

研究报告

间隙连接蛋白 31 相互作用蛋白
Annexin II 的筛选与证实*刘宇** 贺力强** 谭志平 唐程远 迟静薇 蔡芳 潘乾
龙志高 梁德生 郭玲仟 戴和平 夏昆*** 张灼华 夏家辉

(中南大学医学遗传学国家重点实验室, 长沙 410078)

摘要 间隙连接蛋白 31 (connexin31, Cx31) 是间隙连接蛋白 (connexin) 家族的一员, 目前对于 Cx31 的功能及其调节方式知之甚少. 采用固相多肽合成的方法合成 Cx31 羧基端一个多肽片段 (250~266), 经 HPLC 纯化后偶联到匙孔蛾血蓝蛋白, 免疫新西兰雄兔后采血检测、并纯化、经蛋白质印迹、细胞免疫荧光染色、免疫沉淀证实得到的抗体为特异性抗 Cx31 的抗体. 运用制备的抗 Cx31 多克隆抗体免疫沉淀, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 蛋白质条带回收, 蛋白质胶块酶解, Q-TOF 质谱分析, 数据库扫描筛选可能相互作用蛋白, 运用抗体 pull-down 实验, 筛选到可能相互作用蛋白 annexin II, 经过免疫共沉淀、细胞免疫共定位等实验证实 annexin II 与 Cx31 相互作用.

关键词 间隙连接蛋白 31, 抗体蛋白质相互作用, annexin II, 免疫共沉淀, 免疫共定位

学科分类号 Q25

间隙连接 (gap junction) 是在相邻细胞间形成的一类聚合通道, 这类通道允许小分子物质如离子、第二信使以及代谢过程中产生的某些分子通过^[1,2], 几乎所有的细胞与组织均利用间隙通道来传递信息. 间隙连接通道在细胞增殖, 胚胎发育和肿瘤抑制过程中均起着十分重要的作用^[3]. 形成间隙连接的间隙连接蛋白 (connexin, Cx) 是一多基因家族, 该家族不同蛋白质之间具有高度相似性: 均由 4 个跨膜结构域, 2 个胞外环, 1 个胞内环和位于胞质部分的氨基端与羧基端组成. 其中跨膜区与胞外环高度保守, 而胞质部分则相对保守性较低^[4]. 间隙连接蛋白 31 (Cx31) 是间隙连接蛋白家族中的一员, 近来的研究发现 Cx31 突变导致常染色体显性听力下降、常染色体隐性听力下降、周围神经疾病伴听力丧失^[5-7], 以及变性红皮肤病角化病^[8], 这些研究显示该间隙连接在维持正常的生长发育与生理功能等方面具有重要的作用.

间隙连接蛋白相互作用蛋白在间隙连接蛋白的组装、运输、膜定位, 间隙连接通道的形成、间隙连接通信的调控等一系列过程中均有十分重要的作用, 目前对间隙连接蛋白相互作用蛋白的研究主要集中在 Cx43, 通过各种方法筛选到 Cx43 相互作用蛋白有 ZO-1^[9-13]、v-Src^[14]、c-Src^[15,12]、CK1^[16]、PKA^[17]、cadherin^[18]、caveolin^[19]、 α -catenin^[18]、 β -catenin^[20]、 β -tubulin^[21]等, 其中检测到 ZO-1 又与

间隙连接蛋白 Cx45^[22,23]、Cx46^[24]、Cx50^[24]、Cx31.9^[25]等相互作用. 而目前对 Cx31 相互作用蛋白研究十分有限, 本研究利用蛋白质组学的方法, 筛选 Cx31 相互作用蛋白, 并对筛选到的可能相互作用蛋白进行免疫共沉淀、细胞免疫荧光定位证实.

1 仪器与材料

1.1 主要材料与试剂

1.1.1 主要仪器. Pioneer 多肽合成系统 (ABI 公司), 基质辅助激光解析飞行时间质谱 (ABI 公司), Q-TOF (MicroMASS 公司), 高效液相色谱 (Waters 公司), 激光共聚焦 (radiance2100) 显微镜.

1.1.2 实验动物. 2~3 kg 新西兰白兔, 雄性.

1.1.3 试剂. PAL-PEG-PS resin, Fmoc-AA-OH, HATU, DIPEA, DMF, Piperidine, TFA (ABI 公司); 匙孔蛾血蓝蛋白 (Pierce 公司); 弗氏佐剂 (GibcoBRL 公司); sulfolink coupling gel (Pierce 公司); Sepharose 4B, PVDF membrane, ECL Plus Detection Kit (Pharmacia 公司); Cy3-labeled

*国家重点基础研究发展规划项目 (973) (2001CB510302), 国家高技术“863”计划资助项目 (2002BA711A07) 和国家自然科学基金资助项目 (30370737; 30123006).

