

## 研究快报

# Connexin31 相互作用蛋白 筛选、证实与功能研究\*

刘宇 谭志平 潘乾 贺立强 蔡芳  
鄢玲仟 梁德生 夏昆\*\* 夏家辉 张灼华

(中南大学医学遗传学国家重点实验室, 长沙 410078)

**摘要** 筛选间隙连接蛋白 31 (connexin31, Cx31) 相互作用蛋白并研究其在 Cx31 运输中的功能. 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分离, 蛋白质条带回收, 蛋白质胶块酶解, 电喷雾-四极杆-飞行时间质谱分析, 数据库扫描筛选可能相互作用蛋白, 可能互作蛋白经免疫共沉淀、细胞免疫共定位等证实, 确定 actin 为 Cx31 相互作用蛋白. 用药物处理细胞, 抑制 actin 的功能, 观察 Cx31 定位与间隙连接通道的通透性, 确定 actin 在 Cx31 运输中的功能. 当药物抑制 actin 的功能时, Cx31 很少能到达细胞膜上形成间隙连接通道, Cx31 主要分布在胞质中; 当药物抑制 tublin 的功能时, Cx31 能到达细胞膜上形成间隙连接通道, 细胞免疫荧光实验显示间隙连接斑有增多的现象, 但染料转移实验表明细胞膜上间隙连接通道并没有增加. Actin 在 Cx31 运输至细胞膜上形成间隙连接通道的过程中具有重要作用.

**关键词** Cx31, 间隙连接蛋白相互作用蛋白, 细胞免疫共定位, 免疫共沉淀

**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<sup>[1,2]</sup>, 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<sup>[3]</sup>. 形成间隙连接的间隙连接蛋白 (connexin) 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<sup>[4]</sup>. 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<sup>[5-7]</sup>, 以及变性红皮肤病角化病<sup>[8]</sup>, 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的 Cx43 相互作用蛋白有 ZO-1<sup>[9-13]</sup>、v-Src<sup>[14]</sup>、c-Src<sup>[12,15]</sup>、酪蛋白激酶 1 (CK1)<sup>[16]</sup>、蛋白激酶 A (PKA)<sup>[17]</sup>、钙粘附蛋白 (cadherin)<sup>[18]</sup>、小窝蛋白 (caveolin)<sup>[19]</sup>、 $\alpha$  联蛋白 ( $\alpha$ -catenin)<sup>[18]</sup>、 $\beta$  联蛋白 ( $\beta$ -catenin)<sup>[20]</sup>、 $\beta$  微管蛋白 ( $\beta$ -tubulin)<sup>[21]</sup> 等, 其中检测到 ZO-1 又与间隙连接蛋白 Cx45<sup>[22,23]</sup>、Cx46<sup>[24]</sup>、Cx50<sup>[24]</sup>、Cx31.9<sup>[25]</sup> 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. 并对被证实的 Cx31 相互作用蛋白进行生物学活性分析.

\*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).

\*\*通讯联系人.

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

收稿日期: 2004-11-12, 接受日期: 2004-12-16

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与材料

**1.1.1 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), 电喷雾-四极杆-飞行时间质谱(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 试剂.** Fmoc-AA-OH、HATU、DIPEA、DMF、Piperidine、TFA(ABI 公司), Fmoc-Ala-Wang resin(南开大学合成公司), 弗氏佐剂(Sigma 公司), sulfolink coupling gel(pierce 公司), PVDF membrane、ECL Plus Detection Kit(Pharmacia 公司), Cy3-labeled anti-rabbit IgG、Cy2-labeled anti-mouse IgG、Protein A agarose、Protein G agarose(KPL 公司), pcDNA3.1/myc-his(-)B(Invitrogen 公司), HT1080 细胞、HeLa 细胞(CCTCC 公司), anti-c-myc monoclonal antibody(Chemicon 公司), anti-rabbit IgG/HRP、anti-mouse IgG/HRP 二抗(CalBiochem.), 测序级胰酶(Promega 公司).

