

研究报告

心肌特异性新蛋白激酶 p93 和
peroxiredoxin 3 的相互作用*冯 艳^{1, 2)}** 刘冬青¹⁾ 王 震³⁾ 曹慧青¹⁾ 时 娜¹⁾ 邓仲端²⁾ 丁金凤¹⁾ 孟宪敏¹⁾***⁽¹⁾ 中国医学科学院 阜外心血管病医院分子医学中心, 北京 100037;
⁽²⁾ 中国协和医科大学⁽³⁾ 华中科技大学同济医学院病理系, 武汉 430030; ⁽³⁾ 华中科技大学同济医学院药理系, 武汉 430030

摘要 为了明确 p93 在心血管系统中的生物学功能及在信号传导通路中的作用, 采用酵母双杂交技术, 选择 p93 N 端第 101 ~ 372 位氨基酸构建诱饵质粒, 筛选成人心脏 cDNA 文库, 寻找与之相互作用的蛋白质, 结果得到蛋白 peroxiredoxin 3 (PRX3). 采用体外结合实验和免疫共沉淀等方法, 证实了原核和真核表达的 p93 确实可与 PRX3 相互作用, 通过双重荧光共定位, 为二者的相互作用提供了定位依据. 研究提示 p93 可能参与心肌细胞中与 PRX3 有关的各种生理病理过程, 如生长、分化、发育、凋亡、氧应激等.

关键词 p93, peroxiredoxin 3, 酵母双杂交, 相互作用

学科分类号 R34

p93 基因的 cDNA 全长约 3 420 bp, 定位在 1p31 ~ p21 (此区域与房室间隔缺损相关), 其中开放阅读框 (ORF) 全长 2 505 bp, 编码 835 个氨基酸, 分子质量约为 93 ku. 结构域分析表明 p93 蛋白含 3 种结构域: N 端为 7 个锚蛋白重复 (ankyrin repeats, ANK) 结构域, 中间为一典型激酶结构域, C 端为富含丝氨酸结构域. RNA 印迹和免疫组化证实 p93 基因是心肌特异表达的基因^[1].

同源性分析提示, p93 为整合素连接激酶 (integrin-linked kinase, ILK) 的远缘同源基因. 种系发生分析发现, p93 与 ILK 等可能同属 MAPKKKs 家族成员^[1]. 已证实 p93 能自身磷酸化具有激酶活性^[1], 但其在心血管系统中的生物学功能及在信号传导通路中的作用还不清楚. 本研究采用酵母双杂交技术, 选择 p93 N 端第 101 ~ 372 位氨基酸构建诱饵质粒, 筛选成人心脏 cDNA 文库, 寻找与之相互作用的蛋白质, 以进一步揭示其生物学功能和调节机制. 结果得到一个与之相互作用的蛋白 peroxiredoxin 3 (PRX3, antioxidant protein 1, AOP-1), 利用体外结合实验和免疫共沉淀, 证实原核和真核表达的 p93 都可以与 PRX3 发生相互作用. 采用双重荧光共定位, 为二者的相互作用提供定位依据.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂: 酵母双杂交系统 (MATHCHMAKER

Two-Hybrid System 3)、预转化人心脏 cDNA 文库及各种酵母培养基购自 Clontech 公司; 携带 p93 cDNA 全长的 pGEX-5X-1/p93、pEGFP/p93、pAdTrack-CMV/p93 质粒由本室前期构建; 真核表达载体 pcDNA4-Xpress、Anti-Xpress 单抗及 Lipofectamine 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司; 真核表达载体 pcDNA6-FLAG 由协和医科大学基础医学研究所缪时英教授惠赠; Anti-FLAG 单抗购自 Sigma 公司; ECL 试剂盒和谷胱甘肽-Sepharose 4B 亲和层析柱购自 Pharmacia 公司; HRP-羊抗鼠二抗和 TRITC-羊抗鼠二抗购自北京中山生物公司.

1.1.2 仪器: PCR 仪 (GeneAmp 2400), 激光共聚焦显微镜 (Olympus 公司), 电穿孔仪 (Gene Pluser), 半干电转膜仪 (Hoefer SemiPhoy™ TE 70).

