

## 干扰素诱导蛋白 Nmi 与 IFP35 的结合区域 及 Nmi 亚细胞定位\*

沈 涓<sup>1, 2)</sup> 刘迎芳<sup>1)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup>中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; (<sup>2)</sup>中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要** 人源 N-Myc 结合蛋白(N-Myc interactor, Nmi)能在干扰素(interferon, IFN)诱导后高表达, 并参与下游的 JAK-STAT 通路, 且有抑制癌细胞增殖的功能. Nmi 能够结合人干扰素结合蛋白 35(interferon-induced protein 35, IFP35)并保护 IFP35 不被降解. 本研究构建了 Nmi 和 IFP35 的全长及 N 端截短体克隆, 通过两种蛋白的共表达和 GST pull down 实验确定二者能够相互作用的区域, 并进一步大量共表达和纯化了重组蛋白复合物. 结合实验表明, 与先前报道的两者通过 C 端串联的 NID 结构域相结合不同, 两者的 N 端结构域都足以介导复合物形成. 免疫荧光观察未经干扰素刺激的 RAW264.7 细胞, 发现 Nmi 与 IFP35 共定位于细胞核内. 免疫荧光观察 Nmi 在 293A 细胞中的分布特点, 发现正常细胞中 Nmi 分布于细胞核内. 如先前研究报道, 干扰素诱导 24 h 后, Nmi 在胞质内形成颗粒状聚集, 此时加入低浓度过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)会使 Nmi 的亚细胞定位回到细胞核内, 表明 Nmi 的亚细胞定位受到细胞氧化环境的影响.

**关键词** Nmi, IFP35, 干扰素诱导蛋白, 蛋白质相互作用, 亚细胞定位

**学科分类号** Q511, Q26

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2013.00178

干扰素(interferons, IFN)能够通过激活数百种干扰素诱导蛋白和干扰素刺激基因的表达来实现其抗病毒、抑制肿瘤生长及免疫调节等功能<sup>[1-2]</sup>. 干扰素诱导蛋白通常在细胞里低表达或不表达, 当干扰素结合细胞表面干扰素受体时, 通过 JAK-STAT 等信号通路激活效应蛋白的转录和表达<sup>[3]</sup>. 人源 N-Myc 结合蛋白(N-Myc interactor, Nmi)是一种在干扰素诱导后高表达的蛋白, 在干扰素诱导的不同细胞系中, Nmi 的表达水平都有 2~20 倍不等的提高<sup>[4]</sup>. Nmi 能结合除 STAT2 以外所有的 STATs, 提高 STATs 介导的下游基因转录水平<sup>[5]</sup>. Nmi 还能结合 BRCA1 和 c-Myc, 形成三元复合物, 下调 c-Myc 诱导的 hTERT 启动子活性, 具有潜在的抑制癌细胞增殖的功能<sup>[6]</sup>. 此外, Nmi 还能够抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路, 在细胞和小鼠体内实验都能观察到 Nmi 抗肿瘤的功能<sup>[7]</sup>.

与 Nmi 类似, 人干扰素结合蛋白 35(interferon-induced protein 35, IFP35)也是一个在干扰素诱导后高表达的蛋白<sup>[8]</sup>. IFP35 具有抗病毒的功能, 并被发现在西泽里综合征(Sezary syndrome)患者 T 细胞内显著低表达<sup>[9-10]</sup>. 这两个蛋白的 C 端由二者同

源的两个串联的 Nmi/IFP35(NID)结构域组成. Nmi 的 N 端是一个卷曲螺旋结构域, IFP35 的 N 端则是一个亮氨酸拉链结构域<sup>[11]</sup>. 用酵母双杂交方法, Chen 等<sup>[12]</sup>发现 Nmi 与 IFP35 通过两者 C 端串联的 NIDs 相互结合, 形成大分子质量复合物, 而两个蛋白 N 端结构域不参与结合. Nmi 通过结合 IFP35, 能够保护 IFP35 不被蛋白酶体降解. 细胞定位实验还表明, Nmi 在干扰素诱导后能够在细胞质内与 IFP35 共定位, 形成颗粒状聚集.