### 1.2 方法

**1.2.1 抗 Cx31 抗体制备.** 运用 DNASTAR 软件中 protean 分析人源 Cx31 序列, 选择强免疫原性肽, 进行 Blast 分析, 确定 Cx31 250~266 氨基酸为合适片段, Fmoc 多肽合成法合成多肽片段, 经 HPLC 纯化后偶联到匙孔螯血蓝蛋白, 免疫新西兰雄兔, 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抗 Cx31 的特异抗体.

#### 1.2.2 质粒的构建与表达.

设计引物: Cx31pcF 为 5' CG gaa ttc GCC GCC ATG GAC TGG AAG ACA CTC CA 3'(小写为 *EcoR* I 切点, 下划线为 Kozak 序列), Cx31pcR 为 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 为 5' CG g aat tcT GGG CGC CAT GGA CTG GAA GAC ACT CCA 3'(小写为 *EcoR* I 切点), CX31-R 为 5' GC g teg 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.

Cx31-pcDNA3.1/myc-his(-)B 表达质粒转染 HT1080 细胞. HT1080 细胞于 DMEM/10%NBS 培养, 将生长状态好、分裂旺盛、80%左右汇合的 HT1080 细胞收获用于转染. 采用电击法转染, 电击条件为 260 V, 725  $\mu$ F, 10.8 ms. 转染后的细胞于 DMEM/10%NBS 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. 挑选单克隆, 用抗 Cx31 多克隆抗体, 免疫印迹(immunoblot)检测表达 Cx31-myc 融合蛋白的阳性克隆.

Cx31-pcDNA3.1/myc-his(-)B 表达质粒与 Cx31-pEGFP-N1 转染 HeLa 细胞, 用脂质体 LipofectAmine 2000 进行转染, 具体方法见 LipofectAmine 2000 说明书, 转染后 24~48 h 检测. 加 G418 至 600 mg/L 筛选 10~15 天, 至单克隆长出. 挑选单克隆, 用抗 Cx31 多克隆抗体, 免疫印迹检测表达 Cx31-myc 融合蛋白的阳性克隆与表达 Cx31-myc 融合蛋白的阳性克隆.

**1.2.3 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°C 预冷 PBS 洗 3 次, 吸干, 放射性标记免疫沉淀(RIPA)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, 蛋白酶抑制剂(10 mg/L antipain, 10 mg/L aprotinin, 10 mg/L Leupeptin, 10 mg/L trypsin inhibitor), 磷酸酶抑制剂(50 mmol/L NaF, 2 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) )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°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°C, 转鼓过夜. 4°C, 2 000 g 离心, 取沉淀, RIPA 缓冲液洗涤 6 次, 加上样缓冲液, 100°C 变性 10 min, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离, 考马斯亮蓝染色, 脱色液脱色, 回收蛋白带, 50%乙腈脱色, DTT 还原, IAA 修饰, 测序级胰酶酶解, 酶解产物 LC-Q-TOF 质谱分析. 质谱数据在 Mascot 上进行

数据分析.

**1.2.4 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℃) 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, 加相互作用蛋白一抗, 相互作用蛋白一抗(anti-actin monoclonal antibody) 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-mouse IgG 1:500, 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, 激光共聚焦显微镜下观察.

**1.2.5 免疫共沉淀. 100 cm<sup>2</sup> 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℃ 进行, 弃培养基, 用预冷 PBS 洗涤细胞 3 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 inhibitor: 10 mg/L antipain, 10 mg/L aproptinin, 10 mg/L trypsin inhibitor, 50 mmol/L NaF, 2 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) 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℃, 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 G agarose 20 μl; 取另一份 Cx31myc/HT1080 细胞裂解液加相互作用蛋白抗体 (anti-actin 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-actin 单克隆抗体 10 μl, Protein G agarose 20 μl. 4℃, 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×SDS 上样缓冲液, 100℃ 反应 10 min, 离心取上清, immunoblotting 检测.**

