

干扰素诱导蛋白 P56 与糖皮质激素受体的相互作用及其转录活性的影响*

李淑蓉 粟永萍** 刘晓宏 楼淑芬 程天民

(第三军医大学全军复合伤研究所, 重庆 400038)

摘要 糖皮质激素受体 (GR) 在严重创伤早期及全身性炎症反应中具有重要作用, 为寻找与 GR 相互作用的新的蛋白质, 以期调节 GR 的功能活性, 应用酵母双杂交技术, 以糖皮质激素受体配体结合区 (GR-LBD) 为诱饵蛋白, 在人骨髓 cDNA 文库中筛选到 42 个阳性克隆. 测序结果表明, 其中一个克隆为干扰素诱导蛋白 P56 的大部分编码序列 (221 ~ 1 642 bp, 编码第 53 位至第 478 位氨基酸). 利用酵母双杂交实验再次验证 P56 与 GR 具有结合作用. 并用 PCR 方法从酵母质粒中扩增出 P56 片段, 进行 GST-P56 原核融合蛋白表达与纯化, 及真核表达与免疫共沉淀. 蛋白质结合实验表明, P56 与 GR-LBD 在体内外有结合作用. CAT 报告基因检测表明 P56 抑制 GR 的转录激活能力.

关键词 糖皮质激素受体, 干扰素诱导蛋白 P56, 酵母双杂交系统, 转录活性

学科分类号 Q5, R33

糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 与糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 形成复合物产生效应是机体内部最重要的抗炎机制. 本实验室前期的研究工作已经证明严重烧伤早期多种器官组织 GR 减少、GR 表观结合容量降低, 尤其是 GR 核转位减少, 提示 GR 的转录激活能力减弱, 同时参与全身性炎症反应的细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的浓度显著升高, GR 减少与高细胞因子血症之间互为因果关系, 呈级联放大效应, GR 减少是体内抗炎机制减弱的主要原因^[1-3]. 但 GR 活性减弱的分子机制尚不清楚, 如能揭示其变化的分子机制, 根据变化特点调节 GR 的功能状态, 可望减轻或防止过度炎症反应和继发性全身损害的发生. 为此, 我们以人糖皮质激素受体配体结合区 GR-LBD (GR-ligand binding domain) 为诱饵, 采用酵母双杂交方法^[4-6]从人骨髓 cDNA 文库筛选到干扰素诱导蛋白 P56 (interferon induced protein P56)^[7], 提示 P56 与 GR 之间可能存在相互作用, 并与 GR 的功能活性相关. 本文克隆了 P56 cDNA 片段, 利用酵母双杂交和体内外蛋白质结合实验, 进一步验证 P56 与 GR 的相互作用及 P56 对 GR 介导的转录活性的影响, 为后续的功能研究奠定基础.

1 材料与与方法

1.1 材料

酵母双杂交系统 (yeast two-hybrid system 3) 及人骨髓 cDNA 文库购自 Clontech 公司. pGEX-4T-1

载体、GST 融合蛋白表达纯化系统 (Bulk and Redpack GST Purification Modules, MicroSpin GST Purification Module)、Anti-GST 抗体购自 Amersham Pharmacia 公司. 细胞转染试剂、CAT-ELISA 试剂盒购自 Roche 公司. Anti-myc 和 Anti-HA antibody 购自 Stratagene 公司. IPTG, Aprotinin 及 PMSF 购自 Sigma 公司, M-PER mammalian protein extraction reagent 购自 PIERCE 公司. pCMV-Myc 和 pCMV-HA 载体由周度金教授赠送.

pMAM-CAT 由 Renoir 博士惠赠, pCMV-hGR α 由 Oakley 博士赠送. 大肠杆菌 DH5 α 、BL21 为本室保存菌种. COS7 细胞为本校周虹博士惠赠.

