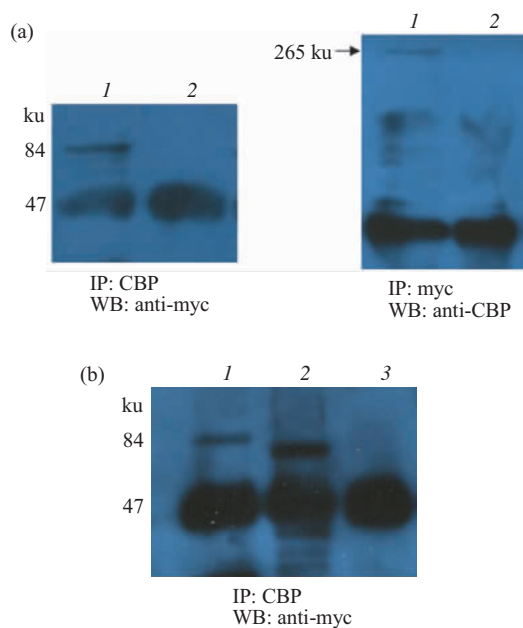


Fig. 8 Immunoprecipitation analysis of the binding of BRD7 or the Bromodomain deleted BRD7 to CBP

Extracts from cells transfected with BRD7 or BRD7-mutant and empty vector were immunoprecipitation with the antibodies indicated above the panels. Precipitates were detected by immunoblot analysis using the indicated antibodies. (a) 1: Cos-7/BRD7; 2: Cos-7/vector. (b) 1: Cos-7/BRD7; 2: Cos-7/BRD7-BD-mut; 3: Cos-7/vector.

3 讨 论

近年来研究者采用晶体学研究方法对 Bromodomain 蛋白的空间构象进行了深入的研究, 结果显示 Bromodomain 在空间构象上具有以下特征: 含有 4 个左手、呈反向平行排列的螺旋, 称为

α_z , α_A , α_B 以及 α_C . 在 α_z 与 α_A 螺旋之间由一个长的环连接, 被称为 ZA loop. α_B 与 α_C 之间由一个较短的环连接, 称为 BC loop. 在 ZA loop 与 BC loop 中间存在着一些疏水氨基酸, 在 Bromodomain 的立体结构中, 这些疏水氨基酸彼此靠近, 形成一个疏水性的“口袋”, 这个疏水性的“口袋”正是 Bromodomain 与乙酰化的组蛋白结合的位点. 虽然 ZAl loop 在不同的 Bromodomain 中长度可能有所不同, 但是总是包含有一些保守的氨基酸, 这些保守的氨基酸正体现了 Bromodomain 在进化中保守的特性.

目前, 研究者对 Bromodomain 结构域中 ZAl loop 和 BC loop 对与 Bromodomain 结合乙酰化组蛋白中的影响进行了深入的研究, Christophe 等^[13]对 Bromodomain 蛋白 BRDT 的研究显示, 当突变其 Bromodomain 中 ZAl loop 的 3 个氨基酸后, BRDT 失去了与乙酰化组蛋白 4 的结合; Kanno 等^[14]突变 BRD3 中 ZAl loop 以及 BC loop 中各 2 个氨基酸后, 严重影响了 BRD3 与乙酰化组蛋白 4 的结合. 最新的研究进展来自于 Pizzitutti 等^[15]对 GCN5 的研究, 他们发现 GCN5 的 371Pro 氨基酸对于稳定 ZAl loop 空间构象以及对于结合乙酰化的组蛋白都有着重要的作用.

运用生物信息学以及综合文献, 我们初步获得了组成 BRD7 Bromodomain 4 个螺旋的氨基酸位置信息, 并且依据此结果构建了 Bromodomain 的相关突变体. 结果显示: 缺失 ZAl loop 和 BC loop 后, BRD7 结合乙酰化 H3 能力非常微弱; 突变 3 个氨基酸后, BRD7 结合乙酰化组蛋白 3 能力也有

所降低;而缺失 A 螺旋以后,对 BRD7 结合乙酰化 H3 能力影响不明显,这说明 ZAl loop 和 BC loop 结构的完整性对于 BRD7 的 Bromodomain 结合乙酰化组蛋白 3 具有至关重要的作用.而通过免疫荧光显示:BRD7-BC Δ 、BRD7-ZA Δ 以及 BRD7-3AM 分别出现了不同程度的核膜聚集现象;BRD7-A Δ 在核内的分布与野生型 BRD7 区别不大.这说明 ZAl loop 和 BC loop 结构的完整性能影响 BRD7 在细胞核内的分布,并且这种定位模式的改变与其结合乙酰化组蛋白 3 的功能有着密切的联系.