**1.2.6 药物处理与荧光定位. 药物处理前一天将稳定表达 Cx31/egfp 的 HeLa 细胞接种至加有干净灭菌圆形盖玻片的 24 孔板中, 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养. 将培养细胞的 24 孔板换上新鲜的培养基, 孔中分别加入下列药物 cytochalasin D 和 nocodazole (终浓度分别为 1 mg/L 和 20 mg/L) 处理**

6 h. 将药物处理好的细胞 anti-actin 单克隆抗体进行荧光定位, 操作步骤: 弃培养基, PBS 洗涤 2 次, 甲醇 (-20℃) 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, 去离子水洗涤 1 次. 封片, 激光共聚焦显微镜下观察.

**1.2.7 染料转移实验. 转移实验前一天将稳定表达 Cx31/myc 的 HeLa 细胞接种至 3 个 35 mm 培养皿 (其中 1 个为供体细胞, 2 个为受体细胞)中, 将一瓶未转染质粒的 HeLa 细胞接种至 2 个 35 mm 培养皿 (其中 1 个为供体细胞, 1 个为受体细胞)中, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养. 在染料标记前 4 h 分别在 2 个受体细胞培养皿中加入下列药物 cytochalasin D 和 nocodazole (终浓度分别为 1 mg/L 和 20 mg/L), 另一个受体细胞培养皿作阳性对照, 不加任何药物. 染料标记操作如下: 分别取 1 μl 10 mmol/L DiI 和 1 μl 5 mmol/L calcein AM 溶于 1 ml 0.3 mol/L 葡萄糖, 取出供体细胞培养皿, 吸去培养基, 用 1 ml 0.3 mol/L 葡萄糖洗一次, 然后将 DiI 和 calcein AM 溶液加入供体细胞, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 30 min, 吸去标记培养基, 用胰酶消化 5 min, 加入培养基终止消化, 将消化后的细胞转入 1.5 ml 离心管中以 1 000 g 离心 5 min, 吸去上层培养基, 用 1 ml 新鲜培养基重悬细胞, 再以 1 000 g 离心 5 min, 吸去上层培养基, 用 1 ml 新鲜培养基重悬细胞, 按 1:100 的比例加入受体细胞中, 在培养箱中培养 2 h, 然后 100% 甲醇 (-20℃) 固定细胞 10 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 封片, 激光共聚焦显微镜下观察分析.**