1.2 方法

1.2.1 酵母双杂交系统及人骨髓 cDNA 文库的筛选: 根据 GenBank GR-LBD 序列设计引物, 以人胎肝 cDNA 文库为模板, PCR 扩增 GR-LBD (893 bp) 片段, 与 pGEM[®]-T Vector Systems 连接测序. 以酶切位点 *Sma*I 和 *Sal*I 插入 pGBKT7, 构建与 Gal4-BD 融合表达载体 pGBKT7-GR LBD. 采用醋酸锂法, pGBKT7-GR LBD 转化酵母感受态 AH109, 在 SD/-Trp 选择培养基上生长良好, AH109 [pGBKT7-GR LBD] 转化成功但并未自主

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G1999054201).

** 通讯联系人.

Tel: 023-68752009, E-mail: suyiping@yahoo.com

收稿日期: 2004-02-17, 接受日期: 2004-05-28

激活报告基因, 作为酵母双杂交系统中的“诱饵”。挑取新鲜的 AH109 [pGBKT7-GR LBD] 克隆于 50 ml SD/-Trp, 30°C 过夜, 离心收集细胞, 浓度大于 1×10^9 个/ml, 与 1 ml (文库滴度大于 5×10^7) 构建于 pACT2 载体上的人骨髓 cDNA 文库 DNA 于 2 L 烧瓶中混合, 加 45 ml $2 \times$ YPDA/kan, 30°C 过夜低速振荡 (30 ~ 50 r/min), 收集杂交液并铺于 50 个 150 mm 的 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 选择培养板上 (培养基中加 50 μ mol/L 地塞米松 Dex 或不加两种情况)。另取少量杂交液稀释后涂布于 SD/-Leu、SD/-Trp 和 SD/-Leu/-Trp 培养板, 用以计算筛选的克隆数和共转化效率。30°C 培养 8 ~ 21 天。挑取直径 ≥ 2 mm 的菌落再在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -gal (加 Dex) 选择培养基上进行第二次筛选, X- α -gal 检测 α -半乳糖苷酶 (α -gal) 活性, 即 MEL 基因表达, 显示蓝斑者为阳性克隆。

1.2.2 酵母质粒的抽提与再扩增及核酸序列分析: 用酚、氯仿、异戊醇和溶菌酶提取阳性克隆质粒, 根据文库质粒 pACT2 多克隆位点两侧序列设计引物为 5' CTATTCgATgAAGATACCCCACCAAACCC 3', 5' gTgAACTTgCggggTTTTTCAGTATCTACgAT 3', PCR 扩增插入片段。电泳回收插入片段并装入 pGEM[®]-T Vector, 送大连宝生物公司测序。测序结果提交 GenBank 数据库进行同源性比较。同时阳性克隆质粒电转化入大肠杆菌 DH5 α , 铺于 Amp⁺ LB 培养板, 筛选仅含文库质粒的转化菌。

1.2.3 质粒构建: 把 PCR 扩增的 P56 cDNA (1.3 kb) 以酶切位点 *EcoR* I 和 *Xho* I 插入 pACT2, 形成 pACT2-P56, 与 pGBKT7-GR LBD 用于酵母双杂交。把 GR LBDcDNA (893 bp) 以上游引物 5' CTCgAgTggAATgAACCTggAAgCTCgAA 3' (*Xho* I) 和下游引物 5' gCggCCgCACTTTTgATgAAACAgAAgTT 3' (*Not* I), 从胎肝 cDNA 文库中 PCR 扩增 GR LBD, 以酶切位点 *Xho* I 和 *Not* I 插入 pCMV-Myc 载体, 形成 pCMV-Myc-GR LBD, 用于真核表达。用 P56 上游引物 5' ggATCCggAA-TACACAACCTACTAg 3' (*Bam*H I) 和下游引物 5' CTCgAgCTgggTgCCTAAggACCTT (*Xho* I) PCR 扩增 P56 cDNA 片段, 克隆到 pGEX-4T-1, 形成 pGEX-4T-1-P56, 用于原核表达。将该片段以 *EcoR* I 和 *Xho* I 插入 pCMV-HA 载体, 形成 pCMV-HA-P56, 用于真核表达。

