

环指蛋白 RING1 与 A 型核纤层蛋白的细胞内相互作用*

陈维春^{1, 2)**} 宋杰^{1)**} 刘振杰^{2, 3)} 蒋智文^{1, 2)} 袁源¹⁾ 郑慧玲^{1, 2)} 刘新光^{1, 2)***}

¹⁾ 广东医学院衰老研究所, 东莞 523808; ²⁾ 广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 湛江 524023;

³⁾ 广东省中医院检验科, 广州 510120)

摘要 环指蛋白 RING1 能结合 DNA 并抑制基因的转录。采用酵母双杂交方法从人骨骼肌文库中筛选出了与 A 型核纤层蛋白(lamin A)结合的 RING1 蛋白, 回复杂交酵母能在缺陷培养基上生长。RING1 与绿色荧光蛋白融合载体转染 HEK293 细胞, 激光共聚焦显微观察发现 RING1 能与带红色荧光蛋白的 lamin A 蛋白在细胞核周围共定位。免疫共沉淀结果证明 RING1 与 lamin A 能够相互作用。结果证明了一个新的 lamin A 结合蛋白, 为揭示 lamin A 影响基因表达乃至细胞衰老提供了依据。

关键词 RING1, 核纤层蛋白 A, 相互作用, 酵母双杂交

学科分类号 Q51, Q28, Q78

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00311

A 型核纤层蛋白(lamin A)的基因突变或异常加工能引起早老症^[1-2]。这类早老症患者细胞往往出现核形态严重异常, 细胞应激机械张力发生改变使得染色质和核膜出现损伤, 随后产生适应性和保护性基因的转录激活^[3]。RING1 蛋白具有典型的 RING 结构域, 经由 C 端富含甘氨酸的区域与 CBX4 结合, 与 BMI1、EDR1 等蛋白结合共同构成 PcG 家族(polycomb group)复合体。RING1 功能是转录抑制因子, 过表达 RING1 抑制 En-2, 同时 RING1 过表达会导致原癌基因 c-jun 和 c-fos 的表达^[4]。

本课题组采用酵母双杂交方法从人骨骼肌 DNA 文库中筛选 lamin A 相互作用蛋白, 发现环指蛋白 RING1 可能与 lamin A 结合, 并可能在细胞衰老过程中发挥作用。为了进一步确证该蛋白质与 lamin A 的体内外的相互作用, 我们采用一对一的回复杂交、细胞内共定位和免疫共沉淀分析方法进行了实验, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

pACT2-RING1-N 质粒由广东医学院衰老研究所酵母双杂交筛选得到, 含有 lamin A 的 C 端

389~658 氨基酸残基的酵母表达质粒 pGBKT7-LA-C 和红色荧光蛋白与 lamin A 融合表达的载体 pDsRed-LA 由广东医学院衰老研究所构建。含有全长 RING1 基因的质粒 pCDNA3.1-RING1 由第四军医大学医学遗传学与发育生物学教研室惠赠。大肠杆菌 DH5 α 、质粒载体 pEGFP-N1 和 pCMV-HA 由广东医学院衰老研究所保存。酵母 AH109 购自 Clontech 公司。HEK293 细胞由香港大学周中军博士惠赠。限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、*Pst* I、T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司。HA 和 lamin A 抗体分别购自 Clontech 和 SANTA CRUZ 公司。Lipofectamin2000 为 Invitrogen 公司产品。酸洗玻璃珠为 Sigma 公司产品其他为国产分析纯试剂。

* 国家自然科学基金(30672205, 30871440, 30900739)和广东省自然科学基金(7301506, 9252402301000002)资助项目, 广东省高校自然科学研究重点项目(06Z015), 东莞市科技计划项目(2008108101062)和湛江市科技攻关项目(2009C3104005)。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 0769-22896425, E-mail: xgliu64@126.com

