

叶花相关蛋白结构域对其转录辅激活及细胞核定位的影响*

袁 灿 李晓荣 顾丹丹 古 月 高英杰 崔素娟**

(河北省分子细胞生物学重点实验室, 河北师范大学生命科学院, 石家庄 050024)

摘要 染色质相关蛋白在真核生物 DNA 复制、基因转录调控等过程中起着非常重要的作用。前期报道拟南芥叶花相关蛋白(leaf and flower related, LFR)蛋白定位于细胞核中, 其缺失突变体在叶、花发育及育性等方面存在着许多表型, 但 LFR 蛋白的自身特征尚有待进一步探究。酵母单杂交实验表明, 酵母转录因子 GAL4 的 DNA 结合域与全长 LFR 的融合蛋白(GBD-LFR)具有转录辅激活活性, LFR 的 C 端至少有 2 个玃狢蛋白(ARM)重复结构域及完整 N 端对于其转录辅激活活性是必需的。但在野生型拟南芥原生质体中, 与典型的转录激活因子相比, GBD-LFR 的转录辅激活活性并不明显。缺失或突变 LFR 与黄色荧光蛋白(YFP)的原生质体亚细胞定位的荧光显微观察表明, N 端的 1~25 位氨基酸, 特别是其中第 22 位的赖氨酸和第 4、23 以及 25 位精氨酸影响其核定位。利用激光共聚焦显微镜观察共表达黄色或青色荧光(CFP)融合蛋白的细胞核内分布, 结果表明 LFR 与染色质结构蛋白组蛋白 H4 及染色质结合蛋白 HMGA 有一定的核内共定位。这些结果表明 LFR 可能作为一个染色质相关的蛋白质, 在拟南芥的生长发育中发挥重要作用。

关键词 拟南芥, LFR, 结构域, 转录辅激活, 核定位

学科分类号 Q291

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00048

在真核生物中, 基因组 DNA 缠绕组蛋白八聚体最终形成染色质^[1], 染色质这种高度紧密的结构使细胞核基因的一些活动, 如转录、复制等的进行受到抑制。除染色质的结构蛋白, 染色质结合蛋白在基因的转录调控、DNA 复制、修复以及重组等方面也起着非常重要的作用, 例如组蛋白修饰酶、染色质重塑复合体等对基因转录调节起着非常重要的辅助激活或抑制作用^[2-6], 转录辅激活或抑制蛋白间往往通过蛋白质-蛋白质互作结构域形成较大的复合体发挥其转录调控作用。文献中已经报道了许多在蛋白质互作中发挥作用的保守蛋白结构域, 如由 42 个氨基酸组成的 3 个 α 螺旋结构的玃狢蛋白(ARM)重复域(Armadillo repeat domain)^[7-8]。

ARM 重复结构域最早是在果蝇胚发育中由调控节极性基因 ARMadillo 编码的 β - 联蛋白(β -catenin)中发现的, ARM 重复蛋白是广泛存在于真核生物中的一大类蛋白质, 研究表明, 这些蛋白质参与了细胞内的众多生物过程, 包括核输入、转录调节、生物体组织器官的生长发育等等^[9-14]。

拟南芥叶花相关蛋白(leaf and flower related, LFR)是我们实验室前期报道的具有推测的 ARM 重复结构域的核蛋白, 遗传工作表明 LFR 基因是一个参与叶、花发育及育性调控过程的新功能基因^[14-15], 但是它发挥作用的分子机制尚有待研究。本文分析了 LFR 蛋白的转录辅激活活性、在其核定位中发挥作用的關鍵氨基酸及与其共定位的核蛋白, 这有利于进一步阐明 LFR 生物学作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)生态型 Columbia-0 (Col-0)种子为本实验室所保存的植物材料; 质粒

* 国家自然科学基金资助项目(31171170, 30871421), 河北省自然科学基金杰出青年项目(C2009001516)部分资助。

** 通讯联系人。

Tel: 0311-86269144, E-mail: cuisujuan@mail.hebtu.edu.cn

收稿日期: 2012-01-31, 接受日期: 2012-03-19

pGBKT7, pCAMBIA1300 35S::YFP, pAVA32135S::YFP/CFP 为本实验室保存; 35S::GAL4DB, 5×GAL4BS-TATA::LUC 和 35S::Renilla LUC 由日本尖端科技国立学会基因研究中心的 Masaru Ohme-Takagi 教授惠赠; 实验中所用到的 T4 DNA 连接酶及限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; 制备原生质体时所用的两种酶 cellulase R10 和 macerozyme R10 购自 Yakult Honsha 公司; PEG4000 购自 Fluka 公司; 质粒大量提取纯化试剂盒购自威格拉斯生物技术有限公司; 双荧光素酶报告试剂盒购自美国 Promega 公司.

1.2 载体构建

1.2.1 酵母 pGBKT7 融合诱饵载体构建. LFR 系列缺失体包括 LFR Δ C1、LFR Δ C2、LFR Δ C3、LFR Δ C4、LFR、ARM1、ARM2、ARM3、ARM1-2、ARM2-3 和 ARM1-3. 构建过程如下, 首先以 LFR 全长 cDNA 为模板, 以表 1 显示的上游引物 FP(带有 *EcoR* I 的酶切位点), 和下游引物 RP(带有 *Sal* I 的酶切位点), 通过 PCR 扩增出大小正确的片段, 片段回收后用 *EcoR* I 和 *Sal* I 进行酶切, 然后插入到 pGBKT7 载体相应的多克隆位点.

1.2.2 拟南芥原生质体转录活性系统载体构建. 将 LFR 及系列缺失体包括 LFR Δ C1、LFR Δ C3、LFR Δ C4 通过酶切连接亚克隆到效应载体 35S::GAL4DB 上, 得到 35S::GBD-LFR 及 35S::GBD-LFR Δ C1/C3/C4.

