

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)15-1353-04

小鼠 PTA1(CD226)胞膜外两个结构域同时与小鼠 Tage4(CD155)的相互作用

徐向升, 张新海, 庄然, 金伯泉 (第四军医大学基础部免疫学教研室, 陕西 西安 710033)

Two extracellular Ig-like domains of mouse PTA1 (CD226) involved in the interaction with its ligand mouse Tage4 (CD155)

XU Xiang-Sheng, ZHANG Xin-Hai, ZHUANG Ran, JIN Bo-Quan
Department of Immunology, School of Basic Medicine, Fourth
Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To identify the domains of mPTA1 that interact with mouse Tage4 and to study their functions further. **METHODS:** The DNA fragments encoding mTage4, various domains of mPTA1 and human ICAM-1 were amplified by PCR and cloned into the eukaryotic expression vector pDsRed2-N1 or pEGFP-N1 respectively, then transfected into eukaryotic COS-7 cells. Confocal laser scanning microscopy was used to confirm the interaction between mPTA1 and mTage4. **RESULTS:** DNA sequencing confirmed that eukaryotic expression vectors containing mTage4, various domains of mPTA1 or mPTA1/hICAM-1 chimera were constructed successfully. Confocal laser scanning microscopy indicated that mPTA1 truncation and mPTA1/hICAM-1 chimera didn't interact with mTage4, whereas full-length mPTA1 did. **CONCLUSION:** Both extracellular Ig-like domains of mPTA1 are involved in the interaction with its ligand mTage4.

【Keywords】 PTA1; CD226; Tage4; CD155; truncation; chimera; domain

【摘要】目的: 确定 mPTA1 分子与 mTage4 参与相互作用的结构域, 以深入研究这两种分子的功能。方法: 扩增编码 mTage4 全长分子和 mPTA1/hICAM-1 分子不同结构域的 DNA 序列, 构建含 mTage4, mPTA1 不同结构域编码序列的截短体、mPTA1/hICAM-1 荧光蛋白嵌合体分子基因的真核表达载体, 并转染 COS-7 真核细胞, 通过激光共聚焦扫描显微镜研究这两种分子间的相互作用。结果: DNA 序列测定证实成功构建了含 mTage4 全长分子和 mPTA1 截短体、mPTA1/hICAM-1 嵌

合体分子基因的真核表达载体。激光共聚焦扫描显微镜观察结果表明 mPTA1 截短体分子和 mPTA1/hICAM-1 嵌合体分子不能与 mTage4 有效结合, 而 mPTA1 全长分子能与 mTage4 相互作用。结论: mPTA1 分子胞膜外区两个结构域同时参与了与 mTage4 的相互作用。

【关键词】 PTA1; CD226; Tage4; CD155; 截短体; 嵌合体; 结构域

【中图分类号】 R392.11 **【文献标识码】** A

0 引言

人血小板与 T 细胞活化抗原 1 (platelet and T cell activation antigen 1, PTA1) 是 1996 年基因克隆成功的一个新分子^[1], 并在 2000 年获准了新的 CD 编号 (CD226)。CD226 分子属于免疫球蛋白超家族成员, 胞膜外区含有 2 个 V 样结构域。最近已经证实, 脊髓灰质炎病毒受体 (PVR/CD155) 及其家族成员 nectin-2/CD112 是 CD226 的两个配体^[2-3], CD226 与其配体 CD155 和 CD112 相互作用可引起细胞黏附、浸润和细胞信号转导^[4]。本实验室已于 2002 年成功地克隆出编码小鼠 CD226 分子的全长基因, 并且证实存在着不同的异型^[5]。新近已经鉴定小鼠 Tage4 分子是人 CD155 的同源分子^[6], 小鼠 CD226 的配体也是 CD155 (Tage4) 和 CD112 (Nectin-2), 且 mCD226 与其配体的结合诱导了抗原特异性 CD8 + T 细胞共刺激信号的表达^[7]。我们旨在构建含 mCD226 不同结构域的截短体和 mCD226/hICAM-1 嵌合体, 并采用激光共聚焦扫描显微镜的方法研究 mCD226 与其配体 mCD155 分子间的相互作用结构域。

