

# H2AX의 BRCA1 NLS domain과 BARD1 BRCT domain 각각과의 *in vitro* 상호 결합

배승희<sup>1,2</sup> · 이선미<sup>1,2</sup> · 김수미<sup>2</sup> · 최태부<sup>1</sup> · 김차순<sup>3</sup> · 성기문<sup>3</sup> · 진영우<sup>3</sup> · 안성관<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>건국대학교 미생물공학과, <sup>2</sup>유전단백체 기능제어연구센터, <sup>3</sup>(주)한국수력원자력 방사선보건연구원

## H2AX Directly Interacts with BRCA1 and BARD1 via its NLS and BRCT Domain Respectively *in vitro*

Seunghee Bae<sup>1,2</sup>, Sun-Mi Lee<sup>1,2</sup>, Sumi Kim<sup>2</sup>, Tae-Boo Choe<sup>1,2</sup>, Cha Soon Kim<sup>3</sup>,  
Ki-Moon Seong<sup>3</sup>, Young-Woo Jin<sup>3</sup>, and Sungkwan An<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbial Engineering, <sup>2</sup>Functional Genoproteome Research Centre, Konkuk University, Seoul, Korea, <sup>3</sup>Division of Radiation Effect Research, Radiation Health Research Institute, Korea Hydro & Nuclear Power Co., LTD., Seoul, Korea.

**Abstract** H2AX, a crucial component of chromatin, is implicated in DNA repair, cell cycle check point and tumor suppression. The aim of this study was to identify direct binding partners of H2AX to regulate cellular responses to above mechanisms. Literature reviews and bioinformatical tools were attempted intensively to find binding partners of H2AX, which resulted in identifying two potential proteins, breast cancer-1 (BRCA1) and BRCA1-associated RING domain 1 (BARD1). Although it has been reported *in vivo* that BRCA1 co-localizes with H2AX at the site of DNA damage, their biochemical mechanism for H2AX were however only known that the complex monoubiquitinates histone monomers, including unphosphorylated H2AX *in vitro*. Therefore, it is important to know whether the complex directly interacts with H2AX, and also which regions of these are specifically mediated for the interaction. Using *in vitro* GST pull-down assay, we present here that BRCA1 and BARD1 directly bind to H2AX. Moreover, through combinational approaches of domain analysis, fragment clonings and *in vitro* binding assay, we revealed molecular details of the BRCA1-H2AX and BARD1-H2AX complex. These data provide the potential evidence that each of the BRCA1 nuclear localization signal (NLS) and BARD1 BRCA1 C-terminal (BRCT) repeat domain is the novel mediator of H2AX recognition.

**Keywords:** H2AX, BRCA1, BARD1, interaction

### 서 론

세포의 생존과 죽음은 생명 유지에 있어 필수적인 현상이다. 따라서 불안정한 세포의 과도한 증식이나 또는 세포의 악영향을 미칠 수 있는 외부 환경요인으로부터 신속하게 반응하여 세포 내 관련 신호전달 체계를 활성화시켜 결과적으로 비정상적인 세포의 사멸을 유도하거나 세포 내 방어 메커니즘을 활성화 시키게 된다. 이러한 세포의

자기 안정성 유지에 있어 가장 중요한 것은 고유의 유전 정보 안정성 (genomic stability)에 기초한다. 게놈의 불안정성은 외부의 DNA damage elements (예를 들어, 방사선이나 자외선 등)에 의해 손상된 DNA에 대한 반응인 DNA damage response (DDR)에 이상이 생겨 발생하게 된다. 여기에는 손상된 DNA부분을 인식하여 수복하는 DNA repair system 또는 불안정한 게놈을 가진 세포의 성장을 억제하는 cell cycle checkpoint의 저하로 인한 염색체의 이상이 증가되는 것들을 포함한다. 좀 더 살펴보면, 진핵 세포에서 DNA double-strands break (DSB)가 발생하게 되면 DNA repair나 damage 존재에 대한 신호전달에 관계하는 것으로 알려진 여러 인자들이 그 손상된 부분으로

### \*Corresponding author

Tel: +82-2-450-4054, Fax: +82-2-3437-4055

e-mail: ansfgrc@konkuk.ac.kr

소집하게 되어 하나의 큰 군집을 이루는 nuclear foci의 형태를 가진다(1). 이러한 foci 현상을 만드는 생화학적 기전은 제일 처음 ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated)의 활성화와 활성화된 ATM에 의한 손상된 부분에 존재하는 H2A 분자중의 하나인 H2AX에 인산화됨으로써 ( $\gamma$ -H2AX) 시작된다(2). H2AX의 C-말단 꼬리 (C-terminal tail)에 존재하는 serine 139가 그러한 인산화에 해당되며, 이러한 변화는 damage 후 1-3분 안에 매우 빠르게 일어난다. 이러한 인산화된 H2AX의 부분은 시간이 지나면서 다른 여러 단백질들을 그 부위로 이끌어 foci를 형성하여 관련 DNA 수복 기전 및 cell cycle arrest를 진행하게 되는데, 이는 다시 말해 H2AX의 분자 물질은 세포의 게놈 안정성에 매우 기본적이며 중요한 역할을 한다는 것을 반증한다. 실제로, H2AX를 게놈 상에서 없앤 H2AX-/- 쥐는 염색체 실패, 전좌 또는 이수성 (aneuploidy)의 현상을 가지며(3), DSBs를 유발하는 ionizing radiation (IR)에 노출된 H2AX-/- 세포는 G2 phase와 mitosis로 가는 것을 arrest하지 못하게 된다(4).

