

血管紧张素(1-7)的受体 MAS 与 PSD-95 的相互作用

李积凤^{1,2)}, 熊英¹⁾, 李延华¹⁾, 杨晓梅¹⁾, 陈鹏¹⁾,
江琪¹⁾, 安云庆²⁾*, 贺俊崎¹⁾*

(首都医科大学¹⁾生物化学与分子生物学系,²⁾免疫学系,北京 100069)

摘要 经过对蛋白质 MAS 的氨基酸序列进行分析、比对发现,其羧基末端含有一段高度保守的 PDZ 结合模序。据此推测, MAS 通过此模序可能会与某些 PDZ 蛋白质发生相互作用。将 MAS 羧基末端 27 个氨基酸所对应的 DNA 序列,克隆到原核表达载体 pGEX-4T-1 中,构建重组质粒 pGEX-MAS-CT。将重组质粒转入大肠杆菌 BL21 内,经 IPTG 诱导,并用 glutathione-Sepharose 4B 纯化,得到纯化的融合蛋白 GST-MAS-CT。以 GST-MAS-CT 为饵蛋白,利用 GST pull down 方法,在兔脑组织中筛选与 MAS 特异结合的蛋白质。结果表明,在兔脑组织中有多种蛋白质可以与 MAS-CT 特异结合,经 Western 印迹检验其中之一为突触后致密物质-95 (postsynaptic density protein 95, PSD-95)。PSD-95 与 MAS 的相互作用的研究结果,为研究完整的 MAS 与 PSD-95 的相互作用以及这种相互作用对 MAS 受体的功能的影响奠定了基础。

关键词 MAS;血管紧张素;PSD-95;G 蛋白偶联受体;PDZ 蛋白

中图分类号 Q51;R392

MAS, the Receptor of Angiotensin-(1-7), Associates with PSD-95

LI Ji-Feng^{1,2)}, XIONG Ying¹⁾, LI Yan-Hua¹⁾, YANG Xiao-Mei¹⁾,
CHEN Peng¹⁾, JIANG Qi¹⁾, AN Yun-Qing²⁾*, HE Jun-Qi¹⁾*

(¹⁾ Department of Biochemistry and Molecular Biology; ²⁾ Department of Immunology,
Capital University of Medical Sciences, Beijing 100069, China)

Abstract The carboxyl terminal amino acid sequences of MAS protein is E-T-V-V, which conform to the consensus motif (E-S/T-X-I/L/V) for association with PDZ proteins. It was speculated that MAS may associate with some PDZ proteins via its carboxyl terminal to regulate MAS signaling. In this study pGEX-MAS-CT was first constructed by inserting the DNA fragment of MAS encoding the last 27 amino acids of its carboxyl terminal into the prokaryotic expression vector pGEX-4T-1. The recombinant construct pGEX-MAS-CT was successfully cloned and identified by *EcoR* and *Xho* digestion, PCR amplification and sequencing. GST-MAS-CT fusion protein was then robustly induced by IPTG and purified with glutathione-Sepharose 4B beads from the lysate of *E. coli* BL21, which was transformed in pGEX-MAS-CT. Rabbit brain lysates were pull-downed with GST-MAS-CT fusion protein conjugated with Glutathione-Sepharose 4B beads to screen novel binding proteins of MAS. Many proteins were able to be detected in the GST-MAS-CT pull-down complex but not in GST pull-down complex, with one of the binding proteins been identified as postsynaptic density protein 95 (PSD-95) by Western blot. These results provide a strong evidence for further studying the intracellular association of the MAS and PSD-95 and also their potential physiological significances.

收稿日期:2006-10-23,接受日期:2006-12-25

国家自然科学基金项目(No. 30371643, No. 30572183),北京市教委科技发展基金(No. KZ200610025013),北京市优秀人才择优资助项目资助

*联系人 贺俊崎 Tel: 010-83911684, E-mail: jq_he@cpums.edu.cn; 安云庆 Tel: 010-83911439, E-mail: anyunq@cpums.edu.cn

Received: October 23, 2006; Accepted: December 25, 2006

Supported by National Natural Science Foundation of China(No. 30371643, No. 30572183), Scientific Research Key Program of Beijing Municipal Commission of Education(No. KZ200610025013)