1 材料和方法

1.1 材料 rTaq DNA 聚合酶、pfu DNA 聚合酶、dNTPs、限制性核酸内切酶以及 DNA 连接试剂 I (大连宝生物公司); 质粒提取、胶回收试剂盒 (上海华舜生物工程公司); PCR 引物根据 mCD226, mCD155 和 ICAM-1 的结构特征及真核表达载体 pEGFP-N1 和 pDsRed2-N1 的读框序列和酶切点设计, 由北京奥科生物工程公司合成, 引物对应位置见表 1。克隆基因的序列测定由北京奥科生物工程公司完成。含有小

收稿日期 2006-01-11; 接受日期 2006-03-03

基金项目 国家自然科学基金重点项目 (30030130)

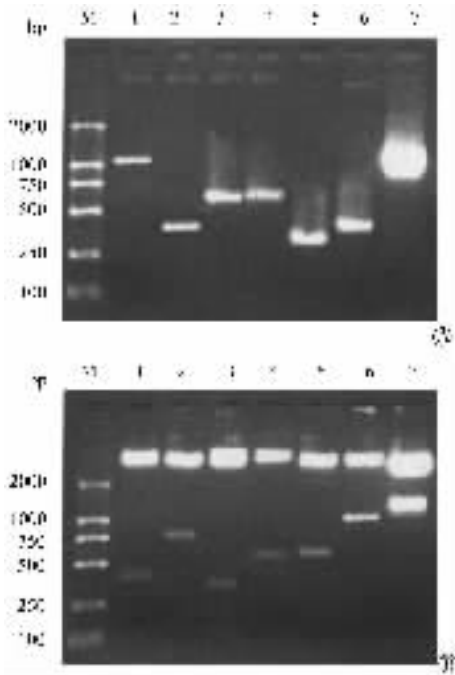
通讯作者 金伯泉。Tel (029) 84774598 Email jimmu_jin@fmmu.edu.cn

作者简介: 徐向升, 硕士生 (导师金伯泉)。Tel (029) 84774531

Email jackeyxu@fmmu.edu.cn

分子)。得到的片段大小与预期一致(图2A)。

2.2 mPTA1 截短体、mPTA1/hICAM-1 嵌合体表及 mTage4 真核表达载体的构建 将各 mPTA1 截短体、mPTA1/hICAM-1 嵌合体真核表达载体及 mTage4 真核表达载体用相应的双酶切反应鉴定,所插入的各片段大小与预期一致(图2B)。DNA 测序结果证实,载体中的插入片段序列与 mPTA1, hICAM-1 和 mTage4 cDNA 中的相应序列完全一致。



A: PCR 扩增 mPTA1 和 hICAM-1 的不同结构域和 mTage4 全长基因
M: DNA DL-2000 marker 1: mPTA1 全长基因; 2: mPTA1 D1; 3: mPTA1 D2; 4: mPTA1 SD2; 5: hICAM-1 D1; 6: hICAM-1 D2; 7: mTage4 全长基因。B: 各重组表达载体的酶切鉴定 M: DNA DL-2000 marker 1: pEGFP-mAD1 (*Bgl* II/*Kpn* I); 2: pEGFP-mAD1-hID5 (*Bgl* II/*Bam* HI); 3: pEGFP-hID1-hID5 (*Bgl* II/*Kpn* I); 4: pEGFP-hID1-mAD2 (*Kpn* I/*Bam* HI); 5: pEGFP-mAD2 (*Bgl* II/*Bam* HI); 6: pEGFP-hID1-mAD2 (*Bgl* II/*Bam* HI); 7: pDsRed2-mCD155 (*Bgl* II/*Eco*R I)。

图2 PCR 扩增 mPTA1, hICAM-1, mTage4 不同片段及各重组表达载体的酶切鉴定

2.3 激光共聚焦扫描显微镜 pEGFP-mAD1 和 pEGFP-mAD2 截短体、pEGFP-hID1-mAD2 和 pEGFP-mAD1-hID5 嵌合体不能与 mTage4 分子相互作用,只有 pEGFP-mPTA1 才能与 mTage4 相互作用(图3)。在相互作用的区域, mPTA1 和 mTage4 分子在局部发生聚集,并且绿色和红色荧光相互叠加形成黄色结合区,而截短体分子和嵌合体分子在细胞膜表面分布均匀,在细胞相互接触区域未发生聚集现象,且无绿色和红色荧光的相互叠加。