최근 몇 년간 H2AX에 관한 연구들의 중심은 IR에 의해 생기는  $\gamma$ -H2AX foci 현상에 있어, 과연 어느 단백질이 H2AX와 foci에 해당하는 단백질인 Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) complex, Mdc1, 53BP1, BRCA1, Rad51 등을 연결자로서 역할을 하는지는 것이었다. 이러한 연구의 중심 실험은 H2AX에 직접적으로 결합할 수 있는 단백질을 선별하는 것에 있다. 왜냐하면, 최근까지 위의 단백질들은 인산화된 H2AX와 co-localization을 보이는 수준에 머물러 있었다. 그 원인은, 세포 안에서 H2AX는 DNA에 둘러싸여 있는 형태로 인한 직접적으로 결합하는 단백체를 찾고 그 기능을 연구하는 데에 여러 어려움이 있다고 사료되며, 게다가 H2AX의 인산화 잔기인 serine 139를 가인산화 (phosphor mimics) 형태인 glutamic acid로 치환하여 H2AX-/- 쥐 세포에 주입시킨 결과, IR에 의한 nuclear foci 및 DSB hypersensitivity가 복구되지 않았기 때문이다(5). 앞서 언급한 단백질 중에서 Nbs1, 53BP1, Mdc1이 현재까지 알려진 H2AX에 결합하는 것을 입증하여, 위의 연구 중심을 이루고 있다. 하지만 위의 3가지 단백질로 H2AX에 의한 DDR의 설명을 하기에는 한계가 있다.

본 연구는 DNA 및 게놈 안정성에 관련된 H2AX와 직접적으로 결합할 수 있는 새로운 단백질을 찾고자 하였다. 먼저 H2AX의 세포 내 기능과 밀접한 연관성을 지닌 단백질들을 수집하였으며, 이 단백질들을 생물정보학적 기술을 이용하여 기능적으로 H2AX와 가장 중첩되는 기능을 보이는 단백질들을 판별하였다. 그 다음 판별된 단백질들 중에 이미 H2AX와 결합하는 것으로 보고된 것들을 배제시키고, 남은 단백질들을 대상으로 지금까지 발표된 H2AX 논문을 토대로 결합가능성을 타진할 만한 최종 단백질을 분리하였다. 이 단백질들이 BRCA1과 BARD1이며, 이들과 H2AX와의 상호 결합 부위를 추적하였다. 이에 각각의 유전자들을 확보하고, 클로닝된 유전자를 바탕으로 H2AX와 결합 유무를 판단한 결과, 모두 H2AX와 결합함을 보였다. 게다가

H2AX의 결합에 작용하는 BRCA1, BARD1의 domain을 분석하고, 결합 실험을 통하여 상호작용이 가능한 최적 domain 부위를 추적하였다.

## 재료 및 방법

### 생물정보학적 분석

H2AX와 상호 결합할 가능성이 있는 단백질을 추적하기 위해, 먼저 NCBI (National Center for biotechnology Information)(22) 사이트에 검색어 'H2AX'을 입력하여 Pubmed 데이터베이스를 통해 나온 관련 논문들을 토대로 H2AX 관련 단백질들의 정보와 Gene 데이터베이스를 통해 지금까지 보고된 결합 및 결합 가능성을 가진 단백질들의 정보를 수집하였으며 또한, EBI-Harvester (European Bioinformatics Institute)(23) 사이트를 통해 H2AX 단백질과 상호작용을 하는 단백질들의 정보를 수집하여 종합적으로 결과 단백질들을 수집하였다. 이에 해당하는 단백질들은 H2AX, ATM, ATR, NBS1, MDC1, TP53, CCND1, CLU, CHK1, SMC1L1, CHK2, BRCA1, BARD1, DNAPK, JNK, PP2A, PP4C, MRE11, RAD50, RAD51, MCPH1, RNF8, 53BP1, RAP80, TIP60, ARP4, EGFR, ERBB3, ERK1, ERK2, GLO1, HSP25, HSP70, MAPK1, MAPK3, MAPK14, PCNA, CDK4, p21, p16 그리고 p21 등 총 40개가 해당되었다. 이러한 단백질들과 H2AX간의 기능적 분류를 통해 가장 높은 관련성을 가지는 단백질들을 찾고자 GATHER (Gene Annotation Tool to Help Explain Relationships)(24) 사이트를 이용하여 위의 40개 단백질들과 H2AX을 입력하여 나오는 결과를 대상으로 대표적인 H2AX의 기능인 DNA metabolism, Cell cycle, Cell proliferation, DNA repair, Meiosis 그리고 Response to DNA damage stimulus을 주축으로 관련 단백질들을 정리하였으며, H2AX와 기능적으로 중첩되는 단백질들을 선별하였다(Fig. 1B).

선별된 단백질들을 대상으로 지금까지 보고된 논문을 참고하여 H2AX 결합 단백질로써 밝혀진 것들인 ATM, ATR, Mdc1, Nbs1, 53BP1(6, 7, 8, 9, 10)와 H2AX에 비의존적인 세포내 활성을 가지는 TP53, Smc1, Chk1, Chk2(10)을 제외시켰으며, 남은 단백질들을 대상으로 기존 연구논문들을 바탕으로 가장 H2AX와 상호 결합할 가능성이 있는 BRCA1과 BARD1을 선별하였다.