由于 Nmi 具有参与 JAK-STAT 通路、抑制癌细胞增殖等重要功能, 其与 IFP35 的结合又对 IFP35 在细胞内稳定存在有重要作用, 因而研究 Nmi 与 IFP35 的结合方式, 并确定 Nmi 在细胞内定位, 对于研究 Nmi 在细胞内行使功能的详细机制具有重要的基础意义. 本研究通过 Nmi 和 IFP35 N 端截短体与全长蛋白的原核重组复合物共表达和 GST pull down 实验确定 Nmi 与 IFP35 的结合区域,

\* 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2012CB910204).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-64888536, E-mail: liuy@ibp.ac.cn

收稿日期: 2013-04-27, 接受日期: 2013-06-03

并且大量表达纯化 IFP35 和 Nmi N 端截短体与全长蛋白结合形成的复合物蛋白。体外证实两种蛋白质结合后, 又通过免疫荧光技术首次观察了未用干扰素刺激的小鼠 RAW264.7 细胞中内源 Nmi 与 IFP35 的亚细胞定位。同时还观察了 IFN- $\beta$  诱导以及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激的 293A 细胞中 Nmi 的亚细胞定位, 发现 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可以影响 Nmi 在细胞中的分布。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人源 Nmi 及 IFP35 cDNA 序列质粒购自 www.lifesciences.sourcebioscience.com 网站; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、BL21 (DE3) 感受态菌株及表达载体 pGEX-6p-1、pMal II、pRSFduet-1 由本实验室保存; 超保真 DNA 聚合酶购自 Genstar 公司; 限制性核酸内切酶购自 Takara 公司; T4 DNA 连接酶、琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Transgene 公司; GST 亲和柱胶、阴离子交换柱(HiTrap\_Q\_HP\_5 ml)、预装镍柱、凝胶过滤层析柱(HiLoad\_16/60\_Superdex200\_prep grad)及蛋白质纯化系统购自 GE healthcare 公司; 断前蛋白酶 (pre-scission protease, PPase) 由本实验室纯化。小鼠巨噬细胞 RAW264.7 由中国科学院生物物理研究所刘志华研究员实验室馈赠。人胚肾细胞 293A 由中国科学院生物物理研究所张立国研究员实验室馈赠。IFN- $\beta$  重组蛋白购自 PeproTech (US); 荧光二抗 Alexa 488 及 Alexa 594 购自 Invitrogen 公司; Nmi 鼠多抗由中国科学院遗传研究所动物房制备, IFP35 兔多抗购自 Abnova 公司。

### 1.2 表达载体构建

利用标准的克隆方法, 将 Nmi 全长蛋白及 N 端截短体克隆在大肠杆菌表达载体 pRSFduet 中。IFP35 全长蛋白及 N 端截短体克隆在 pGEX-6p-1 中。所有克隆都经测序鉴定(北京华大基因公司)。

### 1.3 复合物蛋白表达及 GST pull down

将含有 Nmi 和 IFP35 对应片段的相容质粒共同转化入大肠杆菌 BL21 表达菌株。挑取单克隆于含有氨苄青霉素和卡那霉素双重抗性的 LB 培养基 50 ml 中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 A<sub>600</sub>=0.8~1.0, 冷却至 16 $^{\circ}$ C 后加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 16 $^{\circ}$ C 诱导 12~18 h。收集大肠杆菌细胞, 用预冷的 PBS (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1.2 ml 重悬后, 冰浴中超声破碎(功率 150 W, 工作 3 s 间隔 7 s, 持续 10 min)。4 $^{\circ}$ C 13 500 r/min 离心 30 min。向离心

后的上清中加入 GST 亲和柱胶 20  $\mu$ l, 4 $^{\circ}$ C 混匀结合 30 min。4 000 r/min 离心 1 min, 弃去上清。用预冷的 PBS 缓冲液清洗柱胶 3~4 次以除去非特异性结合的杂蛋白, 弃去缓冲液。清洗后的柱胶 SDS 电泳、考马斯亮蓝染色鉴定。

### 1.4 复合物蛋白纯化

扩大细胞培养规模至 2 L, 培养和诱导条件与小量表达相同。收集的菌体以每升大肠杆菌菌体加入 50 ml PBS 的比例重悬、高压破碎。4 $^{\circ}$ C, 16 000 r/min 离心 30 min 除去菌体碎片。在离心后的裂解液上清中加入 GST 柱胶 2 ml, 4 $^{\circ}$ C 混合结合 30 min。用含有 15 mmol/L GSH、150 mmol/L NaCl、20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 的缓冲液洗脱蛋白复合物。向洗脱的蛋白复合物溶液中加入 50  $\mu$ g 断前蛋白酶(PPase), 4 $^{\circ}$ C 混合酶切过夜。得到的蛋白复合物和 GST 标签混合溶液通过预装镍柱, 用 1 mol/L 咪唑、150 mmol/L NaCl、20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 的缓冲液梯度洗脱, 除去 GST 标签, 得到的蛋白质复合物再经凝胶过滤层析, 得到纯化的目的蛋白复合物。