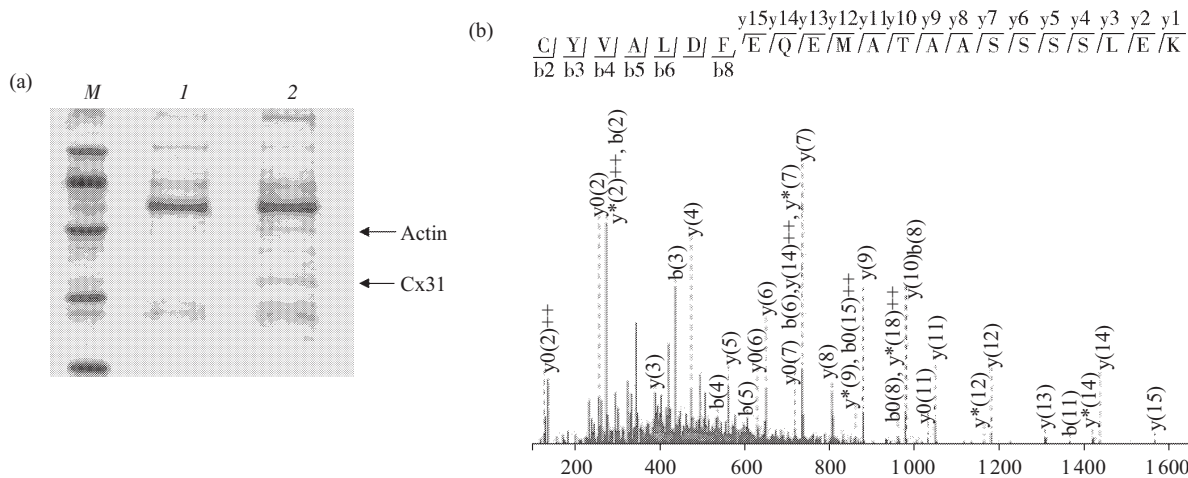
## 2 结 果

### 2.1 Q-TOF 质谱扫描结果

图 1a 为 Cx31-myc/HT1080 细胞匀浆 anti-Cx31 polyclonal antibody 免疫沉淀, SDS-PAGE 分离, 考马斯亮蓝染色结果; 蛋白质条带测序级 trypsin 酶解, LC-Q-TOF-MS/MS 质谱扫描, 数据库分析结果显示为 actin (图 1b).

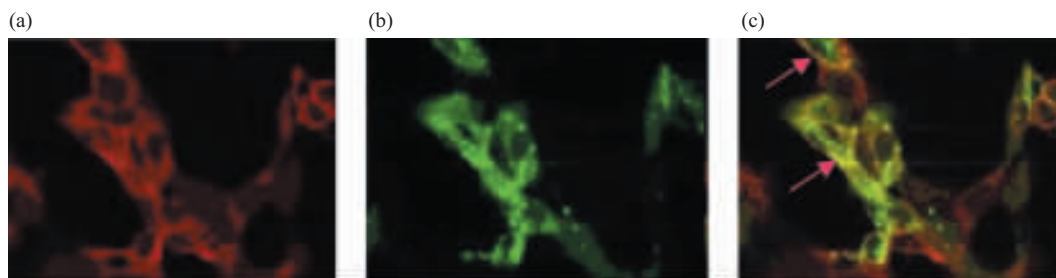
### 2.2 细胞免疫共定位与免疫共沉淀

筛选到的可能相互作用蛋白 actin 与 Cx31 进行细胞免疫共定位, 从图 2c 可知 Cx31 与 actin 共定位. 筛选到的可能相互作用蛋白 actin 与 Cx31 进行免疫共沉淀, 从图 3 可知 Cx31 与 actin 相互作用.



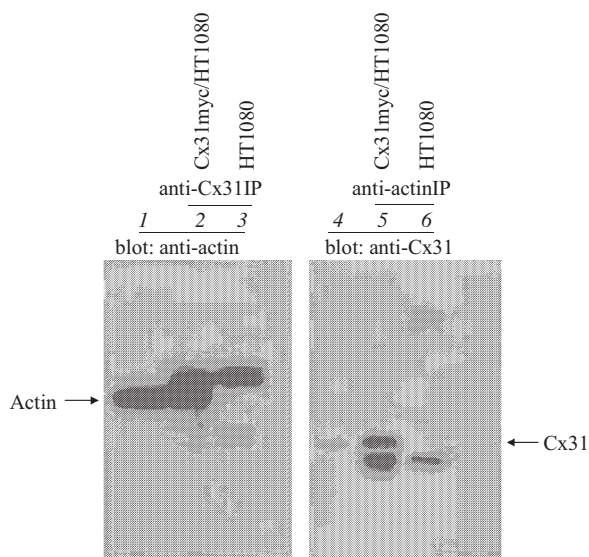
**Fig.1 Screening the Cx31 interaction proteins using anti-Cx31**

(a)SDS-PAGE and coomassie staining of protein obtained in a pull-down assay with anti-Cx31 antibody with Cx31myc/HT1080 or HT1080 cells homogenate. Arrow show the actin and Cx31.Both proteins were identified by MALDI-Q-TOF in the pull-down fraction.(b) Sequencing of one of the peptides from actin by MALDI-Q-TOF.



