CD2 胞内区结合蛋白的分子克隆与鉴定

邵源^① 肖声^② 翟文静^① 李董^① 刘彦信^② 刘士廉^② 郑德先^{②*}

(^①中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所实验血液学国家重点实验室, 天津 300020; ^②中国医学科学院中国协和医科大学基础医学研究所医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005. * 联系人)

摘要 为了探讨 CD2 分子的信号传递功能, 以编码 CD2 胞内区(Thr211-Gln336)肽段的 cDNA 为“钓饵”, 采用酵母双杂交系统从激活的人 T 淋巴细胞 cDNA 文库中筛选与之相互作用蛋白的 cDNA 序列. 并采用免疫共沉淀法鉴定该蛋白在体内与 CD2 胞内区结合的特异性. 克隆并鉴定了一个与 CD2 胞内区特异性结合的胞内蛋白分子, 与 *v-fos* 转化效应蛋白(Fte-1)同源. Fte-1 参与细胞转化、生长、蛋白合成及向线粒体转运蛋白质. 蛋白数据库检索表明, Fte-1 具有蛋白激酶 PKC 的结合与作用位点, 提示 Fte-1 参与 CD2 分子介导的信号传递.

关键词 CD2 胞内区 信号传递 酵母双杂交系统 Fte-1

CD2 分子, 又称 E 受体, 分布于胸腺细胞、成熟 T 淋巴细胞和大部分 NK 细胞表面, 在淋巴细胞识别、粘附、发育分化和激活方面具有重要作用^[1]. CD2 分子的胞内区具有调节细胞识别、粘附和传递 T 细胞激活信号两种不同的功能^[2]. CD2 与其配体 CD58(LFA-3)、CD48 结合可传递外来刺激信号, 参与胸腺细胞的分化、成熟和 T 淋巴细胞的激活及增殖过程. 其激活途径在胸腺细胞分化过程中起着重要的作用. 使用不同的抗 CD2 单克隆抗体处理 T 细胞, 可引起 T 细胞不同的应答反应. 以 T11₂ 和 T11₃ 处理 T 淋巴细胞, 引起 T 细胞激活^[3], 而以 T11₁ 和 D66 处理 T 淋巴细胞引起 T 细胞激活后凋亡(activated-induced cell death, AICD)^[4], 其分子机制尚不明. 为了深入研究 CD2 分子传递不同刺激信号的分子机制, 采用酵母双杂交系统(yeast two-hybrid system)克隆并鉴定 CD2 胞内区(CD2c)的结合蛋白(CD2cBP), 并研究其功能, 可为 CD2 的免疫学功能研究及 CD2 相关的免疫缺陷病的诊断治疗提供新的资料.

1 材料与方法

(i) CD2c 酵母重组表达载体的构建. 采用 RT-PCR 法, 按常规操作从人外周血淋巴细胞 mRNA 中扩增 CD2 胞内区 Thr211-Gln336 肽段 cDNA, 亚克隆入 PCR II 载体中(Invitrogene 公司). 重组 PCR II 载体经 *EcoR* I 酶切后, 与经同一内切酶处理的酵母表达载体 pAS2-1 连接, 获得 CD2c/pAS2-1, 用 *EcoR* I 及 *Nco* I 酶切鉴定插入片段及方向.

(ii) 酵母双杂交系统及人 T 淋巴细胞 cDNA 文库的筛选. 采用醋酸锂转化法^[5], 将重组表达载体 CD2c/pAS2-1 与人 T 淋巴细胞 cDNA 文库 DNA 共同转化酵母菌株 Y190, 在 SD/-His/-Leu/-Trp/+3-AT 选择培养基上, 30℃培养 5~10 d. 挑取直径 ≥ 2 mm 的菌落, 再在 SD/-His/-Leu/-Trp/+3-AT 选择培养基上进行第 2 次筛选, 采用印膜 X-gal 检测法^[5]检测 β-半乳糖苷酶活性, 30℃显色, 8 h 内显示蓝斑者为阳性克隆. 人 T 淋巴细胞 cDNA 文库由美国哈佛医学院 Terhorst 博士惠赠, 来源于人 KT3 T 淋巴瘤细胞系, 构建于 pGAD424 载体, 滴度达 2 × 10⁶ cfu.