### 1.5 免疫荧光

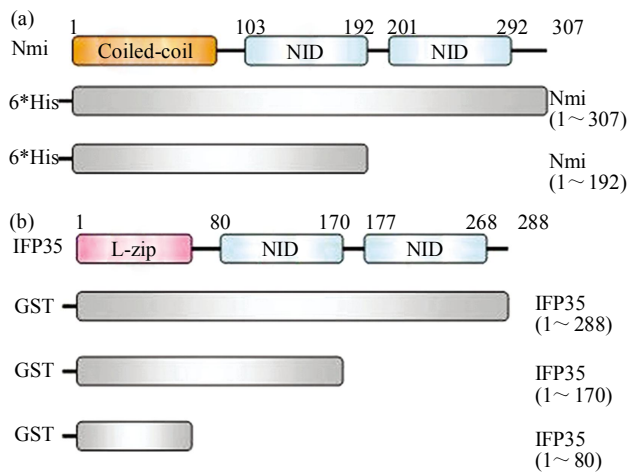
RAW264.7 细胞接种于铺有玻片的培养皿中培养 12 h 后, 吸去培养基, 用 4% PFA 室温固定 15 min, PBS 清洗。加入含有 0.1% Triton-X 的 PBS 溶液室温孵育 5 min 破膜, PBS 清洗。用含 1% BSA 的 PBS 1:500 稀释 Nmi 鼠多抗和 IFP35 兔多抗, 室温孵育 60 min, 用含有 0.1 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 和 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 的 PBS(PBS-Ca/Mg) 漂洗 3 次。Alexa 488 抗小鼠和 Alexa594 抗兔荧光二抗按照 1:2000 的比例用含 1%BSA 的 PBS 共同稀释, 室温避光孵育 60 min。PBS-Ca/Mg 漂洗 2 次, 1/10 稀释的 PBS-Ca/Mg 漂洗 1 次。将玻片倒置于滴有封片剂的载玻片上, 指甲油封片。激光共聚焦显微镜(Olympus FV1000) 60 倍油镜观察拍照。

293A 细胞接种于铺有玻片的 6 孔细胞培养板中, 经过干扰素及过氧化氢刺激培养后, 免疫荧光样品的制备与 RAW 细胞相同。一抗使用 1:500 稀释的 Nmi 鼠多抗, 二抗使用 1:2 000 稀释的 Alexa 488 抗小鼠荧光二抗。

## 2 结果

### 2.1 Nmi N 端可以结合全长 IFP35

Nmi 和 IFP35 的结构域组成和实验中所用到的截短体示意图如图 1 所示。



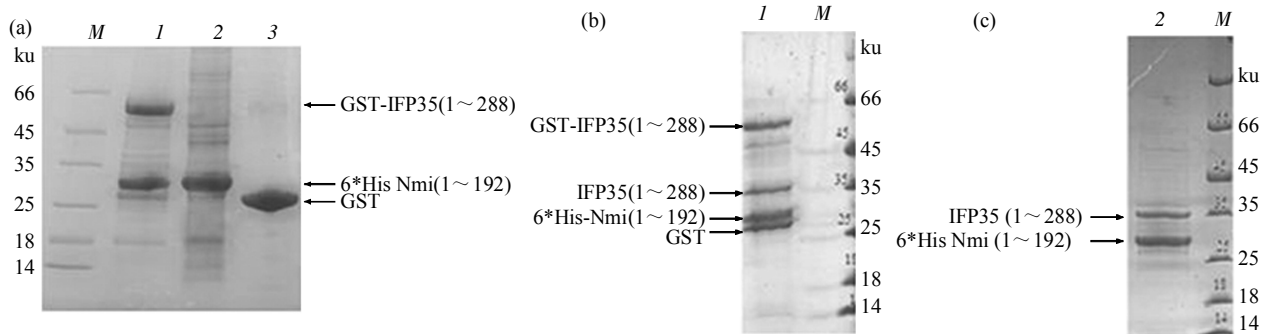
**Fig. 1 Schematic representation of Nmi and IFP 35**

Schematic representation of Nmi (a) and IFP35 (b) constructs used in this study. Coiled-coil, NID1, NID2 and leucine zipper (L-zip) domains are labeled.

为了验证 Nmi 与 IFP35 结合时是否两个 NID 都是必需的, 我们首先克隆了缺失第二个 NID 结

构域的 Nmi 截短体 6\*His-Nmi(1~192) 以及带有 GST 标签的 IFP35 全长蛋白 GST-IFP35(1~288). 通过在大肠杆菌中共表达两种蛋白后, 进行体外 GST pull down 实验证明两者可以很好地相互作用. 6\*His-Nmi(1~192) 截短体与 GST 蛋白在大肠杆菌中共表达作为对照(图 2a).

