

研究报告

亮氨酸拉链结构域在 p57 与 actin 结合中的重要作用 *

刘长振 何 立 沈庆涛 李湘辉 隋森芳 **

(清华大学生物科学与技术系, 生物膜国家重点实验室, 北京 100084)

摘要 Actin 结合蛋白 p57 与 actin 之间存在相当复杂的作用机制. 为深入了解这一机制, 利用体外 F-actin 结合共沉淀、细胞内免疫荧光共定位以及免疫印迹和吸光度扫描分析等实验技术, 系统地研究了亮氨酸拉链结构域在 p57 与 actin 结合中的作用. 结果显示, 亮氨酸拉链序列区域本身没有 actin 结合活性, 但该区域缺失突变以及破坏亮氨酸拉链结构域的点突变都可以显著降低 p57 同 actin 的结合能力. 同时, 体内和体外的半定量分析结果表明, 这两种突变导致 p57 同 actin 的结合能力的降低程度十分相近. 这些结果充分说明亮氨酸拉链结构域在 p57 与 actin 的结合中起到了重要作用.

关键词 p57, actin 结合活性, 亮氨酸拉链结构域

学科分类号 Q78, Q245

类 coronin 蛋白家族(coronin-like protein family)是一类广泛存在于真核细胞生物中的肌动蛋白结合蛋白家族(actin-binding protein family)^[1]. 该家族第一个成员 coronin 是在粘菌(*Dictyostelium discoideum*)中被发现的. 研究表明, 它在细胞移动(cell locomotion)、细胞吞噬(phagocytosis)以及胞浆移动(cytokinesis)等细胞活动中都起了重要的作用^[2-4]. p57, 又叫 Hcoronin1, 是第一个被鉴定出来的哺乳动物类 coronin 蛋白^[1,5]. 它的结构特征是在中心区域有一个与家族中其他成员相似的 5 WD(Trp-Asp)重复序列结构(5 WD repeats domain), 通常认为这个结构可作为一个平台来介导蛋白质之间的相互作用^[6]. 在 p57 的 C 端有一个家族中其他成员所没有的亮氨酸拉链结构域(leucine-zipper domain, LZ domain)^[7]. 根据最近的报道, p57 通过这个 LZ domain 形成同源二聚体(homo-dimer)结构^[8]. 在组织分布上, 与其他哺乳动物类 coronin 蛋白所具有的广泛分布性不同, p57 仅在淋巴样或骨髓样细胞谱系(lymphoid/myeloid lineage)中特异性分布^[7].

现已知 p57 的生理功能是它参与了细胞吞噬作用(phagocytosis), 并且有研究表明它与肌动蛋白(actin)的结合是细胞吞噬过程中的一个重要步骤^[9,10]. 通过与 actin 的相互作用, p57 可以将一些功能蛋白诸如 p47^{phox} (NADPH 氧化酶的一个亚基)等招募至新生的吞噬泡(phagosomes)周围^[11]. 鉴于 p57 与 actin 之间结合的重要性, p57 的 actin 结合

位点(actin-binding sites)得到了深入的研究. Oku 等^[12]研究发现, p57 内部有两个区域(Met¹~Asp³⁴ 和 Ile¹¹¹~Glu²⁰⁴)具有结合 actin 纤维(filamentous actin, F-actin)的能力.

同其他类 coronin 蛋白家族成员一样, p57 与其他种类的 actin 结合蛋白不具有序列相似性^[1]. 而且在家族内部, 其他成员也不具有 p57 这种多 actin 结合位点(multiple actin-binding sites)^[12]. 这些现象预示着 p57 与 actin 之间结合具有相当复杂的机制. 为了深入了解 p57 的 actin 结合性质, 我们检测了蛋白质 C 端的 LZ domain 在蛋白质结合 actin 过程中的作用. 研究结果表明 LZ domain 在 p57 与 actin 结合的过程中起着非常重要的作用.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂. actin, 交联剂 disuccinimidylsuberate (DSS)(Sigma 公司); 限制性内切酶、T4 连接酶(大连宝生物工程公司); pfu DNA polymerase, Silver Beads 胶回收试剂盒, PCR 引物(上海生工生物工程技术有限公司); 胎牛血清, RPMI 1640 培养基(Hyclone 公司); Glutathione Sepharose™ 4 fast

*国家重点基础研究发展规划项目(973)(2004CB720005).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62784768, E-mail: suisf@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2005-03-25, 接受日期: 2005-04-30

flow树脂(Amersham Pharmacia 公司); DMEM 培养基, lipofectamine™ 2000 转染试剂盒(Invitrogen 公司). 其他试剂均为国产分析纯.

1.1.2 质粒、菌种、细胞株及抗体. 原核表达质粒 pGEX-6P-1 为本实验室保存; 真核表达质粒 pcDNA 4.0/His-max 由清华大学段明星教授惠赠. 大肠杆菌 DH5 α 、BL21 为本实验室保存. THP-1 购自中国协和医科大学细胞库; COS-1 细胞由清华大学孟安明实验室惠赠. 小鼠抗 Xpress™ 单克隆抗体购自 Invitrogen 公司; 羊抗 actin 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司.

