

含磷酸结合口袋的 BRCT 结构域功能位点预测

盛自章^{1,2}, 黄京飞^{1,3,*}

(1. 中国科学院昆明动物研究所 遗传资源与进化国家重点实验室, 云南 昆明 650223; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049;
3. 中国科学院昆明动物研究所和香港中文大学生物多样性和人类疾病模型联合研究中心, 云南 昆明 650223)

摘要: BRCT(BRCA1 C-terminus)是真核生物 DNA 损伤修复系统重要的信号传导和蛋白靶向结构域。为了探讨含磷酸结合口袋的 BRCT 与磷酸化配体结合的机制, 对 XRCC1 BRCT1、PTIP BRCT4、ECT2 BRCT1 和 TopBP1 BRCT1 进行了结构保守性和表面静电势分析。结果显示, 4 个 BRCT 的磷酸结合口袋周围所存在的结构保守并带正电势的沟槽很可能是其功能位点, 并且类似的沟槽在含磷酸结合口袋的 BRCT 中普遍存在。沟槽两侧及底部均带有极性氨基酸残基, 两侧带正电荷, 而底部疏水。这说明沟槽与配体的结合以静电和疏水相互作用为主。沟槽主要位于单个 BRCT 中, 而且 4 个 BRCT 的沟槽在形状和电荷分布上都不同, 说明 BRCT 配体特异性主要由单个 BRCT 决定。磷酸结合口袋位于沟槽中心, 说明沟槽可能同时结合磷酸化残基的 N 端和 C 端附近残基。

关键词: BRCT 结构域; 磷酸结合口袋; DNA 损伤修复; 表面静电势

中图分类号: Q5-3; Q811.4; TP399; R711.75 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2011)05-0509-06

Functional site prediction of BRCT domain containing phosphate binding pocket

SHENG Zi-Zhang^{1,2}, HUANG Jing-Fei^{1,3,*}

(1. State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223 China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049 China; 3. Kunming Institute of Zoology-Chinese University of Hong Kong Joint Research Center for Bio-resources and Human Disease Mechanisms, Kunming 650223, China)

Abstract: The BRCT domain (after the C-terminal domain of a breast cancer susceptibility protein) is an important signaling and protein targeting motif in the DNA damage response system. To clarify possible interaction mechanisms between the BRCT domain, which contains phosphate binding pocket and its phosphorylated ligand, we analyzed the structural conservation and electrostatic surface potentials of XRCC1 BRCT1, PTIP BRCT4, ECT2 BRCT1 and TopBP1 BRCT1. The results showed common structurally conserved and positively charged grooves located around the phosphate binding pockets of these domains. These grooves possibly act as functional sites in the four BRCT domains due to the extensive existence of similar grooves in the BRCT domains containing phosphate binding pocket. The two sides of the groove were composed of positively charged and hydrophilic residues and the bottom was composed of hydrophobic and hydrophilic residues, suggesting that the groove binds to BRCT domain ligand mainly through electrostatic and hydrophobic interactions. The groove was mainly located in individual BRCT domains and differences in shape and charge distribution among the four BRCT domain grooves were observed, indicating that ligand binding specificity was predominantly determined by individual BRCT domains. The groove was centered by the phosphate binding pocket, implying that the groove interacted with residues located at both the N-terminal and C-terminal sides of the phosphorylated residue.

Key words: BRCT domain; Phosphate binding pocket; DNA damage repair; Electrostatic surface potential

BRCT(BRCA1 C-terminus)结构域最早发现于 乳腺癌相关蛋白 BRCA1 中, 后来发现它还广泛存 在于真核生物的 DNA 损伤修复蛋白中(Bork et al, 1997)。BRCT 结构域能够识别被 DNA 损伤探测蛋

收稿日期: 2011-04-11; 接受日期: 2011-07-01

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目“973”(2009CB941302); 国家自然科学基金项目(30470939、30623007); 中国科学院基金项目(2007211311091)