为了确证 Nmi (1~192) 与全长 IFP35 (1~288) 的结合是否足够牢固, 同时为了得到复合物蛋白用于后续实验, 我们还对 Nmi(1~192)/IFP35(1~288) 复合物进行了大量纯化. 在纯化实验中, 结合在 GST 亲和柱上的复合物蛋白, 首先用含 15 mmol/L 还原型谷胱甘肽缓冲液洗脱后, 加入断前蛋白酶对 GST 标签进行酶切. 之后再结合预装 Ni 柱, 带有 6\*His 标签的复合物蛋白结合在预装镍柱上, 咪唑梯度洗脱中两种蛋白一起被洗下. 所得到的复合物蛋白再经过凝胶过滤层析进一步纯化, 并确认两者结合形成的复合物稳定(图 2b).



**Fig. 2 Nmi N terminus region 1~192 can bind full length IFP35**

(a) SDS-PAGE verification of GST pull down of Nmi (1~192)/IFP35 (1~288) complex. 6\*His-Nmi(1~192) and GST-IFP35 (1~288) were co-expressed in BL21(ED3) cells and bound onto Glutathione affinity resin. 6\*His-Nmi(1~192) and GST were co-expressed and bound onto Nickel affinity or Glutathione resin as control. 1: GST pull down; 2: Nmi input(Ni beads); 3: GST control. (b) SDS-PAGE verification of purification of Nmi (1~192)/IFP35(1~288) complex. Left, protein complex was eluted from GST beads with additional 15 mmol/L reduced glutathione and digested with 100  $\mu$ g Ppase overnight at 4  $^{\circ}$ C. Right, Nmi (1~192)/IFP35(1~288) complex after Nickel-affinity column and gel filtration. 1: Ppase digested; 2: IFP35 (1~288)/Nmi (1~192) complex. M: Molecular mass marker.

## 2.2 IFP35 N 端结构域可以结合全长 Nmi

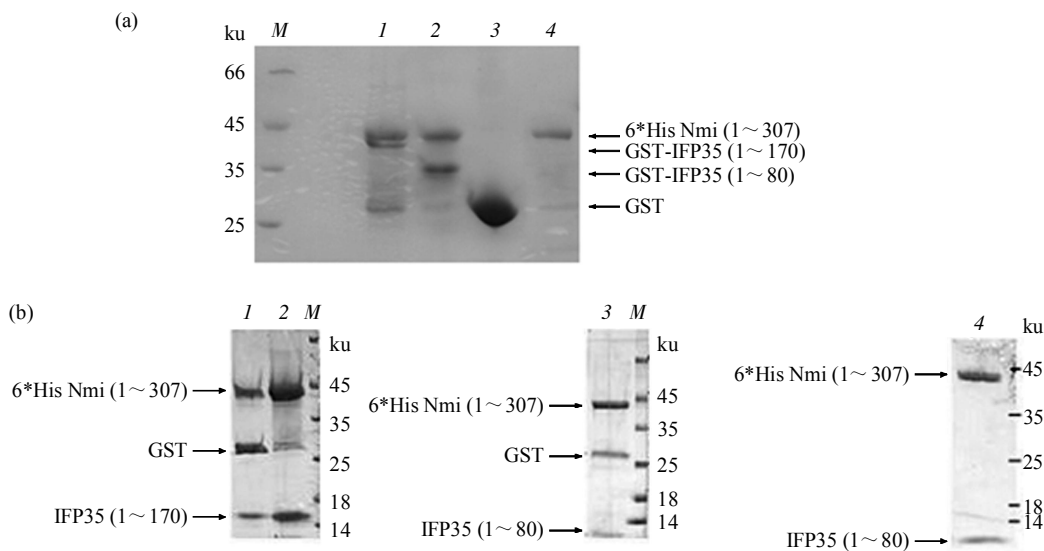
由于 IFP35 与 Nmi 的结构域组成非常相似, 所以在发现 Nmi 缺失第二个 NID 结构域仍能够稳定结合全长的 IFP35 之后, 考虑 IFP35 N 端结构域是否也能够单独结合全长 Nmi 蛋白.

我们首先克隆了带有 GST 标签, 同样缺失第二个 NID 结构域的 IFP35 截短体 GST-IFP35(1~170) 并与 6\*His-Nmi (1~307) 全长蛋白在大肠杆菌

中共表达, 并进行 GST pull down 实验. 发现缺失第二个 NID 结构域的 IFP35(1~170) 同样可以结合全长 Nmi 蛋白后, 我们进一步克隆了缺失两个 NID 结构域的 GST-IFP35(1~80) 截短体并与 Nmi 全长蛋白进行 GST pull down. 结果显示, IFP35 (1~80) 也能够很好地结合全长 Nmi 蛋白. 6\*His-Nmi (1~307) 全长蛋白与 GST 蛋白共表达作为对照组(图 3a).

