

基因家庭 Pax7 与 Ubc9 基因编码蛋白相互作用研究*

刘乙蒙¹, 栾治东², 刘超², 李明洋¹, 肖建英¹

摘要:目的 了解 Pax7 的重要生物学功能, 筛选并验证与其相互作用的 Ubc9 基因编码蛋白, 并明确 Pax7 与小泛素相关修饰蛋白(SUMO)的关系, 为进一步研究 Pax7 的作用机制奠定基础。方法 酵母双杂交系统筛选出与 Pax7 相互作用的基因 Ubc9; GST-pull down 方法验证 Pax7 与 Ubc9 在体外相互作用; Western blot 方法检测 Pax7 的 SUMO 化状态; 免疫共沉淀方法验证 Pax7 与 SUMO 的关系。结果 Pax7 和 Ubc9 在酵母中存在相互作用; Pax7 和 Ubc9 在体外可特异性结合; 在 Ubc9 存在的条件下, Pax7 呈现 SUMO 化状态, 且可与 SUMO 相互作用; Pax7 在鸡胚胎中也呈现 SUMO 化状态。结论 Pax7 可以与 Ubc9 相互作用, 且这种作用与 SUMO 有关。

关键词: Pax7; Ubc9; 小泛素相关修饰蛋白(SUMO)

中图分类号: R 293 文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2014)09-1173-03 DOI: 10.11847/zgggws2014-30-09-21

Interaction between gene family Pax7 and gene coding protein Ubc9

LIU Yi-meng*, LUAN Zhi-dong, LIU Chao, et al (* Department of Biochemical and Molecular Biology, Liaoning Medical College, Jinzhou, Liaoning Province 121001, China)

Abstract: Objective To explore biological function of gene family Pax7, its interaction with gene coding protein Ubc9, and the relationship between Pax7 and small ubiquitin-related modifier(SUMO). **Methods** Yeast two-hybrid was applied to screen out Ubc9 interacted with Pax7. The interaction between Pax7 and Ubc9 *in vitro* was confirmed with glutathione-S-transferase(GST) pull-down. Western blot was used to detect the SUMOylation of Pax7. The interaction between Pax7 and SUMO was demonstrated with co-immunoprecipitation(Co-IP). **Results** There was an interaction between Pax7 and Ubc9 in yeast. Pax7 can bind to Ubc9 specially *in vitro*. Pax7 could be SUMOylated in the presence of Ubc9 and it also could interact with SUMO. **Conclusion** The results demonstrate that Pax7 interacts with Ubc9, and the interaction leads to the SUMOylation of Pax7.

Key words: Pax7; Ubc9; SUMO

Pax 基因家族在胚胎发育、器官形成及成熟组织的分化和再生起着重要的调控作用, 主要有 9 个基因组成, 根据其功能域结构的不同又可分为 4 组, 而每组成员之间在功能和表达上都有部分重复^[1-2]。Pax7 隶属于 Pax 家族的 III 组, 与中枢神经系统、神经嵴和肌源性前体细胞的发育有着密切关系^[3]。为进一步揭示 Pax7 的生物学功能和作用机制, 本研究应用酵母双杂交系统筛选出与 Pax7 相互作用的 Ubc9。Ubc9 是小泛素相关修饰蛋白(small ubiquitin related modifier, SUMO)结合酶 E2, 负责将激活的 SUMO 转移到靶蛋白上。本研究旨在验证 Pax7 与 Ubc9 的相互作用并阐明其相互作用对 Pax7 的 SUMO 化修饰影响, 为进一步研究 Pax7 在神经嵴和肌肉形成的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂 DH5 α 感受态细胞(日本 TaKaRa 公司), 酵母表达载体 pGBKT7(pBD)、pGADT7(pAD)、酵母菌株 Y2H, 鸡 cDNA 文库(美国 Clontech 公司); 293T 细胞由本实验保存, 所用质粒均由本实验构建保存。抗 HA/Myc 单克隆抗体(美国 BD Biosciences 公司), HRP 标记的山羊抗兔 IgG(中国北京中杉金桥生物技术有限公司), GST 树脂(美国 GE 公司)。