*Corresponding author He Jun-Qi Tel: 010-83911486, E-mail: jq_he@cpums.edu.cn; An Yun-Qing Tel: 010-83911439 E-mail: anyunq@cpums.edu.cn

Key words MAS; Angiotensin; PSD-95; GPCR; PDZ Protein

蛋白质 MAS 是新近发现的血管紧张素(1-7)的受体^[1,2],由原癌基因 *mas* 编码,它含有 7 个疏水的跨膜结构域,是一种典型的 G 蛋白偶联受体. MAS 蛋白的组织学分布比较广泛,在脑、睾丸、心脏、肾脏以及大脑血管内皮细胞中均有表达^[3,4]. MAS 具有多种生理功能,作为血管紧张素(1-7)的受体,它能够有效调节肾素-血管紧张素系统;同时它对于神经可塑性、记忆和焦虑也有重要的调节作用^[2];此外,它还对肿瘤的发生有重要的影响^[5]. 然而,目前对 MAS 复杂、广泛的生理作用尚未完全了解,仍需深入研究. 对 MAS 在细胞内引发多种生理作用的细胞信号转导通路及其调控机制更是知之甚少,至今尚未有任何有关 MAS 结合蛋白的研究报道. 因此,寻找细胞内 MAS 受体的结合蛋白对于阐明 MAS 受体的细胞信号转导通路及其在细胞内的调控机制有十分重要的作用. 比较不同种属之间 MAS 羧基末端的氨基酸序列,发现该蛋白的羧基末端拥有与其它蛋白质相结合的模式(motif),为此首先构建了 GST 与 MAS 羧基末端的融合蛋白(GST-MAS-CT)在原核细胞中的表达载体,并对 GST-MAS-CT 进行诱导表达与纯化,然后利用 GST-MAS-CT 为诱饵在兔脑组织中筛选与其特异结合的蛋白质,初步发现突触后致密物质-95(PSD-95)可与 MAS 特异地相互作用.

1 材料和方法

1.1 材料

质粒和菌种 人 MAS 全长 cDNA,原核表达载体 pGEX-4T-1,菌株 *E. coli* DH5、BL21 均由本实验室保存.

酶与试剂 DNA 限制性内切酶(*EcoR*, *Xho*)购自日本 TOYOBO 公司;DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自日本 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒购自博大泰克公司;DNA、蛋白质相对分子量标准购自北京鼎国生物技术公司;Gutathione-Sepharose 4B 购自 Sigma 公司;Anti-PSD-95 单抗购自 ABR 公司;山羊抗兔 IgG HRP 购自北京中杉生物工程公司;ECL Western 印迹检测试剂盒购自 Chemicon 公司;PCR 引物合成,重组 DNA 测序由六合通公司完成;其它试剂均为国产分析纯.

1.2 重组表达载体的构建

以人 MAS 羧基末端终止密码子至其上游 81 bp 的 DNA 片段为目的片段,分别设计上下游引物,引

物序列分别为:5 引物 5'-AGA CAC GAA TTC ACC AGG GCT TTC AAA GAT G-3';3 引物 5'-AGA CTC GAG TTA GAC GAC AGT CTC AAC TGT G-3';划线处分别为 *EcoR* 和 *Xho* 酶切位点. PCR 扩增产物和载体 pGEX-4T-1 分别通过限制性内切酶 *EcoR* 和 *Xho* 双酶切,经琼脂糖凝胶电泳分离,回收目的条带,用 T4 DNA 连接酶将纯化的 MAS-CT DNA 片段与 pGEX-4T-1 载体片段连接. 连接产物转化 *E. coli* DH5 感受态细胞.

1.3 重组表达载体的鉴定

1) 酶切鉴定:选择 3 个阳性克隆,分别提取其中的质粒 DNA,经 *EcoR* 和 *Xho* 双酶切后,用 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,切出 81 bp 片段者为阳性.

2) PCR 鉴定:以酶切鉴定正确的质粒为模板,以特异引物进行 PCR 扩增,PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,扩增出 81 bp 片段者为阳性.

3) 测序鉴定:将酶切及 PCR 鉴定均为阳性的单克隆,培养新鲜菌液送至公司进行 DNA 测序鉴定.