1.2.3 LFR 的定点突变. LFR 系列定点突变构建方法参照 Takara Site-directed mutagenesis 试剂手册, 首先将 LFR 的全长 cDNA 克隆到 T-Vector 上; 然后设计一对用以导入变异点的 5'端邻接和 3'端方向相反的引物(表 1), PCR 扩增, PCR 片段的末端平滑化及 5'端磷酸化反应, 自身连接, 质粒 DNA 转化, 测序, 挑选定点突变的基因.

1.2.4 植物细胞瞬时表达载体构建. 将 LFR 系列缺失体 LFR Δ C1、LFR Δ C3、LFR Δ C4 和 LFR Δ N1 以及 LFR 及 LFR 的定点突变体分别构建到载体 pAVA321 35S::YFP 上, 其构建过程如下: 首先通过 PCR 扩增出大小正确的 DNA 片段, 其上游引物带有 *Spe* I 的酶切位点, 下游引物带有 *Nco* I 的酶切位点(表 1), 片段回收后用 *Spe* I 和 *Nco* I 进行酶切, 然后插入载体 pAVA321 35S::YFP 相应的多克隆位点.

Table 1 Primers used in this paper

Construction name	The sequence of forward primer (FP) and reverse primer (RP) (5'-3')
pGBKT7 GBD-LFR	FP: CGGAATTCATGCAGAAACGGGAGCTTG; RP: ACGCGTCGACTTACATGCCCCAGATTCCTCTAG
pGBKT7 GBD-LFR Δ C1	FP:CGGAATTCATGCAGAAACGGGAGCTTG; RP: ACGCGTCGACTCAGGCTAGAGCATCATACTCATTGC
pGBKT7 GBD-LFR Δ C2	FP: CGGAATTCATGCAGAAACGGGAGCTTG; RP: ACGCGTCGACTCAAGCAGACAAATTCGAAGC
pGBKT7 GBD-LFR Δ C3	FP: CGGAATTCATGCAGAAACGGGAGCTTG; RP: ACGCGTCGACTCAGAGATTGTAGAGTGCTCCAAC
pGBKT7 GBD-LFR Δ C4	FP: CGGAATTCATGCAGAAACGGGAGCTTG; RP: ACGCGTCGACTCATTGAGGCTCCGAGACAAGG
pGBKT7 GBD-LFR Δ N1	FP:CCGGAATTCATGCCCTTCGGTAGTACAAGTGC;RP: ACGCGTCGACTTACATGCCCCAGATTCCTCTAG
pAVA321 35S::LFR-YFP	FP: GGACTAGTATGCAGAAACGGGAGCTTG; RP: CATGCCATGGCCATGCCCCAGATTCCTCTAG
pAVA321 35S::LFR Δ C1-YFP	FP: GGACTAGTATGCAGAAACGGGAGCTTG; RP: CATGCCATGGCGGCTAGAGCATCATACTCATTGC
pAVA321 35S::LFR Δ C3-YFP	FP: GGACTAGTATGCAGAAACGGGAGCTTG; RP: CATGCCATGGCGAGATTGTAGAGTGCTCCAAC
pAVA321 35S::LFR Δ C4-YFP	FP: GGACTAGTATGCAGAAACGGGAGCTTG; RP: CATGCCATGGCTTGAGGCTCCGAGACAAGG
pAVA321 35S::LFR Δ N1-YFP	FP: GGACTAGTATGCCCTTCGGTAGTACAAGTGC; RP: CATGCCATGGCCATGCCCCAGATTCCTCTAG
pAVA321 35S::K3T-YFP	FP: GAAATCCGGCGGTAATTCC; RP: CCAAGCTCCCGTGTCTGCAT
pAVA321 35S::K8T-YFP	FP: GACATCCGGCGGTAATTCC; RP: CCAAGCTCCCGTTTCTGC
pAVA321 35S::K22T-YFP	FP: GCGACGAGAGGCCGTC; RP: TGGTGGACCCGAAGATCC
pAVA321 35S::R4Q-YFP	FP: GGAAATCCGGCGGTAATT; RP: CAAGCTCCTGTTTCTGCAT
pAVA321 35S::R23T-YFP	FP: CAGCGAAGACAGGCCGTC; RP: GTGGACCCGAAGATCCACC
pAVA321 35S::R25P-YFP	FP: CAGCGAAGAGAGGCCCTC; RP: GTGGACCCGAAGATCCACC
pAVA321 35S::H4-CFP	FP: GGACTAGTATGTCTGGTCTGGAAAGG; RP: GGACTAGTACCGCCGAATCCGTAGAGAGTCC
pAVA321 35S::Fibrillarin-CFP	FP: GACTAGTATGAGACCTCCTCTAACTGG; RP: GACTAGTATGAGACCTCCTCTAACTGG
pAVA321 35S::SC35-CFP	FP: GACTAGTATGAGGGGAAGGAGCTACAC; RP: GACTAGTATGAGGGGAAGGAGCTACAC
pAVA321 35S::HMGA-CFP	FP: GACTAGTATGGAGACTACCGGAGAAGTTG; RP: GACTAGTATGGAGACTACCGGAGAAGTTG

将组蛋白 H4、AT-hook-HMGA、SC35 和 Fibrillarin 的 ORF 序列分别构建到质粒 pAVA321 35S::CFP 中, 使其与 CFP 正确融合, 构建过程如下: 首先通过 PCR 扩增出大小正确的片段, 引物见表 1, 片段回收后酶切, 然后将其分别插入到载体 pAVA321 35S::CFP 相应的多克隆位点。

