维普资讯 http://www.cqvip.com

第17卷 3期
2002年8月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

17(3):230－233
August 2002

腺病毒 E1B 55kD 癌蛋白与 hDaxx 的相互作用*

万艳平[1], 吴移谋[1**], 谭立志[1], 廖端芳[2]
(1.南华大学基础医学院微生物学教研室,湖南衡阳,421001;2.南华大学基础医学院药理学教研室,湖南衡阳,421001)

Interaction of Adenovirus E1B 55kD Oncoproteins with hDaxx

WAN Yan-ping[1], WU Yi-mou[1**], TANG Li-zhi[1], LIAO Duan-fang[2]
(1. *Department of Microbiology, School of Basic Medicine, Nanhua University, Hengyang* 421001, *China*;
2. *Department of Pharmacology, School of Basic Medicine, Nanhua University, Hengyang* 421001, *China*)

Abstract: To question the reason of co-localization of hDaxx and PML in PODs disrupted by Adenovirus(Ad) E1B 55-kilodalton oncoproteins(Ad E1B 55kD), the interaction of Ad E1B 55kD with hDaxx was analyzed by the yeast two-hybrid assay, and the direct binding of Ad E1B 55kD with hDaxx was studied by coimmunoprecipitation reaction *in vivo* or *in vitro*. The results show that Ad E1B 55kD oncoproteins interact with hDaxx by binding the C-terminus 58 amino acids of Ad2 E1B 55kD or the full length of Ad12 E1B 55kD. Ad2/5 or Ad12 E1B 55kD directly binds hDaxx *in vivo* or *in vitro*.

Key words: Ad E1B oncoproteins; hDaxx; Yeast two-hybrid assay; Interaction

摘要: 为了探讨腺病毒(adenovirus, Ad)E1B 55kD 癌蛋白(Ad E1B 55kD)打破 hDaxx 和 PML 共定位细胞核的作用机制,本文利用体内外共免疫沉淀反应研究 Ad E1B 55kD 与 hDaxx 的结合反应,并通过酵母双杂交体系测定两种蛋白质的相互作用及其作用的氨基酸残基序列。结果显示:Ad2 E1B 55kD 通过 C 端 58 个氨基酸(aa)与 hDaxx 结合并发生相互作用。Ad12 E1B 55kD 与 hDaxx 结合需全序列 aa 及其构象。共免疫沉淀反应和 Western blot 结果证实 Ad2/5 或 Ad12 E1B 55kD 能在体内外与 hDaxx 直接结合。

关键词: 腺病毒 E1B 55kD 癌蛋白;hDaxx;酵母双杂交测定;相互作用
中图分类号:R37 **文章标识码**:A **文章编号**: 1003-5125(2002)03-0230-04

Ad 感染细胞后,引起早幼粒细胞性白血病蛋白(promyelocytic leukemia protein, PML)癌基因结构域(PML oncogenic domains, PODs)的形态发生显著性改变,由球状变成轨道状。Ad E1B 55kD 与 PML 短暂地定位 PODs,随后转位到病毒包涵体内[1]。hDaxx 是一种新型转录抑制蛋白,它与 PML 相互作用共定位 PODs,关系到 PODs 球状结构形成、维持及其它蛋白质的定位[2]。Ad5/12 E1B 55 kD 与 hDaxx 共定位细胞核,且打破 hDaxx 与 PML 共定位 PODs[3]。为了研究打破这种共定位的机制,本文利用酵母双杂交系测定了 Ad2/12 E1B 55kD 与 hDaxx 的相互作用,通过体内外共免疫沉淀试验测定两种蛋白质的结合反应。

1 材料与方法

1.1 主要材料

限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶购于 Biotech 公司。免抗 Daxx 抗体、抗 Ad12 E1B 55kD

收稿日期:2002-01-25,修回日期:2002-04-01
* 基金项目:国家教育部高等学校骨干教师资助计划资助(200065)
作者简介:万艳平(1965-),女,湖南衡阳县籍,副教授,硕士,从事病毒致癌机制及其疫苗的研究。
** 通讯作者:吴移谋(1954-),男,湖南汨罗籍,教授,硕士,主要研究方向为微生物学与免疫学。
Correspondence author. E-mail: wyy927@yahoo.com.