质粒 DNA 的制备、DNA 片段回收、酶切、连接、转化参考文献[6]进行.

1.4 GST-MAS-CT 融合蛋白在大肠杆菌中的诱导表达及纯化

将测序正确的重组表达载体转化到宿主菌 *E. coli* BL21 中,挑取单克隆,接种于 LB 培养基,37℃,250 r/min 振荡培养至其 A 值达到 0.6~0.7,加入 IPTG(终浓度 0.5 mmol/L)继续振荡培养 2 h,进行诱导表达,4℃,3 000 r/min,30 min 离心收集菌体,所获菌体用收获缓冲液(harvest buffer: HEPES 10 mmol/L, NaCl 50 mmol/L, EDTA 5 mmol/L, benzamidine 1 mmol/L)悬浮(每升菌液用 25 ml 收获缓冲液),加入溶菌酶(100~200 mg/L 菌液收集的菌体),经超声破菌至悬浮液清亮后,离心收集上清,加入 Gutathione-Sepharose 4B(60 mg/L 菌液收集的菌体),4℃持续混和 3 h,4℃,3 000 r/min,离心 1 min,收集沉淀,用收获缓冲液悬浮(30 ml/次)4℃,3 000 r/min 离心 1 min,洗 3 次后,将沉淀悬浮于 1 ml 收获缓冲液,即得到纯化的融合蛋白.

1.5 脑组织裂解液的制备

取兔全脑,将脑组织置于冰上,用冰浴的 PBS 洗去残留的血液,加 10 ml 裂解液/克组织(裂解液: HEPES 10 mmol/L, NaCl 50 mmol/L, EDTA 5 mmol/L, Triton X-100 1%, benzamidine 1 mmol/L),然后匀浆器

匀浆 10 min (15 W), 经 4 °C, 13 000 r/min, 离心 15 min 后, 上清即为脑组织裂解液。

1.6 GST pull down

将 50 μl 纯化的 GST 和 GST-MAS-CT 分别和 2 ml 兔脑组织裂解液 4 °C 持续混和 3 h, 4 °C 3 000 r/min, 离心 1 min 收集沉淀并用洗涤液 (HEPES 10 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, EDTA 5 mmol/L, Tween 20 0.1%, BSA 3%) 洗涤 4 次 (1 ml/次), 再用 1 ml 洗涤液 (HEPES 10 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, EDTA 5 mmol/L, Tween 20 0.1%, benzamidine 1 mmol/L) 洗涤 1 次, 所得的沉淀物即为 GST pull down 沉淀复合物。

1.7 Western 印迹

参照文献[7]的方法, 在 GST pull down 沉淀复合物中加入 50 μl 2 × 蛋白上样缓冲液, 经 95 °C 加热 5 min 后, 以 8% 胶进行 SDS-PAGE, 将凝胶中的蛋白转移到硝酸纤维素膜上 (Bio-Rad, mini-protein 电转系统进行湿转, 100 V, 3 h), 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, PSD-95 单抗 (1:1 000) 4 °C 培育过夜, TBST (Tris-HCl 20 mmol/L, pH 7.5, NaCl 0.5 mol/L, Tween-20 0.05%) 洗膜, 10 min × 3 次, 山羊抗小鼠二抗 (1:3 000) 室温培育 1 h, TBST 洗膜, 10 min × 3 次, 参照 ECL 发光试剂盒说明书于暗室内发光曝光。

2 结果

2.1 MAS 羧基末端含有 PDZ 蛋白结合序列

MAS 蛋白质的结构分析显示, 它含有 7 个疏水的跨膜结构域, 是典型的 G 蛋白偶联受体。E-S/T-X-I/L/V 是第一类 PDZ 蛋白的结合模序 (motif)^[8]。MAS 位于胞浆内的羧基末端, 为短肽 E-T-V-V, 是第一类 PDZ 蛋白的结合模序。同时, 比较 MAS 不同种属之间羧基末端的氨基酸序列 (Fig. 1) 发现: MAS 的羧基末端在不同种属之间高度保守, 均含有典型的第一类 PDZ 蛋白结合模序 E-T-V-V。据此我们推测, 蛋白质 MAS 可能会通过其羧基末端与某些 PDZ 蛋白特异结合而调节 MAS 的某些生理功能。