上述所有构建载体均经过 DNA 测序, 以确定融合阅读框及编码氨基酸序列的正确。

1.3 酵母转化、缺陷培养基生长及 β -半乳糖苷酶活性的定量测定

酵母感受态细胞的制备以及转化过程主要参考 Clontech 的 Yeast Protocols Handbook. 将构建好的 pGBKT7 融合诱饵载体分别转化酵母菌种 Y190, 涂布于缺失色氨酸的 SD 培养基(SD/-Trp)上筛选转化阳性克隆, 30℃ 培养. 待长出克隆后, 挑选单克隆 4~8 个分别涂于加入 45 mmol/L 3-AT(3-amino-1, 2, 4-triazole)的缺失色氨酸和组氨酸的 SD 培养基(SD/-Trp/-His)上, 仍然在 30℃ 培养, 看其是否继续生长. 参考 Clontech 的 Yeast Protocols Handbook, 用邻硝基苯酚 β -半乳糖苷(ONPG)进行 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)活性的定量测定。

1.4 拟南芥原生质体制备及 PEG 介导转化

拟南芥叶肉细胞原生质体制备和转化的具体实验流程主要根据 Jan Sheen 实验室的操作规程 (<http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/>). 取 3~4 周龄未抽苔的短日照 8 h 光/16 h 暗条件下培养的拟南芥莲座叶片作为实验材料, 把叶片切成 0.5 mm 宽窄条状, 浸没到酶解液(1.5% cellulase R10, 0.2%~0.4% macerozyme R10, 0.4 mol/L 甘露醇(mannitol), 20 mmol/L KCl, 20 mmol/L MES, pH 5.7, 55℃ 加热 10 min 后, 再加入 10 mmol/L CaCl₂, 5 mmol/L β -巯基乙醇, 0.1% BSA)中. 暗中放置 3 h, 然后用 200 目筛网过滤, 滤过液置于离心管中 100 g 缓慢离心 2 min, 去上清, 用预冷的 W5(154 mmol/L NaCl, 125 mmol/L CaCl₂, 5 mmol/L KCl, 2 mmol/L MES, pH 5.7)溶液清洗, 再次缓慢离心去上清, 然后用预冷的 W5 重悬原生质体, 在冰上放置 30 min, 再次离心得到制备好的原生质体, 用适量的 MMg(0.4 mol/L 甘露醇, 15 mmol/L MgCl₂, 4 mmol/L MES, pH 5.7)溶液重悬。

原生质体的转化采用 PEG-CaCl₂ 方法转染质粒. 取 10 μ l 质粒(大约 10~20 μ g)加入到 100 μ l 原生质体 MMg 悬液中, 再加入 110 μ l PEG-CaCl₂ (4 g PEG4000, 3 ml H₂O, 2.5 ml 0.8 mol/L 甘露醇,

1 ml 1 mol/L CaCl₂)溶液, 轻轻吹吸混匀, 转化 20 min. 转化后加入 440 μ l W5 溶液混匀后 100 g 缓慢离心 3 min, 去上清后加入 1 ml W5 溶液过夜培养。

1.5 原生质体中转录活性检测

按 Ohta 等及 Hiratsu 等方法^[16-18], 按照 1:1:6 摩尔比把效应载体(effector) 35S::GAL4DB/GBD 或 35S::GBD-LFR/-LFR Δ , 报告基因载体(reporter) 5 $\times$ GAL4BS-TATA::LUC, 以及内参 35S::Renilla LUC 这 3 种质粒混合, 通过 PEG 介导将其共转化制备好的拟南芥原生质体. 转化后的原生质体经过夜培养后, 先 100 g 缓慢离心 3 min, 收集沉淀的原生质体, 采用双荧光素酶报告试剂盒中提供的细胞裂解液裂解 15 min 后, 10 000 g 离心 5 min, 取上清测定荧光素酶活性. 按照双荧光素酶报告试剂盒的操作规程, 首先检测报告基因 LUC 的相对发光单位 RLU(relative light unit), 以报告基因细胞裂解液为空白对照, 然后检测内参基因 Renilla LUC 的 RLU. 所用检测仪器为 GlomaxT20/20 (Promega 公司, 美国), 测定间隔 2 s, 测定时间 10 s. 将 LUC 的 RLU 除以 Renilla LUC 的 RLU, 根据比值比较不同样品间对报告基因的激活程度。

1.6 基因枪洋葱表皮瞬时表达

参照实验室前期建立方法^[14], 将构建到 pAVA32135S::YFP 或 pAVA32135S::CFP 载体上的相关质粒用金粉包被, 然后用这些包被的质粒轰击洋葱表皮细胞, 采用 PDS-1000/He System(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)基因枪和 1 100 psi 压力可裂膜. 将转化材料 22℃ 光照培养 18~22 h, 进行荧光显微观察。

1.7 荧光显微观察

在激光扫描共聚焦显微镜(LSM 710 Mega, Zeiss)下进行荧光观察. 对于 YFP 荧光, 激发光为 514 nm, 采用的是 BP 520~555 nm 过滤的 YFP 通道; 对于 CFP 荧光, 激发光为 458 nm, 采用的是 BP 465~510 nm 过滤的 CFP 通道. 数码显微照片采用 Adobe photoshop 进行整理。

2 结 果

2.1 酵母中 GBD-LFR 具有转录激活活性

酵母转录因子 GAL4 包括 DNA 结合域(GBD)和转录激活域(GAD), 酵母双杂交 GAL4 系统中, 诱饵载体 pGBKT7 仅含有 GBD, 猎物载体 pGADT7 仅含有 GAD. 在酵母单杂交系统中, 仅

