

从人白细胞 cDNA 文库筛选凋亡素相互作用蛋白^{*}

孙国敬 童 新 孟祥兵 董 燕 孙志贤^{**}

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 1000850)

摘要 来源于鸡贫血病毒的小分子蛋白-凋亡素 (apoptin) 能够选择性诱导肿瘤细胞凋亡, 为研究其选择性诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制, 利用酵母双杂交系统筛选从人白细胞 cDNA 文库筛选 apoptin 相互作用蛋白, 核酸序列分析及同源性检索表明, 其中一个与 ABP280 (actin-binding protein 280) 有高度同源性. 细胞免疫共沉淀实验结果显示: 在哺乳动物细胞水平仍能够检测到 apoptin 与 ABP280 片段的特异的相互作用. 分别构建缺失 C 端 11 个氨基酸、中间 33~46 位氨基酸和二者均缺失的 apoptin 的 3 个突变体, 突变体与 ABP280 相互作用研究表明: apoptin 的 33~46 位氨基酸 (核外运信号) 对于 apoptin 与 ABP280 的相互作用是必需的, 而 C 端核定位信号/DNA 结合序列对于 apoptin 与 ABP280 的相互作用不是充分必要的.

关键词 凋亡素, 酵母双杂交, ABP280, 免疫共沉淀

学科分类号 Q255

凋亡素 (apoptin) 来源于鸡贫血病毒 (chicken anemia virus, CAV) 的 VP3 蛋白^[1,2], 由 121 个氨基酸组成, 相对分子质量 13 600, 其 C 端碱性区 (即 C 端 11 个氨基酸) 是核定位信号 NLS 和/或 DNA 结合区域. 凋亡素 (apoptin) 能诱导人的肿瘤细胞和恶性/转化细胞凋亡^[3], 但不能诱导正常的人双倍体细胞凋亡, 且无毒性 and 转化活性. 此外, apoptin 诱导的细胞凋亡无需 p53 参与, 也不被 Bcl-2 的过表达抑制. 因此与多种药物相比, apoptin 可能是真正意义上的第一个被发现的可选择性诱导肿瘤细胞凋亡, 而不损伤正常细胞的凋亡蛋白, 有望成为一种很有前景的抗肿瘤治疗剂. 然而, 凋亡素选择性诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制仍不清楚, 目前唯一的线索是: apoptin 蛋白的核定位与其诱导凋亡的活性有相关性, 在正常细胞中 apoptin 存在于细胞质, 而肿瘤细胞中 apoptin 则集中于细胞核. 核酸序列分析表明, apoptin 不仅具有两个向核内运输的保守序列, 而且在蛋白质一级结构中还存在一段向核外运输的保守氨基酸序列 (即位于 33~46 位的 IPIGIAGITITLSL). 有理由推测胞浆中的运输或抑制因子可能是通过与这些保守肽段相互作用来控制 apoptin 的核定位的, 而正常细胞和肿瘤及转化细胞胞质内的特定的因子不同或有所改变, 从而影响了 apoptin 的核定位. 细胞免疫共沉淀和酵母双杂交系统是研究蛋白质-蛋白质相互作用的主要方法, 酵母双杂交系统除了能够用于研究已知蛋白质-蛋白质的相互作用, 还能

够从文库中筛选与目的蛋白有特异相互作用的蛋白质, 并可直接得到编码该蛋白质的 cDNA 序列, 是研究分析基因功能的重要工具. 据此, 本文利用酵母双杂交系统从正常人白细胞 cDNA 文库筛选 apoptin 相互作用蛋白, 特别是与 apoptin 核定位相关的蛋白质, 并用免疫共沉淀验证这种相互作用. 希望能筛选到与 apoptin 有特异相互作用的蛋白质, 为阐明 apoptin 诱导及选择性诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制提供重要的线索和启示.

1 材料

1.1 质粒、菌株、细胞和文库

COS-7 细胞由杨淑静博士惠赠; 菌株 Y187, Y190 和 CG1945, 质粒 pAS2-1, pACT2、质粒 pCMV-HA 和 pCMV-MYC、pCL 及人白细胞 cDNA 文库均购自 Clontech 公司.

1.2 酶和试剂

各种限制性内切酶均购自 TaKaRa 和 Promega 公司, HA 多克隆抗体 (兔源) 和 MYC 单克隆抗体 (鼠源) 及酵母用培养基均购自 Clontech 公司, X-gal, PEG4000, 3AT, Lyticase 和放线菌酮均购自 Sigma 公司, DMEM, Lipofectamine 转染试剂为

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (39800178).

^{**} 通讯联系人.

Tel: 010-66931218, E-mail: sunzx@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2000-11-13, 接受日期: 2000-12-12

GIBCO 公司产品; 小牛血清和其他试剂均为国产试剂.