1.2 方法

1.2.1 野生型 p57 及 p57 的缺失突变体和点突变体的原核及真核表达质粒的构建. 利用 RT-PCR 的方法由 THP-1 细胞的总 mRNA 获得 p57 的 cDNA. p57、p57³⁸⁶⁻⁴⁶¹、p57¹⁻⁴³² 和 p57^{mutant} (Leu⁴⁴¹ 和 Leu⁴⁴⁷ 突变为 Ala)(图 1)的原核和真核表达质粒构建过程中的 PCR、DNA 提取、纯化、酶切、胶回收、连接、转化、鉴定等均按常规方法进行. 引物如下. a. p57: 上游引物, GTCGGATCCATGAGCCGGCAGGTGG; 下游引物, GTCGAATTCCTACTTGGCCTG GACTGTCTC. b. p57³⁸⁶⁻⁴⁶¹: 上游引物, GTCGGATCCCCCTCCTCATCTCCCTCAAG; 下游引物, GTCGAATTCCTACTTGGCCTGGACTGTCTC. c. p57¹⁻⁴³²: 上游引物, GTCGGATCCATGAGCCGGCAGGTGG; 下游引物, GTCGAATTCCTACC GAGACACGGCATCCG. d. p57^{mutant}: 上游引物, GTCGGATCCATGAGCCGGCAGGTGG; 下游引物, TACTTGGCCTGGACTGTCTCCTCCAGCCT GTCCAAGCGTTCTGGAGCTCCTGCACCGTGG CCTGGAGCTTC. 以上构建的载体均经过 DNA 测序验证(上海博亚生物技术公司).

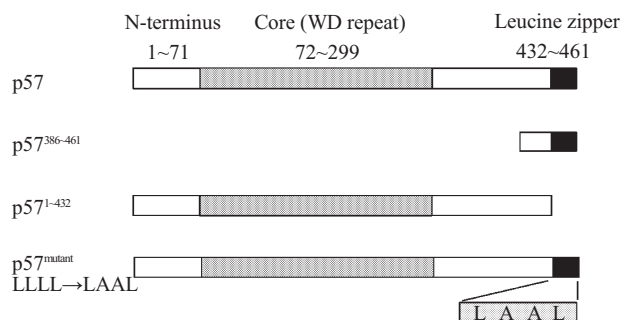


Fig.1 Schematic views of p57 and its mutants

The WD repeat region (solid box) and the leucine zipper region (hatched) are highlighted.

1.2.2 GST 融合蛋白的表达、纯化以及抗 p57 多克隆抗体的制备. 上述构建的原核表达质粒被转化入 *E.coli* BL21 以表达全长 p57、p57³⁸⁶⁻⁴⁶¹、p57¹⁻⁴³² 和 p57^{mutant} 的 GST 融合蛋白. 蛋白质的表达和纯化工作依照 GST Gene Fusion System (Amersham Pharmacia 公司) 的操作说明进行. 将纯化得到的 GST-p57 融合蛋白按 200 μ g/ 次免疫健康雄兔, 抗血清经抗原亲和纯化得到纯化后的抗 p57 多克隆抗体.

1.2.3 F-actin 结合共沉淀实验. 重组融合蛋白 GST-p57 的活性鉴定采用 F-actin 结合共沉淀实验 (F-actin co-sedimentation assay)^[7]: 单体状态 actin (G-actin) (3 μ mol/L, Sigma 公司) 置于 F-actin 缓冲液 (20 mmol/L imidazole, pH 7.0, 50 mmol/L KCl, 1 mmol/L DTT, 5 mmol/L ATP, 2 mmol/L MgCl₂ 和 5 mmol/L CaCl₂) 中, 25℃ 孵育 30 min 形成 F-actin. 融合蛋白与 F-actin 混合, 混合液的一部分作为总体样品(T). 混合液在 25℃ 孵育 40 min 后于 100 000 *g* 条件下离心 30 min, 离心上清液作为上清样品(S), 沉淀作为沉淀样品(P). 样品经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离, 之后用考马斯亮蓝 R-250 染色鉴定. 在半定量试验中, 每种融合蛋白都被分成浓度成几何级数的 5 份, 它们都同等量的 F-actin (2 μ mol/L) 于 F-actin 缓冲液中孵育并离心操作. 每种蛋白质的初始浓度都为 0.5 μ mol/L, 其他 4 个浓度分别为初始浓度的 1/2、1/4、1/8 和 1/16. 总体样品 (T) 及沉淀样品 (P) 经 8% SDS-PAGE 分离后用抗 p57 多抗和抗 actin 多抗进行免疫印迹 (Western blot) 检测.