1.2 方法

1.2.1 酵母双杂交筛选人心脏 cDNA 文库: pfu 酶扩增 p93 N 端第 101 ~ 372 位氨基酸的核苷酸序列, 经 EcoR I 和 BamH I 双酶切, 按正确的阅读框将目的片段亚克隆至 pGBKT7 载体, 构建诱饵质粒并将其转化入酵母菌 AH109 中. 将预转化了人心脏 cDNA 文库的 Y187 酵母菌和含诱饵质粒的 AH109

* 国家自然科学基金资助项目 (30270557, 30300131) 和北京市重大科技资助项目 (H020220020310).

** 现在上海同济医科大学病理教研室工作.

*** 通讯联系人.

Tel: 010-68314466-8069, Fax: 010-68313012

E-mail: xmmeng@163.com

收稿日期: 2004-03-30, 接受日期: 2004-04-28

酵母菌, 在 2 L 的培养瓶内于 30℃ 30 ~ 50 r/min 轻轻振摇交配 24 h. 交配产物在缺失色氨酸、亮氨酸、组氨酸和腺嘌呤的 SD (SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade) 培养盘上培养 8 ~ 20 天. 其间逐一将长出的菌落挑至 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 网格盘上, 通过两次划线和两次 β -Gal 检测筛选阳性克隆. 从中提取质粒, 并将其电转化入 DH5 α 菌株获得阳性克隆之文库质粒. 根据文库质粒载体上提供的引物序列合成引物, PCR 扩增筛选到的文库质粒的插入片段, 产物经 *Alu* I 和 *Hae* III 酶切归类, 排除重复克隆. 为了验证结果, 将筛选到的文库质粒和诱饵质粒交换转化酵母宿主菌后, 再次交配、涂于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养盘上. 培养 3 天后对长出的菌落进行第 3 次 β -Gal 检测, 同时设阴性对照以排除假阳性. 对获得的真正阳性文库质粒进行测序, 并将测序结果按正确的阅读框翻译后进行蛋白质 Blast 比对^[2].

1.2.2 体外结合试验: *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切酵母双杂交筛选获得的阳性文库质粒 pACT2-PRX3 (5 ~ 256 位氨基酸), 按正确的阅读框将目的片段亚克隆至 pcDNA4-Xpress (A) 真核表达载体上, 构建重组质粒 pcDNA4-Xpress (A) /PRX3 (5 ~ 256 位氨基酸). 以 10% FBS-DMEM 培养基于 T₂₅ 培养瓶内, 培养 HEK-293FT 细胞至 90% 汇合, 用 Lipofectamine 2000 将重组质粒转染入 HEK-293FT 细胞, 培养 40 h 后胰酶消化收集细胞, 加入 500 μ l RIPA 裂解液, 冰浴振摇 30 min, 离心收集上清备用. 同时, 分别将质粒 pGEX-5X-1 和 pGEX-5X-1/p93 转化 BL21 宿主菌, 各取菌液 5 ml, 用 0.1 mmol/L IPTG 诱导表达 GST 和 GST-p93 融合蛋白, 并经谷胱甘肽-Sepharose 4B 亲和层析纯化 (省去最后的洗脱步骤, 让融合蛋白结合于 Sepharose 4B 颗粒上). 取前述收集的含有 PRX3 蛋白的细胞裂解液上清各 200 μ l 加到 GST-Sepharose 4B 和 GST-p93-Sepharose 4B 沉淀中, 冰浴振摇 3 h, 离心后弃上清, PBS 洗涤沉淀 3 次, 再用 20 μ l 1 $\times$ SDS 上样缓冲液重悬沉淀, 煮沸变性取上清经 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离、转膜, 行蛋白质印迹检测 (以预留之细胞裂解上清为参照). 将 PVDF 膜置室温封闭 (5% 的脱脂奶粉-TBST) 1 h 后, 加 Anti-Xpress 单抗 (1:5 000 稀释) 室温孵育 1 h, 洗膜后再用 HRP-羊抗鼠 IgG 二抗 (1:5 000 稀释) 室温孵育 1 h, 最后以 ECL 化学发光试剂盒检测.