我们同样对 Nmi (1~307)/IFP35 (1~170) 和 Nmi (1~307)/IFP35 (1~80) 两种蛋白复合物进行了大量表达, 断前蛋白酶切去 GST 标签和多步色谱

柱纯化. 纯化结果进一步确证 Nmi(1~307)/IFP35 (1~170)(图 3b, 左)和 Nmi(1~307)/IFP35 (1~80) (图 3b, 中、右)能够形成稳定的复合物.



**Fig. 3 IFP35 N terminus region 1~170 and 1~80 can bind full length Nmi**

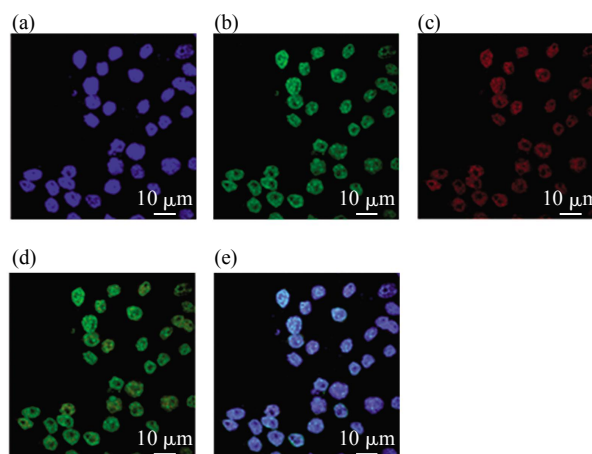
(a) SDS-PAGE verification of GST pull down of Nmi (1~307)/IFP35 (1~170) and Nmi (1~307)/IFP35 (1~80) complex. 6\*His-Nmi (1~307) and GST-IFP35(1~170), 6\*His-Nmi (1~307) and GST-IFP35 (1~80), 6\*His-Nmi (1~307) and GST (as control) were separately co-expressed in BL21 (ED3) cells and bound onto Glutathione affinity resin. 1: Nmi (1~307)/IFP35 (1~170) GST pull down; 2: Nmi (1~307)/IFP35 (1~80) GST pull down; 3: GST control; 4: Nmi input (Ni beads). (b) SDS-PAGE verification of GST pull down and purification of Nmi (1~307)/IFP35 (1~170) and Nmi (1~307)/IFP35 (1~80) complex. 6\*His-Nmi (1~307)/ GST-IFP35 (1~170) (left) and 6\*His-Nmi (1~307)/IFP35 (1~80) complex (middle) were eluted from GST beads with additional 15 mmol/L reduced glutathione and digested with 100 μg Ppase overnight at 4°C. Afterwards, the complex was purified through Nickel-affinity column and gel filtration. 1: Ppase digested; 2: Nmi (1~307)/IFP35 (1~170) complex; 3: Ppase digested; 4: Nmi (1~307)/IFP35 (1~80) complex; M: Molecular mass marker.

### 2.3 Nmi 与 IFP35 在小鼠 RAW264.7 细胞中共定位

确认 Nmi 与 IFP35 在体外实验中可以稳定地相互结合后, 我们观察了两种蛋白在小鼠 RAW264.7 细胞系中的亚细胞定位. 实验结果显示, 在 RAW264.7 细胞中, 两种蛋白共定位于细胞核中(图 4).

### 2.4 Nmi 的细胞定位受到细胞氧化环境影响

分别观察正常培养、IFNβ 诱导以及 IFNβ 诱导后添加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激的 293A 细胞中 Nmi 的亚细胞定位, 发现在未受 IFNβ 刺激的细胞中, Nmi 呈现主要分布于核内并在细胞核表面富集分布特点. 在 IFNβ 刺激 24 h 后, 与文献[12]及[13]中描述一致, Nmi 在细胞质中出现颗粒状聚集. 当用低浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(5 μmol/L)刺激 2 h 后, Nmi 的颗粒状聚集明显减少, 又回到分布于细胞核内的分布方式(图 5).