H2AX와 BRCA1, BARD1의 결합 유무 및 결합 부위 추적을 위해 각 단백질들의 도메인 분석을 SMART (Simple Modular Architecture Research Tool)(25) 사이트를 통해 수행하였다. H2AX는 뉴클레오솜과 DNA 결합 기능을 하는 H2A 도메인 부분과 C-말단의 인산화 motif를 가지고 있으며, H2AX의 C-말단 부분이 20개의 아미노산임을 감안하여 H2A와 H2AX을 대상으로 H2AX의 결합 부분을 실험적으로 추적하였으며, BRCA1과 BARD1의 도메인 분석을

통해 유비퀴틴화 (Ubiquitination)에 관여하는 RING-finger (Really Interesting New Gene-Finger) 도메인, NES (Nuclear Export Signal), NLS (Nuclear Localization Signal) 그리고 protein-protein interaction에 관여하는 BRCT (BRCA1 C-Terminus) 도메인을 대상으로 실험하여 H2AX의 결합 부분을 추적하였다.

## 유전자 클로닝

H2A, H2AX, BRCA1 및 BARD1에 대한 유전자의 ORF 클로닝은 모두 인간 자궁경부암 세포주 HeLa로부터 순수 분리된 mRNA로부터 합성된 cDNA를 주형으로, Polymerase Chain Reaction (PCR) 기법을 통하여 선택적으로 복사 및 대량 증폭시킨 후, pGEX-6p (Amersham Pharmacia, USA) 의 *EcoRI* (New England Biolabs, USA) site와 pCITE4 (Novagen, USA)의 *EcoRI*, *KpnI*, *BamHI* (New England Biolabs)에 삽입시킴으로써 이루어졌다. 관련 primer (Bionics, Korea) 정보는 Table 1에 나타내었다. 모든 클로닝 산물은 양방향 automated DNA sequencing을 통해 확인하였다.

**Table 1.** Primers used for gene cloning

Primer	Sequence
H2A-S <sup>a)</sup>	<b>GGAATTCC</b> ATGCTGCGGCGTGGTA
H2A-AS <sup>b)</sup>	<b>GGAATTC</b> CACTTGCCTTGGCC
H2AX-S	<b>GGAATTC</b> ATGCTGGGCCGCGCAAGA
H2AX-AS	<b>GGAATTC</b> CACTACTCCTGGGAGGCC
BRCA1-S	<b>CGGGGTACCCG</b> ATGGATTATCTGCTCTTC
BRCA1-AS	<b>CGGGGTACCCG</b> TCAGTAGTGGCTGTGGGGG
BRCA1-1-313-S	<b>CGGGGTACCCG</b> ATGGATTATCTGCTCTTCG
BRCA1-1-313-AS	<b>CGGGGTACCCG</b> GCCAGGCTGTTTCGTTTATTA
BRCA1-314-1313-S	<b>CGGGGTACCCG</b> TAGCAAGGAGCCAACATAAC
BRCA1-314-1313-AS	<b>CGGGGTACCCG</b> CTGGTGTGGTATTGTCAG
BRCA1-1314-1864-S	<b>CGGGGTACCCG</b> ATCCTTTCTTGATTGGTTG
BRCA1-1314-1864-AS	<b>CGGGGTACCCG</b> TCAGTAGTGGCTGTGGGGG
BARD1-S	<b>CGGGATCCCG</b> ATGCCGATAATCGGCAG
BARD1-AS	<b>CGGGATCCCG</b> TCAGCTGTCAAGAGGAAGC
BRCA1-314-772-S	<b>GGAATTC</b> GTTCTGTAATAAAGC
BRCA1-314-772-AS	<b>GGAATTC</b> GACAAATTCTTTAAG
BRCA1-773-1313-S	<b>GGAATTC</b> GAAATCCTAGCCTTCCAAG
BRCA1-773-1313-AS	<b>GGAATTC</b> CTGGGTGTTTGTATTG
BARD1-14-189-S	<b>GGAATTC</b> CGCTCCGGAACGAGCCTC
BARD1- 14-189-AS	<b>GGAATTC</b> TGCAGGAGGACTTGGGGAAAC
BARD1-250-386- S	<b>CGGGATCCCG</b> TCCAGTCCAGATAAATG
BARD1-250-386-AS	<b>CGGGATCC</b> CATCGACATGTTACTG
BARD1-551-776-S	<b>GGAATTC</b> CGTCATCCTCAGCTAG
BARD1-551-776-AS	<b>GGAATTC</b> CGCTGTCAAGAGGAA

The numbers mean the site of amino acids. Boldfaces represent restriction enzyme sites. <sup>a)</sup>S: sense; <sup>b)</sup>AS: antisense; **GGAATTC**: *EcoRI*, **CGGGGTACCCG**: *KpnI*; **CGGGAATCCCG**: *BamHI*.