1.2 方法

1.2.1 酵母双杂交筛选及共转化 酵母双杂交筛选方法及共转化过程参见文献[4]。

1.2.2 GST pull-down 试验 将吸附有 GST 融合蛋白的凝胶 20 μ L 加入离心管中, 用 PBS 洗涤 3 次后加入带有 HA 标签的 Pax7 真核表达的细胞裂解上清液, 4 $^{\circ}$ C 结合 3 h, 3 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,

* 基金项目: 辽宁省教育厅一般项目资助(L2012303)

作者单位: 1. 辽宁医学院基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 辽宁 锦州 121001; 2. 辽宁医学院基础医学院发育生物学教研室

作者简介: 刘乙蒙(1988-), 女, 沈阳人, 硕士在读, 研究方向: 胚胎发育的分子机制。

通讯作者: 肖建英, E-mail: lyxiaojy@163.com

数字出版日期: 2014-8-8 9:01

数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20140808.0901.015.html>

弃上清。再用裂解液洗珠子 4 次,吸净上清。用 2 × SDS-PAGE 上样缓冲液溶剂沉淀,煮沸 5 min, 然后进行 Western blot 免疫印迹分析。

1.2.3 免疫共沉淀 (Co-IP) 试验 将 Pax-Myc、Ubc9、HA-SUMO 分别共转染 293T 细胞。48 h 之后收集细胞样品,1 500 r/min,4 °C,离心 3 min,弃上清,加入 1 mL 预冷的 PBS 重新悬浮细胞,1 500 r/min,4 °C,离心 3 min,弃上清,细胞沉淀加入 100 μL 细胞裂解液,冰上裂解 30 min 后,12 000 r/min,4 °C,离心 20 min,收集上清,分别加入 HA-beads 和 Myc-beads,4 °C 翻转孵育过夜。收集样品 5 000 r/min,4 °C,离心 1 min,弃上清,用细胞裂解液重悬。

1.2.4 Western blot 样品经 10% SDS-PAGE 电泳分离,然后半干转移法转至硝酸纤维素膜上;5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后,以相应的一抗 4 °C 过夜,以 HRP 酶标抗体作为二抗室温作用 2 h,洗膜 3 次,ECL 化学发光显影成像。

2 结果

2.1 Pax7 与 Ubc9 在酵母中的相互作用 (图 1) 为进一步研究调节 Pax7 功能的分子机制,利用酵母双杂交系统筛选与 Pax7 相互作用蛋白。将 Pax7 作为诱饵质粒,从鸡 cDNA 文库中钓取了 Ubc9 基因的全长 cDNA 序列。Pax7 和 Ubc9 均无自激活活性,pBD-Pax7 和 pAD-Ubc9 共转化的酵母在 SD/-Ade-His-Leu-Trp (SD/-4) 培养基上能够生长,结果表明 Pax7 蛋白和 Ubc9 蛋白在酵母中存在相互作用。

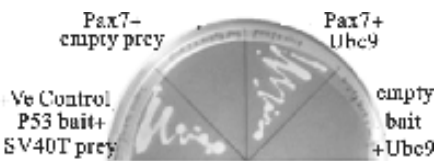
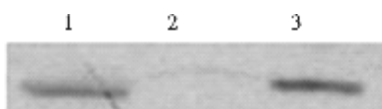


图 1 酵母双杂交系统试验验证 Pax7 与 Ubc9 存在相互作用

2.2 体外验证 Pax7 与 Ubc9 在体外的相互作用 (图 2) 将 GST-Pax7 或 GST 纯化蛋白分别与 Ubc9 混合后进行 GST pull-down 试验。GST-Pax7 能与 Ubc9 结合,而阴性对照 GST 不能与 Ubc9 结合,说明在体外 Pax7 能特异性结合 Ubc9。