1.2.4 细胞培养, 转染及表达蛋白的 DSS 交联分析. THP-1 和 COS-1 细胞分别在 RMPI 1640 培养基加 10% 胎牛血清和 DMEM 培养基加 10% 胎牛血清中于常规条件下培养. 质粒 pcDNA 4.0/p57、pcDNA 4.0/p57¹⁻⁴³² 和 pcDNA 4.0/p57^{mutant} 通过 lipofectamine™ 2000 转染入 COS-1 细胞. 转染操作依照试剂说明进行. 转染后表达的蛋白质都带有 N 端 Xpress™ 标记, 可以利用抗 Xpress™ 单克隆抗体进行检测. 表达蛋白的 DSS 交联分析按文献[13]方法执行.

1.2.5 免疫荧光共定位. 转染后的 COS-1 转移到多聚赖氨酸 (polylysine) 包被的 12 mm 玻璃盖玻片上. actin 细胞骨架按文献[14]方法制备. 样品在室温下于含有 1% 牛血清白蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中孵育 30 min 后, 再与小鼠抗 Xpress™ 抗体

(1 : 1 000)和羊抗 actin 抗体 (1 : 500) 于室温孵育 3 h, 之后用 PBS 清洗 3 次, 再与 Rhodamine 标记的兔抗羊 IgG (1 : 400) 避光室温孵育 20 min, 清洗后再与 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG (1 : 400) 避光室温孵育 20 min. 经过荧光标记的样品用 PBS 清洗 5 min × 3 次, 最后用含 90%甘油的 PBS 封片, 利用 Nikon Eclipse E800 荧光显微镜观察并用高分辨 CCD 采集图像.

1.2.6 亚细胞分离以及吸光度扫描分析. 转染后的 COS-1 细胞经收集后按文献[15,16]的方法得到粗提的含有 F-actin 及其结合蛋白的细胞骨架组分. 将全细胞表达的蛋白质 (Group 1) 以及同细胞骨架结合的蛋白质 (Group 2) 同时进行 8% SDS-PAGE 分离, 再用抗 Xpress™ 抗体及抗 actin 抗体免疫印迹, 并用增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL)方法显色. 显色结果用 FluorChem™ 8900 荧光成像系统 (Alpha Innotech 公司) 记录后, 再用 AlphaEaseFC™ 软件 (Alpha Innotech 公司) 对蛋白质条带进行吸光度分析并计算得到相应的蛋白质含量. 每组实验都将结合 actin 细胞骨架上的蛋白质量与全细胞中表达的总蛋白质量按相对比例进行计算 (Group2/Group1), 计算结果再以野生型 p57 的比例为 100%进行归一化, 同相应的 p57¹⁻⁴³² 以及 p57^{mutant} 数据进行对比. 数据采用 4 次实验的平均值并计算标准偏差.

2 结 果

2.1 体外实验对比 p57 及其突变体的 actin 结合能力

为了检测 LZ domain 序列区域与 p57 和 actin 结合之间的关系, 我们把野生型 p57 和它的两种缺失突变体: p57³⁸⁶⁻⁴⁶¹ (包含 LZ domain 序列区域) 和 p57¹⁻⁴³² (仅缺失 LZ domain 序列区域) (图 1)的 GST 融合蛋白与 actin 结合能力通过体外 F-actin 结合共沉淀实验进行了对比. 如果融合蛋白具有 F-actin 结合活性, 则它可以结合在 F-actin 上随同 F-actin 在超速离心条件下一起沉淀出来^[7,17]. 在本实验中, 作为阳性对照, 大部分 GST-p57 在离心后都进入沉淀 (P) 中, 而仅有少量还保留在上清 (S) 中 (图 2a). 而与之不同的是, GST-p57³⁸⁶⁻⁴⁶¹ 仅在上清 (S) 中存在 (图 2b). 在 GST-p57¹⁻⁴³² 组则可以看到一部分蛋白质出现在沉淀 (P) 中, 但它的含量远小于在上清 (S) 中的含量 (图 2c). 这些结果表明 GST-p57³⁸⁶⁻⁴⁶¹ 不存在 F-actin 结合活性, 而 GST-p57¹⁻⁴³² 具有一定的

actin 结合活性, 但是该活性比野生型 p57 要低很多.

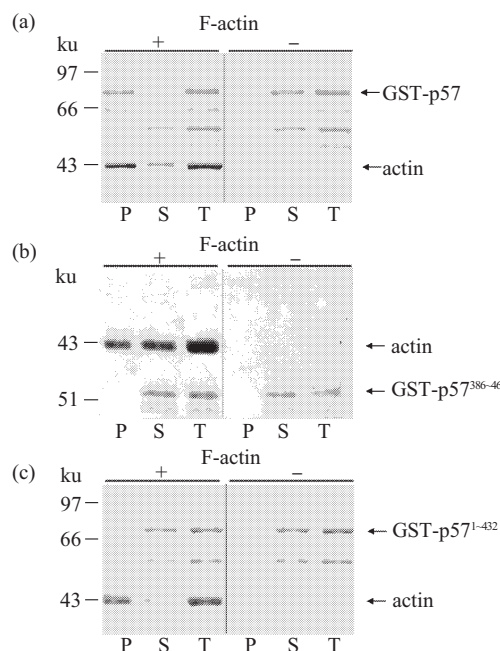


Fig.2 In vitro co-sedimentation assay of GST-p57, GST-p57³⁸⁶⁻⁴⁶¹ and GST-p57¹⁻⁴³² with F-actin

After mixtures were sedimented by ultracentrifugation, fractions were subjected to SDS-PAGE; T, total reaction mixture; S, ultracentrifuged supernatant; P, ultracentrifuged precipitate. Each fusion protein ((a) GST-p57; (b) GST-p57³⁸⁶⁻⁴⁶¹; (c) GST-p57¹⁻⁴³²) was incubated with (+) or without (-) F-actin for co-sedimentation assay.