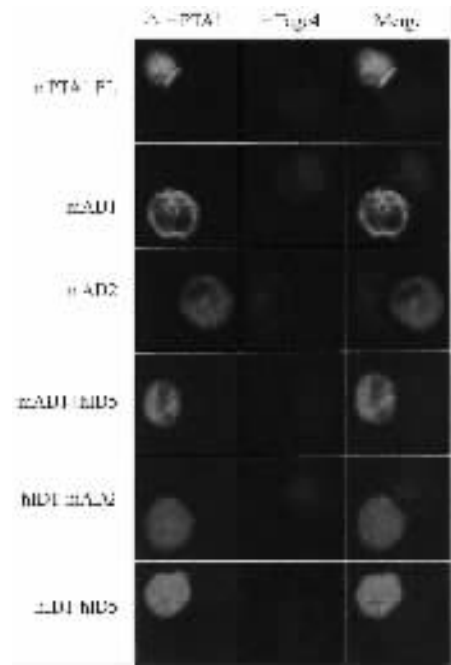


图3 mPTA1 截短体、mPTA1/hICAM-1 嵌合体和 mTage4 的相互作用

3 讨论

CD226 分子在结构上属于免疫球蛋白超家族成员,其胞膜外区含有两个 V 样结构域,这在 IgSF 中是非常特殊的,第一结构域与其功能有关。CD226 主要表达于活化 T 细胞、NK 细胞、巨核/血小板谱系及活化的血管内皮细胞,参与 T 细胞的分化和 NK 细胞的杀伤、血小板的活化与聚焦,并参与其中的信号转导。CD226 与其配体 CD155 和 CD112 相互作用可引起细胞黏附、浸润和细胞信号转导,最终引起体外实验中的固有免疫和适应性免疫应答等细胞反应^[4],发挥了重要的生物学功能。

小鼠 CD226 分子的克隆成功为拓展 PTA1 分子的研究领域,尤其是 PTA1/CD226 体内功能的研究打下了基础。编码完整小鼠 CD226 分子的 cDNA 开放读框有 1002 bp,编码 333 个氨基酸残基,其中,信号肽有 18 个氨基酸残基,胞膜外区有 236 个氨基酸残基,两对保守的半胱氨酸残基(Cys19 和 Cys91,以及 Cys135 和 Cys206)以二硫键形成两个免疫球蛋白 V 样结构域。跨膜区有 21 个氨基酸残基。胞质区有 58 个氨基酸残基,在胞质区具有高度保守的序列 EDIYVNY,该序列为非受体蛋白酪氨酸激酶作用的底物,并为含有 SH2 结构域分子的识别位点^[5]。我室发现小鼠 PTA1 有 3 种不同的剪切形式,其中 isoform2 有 220 个氨基酸残基,在信号肽之后缺失了胞膜外区第一个结构域,编码完整的第二结构域、跨膜

区和胞质区,利用此 mPTA1 异型做为模板,根据 pEGFP-N1 真核表达载体的多克隆位点设计引物,最终构建出的真核表达载体 pEGFP-mAD2 是只在胞膜外表达 mPTA1 第二个结构域的膜蛋白形式。

在蛋白质结构和功能的研究中,截短体和嵌合体的构建是常用的突变手段。通过缺失相应基因序列扩增出 mPTA1 分子和 hICAM-1 分子胞膜外区不同结构域的截短序列,将两种分子各截短序列相互交叉配对进行分子内连接后,然后将 mPTA1 各截短体及 mPTA1/hICAM-1 嵌合体插入真核表达载体后构建细胞膜分子表达的形式。这种通过缺失相应的目的片段来构建突变序列是一种较为简便的策略。