1.2.4 酵母双杂交检测 (蛋白质相互作用): pGBKT7-GR LBD 和 pACT2-P56 共转化酵母菌

AH109, 长出的菌落转入相互作用培养基 SD/-Leu-Trp-His (加和不加 Dex 两种情况), 同时以试剂盒中所带菌株作阴性和阳性对照, ONPG 法检测 β -gal 活性。

1.2.5 GST-P56 融合蛋白表达及纯化: 把 pGEX-4T-1-P56 转化表达菌株 BL21, 用 0.1 mmol/L IPTG 诱导 7.5 h, 收集菌体, 超声破碎, 收集包涵体。用 8 mol/L 尿素溶解包涵体 (GST-P56 融合蛋白), 再用 PBS 透析复性。把经复性的 GST-P56 融合蛋白上样 Bulk and Redpack GST Purification 纯化柱, 洗去未结合的杂蛋白, 再用还原性的谷胱甘肽从柱上切下 GST-P56 融合蛋白。把切下的 GST-P56 融合蛋白用 PBS 透析, 去除还原性的谷胱甘肽。对照表达的 GST 是可溶性蛋白, 存在于菌体超声上清中, 超声上清直接上柱纯化。

1.2.6 体外蛋白质结合实验: 用 2 μ g pCMV-Myc-GR LBD 质粒与 5 μ l Dospers 转染 COS7 细胞, 48 h 后用 M-PER 蛋白裂解液裂解细胞, 离心收集细胞总蛋白质。在 50 μ l glutathione-Sepharose 4B 中加入 100 μ g GST-P56 或 GST, 洗去未结合的蛋白质, 再向柱中加入 1 mg 转染的 pCMV-Myc-GR LBD COS7 细胞总蛋白质, 洗去未结合的杂蛋白质, 用还原性的谷胱甘肽从柱上洗下 GST-P56/Myc-GR LBD 复合物。洗下的复合物同时做 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和蛋白质免疫印迹。

1.2.7 免疫共沉淀: 用 4 μ g pCMV-Myc-GR LBD 质粒、4 μ g pCMV-HA-P56 质粒或 pCMV-HA 与 8 μ l Dospers 共转染 COS7 细胞, 48 h 后用 M-PER 蛋白裂解液裂解细胞, 4°C 离心收集细胞总蛋白质。免疫共沉淀按 Roche 试剂盒操作。

1.2.8 蛋白质免疫印迹: 蛋白质样品经过 SDS-PAGE 之后, 电转印到 PVDF 膜上, 封闭过夜, 一抗和二抗分别以 1:1 000 稀释, DAB 显色 (硫酸镍铵增强显色)。

1.2.9 CAT 活性检测: pCMV-HA-P56、pCMV-GR α 和含 GRE 的 pMAM-CAT 质粒与 8 μ l Dospers 共转染 COS7 细胞。pCMV-HA-P56 设不同浓度梯度, 共转染总 DNA 量一致。48 h 后用 ELISA 试剂盒收集细胞总蛋白质, 检测 CAT 活性。

2 结 果

2.1 GR LBD 分子克隆及人骨髓 cDNA 文库筛选
PCR 扩增 GR-LBD (893 bp) 片段, 与 pGEM[®]-T Vector Systems 连接, *Sma*I 和 *Sal*I 双

酶切, 酶切片段插入 pGBKT7 中, 酶切鉴定片段大小正确. 用 T7 启动子引物测序, 结果表明序列完全正确, 融合区域的读码框正确. pGBKT7-GR LBD 转化感受态 AH109, 在 SD/-Trp 板上生长良好, 证明 GR-LBD 基因表达产物对酵母无毒性, 而不能在 SD/-His-Trp 板上生长, 说明 AH109 [pGBKT7-GR LBD] 未自主激活报告基因.