*通讯作者(Corresponding author), E-mail: huangjf@mail.kiz.ac.cn

白如 ATM (ataxia telangiectasia mutated protein)或 ATR(ATM-Rad3-related kinase)磷酸化修饰的蛋白,并将 DNA 损伤的信号传导给下游分子;也可以通过与非磷酸化的蛋白相互作用将修复蛋白靶向到 DNA 损伤位点(Dulic et al, 2001; Mohammad & Yaffe, 2009; Glover et al, 2004)。BRCT 结构域包含约 95 个氨基酸残基,其二级结构主要由 3 个 α -螺旋围绕 4 个平行的 β -片层组成(β 1- α 1- β 2- β 3- α 2- β 4- α 3, α 1-和 α 3-螺旋位于 β -片层的一侧, α 2-螺旋则位于另一侧)(Zhang et al, 1998)。在 DNA 连接酶 III 和 XRCC1(X-ray repair cross complementing protein 1)等蛋白中, BRCT 结构域以单体形式存在并发挥功能(Dulic et al, 2001)。在 BRCA1 和 MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint 1)等蛋白中, BRCT 结构域则由序列上相隔 20~30 个氨基酸残基的两个 BRCT 组成二联体。根据两个 BRCT 相互作用方式的不同可将其分为 I 类和 II 类二联体(Sheng et al, 2011; Rappas et al, 2011): I 类二联体的两个 BRCT 通过 N 端 BRCT(BRCTa)的 α 2-螺旋与 C 端 BRCT(BRCTb)的 α 1-和 α 3-螺旋形成三螺旋束的形式结合,两个 BRCT 的 β -片层相互平行,如 BRCA1 和 MDC1 中的二联体(Williams et al, 2001, Glover et al, 2004); II 类二联体的两个 BRCT 可能通过 BRCTa 的 α 2-螺旋与 BRCTb 的 β -片层底部结合,两个 BRCT 的 β -片层相互垂直,如 PTIP (PAX transcription activation domain interacting protein 1)BRCT1-2 和 BRCT3-4, TopBP1 BRCT4-5 (Rappas et al, 2011; Sheng et al, 2011)。在 TopBP1 (topoisomerase (DNA) II binding protein 1)和 Ect2 (epithelial cell transforming sequence 2)的 N 端, BRCT 结构域由序列上相隔~20 个氨基酸残基的三个 BRCT 组成(TopBP1 BRCT0, BRCT1 和 BRCT2)(三联体),相邻的两个 BRCT 也是以 β -片层相互垂直的方向相互结合(Rappas et al, 2011; Sheng et al, 2011)。

研究表明,很多 BRCT 结构域均含有由位于 β 1- C 端邻接的 Ser 和 Gly, α 1- N 端的 Arg 和 α 2- N 端的 Lys 组成的磷酸结合口袋(Williams et al, 2004)。磷酸结合口袋与这些 BRCT 的功能紧密相关,例如, RFC1(replication factor C large subunit)中的单体 BRCT 可以结合 DNA 末端的磷酸(Kobayashi et al, 2010)。但研究最清楚的是 I 类二联体识别特异磷酸化蛋白的机制。磷酸化蛋白识别口袋由 BRCTa 的磷酸结合口袋延伸至 BRCTa 与 BRCTb 相互作用的三螺旋束区。BRCTa 的磷酸结合口袋结合磷酸丝氨

酸(磷酸丝氨酸结合区),而三螺旋束区结合磷酸丝氨酸 C 端第一到第三位的残基(特异性决定区)(Williams et al, 2004)。此外,磷酸结合口袋还存在于一些参与蛋白内或蛋白间相互作用的单体、II 类二联体和三联体的 BRCT 中。由于这三类 BRCT 与 I 类二联体结构上的差异,而且 II 类二联体的磷酸结合口袋位于 BRCTb 而不是 BRCTa,它们并不含有 I 类二联体的决定识别特异性的三螺旋束区。研究表明这三类 BRCT 也可以结合含有磷酸基的配体(Yu et al, 2003; Rappas et al, 2011; Masson et al, 1998; Munoz et al, 2007; Kim et al, 2005),但具体机制不清楚。因此,本研究对这三类 BRCT 进行了结构保守性和表面静电势分析,并对其结合磷酸化配体的机制进行了探讨。