** 并列第一作者. *** 通讯联系人.

Tel: 0731-4472093, E-mail: nlmglcy@xysm.net

收稿日期: 2005-01-04, 接受日期: 2005-02-28

anti-rabbit IgG protein A agarose, protein G agarose (KPL 公司); pcDNA3.1/myc-his(-)B(invitrogen 公司); HT1080 cell, HeLa cell (CCTCC 公司); anti-c-myc monoclonal antibody (Chemicon 公司); anti-rabbit IgG/HRP, anti-mouse IgG/HRP 二抗 (CalBiochem).

2 方 法

2.1 Cx31 多克隆抗体的制备与纯化

对 Cx31 蛋白进行免疫原性分析与 Blast 分析, 确定序列为: NH₂-E-V-D-P-D-P-G-N-N-K-L-Q-A-S-A-P-N-C-CONH₂, 其中 C 端的半胱氨酸为额外添加, 以提供巯基偶联至载体 (匙孔螯血蓝蛋白) 上. 多肽合成在 Pioneer 多肽合成仪上合成. 合成完毕, 用裂解试剂 R (90%三氟乙酸, 5%二巯基乙烷, 3%苯甲硫醚, 2%苯甲醚) 室温下裂解 2.5 h, 收集裂解液, 氮气吹干, 加冷乙醚沉淀和洗涤样品, 冷冻干燥样品. 合成样品溶于去离子水中, 在 Waters alliance HPLC 上纯化, 色谱柱为 C18 反相柱. 合成样品经纯化后, 进行 MALDI-TOF 质谱检测, 确定其合成正确. 将合成的多肽半抗原偶联至匙孔螯血蓝蛋白上用于免疫.

选用健康 2~3 kg 新西兰雄兔, 免疫前 7 天耳静脉采血 1~2 ml 得免疫前血清. 第一次免疫: 抗原 1 ml (1 g/L), 加入弗氏完全佐剂 1 ml, 超声乳化后, 进行兔背部皮下多点注射; 28 天后, 第二次加强免疫: 抗原 1 ml (0.5 g/L), 加入弗氏不完全佐剂 1 ml, 超声乳化后, 进行兔大腿肌肉多点注射; 14 天后, 第三次加强免疫: 抗原用量同第二次, 进行背部皮下多点注射. 第三次加强免疫后 10 天左右采血 2~3 ml 检测. 效价达到要求后大量采血, 室温离心 (3 000 r/min) 收集上清, 即为抗血清. 每次采血前数小时予以禁食.

抗血清的纯化采用 sulfolink coupling gel, 纯化方法见产品说明书.

2.2 质粒的构建与表达

设计引物: Cx31pcF, 5' CG gaa ttc GGC GCC ATG GAC TGG AAG ACA CTC CA 3' (小写为 *EcoR* I 切点, 下划线为 Kozak 序列); Cx31pcR, 5' CC aag ctt GGG ATG GGG GTC AGG TTG GG 3' (小写为 *Hind* III 切点). 以人 cDNA 为模板, PCR 扩增 Cx31 全长编码区, PCR 产物回收, 克隆到 T 载体中, 测序证实序列正确. *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切并回收目的片段, 亚克隆至 pcDNA3.1/myc-

his(-)B, 最后得到表达质粒 Cx31-pcDNA3.1/myc-his(-)B.

设计引物: CX31-F, 5' CG g aat tcT GGG CGC CAT GGA CTG GAA GAC ACT CCA 3' (小写为 *EcoR* I 切点); CX31-R, 5' GC g tcg acT GGA TGG GGG TCA GGT TGG G 3' (小写为 *Sal* I 切点). 以人 cDNA 为模板, PCR 扩增 Cx31 全长编码区, PCR 产物回收, 克隆到 T 载体中, 测序证实序列正确. *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切并回收目的片段, 亚克隆至 pEGFP-N1, 最后得到表达质粒 Cx31-pEGFP-N1.

表达质粒转染 HT1080 细胞与 HeLa 细胞. 转染后的细胞于 DMEM/10%FBS 中恢复培养 24 h 后, 加 G418 至 600 mg/L 筛选 10~15 天, 至单克隆长出. 挑选并检测单克隆.

2.3 抗血清蛋白质印迹检测

25 cm² 培养瓶培养 HT1080 细胞 (Cx31 转染和未转染各一瓶) 至 80%~90% 汇合. 弃培养基, 用 PBS 洗涤 3 次, 每瓶细胞加 200 μ l 2 $\times$ SDS 上样缓冲液裂解细胞, 立即于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min, 冰上冷却. 进行蛋白质印迹检测, 用 anti-c-myc 单克隆抗体作为阳性对照.