(iii) 核苷酸序列分析及其同源性比较. 阳性克隆重组表达载体内区 DNA 的提取及其在大肠杆菌 HB101 中的扩增按文献^[5]的方法进行. 根据人 T 淋巴细胞 cDNA 文库克隆载体(pGAD424)的序列设计并合成引物: 5' -TACCACTACAATGGATG-3'. 用 ABI377 型自动序列分析仪测序, 并将结果提交 Genebank 数据库进行同源性比较.

(iv) 假阳性克隆的鉴定. 参照文献[6]的方法, 将第一轮筛选获得的各阳性克隆 DNA 分别转化酵母菌 Y190, 再分别与转化了 SV40, CD2c/pAS2-1 载体的酵母 Y187 融合, 检测融合后的酵母菌株 β -半乳糖苷酶活性. 鉴定其与 CD2 胞内区结合的特异性和重复性, 排除假阳性克隆.

(v) 免疫共沉淀及 Western blot. PCR 扩增 CD2c 的 cDNA 片段, 并连接到 pUC18 中, 再经适当酶切后亚克隆到真核表达载体 pcDNA3.1 $\cdot$ His (Invitrogen 公司)的 6 $\times$ His 序列的下游, 获得能表达(His)₆-CD2c 的真核表达载体(CD2c/pcDNA3.1 $\cdot$ His). 用 *EcoR* I, *Pst* I 双酶切 CD2cBP/pGAD424 释放出 CD2cBP 的 DNA 片段, 并进一步亚克隆到真核表达载体 pcDNA $\cdot$ FLAG2(美国 NIH 的王建祥博士惠赠)的 FLAG 下游, 获得表达 FLAG-CD2cBP 融合蛋白真核重组表达载体 CD2cBP/pcDNA $\cdot$ FLAG2, 使用 Lipofactamine (GIBCO/BRL 公司)将 CD2c/pcDNA3.1His 和 CD2cBP/pcDNA $\cdot$ FLAG2 共同转染 293 细胞, 继续细胞培养 2 d, 收集细胞并重悬于细胞裂解液(含 0.1%NP-40, 1 mmol/L EDTA, 1 μ g/mL 蛋白酶抑制剂, 1 mmol/L PMSF 的 PBS). 细胞裂解物在 12 000 r/min 离心 2 min, 收集上清, 分别加入抗 His 的单克隆抗体(Clontech 公司)和抗 FLAG 的单克隆抗体 M2(Sigma 公司)及 20 μ L 蛋白 G 琼脂糖, 于 4 $^{\circ}$ C 进行免疫共沉淀. 12 h 后, 离心, 用细胞裂解液洗涤沉淀, 在沉淀物中加入样品缓冲液, 进行 SDS-PAGE. 将蛋白转印到 NC 膜上后, 用含 5%脱脂奶粉的 TBS-T 缓冲液(10 mmol/L Tris $\cdot$ HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20)封闭, 再分别用抗 His 和抗 FLAG 的单克隆抗体 M2 进行免疫印迹. ECL 发光法(Amersham 公司)显色.

2 结果

2.1 CD2c 结合蛋白的分子克隆

利用 RT-PCR 技术从人外周血淋巴细胞中扩增 CD2 胞内区 cDNA 片段, 将该 DNA 片段克隆入 PCR II 中, 用 T7 启动子引物测序, 表明该片段 DNA 序列与文献发表的 CD2 胞内区序列完全一致^[7]. 将 CD2 胞内区 cDNA 片段亚克隆入酵母细胞表达载体 pAS2-1 中. 经酶切鉴定, 表明该 DNA 片段大小及插入方向正确, 命名为 CD2c/pAS2-1.

