

神经病靶标酯酶调控结构域结合蛋白筛选及其在 COS-7 细胞中的表达*

陈瑞^{1,2} 杨琳^{1,2} 姚智¹ 刘承云^{1,2} 李晓华^{1,2} 李琴^{1,2}
刘杰¹ 常平安^{1,2} 李薇¹ 伍一军^{1**}

1. 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100080

2. 中国科学院研究生院, 北京 100039

摘要 本研究采用酵母双杂交系统探寻与神经病靶标酯酶(NTE)调控结构域相互作用的蛋白因子, 揭示与NTE信号转导相关的可能机制。通过构建含有NTE调控结构域的诱饵蛋白载体筛选胎脑文库, 并将筛选得到的阳性克隆在酵母中进行了验证, 随后在哺乳动物细胞中表达了该蛋白。生物信息学分析显示: 该阳性克隆为前列腺素受体结合蛋白54(ARA54), 具有泛素连接酶活性, 提示细胞可能存在依赖于细胞周期的NTE活性调节机制, 为阐明NTE生理功能创造了条件[动物学报 51(5): 840-844, 2005]。

关键词 神经病靶标酯酶 酵母双杂交系统 泛素 ARA54

Hunting for novel proteins in neuropathy target esterase regulatory domain with yeast two-hybrid system*

CHEN Rui^{1,2}, YANG Lin^{1,2}, YAO Zhi¹, LIU Cheng-Yun^{1,2}, LI Xiao-Hua^{1,2}, LI Qin^{1,2}, LIU Jie¹, CHANG Ping-An^{1,2}, LI Wei^{1,2}, WU Yi-Jun^{1**}

1. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract To explore protein factors that may interact with regulatory domain of neuropathy target esterase (NTE) in signal transduction pathways, the bait plasmid of NTE-regulatory domain cDNA was constructed and screened in human fetal brain cDNA library by the method of yeast two-hybrid. The candidate positive clones were retested in yeast, and its expression was verified in mammalian cells. The results of bioinformatics showed that androgen receptor-associated protein 54 (ARA54), a ubiquitin protein ligase, may be an essential controller of the NTE in the process of cell cycle. This result will put great opportunity for understanding the physiological mechanism of the NTE [Acta Zoologica Sinica 51(5): 840-844, 2005].

Key words Neuropathy target esterase, Yeast two-hybrid system, Ubiquitin, ARA54

神经病靶标酯酶(Neuropathy target esterase, NTE)是在研究有机磷引起的迟发性神经毒性(Organophosphate-induced delayed neurotoxicity, OPIDN)过程中发现的, 它一般被认为是有机磷引发人和敏感动物中毒后出现该病症的主要靶标。

OPIDN的主要特征是其毒性发生时有1-3周的潜伏期, 症状表现为运动失调、下肢麻痹甚至瘫痪, 组织病理学可见脊髓和外周神经(如坐骨神经)的轴突髓鞘变性、脱落(Johnson, 1974; Glynn, 2000)。

2005-03-16 收稿, 2005-06-06 接受

* 国家自然科学基金项目(No.30140005, No.3470228)、中国科学院知识创新工程重要方向性项目(No.KSCX2-SW-128)和国家863项目(No.2002AA601160)资助 [This research was funded by the grants from the NSFC Project (No.30140005, No.30470228), CAS Innovation Program (No.KSCX2-SW-128), and the National 863 Program of China (No.2002AA601160)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: wuyj@ioz.ac.cn

© 2005 动物学报 Acta Zoologica Sinica

NTE 是一个由 1 327 个氨基酸组成的单链蛋白质, 分子量约为 146 kD, 其活性中心的氨基酸为 Ser⁹⁶⁶、Asp⁹⁶⁰, Asp¹⁰⁸⁶, 有机磷通过磷酸化 Ser⁹⁶⁶羟基而抑制 NTE 活性, 磷酸化的 NTE 会进一步发生“老化”反应, 而“老化”可能是产生 OPIDN 的必要条件 (Atkins and Glynn, 2000)。NTE 蛋白含有明显的调控结构域和酯酶活性区域 (Lush et al., 1998)。尽管在 NTE 调控结构域存在着 3 个 cAMP 的结合位点, 但却未见有其活性可以受 cAMP 调控的相关报道 (Dremier et al., 2003)。NTE 的调控序列在各物种间的进化上比较保守, 它可能在维持 NTE 活性或保持蛋白自身的稳定性上起着重要的作用。本室前期研究发现, 过表达 NTE 可以导致细胞 G1/S 期阻滞并产生细胞死亡 (Chang et al., 待发表资料), 而基因敲除小鼠则产生胚胎早期死亡 (Akassoglou et al., 2004; Moser et al., 2004)。现有的资料提示, NTE 可能与维持正常机体细胞膜结构稳态平衡有关 (Quistad et al., 2003; Zaccheo et al., 2004), 但其实际功能并不清楚。研究 NTE 调控区在分子水平的相互作用蛋白将有助于阐明它在机体内的生理功能。