2.4 抗血清细胞免疫荧光染色

稳定表达 Cx31-myc 融合蛋白的 HT1080 细胞, 用于免疫荧光染色. 操作步骤: 弃培养基, PBS 洗涤 2 次, 甲醇 (-20 $^{\circ}$ C) 固定细胞 10 min, PBS/0.1% Triton X-100 渗透 10 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 5% BSA 封闭 30 min, 加一抗 (anti-Cx31 1:200 稀释于 5% BSA), 室温 1 h, PBS 洗涤 5 次, 每次 5 min, 5% BSA 再封闭 30 min, 加二抗 (cy3-labeled anti-Rabbit IgG 1:1 000, 稀释于 5% BSA), 室温 40 min, PBS 洗涤 7 次, 每次 5 min, 去离子水洗涤 1 次. 封片, 激光共聚焦显微镜观察.

2.5 抗血清免疫沉淀

100 cm² 培养皿培养 HT1080 细胞 (转染和未转染 Cx31 各一皿) 至 80%~90% 汇合. 操作在 4 $^{\circ}$ C 进行, 弃培养基, 用预冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 加裂解缓冲液 (50 mmol/L Hepes pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% DOC, protease 抑制剂: 10 mg/L antipain, 10 mg/L aprotinin, 10 mg/L Leupeptin, 10 mg/L trypsin 抑制剂, 50 mmol/L NaF, 2 mmol/L Na₃VO₄) 于细胞中, 冰上裂解 1 h, 裂解液转入 1.5 ml 离心管, 20 000 $\times$ g, 离心 30 min, 取上清, 加入

Agarose 40 μl , 4 $^{\circ}\text{C}$, 转鼓预吸附 2 h, 离心, 取上清, 加一抗: 转染 Cx31 的 HT1080 细胞裂解上清加 anti-myc, anti-Cx31, 免疫前血清各 10 μl , 没有转染 Cx31 的 HT1080 细胞裂解上清加 anti-Cx31 抗体 10 μl , 4 $^{\circ}\text{C}$, 转鼓上反应 1 h, 各加入 protein A agarose 20 μl , 其中加 anti-myc 的反应管加 protein G agarose 20 μl , 转鼓过夜, 离心, 弃上清, 用裂解缓冲液洗涤沉淀 4 次, 每管加 40 μl 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min, 离心取上清, 蛋白质印迹检测。

2.6 Cx31 相互作用蛋白筛选

稳定表达的 Cx31-myc/ HT1080 细胞和 HT1080 细胞培养至 95% 融合, 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷 PBS 洗 3 次, 吸干, 裂解缓冲液冰上裂解 15 min, 收集裂解液, 冰上再裂解 30 min, 16 000 g 离心, 收集上清, 加入 protein A agarose, 4 $^{\circ}\text{C}$, 转鼓预吸附 2 h, 离心, 取上清, Cx31-myc/ HT1080 细胞和 HT1080 细胞裂解液各加入 protein A agarose 与 anti-Cx31 多克隆抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$, 转鼓过夜. 4 $^{\circ}\text{C}$, 2 000 g 离心, 取沉淀, RIPA 缓冲液洗涤 6 次, 加上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, SDS-PAGE 分离, 考马斯亮蓝染色, 脱色液脱色, 蛋白质带回收, 50% 乙腈脱色, DTT 还原, IAA 修饰, 测序级胰酶酶解, LC-Q-TOF 质谱分析酶解产物在 Mascot 上进行质谱数据分析。

2.7 细胞免疫共定位

稳定表达 Cx31-EGFP 融合蛋白的 HeLa 细胞, 用于荧光免疫共定位. 操作步骤: 弃培养基, PBS 洗涤 2 次, 100% 甲醇 (-20 $^{\circ}\text{C}$) 固定细胞 10 min, PBS/0.1% Triton X-100 渗透 10 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 3% BSA 封闭 5 min, 加相互作

用蛋白一抗 (anti-annexin II monoclonal antibody 稀释于 3% BSA), 室温 1 h, PBS 洗涤 5 次, 每次 5 min, 3% BSA 再封闭 5 min, 加二抗 (cy3-labeled anti-mouse IgG 1: 500, 稀释于 3% BSA), 室温 40 min, PBS 洗涤 7 次, 每次 5 min, 去离子水洗涤 1 次. 封片, 激光共聚焦显微镜下观察。