1.2.3 免疫共沉淀: *Kpn* I 和 *Bam*H I 酶切 pAdTrack-CMV/p93 质粒, 将 p93 cDNA 全长亚克隆至 pcDNA6-FLAG 真核表达载体上, 构建重组质粒 pcDNA6-FLAG/p93. 以 10% FBS-DMEM 培养基于 T₂₅ 培养瓶内, 培养 HEK-293FT 细胞至 80% 汇合, 用 Lipofectamine 2000 转染试剂将质粒 pcDNA4-Xpress/PRX3 和 pcDNA6-FLAG (对照组)、pcDNA4-Xpress/PRX3 和 pcDNA6-FLAG/p93 (实验组) 分别共转染入 HEK-293FT 细胞, 培养 40 h 后胰酶消化收集细胞, 各加入 500 μ l RIPA 裂解液, 冰浴振摇 30 min, 离心收集上清 (预留 40 μ l 行蛋白质印迹检测融合蛋白的表达, 其余进行免疫共沉淀实验). 在每管上清中加入 20 μ l Protein G-Agarose, 冰浴振摇 1 h, 离心后取上清, 加入 2.5 μ g Anti-FLAG 单抗, 冰浴振摇 3 h, 再加入 20 μ l Protein G-Agarose, 冰浴振摇 3 h, 离心后弃上清, 用 RIPA 细胞裂解液洗涤沉淀 3 次, 最后用 20 μ l 1 $\times$ SDS 上样缓冲液重悬沉淀, 按照 1.2.2 行蛋白质印迹检测.

1.2.4 双重荧光共定位: 于 24 孔细胞培养板内放置盖玻片, 以 10% FBS-DMEM 培养基培养 HEK-293FT 细胞至 50% 汇合, 用 Lipofectamine 2000 将质粒 pcDNA4-Xpress/PRX3 和 pEGFP-C1/p93 共转染入 HEK-293FT 细胞, 培养 24 h 后取出细胞爬片, 用冷丙酮:乙醇 (1:1) 固定 10 min, 然后按细胞间接免疫荧光法, 以正常山羊血清 37℃ 封闭 30 min 后, 加 Anti-Xpress 单抗 (1:500 稀释) 4℃ 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 再用红色荧光染料 TRITC 标记的羊抗鼠 IgG 二抗 (1:500 稀释) 避光孵育 45 min, PBS 洗涤 3 次, 90% 的碱性甘油 (pH 8.5) 封片, 激光共聚焦显微镜下观察.

2 结 果

2.1 酵母双杂交

将测序结果按正确的阅读框翻译后进行蛋白质 Blast 比对, 最终得到 5 个阳性克隆. 其中相似性最高的是 peroxiredoxin 3 (PRX3, antioxidant protein 1, AOP-1), 仅缺 N 端 4 个氨基酸. 同源性比较分析表明, PRX3 是近年来新发现的一个定位于线粒体的抗氧化蛋白.

2.2 体外结合实验

Xpress-PRX3 (5 ~ 256 位氨基酸) 融合蛋白全长 297 个氨基酸, 估计分子质量约为 33 ku. 体外结合实验发现, 实验组 (GST-p93 融合蛋白) 和参

照组（转染后细胞裂解液上清）都可检测到同一条特异性条带（图 1-2, 3），此条带位于蛋白质分子质量标准 31 ku 稍上方，符合 PRX3 融合蛋白的预期大小，说明此条带为 Xpress-PRX3 融合蛋白。而阴性对照组（GST 蛋白）未检测到此条带（图 1-1），可见只有加入实验组的 Xpress-PRX3 融合蛋白被沉淀了下来，说明原核表达的 p93 可以在体外结合 PRX3。

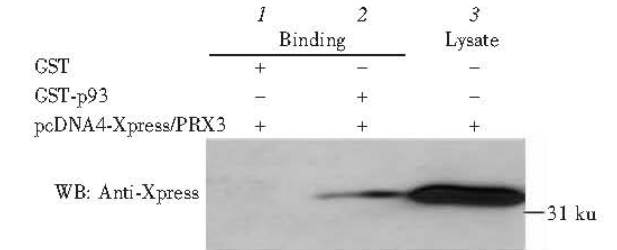


Fig. 1 *In vitro* binding assay of Xpress-tagged PRX3 with GST-p93
1: Negative control; 2: Xpress tagged PRX3 precipitation with GST-p93-Sephareose 4B; 3: The lysate of transiently transfected HEK-293FT cells.