本研究以 NTE 调控结构域为诱饵, 构建去掉跨膜区 (Transmembrane helix, Tm) 的诱饵质粒 pGBKT7- Δ Tm-NTE-R, 应用酵母双杂交技术筛选与其结合的蛋白因子, 在哺乳动物细胞中进行表达检测, 为从细胞和整体水平上研究 NTE 的正常生理功能提供更多的切入点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

酵母菌株 AH109、Human Fetal brain cDNA library、MatchMaker Gal4Two-hybrid system3、Anti-Myc 抗体、 α -gal、YPD、SD 及各种缺陷型培养基为 Clontech 公司产品; 含有 NTE 基因的 D16 质粒由 P. Glynn 博士惠赠 (英国莱斯特大学毒理学实验室); COS-7 由王雁玲博士惠赠 (中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室); 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶购自大连宝生物工程公司; pGEM-T easy 载体为 Promega 公司产品; pCMV-cMyc 表达质粒由王健博士惠赠 (军事医学科学院放射医学研究所); DMEM、Lipofectamine 2000、ECL 发光试剂盒为 Invitrogen Life 公司产品; 文中非特别说明的生化试剂均购自 Sigma 公司。

1.2 酵母双杂交诱饵质粒的构建及自激活的检测

以 D16 质粒为模板, 扩增含有调控结构域的 NTE 片段 (121-2 178 bp), 上游引物: 5'-TCA-GAATCCCCAGCCCCGGATGGCCCC, 下游引物: 5'-TTGGATCCTTCCGAGTGT-GGGGGCAC, 为方便克隆, 分别添加 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切位点, 所扩 PCR 产物插入 pGEMT-easy 载体, 测序验证正确后, 双酶切并回收相应片段, 插入 pG-BKT7 载体的相应位点。将构建好的诱饵质粒 pG-BKT7- Δ Tm-NTE-R 单独转化制备的新鲜感受态酵母细胞 AH109, 观察其在 SD/-Trp 选择平板的生长情况, 以及能否表达 β -半乳糖苷酶 (β -gal), 以排除质粒本身可能导致的自身激活。

1.3 文库杂交

将诱饵质粒及扩增提取的文库质粒用标准醋酸锂方法共转化酵母 AH109, 并铺于 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/x- α -gal 四缺选择培养板上, 平板中 3-氨基三唑 (3-AT) 的浓度为 5 mmol/L, 30 $^{\circ}$ C, 培养 4 d-6 d 直到有酵母菌落长出。因为酵母不同于大肠杆菌等表达系统, 不具有质粒表达的“不相容性”, 从而所筛选的阳性克隆中可能存在冗余文库质粒, 筛库后将显蓝的阳性酵母菌落涂于 SD/-Leu/-Trp/x- α -gal 二缺平板, 待长出后, 再将可以显蓝的菌落涂于四缺平板, 几次循环以去除酵母中可能含有的不与诱饵质粒相互作用的无关文库质粒, 最后得到的阳性克隆封存以备进一步检测。

1.4 滤纸法 β -gal 活性分析及 ONPG (o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside) 显色测定

挑取待检测克隆直接涂于无菌滤纸上, 液氮冻融, 铺在被 Z 缓冲液/x- β -gal 溶液 (100 ml Z 缓冲液加入 1.67 ml 20 g/L x- β -gal, 0.27 ml β -巯基乙醇; Z 缓冲液含 60 mmol/L Na₂HPO₄, 40 mmol/L NaH₂PO₄, 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgSO₄) 预先润湿的滤纸上, 30 $^{\circ}$ C 温育直至出现蓝色克隆, 8 h 内有效。滤纸法所测得的蓝色强度直接反应相互作用强度。一定量的待测酵母细胞液氮冻融后与硝基苯半乳糖苷 (o-nitrophenyl-D-galactopyranoside, ONPG) (4 mg/ml 于 Z 缓冲液) 30 $^{\circ}$ C 反应显色, 待有较明显颜色出现后, 加入 0.4 ml 1 mol/L Na₂CO₃ 终止反应并记录 OD₄₂₀ 值及显色时间, 活性以每个细胞单位时间分解底物的量来表示 (Giacomini et al., 1992)。

