

L1CAM 胞内区相互作用蛋白的筛选与鉴定

张 玲^{1)*} 黄兴汉²⁾

(¹⁾东南大学附属中大医院神经内科, 南京 210009; ²⁾武汉大学人民医院神经内科, 武汉 430060)

摘要 L1 细胞粘附分子 (L1 cell adhesion molecular, L1CAM) 属于神经细胞粘附分子, 是属于免疫球蛋白超家族的 I 型跨膜糖蛋白. L1 主要在神经系统中表达, 参与神经系统发育, 学习记忆等重要过程作用. L1 的胞内区可能参与信号转导, 对于 L1 的功能非常重要, 为探讨 L1 胞内区信号转导的分子机制, 以 L1 胞内区为诱饵运用酵母双杂交技术在人脑 cDNA 文库中筛选其结合蛋白, 挑选阳性克隆, 进行 DNA 序列分析和同源检索, 阳性克隆编码几个不同的蛋白质, 其中一个候选蛋白为 PAX6 转录因子. 为进一步验证 L1 胞内区和 PAX6 的相互作用, 克隆其基因到表达质粒共转染 COS-7 细胞, 免疫共沉淀证实了 L1 胞内区和 PAX6 的相互作用, 提示 L1 胞内区可能参与转录调节, 为深入探讨其功能提供了重要线索.

关键词 L1 细胞粘附分子(L1CAM), 酵母双杂交, PAX6, 蛋白质相互作用

学科分类号 Q189

L1 细胞粘附分子 (L1 cell adhesion molecular, L1CAM) 简称 L1, 是一类神经细胞粘附分子, 属于免疫球蛋白超家族中的一员. L1 是 I 型跨膜糖蛋白, 分子质量约 220 ku, 该蛋白质胞外区含有 6 个免疫球蛋白样结构域和 5 个纤维连接蛋白 3 型结构域, 可能和多种配体结合而将外界信号通过跨膜区传导到胞内区而激活下游的信号转导路径^[1]. L1 主要在神经细胞表达并在神经元的迁移, 轴突生长、成束和延长等神经系统发育中起重要作用^[2], 对于学习和记忆也非常关键^[3,4]. L1 基因突变可引起以胼胝体发育不全、精神发育迟滞、拇指内收, 遗传性痉挛性截瘫和脑积水为主要特征的 CRASH 综合征^[5,6]. L1 胞内区 (L1 cytoplasmic domain, L1CD) 对于 L1 的功能非常重要, 导致 CRASH 综合征的 L1 基因突变位点即位于 L1CD^[7]. 几种激酶可以通过磷酸化 L1CD 而调节 L1 介导的神经突起生长和迁移^[7,8], 因此寻找和鉴定 L1CD 的结合蛋白对于阐明 L1CD 调节 L1 功能的分子机制具有重要意义. 目前已经报道的 L1CD 结合蛋白不多, 锚蛋白 (ankyrin) 通过结合 L1CD 在 L1 和肌动蛋白细胞骨架之间建立联系, 参与 L1 介导的粘附和迁移^[9]. 细胞骨架连接蛋白 ezrin 也结合 L1CD 而联系 L1 和细胞骨架, 在 L1 介导的神经突起生长和分支中起重要作用^[10]. Clathrin adaptor AP-2 蛋白可以结合 L1CD 的 YRSL

序列而介导 L1 的内吞^[11]. RanBPM 结合 L1CD 的 C 端 28 个氨基酸而调节 L1 下游的 MAPK/Erk 信号通路^[12]. 为了分离和鉴定新的 L1CD 结合蛋白, 本研究采用酵母双杂交技术从人脑 cDNA 文库中筛选到几个蛋白质, 其中一个为 PAX6 转录因子, 尚未见报道. 通过免疫共沉淀在 COS-7 细胞中证实了 L1CD 和 PAX6 的相互作用, 为下一步探讨其功能的相互作用提供了依据.