1 材料与方法

BRCT 结构域的结构主要来源于 PDB 数据库(表 1)。ECT2 BRCT0-2 和 PTIP BRCT3-4 的同源模建使用 Discovery Studio 2.5; ECT2 BRCT0-2 和 PTIP BRCT3-4 同源模建的模板分别是 TopBP1 BRCT0-2 和 TopBP1 BRCT1-2(PDB ID: 2xnk)(Sheng et al, 2011)。ECT2 BRCT0-2 和 PTIP BRCT3-4 与模板的序列比对使用“Align Multiple Sequences”模块;对于每个要模建的对象,首先使用默认参数产生 20 个结构,每个结构进行环区优化产生 10 个结构,在产生的 200 个结构中选取总能量最低的作为模建结果。两个模建结构用 Profile-3D 进行结构兼容性评估。XRCC1 BRCT1、PTIP BRCT3-4、ECT2 BRCT0-2 和 TopBP1 BRCT0-2 的同源序列来自 NCBI nr 数据库,序列搜索使用 Blastp,采取默认参数(Altschul et al, 1997)。使用 MAFFT 方法,采取 genafpair 策略(Katoh et al, 2002)分别对 XRCC1 BRCT1、PTIP BRCT3-4、ECT2 BRCT0-2 和 TopBP1 BRCT0-2 的同源序列进行比对。将每个序列比对文件和对应的 BRCT 结构文件提交到 ConSurf 网站,使用最大似然法依次计算 XRCC1 BRCT1、PTIP BRCT3-4、ECT2 BRCT0-2 和 TopBP1 BRCT0-2 的结构保守性(Landau et al, 2005)。表面静电势计算使用 PyMol 中的 APBS 模块(Schrodinger, 2010; Baker et al, 2001),采取默认参数。

2 结果

本研究主要分析了 XRCC1 BRCT1(单体)、PTIP

表 1 本文使用的 BRCT 结构域的结构
Tab. 1 Structures of BRCT domains

BRCT 结构域 BRCT domain	PDB 编号 PDB ID	BRCT 类型 BRCT type	磷酸结合口袋残基 Phosphate binding pocket residues	沟槽区保守的残基 Conserved residues in groove
XRCC1 BRCT1	2d8m	single	S328(9),G329(9),R335(9), T367(9),K369(9)	F330(8),Q331(9),N332(9),P333(9),F334(8),R339(9),L343(8),K348(8),Y349(9), R350(7),A363(9),F364(8),R382(8), K383(9)
XRCC1 BRCT2	1cdz	single	no	no
REV1 BRCT	2ebw	single	N57(9),G58(9),K99(9)	R68(8),M72(8),H79(7),Y81(8),N94(7), L95(9),P95(9)
RFC1 BRCT	2ebu	single	T415(9),G416(9),R423(9),K458(9)	K436(7),V437(8),T438(7),S442(8),K443(8), K444(9),K461(9)
Pes1 BRCT	2ep8	single	no	no
TopBP1 BRCT6	3pd7	single	no	no
BRCA1 BRCT	1t2v	dGroup I	BRCTa:S1655(8), G1656(6),T1700(9),K1702(9)	SDR:R1699(8),L1701(8),F1704(7),N1774(7), M1775(7),R1835(5),L1839(6)
MDC1 BRCT	2azm	dGroup I	BRCTa:T1898(9),G1899(9),T1932(9), K1936(9)	SDR:V1932(8),R1933(9),P2009(9)
PTIP BRCT3-4	-	dGroup II	BRCTb:T714(7),G715(9),K755(9)	R721(9),K725(7),A733(9),K734(6),Y735(5), T736(8),Y738(7),C740(8),K758(6), W762
ECT2 BRCT0-2	-	triple	BRCT1:T153(9),G154(8),K195(9)	F155(8),R156(8),K157(5),K158(7),L161(5), V165(8),H169(9),V174(8),I175(9), R176(9),K177(9),D178(6),F179(5),N180(5), E194(6),V198(6),L202(7)
TopBP1 BRCT0-2	2xnk	triple	BRCT1:T114(8),S115(8),K155(9) BRCT2:T208(8),G209(5),K250(9)	BRCT1:R121(9),V135(7),D138(7),L139(7), N140(7),K154(5),V158(5),N161(6) BRCT2:L210(6),R215(9),K216(6),N219(5), Y229(8),M230(6),G231(9),N232(5), L233(8),G248(8)

“-”代表该结构来自同源模建。dGroup I 表示 I 类二联体, dGroup II 表示 II 类二联体。小括号内数值为使用 ConSurf 计算的保守性打分。“SDR”表示特异性决定区。

“-”means the structure was derived from homology modeling. dGroup I means group I double BRCT, dGroup II means group II double BRCT. The value in the parenthesis is the conservation score calculated by ConSurf. “SDR”means specificity determining region.