1.5 标签载体的构建、鉴定及其在哺乳动物细胞中的表达

分析文库质粒 pACT2 和表达质粒 pCMV-cMyc 的酶切位点, 发现 *EcoR* I 和 *Xho* I 双切后相位相符 (且在目标 DNA 上无这两个酶的酶切位点), 双酶切回收相应片段, T4 DNA 连接酶连接, 并进行酶切和测序验证。COS-7 细胞培养条件为: 10% 小牛血清, 含抗生素的 DMEM 培养基, 37°C, 5% CO₂。当细胞长到 80% 时, 利用 Lipofectamine 2000 转染试剂将构建的表达质粒转染 COS-7 细胞, 48 h 后, 收获裂解细胞, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 半干转移至硝酸纤维素膜上, 进行免疫印迹分析 (Western blot)。

2 结 果

2.1 诱饵蛋白质粒 pGBKT7-ΔTm-NTE-R 的构建及鉴定

利用 PCR 方法从质粒 D16 中扩增 ΔTm-NTE-R 片段, 连接到 pGEMT-easy 载体中, 转化菌株, 提取重组质粒, 用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切, 回收相应片段, 克隆至 pGBKT7 载体, 经酶切鉴定发现目的片段与预期片段大小一致 (图 1), 并经 DNA 测序验证排除 PCR 反应引入突变的可能。

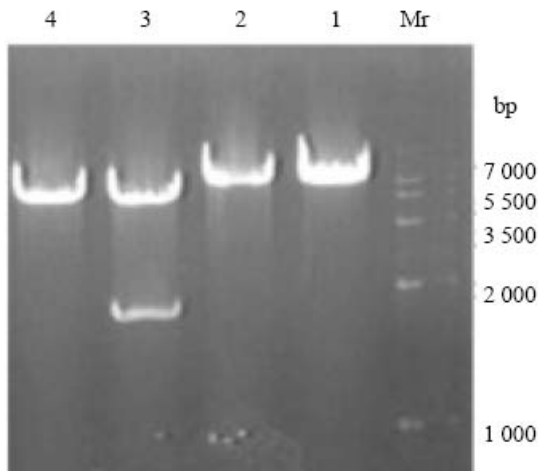


图 1 诱饵质粒 pGBKT7-ΔTm-NTE-R 的酶切验证

1: pGBKT7-ΔTm-NTE-R 单酶切 (*EcoR* I)。2: pGBKT7-ΔTm-NTE-R 单酶切 (*Bam*H I)。3: pGBKT7-ΔTm-NTE-R 双酶切 (*EcoR* I 和 *Bam*H I)。4: pGBKT7 单酶切 (*EcoR* I)。

Fig. 1 Restriction analysis of bait plasmid pGBKT7-ΔTm-NTE-R

1: pGBKT7-ΔTm-NTE-R/*EcoR* I. 2: pGBKT7-ΔTm-NTE-R/*Bam*H I. 3: pGBKT7-ΔTm-NTE-R/*EcoR* I and *Bam*H I. 4: pGBKT7 control. M: Marker.

2.2 cDNA 文库的筛选及阳性克隆的检测

诱饵蛋白经滤纸法 β-gal 活性检测后发现无自

身激活状况。大规模文库转化, 通过共转化效率的测定, 约 2×10^6 转化有诱饵质粒和文库质粒的酵母菌在四缺平板上得到筛选。将平板上显蓝的菌落转接生长后, 进行滤纸法 β-gal 筛选, 得到 5 个显色较强的克隆, 经 DNA 序列分析, 发现其中 3 个片段为人前列腺素受体结合蛋白 54 (Androgen receptor-associated protein 54, ARA54), 同源性 100%, 并进一步对这两种蛋白的相互作用强度进行了 ONPG 显色检测 (表 1), 表明这两种蛋白在酵母中确实存在很强的相互作用。

表 1 筛选蛋白的 ONPG 显色结果

Table 1 Liquid culture assay using ONPG as substrate

克隆 Clone	片段特征 (cDNA) Identity (cDNA)	活性 (μmol/min/cell) Activity (μmol/min/cell)
C2	ARA54 (191-1422bp) / ΔTm-NTE-R	1.02 ± 0.15
C5	"	0.94 ± 0.11
C16	"	0.88 ± 0.12
阳性对照 ^a Positive control ^b	P53/T	2.49 ± 0.19
阴性对照 ^b Negative control ^b	无 (None)	0.03 ± 0.02

a: 含阳性对照质粒。b: 仅含空质粒 pGBKT7/pGADT7。

a: Including positive control plasmids. b: Including pGBKT7 and pGADT7 empty vectors.