免疫球蛋白超家族(IgSF)黏附分子对炎症反应和免疫应答中的细胞-细胞间相互识别有着非常重要的作用,尤其是许多 IgSF 分子 N 端 IgV 样结构域在功能上显示出极为重要的功能,如 CD2, CD58, CD48, CD22, CD80, CTLA-4, CEACAM1 (BGP), CEACAM5 (CEA), CEACAM6 (NCA) 等^[8-10] 而且在很多情况下,仅其 N 端结构域就构成了与其配体的结合位点。小鼠 PTA1 分子胞膜外区有两个 V 样结构域,这在 IgSF 分子是不多见的。我们在本实验中研究了其与配体分子 mTage4 的相互作用,结果显示 mPTA1 单独的 D1 或 D2 不能与 mTage4 分子发生相互作用,而是包含两个结构域的完整 mPTA1 全长分子才能与其配体 mTage4 分子发生相互作用,提示 PTA1 分子胞膜外区两个 V 样结构域可能同时参与了受体-配体的相互作用,这对深入研究 PTA1 分子功能及其胞内信号转导有着重要意义。

【参考文献】

[1] Shibuya A, Campbell D, Hannum C, et al. DNAM-1, a novel ad-

hesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes [J]. *Immunity*, 1996, 4(6): 573-581.

[2] Bottino C, Castriconi R, Pende D, et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule [J]. *J Exp Med*, 2003, 198(4): 557-567.

[3] Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Onoda Y, et al. Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112) [J]. *Int Immunol*, 2004, 16(4): 533-538.

[4] Shibuya A, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, et al. DNAM-1 (CD226), a two-sword fencer for innate and adaptive immunity [J]. *Curr Med Chem Anti Inflammatory Allergy Agent*, 2005, 4(1): 53-58.

[5] 张新海,李德敏,欧阳为明,等.小鼠 CD226(PTA1)的基因克隆及其异型[J]. *中国免疫学杂志* 2002, 18(6): 371-375.

[6] Ravens I, Seth S, Forster R, et al. Characterization and identification of TAGE4 as the murine orthologue of human poliovirus receptor/CD155 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 312(4): 1364-1371.

[7] Tahara-Hanaoka S, Miyamoto A, Shibuya A, et al. Identification and characterization of murine DNAM-1 (CD226) and its poliovirus receptor family ligand [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329(3): 996-1000.

[8] Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structure, suggested functions and expression in normal and malignant tissues [J]. *Semin Cancer Biol*, 1999, 9(2): 67-81.

[9] Obrink B. CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9(5): 616-626.

[10] Davis SJ, Ikemizu S, Wild M, et al. CD2 and the nature of protein interactions mediating cell-cell recognition [J]. *Immunol Rev*, 1998, 163: 217-236.

编辑 王 睿

· 期刊文摘 · VEGF 和 PCNA 在慢性低氧性肺动脉及高压大鼠主动脉、肺动脉平滑肌细胞中表达

[罗颖,李志超,张齐,张博,刘毅,彭利静,宋祖军. *细胞与分子免疫学杂志* 2006 22(1): 103-105]

目的:研究慢性低氧性肺动脉高压(PAH)发生过程中,血管内皮生长因子(VEGF)及细胞核增殖抗原(PCNA)在体循环血管、肺循环血管平滑肌细胞中的表达。方法:利用低压缺氧舱建立大鼠缺氧性肺动脉高压模型。实验分为3组:即正常氧组、缺氧2wk组和缺氧3wk组。用免疫组化染色和图像分析,检测主动脉、肺动脉主干及肺内小动脉平滑肌细胞中VEGF及PCNA的表达量。结果:VEGF在正常氧组大鼠的主动脉、肺动脉主干及肺内小动脉平滑肌内均有表达,缺氧组大鼠肺动脉主干及肺内小动脉平滑肌细胞内VEGF的表达明显增强并随着缺氧时间的延长而增加,主动脉平滑肌内VEGF的表达量无明显变化。PCNA在正常氧组大鼠的主动脉、肺动脉主干及肺内小动脉平滑肌内均有微弱表达,但缺氧时只有肺小动脉平滑肌内其表达量增加,主动脉、肺动脉主干平滑肌内PCNA的表达量无明显差别。结论:在缺氧性肺动脉高压的发生过程中,VEGF在体循环血管、肺循环血管平滑肌细胞中的表达量具有差异性,提示其可能在肺动脉高压形成过程中起重要作用。