BRCT3-4(II 类二联体)、ECT2 BRCT0-2 和 TopBP1 BRCT0-2(三联体)的结构保守性和表面静电势。PTIP BRCT3-4 和 ECT2 BRCT0-2 的三维结构通过同源模建得到, 模建结构的 Profile-3D 打分都位于最小期望值和最大期望值之间(PTIP BRCT3-4 打分为 62.36, 最小和最大期望值分别为 37.94 和 84.31; ECT2 BRCT0-2 打分为 96.45, 最小和最大期望值为 56.68 和 125.96), 说明模建结构是合理的。结构保守性分析显示, XRCC1 BRCT1、PTIP BRCT4、ECT2 BRCT1、TopBP1 BRCT1 和 TopBP1 BRCT2 中的磷酸结合口袋残基是保守的(残基 ConSurf 打分 6~9, 表 1), 由于前四个 BRCT 有结合磷酸化配体的报道(Rappas et al, 2011; Masson et al, 1998; Munoz et al, 2007; Kim et al, 2005), 所以我们下一步的分析主要针对前 4 个 BRCT。结果显示, XRCC1 BRCT1、PTIP BRCT4、ECT2 BRCT1 和 TopBP1 BRCT1 的磷酸结合口袋周围还存在一些保守的区域(残基 ConSurf 打分 5~9, 表 1)。XRCC1 BRCT1 的磷酸结合口袋周围有两个保守的区域: 一个由 $\alpha 1$ -和 $\beta 2$ -组成, 另一个由 $\alpha 1$ -和 $\alpha 3$ -组成(图 1A)。PTIP BRCT4 和 TopBP1

BRCT1 的表面保守区组成相似, 都是由 $\alpha 1$ -延伸到 $\beta 2$ -和 $\beta 3$ -之间的环区(图 1B, C)。ECT2 BRCT1 的表面保守区由 $\alpha 1$ -至 $\beta 2$ -区域延伸到 BRCT0 和 BRCT1 相互作用的区域(图 1D)。这四个 BRCT 的保守区都在结构域表面形成以磷酸结合口袋为中心的沟槽。此外, 这些 BRCT 表面不存在其它由三个或更多残基组成的保守区域。因此, 磷酸结合口袋及其周围的保守区形成的沟槽可能是这些 BRCT 重要的功能位点。

表面静电势分析显示, 这四个 BRCT 的磷酸结合口袋和保守区都带有较强的正电势(图 1E, H)。沟槽保守性和静电势的一致性提示我们, 这种沟槽可能是含有磷酸结合口袋的 BRCT 结构域的共同特征。为了验证这一假设, 我们还分析了其它含有磷酸结合口袋的 BRCT。结果显示, 结构较保守(ConSurf 打分 5~9 的残基组成)的带正电势的沟槽也存在于一些蛋白如 REV1(deoxycytidyl transferase)中的单体 BRCT(表 1), II 类二联体的 BRCTb 如 PTIP BRCT2 和 TopBP1 BRCT5(未给出具体数据)。I 类二联体的特异性决定区也带有正电势并且周围是中性或带负电势区(图 1I), RFC1 结合 DNA 的位点

也带有正电势(未给出具体数据)。此外, 在一些不含磷酸结合口袋的单体 BRCT 如 XRCC1 BRCT2(图 1J)、Pes1(pescadillo homolog 1) BRCT 和 TopBP1 BRCT6 中, 磷酸结合口袋等同的位置不含或只有由结构上不保守(ConSurf 打分 1~4)的少于五个残