## <sup>35</sup>S 표지 및 GST 융합 단백질 생산

<sup>35</sup>S로 표지된 단백질은 <sup>35</sup>S-methionine (PerkinElmer, USA) 의 존재 하에, TnT Coupled Reticulocyte Lysate System

(Promega, USA)을 이용하여 pCITE4c-BRCA1, pCITE4c-BARD1, 여러 fragment plasmids로부터 30°C에서 90분간 *in vitro* 상에 합성되었다. pGEX-6p3-H2A와 pGEX-6p3-H2AX을 BL21 (Novagen) 균주에 도입 및 형질전환 시킨 뒤, 0.1 mM의 isopropyl b-D-thiogalactoside (IPTG)를 이용하여 상온에서 2시간 동안 가역적으로 전사를 유도하여 재조합 단백질을 발현시켰다. 발현된 균체를 lysis buffer [30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mM NaCl, 1 mM DTT, 1% NP40, 1 mM PMSF, 2 µg/mL aprotinin]에 현탁시킨 후, sonication 과정을 거쳐, 상층액으로부터 Glutathione Sepharose 4B Bead (Amersham Pharmacia)을 이용하여 발현된 단백질을 분리하였다. 이후, 10 mM glutathione을 이용하여 bead에서 재조합 단백질을 회수시킨 후, dialysis 와 ultra-filtration 과정을 거쳐 최종 분리하였다.

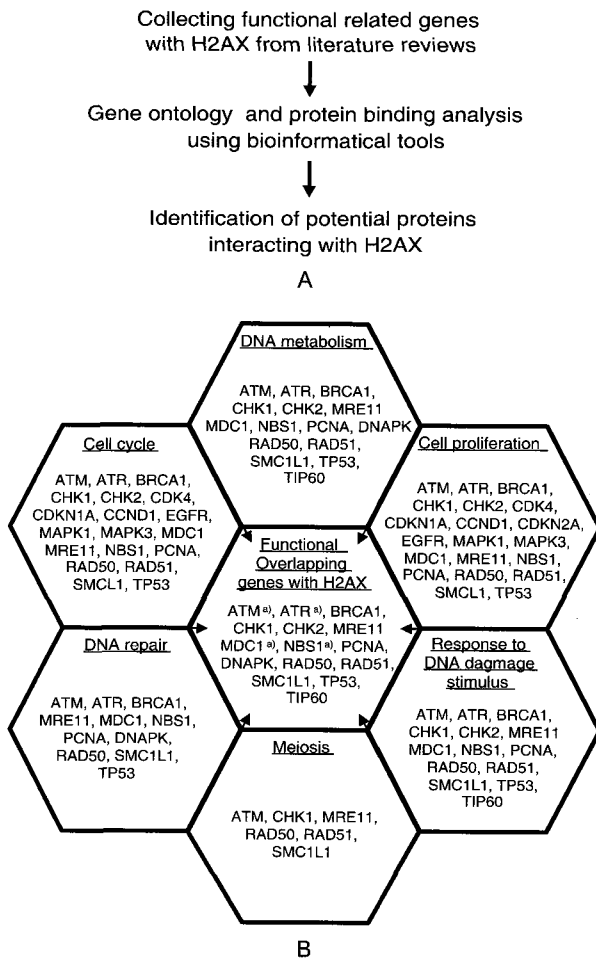
## 시험관내 단백질 간의 상호결합력 측정

먼저 lysis buffer 1 ml에 7 µl의 glutathione sepharose 4B bead와 순수 정제된 5 µg GST 및 GST-재조합 단백질을 넣고 4°C에서 overnight 시켰다. 반응이 끝난 후 *in vitro* binding buffer (1 × PBS, 0.1% NP40, 0.5 mM DTT, 10% Glycerol, 1 mM PMSF, 2 µg/mL aprotinin) 1 mL로 한번 washing해 주었다(sample 1). TnT Quick Coupled Transcription/Translation system을 이용하여 얻은 <sup>35</sup>S로 표지된 단백질 5 µL와 sample 1을 *in vitro* binding buffer에 넣어 총 1 mL을 만든 후, 4°C에서 2시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 1 mL *in vitro* binding buffer를 첨가하여 3번 washing을 시켰으며, 8-15% SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동을 했다. 전기영동 후 gel dryer (Bio-Rad, USA)를 이용하여 80°C에서 1시간 동안 건조했으며, 이후 autoradiography로 시각화 하였다.

## 결과 및 고찰

### H2AX에 대한 BRCA1과 BARD1의 결합 가능성

H2AX에 신규 결합 가능한 단백질들을 스크리닝에 대한 전체적인 방법은 Fig. 1A에 설명하였다. 먼저 H2AX와 기능적으로 관련 있는 40개의 단백질들을 선별하였다. 이러한 단백질들을 온톨로지 기능별로 분류하여 현재까지 보고된 H2AX의 기능과 가장 중첩되는 15개의 유전자로 축약하였다. 여기에는 ATM, ATR, BRCA1, Chk1, Chk2, PCNA, Mdc1, Nbs1, Rad51, SMC1, TP53, TIP60들이 포함된다(Fig. 1B). 이중 기존에 H2AX와 결합하는 것으로 알려진 것 (ATM, ATR, Mdc1, Nbs1, 53BP1)을 제외한 후 남은 것들을 H2AX와의 연관성에 기초하여 기존에 보고된 논문들을 통해 최적의 결합 가능성을 지닌 단백질을 선정하였다(재료 및 방법).



**Fig. 1.** Identification of potential interacting proteins with H2AX by bioinformatical approach.

A, The overall scheme of identification. Its detailed procedures were described in Result and Discussion.  
B, Gene ontology analysis of H2AX related proteins.  
<sup>a)</sup> Known proteins interacting with H2AX.