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pCDNA3-L1pBTM116、pCDNA6-His (6xHis tag)、pCS2-MT (6xMyc tag), 酵母 L40 和 COS-7 细胞株为东南大学血管疾病研究所保存; 酵母双杂交人脑 Matchmaker cDNA 文库购于 Clontech 公司; 各种酵母培养基购于 Qbiogene 公司; DMEM 培养基购于 Merck 公司; Lipotectamine2000 转染试剂购于 Invitrogen 公司; Protein G 琼脂糖购于 Pierce 公司; LexA、Myc 和 His 抗体购于 Santa Cruz 公司; 二抗和 ECL 检测试剂购自 GE Healthcare 公司.

* 通讯联系人.

Tel: 025-83272530, E-mail: eastsouthuniversity@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-02-25, 接受日期: 2007-04-09

1.2 方法

1.2.1 Bait 质粒构建. 以 pCDNA3-L1 为模板, PCR 扩增 L1CD (1 144~1 257 个氨基酸)的编码序列, PCR 产物两端分别引入 *EcoR* I 和 *Bam*H I 位点, 产物纯化后和 pBTM116 质粒经 *EcoR* I /*Bam*H I 双酶切, DNA 凝胶电泳回收酶切产物, T4 DNA 连接酶连接, 构建重组 bait 质粒 pBTM116-L1CD, 酶切和测序鉴定重组质粒.

1.2.2 L1CD 和 PAX6 真核表达质粒构建. 以 pCDNA3-L1 为模板, PCR 扩增 L1CD 的编码序列, PCR 产物两端分别引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 位点, 产物纯化后和 pCDNA6-His 质粒经 *Bam*H I /*Xho* I 双酶切, DNA 凝胶电泳回收酶切产物, T4 DNA 连接酶连接, 构建重组质粒 pCDNA6-His-L1CD. 以人脑 Matchmaker cDNA 文库为模板 PCR 扩增 PAX6 的全长编码序列, PCR 产物两端分别引入 *Xho* I 和 *Xba* I 位点, 产物纯化后和 pCS2-MT 质粒经 *Xho* I /*Xba* I 双酶切, DNA 凝胶电泳回收酶切产物, T4 DNA 连接酶连接, 构建重组质粒 pCS2-MT-PAX6. 酶切和测序鉴定重组质粒.

1.2.3 预转化 bait 质粒到酵母 L40. 用 LiAc/PEG 法转化质粒 pBTM116-L1CD 到酵母 L40, 鉴定 L1CD 的自转录激活和测定最佳 3-AT 抑制浓度. 挑选转化子接种 SD-Trp 培养基液体培养, 提取酵母裂解物进行 12% SDS-PAGE, 蛋白质印迹后加入抗 LexA 抗体, 室温孵育 1 h, 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1 h, 洗膜后按 ECL 试剂盒说明书显影, 挑选成功表达 LexA-L1CD 融合蛋白的阳性克隆, 称为 L40-L1CD.

1.2.4 酵母双杂交筛选人脑 cDNA 文库. 接种 L40-L1CD 到 SD-Trp 培养基, 制备感受态酵母, 用 LiAc/PEG 法转化人脑 cDNA 文库, 涂 SD-Trp/Leu/His + 20 mmol/L 3-AT 培养基, 30℃ 培养 3~5 天后挑选 His 阳性克隆, 接种 SD-Trp/Leu/His + 20 mmol/L 3-AT+X-Gal 培养基, 30℃ 培养 5~6 天后挑选蓝色阳性克隆进行液体培养, 用玻璃珠法提取质粒, 电转化 *E. coli* HB101, 提取 AD Prey 质粒进行酶切鉴定. 共转化 bait 质粒和 AD 质粒到 L40, 涂 SD-Trp/Leu/His+20 mmol/L 3-AT+X-Gal 培养基再次验证. 对阳性 AD 质粒测序分析, 测序结果进行 BLAST 检索, 并验证候选基因的阅读框是否与 Gal4 AD 的阅读框融合.