基组成的正电势区域。因此, 磷酸结合口袋周围带正电势的保守的沟槽很可能是 BRCT 与含有磷酸基团的配体相互作用的位点。

我们对 XRCC1 BRCT1、PTIP BRCT4、ECT2 BRCT1 和 TopBP1 BRCT1 进行比较后发现, 虽然

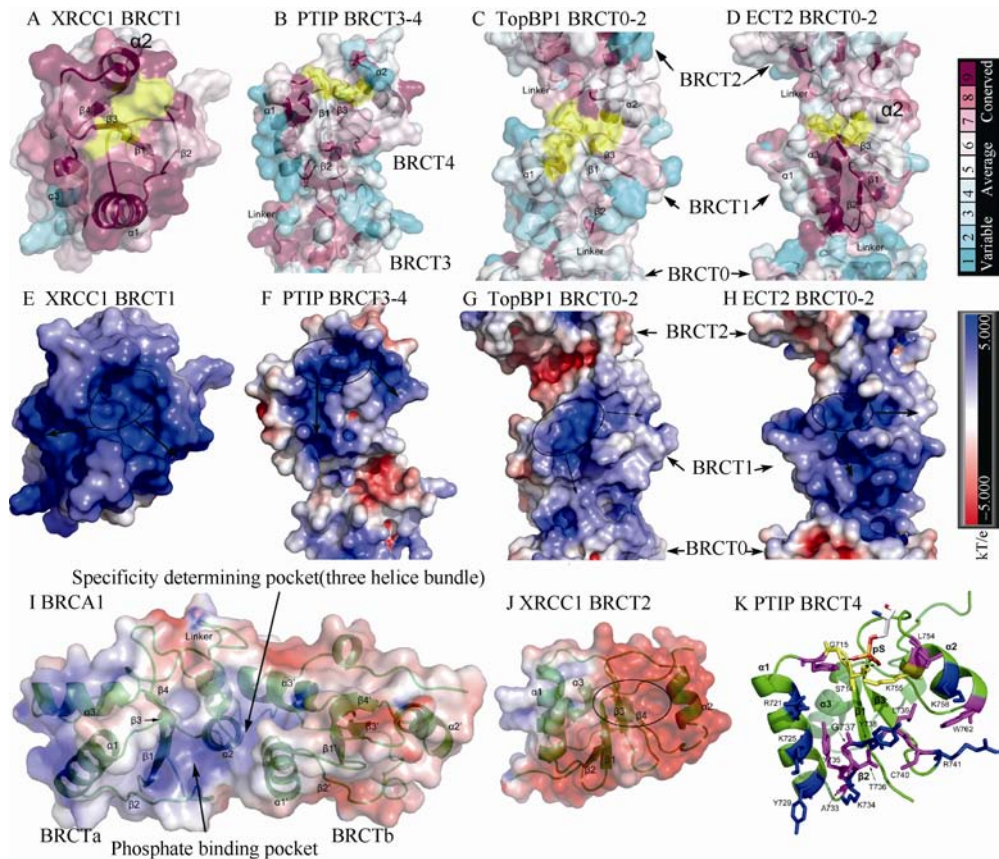


图 1 BRCT 结构域的结构保守性和表面静电势

Fig. 1 The structural conservation and electrostatic surfaces of BRCT domains

(A-D): XRCC1 BRCT1 (PDB:2d8m), PTIP BRCT4, TopBP1 BRCT1(PDB:2xnk)和 ECT2 BRCT1 结构保守性的半透明视图.磷酸结合口袋用黄色显示(ConSurf 打分 7~9), 二级结构元件和 BRCT 结构域之间的连接区被标出。

(E-H): XRCC1 BRCT1, PTIP BRCT4, TopBP1 BRCT1 和 ECT2 BRCT1 的表面静电势。图 1E~1H 的视图角度分别与图 1A~1D 相同。磷酸结合口袋用椭圆标出, 沟槽用箭头标出。

I: BRCA1 BRCT 结构域的表面静电势。

J: XRCC1 BRCT2 的表面静电势。磷酸结合口袋区域用椭圆标出。

K: PTIP BRCTb 沟槽的氨基酸残基排布。结合磷酸的残基用黄色显示, 残基与磷酸的相互作用用虚线标出。沟槽两侧的残基用蓝色显示, 沟槽底部的残基用洋红色显示。

(A-D): the transparent surface view of structural conservation of XRCC1 BRCT1 (PDB:2d8m), PTIP BRCT4, TopBP1 BRCT1(PDB:2xnk), and ECT2 BRCT1. The phosphate binding pockets are highly conserved (consurf scores: 7-9) and colored yellow. The secondary structural elements and the linker between BRCT domains were labeled.