앞서 기술한 바와 같이, DNA DSB의 반응으로 ATM, ATR 그리고 DNAPK를 포함하는 거대 단백질 complex들이 활성화된다. 이 활성화된 kinase들은 손상된 DNA 부분을 복구하기 위해 cell-cycle progression에 해당하는 일련의 신호전달 체계를 가동시키며, 이 과정에 BRCA1이 관여됨이 보고되었다(12). DNA에 손상이 오면 BRCA1은 ATM과 ATR에 의해 인산화되어(12), 이후 Chk1 kinase를 조절하여 S phase 및 G2/M transition의 과정을 조절한다(13). 게다가 면역형광 연구에 의하면 BRCA1은 DNA damage 후에 H2AX의 인산화로 생기는 nuclear foci와 같은 위치를 보인다(14). 흥미로운 점은 IR 조사 후 생기는 foci를 분석한 결과, H2AX foci가 가장 빠르게 나타났으며, 이후 순차적으로 Rad50 (MRN complex 일원) foci, BRCA1 foci, Rad51 foci가 형성됨이 보였다. 그러나 BRCA1과 MRN의 결합은 일부 세포에서만 발견되었으며, IMR90 세포주를 12 Gy의 IR에 노출시킨 후 2시간 이내에 H2AX foci

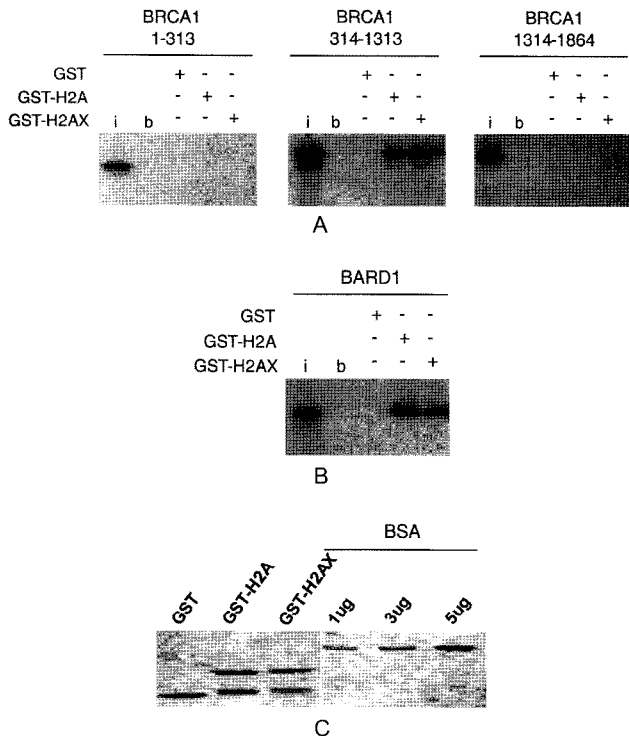
가 100%의 세포 균집에서 나타나지만, Rad50은 6-8시간 후에 H2AX foci와 co-localization이 관찰 되었으며, 이와는 다르게 BRCA1 foci는 조사 2시간 후 최대에 이르며 상당수가 H2AX foci와 co-localization됨이 관찰되었다. 또한 Rad51 foci는 BRCA1 foci와 co-localization함이 알려졌지만, IR 조사 2시간 후 H2AX foci와 Rad51 foci간에 겹치는 현상이 보이지 않았다(14). 즉 H2AX의 인산화가 일어난 후 BRCA1-H2AX, 다음으로 Rad50-H2AX와 Rad51-H2AX co-localization이 일어난다고 볼 수 있다. 위에서 언급된 것들 중, TP53, Smc1, Chk1, Chk2는 H2AX가 없는 상태에서도 DNA damage agents에 의해 높은 비율로 활성화되어 있다(15). 특히, Nbs1와 Chk2는 H2AX/-세포에서 이런 PIKK-mediated 인산화가 정확하게 DSB에서 일어난다(11). 이는 H2AX와의 분자적인 관점에서는 관련성이 다소 적다고 사료되어 최종적으로 BRCA1을 H2AX에 결합할 수 있는 최적의 분자물질로 정하였다. 순위 선정 결과, BRCA1 (또한 BRCA1-BARD1 complex)이 가장 높은 관련성을 보였다.

## H2AX에 대한 BRCA1과 BARD1 결합 확인

BRCA1은 암 억제 유전자 (tumor suppressor gene)로서, 단일 대립 유전자의 돌연변이로 인해 우성형질 대립 유전자의 손실 또는 비활성화를 야기시키며, 이로 인한 단백질 기능의 저하로 질병을 진행시킨다(16). 또한, BARD1도 잠재적인 tumor suppressor gene이다(17). BRCA1과 BARD1은 특히 성장 자극에 대한 세포 반응, DNA damage 그리고 cell cycle checkpoints에 있어 그 역할을 가지기 위해 핵내로 들어오게 되는데 그 이전에 대한 연구는 현재 핵막의 importin에 의해 핵-세포질간의 shuttling이 이루어진다고 보고되고 있지만, 그 이후의 DNA damage, DNA repair에 관여하여 genomic stability와 cell cycle checkpoint에 중요한 역할을 하는 H2A 및 H2AX와의 작용 기작에 대해서는 추가로 연구가 필요한 상태이다.