2.8 免疫共沉淀

100 cm^2 培养皿培养 Cx31myc/ HT1080 细胞与 HT1080 细胞 (各一皿) 至 80%~90% 汇合. 操作在 4 $^{\circ}\text{C}$ 进行, 弃培养基, 用预冷 PBS 洗涤细胞 3 次, 加裂解缓冲液于细胞中, 冰上裂解 1 h, 裂解液转入 1.5 ml 离心管, 20 000 g , 离心 20 min, 取上清, 每种裂解液分成二等份. 取一份 Cx31myc/ HT1080 细胞裂解液加入 protein A 40 μl , 4 $^{\circ}\text{C}$, 转鼓预吸附 2 h, 离心, 取上清, 加一抗 (anti-Cx31 多克隆抗体) 10 μl , protein A agarose 20 μl , 取一份 HT1080 细胞裂解液作为阴性对照加 anti-Cx31 多克隆抗体 10 μl , protein A agarose 20 μl ; 取另一份 Cx31myc/ HT1080 细胞裂解液加相互作用蛋白抗体 (anti-annexin II 单克隆抗体) 10 μl , protein G agarose 20 μl , 取另一份 HT1080 细胞裂解液作为阴性对照加 anti-annexin II 单克隆抗体 10 μl , protein G agarose 20 μl . 4 $^{\circ}\text{C}$, 转鼓上反应过夜, 2 000 g 离心, 弃上清, 用裂解缓冲液洗涤沉淀 6 次, 每管加 40 μl 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min, 离心取上清, 免疫印迹检测。

3 结 果

3.1 合成半抗原的纯化与确证

多肽合成仪合成的半抗原用去离子水溶解, 在 Waters alliance HPLC 上纯化, 纯化结果见图 1a,

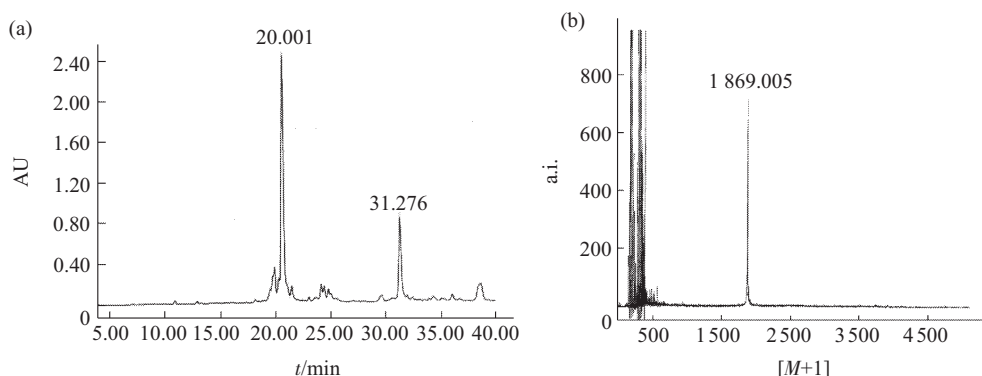


Fig.1 Hapten synthesis and purification

(a) Waters alliance HPLC purify the synthesized hapten, and collect the highest peak at the retention time (20.801 min). (b) MALDI-TOF mass analyses the sample from the HPLC purified hapten, $[M+1]=1869.005$.

收集主峰, 进行 MALDI-TOF 质谱分析, 结果见图 1b, $M+1=1869.005$, 与半抗原的理论分子质量相吻合, 显示合成正确。

3.2 抗血清蛋白质印迹检测

蛋白质印迹 (Western blotting) 结果显示: 免疫前血清中没有检测到抗 Cx31 抗体, 免疫血清中存在抗 Cx31 抗体, 并且效价可达 1:2 000 (结果没显示)。免疫血清经 sulfolink coupling gel- 半抗原纯化后, 再经 Western blotting 检测 (图 2), 结果显示: 抗 Cx31 抗体效价在 1:1 000 时, 结果较理想。

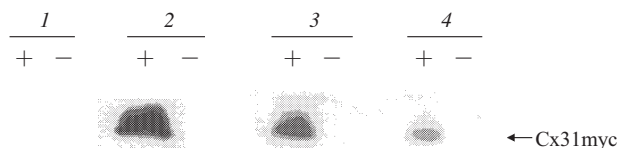


Fig.2 Western blotting result of anti-Cx31 polyclonal antibody

The “+” is the fusion protein (Cx31-pcDNA3.1/myc-his (-) B/HT1080 cell expressed protein. The “-” HT1080 cell lysate. The first membrane blotted with pre-antisera. The second membrane blotted with anti-Cx31 antibody. The third membrane blotted with anti-Cx31 antibody. The fourth membrane blotted with anti-myc antibody.