收稿日期: 2010-06-08, 接受日期: 2010-11-23

1.2 pACT2-RING1-N 质粒的提取和纯化

以 A 型核纤层蛋白前体 prelamins A 为诱饵蛋白进行酵母双杂交筛选人骨骼肌文库获得了含有 pACT2-RING1-N 质粒的酵母, 采用 Hoffman 裂解法^[9]提取质粒 DNA. 收集 5 ml 培养物中的酵母沉淀, 加入 0.2 ml 酵母裂解液(pH 8.0 Tris-HCl 100 mmol/L, EDTA 1.0 mmol/L, 2% Triton-X-100, 1% SDS), 0.2 ml 酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)和 0.3 g 酸洗玻璃珠, 剧烈振荡 2 min, 离心后上清中的质粒 DNA 用 2.5 倍体积无水乙醇沉淀, 最后将 DNA 沉淀重悬于 20 μ l 无菌的 TE 缓冲液中. 提取的质粒 DNA 电击转化感受态 DH5 α , 在含有 Amp 的平板上长出的克隆为含有单一 pACT2-RING1-N 质粒的克隆, 送上海生工生物工程公司测序, 测序引物为 pACT2 载体上的通用引物.

1.3 一对回复性杂交

纯化的 pACT2-RING1-N 质粒电击转化含有 pGBKT7-LA-C 的 AH109 酵母感受态, 转化混合物涂布于 SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His 四缺平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 3~5 天, 经 β -半乳糖苷酶分析, 观察克隆是否显示蓝色.

1.4 引物设计和 PCR 扩增

根据已知的 RING1 基因序列设计 2 对引物, 序列如下: GFP-RING-P1, CCCAAGCTTATGGATGGCACAGAGATTGCTG; GFP-RING-P2, AAAA-CTGCAGCTTTGGATCCTTGGTGGGAG; RING-P1, CGGAATTCATGGATGGCACAGAGATTGC; RING-P2, CCCAAGCTTTCACCTTTGGATCCTTGGTGGG. 阴影部分分别为 *Hind* III、*Pst* I、*Eco*R I、*Hind* III 切点, 引物由上海生工生物工程公司合成.

PCR 反应体系 50 μ l, 以 pCDNA3.1-RING1 质粒 DNA 为模板, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min、55 $^{\circ}$ C 退火 1 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 于 4 $^{\circ}$ C 保存备用. 引物对 GFP-RING-P1/P2 和 RING-P1/P2 扩增产物分别用于构建 pEGFP-RING1 和 pCMV-RING1 重组载体.

1.5 重组载体 pEGFP-RING1 和 pCMV-RING1 的构建及鉴定

扩增得到的 RING1 PCR 产物分别用 *Hind* III/*Pst* I 和 *Eco*R I/*Hind* III 双酶切, 产物进行胶回收纯化, 分别与同样双酶切和胶回收纯化的载体

pEGFP-N1 和 pCMV-HA 连接, 转化感受态 DH5 α , 挑取重组转化子进行酶切和测序鉴定, 得到重组质粒 pEGFP-RING1 和 pCMV-RING1.

1.6 质粒转染 HEK293 细胞和激光共聚焦显微镜观察

按 2×10^5 /孔密度接种 HEK293 细胞至 6 孔板, 板内预先放置盖玻片, 培养 24 h 后玻片上细胞生长至约 70% 密度, 按 Lipofectamin2000 操作说明进行细胞转染. 2 μ g 重组质粒 pEGFP-RING1 和 2 μ g pDsRed-LA 共转染, 并设置两者分别转染的对照, 培养 48 h 后取出玻片利用激光共聚焦显微镜(Leica 公司)进行观察, 拍照.

1.7 免疫共沉淀反应及蛋白质印迹

按上面相同的方法转染 2 μ g 重组质粒 pCMV-RING1 至 HEK293 细胞. 48 h 后收获细胞于细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH7.4, 1% NP-40, 0.25% 脱氧胆酸钠, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 35 mg/L 蛋白酶抑制剂 PMSF), 4 $^{\circ}$ C 13 000 r/min 离心 10 min, 加入 50 μ l 50% 蛋白 A 琼脂糖珠 4 $^{\circ}$ C 旋转 3 h 去除背景. 加入 1 μ g HA 抗体 4 $^{\circ}$ C 旋转过夜, 再加入蛋白 A 琼脂糖珠 4 $^{\circ}$ C 旋转 3 h. 12 000 r/min 离心 30 s, 用细胞裂解液洗涤沉淀 3 次, 然后加入上样缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl pH6.8, 4% SDS, 20% 甘油, 10% β -巯基乙醇, 2 g/L 溴酚蓝), 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min, 进行 10% SDS-PAGE 分离, 蛋白质转到 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20)室温封闭 1 h, 然后分别用抗 HA 和抗 lamin A 的单克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 二抗室温孵育 1 h, ECL 显色, 暗室曝光显示结果.