1.2.5 免疫共沉淀. 采用 Lipofectamine2000 试剂将 pCDNA6-His-L1CD 和 pCS2-MT-PAX6 质粒共转染

COS-7 细胞. 转染 48 h 后收集细胞进行裂解, 裂解液离心后取上清, 留取少部分以备蛋白质印迹分析, 余下的加入 5 μg His 抗体沉淀 L1CD, 或加入 5 μg IgG 作为阴性对照, 4℃ 转鼓 1 h, 离心收集上清, 加入 50 μl Protein G 琼脂糖, 4℃ 转鼓 3 h, 离心收集沉淀, RIPA 洗涤 3 次, 去上清, 加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 煮沸 5 min, 离心收集上清, 和预留的细胞裂解液进行 12% SDS-PAGE、转膜、抗体结合及显色. 一抗为 Myc 抗体, 经辣根过氧化物酶标记的二抗孵育后, 按 ECL 试剂盒说明书显影.

2 结果

2.1 Bait 质粒的表达和自转录活性分析

转化了 pBTM116-L1CD 的 L40 酵母可以在 SD-Trp 培养基生长, 挑选 3 个克隆和对照质粒 pBTM116 转化的克隆进行液体培养, 提取蛋白质进行免疫检测, 见图 1, 对照质粒转化的酵母表达 26 ku 的 LexA DNA 结合区 (LexA-BD), 而 Bait 质粒转化的 3 个克隆都表达预计的 38 ku 的 LexA-BD 和 L1CD 的融合蛋白, 其中 3 号表达最强, 所以对它进行自转录活性分析, 发现该克隆在 SD-Trp+X-Gal 培养基上的菌落不变蓝, 说明 L1CD 本身没有转录激活活性, 可以用于下一步的文库筛选. 由于 3 号克隆在 SD-Trp/His 培养基上能生长, 说明存在 His leak, 所以检测其在添加不同浓度 3-AT 的 SD-Trp/His 培养基上的生长, 发现抑制其生长的最低 3-AT 浓度为 20 mmol/L.

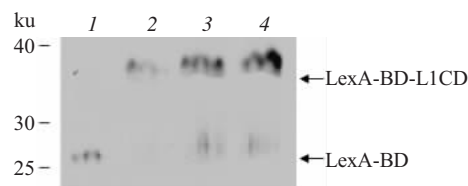


Fig. 1 Expression of LexA-BD-L1CD fusion protein in yeast L40

Protein extract was made from yeast L40 transformed with pBTM116 (lane 1) or pBTM116-L1CD (lane 2~4: clone No. 1~3) and subjected to Western blot using LexA antibody.

2.2 cDNA 文库的筛选和阳性克隆的鉴定

通过酵母双杂交筛选人脑 cDNA 文库, 在 SD-Trp/Leu/His+20 mmol/L 3-AT 培养基上共挑选到 18 个 His 阳性克隆, 这些克隆接种 SD-Trp/Leu/His+20 mmol/L 3-AT+X-Gal 培养基培养 5~6

天后只有 12 个克隆变蓝色. 提取这 12 个克隆的 AD Prey 质粒, 和 bait 质粒共转化 L40 涂 SD-Trp/Leu/ His+20 mmol/L 3-AT+X-Gal 培养基再

次验证, 都变蓝色, 表明是双阳性克隆, 测序分析和阅读框验证发现这 12 个克隆编码的 5 个基因序列如表 1.