2.3 候选蛋白在酵母中的重新验证

用电转法从阳性酵母克隆中获得筛选到的阳性质粒 pACT2-ARA54, 并与含不同 NTE 片段的质粒共转化酵母 AH109, 涂布四缺 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 平板, 进行酵母中的重新验证 (图 2), 阳性对照 (pGBKT7-53 + pGADT7-T) 和筛选验证组 (pGBKT7-ΔTm-NTE-R + pACT2-ARA54) 有较多克隆长出, 在全长 NTE 验证组 (pGBKT7-FullΔTm/NTE + pACT2-ARA54) 有较少克隆形成, 而阴性对照组 (pGBKT7 + pACT2-ARA54) 没有克隆形成。这一结果说明, ARA54 不能单独激活报告基因的表达, ARA54 可以和 NTE 的调控结构域在酵母中有很强的相互作用, 也可以和全长 NTE 蛋白相互结合, 但由于 NTE 基因比较长 (4 kb), 影响其在酵母中的表达, 并可能存在全长 NTE 与 ARA54 表达后相互作用结构域没有得到完全暴露的情况, 以至于相互作用比较小, 导致在共转化后只有少量克隆长出。

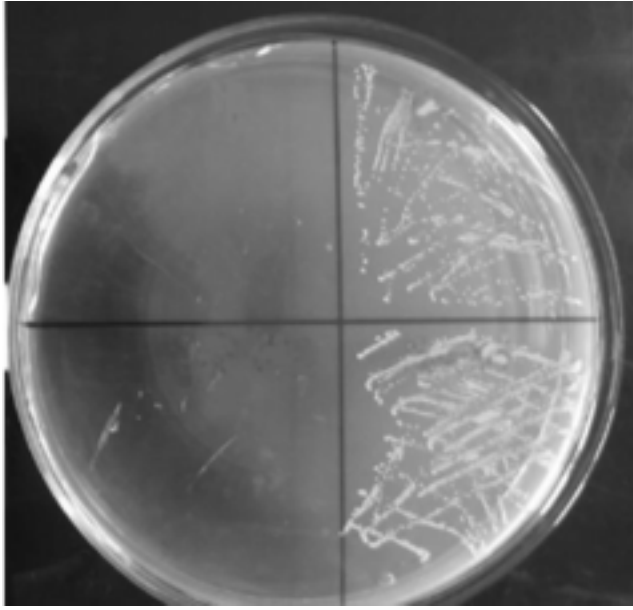


图 2 ARA54 和 Δ Tm-NTE-R 蛋白相互作用在酵母中的重新验证结果

1: pGBKT7 + pACT2-ARA54. 2: pGBKT7- Δ Tm-NTE-R + pACT2-ARA54. 3: pGBKT7- Δ Tm/NTE + pACT2-ARA54. 4: 阳性对照 (pGBKT7-53 + pGADT7-T)。

Fig.2 Retest results of the interaction of ARA54 and Δ Tm-NTE-R protein in yeast

1: pGBKT7 + pACT2-ARA54. 2: pGBKT7- Δ Tm-NTE-R + pACT2-ARA54. 3: pGBKT7- Δ Tm/NTE + pACT2-ARA54. 4: Positive control (pGBKT7-53 + pGADT7-T)。

2.4 文库蛋白在哺乳动物细胞中的表达

将得到的文库质粒 pACT2-ARA54 经双酶切后直接克隆到 pCMV-cMyc 标签载体上, 经测序和酶切验证表明 pCMV-cMyc-ARA54 质粒得到了成功构建 (图 3)。将带有 c-Myc 标签的 ARA54 转染到 COS-7 中, 通过 c-Myc 抗体的 Western blotting 检测, 发现 ARA54 可以在 COS-7 细胞中得到很好的表达 (图 4), 与预测条带大小一致, 这为进一步在其细胞功能方面的研究奠定了基础。

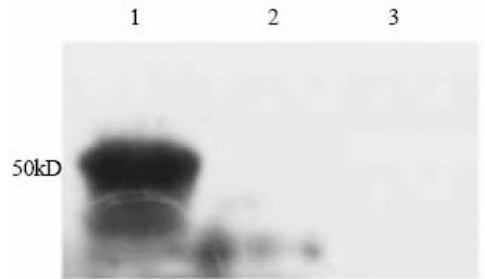


图 4 ARA54 在 COS-7 细胞中的表达结果

1: pCMV-cMyc-ARA54. 2: pCMV-cMyc. 3: 空菌 AH109。

Fig.4 Expression of ARA54 in transfected COS-7 cells

1: pCMV-cMyc-ARA54. 2: pCMV-cMyc. 3: yeast AH109.