维普资讯 http://www.cqvip.com

抗体、鼠抗GST抗体及辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG购于Santa Cruz公司。鼠抗Ad2/5 E1B 55kD 2A6抗体和Ad2或Ad12 E1B 55kD纯化蛋白、Ad2或Ad12 E1B 55kD及其删除突变体酵母表达质粒由刘跃博士惠赠[4]。hDaxx纯化物由本室制备[5]。

1.2 质粒pGAD/hDaxx的购建

质粒pGBDU/hDaxx由本室构建[5]。将其*Eco*R I酶切片段融合到载体pGAD-C1相应酶切位点,经酶切鉴定方向正确后得质粒pGAD/hDaxx,N端附有Gal4 AD编码基因片段。

1.3 酵母双杂交系测定

用标准醋酸锂转化方法将质粒转化酵母菌株PJ69-4A[5]。被转化的是pGAD/hDaxx分别与pGBDU/Ad2ΔE1B(aa473～495)、pGBDU/Ad2ΔE1B(aa155～495)、pGBDU/Ad2ΔE1B(aa1～437)、pGBDU/Ad12 E1B 55KD(aa1～483)、pGBDU/Ad12ΔE1B(aa1～408)、pGBDU/Ad12ΔE1B(aa1～204)、pGBDU/Ad12ΔE1B(aa204～483)的混合质粒。转化产物生长在含5mmol/L 3-氨基三唑(3-AT)缺组氨酸(histidine, His)酵母菌培养基(-His)或缺腺嘌呤(Adenine, Ade)酵母菌培养基(-Ade),测定两种蛋白质的相互作用。

1.4 共免疫沉淀反应(COIP)

1.4.1 体内COIP G401-CC3细胞来源于稳定转染了Ad12E1B 55 kD蛋白质表达体的G401细胞,G401细胞为肾癌杆状细胞;293细胞为转化了Ad5DNA片段的人胚肾细胞,该细胞表达Ad5 E1B 55 kD。在含10%小牛血清(FBS)、100u/mL青霉素、0.1μg/mL链霉素的达尔伯氏改良基础培养基(Dulbecco's modified essential medium, DMEM)中,G401-CC3细胞另加15μg/mL次黄嘌呤、10μg/mL胸苷、250μg/mL G418于37℃、5%CO_2条件下培养细胞。293、G401-CC3细胞培养48h后,用冷的PBS洗细胞二次,再用缓冲液B[5]收获细胞。适量的细胞裂解液加20μL蛋白质G琼脂糖,置4℃缓慢旋转1h,离心取上清。293细胞裂解液加2A6抗体、G401-CC3细胞裂解液加抗Ad12 E1B 55kD抗体,每管加入蛋白质G琼脂糖20μL,抗GST抗体作阴性对照。将其置4℃缓慢旋转1h,用缓冲液B洗沉淀物4次。沉淀物加20μL SDS样本缓冲液,阳性对照为适量细胞裂解上清液,作Western blot。一抗为兔抗Daxx抗体,二抗为HRP-羊抗兔IgG。

1.4.2 体外COIP 0.5μg hDaxx纯化物与0.5μg Ad2/12 E1B 55kD纯化物混合,Ad2 E1B 55kD加抗体2A6、Ad12 E1B 55kD加抗Ad12 E1B 55kD抗体,每管加500μL缓冲液B及20μL蛋白质G琼脂糖,阴性对照为hDaxx与抗体2A6或抗Ad12 E1B 55kD抗体。将其置4℃缓慢旋转1h,用缓冲液B洗沉淀物4次。沉淀物加20μL SDS样本缓冲液,50ng hDaxx纯化物作阳性对照,同上作Western blot。