诱饵载体 pGBKT7 单转化酵母 Y190, 报告基因 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)不能被转录激活. 但融合诱饵载体 pGBKT7 GBD-LFR/LFR 系列缺失体分别转化酵母 Y190, SD/-Trp/-His 缺陷培养生长筛选及 ONPG 显色法 β -半乳糖苷酶活性定量分析转化酵母(图 1). 由于酵母菌种 Y190 本身具有较强的组氨酸泄露, 加入 45 mmol/L 的 3-AT 可完全抑制其本底泄露. 缺陷培养基生长实验结果表明, 只有含有 GBD-LFR/LFR Δ C3/LFR Δ C4 的酵母克隆可

以在 SD/-Trp/-His + 45 mmol/L 3-AT 培养基上生长, 并且其 β -半乳糖苷酶活性与空对照(GBD)相比明显增高, 而其他的 LFR 缺失体, 包括不包含 ARM-repeat 结构域的 LFR Δ C1(1~160)、仅包含一个 ARM-repeat 结构域的 LFR Δ C2(1~310)和单独的 ARM 重复结构域, 与空对照(GBD)相似, 不能激活 β -半乳糖苷酶的活性, 这表明 LFR 的 C 端至少 2 个 ARM-repeat 结构域及 N 端的同时存在对酵母中 GBD-LFR 转录激活活性有贡献.

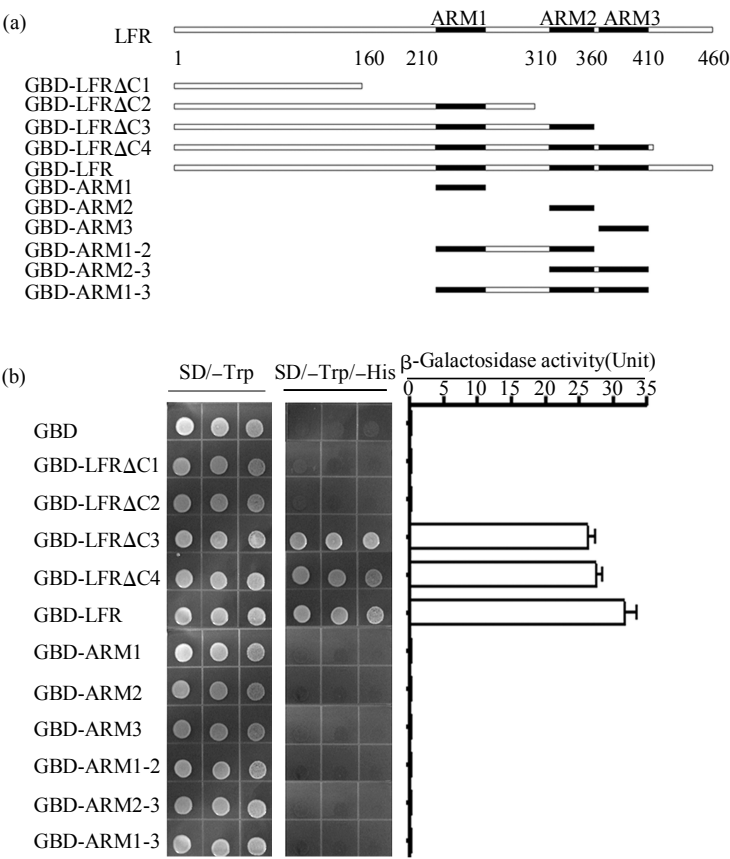


Fig. 1 Transactivation activity of full length and truncated LFR in yeast

(a) Constructs used in the transactivation analysis. The regions shown below the LFR diagram were inserted into the expression vector pGBKT7 (GBD) to express the GBD fusion proteins in yeast. Number below the LFR diagram meant the length of different domain of LFR. (b) Transactivation activity of different domains of LFR in yeast strain Y190. Expression vectors (GBD only or GBD with different domains of LFR) were introduced into yeast Y190 on SD medium lacking tryptophan (SD/-Trp) or SD medium lacking tryptophan and histidine (SD/-Trp/-His) containing 45 mmol/L 3-AT. The growth condition and β -galactosidase activity of the transformed yeast cells were measured as described in the Clontech Yeast Protocols Handbook. β -Galactosidase units = $1\,000 \times A_{420} / (t \times V \times A_{600})$; t = elapsed time (in min) of incubation; V = 0.1 ml $\times 5$ (concentration factor); A_{600} = A_{600} of 1 ml of culture. The values are the average of results from three independent experiments. Standard errors are indicated above the bar graphs.

2.2 拟南芥原生质体中 GBD-LFR 转录激活活性不明显

为了进一步检测 GBD-LFR 在植物细胞内是否

具有转录激活活性, 我们利用拟南芥原生质体系统做进一步的分析. 我们分别把 35 S 启动子驱动的 GBD-LFR/LFR Δ C1/ LFR Δ C3/ LFR Δ C4 效应载体

(effector)*35S::GBD-LFR/LFRΔ*, 5 次重复的 GAL4 DNA 结合序列融合 TATA mini 启动子驱动的萤火虫荧光素酶(firefly luciferase 或 luciferase, LUC)报告基因载体(reporter)*5×GAL4BS-TATA::LUC* 以及 35 S 启动子驱动的 Renilla LUC 内参(internal control)

control)共同转化拟南芥原生质体(图 2). 以 GBD 作为系统阴性对照, 强转录激活因子 VP16 作为阳性对照, 实验结果表明, GBD-LFR 或其缺失体在野生型拟南芥原生质体中没有检测到明显的转录激活活性.