接着为了确定 GST-p57¹⁻⁴³² 的 actin 结合活性低于野生型 p57 的原因是该突变体缺少 LZ domain 这个结构域对 actin 结合活性的贡献, 我们构建了针对 LZ domain 的点突变体: 构成亮氨酸拉链 (leucine zipper) 的 4 个亮氨酸残基中的 2 个 (Leu⁴⁴¹ 和 Leu⁴⁴⁷) 被突变为丙氨酸残基 (Ala). 点突变对 LZ domain 的破坏效果利用细胞内 DSS 化学交联实验进行了验证. 免疫印迹结果显示, 在野生型 p57 组出现了交联得到的蛋白质二聚体带 (约 120 ku), 而点突变组没有发现该二聚体带 (图 3a). 因为二聚化作用是 LZ domain 的标识式功能而且 p57 通过 LZ domain 来形成蛋白质二聚体也已经被证实^[8], 所以这个结果可以说明点突变有效地破坏了 LZ domain. 随后我们对 p57^{mutant} 进行体外 F-actin 结合共沉淀检测. 同 GST-p57¹⁻⁴³² 一样, GST-p57^{mutant} 蛋白主要存在于上清 (S) 中, 仅有少量同 actin 结合而共沉淀 (P) 下来 (图 3b). 这说明点突变后的 p57 其 actin 结合能力也远弱于野生型 p57.

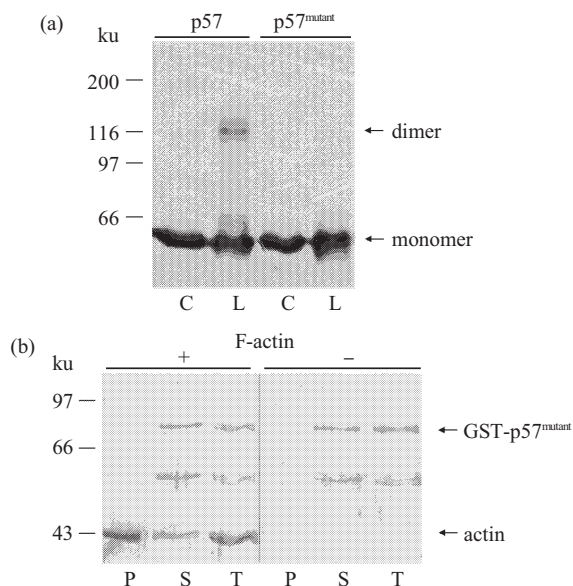


Fig.3 Effect of introduction of mutation into the leucine zipper of p57 on the actin-binding activity

(a) Cross-linking assay of p57 and p57^{mutant} expressed in COS-1 cell. Expression plasmids pcDNA 4.0/p57 and pcDNA 4.0/p57^{mutant} were introduced in COS-1 cells and expressed proteins were cross-linked by DSS. Cell fractions were subjected to SDS-PAGE and the monomer and dimer forms of expressed p57 and p57^{mutant} were detected by immunoblotting analysis with anti-XpressTM monoclonal antibody; C, control group; L, cross-linking group. (b) *In vitro* co-sedimentation assay of GST-p57^{mutant} with F-actin. After mixtures were sedimented by ultracentrifugation, fractions were subjected to SDS-PAGE; T, total reaction mixture; S, ultracentrifuged supernatant; P, ultracentrifuged precipitate.

我们进一步用半定量 F-actin 结合共沉淀的方法, 来分析 LZ domain 序列区域缺失突变和点突变对 p57 结合 actin 能力的影响. 实验设置了一系列以几何级数稀释的融合蛋白同等量的 actin 进行 F-actin 结合共沉淀. 通过对比 Western blot 的结果, 我们发现一定浓度的 GST-p57¹⁻⁴³² 结合 actin 的能力仅与相应的 1/4 ~ 1/8 浓度的 GST-p57 能力相当 (图 4a). 对比 GST-p57^{mutant} 和 GST-p57 也出现相似的结果 (图 4b). 这些结果表明 LZ domain 区域缺失突变和点突变导致 p57 的 actin 结合能力都大幅度地降低, 而且降低的程度很相近.