Literature review를 활용하여 H2AX관련 기전 연구에 있어서 DNA damage나 cell cycle check point에 관련되어 세포 내에서 같은 위치를 보이고, 동시에 immunoprecipitation을 통해 H2AX에 직간접적으로 결합할 수 있는 단백질들인 BRCA1과 BARD1을 선별하였다. 이 유전자들은 앞서 설명한 바와 같이 세포 내 DNA repair에 있어 H2AX와 매우 밀접한 관계를 이루며 그 역할을 수행한다. BRCA1은 아미노산 길이가 1864로 매우 큰 유전자임을 감안하여 일단 BRCA1 1-313, BRCA1 314-1313 그리고 BRCA1 1314-1864의 세 부분으로 나누어 pCITE4c에 클로닝 하였고, BARD1은 full-length ORF를 같은 벡터에 클로닝 하여, H2AX와 *in vitro* binding assay를 수행한 결과 H2AX와 결합하는 것으로 확인되었다(Fig. 2). 특이한 점은, H2AX는 BRCA1의 314-1313 부분과 결합하였지만 RING domain과 NES가 있는 1-313 부분과, BRCT domain 부분과는

결합하지 않음을 보였다. 또한 H2AX에 대한 BRCA1과 BARD1의 결합은 H2A와 비교해 봤을 때, H2AX의 특이성을 가지는 부위인 C-말단 꼬리 부분에 의해 매개되지 않으며 H2A와 H2AX의 공통된 단백질 서열 부위와 결합을 하는 것으로 관찰되었다.



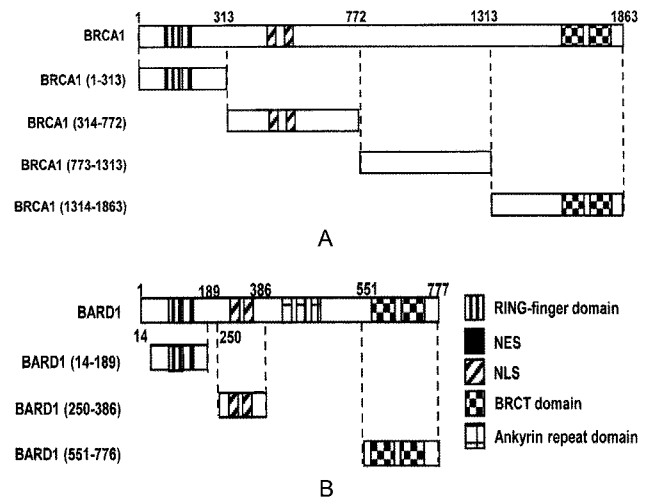
**Fig. 2.** H2A and H2AX interact directly with BRCA1 and BARD1 *in vitro*

*In vitro* binding of H2A and H2AX to the fragments (amino acids 1-313, 314-1313, and 1314-1864) of BRCA1 (A) and full-length BARD1 (B). Five  $\mu$ l of the <sup>35</sup>S-labeled fragment proteins of BRCA1 and full-length protein of BARD1 were transcribed and translated *in vitro* from each cloned plasmids using the TnT Coupled Reticulocyte Lysate System and added to 5  $\mu$ g of GST, GST-H2A and GST-H2AX fusion proteins (C) and incubated for 2 hr at 4°C. Bound proteins were detected by using autoradiography. This experiment was performed in triplicate and the results of a representative experiment are shown. i, input (30% of total protein in the binding reaction); b, blank lane.

### BRCA1의 NLS domain과 BARD1의 BRCT domain에 대한 H2AX 최적 결합 부위 확인

BRCA1과 BARD1은 공통적으로 RING-finger, NLS, NES, BRCT domain을 가지고 있으며, BARD1은 BRCA1과 달리 ankyrin-repeat domain을 가지고 있다(Fig. 3). 이들 단백질의 기능은 heterodimer 상태의 유무에 따라서 다르다. BRCA1-BARD1 복합체는 서로의 N-말단 부위에 위치한 RING-finger domain을 통해 결합을 이루고 있으며,

이로 인해 인접한 NES 부분이 차폐되어 핵 내에 머물게 되어 그 기능을 발휘한다(18). 대표적으로 이 복합체는 replication 및 S-phase 단계에서 DNA repair에 관련된 단백질인 PCNA와 Rad51, 그리고 DSB가 일어난 후  $\gamma$ -H2AX와 co-localization을 이루어 관련 기능을 암시할 뿐만 아니라, RNA polymerase II에 BRCA1-C-말단 부위(1380-1863)를 매개로 결합한 후, ubiquitination 반응을 담당한다. 또한 polyadenylation factor CstF-50은 BARD1-ANK repeat domain을 매개로 결합하여 mRNA processing을 저해시켜 종양 억제에 대한 기전을 제공한다(19, 20). BRCT domain은 DNA damage에 반응하여 cell cycle checkpoint 기능에 관련되어 있는 단백질인 BRCA1, BARD1, TopBP1, 53BP1 그리고 Mdc1 등에서 현저히 발견된다(21). 이러한 단백질들은 위에 명시된 것처럼 H2AX와 밀접한 관계를 보이고 있다.