(E-H): the electrostatic surfaces of XRCC1 BRCT1, PTIP BRCT4, TopBP1 BRCT1, and ECT2 BRCT1. Figure 1E-1H are in the same angles as Figure 1A-1D respectively. The phosphate binding pockets were labeled with ellipse. The directions of grooves were shown with arrows.

I: the transparent view of electrostatic surface of BRCA1 BRCT (PDB:1t2v).

J: the transparent view of electrostatic surface of XRCC1 BRCT2 (PDB:1cdz). The phosphate binding pocket region was labeled with ellipse.

K: the groove residue arrangement in PTIP BRCT4. The phosphate binding residues were colored yellow. The possible interactions between phospho-serine and the phosphate binding pocket were shown with dashed lines. The residues at the two sides of the groove were colored blue and the residues at the bottom of the groove were colored magenta.

这四个 BRCT 磷酸结合口袋周围的沟槽在形状上有所差异, 但都包含 $\alpha 1$ 至 $\beta 2$ 区。四个 BRCT 的 $\alpha 1$ 至 $\beta 2$ 区都含有保守的 Arg, Lys 或 His, 但并没有发现在四个 BRCT 中均保守的残基(图 2), 说明电荷在这些 BRCT 沟槽中的分布是不同的。PTIP BRCT4、ECT2 BRCT1 和 TopBP1 BRCT1 的沟槽都包含由 $\alpha 2$ 和位于 $\beta 2$ 和 $\beta 3$ 之间的环区构成的表面区域, 但三个 BRCT 在该区域也没有共同保守的残基。这种

沟槽区电荷分布和残基差异说明这些 BRCT 可能结合不同的配体。磷酸结合口袋位于沟槽的中心, 说明沟槽可能能够同时结合配体磷酸化氨基酸残基的两端序列。I 类二联体的特异性决定区由 BRCTa 延伸至 BRCTb, 与此不同的是, XRCC1 BRCT1、PTIP BRCT4、ECT2 BRCT1 和 TopBP1 BRCT1 的沟槽主要分布于这四个 BRCT 内部, 说明识别特异性主要由单个 BRCT 决定。

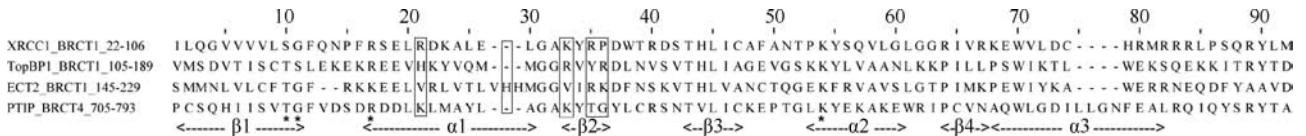


图 2 人 XRCC1 BRCT1, PTIP BRCT4, TopBP1 BRCT1 和 ECT2 BRCT1 的序列比对

Fig. 2 Sequence alignment of human XRCC1 BRCT1, PTIP BRCT4, TopBP1 BRCT1, and ECT2 BRCT1

结合磷酸基团的残基用星号标出, 形成沟槽的带正电荷残基用长方形标出。

The phosphate binding residues were marked with stars. The positively charged residues forming the groove were marked with rectangles.

此外, 根据我们构建的四个 BRCT 结构模型, 我们还分析了沟槽氨基酸残基在其空间结构中的位置分布情况。结果显示, 沟槽两侧多为带正电荷和极性的氨基酸残基, 而底部多为疏水和极性氨基酸残基(图 1K)。尽管 I 类二联体的特异性决定区也具有类似的残基分布(Williams et al, 2004), 但以上四个 BRCT 的沟槽含有三到四个带正电荷的氨基酸残基($\alpha 1$ 至 $\beta 2$ 区), 而 I 类二联体如 BRCA1 和 MDC1 的特异性决定区只含有一到两个带正电荷残基 (人 BRCA1: Arg1699 和 Arg1835)。因而, 沟槽区的更强的正电势使得这类 BRCT 结构域更倾向于结合带负电的配体。