2 方 法

2.1 酵母双杂交筛选

将 apoptin 基因定向克隆至酵母双杂交系统中的诱饵载体 pAS2-1, 构建重组质粒 pAS2-1-apoptin. 采用 LiAc 方法将质粒 pAS2-1-apoptin 转化至酵母菌株 Y187, β -gal 显色反应鉴定转录激活活性. 扩增人白细胞 cDNA 文库, 采用 LiAc 法转化 pAS2-1/apoptin 和文库质粒至酵母菌株 CG1945, 涂布于 50 块 $\text{Leu}^-/\text{Trp}^-/\text{His}^-$ SD Medium+ 3AT 平板上. 30℃ 培养至菌落长出 (7~10 d). 分析和证实假定的阳性克隆. 实验操作按常规方法^[4,5]和厂家说明书进行. 阳性克隆序列分析, 通过国际互联网络进行同源性分析, 以美国国立生物信息中心 (NCBI) 的 BLAST 作为主要的检索工具, 对比数据库主要 NR 库和 ESTs 库. 检索主要程序采用 BLASTN.

2.2 细胞免疫共沉淀试验

构建 pCMV-HA-apoptin 和 pCMV-MYC-ABP280 重组质粒, pCMV-HA-apoptin 采用 *Sfi* I 和 *Sal* I 双酶切, 连接定向克隆方法. pCMV-

MYC-ABP280 采用 *Bgl* II 位点酶切, 进行克隆, 并利用 *Xho* I 位点进行重组质粒的鉴定同时还可以鉴定插入方向正确与否. 利用 lipofectamine (2 g/L) 将两个质粒转染至 COS-7 细胞, 质粒与 lipofectamine 按 1:10 的比例. 转染 48 h 后收集细胞, 加 1 ml 细胞裂解液, 4℃ 放置 45 min, 离心, 上清加 15 μ l HA 多抗, 4℃ 摇 2 h, 加 50 μ l 的琼脂糖交联的蛋白 A 悬液 4℃ 摇过夜, 离心 20 s, 沉淀加 1 ml 细胞裂解液 4℃ 摇 20 min, 离心, 沉淀再用细胞裂解液洗 3 次, 沉淀加 50 μ l 上样缓冲液悬浮. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 转移到硝酸纤维素膜上, 4℃ 封闭过夜. 一抗为 MYC 单克隆抗体, 二抗为兔抗鼠抗体. DAB 显色.

2.3 相互作用位点的鉴定

设计引物, 通过 PCR 方法扩增得到分别缺失 C 端核内运信号和位于 33~46 位氨基酸的核外运信号的 apoptin 突变体 1, 2, 3. 构建重组质粒 pAS2-1-apoptinT1/T2/T3 (pC-T1/T2/T3). 序列分析验证. 用小量酵母转化法分别按下列分组方法转化酵母菌株 Y187; 挑取在相应培养基上生长的克隆用 β -半乳糖酶克隆滤膜影印法分析 lacZ 表型, 以确定二者有无特异相互作用. 按表 1 实验.

Table 1 Testing for interaction between ABP280 and apoptin mutants T1, T2, T3

No.	Plasmid 1 (DNA-BD)	Plasmid 2 (AD)	SD Selection medium	lacZ Pheno.
1	—	pCL1	— Leu	blue (positive)
2	pAS2-1	—	— Trp	white (negative)
3	pAS2-1/apoptin	pGAD10/5	— Leu, — Trp	unknow
4	pAS2-1/apoptinT1	pGAD10/5	— Leu, — Trp	unknow
5	pAS2-1/apoptinT2	pGAD10/5	— Leu, — Trp	unknow
6	pAS2-1/apoptinT3	pGAD10/5	— Leu, — Trp	unknow

3 结 果

3.1 酵母双杂交筛选及鉴定

首先构建重组质粒 pAS2-1-apoptin, *Eco*R I, *Sal* I 双酶切结果为 8.4 kb, 0.4 kb 的两个片段 (图略), 表明成功构建了重组质粒 pAS2-1-apoptin. 转化 pAS2-1-apoptin 至酵母菌株 Y187, 待菌落长出后, 作 β -半乳糖苷酶活性显色实验, 结果为阴性无颜色反应, 表明 apoptin 本身无转录激活活性, 可作为诱饵蛋白利用酵母双杂交系统进行文库的筛选. 经过文库筛选和验证, 得到四个与

apoptin 有特异相互作用的克隆, 核酸序列分析及同源性检索表明其中的 5 号克隆与 ABP280 (actin-binding proein) 高度同源 (同源性达 99%).