3.3 细胞免疫荧光显示 Cx31 定位于间隙连接处

Cx31 是一种间隙连接蛋白, 为进一步检测该抗体, 我们用 Cx31 转染和未转染的 HT1080 细胞进行免疫荧光染色, 检测结果显示 (图 3), 在 Cx31 转染的细胞间隙连接处和胞质中, 有明显而特异的红色荧光信号, 而未转染的细胞中则没有这种信号。表明该抗体可用于细胞免疫荧光检测。

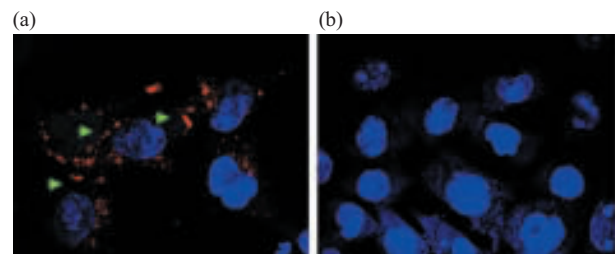


Fig.3 Immunofluorescence result

Cx31-pcDNA3.1/myc-his (-) B/HT1080 Cell fixed with methanol, and then blotted with anti-Cx31 antibody. (a) Arrows show the cell-cell contact gap junction. HT1080 Cell fixed with methanol, and then blotted with anti-Cx31 antibody. (b) control. Nucleus stained with DAPI (900x).

3.4 免疫沉淀

为了证明该抗体是否能进行免疫沉淀分析, 我

们用 Cx31 转染和未转染的 HT1080 细胞进行实验, 并且设计了一系列对照, 结果见图 4, Cx31 转染的 HT1080 细胞进行免疫沉淀: 加 Cx31 抗体和加 myc 抗体的阳性对照泳道均可清楚地看到目的带, 而加免疫前血清的则没有该条带。未转染的 HT1080 细胞免疫沉淀, 加 Cx31 抗体, 没有该目的带。结果显示, 该抗体可用于免疫沉淀实验。

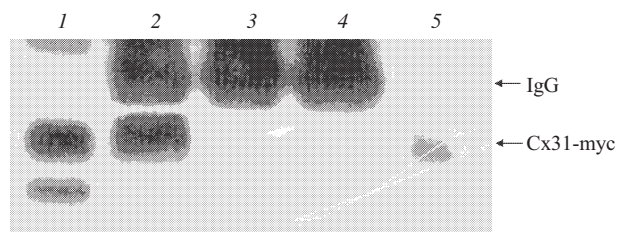


Fig.4 Immunoprecipitation result of anti-Cx31 antibody

The first to the fourth line are Cx31-myc/HT1080 or HT1080 cell lysates immunoprecipitated with antibody or pre-antisera. 1: Cx31-myc fusion protein blotted with anti-myc antibody; 2: Cx31-myc fusion protein blotted with anti-Cx31 antibody; 3: Cx31-myc fusion protein blotted with pre-antisera; 4: HT1080 lysate blotted with anti-Cx31 antibody; 5: Cx31-myc fusion protein directly blotted with anti-Cx31 antibody.

3.5 Q-TOF 质谱扫描结果

图 5a 为 Cx31-myc/ HT1080 细胞匀浆 anti-Cx31 polyclonal antibody 免疫沉淀, SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 考马斯亮蓝染色结果; 蛋白

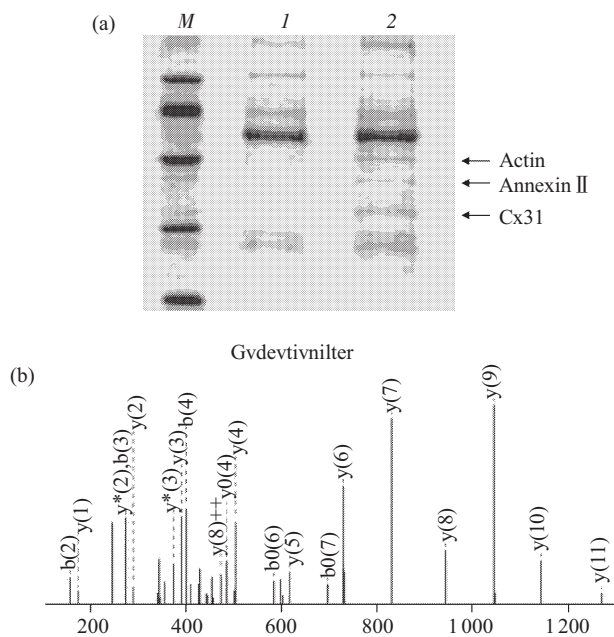


Fig.5 Pull-down results

(a) SDS-PAGE and coomassie staining of protein obtained in a pull-down assay with anti-Cx31 antibody with Cx31 myc/HT1080 or HT1080 cells homogenate. Arrows show the actin and annexin II. Both proteins were identified by MALDI-Q-TOF in the pull-down fraction. (b) Sequencing of one of the peptides from annexin II by MALDI-Q-TOF.

质条带测序级胰酶酶解, LC-Q-TOF-MS/MS 质谱扫描, 数据库分析结果显示为 actin 与 annexin II (图 5b).