**Fig2 Colocalization of actin and Cx31**

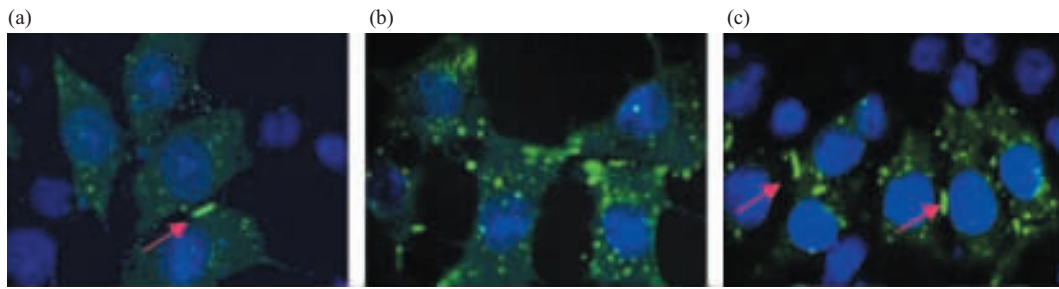
Cells were stained with antibodies against actin (red) and in green show the Cx31lgfp (b). The arrows show the merge (×600). (a)actin; (b)Cx31lgfp; (c) merge.



**Fig3 Cx31myc/HT1080 and HT1080 cells lysed, immunoprecipitated with antibodies against Cx31 and actin, and revealed for actin and Cx31 by immunoblot**

**2.3 药物处理与染料转移**

用药物处理细胞 6 h 以后, 将稳定表达 Cx31lgfp 的 HeLa 细胞固定, 进行细胞免疫荧光定位, 结果见图 4. 我们用 Cx31lgfp/ HeLa 细胞进行免疫荧光定位, 在 Cx31lgfp/ HeLa 细胞间隙连接处和胞质中, 有明显而特异的绿色荧光信号, 而未转染 Cx31lgfp 的 HeLa 细胞则没有明显而特异的绿色荧光信号. 用 cytochalasin D 处理的 Cx31lgfp/ HeLa 细胞在细胞间隙连接处很少见到特异的绿色荧光信号, 绿色信号主要集中在胞质中. 用 nocodazole 处理的细胞在细胞间隙连接处可以见到特异的绿色荧光信号, 和没有用药物处理的结果相比, 细胞间隙连接可见到更多的特异绿色荧光信号.



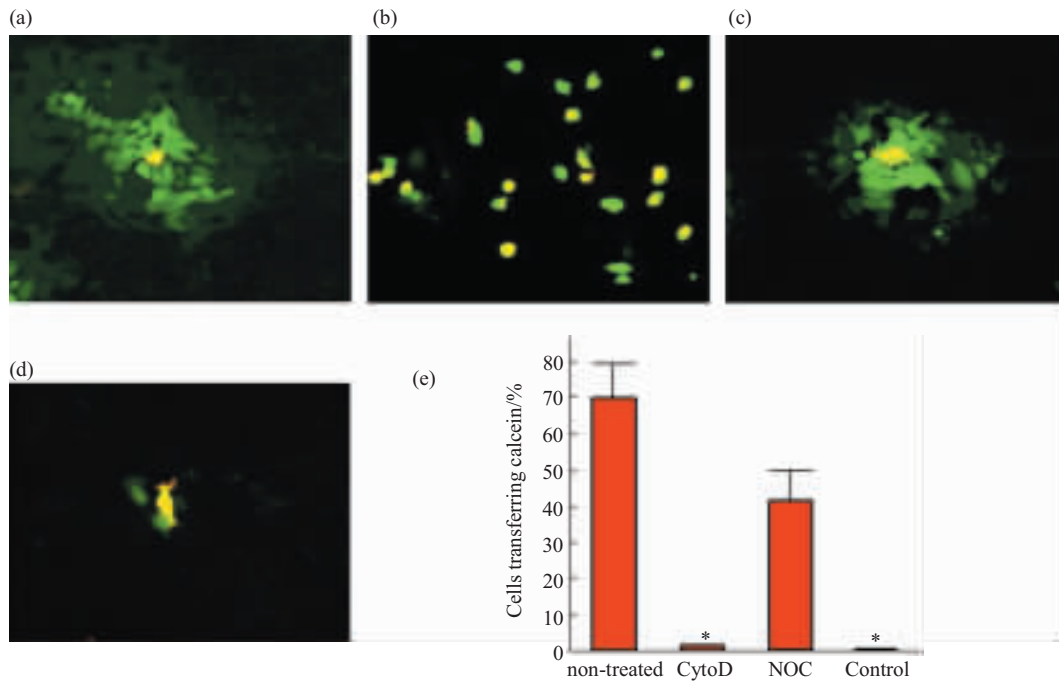
**Fig4 Confocal microscopy of Cx31egfp were shown**