用 GR-LBD 作为诱饵蛋白筛选人骨髓 cDNA 文库, 分两次进行, 第一次在所有培养基中加入 Dex, 第二次不加. 根据转染效率计算, 共约有 1×10^6 个共转染入 2 种质粒的克隆被筛选. 两次筛选到 65 个 His、Ade 阳性克隆, 再经 α -gal 检测获得 45 个强阳性克隆, 即为 His、Ade、Mel3 个阳性克隆. 经提取质粒、PCR 扩增文库插入片段, 共获得 42 个含 pACT2 的克隆. 测序结果表明, 25 种蛋白质为 GR-LBD 相互作用候选蛋白, 其中之一为干扰素诱导蛋白 P56 cDNA 的大部分编码序列 (221 ~ 1 642 bp, 编码第 53 位至 C 端第 478 位氨基酸), 序列与 GenBank 号 NM_001548.1 完全同源. 至此, 我们利用酵母双杂交系统从人骨髓 cDNA 文库中筛选到能与 GR-LBD 有结合作用的蛋白 P56, 其开放阅读框 (ORF) 为 425 个氨基酸.

2.2 GR-LBD 与 P56 在酵母中的相互作用

pACT2-P56 质粒与 pGBKT7-GR LBD 共转化酵母菌 AH109, 在 SD/-Leu-Trp-His 培养基上生长, 加 Dex 后 β -gal 活性单位为 8.3, 不加 Dex 时 β -gal 活性单位为 6.2, 检测结果再一次表明, 加 Dex 和不加 Dex 时 GR-LBD 与 P56 都有结合作用, 但不加 Dex 时结合力较弱.

2.3 GST-P56 融合蛋白的表达与纯化

把经 IPTG 诱导表达的菌体裂解, pGEX-4T-1-P56 在大肠杆菌 BL21 中表达 GST-P56 融合蛋白 (图 1), SDS-PAGE 表明, IPTG 诱导 BL21 阳性克隆表达 GST-P56, 其分子质量约 71 ku (与蛋白质免疫印迹结果一致), 除去 GST 分子质量 (29 ku), P56 分子质量约为 42 ku (从第 53 位至 C 端第 478 位氨基酸), 与预计值基本一致 (42 ku). 表达的 GST-P56 以包涵体形式存在, GST 存在于超声上清中. 包涵体经裂解复性后上 2 ml glutathione-Sepharose 4B 纯化柱纯化, 存在于超声上清中的 GST 直接上柱纯化. 用抗 GST 抗体进行蛋白质免疫印迹检测, 结果说明 GST 或 GST-P56 的表达 (图 2).

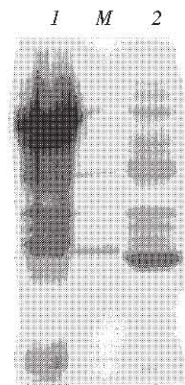


Fig. 1 The expression of GST and GST-P56 protein in BL21, SDS-PAGE analysis and Coomassie brilliant blue stain

1: GST-P56 fusion protein (71 ku); 2: GST protein (29 ku); M: Mid-range protein molecular mass marker.

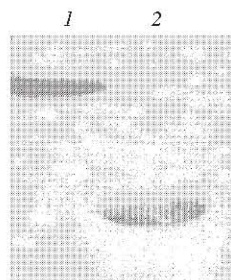


Fig. 2 The expression of GST and GST-P56 protein by anti-GST antibody assay

1: GST-P56 fusion protein; 2: GST protein.