3.6 细胞免疫共定位与免疫共沉淀

筛选到的可能相互作用蛋白 annexin II 与 Cx31

进行细胞免疫共定位, 从图 6c 可知 Cx31 与 annexin II 共定位(黄色为共定位处). Annexin II 与 Cx31 进行免疫共沉淀, 从图 7 可知 Cx31 与 annexin II 免疫共沉淀, 从细胞免疫共定位与免疫共沉淀可知, Cx31 与 annexin II 相互作用.

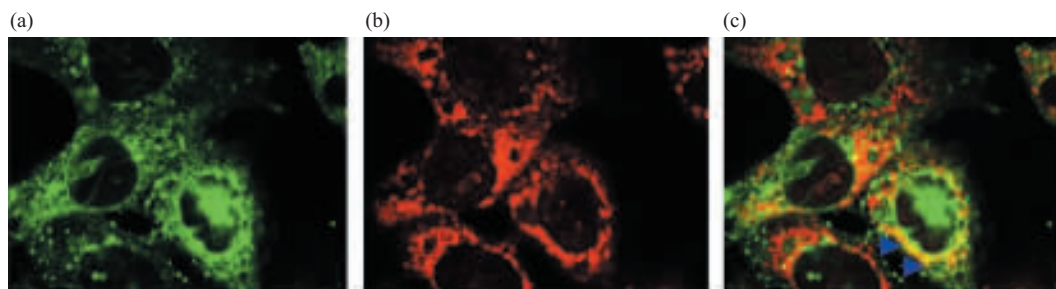


Fig.6 Colocalization result

Cells were stained with antibodies against annexin II (Fig 7b, red) and in green show the Cx31-EGFP(Fig 7a). The arrows show the merge. (1500×). (a) Cx31-EGFP; (b) Annexin II; (c) Merge.

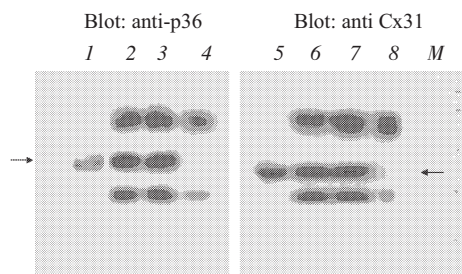


Fig.7 Coimmunoprecipitation results

Cx31myc/HT1080 and HT1080 cells lysed, immunoprecipitated with antibodies against Cx31 or annexin II, and revealed for annexin II and Cx31 by immunoblot. 1: Cx31-myc fusion protein directly blotted with anti-annexin II antibody; 2 and 3: Cx31-myc fusion protein, immunoprecipitated with anti-Cx31 antibody; 4: HT1080 cell lysates precipitated with anti-Cx31; 5: Cx31-myc fusion protein directly blotted with anti-Cx31 antibody; 6 and 7: Cx31-myc fusion protein, immunoprecipitated with anti-annexin II antibody; 8: HT1080 cell lysates precipitated with anti-annexin II.

4 讨 论

进行基因功能研究, 必须获得该基因所编码蛋白的特异性抗体. 本实验采用设计半抗原, 多肽合成仪合成半抗原的方法, 经纯化后偶联到载体蛋白 KLH 上, 免疫新西兰雄兔后获得高效价的多克隆抗体, 经上述一系列实验证明, 可以进行 Western blotting 检测, 细胞免疫荧光检测, 免疫沉淀检测, 为进一步了解 GJB3 基因的功能提供了强有力的工具. 该抗体在设计半抗原时, 进行了一系列的分析, 是一个特异性很高的多肽片段. 与其他间隙连接蛋

白及其他蛋白质没有同源性.

Annexin II 是 annexins 家族中的一员, annexins 为一类 Ca^{2+} 依赖的磷脂结合蛋白. Annexin II 可能在一系列生理活动中起重要作用, 如细胞外泌(exocytosis)^[26]、膜运输(membrane trafficking)^[27]、细胞增殖^[28]、胰岛素信号传导^[28], 蛋白质降解途径^[29]等, 细胞外的 annexin II 四聚体可能作为细胞黏附因子、纤溶酶原(plasminogen)和组织纤溶酶原激活剂(tissue plasminogen activator, tPA)的受体、tenascin-C 的受体, 以及 Procathepsin B 在肿瘤细胞的表面受体, 在几种生理过程起作用, 如细胞黏附、纤溶、配体介导的细胞信号传导和在肿瘤细胞表面起作用, 可能促进肿瘤浸润和转移.