注:1:10% input;2:GST;3:GST - Pax7。

图 2 GST-pull down 验证 Pax7 与 Ubc9 相互作用

2.3 验证 Pax7 的体内 SUMO 化状态 (图 3) 由于 Ubc9 是一种重要的小泛素样修饰蛋白结合酶,

参与整个 SUMO 化过程,其负责把激活的 SUMO 转移到靶蛋白上。推测 Pax7 有可能被 SUMO 化修饰,并通过执行 SUMO 化实验来确证。将 293T 细胞与带有 Myc 标签的 Pax7 (Pax7-Myc)、Ubc9 和 SUMO 分别共转染。细胞裂解液用或者不用可以稳固 SUMO 化连接的 NEM 处理,利用抗 myc 抗体做 Western blot 分析。Pax7 在 SUMO 和 NEM 的存在下呈现出更低的迁徙率 (约 70 kDa),这与 SUMO 化修饰的 Pax7 大小相一致。

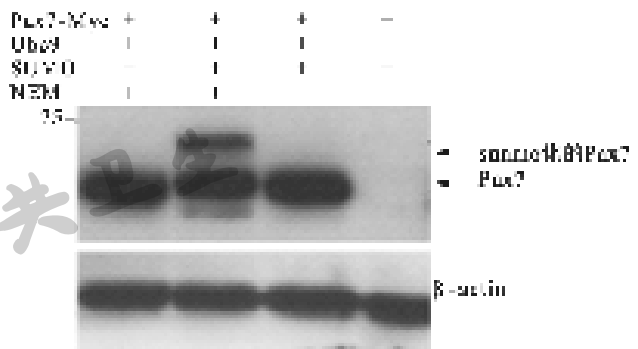


图 3 Myc 抗体检测 Pax7 的表达

2.4 免疫共沉淀 (Co-IP) 方法验证 Pax7 和 SUMO 相互作用 (图 4) 为进一步验证 Pax7 与 SUMO 化修饰的关系,我们将带有 HA 标签的 SUMO (HA-SUMO) 和带 Myc 标签的 Pax7 (Pax7-Myc) 分别和 Ubc9 共转染 293T 细胞,细胞裂解液分别用或者不用 NEM 处理。利用抗 HA/Myc 抗体免疫沉淀,再用抗 Myc/HA 抗体做 Western blot 分析。Pax7 在 Ubc9 的存在下可以 SUMO 特异性结合,且 Pax7 处于 SUMO 化修饰的状态。

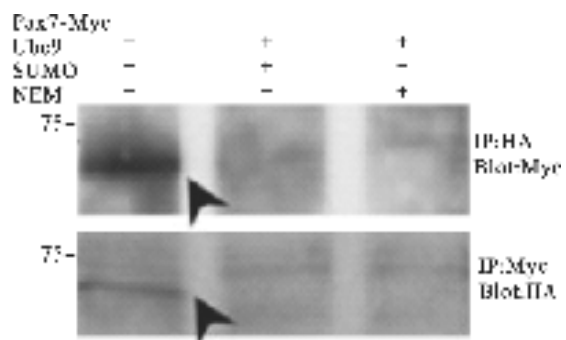


图 4 免疫共沉淀验证在 Ubc9 存在下 Pax7 与 SUMO 的相互作用

2.5 Pax7 在体内的 SUMO 化修饰 (图 5) 为了进一步研究 Pax7 在体内是否被 SUMO 化,提取鸡胚 8 阶段的所有蛋白进行 Western blot 实验。在 NEM 存在的情况下,出现额外的一条迁徙率更低的条带 (约 70 kDa)。说明在 NEM 的存在下,Pax7 呈现一种 SUMO 化修饰的状态。