Table 1 BLAST results of 12 positive clones by screening human brain cDNA library with L1CD as bait

Gene name	Homology	Encoded protein	Clone numbers
ANK2	100%	Ankyrin 2	1
PAX6	100%	Paired box gene 6	2
CTSB	100%	Cathepsin B	4
HNRPC	100%	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	2
RAD52	100%	RAD52 homolog	3

分析这 5 个候选 L1CD 结合蛋白, 其中 ANK2 为已经报道的和 L1CD 特异结合的锚蛋白, CTSB、HNRPC 和 RAD52 分别编码参与蛋白酶复合体、RNA 加工和 DNA 修复的蛋白质, 为酵母双杂交常见的假阳性克隆(http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/main_false.html), 而剩下的一个为转录因子 PAX6, 尚未见报道其和 L1CD 的相互作用.因此, 我们检测了 ANK2 和 PAX6 与 L1CD 的特异相互作用, 结果见图 2, 显示只有 PAX6(第 3 行)是不能激活报道基因转录的, 说明 PAX6 不是假阳性克隆, 而 PAX6 和 L1CD 一起可以激活报道基因转录(第 2 行), 说明 PAX6 和 L1CD 的相互作用是特异的.



Fig. 2 Interaction between L1CD and PAX6 revealed by yeast two-hybrid assay

Different bait vector or prey vector were co-transfected into yeast strain L40. One representative colony from each co-transformation was picked and streaked onto a SD-Leu/Trp agar plate (a) to make sure that both vectors are transformed into L40 or SD-Leu/Trp/His+X-gal plate (b) to check interaction. The plates were incubated at 30℃ for 3~4 days. Blue colonies represent positive interaction.

2.3 免疫共沉淀

为了验证 L1CD 和 PAX6 在细胞里也能特异相互作用, 共转染 L1CD 和 PAX6 表达质粒到 COS-7, 提取细胞裂解物, 用 His 抗体免疫沉淀

His-L1CD 蛋白及其结合蛋白, 用 Myc 抗体能检测到 Myc-PAX6 (图 3), 说明 L1CD 和 PAX6 共沉淀. 而用 His 抗体免疫沉淀未转染的细胞裂解物或者用 IgG 抗体免疫沉淀转染的细胞裂解物都不能共免疫沉淀.这些结果显示, 在 COS-7 细胞里 L1CD 和 PAX6 特异相互作用.

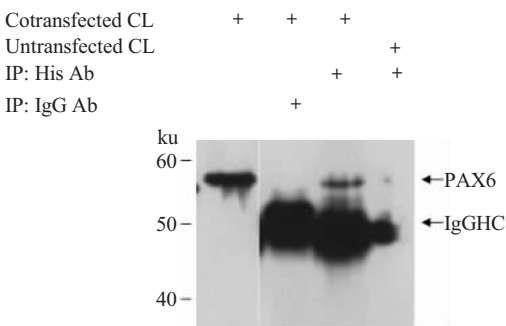


Fig. 3 Interaction between L1CD and PAX6 in COS-7 cells revealed by Co-immunoprecipitation

Cell lysates (CL) from COS-7 cells co-transfected with pCDNA6-His-L1CD and pCS2-MT-PAX6 or from untransfected COS-7 cells were immunoprecipitated using mouse anti-His antibody or IgG antibody as negative control. The precipitated proteins were subjected to immunoblotted with mouse anti-Myc primary antibody. HC represents mouse IgG heavy chain.

3 讨 论

L1 作为一个跨膜蛋白, 其胞内区对于 L1 蛋白的功能调节起关键作用. 目前已经报道的 L1 胞内区结合蛋白不多. 本研究通过酵母双杂交技术找到了几个 L1CD 结合蛋白, 其中包括已经报道的锚蛋白, 说明筛选比较成功. 此外, 还筛选出 PAX6 这一转录因子, 并在细胞里验证了其和 L1CD 的特异