2.2 在 COS-1 细胞内研究 p57 及其突变体的 actin 结合活性

我们利用 COS-1 细胞来表达野生型 p57 及其突变体, 并且利用免疫荧光共定位方法检测了这几

种外源蛋白的 actin 结合能力. 从荧光照片上我们可以看到, 外源蛋白 p57、p57¹⁻⁴³² 以及 p57^{mutant} 均与细胞皮层 actin 细胞骨架(cortical actin cytoskeleton)有一定的荧光共定位, 而体外检测无 actin 结合活性的 p57³⁸⁶⁻⁴⁶¹ 在细胞内也没有展现出与细胞皮层 actin 细胞骨架的共定位 (图 5). 同时在荧光观察中我们还发现, 用于标记外源蛋白 p57¹⁻⁴³² 和 p57^{mutant} 的 FITC 荧光其强度要普遍弱于标记野生型 p57 的 FITC 荧光, 这表明在细胞内结合在 actin 细胞骨架上的突变体蛋白数量要低于野生型蛋白数量.

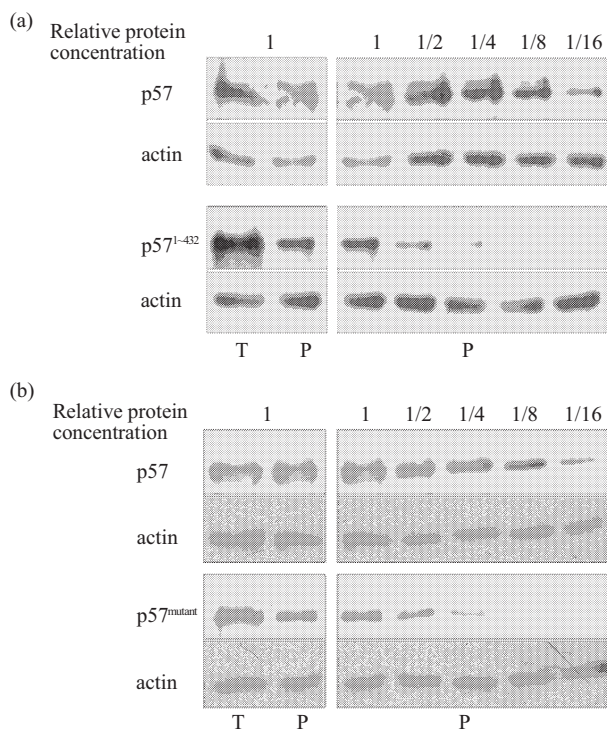


Fig.4 F-actin co-sedimentation assays with geometric series of concentrations of fusion proteins *in vitro*

Five concentrations of GST-p57, GST-p57¹⁻⁴³² and GST-p57^{mutant} were incubated with equal concentration (2 $\mu\text{mol/L}$) of pre-assemble F-actin in F-actin buffer. The first concentrations of all fusion proteins were equal 0.5 $\mu\text{mol/L}$, and the second, the third, the fourth, and the fifth concentrations were 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 of the first one. Fractions obtained from co-sedimentation of the mixtures were immunoblotted by anti-p57 polyclone antibody and anti-actin antibody. Comparisons were carried out between GST-p57 group and GST-p57¹⁻⁴³² group (a), and between GST-p57 group and GST-p57^{mutant} group (b). Immunoblotting results of total reaction mixture (T) for the first concentrations of fusion proteins and ultracentrifuged precipitate (P) for all concentrations of fusion proteins were shown.