2.4 体外蛋白质相互作用证明

为了进一步确证 GR-LBD 与 P56 蛋白在体外有结合作用, 采用蛋白质结合实验. pCMV-Myc-GR LBD COS7 细胞蛋白分别与 GST 和 GST-P56 经过 glutathione-Sepharose 4B, 洗下复合物 GST-P56/Myc-GR LBD, Myc 抗体检测表明 GST-P56 结合 GR-LBD. 由于 GST 与 Myc-GR-LBD 没有结合作用, 因而表明 P56 与 GR-LBD 之间有结合作用 (图 3).

2.5 在哺乳动物细胞中的相互作用

为了验证哺乳动物细胞中 GR LBD 与 P56 是否具有相互作用, 用 pCMV-Myc-GR LBD 质粒与 pCMV-HA-P56 质粒共转染 COS7 细胞, 以转染 pCMV-HA 细胞作阴性对照, 用共转染而未经免疫沉淀的细胞作阳性对照. 细胞裂解后, 用抗 myc 抗体免疫沉淀 GR LBD 蛋白, 用抗 HA 抗体进行免疫印迹, 结果表明 GR LBD 可在哺乳动物细胞内与

P56 结合 (图 4).

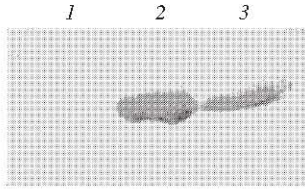


Fig. 3 The interaction between GR LBD and P56 by anti-myc antibody assay *in vitro*

1: Myc-GR-LBD + GST; 2: Myc-GR-LBD; 3: Myc-GR-LBD + GST-P56.

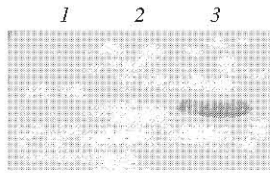


Fig. 4 The interaction between GR LBD and P56 in COS7 cell

1: The cell extract of pCMV-HA transfected (immunoprecipitation of myc-tagged protein, anti-HA antibody assay); 2: The cell extract of pCMV-Myc-GR LBD and pCMV-HA-P56 co-transfected (immunoprecipitation of myc-tagged protein, anti-HA antibody assay); 3: The cell extract of pCMV-Myc-GR LBD and pCMV-HA-P56 co-transfected (anti-HA antibody assay).

2.6 P56 对 GR 介导转录活性的影响

为了研究 P56 对 GR 转录激活能力的影响, 以 pCMV-HA- P56、pCMV-GR α 和含 GRE 的 pMAM-CAT 质粒共转染 COS7 细胞, 当转染 pCMV-HA-P56 质粒的量逐渐增加时 (0、2、4、8、12 μg), CAT 相对活性逐渐降低, 当增加到 12 μg 时, CAT 相对活性从约 2.0 降低到 0.5, 表明 P56 抑制 GR 介导的转录活性, 随着 P56 量的增加, 抑制作用更明显 (图 5).

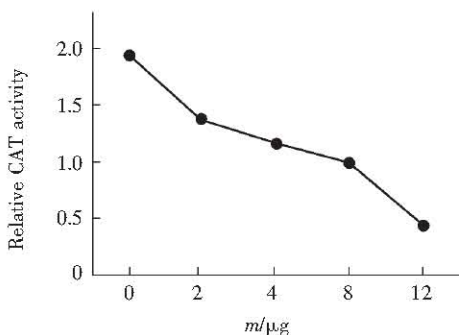


Fig. 5 Effect of P56 on relative GR-CAT activity

3 讨 论

本研究以 GR-LBD 为诱饵, 用酵母双杂交技术在 4 种营养缺陷培养基上, 从人骨髓 cDNA 文库中筛选到强相互作用的阳性克隆, 经蓝白斑筛选含 MEL 基因的阳性克隆, PCR 扩增含文库质粒的阳性克隆, 再测序表明, 其中之一为干扰素诱导蛋白 P56.