相互作用。

因为 PAX6 主要在细胞核里发挥作用, 而 L1CD 是锚定到细胞膜内侧, 为探讨它们相互作用的生物学意义, 我们对已经报道的相关研究结果进行分析后, 认为 L1CD 和 PAX6 的相互作用可能会发挥重要的生物学效应。依据如下: 许多膜蛋白如 Notch、淀粉样蛋白前体 APP、Cadherin 等发生蛋白酶介导的接连性的蛋白酶切, 金属蛋白酶切割释放出可溶性的胞外区, presenilin 进一步在膜内切割释放胞内区到胞浆中而发挥信号转导和转录调节功能^[13]。L1 也能发生接连性的蛋白酶切, ADAM10 和 ADAM17 介导胞外区的酶切进而 presenilin 参与胞内区的酶切^[14], 而且这些蛋白酶参与调节 L1 介导的细胞粘附、迁移和神经突起生长等重要功能, 据此推测释放到胞浆中的 L1CD 可能参与转录调控, 但是缺乏实验证据。最近发现 APP 样蛋白 APLP2 胞内区被 presenilin 切割后进入核内, 结合转录因子 CP2 而诱导 GSK3 β 的表达而促进阿尔兹海默病^[15]。 γ -Protocadherins 原钙粘附蛋白被 presenilin 切割释放的胞内区可以进入核内促进 γ -Protocadherins 基因自身转录, 形成正反馈^[16]。最近研究发现, PAX6 可以结合 L1 基因第一个内显子里的 HPD 区域而激活 L1 转录^[17], 那么是否 L1CD 被切割释放到胞浆内也转运入核与 PAX6 形成复合体而更有效地结合 HPD 区域, 从而启动 L1 的基因转录呢? 有报道 L1 胞外区被切割释放到细胞外后可以与整合素 Integrin 结合而促进细胞迁移^[18], 最近的结果也显示重组的 L1 胞外区可以诱导神经元细胞的神经突起生长^[19]。综合上述报道, 可以推测 L1 发生接连性的蛋白酶切后, 产生的胞外区释放到细胞外而发挥 L1 的神经功能调节作用, 而产生的胞内区进入核内结合 PAX6 促进 L1 自身转录, 以维持 L1 不断合成和运输到膜上, 继续发生接连性的蛋白酶切, 形成正反馈, 产生足够的胞内外区片段来介导 L1 的生理功能。因此, 本研究下一步的主要目标就是检测 L1CD 和 PAX6 的结合是否能增强 L1 及其他 PAX6 靶基因的转录, 这对于检验我们提出的推测是至关重要的。当然, L1CD 的功能肯定不只局限于参与基因调控, 我们也将进一步验证 L1CD 与其他几个筛选出的候选蛋白之间的结合及探讨其结合的生物学意义。