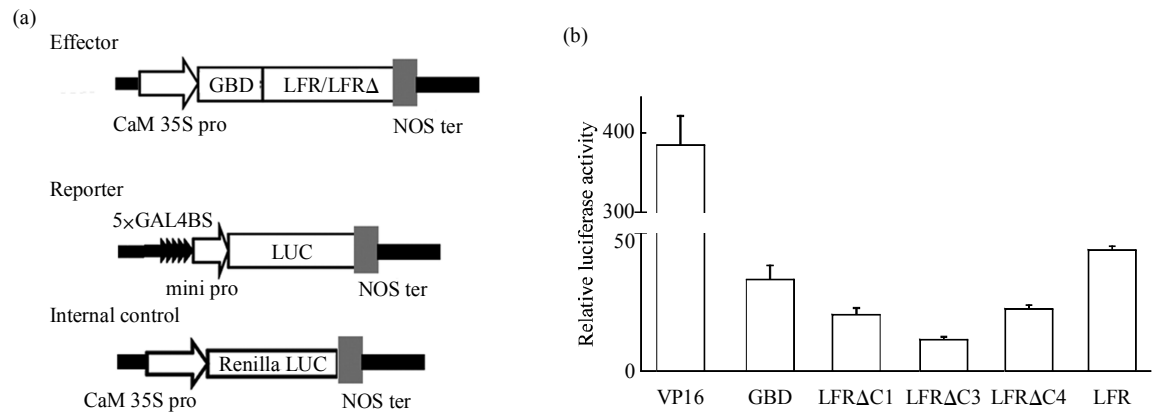


Fig. 2 Transactivation activity of LFR in *Arabidopsis* protoplasts
(a) Constructs used in the transactivation analysis. LFR or truncated LFR was respectively fused with GAL4 DNA-binding domain (GAL4DB) in effector with Cauliflower mosaic virus 35S promoter (CaM 35S pro) and nopaline synthase terminator (NOS ter). The Reporter contained five repeated GAL4 binding sites (5×GAL4BS), TATA box mini promoter (mini pro) and luciferase reporter (LUC) and NOS ter. Renilla LUC driven by 35S promoter as internal control. (b) Relative luciferase activities of full or truncated LFR fused with GAL4DB (GBD) in co-transformed *Arabidopsis* protoplasts. VP16 was used as the positive control. The values are the average of results from three independent experiments. Standard errors are indicated above the bar graphs.

2.3 LFR 的 N 端第 1~25 位氨基酸影响其核定位
融合荧光蛋白显微观察及免疫印迹分析表明, 全长 LFR 是一个核定位蛋白^[14, 19], 但常用核定位信号软件预测不到其具有典型的核定位信号序列, 为了寻找可能影响 LFR 核定位的氨基酸, 我们在拟南芥原生质中重组表达了 LFR 不同缺失体与黄色荧光蛋白 YFP 的融合蛋白, 激光共聚焦扫描显微镜下观察其核分布变化(图 3). 结果表明, 在所观

察到的 LFRΔC1, LFRΔC3, LFRΔC4, 以及 LFR 至少 10 个转化细胞中, 仅仅在细胞核中存在明显的荧光分布, 在细胞的其他部位没有观察到明显的荧光分布; 缺失 N 端 25 个氨基酸的 LFRΔN1 除了在细胞核有荧光分布外, 在细胞的其他部位也有明显的分布, 表明 LFR 的 N 端第 1~25 位氨基酸与 LFR 的核定位相关.

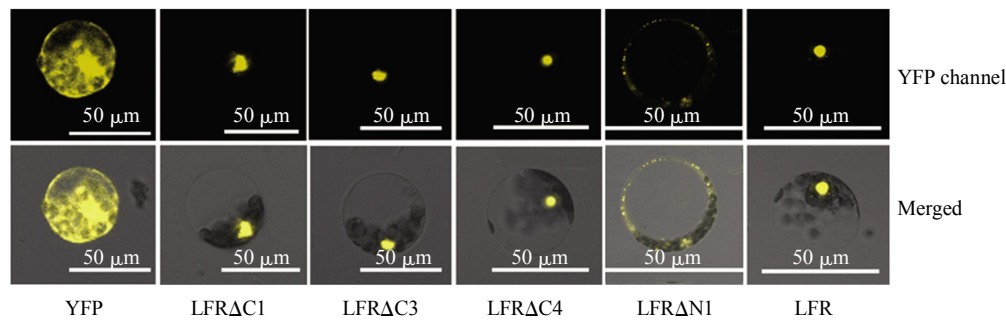


Fig. 3 Subcellular localization of truncated LFR fused with YFP in *Arabidopsis* protoplasts
Full length or truncated LFRs fused with YFP were transformed into and transiently expressed in *Arabidopsis* protoplasts. Representative images under YFP channel and merged images of YFP and light are shown.

为进一步确定哪个或哪些保守的氨基酸在 LFR 的核定位中发挥重要作用, 我们构建并借助原生质体重组表达了 LFR 的 N 端 1~25 位氨基酸的一系列定点突变体与 YFP 的融合蛋白, 并且通过荧光显微观察了融合荧光蛋白的核定位分布变化(图 4). 我们主要是对其中的碱性氨基酸进行了定点突变(图 4a), 荧光显微观察表明, 将 22 位的赖氨酸突变为苏氨酸(K22T), 或 4 位、或 23 位、或 25 位的

精氨酸分别突变为谷氨酰胺、苏氨酸、脯氨酸(R4Q 或 R23T 或 R25P)时, 荧光分布是在细胞核特异出现, 在细胞的其他部位也可以观察到明显的荧光分布, 而且观察到这种荧光分布的细胞数目每种均在 10 个以上. 但将 3 位或 8 位的赖氨酸突变为苏氨酸(K3T 或 K8T)时, 只在细胞核部位观察到荧光分布. 这表明第 4, 22~23 和 25 位的碱性氨基酸在 LFR 的核定位中发挥重要作用.