3 讨论

酵母双杂交系统具有操作简便、灵敏度高的优点, 可直接从文库中筛选出与诱饵蛋白相互作用的基因编码序列 (Fields and Sternglanz, 1994)。我们利用双杂交系统获得了一个与 NTE 调控结构域相互作用的候选蛋白 ARA54, 最初该蛋白是在研究前列腺癌时发现的, 它最主要的特征是含有环指结构域, 通过此结构域可以与前列腺素受体相互作用, 与前列腺素协同对前列腺素受体行使正向调控 (Miyamoto et al., 2002)。最近的资料显示 ARA54 可以作为 E3 连接酶 (Ubiquitin protein ligase) 参与某些蛋白的泛素化调节途径 (Ubiquitin-proteasome pathway), 在这过程中它结合特定的 E2 (Ubiquitin-carrier), 并伴随发生 ARA54 蛋白自身的泛素化 (Ito et al., 2001)。泛素-蛋白酶体途径是细胞内重要的蛋白质质控系统, 参与调节细胞周期进程, 与细胞周期素 cyclin、cdc 等分子依赖于周期进程的特异性降解有着密切的联系 (Yamano et al., 1998)。我们对相关蛋白序列生物信息学分析后发现, ARA54 和 NTE 蛋白 N 端均含有泛素化调节信号 D-Box (Destruction Box) (图 5), 而含有泛素化信号是泛素化靶蛋白和自身泛素化的典型

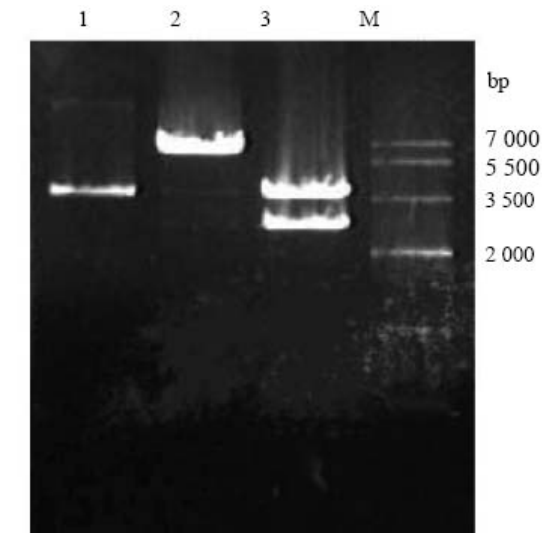


图 3 pCMV-cMyc-ARA54 的酶切验证

1: pCMV-cMyc/EcoR I. 2: pCMV-cMyc-ARA54/EcoR I. 3: pCMV-cMyc-ARA54/EcoR I + Xho I. M: Marker.

Fig.3 Restriction analysis of plasmid pCMV-cMyc-ARA54

1: pCMV-cMyc/EcoR I. 2: pCMV-cMyc-ARA54/EcoR I. 3: pCMV-cMyc-ARA54/EcoR I + Xho I. M: Marker.

特征 (Yamano et al., 1998)。作为 E3, ARA54 可能在泛素化过程中直接与 NTE 相互结合, 起着依赖于周期进程的特异性识别降解的作用。