2 结 果

2.1 RING1 与 lamin A 回复杂交结果

将 pACT2-RING1-N 质粒转化含有 pGBKT7-LA-C 的 AH109 酵母感受态, 在 SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His 四缺平板上能够生长出正常的克隆, 经 β -半乳糖苷酶分析显示蓝色(图 1). 初步证明了 RING1 与 lamin A 能够结合. pACT2-RING1-N 质粒仅携带 RING1 基因的 N 端 345 nt, 而 pGBKT7-LA-C 质粒带有 lamin A 的 C 端 810 nt, 因此两者为 RING1 的 N 端和 lamin A 的 C 端结合.



Fig. 1 One to one reverse hybridization of RING1 and lamin A

1: Blue colony of AH109 with pGBKT7-LA-C and pACT2-RING1-N plasmids; 2: Negative control of AH109 (white). Competent AH109 with pGBKT7-LA-C was prepared and transfected by pACT2-RING1-N and pACT2 respectively. All yeast cells were coated on SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His with X-gal. AH109 transfected by pGBKT7-LA-C and pACT2-RING1-N appeared to blue, pACT2 transfected AH109 showed white.

2.2 重组载体 pEGFP-RING1 和 pCMV-RING1 的酶切鉴定

pEGFP-RING1 用 *Hind* III/*Pst* I 进行鉴定, 得到预期的 4.7kb 的载体带和 1.1kb 的目的带(图 2a); *Eco*R I/*Hind* III 双酶切质粒 pCMV-RING1 得到 1.1 kb 的目的带和 3.8 kb 的载体带(图 2b). 表明重组质粒构建成功, 测序结果进一步证明了该结果.

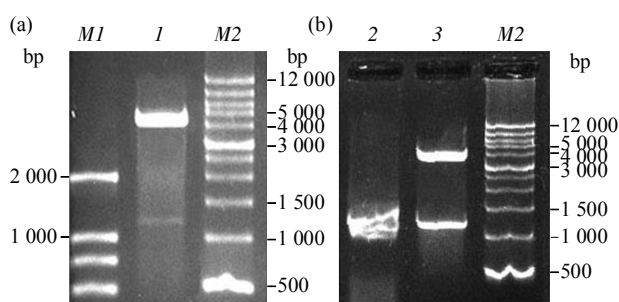


Fig. 2 Construction of the recombinant plasmids pEGFP-RING1(a) and pCMV-RING1(b)

The plasmid pEGFP-RING1 digested by *Hind* III/*Pst* I (1), the PCR product of RING1 used for subcloning(2) and pCMV-RING1 digested by *Eco*R I/*Hind* III were subjected to 1% agarose gel. M1: DL2000 DNA ladder; M2: Wide range (500~12 000 bp) DNA ladder.

2.3 RING1 和 lamin A 蛋白在细胞内共定位

质粒 pEGFP-RING1 和 pDsRed-LA 分别带有绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白标签, 各取 2 μ g 质粒共转染 HEK293 细胞后两种荧光标签蛋白分别与 RING1 和 lamin A 融合表达. 激光共聚焦显微镜下观察发现红色荧光主要位于核纤层区域, 环状分布

于核周围(图 3b); 绿色荧光同样分布于核的周围(图 3a). 两种荧光融合的结果发现能够在细胞内共定位(图 3c).

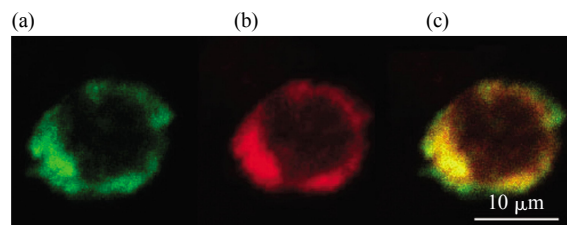


Fig. 3 Localization of RING1 in HEK293 cells

HEK293 cells were transfected with pEGFP-RING1 and pDsRed-LA constructs and visualized by laser confocal microscopy. (a) RING1 (green). (b) Lamin A (red). (c) Merged (yellow).