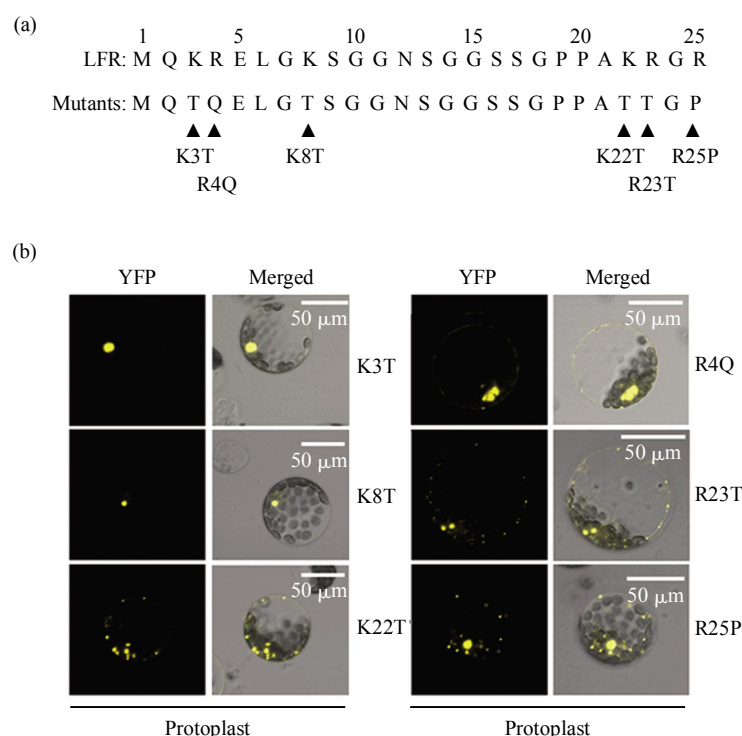


Fig. 4 Subcellular localization of site-mutants of LFR in *Arabidopsis* protoplast

(a) 1~25 amino acid sequence of the N-terminal region of LFR. Mutations introduced into the amino acid were indicated by arrowheads including: K3T, R4Q, K8T, K22T, R23T and R25P. (b) Transient expression in *Arabidopsis* protoplasts of different variants in the N-terminal region of LFR including: K3T, K8T, K22T, R4Q, R23T and R25P. Representative images under YFP channel (YFP) and merged images of YFP and light (Merged) are shown.

2.4 LFR 与染色质结构蛋白或结合蛋白在细胞核的分布存在着共定位

为了进一步研究核蛋白 LFR 与已知核蛋白间的分布关系, 我们分别选取了一些已知的核蛋白, 包括真核生物染色质中的组蛋白 4(histone4, H4)、优先与染色质中富含 AT 区域结合的高迁移率蛋白 (high mobility group AT-hook, HMGA)、含有 RRM 结构域的 SR 可变剪切复合体蛋白中的剪切因子 (splicing factor 35, SC35) 以及真核生物中一类保守的、参与核糖体 RNA 甲基化的核仁纤维蛋白

(fibrillarin)^[20-23], 将它们的开放阅读框分别与 CFP 基因融合构建到载体 pAVA321 35S::CFP 中, 并分别与 pAVA21 35S::LFR-YFP 瞬时共转化洋葱表皮细胞, 荧光显微观察共表达细胞中 CFP 与 YFP 荧光的核分布(图 5). 结果表明, LFR 与染色质结构蛋白 H4 存在较多的共分布, 与染色质结合蛋白 HMGA 也存在一定的共分布, 而与剪切因子 SR45 及核仁纤维蛋白 fibrillarin 没有明显的共分布, 这表明 LFR 可能是一个染色质相关的核蛋白.

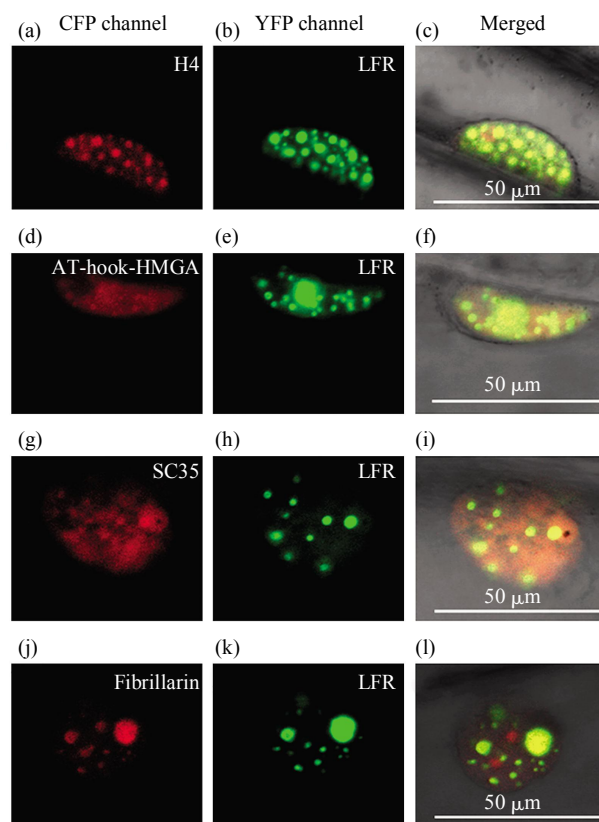


Fig. 5 Co-localization of LFR and histone H4 in onion epidermal cells

LFR::YFP co-transformed in onion epidermal cells with histone H4::CFP (a, b, c), with AT-rich chromatin marker AT-hook-HMGA::CFP (d, e, f), with spliceosome marker SC35::CFP (g, h, i), with nucleolus marker Fibrillarin::CFP (j, k, l). (a-l) Confocal microscopy; (a, d, g, j) CFP channel; (b, e, h, k) YFP channel; (c, f, i, l) Merged image.