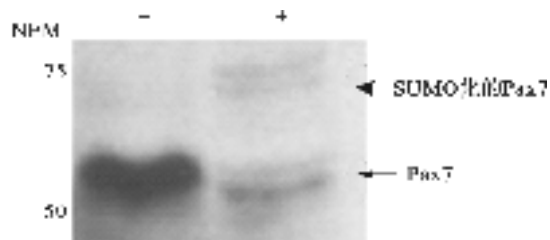


图 5 Pax7 抗体检测 Pax7 在鸡胚内的 SUMO 化状态

3 讨论

Pax7 在脊椎动物骨骼肌的发育、成熟以再生的前体细胞分化中具有重要的作用^[5-7]。然而调控 Pax7 功能的分子机制尚不明确。本研究利用酵母双杂交系统,以 Pax7 蛋白为诱饵,从鸡 cDNA 文库中筛选出与其相互作用的蛋白 Ubc9,并通过 GST-pull down 验证两者在体外的相互作用。Ubc9 是 SUMO 结合酶 E2,介导蛋白质的 SUMO 化过程。SUMO 化在加强蛋白的稳定性、DNA 的修复与复制、有丝分裂、减数分裂、核质转运等过程中都发挥着重要的作用^[8]。SUMO 蛋白广泛存在于真核生物中,是一类高度保守的小蛋白家族,有研究表明,Ubc9 作为 SUMO 化修饰过程中的 E2 结合酶,能够促进 SUMO 化修饰的发生而调节靶蛋白的转录活性,其主要是通过 SUMO 化 E2 结合酶而发挥作用^[9]。本研究在 293T 细胞中共转染 Pax7、Ubc9 和 SUMO 后,检测到了 Pax7 发生 SUMO 化的条带,这证明 Pax7 可能是 SUMO 化修饰的靶蛋白,与以往的研究相一致^[9]。相关研究表明,Ubc9 基因全长 cDNA 序列可编码 158 个氨基酸,其第 93 位的半胱氨酸是 Ubc9 与 SUMO 的结合位点^[10]。本研究也通过免疫共沉淀实验来确定了 Pax7 与 SUMO 的相互作用进一步验证了 Ubc9 与 SUMO 可以结合。此外,揭示了在鸡胚 8 阶段时,Pax7 在稳固 SUMO 化修饰的情况下也呈现了 SUMO 化的修饰状态。这些结果都提示,Pax7 的一些生物学功能可能与

SUMO 化修饰有密切的关系。

综上所述,利用酵母双杂交系统筛选到 Ubc9 与 Pax7 相互作用,并通过 GST-pull down 验证。进一步研究发现,Ubc9 通过与 Pax7 的相互作用而促使 Pax7 发生 SUMO 化修饰,且这种 SUMO 化修饰在体内是广泛存在的。然而 Pax7 的这种 SUMO 化修饰在神经嵴及肌肉形成的作用以及发生 SUMO 化修饰的相关结构域尚未明确,有待进一步研究。

参考文献

- [1] Paixão-Córtés VR, Salzano FM, Bortolini MC. Evolutionary history of chordate PAX genes; dynamics of change in a complex gene family[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73560.
- [2] Maczkowiak F, Matéos S, Wang Ee, et al. The Pax3 and Pax7 paralogs cooperate in neural and neural crest patterning using distinct molecular mechanisms, in *Xenopus laevis* embryos[J]. *Developmental Biology*, 2010, 340(2): 381–396.
- [3] von Maltzahn J, Jones AE, Parks RJ, et al. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(41): 16474–16479.
- [4] 罗星, 张峪涵, 于娜, 等. 神经突起因子酵母双杂交诱饵质粒构建和转化[J]. *中国公共卫生*, 2006, 22(4): 444–445.
- [5] Vadasz S, Marquez J, Tulloch M, et al. Pax7 is regulated by cMyb during early neural crest development through a novel enhancer[J]. *Development (Cambridge, England)*, 2013, 140(17): 3691–3702.
- [6] Murdoch B, DelConte C, García—Castro MI. Pax7 lineage contributions to the mammalian neural crest[J]. *PLoS One*, 2012, 7: e41089.
- [7] Betteres E, Liu Y, Kjaeldgaard A, et al. Analysis of early human neural crest development[J]. *Developmental Biology*, 2010, 344(2): 578–592.
- [8] Voelkel-Meiman K, Taylor LF, Mukherjee P, et al. SUMO localizes to the central element of synaptonemal complex and is required for the full synapsis of meiotic chromosomes in budding yeast[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(10): e1003837.
- [9] Capili AD, Lima CD. Structure and analysis of a complex between SUMO and Ubc9 illustrates features of a conserved E2–Ubl interaction[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 369(3): 608–618.
- [10] Klug H, Xavier M, Chaugule VK, et al. Ubc9 sumoylation controls SUMO chain formation and meiotic synapsis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular Cell*, 2013, 50(5): 625–636.

收稿日期: 2014-04-03

(刘铁编辑 吴少慧校对)