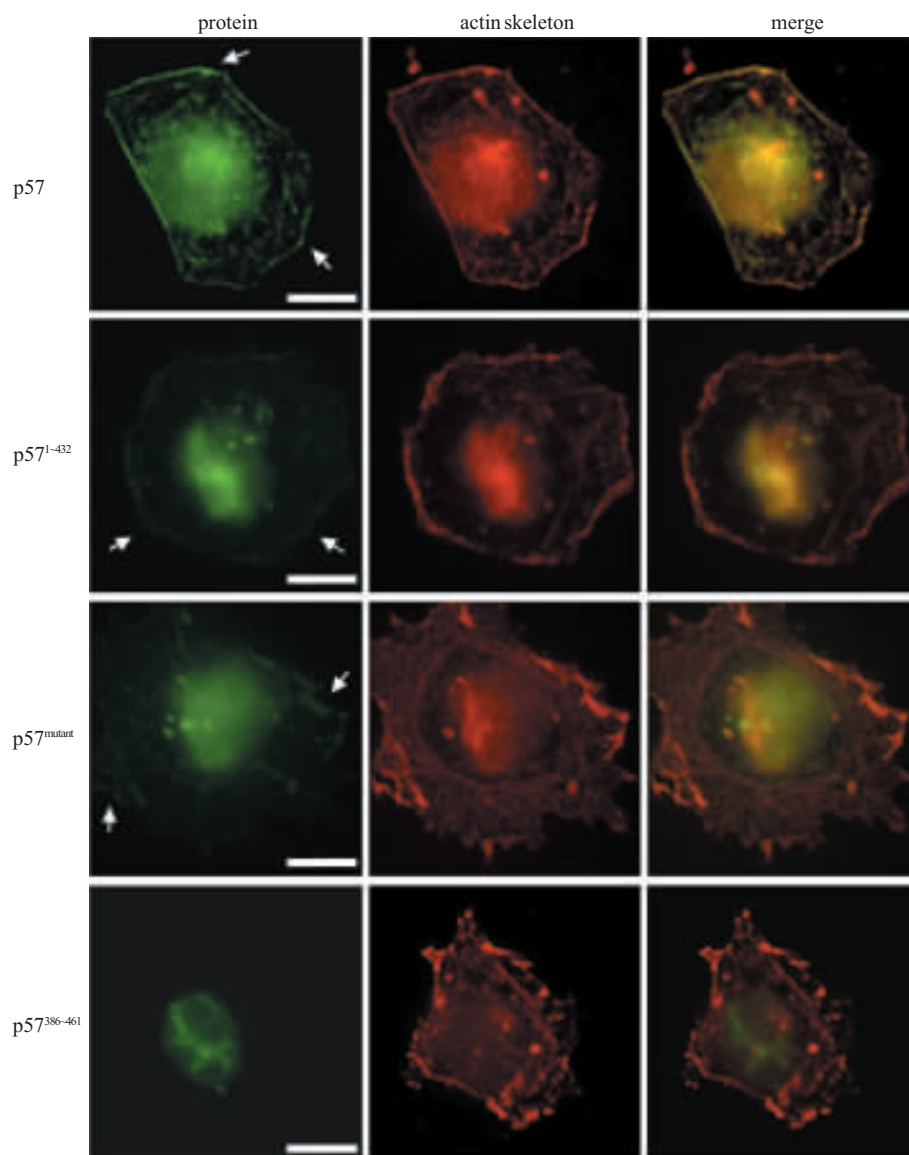


Fig.5 Co-localization analysis of p57 and its mutants with actin cytoskeleton in COS-1 cell

Expression plasmids pcDNA 4.0/p57, pcDNA 4.0/p57¹⁻⁴³², pcDNA 4.0/p57^{mutant}, and pcDNA 4.0/p57³⁸⁶⁻⁴⁶¹ were transiently expressed in COS-1 cells. Expressed proteins and actin cytoskeleton were stained by anti-Xpress antibody and anti-actin antibody, followed respectively by secondary antibody conjugated with FITC and rhodamine, and they were observed by fluorescence microscopy. Arrowheads mark areas of cortical localization of the expressed proteins. Scale bars, 20 μ m.

Experiments were performed more than three times with representative data shown.

为进一步分析细胞内 p57、p57¹⁻⁴³² 以及 p57^{mutant} 结合 actin 的能力, 我们制备了 COS-1 细胞的 actin 细胞骨架, 并且对全细胞中外源蛋白含量 (group 1) 与 actin 细胞骨架结合的外源蛋白含量 (group 2) 进行了半定量性的比较. 通过对比野生型 p57 及其突变体的 group 2 与 group 1 的比值, 我们发现

p57^{mutant} 以及 p57¹⁻⁴³² 的 actin 结合能力分别仅有野生型 p57 的 (28.5%±10.5)% 和 (24.8±9.9)% (图 6). 这些结果说明 LZ domain 区域删除突变和点突变在体内同样导致了 p57 与 actin 结合能力的显著降低, 并且这两种突变导致的降低程度也是很相近的.

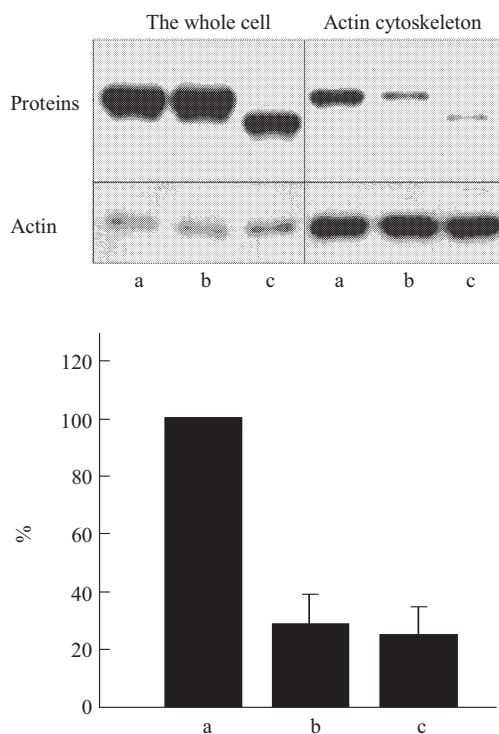


Fig.6 Immunoblotting and density scan analyses of actin binding of expressed p57, p57^{L432} and p57^{mutant} in cells

Fractions of the whole COS-1 cells (group1) and crude cytoskeleton that contains actin filaments and associated proteins (group2) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblotted by anti-XpressTM antibody and anti-actin antibody. Experiments were performed four times with representative data shown here (upper panel). The density scan is of cumulative data from Western blots of the four separate experiments. For each experiment, the ratio of the density absorbance unit of group 2 to that of group 1 was calculated for each given expressed proteins. The ratio for p57 (a) was normalized to 100%, and the ratios for p57^{mutant} (b) and p57^{L432} (c) were compared to that normalized ratio as percentage of the level of p57 (a) (lower panel).