(a) Non-treated Cx31egfp/HeLa. (b) Cx31egfp/HeLa treated with cyto D. (c) Cx31egfp/HeLa treated with nocodazole (The arrows show the gap junction)( $\times 900$ ). (a) control; (b) cyto D; (c) nocodazole.

药物处理和染料转移实验中, 与阳性对照组图 (图 5a) 绿色荧光染料转移至相邻细胞相比, 用 cytochalasin D 处理的 Cx31myc/HeLa 细胞绿色荧光染料转移至相邻细胞很少 (图 5b), 统计分析  $P < 0.05$ , 存在显著性差异 (图 5d); 而用 nocodazole 处理的 Cx31myc/HeLa 细胞绿色荧光染料转移至相邻细胞与阳性对照相比没有显著性差异 (图 5c 和图 5d).

以上实验结果表明, Actin 在 Cx31 转运至细

胞膜上形成间隙连接通道的过程中具有十分重要的作用, 而 tublin 在 Cx31 转运至细胞膜上形成间隙连接通道的过程中作用不大. 抑制 tublin 的功能后, 细胞间隙连接斑有增加的现象, 而染料实验表明, 细胞膜上的有效间隙连接通道并没有增加, 联系到间隙连接通道在细胞膜上具有聚合的趋势, 表明 tublin 在 Cx31 间隙连接通道的聚合中有重要作用.



**Fig5 The effect of drugs on calcein transfer**

(a) Non-treated Cx31myc/HeLa cell. (b) Cx31myc/HeLa cell treated with cyto D. (c) Cx31myc/HeLa cell treated with nocodazole. (d) Non-treated HeLa cell, red shows DiI, green shows calcein. (e) Statistical results. Statistical significance was determined by *t*-test analysis.  $P < 0.05$  was considered significant. \*:  $P < 0.001$ . There is significant differences between positive control and CytoD. There is not significant differences between positive control and nocodazole ( $\times 400$ ).

### 3 讨 论

软电离技术基质辅助激光解析电离(matrix assist laser desorption ionization, MALDI)<sup>[26]</sup>和电喷雾电离技术(electrospray ionization, ESI)<sup>[27]</sup>的出现,使质谱在生物大分子上的应用取得突破性进展.采用蛋白质组学的方法筛选蛋白质相互作用蛋白具有方便、快速等特点,并且可能筛选到非直接相互作用蛋白,而酵母双杂交筛选法则无法筛选到非直接相互作用蛋白,而且,酵母双杂交法假阳性率很高,操作繁琐.

研究表明:actin在Cx31的转运过程中具有十分重要的作用,而tublin在Cx31的转运过程中作用不大.Actin是一种细胞骨架蛋白,在细胞中主要负责膜蛋白运输.本研究显示actin与Cx31可能直接相互作用.用药物破坏actin功能后,到达细胞膜上的Cx31显著减少,揭示了actin细胞骨架蛋白运输Cx31至细胞膜上的分子机理.

Cx31-myc/HeLa细胞用nocodazole抑制tublin的作用后,细胞免疫染色结果与没有用药物处理的Cx31-myc/HeLa细胞免疫染色结果相比,间隙连接斑有增加的现象,而染料转移实验结果表明两者细胞膜上的有效连接通道没有显著性差异.也就是说,细胞膜上的间隙连接通道并没有增加,用nocodazole药物处理后间隙连接斑增加的现象只是间隙连接斑分散而已,结合间隙连接通道在细胞膜上具有聚合的趋势,表明tublin在Cx31间隙连接通道的聚合中有重要作用.结合我们的发现,以及Ross等<sup>[28]</sup>在用电镜研究tublin在Cx43转运过程中的作用时发现:用nocodazole抑制tublin的作用后,细胞膜上的间隙连接斑明显分散.表明tublin在整个间隙连接蛋白家族中可能具有相同的作用.