3 讨 论

生物信息学分析表明, 模式植物拟南芥基因组中存在 108 个 ARM 重复蛋白, 但见于文献报道的却屈指可数. 分析预测 LFR 的 C 端存在着 3 个 ARM 重复域^[14]. ARM 重复域存在于很多真核生物蛋白质中^[13], ARM 重复域通过组装成独特的超螺旋结构, 为蛋白质之间的相互作用提供特异的结构域^[8]. 除了 ARM 重复域, 比对分析表明 LFR 没有预测的其他已知功能结构域. 在酵母体系中, N 端完整并保留所有 3 个或只缺失 C 端 1 个 ARM 重复域的 LFR 缺失体与 GAL4 的 DNA 结合域 GBD 的融合蛋白, 具有激活 GAL4 启动的报告基因的转录激活活性(图 1), 这表明 ARM 重复域及其数量对

于 LFR 的转录活性是必需的, 在 C 端至少有 2 个 ARM 重复域的存在, 融合 GBD 的 LFR 在酵母系统中才能发挥其激活活性, 但是如果没有 N 端存在, 仅仅具有 C 端的 ARM 重复域, 它仍然没有转录激活活性, 这暗示着 LFR 的 N 端和至少 2 个 ARM 重复域的存在对其酵母中的转录激活活性有贡献, 所以推测 LFR 蛋白可能通过 ARM 重复域与其他蛋白组成复合体共同发挥作用, 或者 LFR 中存在其他未知的蛋白质结构域, 而这些未知的结构域, 例如存在于 LFR N 端的结构域, 对于其功能的发挥也起着至关重要的作用. 另外, 我们有待发表的 LFR 蛋白系列缺失体转化 *lfr-2* 突变体的恢复实验也表明, 在 LFR 的 N 端和至少 2 个 ARM 重复域的存在对其在拟南芥中生物学功能的正常发挥着重要作用.

我们在前期^[14]及本文工作(图 5)瞬时表达 LFR-YFP 的植物间期细胞核中常常可以观察到荧光呈散点状分布, 它暗示着 LFR 可能参与到转录、剪接、核仁等重要蛋白质复合体中来发挥其功能^[24]. 为了进一步了解其具体的定位模式, 我们分别选取了一些已知的在细胞核内呈点状分布的复合体蛋白质组分, 来观察它们与 LFR 的共定位情况, 包括真核生物染色质结构蛋白 H4 和结合蛋白 HMGA. 荧光蛋白共定位观察表明, H4 和 HMGA 与 LFR 存在着一定的共定位分布(图 5), 这意味着 LFR 可能是一类与染色质相关的蛋白质, 暗示着它可能通过参与到染色质相关的复合体中来发挥其功能. 同时, 融合蛋白 GBD-LFR 在酵母中具有明显的自激活 GAL4 转录因子启动的 β -半乳糖苷酶报告基因的表达(图 1b), 但融合蛋白 GAD-LFR 没有转录自激活活性(本实验室待发表的工作), 这说明 LFR 可能仅仅具有转录激活或辅激活特性, 而没有与 GAL4 启动子序列结合的 DNA 结合特性, 表明 LFR 可能不是一个典型的具有 DNA 结合域和激活域的转录因子, 而可能是作为一个转录辅因子与转录因子形成复合体来发挥基因表达调控作用的. 例如文献报道作为转录辅激活抑制子的染色质重塑复合体、组蛋白乙酰化酶及去乙酰化酶、蛋白激酶以及甲基化酶等等^[25-26], 这些蛋白质对基因的调节转录也起着非常重要的作用, 由于它们没有特异的 DNA 结合域, 所以它们也不属于典型的转录因子. 关于野生型拟南芥原生质体中 GBD-LFR 全长的转录激活活性并不明显(图 2), 我们的解释是在野生型原生质体中存在足够的正常 LFR 蛋白,

GBD-LFR 可能不具有在酵母中那样可以竞争利用其他转录相关的组分进而启动下游报告基因表达的能力, 因此显现不出转录激活活性. 拟南芥 *LFR* 的功能缺失突变体表现叶、花以及育性等多个方面的缺陷, 但是超表达 *LFR* 的拟南芥植株与野生型相比没有明显的发育表型变化^[14-15], 这也可作为原生质体中 GBD-LFR 没有酵母中那样的转录激活活性的解释. 另外, 我们尚未发表的差异表达谱芯片数据表明, *lfr* 功能缺失突变体幼苗中大约有 5% 的基因被上调或下调. LFR 直接互作蛋白及 LFR 蛋白复合体的生化实验表明, LFR 与染色质重塑复合体的多个组分间存在直接互作, 可能作为与染色质结合的重塑复合体的组分, 通过对叶、花及花药等发育基因的转录辅激活或辅抑制的调控活性, 进而参与拟南芥的生长发育过程.

致谢 感谢中国科学院遗传发育生物学研究所陈受宜和张劲松研究员在拟南芥原生质体转录活性检测实验中的帮助.