2.3 免疫共沉淀

将共转染后收集的细胞裂解液行蛋白质印迹：用 Anti-FLAG 检测 p93 的表达（图 2c），用 Anti-Xpress 检测 PRX3 的表达（图 2b）。可见实验组和对照组均可表达 PRX3，而 p93 仅在实验组表达，说明转染质粒都表达了相应的融合蛋白。以 Anti-FLAG 行免疫沉淀后再用 Anti-Xpress 检测（图 2a），实验组仍可检测到 PRX3 融合蛋白的特异条带，而对照组未检测到，说明实验组中 p93 可和

PRX3 结合而被沉淀下来，结果证实了二者在真核细胞内的相互作用。

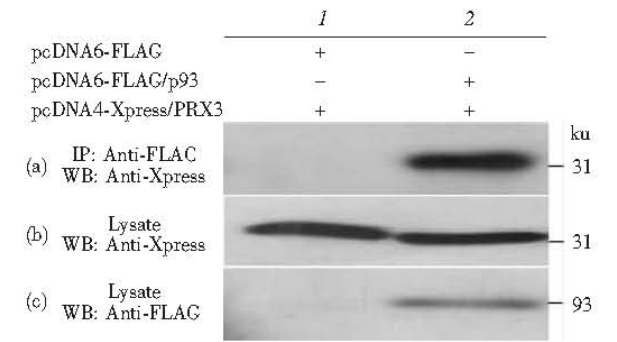


Fig. 2 Analysis of co-immunoprecipitation of Xpress-tagged PRX3 with FLAG-tagged p93 by Western blot
(a) Co-immunoprecipitation followed by Western blot analysis using the anti-Xpress monoclonal antibody to detect the presentation of PRX3; (b) Western blot analysis using the anti-Xpress monoclonal antibody to detect the expression of PRX3 in lysates; (c) Western blot analysis using the anti-FLAG antibody to detect the expression of p93 in lysates. 1: Negative control; 2: Co-transfection with pcDNA6-FLAG/p93 and pcDNA4-Xpress/PRX3.

2.4 双重荧光共定位

激光共聚焦显微镜下观察结果显示：PRX3（红色荧光）位于细胞浆内（图 3b），与文献报道的 PRX3 定位于线粒体是一致的^[3,4]；同时，GFP-p93（绿色荧光）也主要分布于细胞浆内（图 3a）；将二者重叠后即可发现二者在部分区域有共定位（图 3c 中的黄色荧光即代表二者共同存在的部位）。

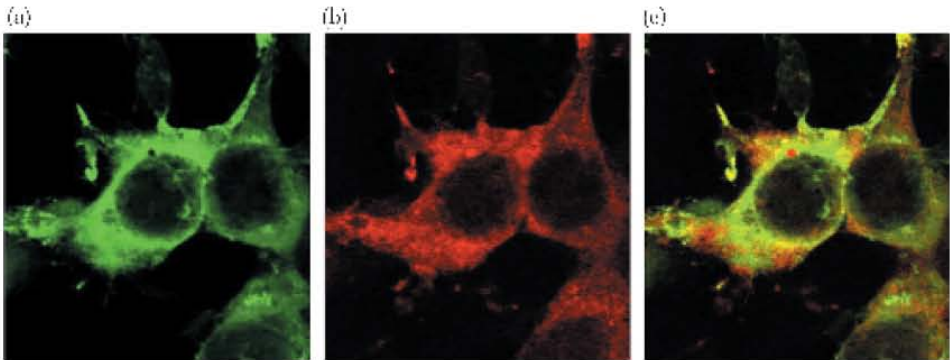


Fig. 3 Co-localization of Xpress-tagged PRX3 and GFP-p93 in HEK-293FT cells
(a) Localization of GFP-p93 in HEK-293FT cells (green); (b) HEK-293FT cells stained with anti-Xpress antibody and visualized with TRITC-conjugated goat anti-mouse IgG (red); (c) overlap of (a) and (b) (yellow). Magnifications are 10 × 60 × 2.5.

3 讨 论

在真核细胞中, 蛋白激酶和其他信号分子共同组成了庞大的信号转导网络系统, 处于其中的蛋白激酶除了具有必备的激酶活性功能域外, 一般还有其他的结构域来调节自身活性、结合信号分子或进行亚细胞定位等, 其中 ANK 结构域就是一个常见的介导蛋白质间相互作用的结构域^[5,6].