干扰素作为重要的细胞因子, 是一类能发挥抗病毒、抗肿瘤、调节免疫功能的蛋白质. 干扰素的多种作用是由干扰素诱导合成的多种蛋白质介导的. 大多数干扰素诱导蛋白尚不知其特殊的生化和细胞功能. P56 是人体细胞经干扰素 (IFN) 处理后诱导的最为丰富的蛋白质^[7,8]. P56 属于 IFN 诱导蛋白家族, 人类 P54、P58 和 P60 结构上与 P56 相关. 已有研究认为 P56 为胞浆蛋白. 20 世纪 80 年代初, 几位研究者分别观察到用干扰素处理人、小鼠和鸡细胞后, 强烈诱导 56 ku 蛋白表达, 说明 56 ku 蛋白可能经 IFN 产生后发挥某些关键作用. Wathélet 等^[7]克隆了全长 56 ku 蛋白的 mRNA 并测定其序列. Guo 等研究表明 IFN 处理后快速诱导 P56mRNA 而且 mRNA 水平非常高. 由于 IFN 处理细胞 P56 急剧升高, 由此推测其有重要功能, 但通过检测蛋白质的一级结构未得到任何功能线索. 因此, 2000 年, Guo 等^[9]以 P56 蛋白为诱饵, 通过酵母双杂交技术筛选到 Int-6/P48, 翻译起始因子 eIF-3 的 P48 亚单位与 Int6 相同, P56 通过与 eIF-3 相互作用, 引起特异的和剂量依赖的翻译抑制. P56 存在时, 体内外的蛋白质合成被抑制, 因此揭示了哺乳动物细胞中一条新的翻译调节通路.

我们通过 Internet SWISS-PROT 对 P56 蛋白进行分析, P56 蛋白含 10 个重复结构 (TPRs), TPRs 从第 52 至 470 位氨基酸, 每一个重复至少含 34 个氨基酸. 这种 TPRs 模体介导蛋白质-蛋白质相互作用, 从这种分析推测 P56 可能与其他蛋白质相互作用, 我们用酵母双杂交从 cDNA 文库中筛选到的 P56 残基为第 53 至 478 位氨基酸, 包括了 P56 的所有重复结构, 从理论上讲具有与其他蛋白质结合的结构基础. Guo 等^[9]分析了 P56 与 Int6 结合的结构域, 认为 P56 蛋白 C 端的 3 个 TPRs 模体是与 Int6 的结合部位.

干扰素诱导蛋白 P56 与 GR 的相互作用尚未见报道, 更不知其功能意义. 我们首次用酵母双杂交技术, 以 GR-LBD 为诱饵, 从人骨髓 cDNA 文库筛

选到干扰素诱导蛋白 P56。以酵母双杂交技术、GST 沉淀实验和免疫共沉淀验证了 GR 与 P56 在体内发生相互作用, 并可以配体非依赖方式与 GR 结合。P56 抑制 GR 介导的转录活性。这些结果提示 P56 蛋白对 GR 核转录有调节作用。结合有关文献报道, 严重烫伤或烧伤早期 IFN 的浓度显著升高, 血清中 IL-1、IL-6 和 TNF- α 等炎症细胞因子浓度显著升高, 同时 GR 功能减弱。我们分析 IFN 升高可能诱导 P56 蛋白表达增多, 增多的 P56 与 GR 结合, 导致转录活性降低, GR 的抗炎能力减弱, 使机体处于高细胞因子状态, 过度炎症反应发生。因此推测 GR 与 P56 相互作用与 GR 调节的抗炎机制相关。

致谢 本实验得到军事医学科学院二所张成岗博士的大力协助和指导, 在此表示衷心的感谢!