2.4 RING1 和 lamin A 蛋白在细胞内能相互作用

将表达 RING1 全长的质粒 pCMV-RING1 转染 HEK293 细胞. 48 h 后收获细胞, 裂解产物分别与 HA 抗体和蛋白 A 琼脂糖珠孵育, 用抗 RING1 的抗体检测到约 50 ku 的 HA-RING1 融合蛋白条带(图 4a), 用抗 lamin A 的抗体检测到约 80 ku lamin A 蛋白(图 4b). 结果证明在细胞内 RING1 和 lamin A 蛋白能够结合.

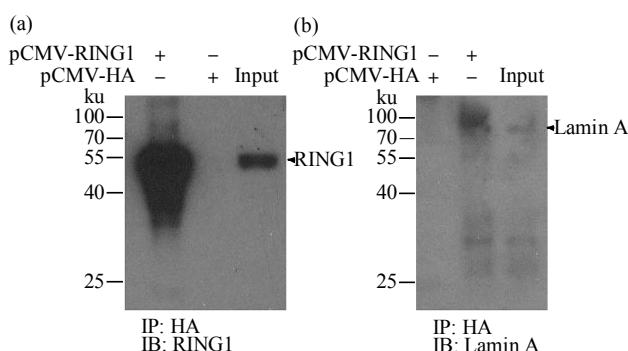


Fig. 4 In vivo confirmation of the RING1-lamin A interaction

Immunoprecipitations were performed using anti-HA antibody on HEK293 cells. Expression of RING1 and lamin A (input) was confirmed by immunoblot of whole cell supernatants. Co-precipitating RING1 and lamin A were detected by immunoblot using anti-RING1 (a) and anti-lamin A (b) antibodies.

3 讨 论

酵母双杂交系统是一种新的研究蛋白质相互作用的技术, 对于疾病的分子机制、细胞凋亡、信号

转导及疫苗等研究具有重要意义,不仅可以用来验证酵母细胞内蛋白质之间的相互作用,亦可用来寻找新的结合蛋白^[6].该系统尽管假阳性率较高、对酵母有毒性蛋白和不能正确表达折叠蛋白不适用^[7],但已经在许多的研究中广泛应用,包括寻找 lamin A 和 prelamin A 的结合蛋白领域.如 Lloyd 等^[8]采用酵母双杂交系统筛选出 lamin A 新的结合蛋白 SREBP1,两者的结合减弱是导致核纤层蛋白病的一个因素, Barton 和 Worman^[9]发现了 prelamin A 特异性识别因子 Narf,该蛋白质与 prelamin A 法尼基化的 C 端特异结合,这种结合依赖于“-CAAX”模体.

Lamin A 在细胞内有一个加工成熟过程,其前体 prelamin A 不能被加工、异常截短或存在点突变均能导致核纤层蛋白病,个体出现早老症状^[10]. Lamin A 的结合蛋白在该过程中可能起着重要作用,与基因的表达和沉默有关.结合蛋白能将 lamin 与核内膜、染色质或其他亚细胞结构联系在一起,如 LAP2 α 、actin、lamin B、nesprin 等^[11].核纤层蛋白本身在体外能与 DNA 小沟非特异性直接结合^[12],人类 lamin A/C 尾部能与核心组蛋白复合体结合,结合特性类似于其与裸 DNA 的结合.组蛋白与 DNA 在核内大量存在,这种结合特性表明 lamin A 始终与染色质接近,是染色质相关的多蛋白复合体的一个结合支撑点.核膜在组织特异性基因表达过程中起重要作用,如 DNA 复制^[13]、RNA 聚合酶 II (pol II)转录^[14]以及有丝分裂过程中的组装和分解等.由于 lamin 的突变,核膜和染色质组分之间的相互作用也发生改变.

Lamin A 结合蛋白与基因表达乃至与早老症之间的关系本显得非常密切,究竟哪些蛋白质在单独或综合起作用以及作用的机理尚不太清楚,而我们筛选得到的 RING1 蛋白可能是个很好的桥梁.共定位的结果显示, RING1 主要存在于细胞核中,能与 lamin A 较好地定位在核纤层,这既与其转录因子的功能相适应,也表明了能结合 lamin A 的性质.免疫共沉淀是证明蛋白质内源性相互作用的方法,我们的结果显示, RING1 与 lamin A 的确存在相互作用,这些结果与酵母双杂交的结果相互印证,表明 RING1 是一个新的 lamin A 结合蛋白. RING1 的环指结构域以及作为 PcG 家族复合体的特征均表明其存在结合 DNA 并抑制基因转录的功

能,我们的结果表明该功能与 lamin A 突变引起的核纤层蛋白病、细胞早老有关.至于 RING1 具体影响哪些基因的表达,被影响表达的基因在细胞衰老和相关疾病形成的网络中起着怎样的作用有待进一步地深入研究.