Cx31,一个基因的不同突变,可以导致耳聋与红皮肤角化病<sup>[7,10]</sup>,而目前还没有发现可以同时导致耳聋与红皮肤角化病的突变.一个基因,控制两种疾病,而目前对其调控机理还不清楚.许多导致遗传疾病的Cx31突变蛋白均表现为丧失转运至细胞膜上的功能<sup>[5,6,29]</sup>.是否突变蛋白丧失了与actin相互作用能力?将有待我们的进一步研究.我们的研究对进一步揭示Cx31突变致病机理打开了方便之门.

### 参 考 文 献

1 Kumar N M, Gilula N B. The gap junction communication channel.

Cell, 1996, **84** (3): 381~388

- 2 Reaume A G, de Sousa P A, Kulkarni S, *et al.* Cariac malformation in neonatal mice lacking connexin43. Science, 1995, **267** (5205): 1831~1834
- 3 Goodenough D A, Goliger J A, Paul D L. Connexins, connexons, and intercellular communication. Annu Rev Biochem, 1996, **65**: 475~502
- 4 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
- 5 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
- 6 Liu X Z, 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
- 7 López-Bigas N, Olivé M, Rabionet R, *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
- 8 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
- 9 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
- 10 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
- 11 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
- 12 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
- 13 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
- 14 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
- 15 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- alpha-induced gap junction regulation. J Biol Chem, 2003, **278** (10): 8326~8332
- 16 Cooper C D, Lampe P D. Casein kinase I regulates connexin-43 gap junction assembly. J Biol Chem, 2002, **277** (47): 44962~44968
- 17 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
- 18 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
- 19 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

- 20 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
- 21 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
- 22 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
- 23 Laing J G, Manley-Markowski R N, Koval M, *et al.* Connexin45 interacts with zonula occludens-1 and connexin43 in osteoblastic cells. *J Biol Chem*, 2001, **276** (25):23051~23055
- 24 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
- 25 Nielsen P A, Beahm D L, Giepmans B N G, *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
- 26 Fenn J B, Mann M, Meng C K, *et al.* Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 1989, **246**: 64~71
- 27 Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of protein with molecular masses exceeding 10 000 daltons. *Anal Chem*, 1988, **60**: 2299~2301
- 28 Ross G, Johnson, Rita A, Meyer, Li X R, *et al.* Gap junctions assemble in the presence of cytoskeletal inhibitors, but enhanced assembly requires microtubules. *Experimental Cell Research*, 2002, **275** (1): 67~80
- 29 Gottfried I, Landau M, Glaser F, *et al.* A mutation in GJB3 is associated with recessive erythrokeratoderma variabilis (EKV) and leads to defective trafficking of the connexin31 protein. *Hum Mol Genet*, 2002, **11** (11): 1311~1316

## Screening, Identification and Functional Research of The Human gap Junction Connexin 31 Interaction Proteins\*

LIU Yu, TAN Zhi-Ping, PAN Qian, HE Li-Qiang, CAI Fang, WU Ling-Qian,  
LIANG De-Sheng, XIA Kun\*\*, XIA Jia-Hui, ZHANG Zhuo-Hua  
(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  $\beta$  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. A proteomics approach was applied 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 Cx31. Interaction between actin and Cx31 is further confirmed by coimmunoprecipitation and immuno-colocalization. Pharmacological disruption of actin polymerization inhibits the plasma membrane localization of Cx31. The results suggested the actin cytoskeleton may play an essential role in regulating Cx31 trafficking via direct association.

**Key words** connexin31, protein-protein interaction, colocalization, coimmunoprecipitation

\*This work was supported by grants from 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 Sciences Foundation of China (30370737, 39970372).

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

Received: November 12, 2004 Accepted: December 16, 2004