参 考 文 献

1 Liu D H, Su Y P, Cheng T M, *et al.* Changes in glucocorticoid and mineralocorticoid receptors of liver and kidney cytosols after pathological stress and its regulations in rats. *Critical Care Medicine*, 2002, **30** (3): 546 ~ 548

- 2 刘都户, 栗永萍, 程天民, 等. 烫伤大鼠肝组织糖皮质激素受体的变化及 α -MSH、合成肽 KPV 的调节作用. *第三军医大学学报*, 2001, **23** (5): 550 ~ 552
Liu D H, Su Y P, Cheng T M, *et al.* *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2001, **23** (5): 550 ~ 552
- 3 王军平, 赵景宏, 栗永萍. 糖皮质激素受体调控与创伤应激紊乱关系的研究进展. *中华创伤杂志*, 2001, **17** (8): 508 ~ 510
Wang J P, Zhao J H, Su Y P. *China J Trauma*, 2001, **17** (8): 508 ~ 510
- 4 Fields S, Song O K. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 1989, **340** (20): 245 ~ 246
- 5 Lee J W, Lee Y C, Na S Y, *et al.* Transcriptional coregulators of the nuclear receptor superfamily: coactivators and corepressors. *Cell Mol Life Sci*, 2001, **58** (2): 289 ~ 297
- 6 Jenkins B D, Pullen C B, Darimont B D. Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. *Trends Endocrinol Metab*, 2001, **12** (3): 122 ~ 126
- 7 Wathélet M, Moutschen S, Defilippi P, *et al.* Molecular cloning, full-length sequence and preliminary characterization of a 56-kDa protein induced by human interferons. *Eur J Biochem*, 1986, **155** (1): 11 ~ 17
- 8 Lafage M, Claus I, Couez D, *et al.* The interferon- and virus-inducible IFI-56K and IFI-54K genes are located on human chromosome 10 at bands q23-q24. *Genomics*, 1992, **13** (2): 458 ~ 460
- 9 Guo J, Hui D J, Merrick W C, *et al.* A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3. *EMBO J*, 2000, **19** (24): 6891 ~ 6899

The Interferon-inducible Protein P56 Interaction With Glucocorticoid Receptor and Regulates GR Transcriptional Activity*

LI Shu-Rong, SU Yong-Ping**, LIU Xiao-Hong, LOU Shu-Fen, CHENG Tian-Min

(*Institute of Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China*)

Abstract A glucocorticoid receptor (GR) interacting protein, interferon-inducible protein P56, was isolated from the human bone marrow cDNA library by two-hybrid screening in yeast using the GR ligand-binding domain (GR-LBD) as bait. The interaction between GR and P56 and the effect of P56 on GR were investigated. PCR was performed to amplify GR-LBD fragments and it was cloned into the bait vector pGBKT7 to create the plasmid pGBKT7-GR LBD. The plasmid was used as bait to screen a cDNA library constructed in the pACT2 vector. The positive colonies were sequenced. P56 and GR-LBD cDNA fragments were cloned respectively into the vector pGEX-4T-2, pACT2, pCMV-Myc, pCMV-HA for GST pull down, yeast two-hybrid, coimmunoprecipitation analysis and CAT activity assay. 42 positive clones were obtained by yeast two-hybrid, in which one isolated cDNA from the library encoded the COOH-terminal portion of the interferon inducible protein P56 (221 ~ 1 642 bp, residues 53 ~ 478 amino acids) as shown by DNA sequencing. Yeast two-hybrid, GST pull down and CO-IP assays verified that P56 interacted with GR-LBD. Expression of P56 resulted in dose-dependent decrease in GR-CAT expression when GR α , GRE-driven reporter genes were cotransfected with P56. Thus, the study demonstrates that P56 interacts with GR-LBD *in vitro* and *in vivo*, P56 inhibites the GR-mediated transcriptional activity.

Key words glucocorticoid receptor, yeast two hybrid, interferon-inducible protein P56, transcriptional activity

* This work was supported by a grant from The Special Funds for Major State Basic Research of China (G1999054201).

** Corresponding author. Tel: 86-23-68752009, E-mail: suyiping@yahoo.com