3 讨论

本研究发现 XRCC1 BRCT1、PTIP BRCT4、ECT2 BRCT1 和 TopBP1 BRCT1 的磷酸结合口袋周围都有结构较保守的带正电势的沟槽, 类似的沟槽也存在于其它含有磷酸结合口袋的 BRCT 结构域中。而且 RFC1 中的沟槽是其结合 DNA 末端的区域, I 类二联体中的沟槽是其结合磷酸化蛋白的特异性决定区(Glover et al, 2004; Kobayashi et al, 2010)。这些结果说明, 我们分析的这四个 BRCT 的沟槽区可能具有容纳配体中磷酸基团附近区域的能力。

这四个 BRCT 可能采取与 I 类二联体相似的配体结合机制。在 I 类二联体中, 磷酸结合口袋残基与配体磷酸丝氨酸中的磷酸基团形成氢键或盐键; 特异性识别区两侧的正电残基与配体中的负电残

水性氨基酸残基(Williams et al, 2004)。我们所研究的四个 BRCT 的沟槽区具有与 I 类二联体特异性识别区相似的残基空间排布, 说明这四个 BRCT 与配体的结合方式可能与 I 类二联体与配体的结合方式相似, 而且沟槽区的极性残基也可能与配体形成氢键。其中, 氢键和盐键等可能与配体结合亲和性有关, 疏水相互作用与配体结合的特异性有关, 但具体结合机制还有待进一步研究。I 类二联体中磷酸结合口袋位于配体结合区的一端, 因而只能结合磷酸丝氨酸 C 端的序列, 但这四个 BRCT 的磷酸结合口袋位于沟槽的中部, 说明四个 BRCT 可能还会结合位于磷酸化残基 N 端的残基。

结合文献报道, 我们进一步推测了这些 BRCT 可能结合的配体以及配体结合机制。XRCC1 BRCT1 倾向于结合 PARP1(Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1)中被寡聚的二磷酸腺苷-核糖基修饰的区域(Masson et al, 1998), 说明 XRCC1 BRCT1 可能结合二磷酸腺苷中的磷酸。TopBP1 BRCT1 可以结合被 CK2(caesin kinase2)磷酸化的 RAD9 C 端序列(SPVLAEED[pS387]EGE)(Rappas et al, 2011)。从序列可以看出, 磷酸丝氨酸 pS387 两端都为带负电荷残基, 可能与 TopBP1 BRCT1 沟槽两侧的带正电荷残基相互作用。PTIP BRCT3-4 (II 类二联体)和 BRCT5-6(I 类二联体)共同结合 53BP1 N 端序列(DTPCLIIED [pS25]QPESQVLEDD), 而且 BRCT3-4 或 BRCT5-6 都不能单独结合该序列(Munoz et al, 2007)。这两个二联体中只有 PTIP

BRCT4 和 BRCT5 有磷酸结合口袋, PTIP BRCT5-6 倾向于结合磷酸丝氨酸 C-端第三位为疏水残基的肽段如 pSQVF (Munoz et al, 2007), 但 PTIP 结合 53BP1 磷酸丝氨酸 pS25 C 端的第三位为谷氨酸 (Glu28), 因而可能不是 BRCT5-6 结合磷酸丝氨酸 pS25 及其附近序列。另外, 53BP1 pS25 两端三个残基的序列与 TopBP1 BRCT1 结合的 RAD9 的序列相同或相似, 而且 PTIP BRCT4 与 TopBP1 BRCT1 的沟槽区具有相似的电荷分布(图 2), 因此很可能是 PTIP BRCT4 结合 pS25 及其附近的序列, 而 BRCT5-6 结合 pS25 N-端或 C 端较远的序列。ECT2 BRCT0-2 通过与 ECT2 C-端的 DH(Dbl homology)/PH(pleckstrin homology)结构域区相互作用而抑制

后者催化二磷酸腺苷转换三磷酸腺苷的功能(Kim et al, 2005), 这一功能可能受到磷酸化作用的调控, 但具体的机制以及 ECT2 BRCT1 在其中的作用还不清楚。此外, 由于磷酸结合口袋附近的沟槽中存在一个较大的环区, 因此我们推测该区域所结合的配体残基可能会含有较小的侧链, 这一推测在 TopBP1 BRCT1 配体上得到了证实, 其第 389 位为 Gly 残基。