2.2 GST-MAS-CT 融合蛋白表达载体的鉴定

为了验证上述推论, 并寻找与 MAS 的羧基末端 (MAS-CT) 特异作用的 PDZ 蛋白, 我们首先构建了 MAS-CT 的原核表达载体 pGEX-MAS-CT, 载体为 pGEX-4T-1, 插入的 MAS 基因片段长度为 81 bp。酶切及 PCR 鉴定结果如 Fig. 2 所示: *EcoR* 和 *Xho* 双酶切和重组质粒经 PCR 扩增均可得到 81 bp 条带, 与预期的 MAS 羧基末端片段大小一致, 相应的空载体 pGEX-4T-1 无此条带。上述结果表明, MAS 羧

HOMO MAS	AFKDEMQPRRQKDN CNTVTVTETVV
RAT MAS	AFKDEMQPRRQEGNGNTVSIETVV
MOUSE MAS	AFKDEMQPRRQEGNGNTVSIETVV
DOG MAS	AFKDEMQPRRQEDNGNTTTIETVV

Fig. 1 The alignment of carboxyl terminal amino acid sequences of human, mouse, rat and dog MAS

ETVV, which conform to the consensus motif (E-S/T-X-I/L/V) for association with PDZ proteins, is conserved in the different species of MAS

基末端已经重组到 pGEX-4T-1 上, 得到重组的质粒 pGEX-MAS-CT。

将经过酶切及 PCR 鉴定正确的重组质粒 pGEX-MAS-CT 进行 DNA 测序。结果显示, 载体中插入的 DNA 序列与目的序列完全一致 (结果未显示)。



Fig. 2 Identification of pGEX-MAS-CT constructs by restriction digestion and PCR amplification

M₁: Marker1 DL2000 DNA ladder; 1: PCR product of MAS cDNA; 2: PCR product of pGEX-MAS-CT; 3: PCR product of pGEX-4T-1; 4: pGEX-4T-1 digested with *EcoR* and *Xho*; 5: pGEX-MAS-CT digested with *EcoR* and *Xho*; 6: pGEX-MAS-CT plasmid; M₂: DNA/*Hind*I ladder

2.3 GST-MAS-CT 融合蛋白在大肠杆菌中的诱导表达及纯化

为了得到纯化的 GST-MAS-CT 融合蛋白, 将空载体 pGEX-4T-1 及重组质粒 pGEX-MAS-CT 转化到宿主细菌 *E. coli* BL21 中, 诱导表达并纯化分别得到 GST 和 GST-MAS-CT 融合蛋白。GST 蛋白的分子量为 28 kD, GST-MAS-CT 融合蛋白为 32 kD。考马斯亮蓝染色结果如 Fig. 3 所示: 空载体 pGEX-4T-1 转化菌株及重组质粒 pGEX-MAS-CT 转化菌株经诱导、纯化后均可得到相应蛋白质, 表明 GST 及 GST-MAS-CT 均已得到成功诱导表达及纯化。

2.4 在兔脑组织裂解液中筛选 MAS-CT 的结合蛋白

据文献[3]报道, 虽然蛋白质 MAS 在组织中分

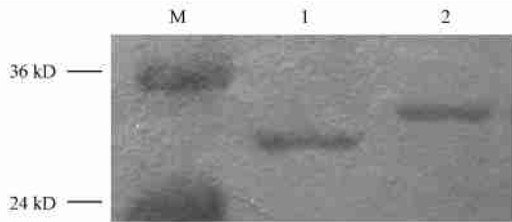


Fig. 3 SDS-PAGE analysis of GST and GST-MAS-CT fusion protein after purification

M: Protein marker; 1: Purified GST protein;
2: Purified GST-MAS-CT fusion protein

布广泛,但在脑组织中其表达量最高.利用 GST pull down 技术在兔脑组织裂解液中筛选与 MAS-CT 特异结合的蛋白质.结果如 Fig. 4 所示:GST-MAS-CT pull down 复合物经考马斯亮蓝染色,可以显示出多种蛋白质的存在,尤其以分子量为 ~ 30 kD (P30), ~ 45 kD (P45), ~ 50 kD (P50), ~ 70 kD (P75)和 ~ 97 kD (P97)的条带较为显著.如 Fig. 5 所示,在相应的单独以 GST 蛋白 pull down 复合物中,或检测不到这些蛋白质的存在,或相应的蛋白质的含量明显低于 GST-MAS-CT pull down 组,表明这些蛋白质可以与 MAS 的羧基端特异结合.