2 结果

2.1 酵母双杂交系测定

pGAD/hDaxx分别与质粒pGBDUC/Ad2/12 E1B 55kD及删除突变体,共转化PJ69-4A后,在含5mmol/L 3-AT的-His平板上酵母菌生长结果(见图1)。-Ade平板结果与-His平板结果相同,结果未显示。Ad2 E1B 55kD删除突变体aa155～495、aa437～495与hDaxx结合并发生相互作用,而删除突变体aa1～437不与hDaxx结合,即Ad2 E1B 55KD通过C端58个aa与hDaxx结合并发生相互作用[图1C(1)-(3)]。全长Ad12 E1B 55kD与hDaxx结合并发生相互作用,Ad12 E1B 55kD删除突变体aa1～408、aa1～204、aa204～483不与hDaxx结合,即Ad12 E1B 55kD与hDaxx结合发生相互作用需全序列aa及其构象[图1C(4)-(7)]。

2.2 Ad E1B 55kD与hDaxx体内结合

用缓冲液B收获293与G401-CC3细胞,细胞裂解上清液用G蛋白琼脂糖处理后,作COIP, Western blot结果见图2。抗Ad5或Ad12 E1B 55kD抗体能将hDaxx一起沉淀下来,Ad5或Ad12 E1B 55kD在体内与hDaxx直接结合(图2 line3, 6)。

2.3 Ad E1B 55kD与hDaxx体外结合

hDaxx与Ad2或Ad12 E1B 55kD纯化物作体外COIP, Western blot结果见图3。抗Ad2或Ad12 E1B 55kD抗体能将hDaxx一起沉淀下来,Ad12或Ad2 E1B 55kD在体外与hDaxx直接结合(图3 line3, 6)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

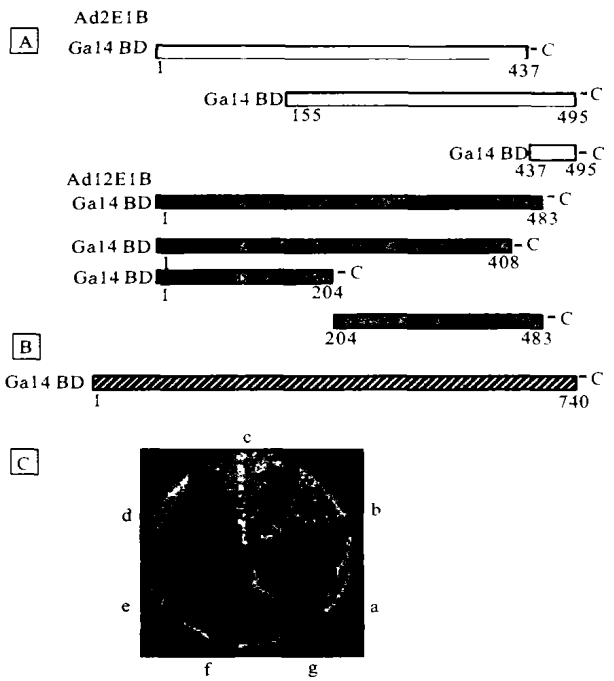

图1 Ad E1B 55kD与hDaxx相互作用

A,N端融合有Gal4 BD的Ad2 E1B 55kD删除突变体或Ad12 E1B 55kD全序列或删除突变体结构示意图;B, N端融合有Gal4 AD的全序列hDaxx结构示意图;C,共转化的酵母菌株在含5mmol/L3-AT缺His平板上生长结果:转化的质粒是pGAD/hDaxx分别与pGBDU/(a) Ad2ΔE1B(aa 1－437), (b) Ad2ΔE1B(aa 155－495), (c) Ad2ΔE1B(aa 437－495), (d) Ad12ΔE1B (aa 1－204), (e) Ad12ΔE1B (aa 1－408), (f) Ad12ΔE1B (aa 204－483), (g) 全序列Ad12 E1B(aa 1－483)。

Fig.1 hDaxx interacts with Ad E1B-55kD proteins

Results of two-hybrid assays between various Ad E1B 55kD constructs and hDaxx. A, Representation of Ad2 E1B 55-kD deletion mutants along with Ad12 E1B full length and deletion mutants, all fused to the Gal4 DNA-binding domain(BD); B, hDaxx full length fused to the Gal4 activation domain(AD); C, Co-transformants: Daxx fused to the gal4 AD along with(a) Ad2ΔE1B(aa 1－437), (b) Ad2ΔE1B(aa 155－495), (c) Ad2ΔE1B (aa 437－495), (d) Ad12Δ(E1B (aa 1－204), (e) Ad12ΔE1B (aa 1－408), (f) Ad12ΔE1B (aa 204－483) and (g) full length Ad12 E1B(aa 1－483), each fused to the Gal4 BD, were grown in the absence of histidine but in the presence of 5mmol/L3-aminotriazol.