Annexin II 定位: Annexin II 的生化特性和其胞内分布受与 p11 形成的复合物的调节. 在人的成纤维细胞中, 两个亚单位协同表达, 重链存在可溶的和细胞骨架结合的两种形式, 其分布较为复杂; calpactin I 轻链亚单位全部出现在细胞骨架. 在人皮肤细胞中, annexin II 主要定位于细胞膜(cell membrane), 胞质中也出现一些着色^[30]. 总的来说, 在细胞中, annexin II (2)p11(2) 四聚体复合物定位在亚膜骨架细胞质膜的胞质表面.

Annexin II 是上皮生长因子受体(EGF-R)和酪氨酸(tyrosine)激酶 pp60v-src 的主要底物, 血小板衍生生长因子(PDGF)、胰岛素和肝细胞生长因子/scatter 因子(HGF/SF)受体酪氨酸激酶体外和细胞

内底物, 丝氨酸苏氨酸蛋白激酶如蛋白激酶 C (PKC)、cAMP-dependent protein kinase A (PKA) 的底物. 研究提示 annexin II 四聚体的磷酸化是一负调节子, annexin II 四聚体的去磷酸化可能为蛋白质激活所必需.

对于 connexin 31 的功能调节知之甚少, 关于 connexin 31 与 annexin II 或者 annexin II 四聚体的相互作用也尚未报道. 本实验采用 HT1080 与 HeLa 细胞进行实验, 是由于这两种细胞均没有 Cx31 表达, 而 HeLa 细胞则间隙蛋白家族均没有表达, 是目前研究间隙连接蛋白常用的细胞系. 同时, 本实验在证实 connexin 31 与 annexin II 相互作用过程中, 采用的是外源基因表达的方法, 还有待进一步证实其体内的真实情况. 由于 annexin II 功能众多, annexin II 对 Cx31 的调节作用目前还不清楚, 还有待进一步实验.

参 考 文 献

- Kumar N M, Gilula N B. The gap junction communication channel. *Cell*, 1996, **84** (3): 381~388
- Reaume A G, de Sousa P A, Kulkarni S, *et al.* Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science*, 1995, **267** (5205): 1831~1834
- Goodenough D A, Goliger J A, Paul D L. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem*, 1996, **65**: 475~502
- Hertzberg E L, Disher R M, Tiller A A, *et al.* Topology of the Mr 27 000 liver gap junction protein. Cytoplasmic localization of amino- and carboxyl termini and a hydrophilic domain which is protease hypersensitive. *J Biol Chem*, 1988, **263** (35):19105~19111
- Xia J H, Liu C Y, Tang B S, *et al.* Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nat Genet*, 1998, **20** (4): 370~373
- Liu X Zhong, Xia X J, Xu L R, *et al.* Mutations in connexin 31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss. *Hum Mol Genet*, 2000, **9** (1): 63~67
- Núria López-Bigas, Montserrat Olivé, Raquel Rabionet, *et al.* Connexin31 (GJB3) is expressed in the peripheral and auditory nerves and causes neuropathy and hearing impairment. *Hum Mol Genet*, 2001, **10** (9): 947~952
- Richard G, Smith L E, Bailey R A, *et al.* Mutations in the human connexin gene GJB3 cause erythrokeratoderma variabilis. *Nat Genet*, 1998, **20** (4): 366~369
- Giepmans B N, Moolenaar W H. The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Curr Biol*, 1998, **8**: 931~934.
- Toyofuku T, Yabuki M, Otsu, K, *et al.* Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 1998, **273** (21):12725~12731
- Giepmans B N, Verlaan I, Moolenaar W H. Connexin-43 interactions with ZO-1 and alpha- and beta-tubulin. *Cell Commun Adhes*, 2001, **8** (4~6): 219~223
- Toyofuku T, Zhang H, Akamatsu Y, *et al.* c-Src regulates the interaction between connexin-43 and ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 2001, **276** (3):1780~1788
- Barker R J, Price R L, Gourdie R G. Increased association of ZO-1 with connexin43 during remodeling of cardiac gap junctions. *Circ Res*, 2002, **90** (3):317~324
- Lin R, Warn-Cramer B J, Kurata W E, *et al.* v-Src phosphorylation of connexin 43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication. *J Cell Biol*, 2001, **154** (4): 815~827
- Huang S, Dudez T, Scerri I, *et al.* Defective activation of c-Src in cystic fibrosis airway epithelial cells results in loss of tumor necrosis factor- α -induced gap junction regulation. *J Biol Chem*, 2003, **278** (10): 8326~8332
- Cooper C D, Lampe P D. Casein kinase 1 regulates connexin-43 gap junction assembly. *J Biol Chem*, 2002, **277** (47): 44962~44968
- Tenbroek E M, Lampe P D, Solan J L, *et al.* Ser364 of connexin43 and the upregulation of gap junction assembly by cAMP. *J Cell Biol*, 2001, **155** (7): 1307~1318
- Fujimoto K, Nagafuchi A, Tsukita S, *et al.* Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation. *J Cell Sci*, 1997, **110** (3): 311~322
- Schubert A L, Schubert W, Spray D C, *et al.* Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1. *Biochemistry*, 2002, **41** (18): 5754~5764
- Ai Z, Fischer A, Spray D C, *et al.* Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *J Clin Invest*, 2000, **105** (2):161~171
- Giepmans B N, Verlaan I, Hengeveld T, *et al.* Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr Biol*, 2001, **11** (17): 1364~1368
- Kausalya P J, Reichert M, Hunziker W. Connexin45 directly binds to ZO-1 and localizes to the tight junction region in epithelial MDCK cells. *FEBS Lett*, 2001, **505** (1): 92~96
- Laing J G, Manley-Markowski R N, Michael K, *et al.* Connexin45 interacts with zonula occludens-1 and connexin43 in osteoblastic cells. *J Biol Chem*, 2001, **276** (25): 23051~23055
- Nielsen P A, Baruch A, Shestopalov V I, *et al.* Lens connexins alpha3Cx46 and alpha8Cx50 interact with zonula occludens protein-1 (ZO-1). *Mol Biol Cell*, 2003, **14** (6): 2470~2481
- Nielsen P A, Beahm D L, Ben N G Giepmans, *et al.* Molecular cloning, functional expression, and tissue distribution of a novel human gap junction-forming protein, connexin-31.9. Interaction with zona occludens protein-1. *J Biol Chem*, 2002, **277** (41): 38272~38283
- König J, Prenen J, Nilius B, *et al.* The annexin II-p11 complex is involved in regulated exocytosis in bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Biol Chem*, 1998, **273** (31): 19679~19684
- Pol A, Ortega D, Enrich C. Identification of cytoskeleton-associated proteins in isolated rat liver endosomes. *Biochem J*, 1997, **327** (Pt3): 741~746