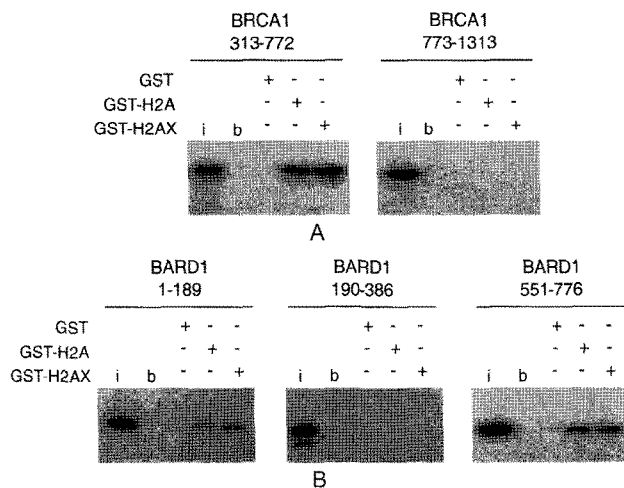


**Fig. 3.** Schematic representation of the BRCA1, BRCA1 mutants and BARD1

A, Domain structure of the full-length BRCA1 and the BRCA1 deletion mutants including nuclear localized signal and BRCT domain deletion mutant (1-131), RING-finger and BRCT domain deletion mutant (313-772), RING-finger, nuclear export/localized signal and BRCT domain deletion mutant (773-1313), and BRCT only domain mutant (1314-1863) used for the *in vitro* binding assay. These mutants were cloned into pCITE4 vector and expressed using TnT Coupled Reticulocyte Lysate System. B, Diagrammatic representation of the BARD1 and BARD1 deletion mutants. The amino acids encompassing each domain are indicated and expressed using same method above.

여기에서는 핵 내의 기능에 관여하는 NLS, NES 그리고 BRCT domain들을 중심으로 H2AX와 결합 가능성을 파악하고자 그 부분에 해당하는 유전자 염기서열을 새로이 클로닝하여, *in vitro* binding assay를 실시하였다. BRCA1 314-1313의 503-615 amino acids에는 NLS가 존재하는데(Fig. 3A), 이 부분과 H2AX와 결합하는지 확인하기 위해 다시 BRCA1 314-772와 BRCA1 773-1313 부분을 클로닝하여 H2AX와

*in vitro* binding assay를 실시한 결과, BRCA1 314-772 부분과 결합함이 관찰되었다(Fig. 4A). 이 부분에는 핵 내로의 이동에 관여하는 NLS만 존재하고 있어, NLS와 H2AX와 결합함을 보였다. 이런 결과를 토대로 BARD1을 RING domain과 NES 부분이 있는 14-189, NLS가 있는 250-386, 그리고 BRCT domain이 있는 551-776 부분(Fig. 3B)을 클로닝하여 H2AX와 *in vitro* binding assay를 하여 결합 위치 부분을 추적하였다. 그 결과 BRCA1과 달리, BARD1은 RING domain과 NES가 있는 14-189 부분과 BRCT domain과 결합함을 보였다(Fig. 4B). 세포 내에서 BRCA1과 BARD1은 각각의 RING domain이 결합되어 heterodimer를 이루어 NES부분이 노출되지 않는 사실로 미루어 볼 때, BARD1의 BRCT 부분과 H2AX가 실질적인 결합을 가질 가능성이 농후하다고 유추된다.



**Fig. 4.** H2A and H2AX interact directly with the NLS region of BRCA1 and BRCT domains of BARD1 *in vitro*. A, NLS region of BRCA1 mediates interaction with H2A and H2AX *in vitro*. 314-772 and 773-1313 fragments of BRCA1 were cloned into pCITE4 as described in the Materials and Methods. Each <sup>35</sup>S-labeled fragment added to GST, GST-H2A and GST-H2AX fusion proteins and incubated for 2 hr at 4°C. The bound proteins were detected by using autoradiography. B, BRCT domain of BARD1 interacts with H2A and H2AX *in vitro*. Each fragment of BARD1 was created as described in the Materials and Methods and *in vitro* binding assay was performed as mentioned above. i, input (30% of total protein in the binding reaction); b, blank lane.

## 요약

본 연구에서는 H2AX의 생리화적인 기능 및 분자세포 생물학적 기전 해석에 대한 보다 명확한 정보를 제시하고자, H2AX 관련 단백질들을 literature review 및 생물정보학적인 기술을 이용하여 최적의 결합 단백질체를 40개를 예측하고, 이들 가운데 상호작용 가능성이 높은 BRCA1

와 BARD1 단백질을 선별하여 *in vitro* 결합실험을 통해 이를 증명하였다. 이들 두 가지의 유전자를 발굴하여, 클로닝하였다. 클로닝된 유전자를 이용하여 두 가지 단백질을 발현 및 정제하였으며, 단백질들의 자체적인 구조에 의한 결합능력을 판단하기 위해 *in vitro* binding assay법을 실시하였다. 단백질의 구조적 안정과 비특이적 결합을 억제하는 detergent만이 포함된 상태에서, 구조학적 및 물리학적 상호 결합의 유무를 판정할 수 있게 하였으며, BRCA1과 BARD1은 모두 H2AX에 결합함을 확인하였다. 이런 실험 결과를 바탕으로 각각의 단백질에 대해 H2AX와의 최적 결합 부위를 알아내기 위해 각 유전자의 domain을 생물정보학적으로 분석하였다. 이에 RING domain, NES, NLS 및 BRCT domain에 해당하는 유전자 부분을 새로 클로닝하여, 다시 *in vitro* 결합실험 및 실험결과에 대한 literature review를 통한 분석을 실시한 결과, H2AX는 BRCA1의 NLS, BARD1의 BRCT domain 부분과 결합하는 것을 확인하였다. H2AX에 대한 BRCA1과 BARD1과의 결합은 DNA repair에 있어 BRCA1의 NLS와 BARD1의 BRCT domain을 통해 H2AX foci의 관련 세포 신호전달 기전에 중요한 역할을 하여 전체적으로 genomic stability에 영향을 미칠 가능성이 농후할 것으로 사료된다.

## 감사

본 연구는 지식경제부 전력산업연구개발사업 (R-2006-1-043) 및 교육과학기술부 원자력기술개발사업 (M2070600002-08M060002000과 20090078237)에 의해 지원되었으며, 이에 감사드립니다.