参 考 文 献

- [1] Tremethick D J. Higher-order structures of chromatin: The elusive 30 nm fiber. *Cell*, 2007, **128**(4): 651-654
- [2] Wang G G, Allis C D, Chi P. Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends Mol Med*, 2007, **13**(9): 363-372
- [3] Taverna S D, Li H, Ruthenburg A J, *et al.* How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, **14**(10): 1025-1040
- [4] Wang G G, Allis C D, Chi P. Chromatin remodeling and cancer, Part II: ATP-dependent chromatin remodeling. *Trends Mol Med*, 2007, **13**(9): 373-380
- [5] Bateman A, Birney E, Durbin R, *et al.* Pfam 3.1: 1313 multiple alignments and profile HMMs match the majority of proteins. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27**(1): 260-262
- [6] Washburn K B, Davis E A, Ackerman S. Coactivators and TAFs of transcription activation in wheat. *Plant Mol Biol*, 1997, **35**(6): 1037-1043
- [7] Samuel M A, Salt J N, Shiu S H, *et al.* Multifunctional arm repeat domains in plants. *Int Rev Cytol*, 2006, **253**(10): 1-26
- [8] Groves M R, Barford D. Topological characteristics of helical repeat proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 1999, **9**(3): 383-389
- [9] Gorlich D. Nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, **9**(3): 412-419
- [10] Gorlich D, Henklein P, Laskey R A, *et al.* A 41 amino acid motif in importin- α confers binding to importin- β and hence transit into the nucleus. *EMBO J*, 1996, **15**(8): 1810-1817
- [11] Hatzfeld M. The armadillo family of structural proteins. *Int Rev Cytol*, 1999, **186**(10): 179-224
- [12] Peifer M, Berg S, Reynolds A B. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell*, 1994, **76**(5): 789-791
- [13] Riggelman B, Wieschaus E, Schedl P. Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene. *Genes Dev*, 1989, **3**(1): 96-113
- [14] Wang Z, Yuan T, Yuan C, *et al.* LFR, which encodes a novel nuclear-localized Armadillo-repeat protein, affects multiple developmental processes in the aerial organs in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2009, **69**(1-2): 121-131
- [15] Wang X T, Yuan C, Yuan T T, *et al.* The *Arabidopsis* LFR gene is required for the formation of anther cell layers and normal expression of key regulatory genes. *Molecular Plant* 2012, **5**(5): 993-1000
- [16] Ohta M, Ohme-Takagi M, Shinshi H. Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions. *Plant J*, 2000, **22**(1): 29-38
- [17] Hiratsu K, Ohta M, Matsui K, *et al.* The SUPERMAN protein is an active repressor whose carboxy-terminal repression domain is required for the development of normal flowers. *FEBS Lett*, 2002, **514**(2-3): 351-354
- [18] Taoka K, Yanagimoto Y, Daimon Y, *et al.* The NAC domain mediates functional specificity of CUP-SHAPED COTYLEDON proteins. *Plant J*, 2004, **40**(4): 462-473
- [19] 高宁, 王志娟, 曾博. 拟南芥 LFR 原核重组蛋白纯化和多克隆抗体制备. *生物化学与生物物理进展*, 200, **35**(9): 1059-1064
- [19] Gao N, Wang Z J, Zeng B, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 200, **35**(9): 1059-1064
- [20] Yu L C, Szabo P, Borun T W, *et al.* The localization of the genes coding for histone H4 in human chromosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1978, **42**(10): 1101-1105
- [21] Cattaruzzi G, Altamura S, Tessari M A, *et al.* The second AT-hook of the architectural transcription factor HMGA2 is determinant for nuclear localization and function. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**(6): 1751-1760
- [22] Sureau A, Gattoni R, Dooghe Y, *et al.* SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs. *EMBO J*, 2001, **20**(10): 1785-1796
- [23] Barneche F, Steinmetz F, Echeverria M. Fibrillarin genes encode both a conserved nucleolar protein and a novel small nucleolar RNA involved in ribosomal RNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 2000, **275**(35): 27212-27220
- [24] Matera A G. Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol*, 1999, **9**(9): 302-309
- [25] Bateman A, Birney E, Durbin R, *et al.* Pfam 3.1: 1313 multiple alignments and profile HMMs match the majority of proteins. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27**(1): 260-262
- [26] Washburn K B, Davis E A, Ackerman S. Coactivators and TAFs of transcription activation in wheat. *Plant Mol Biol*, 1997, **35**(10): 1037-1043

The Effect of *Arabidopsis* LFR Protein Domain on Its Co-transactivation and Subcellular Localization in Nucleus*

YUAN Can, LI Xiao-Rong, GU Dan-Dan, GU Yue, GAO Ying-Jie, CUI Su-Juan**

(Hebei Key Laboratory of Molecular and Cellular Biology, College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China)

Abstract The chromatin-associated proteins play important roles in regulating DNA duplication, gene transcription expression *etc.* in eukaryotic system. Previously, *Arabidopsis* LFR (leaf and flower related) protein localized in nucleus, and its loss-of-function mutants were reported to have pleiotropic phenotypes in leaf, flower and anther development, but the molecular characteristics of LFR protein should be detected further. Firstly, the fusion protein of GAL4 DNA-binding domain (GBD) with full-length of LFR had transactivation activity in yeast Y190 by yeast one-hybrid assay, and at least 2 ARM-repeat domains in the C terminal and full N terminal of LFR were necessary to its transactivation activity. Next, we further analyzed GBD-LFR transactivation activity in *Arabidopsis* protoplast system, it showed that the transactivation of full-length LFR was not obvious compared with that of a classical transcription activity domain of VP16. In protoplast transient expression system, fluorescence microscopy was used to observed subcellular localization of YFP fusion proteins of truncated or site-mutation LFR, and the data showed that the N terminal 1~25 amino acids of LFR, particular lysine 22 and arginine 4, 23, 25, was responsible for its nuclear localization. In transient co-expressing onion epidermal cell, LFR obviously co-localized with chromatin structure protein, histone H4, and chromatin-binding protein, HMGA, in nucleus. All these data suggested that LFR might be as one of chromatin-associated proteins to function in *Arabidopsis* development.

Key word *Arabidopsis*, LFR, domains, transactivation activity, nuclear localization

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00048

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(31171170, 30871421) and Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars in Hebei Province(C2009001516).

**Corresponding author.

Tel: 86-311-86269144, E-mail: cuisujuan@mai.hebtu.edu.cn

Received: January 31, 2012 Accepted: March 19, 2012