3 讨论

Ad E1B 55kD是一种多功能磷酸蛋白,它结合p53氨基端,抑制其转录激活功能,使细胞发生转化[6]。而p53羧基端能与hDaxx结合并发生相互作用[5]。本文利用酵母双杂交系测定发现,Ad2 E1B 55 KD通过C端58个氨基酸残基与hDaxx结合并发生相互作用;Ad12 E1B 55-KD与hDaxx结合发生相互作用需要全序列氨基酸及其构象。来自

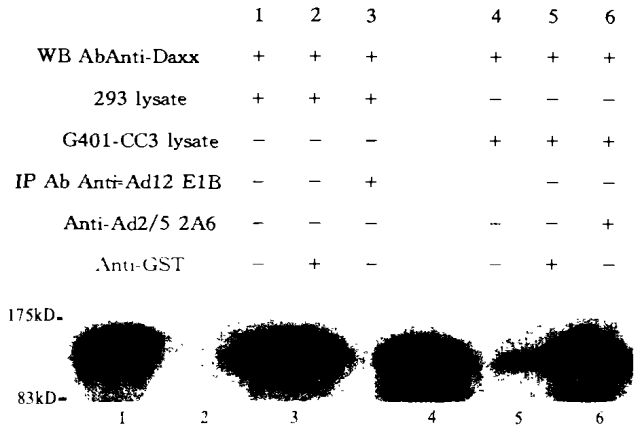

图2 Ad5或Ad12 E1B 55kD与hDaxx在体内的直接结合反应

1、4分别为293、G401-CC3细胞裂解液作阳性对照,2与5为阴性对照,3为293细胞与抗体2A6作IP,6为G401-CC3细胞与anti-Ad12 E1B作IP。Western blot抗体为抗Daxx抗体。

Fig.2 Binding of hDaxx with Ad5 or Ad12 E1B 55kD *in vivo* assay

Ad5/12 E1B 55 kD proteins bind to hDaxx *in vivo*. Cells lysate of 293 cells was subjected to IP with antibody 2A6 (lane3) or anti-GST (lane2); Cells lysate of G401-CC3 cells was subjected to IP with anti-Ad12 E1B(lane6) or anti-GST(lane5). Lane1 is cells lysate of 293 cells which serves as control. Lane4 is cells lysate of G401-CC3 cells which serves as control.

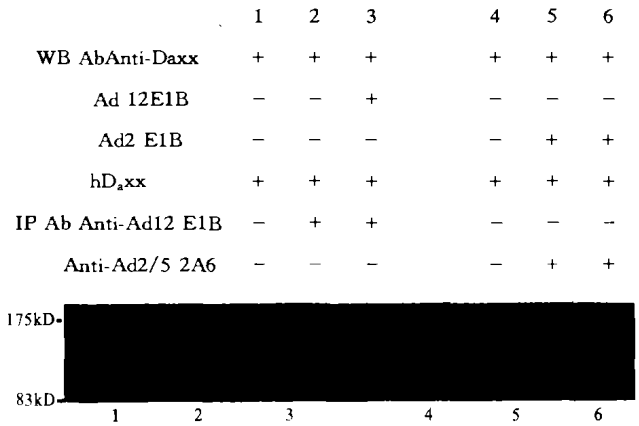

图3 Ad2或Ad12 E1B 55kD与hDaxx在体外的直接结合反应

1、4为hDaxx作阳性对照,2、5为阴性对照,3、6分别是纯化的Ad2或Ad12 E1B 55 kD与hDaxx作IP后,Western blot结果。

Fig.3 Binding of hDaxx and Ad2/12 E1B 55kD *in vitro* assay

Ad2/12 E1B 55 kD proteins bind to hDaxx *in vitro*. Purified Ad2/12 E1B 55 kD protein(500ng), hDaxx(500ng) were incubated and subjected to IP with different antibodies indicated on the top of each panel. The precipitates were subjected to Western blot analysis with indicated antibodies. Lane1 and lane4 are hDaxx(50ng) which serves as positive control.