접수 : 2009년 2월 28일, 게재승인 : 2009년 8월 13일

## REFERENCES

- Kinner, A., W. Wu, C. Staudt, and G. Iliakis (2008),  $\gamma$ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin, *Nucleic Acid Res.* **36**, 5678-5694.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova, and W. M. Bonner (1998), DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139, *J. Biol. Chem.* **273**, 5858-5868.
- Celeste, A., S. Petersen, P. J. Romanienko, O. Fernandez-Capetillo, H. T. Chen, O. V. Sedelnikova, B. Reina-San-Martin, V. Coppola, E. Meffre, and M. J. Difilippantonio (2002), Genomic instability in mice lacking histone H2AX, *Science* **296**, 922-927.
- Fernandez-Capetillo, O., H. T. Chen, A. Celeste, I. Ward,

- P. J. Romanienko, J. C. Morales, K. Naka, Z. Xia, R. D. Camerini-Otero, N. Motoyama, P. B. Carpenter, W. M. Bonner, J. Chen, and A. Nussenzweig (2002), DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1, *Nat. Cell Biol.* **4**, 993-997.
5. Celeste, A., S. Difilippantonio, M. J. Difilippantonio, O. Fernandez-Capetillo, D. R. Pilch, O. A. Sedelnikova, M. Eckhaus, T. Ried, W. M. Bonner, and A. Nussenzweig (2003), H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility, *Cell* **114**, 371-383.
6. Lee J. H. and T. T. Paull (2004), Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex, *Science* **304**, 93-96.
7. Burma S., Chen B. P., Murphy M., Kurimasa A., and D. J. Chen (2001), ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks, *J. Biol. Chem.* **276**, 42462-42467.
8. Stucki M., Clapperton J. A., Mohammad D., Yaffe M. B., Smerdon S. J., and S. P. Jackson (2005), MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulates cellular response to DNA double-strand breaks, *Cell* **123**, 1213-1226.
9. Kobayashi J., H. Tauchi, S. Sakamoto, A. Nakamura, K. Morishima, S. Matsuura, T. Kobayashi, K. Tamai, K. Tanimoto, and K. Komatsu (2002), Nbs1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain, *Curr. Biol.* **12**, 1846-1851.
10. Ward I. M., K. Minn, K. G. Jorda, and J. Chen (2003), Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX, *J. Biol. Chem.* **278**, 19579-19582.
11. Lukas, C., J. Falck, J. Bartkova, J. Bartek, and J. Lukas (2003), Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage, *Nat. Cell Biol.* **5**, 255-260.
12. Cortez, D., Y. Wang, J. Qin, and S. J. Elledge (1999), Requirement of ATM-dependent phosphorylation of BRCA1 in the DNA damage response to double-strand breaks, *Science* **286**, 1162-1166.
13. Yarden, R. I., S. Pardo-Reoyo, M. Sgagias, K. H. Cowan, and L. C. Brody (2002), BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage, *Nat. Genet.* **30**, 285-289.
14. Scully, R., J. Chen, R. L. Ochs, K. Keegan, M. Hoekstra, J. Feunteun, and D. M. Livingston (1997), Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage, *Cell* **8**, 425-435.
15. Celeste, A., O. Fernandez-Capetillo, M. J. Kruhlak, D. R. Pilch, D. W. Staudt, A. Lee, R. F. Bonner, W. M. Bonner, and A. Nussenzweig (2003), Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks, *Nat. Cell Biol.* **5**, 675-679.
16. Nathanson, K. N., R. Wooster, and B. L. Weber (2001), Breast cancer genetics : what we know and what we need, *Nat. Med.* **7**, 552-556.
17. Ghimenti C., E. Sensi, S. Presciuttini, I. M. Brunetti, P. Conte, G. Bevilacqua, and M. A. Caligo (2002), Germline mutations of the BRCA1-associated ring domain (BARD1) gene in breast and breast/ovarian families negative for BRCA1 and BRCA2 alterations, *Genes Chrom. Cancer* **33**, 235-242.
18. Rodriguez J. A., S. Schüchner, W. W. Au, M. Fabbro, and B. R. Henderson (2004), Nuclear-cytoplasmic shuttling of BARD1 contributes to its proapoptotic activity and is regulated by dimerization with BRCA1, *Oncogene* **23**, 1809-1820.
19. Krum S. A., G. A. Miranda, C. Lin, and T. F. Lane (2003), BRCA1 associates with processive RNA polymerase II, *J. Biol. Chem.* **278**, 52012-52020.
20. Kleiman F. E. and J. L. Manley (1999), Functional interaction of BRCA1-associated BARD1 with polyadenylation factor CstF-50, *Science* **285**, 1576-1579.
21. Canman C. E. (2003), Checkpoint mediators: relaying signals from DNA strand breaks, *Curr. Biol.* **13**, 488-490.
22. NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
23. EBI-Harvester <http://harvester.embl.de>.
24. Chang J. T. and J. R. Nevins (2006), GATHER : a systems approach to interpreting genomic signatures, *Bioinformatics* **22**, 2926-2933. <http://gather.genome.duke.edu/>.
25. Letunic I., R. R. Copley, B. Pils, S. Pinkert, J. Schultz, and P. Bork (2006), SMART 5 : domains in the context of genomes and networks, *Nucleic Acids Res.* **34**, 257-260. <http://smart.embl-heidelberg.de/>.