以 CD2c/pAS2-1 单独转化 Y190 后, 细胞不能在 SD/-His/-Leu/-Trp/+3-AT 选择培养基上生长, 表明 CD2c 自身不能激活 Y190 中的报告基因表达. 用 T 淋巴细胞 cDNA 文库 DNA 与 CD2c/pAS2-1 重组载体 DNA 共同转化 Y190, 得到 2.3×10^6 个转化子, 其数目大于 KT3 文库的滴度(2×10^6 cfu), 保证了基因文库筛选的全面性. 经过筛选获得了约 1 000 个 His⁺克隆, 经 β -半乳糖苷酶活性测定, 其中 13 个为 LacZ⁺克隆.

2.2 阳性克隆的鉴定

将各阳性克隆的质粒 DNA 分别转化 Y190, 去除能单独激活报告基因的克隆后, 其余的与转化了 CD2c/pAS2-1 的 Y187 融合, 保留能与 CD2c 相互作用的克隆, 最终获得了 6 个与 CD2c 肽段特异性结合的阳性克隆.

2.3 阳性克隆的核苷酸序列及其同源性比较

阳性克隆中的插入片段经核苷酸序列测定, 并与 GenBank 数据库进行同源性比较分析, 表明其中一阳性克隆与人 *v-fos* 转化效应蛋白(*v-fos* transformation effector protein, Fte-1)高度同源,

1 acc agc acc atg gcg gtt ggc aag aac aag cgc ctt acg aaa ggc ggc aaa aag gga 57
T S T M A V G K N K R L T K G G K K G
58 gcc aag aag aaa gtg gtt gat cca ttt tct aag aaa gat tgg tat gat gtg aaa gca cct 117
A K K K V V D P F S K K D W Y D V K A P
118 gct atg ttc aat ata aga aat att gga aag acg ctc gtc acc agg acc caa gga acc 174
A M F N I R N I G K T L V T R T Q G T
175 aaa att gca tct gat ggt ctc aag ggt cgt gtg ttt gaa gtg agt ctt gct gat ttg cag 234
K I A S D G L K G R V F E V S L A D L Q
235 aat gat gaa gtt gca ttt aga aaa ttc aag ctg att act gaa gat gtt cag ggt aaa aac 294
N D E V A F R K F K L I T E D V Q G K N
295 tgc ctg act aac ttc cat ggc atg gat ctt acc cgt gac aaa atg tgt tcc atg gtc aaa 354
C L T N F H G M D L T R D K M C S M V K
355 aaa tgg cag aca atg att gaa gct cac gtt gat gtc aag act acc gat ggt tac ttg ctt 414
K W Q T M I E A H V D V K T T D G Y L L
415 cgt ctg ttc tgt gtt ggt ttt act aaa aaa cgc aac aat cag ata cgg aag acc tct tat 474
R L F C V G F T K K R N N Q I R K T S Y
475 gct cag cac caa cag gtc cgc caa atc cgg aag aag atg atg gaa atc atg acc cga 534
A Q H Q Q V R Q I R K K M M E I M T R
535 gag gtg cag aca aat gac ttg aaa gaa gtg gtc aat aaa ttg att cca gac agc att 595
E V Q T N D L K E V V N K L I P D S I
595 gga aaa gac ata 606
G K D I

图 1 CD2cBP 的核苷酸及氨基酸序列
划线部分为 PKC 激酶结合及磷酸化位点

命名为 CD2cBP. 检索 EMBL 蛋白数据库表明, Fte-1 具有蛋白激酶 PKC 的结合与作用位点(图 1).