本研究选用 p93 的 ANK 结构域 (N 端第 101 ~ 372 氨基酸) 构建诱饵质粒, 以酵母双杂交的方法寻找与之相互作用的蛋白质, 以进一步揭示其生物学功能和调节机制. 结果从成人心脏 cDNA 文库中筛选出 PRX3 蛋白. PRX3 是 Peroxiredoxins (PRXs) 家族中的一员. 而 PRXs 是一类广泛存在于各种原核和真核生物细胞中的硫氧还蛋白依赖性过氧化物酶, 其活性基团为位于 N 端的一个高度保守的半胱氨酸残基, 在 NADPH-硫氧还蛋白-硫氧还蛋白还原酶系统的协助下可以清除 H₂O₂ 等过氧化物^[7~10]. 在哺乳动物细胞内已发现了 6 个 PRXs 家族成员 (PRX1 ~ 6), 其中只有 PRX3 定位于线粒体^[3,4,7]. 氨基酸序列分析显示, 其 N 端的 61 个氨基酸就是线粒体定位信号^[4].

为了排除假阳性, 我们分别采用体外结合实验和免疫共沉淀, 进一步证实了原核和真核表达的 p93 都可以与 PRX3 发生相互作用. 然后通过双重荧光共定位, 寻找二者相互作用的定位依据. 共定位结果显示 p93 主要分布在胞浆, 并与 PRX3 在部分区域有重叠, 而 PRX3 是定位于线粒体的, 其表达部位可以代表线粒体的所在位置, 由此推断, 在生理条件下即有少量 p93 在线粒体表达, 并与 PRX3 发生作用. 已有文献报道, Abrin^[4]、LZK^[11] 以及 cyclophilin 18^[12] 等胞浆蛋白都可以和 PRX3 发生相互作用. 另一方面, 在凋亡以及一些病理状态下, 线粒体内的蛋白质可以释放出来, 此时, 进入胞浆的 PRX3 就可以和 p93 相结合. 因此推测, p93 不仅在生理条件下, 还可能在凋亡以及一些病理状态下, 和 PRX3 发生相互作用.

众所周知, 线粒体在生物体需氧能量代谢中起着重要作用, 是活性氧 (ROS) 产生的重要部位. 氧应激时, 线粒体膜上的蛋白质被氧化而使膜的通透性增高, 释放出细胞色素 c, 诱导 caspase 依赖的凋亡途径. 而 PRX3 通过清除过氧化物类 ROS, 维持线粒体膜的稳定性, 可以阻止细胞色素 c 的释

放, 从而抑制凋亡的发生^[4]. 因此, PRX3 在线粒体的抗氧化防御机制中起着至关重要的作用. 近年研究发现, PRXs 除了抗氧化作用外, 还可通过调节细胞内信号分子——ROS 的水平或直接结合其他信号转导分子, 参与多种细胞活动的信号转导, 如细胞的增殖、分化、转化和凋亡等^[8,10,13].

本研究从不同层次证明了 p93 确实可以和 PRX3 发生相互作用, 因此推测 p93 很有可能参与心肌细胞中与 PRX3 有关的各种生理病理过程, 如生长、分化、发育、凋亡、氧应激等. 至于 PRX3 究竟是 p93 的底物还是其调节物, 以及二者相互作用的机制还有待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Zhao Y, Meng X M, Wei Y J, *et al.* Cloning and characterization of a novel cardiac-specific kinase that interacts specifically with cardiac troponin I. *J Mol Med*, 2003, **81** (5): 297 ~ 304
- 2 Altschul S F, Gish W, Miller W, *et al.* Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 1990, **215** (3): 403 ~ 410
- 3 Araki M, Nanri H, Ejima K, *et al.* Antioxidant function of the mitochondrial protein SP-22 in the cardiovascular system. *J Biol Chem*, 1999, **274** (4): 2271 ~ 2278
- 4 Shih S F, Wu Y H, Hung C H, *et al.* Abrin triggers cell death by inactivating a thiol-specific antioxidant protein. *J Biol Chem*, 2001, **276** (24): 21870 ~ 21877
- 5 杨新平, 夏家辉. 蛋白激酶研究进展. *生命科学研究*, 1998, **2** (4): 235 ~ 244
- 6 Yang X P, Xia J H. *Life Sci Res*, 1998, **2** (4): 235 ~ 244
- 7 Manning G, Whyte D B, Martinez R, *et al.* The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 2002, **298** (5600): 912 ~ 934
- 7 Wood Z A, Schroder E, Robin Harris J, *et al.* Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*, 2003, **28** (1): 32 ~ 40
- 8 Fujii J, Ikeda Y. Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. *Redox Rep*, 2002, **7** (3): 123 ~ 130
- 9 Henkle-Duhrsen K, Kampkotter A. Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol*, 2001, **114** (2): 129 ~ 142
- 10 Rabilloud T, Heller M, Gasnier F, *et al.* Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for *in vivo* overoxidation of peroxiredoxins at their active site. *J Biol Chem*, 2002, **277** (22): 19396 ~ 19401
- 11 Masaki M, Ikeda A, Shiraki E, *et al.* Mixed lineage kinase LZK and antioxidant protein-1 activate NF-kappaB synergistically. *Eur J Biochem*, 2003, **270** (1): 76 ~ 83
- 12 Jaschke A, Mi H, Tropschug M. Human T cell cyclophilin18 binds to thiol-specific antioxidant protein Aop1 and stimulates its activity. *J Mol Biol*, 1998, **277** (4): 763 ~ 769
- 13 Jin D Y, Chae H Z, Rhee S G, *et al.* Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF-kappaB activation. *J Biol Chem*, 1997, **272** (49): 30952 ~ 30961