3.2 apoptin 和 ABP280 蛋白在细胞中的相互作用

为了进一步研究两者在哺乳动物细胞水平的相互作用, 构建重组质粒 pHA-CMV-apoptin 和 pMYC-CMV-ABP280, 酶切鉴定结果 (图 1). 将质粒 pHA-CMV-apoptin 与 pMYC-CMV-ABP280 共转染 COS7 细胞, 用 HA 多抗沉淀, 用 MYC 的单抗检测. 结果见图 2 (图 2 中 1 为阴性对照), 表明 apoptin 与 ABP280 片段在哺乳动物细胞水平

也存在特异的相互作用。

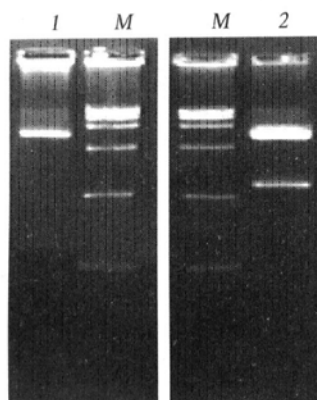


Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of the restriction pattern of pHA-CMV-apoptin and pMYC-CMV-ABP280

M : DL 15 000; 1 : pHA-CMV-apoptin/ *Eco*RI + *Sal*I; 2 : pMYC-CMV-ABP280/ *Xho*II

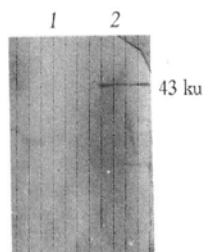


Fig. 2 Western blotting of co-immunoprecipitation between apoptin and ABP280

1: apoptin; 2: apoptin-ABP280.

3.3 apoptin 与 ABP280 相互作用位点的鉴定

通过 PCR 扩增得到 apoptin 的三个突变体, 结果见图 3, 并克隆至双杂交系统 DNA-BD 载体 pAS2-1 上, 核酸序列测定与预先设计的相符. 分别将 apoptin 突变体 1, 2, 3 的 pAS2-1 克隆与 ABP280 片段的 AD 克隆共转化至酵母菌株 Y187, 观察相互作用情况鉴定相互作用位点. 结果见表 2, 蓝色为阳性反应, 白色为阴性反应.

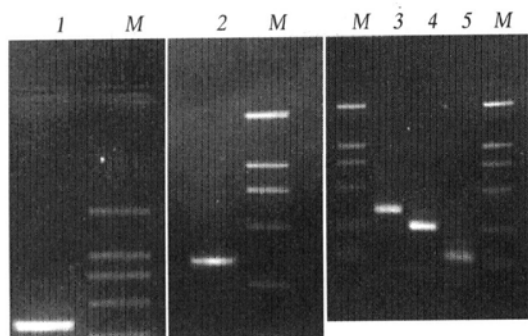


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR product of apoptin T1, T2, T3

M : DL2000 marker; 1 : apoptin T1; 2 : apoptin T2; 3, 4 : apoptin (141~363), apoptin (1~99); 5: apoptin T3.

Table 2 Interaction between ABP280 and apoptin mutants

T1, T2, T3			
No.	Plasmid 1 (DNA-BD)	Plasmid 2 (AD)	lacZ Pheno.
1	—	pCL1	blue (+)
2	pAS2-1	—	white (-)
3	pAS2-1/apoptin	pGAD10/5	blue (+)
4	pAS2-1/apoptinT1	pGAD10/5	blue (+)
5	pAS2-1/apoptinT2	pGAD10/5	white (-)
6	pAS2-1/apoptinT3	pGAD10/5	white (-)

4 讨 论

ABP280 (acting binding protein) 是我们用酵母双杂交系统从人白细胞 cDNA 文库中筛选到的与 apoptin 相互作用的蛋白质, 我们筛选到的是 ABP280 的片段, 鉴于其 280 ku 的分子质量及未能得到其抗体, 我们直接将其片段与 apoptin 免疫共沉淀并得到了证实, 即二者在哺乳动物细胞水平也有相互作用. 相互作用位点实验表明, apoptin 的核外运信号 NES (33~46 位氨基酸) 对于这种相互作用是必需的, 而 C 端的核定位信号与二者的相互作用不是充分必要的. 有理由推测 apoptin 的核外运信号 NES (33~46 位氨基酸) 对于其功能有重要意义. ABP280 的功能是启动 actin 的多聚化, 连接细胞膜组分至细胞骨架^[6]. 而 apoptin 与 ABP280 的相互作用有何功能意义呢? 已有的研究和我们的分析认为可能有以下两种情形:

a. 可能与 apoptin 的亚细胞定位有关. 物质出入细胞核的通路是核膜上的核孔复合物 (nuclear pore complex, NPC), 离子及小分子 (分子质量小于 45 ku) 可自由通过, 而大于 45 ku 的分子如大多数蛋白质则必须有特定的核定位信号 (nuclear localization signal, NLS)^[7]. 此外, 大分子的出核则需要核外运信号 (nuclear export signal, NES). 对于蛋白质在细胞质和细胞核的聚集而言, 核内滞留和胞浆滞留与核运输同样重要, 特别是 apoptin 既有核定位信号又有核外运信号, 分子质量又比较小, 其能否在核内/胞浆内滞留更为重要. ABP280 作为 actin 结合蛋白结合在细胞骨架上, apoptin 与 ABP280 的结合可能使其滞留在胞浆中, 或由于二者的结合使 apoptin 的 NLS 被遮蔽产生空间位阻, 无法与 NLS 受体结合而不能有效运至细胞核. 类似的例子如 p53, 非活性状态的 p53 由于直接或间接与细胞骨架 actin 结合聚集在胞浆中, 而只有当其能够进入细胞核才能发挥活性^[8]. 而肿瘤细胞的细胞骨架及骨架蛋白异常, 这在肿瘤恶变和维持

肿瘤中起重要作用, 如黑色素瘤细胞中 ABP280 缺失, 或许就是这种异常破坏了 apoptin 蛋白在细胞质中的滞留。

b. 与细胞凋亡可能有关。在细胞凋亡的执行阶段细胞核和核外胞浆出现明显的形态学变化, 核外胞浆的形态变化有细胞间黏附降低, 细胞膜内陷皱折形成泡状结构以及最后核小体的形成, 均需要细胞骨架的参与完成。凋亡早期 actin 多聚化, 晚期 actin 去多聚化, 是凋亡过程必需的^[9]。而 ABP280 主要功能就是启动 actin 多聚化, 是否 ABP280 与 apoptin 的结合与细胞凋亡特别是核外胞浆的凋亡形态的形成有关。当然, apoptin 与全长 ABP280 确切的相互作用及功能意义还需要更多的实验来验证。本文的实验结果与分析为这些研究提供了进一步的实验依据和启示。

参 考 文 献

1 Danen van Oorschot A A, Fischer D F, Grimbergen J M, *et al.*

- Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (11): 5843~ 5847
- 2 Rosenberger J K, Cloud S S. Chicken anemia virus. *Poult Sci*, 1998, **77** (8): 1190~ 1192
- 3 Noteborn M H, Todd D, Verschueren C A, *et al.* A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *J Virol*, 1994, **68** (1): 346~ 351
- 4 Ausubel F, Brent R, Kingston E, *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*. 3rd. New York: John Wiley and Sons Inc, 1996. 19. 1. 1~ 19. 3. 28
- 5 Kaiser P, Auer B. Rapid shuttle plasmid preparation from yeast cells by transfer to *E. coli*. *Biotechniques*, 1993, **14** (4): 552
- 6 Hartwig J H, Kwiatkowski D J. Actin-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 1991, **3** (1): 87~ 97
- 7 Gorlich D. Nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, **9** (3): 412~ 419
- 8 Rubtsova S N, Kondratov R V, Kopnin P B, *et al.* Disruption of actin microfilaments by cytochalasin D leads to activation of p53. *FEBS Lett*, 1998, **430** (3): 353~ 357
- 9 Van Engeland M, Kuijpers H J, Ramaekers F C, *et al.* Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. *Exp Cell Res*, 1997, **235** (2): 421~ 430

Screening of Protein Interacting with Apoptin by Yeast Two-hybrid from Human Leucocyte cDNA Library^{*}

SUN Guo-Jing, TONG Xin, MENG Xiang-Bing, DONG Yan, SUN Zhi-Xian^{**}

(*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*)

Abstract Using yeast two-hybrid system to screen the protein interacting with apoptin from human leucocyte cDNA library, four clones interacting with apoptin were identified. One of them was homologue with ABP280 (actin-binding protein), ABP280 is a dimeric actin crossing protein and plays a key role in stabilizing the membrane cytoskeleton. Cell co-immunoprecipitation showed that apoptin could bind to ABP280 in mammalian cells. Apoptin mutants T1, T2 and T3 lack the C-terminal 11 amino acid, 33~ 46 amino acid and both respectively. Apoptin mutants T2 and T3 failed to interact with ABP280, which revealed that its 33~ 46 amino acid was pivotal for the interaction. Apoptin mutant T1 still interacted with ABP280, which revealed that its C-terminal 11 amino acid was not essential for the interaction.

Key words apoptin, yeast two-hybridization, ABP280, co-immunoprecipitation

^{*} This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China (39800178).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-10-66931218, E-mail: sunzx@nic.bmi.ac.cn

Received: November 13, 2000 Accepted: December 12, 2000