综上所述, 本文探讨了 BRCT 结构域结合磷酸化配体的另一种可能的机制, 并为进一步研究 BRCT 结构域的功能机制奠定了基础。我们的结构模型对探讨不同 BRCT 结合磷酸化配体的特异性和亲和性分子机理有一定意义, 同时对 DNA 损伤修复中的细胞周期调控机理研究有帮助作用。

参考文献:

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-3402.
- Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst, MJ, Mccammon JA. 2001. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10037-41.
- Bork P, Hofmann K, Bucher P, Neuwald AF, Altschul SF, Koovin EV. 1997. A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins [J]. *FASEB J*, **11**, 68-76.
- Dulic A, Bates PA, Zhang X, Martin SR, Freemont PS, Lindahl, T, Barns, DE. 2001. BRCT domain interactions in the heterodimeric DNA repair protein XRCC1-DNA ligase III [J]. *Biochemistry*, **40**, 5906-13.
- Glover JNM, Williams RS, Lee MS. 2004. Interactions between BRCT repeats and phosphoproteins: tangled up in two [J]. *Trends Biochem Sci*, **29**, 579-585.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyaya T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform [J]. *Nucleic Acids Res*, **30**, 3059-66.
- Kim JE, Billadeau DD, Chen JJ. 2005. The tandem BRCT domains of Ect2 are required for both negative and positive regulation of Ect2 in cytokinesis [J]. *J Biol Chem*, **280**, 5733-5739.
- Kobayashi M, Eiso AB, Bonvin AMJJ, SIEGAL G. 2010. Structure of the DNA-bound BRCA1 C-terminal Region from Human Replication Factor C p140 and Model of the Protein-DNA Complex [J]. *J Biol Chem*, **285**, 10087-10097.
- Landau M, Mayrose I, Rosenberg Y, Glaser F, Martz E, Pupko T, Ben-tal N. 2005. ConSurf 2005: the projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures [J]. *Nucleic Acids Res*, **33**, W299-W302.
- Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Menissier-de Murcia J, De Murcia G. 1998. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage [J]. *Mol Cell Biol*, **18**, 3563-3571.
- Mohammad DH, Yaffe MB. 2009. 14-3-3 proteins, FHA domains and BRCT domains in the DNA damage response [J]. *DNA Repair (Amst)*, **8**, 1009-17.
- Munoz IM, Jowsey PA, Toth R, Rouse J. 2007. Phospho-epitope binding by the BRCT domains of hPTIP controls multiple aspects of the cellular response to DNA damage [J]. *Nucleic Acids Res*, **35**, 5312-22.
- Rappas M, Oliver AW, Pearl H. 2011. Structure and function of the Rad9-binding region of the DNA-damage checkpoint adaptor TopBP1 [J]. *Nucleic Acids Res*, **39**, 313-24.
- SCHRODINGER. LLC. 2010. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1[DB/OL].
- Sheng ZZ, Zhao YQ, Huang JF. 2011. Functional Evolution of BRCT Domains from Binding DNA to Protein [J/OL]. *Evol Bioinform Online (In Press)*.
- Williams RS, Green R, Glover JNM. 2001. Crystal structure of the BRCT repeat region from the breast cancer-associated protein BRCA1 [J]. *Nat Struct Biol*, **8**, 838-842.
- Williams RS, Lee MS, Hau DD, Glover JN. 2004. Structural basis of phosphopeptide recognition by the BRCT domain of BRCA1 [J]. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 519-25.
- Yu XC, Chini CCS, He M, Mer G, Chen JJ. 2003. The BRCT domain is a phospho-protein binding domain [J]. *Science*, **302**, 639-642.
- Zhang X, Morera S, Bates PA, Whitehead PC, Coffey AI, Hainbucher K, Nash RA, Sternberg MJ, Lindahl T, Freemont PS. 1998. Structure of an XRCC1 BRCT domain: a new protein-protein interaction module [J]. *EMBO J*, **17**, 6404-11.