3 讨 论

通过表达纯化蛋白以及在 COS-1 细胞中转染 cDNA 等体内外实验技术, 我们研究了 LZ domain 在 p57 结合 actin 中的作用. 研究表明, LZ domain 序列区域 (p57 蛋白的 C 端约 30 个氨基酸) 本身并没有直接地与 actin 结合的活性 (图 2b 和图 5), 这同已有的报道结果^[12]十分相符, 然而这一区域的缺失会导致蛋白质结合 actin 的能力明显下降 (图 2c 和图 5), 这暗示着 LZ domain 这个结构域可能对 p57 结合 actin 有重要影响. 构建的 Leu/Ala 点突变体对这一猜测进行了证实: 该点突变体的 actin 结合性质同 LZ domain 序列区域缺失突变体的 actin

结合性质很类似 (图 3b 和图 5). 另外, 半定量实验表明这两种突变对蛋白 actin 结合能力的改变具有极大的相似性 (图 4 和图 6), 这说明 LZ domain 序列区域对 p57 的 actin 结合活性的影响, 可能仅来源于 LZ domain 这个结构域对结合活性的影响. 以上结果充分肯定了 LZ domain 在 p57 结合 actin 中具有重要作用.

通常认为 LZ domain 的基本作用是介导蛋白质的同源或异源二聚化^[17]. p57 蛋白的 LZ domain 也不例外: 有报道表明它介导 p57 同源二聚体的生成^[8]. 因此我们可以进一步推测 LZ domain 对 p57 结合 actin 的重要作用可能是通过它介导 p57 同源二聚体的生成来实现的. 在我们的研究中 p57^{mutant} 在结合 actin 能力显著下降的同时亦不能形成同源二聚体, 这一结果在一定程度上证实了以上的猜想 (图 3a). 那么是否 LZ domain 还通过其他因素, 例如疏水性、电荷以及这段序列二级结构的变化, 来影响蛋白质与 actin 之间的结合呢? 在本实验中, 我们选择性地组成 leucine zipper 的 4 个亮氨酸中的 2 个替换为丙氨酸 (图 1). 丙氨酸同亮氨酸有相近的等电点和疏水性, 而且根据其他含 leucine zipper 蛋白的研究数据^[18,19], 这种突变也不会造成二级结构的显著变化. 因此如果是这些因素导致的蛋白质 actin 结合活性的变化, 那么 LZ domain 序列区域缺失突变与点突变所导致 actin 结合活性的变化会有明显的不同. 但是这些推论与实验中体内和体外半定量分析得到的两种突变对蛋白质 actin 结合能力的改变程度很相似的结果 (图 4 和图 6) 相矛盾. 因此我们认为很可能是 LZ domain 介导的 p57 二聚化在蛋白质结合 actin 中起作用.

目前, 已有实验证据显示, 至少有两个区域 (Met¹~Asp³⁴ 和 Ile¹¹¹~Glu²⁰⁴) 对 p57 结合 actin 有作用^[12]. 我们通过研究 p57³⁸⁶⁻⁴⁶¹ 在体外以及细胞内的 actin 结合活性 (图 2b 和图 5), 证明 LZ domain 序列区域不是 actin 的直接结合位点, 因此 LZ domain 对 p57 结合 actin 的影响更可能是源自于它对蛋白质高级结构的影响. 综合 p57 具有多 actin 结合位点的现象以及我们上述的观点, 我们推测 LZ domain 很可能通过其介导的蛋白质二聚化作用来促使 p57 形成一种特定的有利于蛋白质与 actin 形成最大程度结合的三维构象. 这种假说应该是合理的, 因为通过二聚化作用维持蛋白质结构进而保证蛋白质活性的作用方式已经被广泛地报道^[20-22]. 未来对 p57 蛋白结构的解析将有助于验证我们的设

想, 并进一步揭示这一复杂作用体系的内在机制。

我们的研究工作揭示了 LZ domain 在 p57 结合 actin 中的重要作用, 为 p57 同 actin 作用的内在机制的研究提供了参考, 也为对 p57 与 actin 相关的生理功能及其调控机制的深入探讨奠定了一定的理论基础。同时, 在所有含有 LZ domain 的 actin 结合蛋白的研究中, 我们尚未发现有关 LZ domain 对蛋白质的 actin 结合活性有重要贡献的报道, 因此我们的研究作为这些蛋白质与 actin 之间的相互作用提供了一种新的可能作用机制。