参 考 文 献

- [1] Mattout A, Dechat T, Adam S A, *et al.* Nuclear lamins, diseases and aging. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, **18**(3): 335-341
- [2] Worman H J, Bonne G. "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases. *Exp Cell Res*, 2007, **313**(10): 2121-2133
- [3] Lammerding J, Schulze P C, Takahashi T, *et al.* Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J Clin Invest*, 2004, **113**(3): 370-378
- [4] Satijn D P, Otte A P. RING1 interacts with multiple Polycomb-group proteins and displays tumorigenic activity. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**(1): 57-68
- [5] Hoffman C S, Winston F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 1987, **57**(2-3): 267-272
- [6] Serebriiskii I G, Kotova E. Analysis of protein-protein interactions utilizing dual bait yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol*, 2004, **261**(3): 263-296
- [7] 李铁强, 吴永英, 范洪臣, 等. 酵母双杂交系统研究进展. *生物信息学*, 2008, **6**(1): 46-48
Li T Q, Wu Y Y, Fan H C, *et al.* *Chin J Bioinformatics*, 2008, **6**(1): 46-48
- [8] Lloyd D J, Trembath R C, Shackleton S. A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum Mol Genet*, 2002, **11**(7): 769-777
- [9] Barton R M, Worman H J. Prenylated prelamin A interacts with Narf, a novel nuclear protein. *J Biol Chem*, 1999, **274** (42):30008-30018
- [10] Pendás A M, Zhou Z, Cadiñanos J, *et al.* Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in *ZMPSTE24* metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet*, 2002, **31**(1): 94-99
- [11] Gruenbaum Y, Margalit A, Goldman R D, *et al.* The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6**(1): 21-31
- [12] Ludérus M E, den Blaauwen J L, de Smit O J, *et al.* Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Mol Cell Biol*, 1994, **14**(9): 6297-6305
- [13] Moir R D, Spann T P, Herrmann H, *et al.* Disruption of nuclear lamin organization blocks the elongation phase of DNA replication. *J Cell Biol*, 2000, **149**(6): 1179-1192
- [14] Spann T P, Goldman A E, Wang C, *et al.* Alteration of nuclear lamin organisation inhibits RNA polymerase II -dependent transcription. *J Cell Biol*, 2002, **156**(4): 603-608

In vivo* Interaction of RING1 and Lamin A

CHEN Wei-Chun^{1,2)**}, SONG Jie^{1)**}, LIU Zhen-Jie^{2,3)}, JIANG Zhi-Wen^{1,2)},
YUAN Yuan¹⁾, ZHENG Hui-Ling^{1,2)}, LIU Xin-Guang^{1,2)***}

⁽¹⁾ Institute of Aging Research, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China;

⁽²⁾ Institute of Biochemistry & Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China;

⁽³⁾ Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

Abstract RING1 can bind to DNA and inhibit some gene transcription. RING1 was identified to interact with lamin A by screening a human skeletal muscle library in a yeast two-hybrid interacting screen. The results of one to one reverse hybridization indicated that AH109 transfected with RING1 and lamin A constructs could grow on SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His medium. RING1 was inserted into pEGFP-N1 vector and the constructs including pDsRed-LA and pEGFP-RING1 was used to transfect HEK293 cells. Visualized by laser confocal microscopy, RING1 and Lamin A were co-located around nucleus. Interaction of RING1 and lamin A was confirmed by immunoprecipitations. These results showed a new lamin A binding protein that can present some evidence for lamin A acting on gene expression and cell senescence.

Key words RING1, lamin A, interaction, yeast two-hybrid

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00311

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30672205, 30871440, 30900739), Natural Science Foundation of Guangdong Province (7301506, 9252402301000002), The Key Foundation of Natural Science Research for Guangdong Universities (06Z015), Science and Technology Planning Project of Dongguan City (2008108101062) and Science Technology Program of Zhanjiang (2009C3104005).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-769-22896425, E-mail: xgliu64@126.com

Received: June 8, 2010 Accepted: November 23, 2010