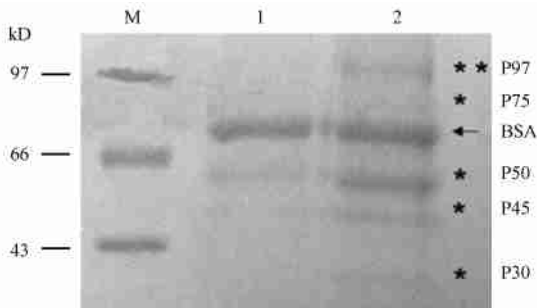


Fig. 4 MAS associates with multi proteins

Many proteins can be detected by GST-MAS-CT pull down from rabbit brain lysates.

M: protein marker; 1: GST pull down complex;
2: GST-MAS-CT pull down complex

2.5 PSD-95 为 MAS CT 的特异结合蛋白之一

由于融合蛋白 GST-MAS-CT 仅含有 MAS 羧基末端的 27 个氨基酸,主要包含 PDZ 蛋白的保守结合模式.因此我们推测,在上述实验结果中筛选到的蛋白质很可能是某些 PDZ 蛋白,同时依据这些蛋白质的分子量以及在脑组织中表达的特点,我们推测其中的 P97 可能是 PSD-95.为此,利用 Western 印迹对 GST pull down 复合物进行检测,结果如 Fig. 6 所示:在 GST-MAS-CT pull down 复合物中能够检测到大量

的 PSD-95 蛋白的存在,相反在 GST pull down 的复合物中却检测不到 PSD-95 蛋白质的存在.结果表明,GST-MAS-CT 可以与 PSD-95 特异结合.

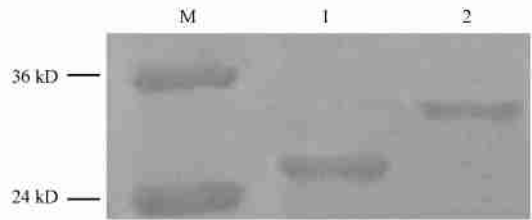


Fig. 5 Equal amount of GST and GST-MAS-CT loaded in GST pull down assay

M: Protein marker; 1: Purified GST protein;
2: Purified GST-MAS-CT fusion protein

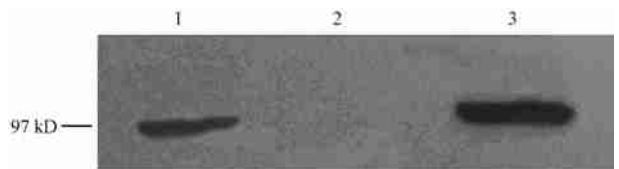


Fig. 6 PSD-95 specifically binds with carboxyl terminal of MAS

1: Rabbit brain lysate;
2: Rabbit brain lysate was pulled down with GST;
3: Rabbit brain lysate was pulled down with GST-MAS-CT

3 讨论

mas 基因由 Wigler 博士研究小组于 1986 年首次克隆出^[5].它所编码的蛋白含有 325 个氨基酸,有 7 个疏水的跨膜结构域,是一种 G 蛋白偶联受体. MAS 蛋白质序列的羧基末端 (E-T-V-V) 是典型的 PDZ 蛋白结合序列 (E-S/T-X-I/L/V). PDZ 蛋白是具有 PDZ 结构域的蛋白质超级家族,目前已经发现有 200 多个成员. PDZ 蛋白与 G 蛋白偶联受体的相互作用,对 G 蛋白偶联受体的功能有重要的调控作用,如 beta 1 肾上腺素受体 (1AR) 可以分别与多种 PDZ 蛋白: PSD-95、MAGF2、PDZ-GEF、CAL 以及 MAGF3 等特异结合而分别调节其多种生理功能^[9-13]: PSD-95 能抑制 1AR 减敏^[9]; MAGF2 可促进 1AR 减敏^[10]; CAL 可以调节新合成的 1AR 在细胞内的运输^[11]; PDZ-GEF 直接介导 1AR 激活 Ras 信号通路^[12]; MAGF3 能够调节 1AR 所介导的 MAPK 信号通路^[3].因此,筛选 G 蛋白偶联受体 MAS 特异的结合蛋白对于进一步阐明该受体在细胞内细胞信号转导通路及其调控机制具有十分重要的意义.