蛋白质为生命活动的体现者,每一种蛋白质不是孤立存在于细胞中,而是与其他蛋白质一起进行相互作用来行使其功能,从而使得细胞中所有蛋白质形成一个相互作用的网络.对新基因功能研究的一个重要手段就是寻找该基因的交互作用蛋白,通过分析该基因是否与功能已知的蛋白质相互作用,即可得到揭示其功能的线索.实践告诉我们,如果两个蛋白质存在相互作用,那么它们一般参与相同或相关的细胞活动.

本研究当中,发现 BRD7 可能与 CBP 蛋白存在交互作用.CBP 蛋白具有重要的生物学功能,它广泛参与细胞的各种生物学活动,CBP/p300 具有多种功能:a.作为转录因子和基本转录复合物之间的桥梁.超过 2 400 个氨基酸残基组成的 CBP/p300 是一个巨大的蛋白质,可以形成许多不同的表面结合区,这样 CBP/p300 在同一时间可以与多种蛋白质结合.b.CBP/p300 能够乙酰化组蛋白和非组蛋白.CBP/p300 具有组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferase, HAT)活性,能够乙酰化核心组蛋白.另外,CBP/p300 还能够乙酰化包括转录因子在内的非组蛋白^[16].c.参与细胞周期的调控.CBP/p300 是腺病毒癌蛋白 E1A 的靶蛋白,而 E1A 能够与 pRB 结合,抑制 pRB 的功能,从而促进细胞进入 S 期.有研究表明,CBP/p300-P/CAF 蛋白复合物可以阻止细胞周期进程,而当 E1A 结合到 CBP/p300 后,能够抑制其功能.有关 CBP/p300 的另外一个重要的问题是它们的 HAT 活性在细胞周期进程中的作用.有证据表明,在 G1~S 转换时,CBP/p300 的 HAT 活性达到最高,另外,cyclinE/CDK2 复合物能够将 CBP/p300 磷酸化,磷酸化后的 CBP/p300 的 HAT 活性明显增强,同时 E1A 也能激活它们的 HAT 活性^[17],以上结果都表明 CBP/p300 的 HAT 活性参与了细胞周期的进程.

寻找 BRD7 的交互作用蛋白是研究 BRD7 功能的一个重要方向,通过特异性酵母双杂交技术和免疫共沉淀技术,证实了 BRD7 基因能与 BRD2、BRD3 等蛋白质有着交互作用.同时,国外学者研究发现,BRD7 与 E1B-AP5、IRF-2 (interferon regulatory factor-2) 以及 dishevelled-1 存在交互作用.另外,IRF-2 是 BRD7 的一个交互作用蛋白,研究显示,IRF-2 被乙酰化修饰后参与了对细胞生长的调控,而负责对 IRF-2 进行乙酰化修饰的酶正是 CBP/P300^[18],那么 BRD7、CBP/p300 以及 IRF-2 这三者之间究竟存在怎样的联系,是一个有趣的问题.

参 考 文 献

- 1 周 鸣,彭 聪,李桂源,等. BRD7 交互作用蛋白 BRD2、BRD3 在鼻咽癌中的表达和作用模式. 癌症, 2003, **22** (2): 123~127
Zhou M, Peng C, Li G Y, *et al.* Chinese Journal of Cancer, 2003, **22** (2): 123~127
- 2 余 鹰,朱诗国,李桂源,等. BRD7 基因转染对鼻咽癌细胞生长的抑制作用. 癌症, 2001, **20** (6): 4~10
Yu Y, Zhu S G, Li G Y, *et al.* Chinese Journal of Cancer, 2001, **20** (6): 4~10
- 3 彭 聪,谭 琛,李小玲,等. 新基因 BRD7 对鼻咽癌蛋白质表达谱影响的初步研究. 生物化学与生物物理进展, 2003, **30** (5): 721~725
Peng C, Tan C, Li X L, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2003, **30** (5): 721~725
- 4 彭 聪,李小玲,李桂源,等. 鼻咽癌相关基因 BRD7 对鼻咽癌细胞 CNE1 的影响. 生物化学与生物物理进展, 2005, **32** (9): 842~850
Peng C, Li X L, Li G Y, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2005, **32** (9): 842~850
- 5 Zhou J, Ma J, Li G Y, *et al.* BRD7, a novel bromodomain genes inhibits cell cycle G1-S progression by transcriptionally regulating some importance molecules involved in RAS/ERK and RB/E2F pathways. J Cell Physiol, 2004, **200** (1): 89~98
- 6 刘华英,李桂源. 候选抑瘤基因 BRD7 及家族蛋白的功能研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2005, **32** (9): 811~816
Liu H Y, Li G Y. Prog Biochem Biophys, 2005, **32** (9): 811~816
- 7 Peng C, Zhou J, Li G Y, *et al.* The transcriptional regulation role of BRD7 by binding to acetylated histone through bromodomain. J Cell Biochem, 2006, **97** (4): 882~892
- 8 Filetici P, Orngi P, Ballario P. The bromodomain: a chromatin browser. Frontiers in Bioscience, 2001, **6** (1): 866~876
- 9 Owen D J, Ovnaghi P, Yang J C, *et al.* The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gen5p. EMBO J, 2000, **19** (22): 6141~6149
- 10 Staal A, Enserink J M, Stein J L, *et al.* Molecular characterization of celtix-1, a bromodomain protein interacting with the transcription factor interferon regulatory factor 2. J Cell Physiol, 2000, **185** (2):