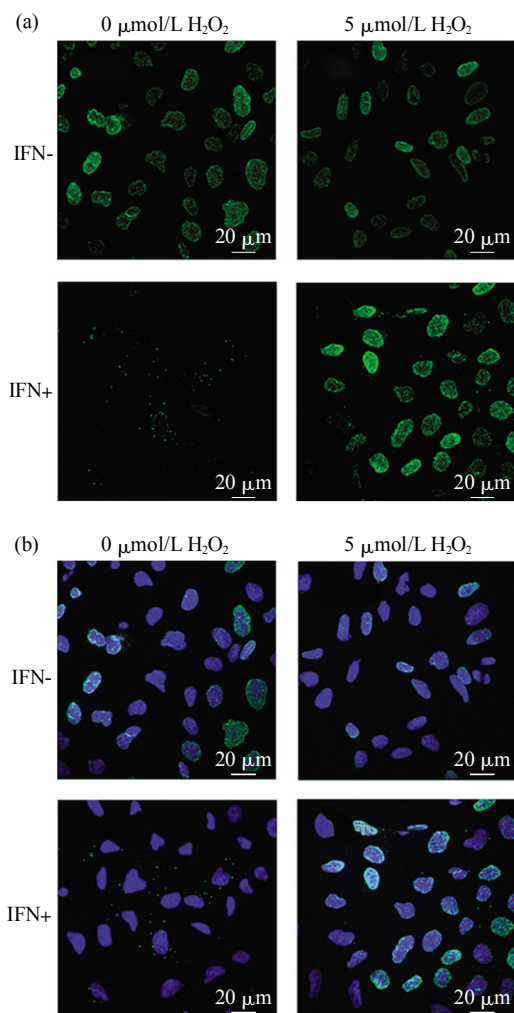


**Fig. 4 Subcellular localization of Nmi and IFP35 in RAW264.7 cells**

RAW264.7 cells were fixed with paraformaldehyde (PFA) and immunofluorescence was conducted. (a) DNA was stained with DAPI (blue). (b) Nmi was stained with mouse anti-Nmi followed by goat anti-mouse Alexa 488 (green). (c) IFP35 was stained with rabbit anti-IFP35 followed by goat anti-rabbit Alexa 594 (red). (d) Overlay of Nmi and IFP35. (e) Overlay of DNA, Nmi and IFP35.



这说明 Nmi 在细胞中的亚细胞定位不仅受到 IFN 诱导的影响, 也受到细胞氧化环境的影响。



**Fig. 5** IFN and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> affected the subcellular localization of Nmi

(a) 293A cells were cultured in 6-well plates and treated with 500 U/ml IFN- $\beta$ (IFN+) or without(IFN-) for 24 h. Afterwards, final concentration of 0  $\mu$ mol/L (Left lane) or 5  $\mu$ mol/L (Right lane) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added. After 2 h incubation, cells were fixed with PFA and immunofluorescence was conducted. Nmi was stained with mouse anti-Nmi followed by goat anti-mouse Alexa 488 (green). (b) Overlay of Nmi and DAPI (blue).

### 3 讨 论

真核细胞在受到病毒、细菌等病原物或肿瘤细胞的侵染时会释放干扰素。干扰素分泌后通过激活干扰素诱导蛋白和干扰素刺激基因来实现抗病毒和免疫调节等生理功能。确认干扰素诱导蛋白之间相互结合的方式对于研究其被干扰素诱导产生后信号

的传递和下游功能的实现都有着基础的意义。

Chen 等<sup>[12]</sup>用酵母双杂交的方法检测不同的 Nmi 与 IFP35 截短体之间的相互作用发现, Nmi (92~307), 即只含两个串联 NIDs 的 Nmi 截短体与 IFP35 同样只有两个串联 NIDs 截短体结合的报告信号很强。因而作者认为, 在 Nmi 与 IFP35 的相互作用中, 2 个串联的 NIDs 是必不可少的<sup>[12]</sup>。此后提及这 2 种蛋白间相互作用的研究报告都基于此, 认为 Nmi 与 IFP35 是通过串联的 NIDs 相互作用的, 并未做进一步验证<sup>[14-15]</sup>。Nmi 与 IFP35 相结合目前所发现的生理意义是能够保护 IFP35 不被蛋白酶体降解。在细胞长期培养体系中, 稳定表达的全长的 Nmi 或使用蛋白酶体抑制剂处理细胞都能使 IFP35 的表达量显著增加, 但是转入缺失 N 端或者缺失 C 端的 Nmi 截短体的细胞中都不能检测到 IFP35 的表达<sup>[12]</sup>。

谷胱甘肽巯基转移酶(GST)pull down 技术通过捕捉能够特异性与结合在 GST 柱胶上的 GST 融合蛋白相结合的蛋白, 可以简便而可靠地体外确证蛋白质之间相互作用<sup>[16]</sup>。