我们首先将 MAS-CT 的基因克隆到原核表达载

体中,并在大肠杆菌中进行了表达、纯化,然后利用 GST pull down 技术在兔脑组织中筛选与 GST-MAS-CT 特异结合的蛋白质,通过考马斯亮蓝染色发现有多条特异蛋白质条带,其中之一经 Western 印迹检验为 PSD-95.

PSD-95 是一种突触后致密物质,属于 PDZ 蛋白质超家族成员,主要通过与其它蛋白质的相互作用而发挥作用. PSD-95 含有 3 个 PDZ 结构域,目前已经报道它可以通过其各个 PDZ 结构域与多种受体相互作用进而调节受体的功能,如可以通过其 PDZ1 + 2 结构域与 Kv1 受体结合而调节钾离子通道的电流,可以通过其 PDZ3 结构域与肾上腺素受体结合而抑制 1AR 减敏^[9].

PSD-95 与 MAS 的相互作用的研究尚未见报道,进一步利用真核细胞及动物组织中的内源蛋白质更好的研究二者之间的相互作用将有助于揭示 MAS 与 PSD95 作用的生理或病理意义.而且 MAS 作为一种受体,其细胞信号转导通路尚不清楚.因此,本研究工作为研究完整的 MAS 与 PSD-95 的相互作用以及这种相互作用在阐述 MAS 受体的细胞信号转导通路中的作用奠定了基础.

参考文献 (References)

- [1] Santos R A, Simpese Silva A C, Maric C , *et al.* Angiotensin (1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(14):8258-8263
- [2] Hellner K, Walther T, Schubert M, *et al.* Angiotensin (1-7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2005, **29**(3):427-435
- [3] Metzger R, Bader M, Ludwig T , *et al.* Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues[J]. *FEBS Lett*, 1995, **357**(1):27-32
- [4] Kumar M, Grammas P, Gacomelli F, *et al.* Selective expression of c-mas proto-oncogene in rat cerebral endothelial cells [J]. *Neuroreport*, 1996, **8**(1):93-96
- [5] Young D, Waitches G, Birchmeier C , *et al.* Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains[J]. *Cell*, 1986, **45**(5):711-719
- [6] Sambrook J, Russell D W 著. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南, 第 3 版[M]. 北京:科学出版社, 2002:26-96 (Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)
- [7] F. 奥斯伯等著. 颜子颖,王海林译. 精编分子生物学实验指南,第 3 版[M]. 北京:科学出版社, 1998:649-52 (Ausubel F M, *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd ed [M]. J Wiley, 1995)
- [8] Harris B Z, Lim W A. Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly[J]. *J Cell Sci*, 2001, **114**(Pt 18):3219-3231
- [9] Hu L A, Tang Y, Miller W E, *et al.* Beta 1-adrenergic receptor association with PSD-95. Inhibition of receptor internalization and facilitation of beta 1-adrenergic receptor interaction with N-methyl-D-aspartate receptors[J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(49):38659-38666
- [10] Xu J, Paquet M, Lau A G, *et al.* Beta 1-adrenergic receptor association with the synaptic scaffolding protein membrane-associated guanylate kinase inverted-2 (MAGF2). Differential regulation of receptor internalization by MAGF2 and PSD-95[J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(44):41310-41317
- [11] He J, Bellini M, Xu J, *et al.* Interaction with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ligand (CAL) inhibits beta 1-adrenergic receptor surface expression[J]. *J Biol Chem*, 2004, **279**(48):50190-50196
- [12] Pak Y, Pham N, Rotin D. Direct binding of the beta1 adrenergic receptor to the cyclic AMP-dependent guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF leads to Ras activation[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, **22**(22):7942-7952
- [13] He J, Bellini M, Inuzuka H, *et al.* Proteomic analysis of beta1-adrenergic receptor interactions with PDZ scaffold proteins[J]. *J Biol Chem*, 2006, **281**(5):2820-2827