总之, 本研究验证了 L1 胞内区和 PAX6 转录因子在体内外的相互作用, 提示 L1 胞内区可能参与转录调节, 为深入探讨 L1 功能提供了重要线索。

参考文献

- 1 Panicker A K, Buhusi M, Thelen K, *et al.* Cellular signalling mechanisms of neural cell adhesion molecules. *Front Biosci*, 2003, **8** (5): d900~911
- 2 Kamiguchi H. The mechanism of axon growth: what we have learned from the cell adhesion molecule L1. *Mol Neurobiol*, 2003, **28** (3): 219~228
- 3 Arami S, Jucker M, Schachner M, *et al.* The effect of continuous intraventricular infusion of L1 and NCAM antibodies on spatial learning in rats. *Behav Brain Res*, 1996, **81** (1~2): 81~87
- 4 Welzl H, Stork O. Cell adhesion molecules: key players in memory consolidation?. *News Physiol Sci*, 2003, **18**: 147~150
- 5 Fransen E, Van Camp G, Vits L, *et al.* L1-associated diseases: clinical geneticists divide, molecular geneticists unite. *Hum Mol Genet*, 1997, **6** (10): 1625~1632
- 6 Fransen E, Lemmon V, Van Camp G, *et al.* CRASH syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, L1. *Eur J Hum Genet*, 1995, **3**(5): 273~284
- 7 Long K E, Lemmon V. Dynamic regulation of cell adhesion molecules during axon outgrowth. *J Neurobiol*, 2000, **44** (2): 230~245
- 8 Schultheis M, Diestel S, Schmitz B. The role of cytoplasmic serine residues of the cell adhesion molecule L1 in neurite outgrowth, endocytosis, and cell migration. *Cell Mol Neurobiol*, 2007, **7** (1): 11~31
- 9 Gil O D, Sakurai T, Bradley A E, *et al.* Ankyrin binding mediates L1CAM interactions with static components of the cytoskeleton and inhibits retrograde movement of L1CAM on the cell surface. *J Cell Biol*, 2003, **162** (4): 719~730
- 10 Cheng L, Itoh K, Lemmon V. L1-mediated branching is regulated by two ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding sites, the RSLE region and a novel juxtamembrane ERM-binding region. *J Neurosci*, 2005, **25** (2): 395~403
- 11 Kamiguchi H, Long K E, Pendergast M, *et al.* The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *J Neurosci*, 1998, **18** (14): 5311~5321
- 12 Cheng L, Lemmon S, Lemmon V. RanBPM is an L1-interacting protein that regulates L1-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurochem*, 2005, **94** (4): 1102~1110
- 13 Medina M, Dotti C G. RIPped out by presenilin-dependent gamma-secretase. *Cell Signal*, 2003, **15** (9): 829~841
- 14 Maretzky T, Schulte M, Ludwig A, *et al.* L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth. *Mol Cell Biol*, 2005, **25** (20): 9040~9053
- 15 Xu Y, Kim H S, Joo Y, *et al.* Intracellular domains of amyloid precursor-like protein 2 interact with CP2 transcription factor in the

- nucleus and induce glycogen synthase kinase-3 β expression. *Cell Death Differ*, 2007, **14** (1): 79~91
- 16 Hambsch B, Grinevich V, Seeburg P H, *et al.* γ -Protocadherins, presenilin-mediated release of C-terminal fragment promotes locus expression. *J Biol Chem*, 2005, **280** (16): 15888~15897
- 17 Meech R, Kallunki P, Edelman G M, *et al.* A binding site for homeodomain and Pax proteins is necessary for L1 cell adhesion molecule gene expression by Pax-6 and bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (5): 2420~2425
- 18 Mechttersheimer S, Gutwein P, Agmon-Levin N, *et al.* Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol*, 2001, **155** (4): 661~673
- 19 Gouveia R M, Morais V A, Peixoto C, *et al.* Production and purification of functional truncated soluble forms of human recombinant L1 cell adhesion glycoprotein from *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells. *Protein Expr Purif*, 2007, **52** (1): 182~193

Screening and Identification of Interaction Partner of Cytoplasmic Domain of L1

ZHANG Ling^{1)*}, HUANG Xing-Han²⁾

¹⁾Department of Neurology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China;

²⁾Department of Neurology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract L1 cell adhesion molecular is a type I membrane glycoprotein of immunoglobulin superfamily. L1 is expressed mainly in nervous system and plays important roles in nervous system development, learning and memory. L1 cytoplasmic domain (L1CD) is important for L1 function by mediating signaling. To investigate the molecular mechanisms of signaling mediated by L1CD, yeast two-hybrid assay was carried out to screen the human brain cDNA library using L1CD as the bait. After sequence analysis and BLAST, several candidates were identified. One candidate is PAX6 transcription factor. L1CD and PAX6 cDNA were cloned in expression vectors and cotransfected into COS-7 cells. The interaction between L1CD and PAX6 was verified by co-immunoprecipitation assay. These preliminary results suggest that L1CD may be involved in transcription regulation.

Key words L1 cell adhesion molecular (L1CAM), yeast two-hybrid, PAX6, protein-protein interaction

*Corresponding author. Tel: 86-25-83272530, E-mail: eastsouthuniversity@yahoo.com.cn

Received: February 25, 2007 Accepted: April 9, 2007