本研究通过 GST pull down 实验首先发现了 Nmi 与 IFP35 相互结合不仅依靠其串联的同源 NID-NID 结构域, 同时两者 N 端的结构域都能够单独介导自身与全长蛋白之间的相互作用。我们也通过本文中的实验体系验证了文献[12]中报道的两种蛋白确实能够通过串联的 NID-NID 相互结合(结果未展示)。综合已有实验结果说明, Nmi 与 IFP35 至少能够通过 N 端和 C 端 2 个不同的位点相互结合。由于缺失 N 端或 C 端的 Nmi 截短体都无法保护 IFP35 在细胞内被蛋白酶体降解, 说明 Nmi 与 IFP35 通过 N 端和 C 端多位点的结合方式对于这 2 种蛋白在细胞内行使功能可能起到重要作用。

我们还大量表达并纯化了 Nmi (1~192)/IFP35 (1~288)、Nmi (1~307)/IFP35 (1~170) 以及 Nmi (1~307)/IFP35(1~80) 三种复合物。经过切去 GST 标签、多步亲和层析和凝胶过滤层析纯化得到复合物蛋白, 一方面能够确认复合物结合稳定牢固, 另一方面也为后续可能进行的实验提供纯化的蛋白质样品。

得到体外结合和纯化实验结果后, 通过在 <http://biogps.org/> 网站查找, 发现这 2 种蛋白都在免疫相关的细胞系中高表达。因而选择小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 作为实验材料, 观察 2 种蛋白在未受干扰素刺激的细胞中的共定位。在未受干扰

素刺激的 RAW 细胞中, 免疫荧光可以观察到两种蛋白的表达, 并共定位于细胞核内. 亚细胞定位实验结果表明, Nmi 与 IFP35 在细胞未受干扰素刺激时, 也可能有相互结合. 文献[12]虽然有关于两种蛋白在干扰素刺激后形成的颗粒状聚集中的共定位报道, 但我们的实验是首次对未经干扰素诱导的细胞中两种蛋白共定位的观察.

IFN 能够促进多形核中性粒细胞和巨噬细胞中活性氧的产生, 而活性氧是吞噬细胞杀死病原体的主要方式之一<sup>[17]</sup>. 免疫荧光分别观察 IFN 诱导后的不同细胞发现, Nmi 大部分都定位于细胞质中, 并形成颗粒状聚集<sup>[4, 18]</sup>. 我们的亚细胞定位实验结果显示, 在未受 IFN 诱导时, 293A 细胞中 Nmi 定位于细胞核内, 并富集于细胞核表面. 我们还首次发现了 Nmi 的亚细胞定位可以受到细胞氧化环境的影响. 在 IFN 刺激 24 h 后, 再以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激 2 h 的细胞中, Nmi 又从颗粒状聚集回到了细胞核周围的分布方式. Nmi 这种分布方式的改变, 暗示它在被 IFN 诱导表达之后, 还可能参与 IFN 引发的活性氧环境调节的下游通路.

综上所述, 我们的研究发现了 Nmi 与 IFP35 多位点的结合方式, 这种结合方式对于 Nmi 保护 IFP35 在细胞中稳定存在起到关键作用, 可能与两种蛋白在细胞内行使其功能密切相关. 同时还纯化得到了 IFP35 和 Nmi 截短体与全长蛋白之间结合形成的复合物, 为两种蛋白进一步研究打下基础. 体外实验证实两种蛋白相互结合后, 我们通过观察亚细胞定位确认了两种蛋白在未经干扰素刺激的 RAW264.7 细胞内也能够共定位. 还首次发现了在 293A 细胞中 IFN 诱导和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激对 Nmi 分布方式的影响, 说明 Nmi 可能参与感受细胞氧化状态的改变. 这种分布方式变化的机制和作用仍不清楚. 目前我们还在对 Nmi 与 IFP35 在 IFN 诱发的免疫调节功能中所起到的作用进行进一步研究.