- 269~279
- 11 Hyshkowska J, Rusch A, Wolf H, *et al.* Regulation of transcription by the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1B-AP5 is mediated by complex formation with the novel bromodomain-containing protein BRD7. *Biochem J*, 2003, **371** (Pt 2): 385~393
 - 12 Kim S, Lee J, Park J, *et al.* BP75, bromodomain-containing M(r) 75 000 protein, binds dishevelled-1 and enhances Wnt signaling by inactivating glycogen synthase kinase-3 beta. *Cancer Res*, 2003, **63** (16): 4792~4795
 - 13 Christophe P P, Caron C, Govin J, *et al.* Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol*, 2003, **23** (15): 5354~5365
 - 14 Kanno T, Kanno Y, Siegel R M, *et al.* Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells. *Molecular Cell*, 2004, **13** (16): 33~43
 - 15 Pizzitutti F, Giansanti A, Ballario P, *et al.* The role of loop ZA and Pro371 in the function of yeast Gcn5p bromodomain revealed through molecular dynamics and experiment. *J Mol Recognit*, 2006, **19** (22): 1~9
 - 16 Sterner E D, Berger L S. Acetylation of histone and transcription related factors. *Microbiol Mol Biol*, 2000, **64** (2): 435~459
 - 17 Goodman R H, Smolik S. CBP/p300 in cell growth, transformation and development. *Genes Dev*, 2000, **14** (13): 1553~1557
 - 18 Masumi A, Yamakawa Y, Fukazawa H, *et al.* Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation. *J Biol Chem*, 2003, **278** (28): 25401~25407

Study The Motif-Bromodomain of BRD7 and Identify a Novel Interaction Protein With BRD7*

PENG Cong^{1)**}, LI Xiao-Ling^{1)**}, LI Xia-Yu³⁾, LIU Hua-Ying¹⁾, ZHOU Ming¹⁾,
ZHANG Li-Ming¹⁾, LUO Xiao-Min¹⁾, SHEN Shou-Rong²⁾, LI Gui-Yuan^{1)***}

¹⁾Cancer Research Institution, Central South University, Changsha 410078, China;

²⁾The Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410078, China;

³⁾The Xiangya Medicine College, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract BRD7, a novel NPC-related gene, was isolated through cDNA representational difference analysis (RDA). The studies showed that wild-type BRD7 interacted with H3 peptide acetylated at Lys14, while the bromodomain deleted mutant lost this ability. Bromodomain is an evolutionally conserved domain which forms a bundle of four α -helices (α_A , α_B , α_C) and two loops (ZA loop, BC loop). Alignment of the amino acid sequence of BRD7 protein with known structure of proteins in PDB (protein database), it was considered that Bromodomain of BRD7 has the same characteristic. Based on results of bio-informatics, mutants of Bromodomain were constructed. The peptide binding assays was performed to detect the binding of mutants with acetylated histone H3. The results indicated that two loops (ZA loop, BC loop) were essential for Bromodomain binding to acetylated histone H3, while two loops (ZA loop, BC loop) could influence the sub-cellular location of BRD7 through indirect immunofluorescence. At last, it was found that the CBP (CREB binding protein) is a novel interaction protein of BRD7. The CBP not only has histone acetyltransferases (HATs) to acetylate lysines on N-terminal tails of histones but also plays a key role as co-activator for a wide variety of transcription factors.

Key words Bromodomain-containing 7 protein (BRD7), Bromodomain, acetylated histone H3, CBP (CREB-binding protein)

*This work was supported by grants from The Hunan Natural Science Foundation (04JJ3097) and The National Natural Science Foundation of China (30400528).

**The two authors contributed equally to this work.

***Corresponding author . Tel: 86-731-4805383, E-mail: Ligy@xysm.net

Received: April 8, 2006 Accepted: June 2, 2006