维普资讯 http://www.cqvip.com

急性早幼粒细胞性白血病(APL)病人血液中的NB4细胞,PML与维甲酸受体α(RARα)结合形成PML-RARα复合物,该复合物能破坏PODs结构,打破PML与hDaxx等蛋白质在PODs的定位,使这些与PML相结合的蛋白质定位到PODs以外的核区。hDaxx则分散在含有PML-RARα复合物的微粒体内。通过维甲酸(RA)或三氧化二砷(As_2O_3)处理NB4细胞,该细胞恢复PODs,此时,hDaxx也向PODs集中[7]。Ad5/12 E1B 55 KD与hDaxx共定位细胞核,且打破hDaxx与PML共定位PODs[3],这可能是因为Ad5/12 E1B 55 KD与hDaxx或PML直接结合并发生相互作用的结果。而Ad2/12 E1B 55 KD与hDaxx在体内外的直接结合,为研究Ad E1B 55kD癌蛋白与hDaxx结合发生相互作用后的效果,以及探讨Ad感染细胞后引起细胞转化的机理提供了一定的实验基础。目前,我们正在研究Ad2/12 E1B 55kD对hDaxx转录抑制作用的影响,并将进一步研究他们及p53在细胞凋亡与细胞转化中的作用。

参考文献

[1] Punga T, Akusjarvi G. The adenovirus-2 E1B-55K protein interacts with a mSin3A/histone deacetylase 1 complex[J]. FEBS Letters, 2000, 476:248-252.

[2] Maul GG, Negorev PB, Ishov AM. Review: Properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs[J]. J Struct Biol, 2000, 129: 278-287.

[3] 万艳平,谭立志,刘传爱,等. 腺病毒E1B55ku癌蛋白打破hDaxx与PML在细胞核的共定位[J]. 微生物学杂志,2001,21:46-48.

[4] Liu Y, Colosimo AL, Yang XJ, *et al*. Adenovirus E1B 55-kilodalton oncoprotein inhibits p53 acetylation by PCAF[J]. Mol Cell Bio, 2000, 20:5540-5553.

[5] 谭立志,万艳平,吴移谋,等. hDaxx与细胞肿瘤抑制子p53在体内外的相互作用[J]. 微生物学杂志,2001,21:32-34.

[6] Kaelin WG. The emerging p53 gene family[J]. J Natl Cancer Inst, 1999, 91:594-598.

[7] Sternsdorf T, Grotzinger T, Jensen K, *et al*. Nuclear dots: actors on many stages[J]. Immunobiology, 1997, 198: 307-331.

欢迎订阅2003年《武汉植物学研究》

《武汉植物学研究》为科学出版社出版、国内外公开发行的植物学综合性学术期刊。主要报道我国植物学及各分支学科的原始研究论文,以及植物学研究的新技术、新方法,酌登专题综合评述和研究简报、重要书刊评介、学术动态等。主要读者对象为从事植物学研究的科技人员、大专院校师生,以及相关学科、包括农、林、牧、医药、轻工、水产和环保等方面的工作者。

本刊为中国自然科学核心期刊、中国科学院优秀期刊,被《中国科学引文索引》、《中国生物学文摘》和《中国学术期刊综合评价库》等作为来源期刊和核心期刊收录,并被中国科技信息所列为《中国科技论文统计与分析》的统计源期刊。

本刊为双月刊,大16开本,双月末出版。国内定价8.00元,全年48.00元。邮发代号38-103,全国各地邮局均可订阅。如漏订,本刊编辑部可办理邮购。除现刊外,尚有部分过刊可出售,价格从优,欲购者请与我编辑部联系。

编辑部地址:武汉市武昌磨山中国科学院武汉植物研究研究所内(或武汉市74006信箱);邮政编码:430074,电话:027-87510755;E-mail:editor@rose.whiob.ac.cn