- 28 Biener Y, Feinstein R, Mayak M, *et al.* Annexin II is a novel player in insulin signal transduction. Possible association between annexin II phosphorylation and insulin receptor internalization. *J Biol Chem*, 1996, **271** (46): 29489~29496
- 29 Mayran N, Parton R G, Gruenberg J. Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells. *The EMBO J*, **22** (13): 3242~3253
- 30 Culard J F, Basset-Seguín N, Calas B, *et al.* Characterization and subcellular localization of calcium-dependent phospholipid binding proteins (annexins) in normal human skin and reconstituted epidermis. *Invest Dermatol*, 1992, **98** (4): 436~441

Human Gap Junction Protein Connexin31 Interacts Directly With Annexin II *

LIU Yu**, HE Li-Qiang**, TAN Zhi-Ping, TANG Cheng-Yuan, CHI Jing-Wei, CAI Fang, PAN Qian, LONG Zhi-Gao, LIANG De-Sheng, WU Ling-Qian, DAI He-Ping, XIA Kun***, ZHANG Zhuo-Hua, XIA Jia-Hui

(National Laboratory of Medical Genetics, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract Connexins form gap junctions that mediate the transfer of ions, metabolites, and second messengers between contacting cells. Connexin31(Cx31) is an important member of connexin β family. Mutations in Cx31 are associated with erythrokeratoderma variabilis (EKV), hearing impairment and peripheral neuropathy. The pathological mechanism for Cx31 mutants in these diseases remains unknown. Assembly, intracellular transport, plaque assembly and stability and channel conductivity of Cx31 are finely regulated and likely involve proteins that interact with Cx31. However, little is known about the Cx31 interaction proteins. And then the differential immunogenic peptide was synthesized, the purified peptide was coupled to the hemocyanin from keyhole limpets (KLH). The peptide-KLH solution was mixed with Freund's complete or incomplete adjuvant and immunized rabbit to prepare specific polyclonal antibody against the topology of connexin31. A proteomics approach was used to screen Cx31 binding proteins using HT1080 cells stably expressing a myc-tagged Cx31. Immunoprecipitation followed by peptide sequence analysis identified association of actin and annexin II. Interaction between annexin II and Cx31 is further confirmed by coimmunoprecipitation, and immuno-colocalization. This result would be useful to study the function of connexin31 further.

Key words connexin31, protein-protein interaction, annexin II, coimmuno-precipitation, immuno-colocalization

*This work was supported by The Special Funds for Major State Basic Research of China (2001CB510302), State 863 High Technology R&D Project of China (2002BA711A07) and The National Natural Science Foundation of China (30370737; 39970372).

** These authors contributed equally.

***Corresponding author. Tel: 86-731-4472093, E-mail: nlmglcy@xysm.net

Received: January 4, 2005 Accepted: February 28, 2005