Consensus:		R	X	X	^L F	X	X	X	X	N
ARA54:	(37)	R	I	Y	L	D	L	P	Q	N
NTE:	(276)	R	V	T	F	L	A	L	H	N

图 5 NTE 和 ARA54 中 D-Box 序列比对

Fig.5 Sequence comparison of D-Box in NTE and ARA54

通常, 蛋白质的相互作用提示参与相互作用的两种蛋白在功能上是相互关联的, 两者或者互为对方的调节蛋白, 或者为了完成某种功能需要发生协同作用, 推测在细胞正常生理过程中可能存在 NTE 的自身循环调节过程。结合以上的研究结果, 我们有理由相信, ARA54 是 NTE 的一种重要的结合蛋白, 它可能在 NTE 的正常生理活动中发挥着重要的作用。为了了解 NTE 与 ARA54 的相互作用关系, 首先将筛库得到的 ARA54 截短体基因在哺乳动物细胞中进行了表达, 在 50 kD 处有强表达条带, 表明该蛋白在哺乳动物细胞中的过表达对细胞自身正常生长没有明显的影响, 在获得 ARA54 的全长基因序列后, 对其表达纯化和细胞内的亚细胞定位将是进一步研究的方向。另外, 在 NTE 的细胞表达实验中, 虽然 NTE 过表达对细胞有很强的毒性作用, 但在瞬时表达条件下, NTE 可以得到正确表达, 这为进一步在细胞内检测这两种蛋白的相互作用及了解它们的生物学功能创造了条件, 尽管这些相互作用的结构基础及生物学意义尚有待进一步研究。

致谢 Paul Glynn 博士提供 D16 质粒, 王雁玲博士提供 COS-7 细胞, 王健博士提供 pCMV-cMyc 质粒, 作者一并表示衷心感谢。

参考文献 (References)

- Akassoglou K, Malester B, Xu J, Tessarollo L, Rosenbluth J, Chao MV, 2004. Brain-specific deletion of neuropathy target esterase/swiss cheese results in neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101 (14): 5 075 - 5 080.
- Atkins J, Glynn P, 2000. Membrane association of and critical residues in the catalytic domain of human neuropathy target esterase. *J. Biol. Chem.* 275 (32): 24 477 - 24 483.
- Dremier S, Kopperud R, Doskeland SO, Dumont JE, Maenhaut C, 2003. Search for new cyclic AMP-binding proteins. *FEBS Lett.* 546 (1): 103 - 107.
- Fields S, Sternglanz R, 1994. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interaction. *Trends Genetics* 10 (8): 286 - 292.
- Giacomini A, Corich V, Ollero FJ, Squartini A, Nuti MP, 1992. Experimental conditions may affect reproducibility of the beta-galactosidase assay. *FEMS Microbiol. Lett.* 79 (1 - 3): 87 - 90.
- Glynn P, 2000. Neural development and neurodegeneration: two faces of neuropathy target esterase. *Prog. Neurobiol.* 61 (1): 61 - 74.
- Ito K, Adachi S, Iwakami R, Yasuda H, Muto Y, Seki N, Okano Y, 2001. N-terminally extended human ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) mediate the ubiquitination of RING-finger proteins, ARA54 and RNF8. *Eur. J. Biochem.* 268 (9): 2 725 - 2 732.
- Johnson MK, 1974. The primary biochemical lesion leading to the delayed neurotoxic effects of some organophosphorus esters. *J. Neurochem.* 23 (4): 785 - 789.
- Lush MJ, Li Y, Read DJ, Willis AC, Glynn P, 1998. Neuropathy target esterase and a homologous *Drosophila*: neurodegeneration-associated mutant protein contain a novel domain conserved from bacteria to man. *Biochem. J.* 332 (Pt 1): 1 - 4.
- Miyamoto H, Rahman M, Takatera H, Kang HY, Yeh S, Chang HC, Nishimura K, Fujimoto N, Chang C, 2002. A dominant-negative mutant of androgen receptor coregulator ARA54 inhibits androgen receptor-mediated prostate cancer growth. *J. Biol. Chem.* 277 (7): 4 609 - 4 617.
- Moser M, Li Y, Vaupel K, Kretzschmar D, Kluge R, Glynn P, Buettner R, 2004. Placental failure and impaired vasculogenesis result in embryonic lethality for neuropathy target esterase-deficient mice. *Mol. Cell Biol.* 24 (4): 1 667 - 1 679.
- Quistad GB, Barlow C, Winrow CJ, Sparks SE, Casida JE, 2003. Evidence that mouse brain neuropathy target esterase is a lysophospholipase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100 (13): 7 983 - 7 987.
- Yamano H, Tsurumi C, Gannon J, Hunt T, 1998. The role of the destruction box and its neighbouring lysine residues in cyclin B for anaphase ubiquitin-dependent proteolysis in fission yeast: defining the D-box receptor. *EMBO J.* 17 (19): 5 670 - 5 678.
- Zaccheo O, Dinsdale D, Meacock PA, Glynn P, 2004. Neuropathy target esterase and its yeast homologue degrade phosphatidylcholine to glycerophosphocholine in living cells. *J. Biol. Chem.* 279 (23): 24 024 - 24 033.