### 参 考 文 献

- [1] Theofilopoulos A N, Baccala R, Beutler B, *et al.* Type I Interferons ( $\alpha/\beta$ ) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol*, 2005, **23**(1): 307-336
- [2] Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, *et al.* Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature*, 2002, **424**(6948): 516-523
- [3] Darnell J E, Kerr Jr I M, Stark G R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 1994, **264** (5164): 1415-1421
- [4] Lebrun S J, Shpall R L, Naumovski L. Interferon-induced upregulation and cytoplasmic localization of Myc-interacting protein Nmi. *J Interferon and Cytokine Research*, 1998, **18** (9): 767-771
- [5] Zhu M H, Susan John, Maria Berg, *et al.* Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFN $\gamma$ -mediated signaling. *Cell*, 1999, **96**(1): 121-130
- [6] Li H C, Tae-Hee Lee, Hava Avraham. A novel tricomplex of BRCA1, Nmi, and c-Myc inhibits c-Myc-induced human telomerase reverse transcriptase gene(hTERT) promoter activity in breast cancer. *J Biological Chemistry*, 2002, **277**(23): 20965-20973
- [7] Fillmore R A, Aparna Mitra, Xi Y G, *et al.* Nmi (N-Myc interactor) inhibits Wnt/b-catenin signaling and retards tumor growth. *Int J Cancer*, 2009, **125**(3): 556-564
- [8] Franz-Christoph Bange, Ulrich Vogel, Thomas Flohr, *et al.* IFP 35 is an interferon-induced leucine zipper protein that undergoes interferon-regulated cellular redistribution. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, **269**(2): 1091-1098
- [9] Tan J, Qiao W T, Wang J, *et al.* IFP35 is involved in the antiviral function of interferon by association with the viral Tas transactivator of bovine foamy virus. *J Virology*, 2008, **82** (9): 4275-4283
- [10] Pomerantz R G, Mirvish E D, Erdos G, *et al.* Novel approach to gene expression profiling in Sezary syndrome. *Br J Dermatol*, 2010, **163**(5): 1090-1094
- [11] Deannie Lee N, Chen J, Shpall R L, *et al.* Subcellular localization of interferon-inducible, Myc/Stat-interacting protein Nmi is regulated by a novel IFP 35 homologous domain. *J Interferon and Cytokine Research*, 1999, **19**(11): 1245-1252
- [12] Chen J, Shpall R L, Anke Meyerdierksi, *et al.* Interferon-inducible Myc/STAT-interacting protein Nmi associates with IFP35 into a high molecular mass complex and inhibits proteasome-mediated degradation of IFP35. *J Biological Chemistry*, 2000, **275** (46): 36278-36284
- [13] Chen J, Louie Naumovski. Intracellular redistribution of interferon-inducible proteins Nmi and IFP35 in apoptotic cells. *J Interferon and Cytokine Research*, 2002, **22**(2): 237-243
- [14] Zhang L Q, Tang Y, Tie Y, *et al.* The PH domain containing protein CKIP-1 binds to IFP35 and Nmi and is involved in cytokine signaling. *Cellular Signalling*, 2007, **19**(5): 932-944
- [15] Yang W, Tan J, Liu R K, *et al.* Interferon-gamma upregulates expression of IFP35 gene in HeLa cells via interferon regulatory factor-1. *Plos One*, 2012, **7**(12): e50932-e50932
- [16] Einarson M B, Pugacheva E N, Orlinick J R. GST Pull-down. *Cold Spring Harb Protocols*, 2007, **2007**(8): pdb.prot4757-4757
- [17] Forman H J, Torres M. Redox signaling in macrophages. *Molecular Aspects of Medicine*, 2001, **22**(4-5): 189-216
- [18] Zhou X J, Liao J, Anke Meyerdierksi, *et al.* Interferon- $\alpha$  induces Nmi-IFP35 heterodimeric complex formation that is affected by the phosphorylation of IFP35. *J Biological Chemistry*, 2000, **275**(28): 21364-21371

## Interaction Regions of N-Myc Interactor (Nmi) and Interferon-induced Protein 35 (IFP35) and Subcellular Localization of Nmi\*

SHEN Juan<sup>1,2)</sup>, LIU Ying-Fang<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup> Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

<sup>2)</sup> Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** Human N-Myc Interactor (Nmi), an interferon (IFN)-induced protein, participates in downstream JAK-STAT pathway and inhibits proliferation of cancer cells. Nmi can bind Interferon-Induced Protein 35 (IFP35) and protect the latter from degradation. Previous research showed that these two proteins associated through their C-terminal domains. In this study, we constructed full length clones and N-terminal truncates of both Nmi and IFP35. Co-expression and GST pull down experiments showed that N-terminal domains of Nmi and IFP 35 are respectively sufficient for their association. We overexpressed and purified recombinant protein complexes afterward. Through immune fluorescence, we found that Nmi and IFP35 co-localized in nucleus in RAW264.7 cells. We also noticed that Nmi localized in nucleus and enriched on surface in normal 293A cells. Although Nmi granularly aggregated in cytoplasm after 24 h induction by interferon as reported, it came back to nucleolus by adding low concentration hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). That result indicated that subcellular localization of Nmi can be affected by the oxidation environment of cells.

**Key words** Nmi, IFP35, interferon-induced protein, protein interaction, subcellular localization

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2013.00178

---

\*This work was supported by a grant from National Basic Research Program of China (2012CB910204).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-10-64888536, E-mail: liuy@ibp.ac.cn

Received: April 27, 2013 Accepted: June 3, 2013