2.4 CD2cBP 与 CD2c 在体内的特异性结合

为了验证 CD2cBP 是否能在哺乳动物细胞中与 CD2c 结合, 分别构建了 CD2cBP/pcDNA • FLAG 和 CD2c/pcDNA3.1 • His 真核重组表达载体, 并共同转染 293 细胞. 细胞裂解后, 用抗 His 的单克隆抗体免疫沉淀 CD2c 蛋白, 经 SDS-PAGE 分离共沉淀蛋白质后, 再用抗 FLAG 的单克隆抗体进行免疫印迹, 可检测到 FLAG-CD2cBP, 或用抗 FLAG 单抗进行免疫沉淀, 用抗 His 单抗进行免疫印迹, 可检测到 CD2c-His. 结果均表明 CD2cBP 可在哺乳动物细

图 2 293 细胞中 CD2cBP 与 CD2c 相互作用的免疫共沉淀结果

(a) 利用抗 FLAG 的 m2 单克隆抗体做免疫共沉淀检测 CD2cBP; (b) 利用抗 His 的单克隆抗体做免疫共沉淀检测 CD2c 蛋白

胞内与 CD2c 特异性地结合(图 2(a)和(b)).

3 讨论

CD2 在调节 T 淋巴细胞分化、激活、成熟及功能表达方面起重要作用^[8]. 然而, 令人意外的是, CD2 基因敲除小鼠并未产生胸腺发育或成熟 T 细胞功能方面的缺陷, 这可能是由于某些有代偿作用的分子弥补了 CD2 的功能. 但是在 CD2 多拷贝转基因小鼠体内却发现胸腺细胞数目下降, 未成熟的胸腺细胞 TCR 表达上调的现象. 而无胞内区的 CD2 高拷贝转基因小鼠表型正常, 未显示胸腺细胞凋亡增加, 也未显示 TCR 表达上调, 表明 CD2 转基因小鼠的表型与 CD2 分子胞内区功能有关, 提示 CD2 诱导的信号传递依赖于 CD2 的胞内区功能.

CD2 的胞内区较长, 有 116 个氨基酸残基, 在人、大鼠及小鼠中高度保守. CD2 传递的激活信号引起细胞内多种蛋白质磷酸化事件发生, 但 CD2 胞内区缺乏内源性激酶活性, CD2 介导的下游信号必然要与一些激酶和/或接头分子相结合, 而激活某些蛋白激酶, 引起下游蛋白的磷酸化. 现在已经发现很多分子比如 TCR/CD3 复合物、CD4, CD8, CD45 及 Src 家族成员 p59Fyn, p56Lck 可与 CD2 胞内区结合形成多分子复合物, 且参与 CD2 介导的信号传递, 但他们的功能以及是否还有其他分子参与, 还有待进一步研究.

本研究利用酵母双杂交系统克隆了一个与 CD2 胞内区结合的胞内蛋白(CD2cBP), 并用免疫共沉淀法鉴定了此蛋白与 CD2 胞内区结合的特异性. 此蛋白与 Fos 转化效应蛋白(Fte-1)高度同源. Fte-1 是 *c-fos* 和 *v-fos* 引起细胞转化的重要效应蛋白, 与核糖体 S3A 及 TNF 诱导的 TU-11 高度同源, 参与细胞转化、增殖和 T 细胞激活^[9,10]. 另外有研究表明 Fte-1 在将蛋白转运到线粒体的过程中起作用^[11]. 线粒体的功能改变与细胞的转化及一些线粒体相关蛋白如 Bcl-2 的功能有关. 经检索蛋白数据库发现, Fte-1 具有蛋白激酶 PKC 的作用位点. 因此推测, CD2cBP 是与 CD2 胞内区特异结合的下游信号分子, 介导 CD2 分子的信号传递作用, 参与 T 细胞激活或凋亡的信号传递. 此结果为进一步了解 CD2 胞内区的功能提供了新的资料.