Interaction Between The Novel Cardiac-specific Protein Kinase p93 and Peroxiredoxin 3*

FENG Yan^{1, 2)}, LIU Dong-Qing¹⁾, WANG Zhen³⁾, CAO Hui-Qing¹⁾,
SHI Na¹⁾, DENG Zhong-Duan²⁾, DING Jin-Feng¹⁾, MENG Xian-Min¹⁾**

(¹⁾ Molecular Medical Center, Cardiovascular Institute and Fuwai Hospital,

Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100037, China;

²⁾ Department of Pathology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China;

³⁾ Department of Pharmacology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract In an attempt to get insight into the biological functions of p93 in the cardiovascular system and its potential roles in the signaling pathway, a yeast two-hybrid technology was carried out to screen the adult heart cDNA library using the N-terminal fragment of p93 (101 ~ 372 aa) as bait. Peroxiredoxin 3 (PRX 3) was identified as a novel p93 binding protein. Subsequently, the interaction was confirmed by *in vitro* binding assay and co-immunoprecipitation and p93 was showed to co-localize in part with PRX 3 in HEK-293FT cells by immuofluorescence. Taken together, these observations suggest that p93 may participate in various pathophysiologic processes mediated by PRX3 in cardiomyocyte, such as cell growth, differentiation, development, apoptosis and oxygen stress.

Key words p93, peroxiredoxin 3, yeast two-hybrid, interaction

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30270557 and 30300131) and The Key Science and Technique Foundation of Beijing (H020220020310).

** Corresponding author. Tel: 86-10-68314466-8069, Fax: 86-10-68313012, E-mail: xmmengcn@163.com

Received: March 30, 2004 Accepted: April 28, 2004

第三届国际人类蛋白质组大会即将于 2004 年 10 月召开

随着人类基因组计划的完成,蛋白质组研究已成为 21 世纪生命科学发展的先导,成为生命科学乃至自然科学最活跃的学科领域。由国际人类蛋白质组组织(HUPO)发起的国际人类蛋白质组大会是国际蛋白质组领域中规模最大、影响最广、水平最高的世界性会议,每年举办一次。2004 年 10 月 25 日至 27 日,第三届国际人类蛋白质组大会将在北京召开。这将是亚太地区主办的第一次大型国际蛋白质组学大会。若干诺贝尔奖获得者及国际蛋白质组研究领域著名专家将应邀作大会报告。预计 3000 余名代表将出席本次大会。

本届大会的主题是“蛋白质组——解析基因组”。会议的主要议题将包括:蛋白质组学技术;糖蛋白质组学;神经蛋白质组学;微生物蛋白质组学;肝脏蛋白质组学;亚细胞蛋白质组学;蛋白质化学;蛋白质结构;蛋白质生物信息学;疾病蛋白质组学;药物蛋白质组学;植物和动物蛋白质组学等。

会议同期将举办“Ex-HUPO”大型生命科学分析仪器、实验室技术及相关设备展览。会前还将举办“人类蛋白质组计划”系列卫星会。

大会由国际人类蛋白质组组织、中国人类蛋白质组组织、国家生物医学分析中心、北京市科学技术委员会共同主办。

有关参会及参展详细信息请查阅大会网站: www.hupo2004.cn

联系人: 陈宁 电话: 86-10-82327644 传真: 86-10-82802515 E-mail: Beijing2004@newlife.org.cn

通信地址: 北京市海淀区学院路 38 号北京大学医学部会议中心一层 100083 第三届国际人类蛋白质组大会会务组