参 考 文 献

- de Hostos E L. The coronin family of actin-associated proteins. *Trends Cell Biol*, 1999, **9** (9): 345~350
- Maniak M, Rauchenberger R, Albrecht R, *et al.* Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell*, 1995, **83** (6): 915~924
- de Hostos E L, Bradtke B, Lottspeich F, *et al.* Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits. *EMBO J*, 1991, **10** (13): 4097~4104
- de Hostos E L, Rehfuess C, Bradtke B, *et al.* *Dictyostelium* mutants lacking the cytoskeletal protein coronin are defective in cytokinesis and cell motility. *J Cell Biol*, 1993, **120** (1): 163~173
- Ferrari G, Langen H, Naito M, *et al.* A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell*, 1999, **97** (4): 435~447
- Smith T F, Gaitatzes C, Saxena K, *et al.* The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci*, 1999, **24** (5): 181~185
- Suzuki K, Nishihata J, Arai Y, *et al.* Molecular cloning of a novel actin-binding protein, p57, with a WD repeat and a leucine zipper motif. *FEBS Lett*, 1995, **364** (3): 283~288
- Oku T, Itoh S, Ishii R, *et al.* Homotypic dimerisation of the actin-binding protein p57/coronin-1 mediated by a leucine zipper motif in the C-terminal region. *Biochem J*, 2005, **387** (Pt 2): 325~331
- Schuller S, Neeffes J, Ottenhoff T, *et al.* Coronin is involved in uptake of *Mycobacterium bovis* BCG in human macrophages but not in phagosome maintenance. *Cell Microbiol*, 2001, **3** (12): 785~793
- Itoh S, Suzuki K, Nishihata J, *et al.* The role of protein kinase C in the transient association of p57, a coronin family actin-binding protein, with phagosomes. *Biol Pharm Bull*, 2002, **25** (7): 837~844
- Allen L A, DeLeo F R, Gallois A, *et al.* Transient association of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase subunits p47phox and p67phox with phagosomes in neutrophils from patients with X-linked chronic granulomatous disease. *Blood*, 1999, **93** (10): 3521~3530
- Oku T, Itoh S, Okano M, *et al.* Two regions responsible for the actin binding of p57, a mammalian coronin family actin-binding protein. *Biol Pharm Bull*, 2003, **26** (4): 409~416
- Gilmore A P, Metcalfe A D, Romer L H, *et al.* Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J Cell Biol*, 2000, **149** (2): 431~446
- Fulton A B, Wan K M, Penman S. The spatial distribution of polyribosomes in 3T3 cells and the associated assembly of proteins into the skeletal framework. *Cell*, 1980, **20** (3): 849~857
- Yang S A, Carpenter C L, Abrams C S. Rho and Rho-kinase mediate thrombin-induced phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase trafficking in platelets. *J Biol Chem*, 2004, **279** (40): 42331~42336
- Lehtonen S, Zhao F, Lehtonen E. CD2-associated protein directly interacts with the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, **283** (4): F734~F743
- Landschulz W H, Johnson P F, McKnight S L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 1988, **240** (4860): 1759~1764
- Richie-Jannetta R, Francis S H, Corbin J D. Dimerization of cGMP-dependent protein kinase I β is mediated by an extensive amino-terminal leucine zipper motif, and dimerization modulates enzyme function. *J Biol Chem*, 2003, **278** (50): 50070~50079
- Kanki H, Kupersmidt S, Yang T, *et al.* A structural requirement for processing the cardiac K⁺ channel KCNQ1. *J Biol Chem*, 2004, **279** (32): 33976~33983
- Levy Y, Caflisch A. Flexibility of monomeric and dimeric HIV-1 protease. *J Phys Chem B*, 2003, **107** (13): 3068~3079
- Poltorak O M, Chukhrai E S, Torshin I Y, *et al.* Catalytic properties, stability and the structure of the conformational lock in the alkaline phosphatase from *Escherichia coli*. *J Mol Catalysis B-Enz*, 1999, **7** (1~4): 165~172
- Bossemeyer D, Engh R A, Kinzel V, *et al.* Phosphotransferase and substrate binding mechanism of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from porcine heart as deduced from the 2.0 Å structure of the complex with Mn²⁺ adenylyl imidodiphosphate and inhibitor peptide PKI (5-24). *EMBO J*, 1993, **12** (3): 849~859

Leucine Zipper Domain is Important for Actin Binding of p57*

LIU Chang-Zhen, HE Li, SHEN Qing-Tao, LI Xiang-Hui, SUI Sen-Fang**

(Department of Biological Sciences and Biotechnology, State Key Laboratory of Biomembranes, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract The role of the leucine zipper domain in actin binding of p57 was investigated by the methods of the F-actin co-sedimentation studies *in vitro*, the immunofluorescence co-localization analyses in cells, the Western blot and density scan assays. The results showed that the leucine zipper-containing domain alone has no

actin-binding activity, while the C-terminal deletion mutation removing this domain or the point mutation destroying leucine zipper domain leads to great reduction of actin-binding activity of p57. Furthermore, the degrees of degradation in actin-binding activity caused by the two mutations were assessed in quasi-quantitative analysis *in vitro* and in cells and both mutations exhibited the extremely similar depressing effects. These data strongly suggest that the leucine zipper domain is important for actin binding of p57.

Key words p57, actin binding activity, leucine zipper domain

*This work was supported by a grant from The National Basic Research 973 Program of China under Grant (2004CB720005).

**Corresponding author . Tel: 86-10-62784768, E-mail: suisf@mail.tsinghua.edu.cn

Received: March 25, 2005 Accepted: April 30, 2005