Li 等人^[12,13]也克隆到两个与 CD2 胞内区结合的蛋白质, 分别命名为 CD2BP1 和 CD2BP2. CD2BP1 与裂殖酵母菌 *cdc15* 同源, 能与 CD2 的脯氨酸富含区 KGPPLPRPRV 序列(300~309 位)结合, 其下游信号尚不清楚, 但功能研究发现它参与了 T 细胞粘附和增殖. CD2BP2 可能是一种接头分子, 对 CD2 C 末端与其他分子的结合起协调作用. Shih 等人^[14]克隆到了另一接头分子 CD2AP, 该分子稳定 CD2 介导的 T 细胞与抗原递呈细胞之间的连接. CD2AP 基因敲除小鼠表现出肾小球上皮细胞伪足形成过程缺陷并伴随肾小球系膜细胞增生及细胞外间质沉积, 最终导致肾病综合征. 我们克隆到的 CD2cBP 与这 3 个蛋白无明显的序列同源性, 因此可以推测 CD2 的胞内结合蛋白有多个, 分别传递不同刺激信号, 发挥不同的功能.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 39670687), 卫生部科学基金(批准号: 96-1-014)及国家重点基础研究专项基金(批准号: G1999053905)资助项目.

参 考 文 献

- 1 郑德先, 许成素, 刘士廉, 等. 猪外周血淋巴细胞表面 E 受体的分离纯化及其生物化学性质的研究. 中国科学, B 辑, 1983, (4): 329~332
- 2 Denning S M, Dustin M L, Springer T A, et al. Purified lymphocyte function-associated antigen-3 (LFA-3) activates human thymocytes via the CD2 pathway. J Immunol, 1988, 141(9): 2980~2985

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2000-45-11-1163>

- 3 Denning S M, Tuck D T, Vollger L W, et al. Monoclonal antibodies to CD2 and lymphocyte function-associated antigen 3 inhibit human thymic epithelial cell-dependent mature thymocyte activation. *J Immunol*, 1987, 139(8): 2573 ~ 2578
- 4 Rouleau M, Bernard A, Lantz O, et al. Apoptosis of activated CD8+/CD57+ T cells is induced by some combinations of anti-CD2 mAb. *J Immunol*, 1993, 151(7): 3547 ~ 3556
- 5 Ausubel F M, Kingston B R, Seidman J G, et al. *Short Protocol in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons Inc, 1995
- 6 Bartel P L, Chien C T, Sternlanz R, et al. Elimination of false positives that arise using the two hybrid system. *Bio Techniques*, 1993, 14: 920 ~ 924
- 7 Sayre P H, Chang H C, Hussey R E, et al. Molecular cloning and expression of T11 cDNAs reveal a receptor-like structure on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 2941 ~ 2945
- 8 Bierer B E, Bogart R E, Burakoff S J, et al. Partial deletions of the cytoplasmic domain of CD2 result in a partial defect in signal transduction. *J Immunol*, 1990, 144(3): 785 ~ 789
- 9 Lecomte F, Szpirer J, Szpirer C. The S3a ribosomal protein gene is identical to the Fte-1 (*v-fos* transformation effector) gene and the TNF-alpha-induced TU-11 gene, and its transcript level is altered in transformed and tumor cells. *Gene*, 1997, 186(2): 271 ~ 277
- 10 Kho C J, Wang Y, Zarbl H. Effect of decreased *fte-1* gene expression on protein synthesis, cell growth, and transformation. *Cell Growth Differ*, 1996, 7(9): 1157 ~ 1166
- 11 Kho C J, Zarbl H. Fte-1, a *v-fos* transformation effector gene, encodes the mammalian homologue of a yeast gene involved in protein import into mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(6): 2200 ~ 2204
- 12 Li J, Nishizawa K, An W H, et al. A cdc 15-like adaptor protein (CD2BP1) interacts with the CD2 cytoplasmic domain and regulates CD2-triggered adhesion. *EMBO J*, 1998, 17(24): 7320 ~ 7336
- 13 Nishizawa K, Freund C, Li J, et al. Identification of a proline-binding motif regulating CD2-triggered T lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(25): 14897 ~ 14902
- 14 Shih N Y, Li J, Karpitskii A, et al. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science*, 1999, 286: 312 ~ 315

(1999-11-10 收稿, 2000-03-30 收修改稿)