RanBPM结合干扰素 λ 信号通路中的干扰素受体1

张俊文^{1,2}, 丛晓杰¹, 赵乔佳杰¹, 杨霞¹, 李梦¹, 陈虹¹, 米蕊芳¹, 金贵善², 黄秉仁^{1*}, 刘福生^{2*}

1. 中国医学科学院&北京协和医学院基础医学院, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005;

2. 北京市神经外科研究所脑肿瘤研究中心, 首都医科大学附属北京天坛医院, 北京 100050

* 联系人, E-mail: huangbingren@hotmail.com; liufushengs@hotmail.com

收稿日期: 2017-01-16; 接受日期: 2017-02-11; 网络版发表日期: 2017-07-11

国家自然科学基金(批准号: 81302186, 81372354, 81672478)、北京市自然科学基金(批准号: 7151002)、生物医用材料北京实验室、北京市神经外科研究所青年基金(批准号: 2016003)和北京市医管局青苗计划(批准号: QML20150505)资助

摘要 最新发现的干扰素 λ 表现出抗病毒、抗增殖和促凋亡活性, 同 I 型干扰素一样干扰素 λ 结合干扰素 λ 受体复合体后进行信号传递. 干扰素受体是由干扰素受体1和白介素10的受体2形成异二聚体, 但是干扰素 λ 信号通路的分子调控机制仍不清楚. 本研究分别运用谷胱甘肽巯基转移酶沉淀试验和免疫共沉淀试验证明了Ran蛋白的结合蛋白RanBPM与干扰素 λ 受体1相互作用. 干扰素 λ 1能够促进干扰素 λ 受体1与RanBPM的相互作用和影响RanBPM在细胞内的分布. 干扰素 λ 受体1与RanBPM的相互作用与保守的TRAF6的结合位点无关. RanBPM作为一个支架蛋白通过调控干扰素刺激反应元件的活性, 是新的调控干扰素 λ 途径的蛋白.

关键词 干扰素 λ , 干扰素 λ 受体1, 相互作用, RanBPM

干扰素 λ (interferon, IFN- λ)是最近发现的一种III型干扰素, 体内外表现出抗病毒的反应能力, 具有抗增殖和促凋亡的活性^[1]. IFN- λ 又被称为白介素29, 功能与干扰素 α 、干扰素 β 等 I 型干扰素类似. I 型和III型干扰素的表达受到病毒和细菌感染^[2]、细胞代谢^[3]和DNA损伤等过程的调控^[4]. 干扰素 λ 1的受体是干扰素 λ 受体1(IFN- λ R1)和白介素10受体2构成的异源二聚体^[5,6]. 干扰素 λ 1结合其受体后引起了Jak-和TRK2酪氨酸激酶的磷酸化, 磷酸化后激活了下游的信号转导子和转录激活因子(STAT1和STAT2), 与干扰素调节因子9结合后形成了干扰素刺激因子3. 干扰素刺激因子3进入细胞核后结合到干扰素刺激反应元件上, 这些

干扰素刺激反应元件位于干扰素调控基因的上游, 应答 I 型干扰素^[7]. 除了STAT1和STAT2以外, IFN- λ 引起IFN- λ R1的酪氨酸磷酸化后引起STAT4和STAT5的磷酸化^[8]. IFN- λ R1含有一个保守的与肿瘤坏死因子相关因子6(TRAF6)结合的结构域, IFN- λ R1与TRAF6结合后能够抑制TRAF6的自身泛素化以及TRAF6泛素化引起的NF- κ B的激活^[9]. 迄今为止鉴定出的与IFN- λ R1相互作用的蛋白数量很少, 所以亟待筛选与IFN- λ R1相互作用的蛋白以及深入研究IFN- λ 信号通路的转导机制.

RAN蛋白在微管组织中心的结合蛋白(RanBPM)又被称为RanBP9, 是细胞核质穿梭蛋白. RanBPM在细

引用格式: 张俊文, 丛晓杰, 赵乔佳杰, 等. RanBPM结合干扰素 λ 信号通路中的干扰素受体1. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 718–727, doi: [10.1360/N052017-00159](https://doi.org/10.1360/N052017-00159)

英文版见: Zhang J W, Cong X J, Zhaoqiao J J, et al. Ran binding protein 9 (RanBPM) binds IFN- λ R1 in the IFN- λ signaling pathway. Sci China Life Sci, 2017, in press, doi: [10.1007/s11427-017-9028-6](https://doi.org/10.1007/s11427-017-9028-6)

胞中广泛表达,但其功能尚不清楚。RanBPM有4个结构域,分别是富含脯氨酸的结合SH3的结构域、SPRY结构域、LiSH/CTLH结构域和羧基端的CRA结构域。SPRY结构域是介导蛋白质相互作用的结构域,参与多个生物学功能的调控^[10],其中包括细胞因子信号通路^[11]、蛋白稳定性^[12]、RNA的结合^[13]以及激活信号通路的蛋白分子^[14-16]。RanBPM调控受体介导的转录激活,其中包括雄激素受体、糖皮质激素受体^[17]和甲状腺素受体^[18]。RanBPM还可以调控其他转录因子如Rta和Zta(艾巴氏病毒早期蛋白)^[19,20]、TIP60^[21],以及与基因表达相关的ERK1/2、WNT、NOTCH和PI3K/AKT信号通路^[22]。RanBPM提高了肿瘤抑制蛋白p73 α 转录和转录后的表达从而调控了线粒体介导的细胞凋亡^[23]。RanBPM还与整合素黏附蛋白受体、神经细胞黏附分子L1相互作用^[24]。过表达的RanBPM增强了LFA-1信号通路诱导的依赖AP-1的转录激活,这也说明了RanBPM作为一个支架蛋白作用于LFA-1以及其他的整合素受体引起细胞内的信号传递^[15]。

RanBPM还可以与多个膜受体相互作用,其中包括p75NTR^[25]、TrkA^[26]、TrkB^[27]、MET^[14]和T β RI^[11],参与细胞内下游信号途径调节。本研究验证了RanBPM能与IFN- λ R1相互作用,免疫共沉淀的方法验证了RanBPM和IFN- λ R1相互作用,同时其配体IFN- λ 1增强受体与RanBPM的相互作用。在鉴定RanBPM和IFN- λ R1相互作用位点的实验中,发现RanBPM和IFN- λ R1种分别有多个结构域参与相互作用。RanBPM能和IFN- λ R1共定位于细胞膜。RanBPM和IFN- λ 1抑制了TRAF6的自身泛素化。RanBPM诱导干扰素刺激因子3(ISGF3)中干扰素调节因子9(IRF9)的表达,从而促进了IFN- λ 1诱导的干扰素应答元件的激活(ISRE)。

1 材料与方法

1.1 抗体和试剂

小鼠(*Mus musculus*)Flag(M5, 1:2000稀释),小鼠HA(1:2000稀释),小鼠Actin(1:5000稀释),兔 β -微管蛋白(1:2000稀释)购买于Sigma(St. Louis, 美国)。小鼠Myc(9E10; 1:2000稀释或免疫荧光染色1:50稀释),兔RanBPM抗体(1:1000稀释或免疫荧光染色1:50稀释),以及兔IRF9 (1:500)来源于圣克鲁斯生物科技

公司(Santa Cruz, 美国)。兔STAT1磷酸化抗体(58D6; 1:1000),兔lamin A/C(4C11; 1:1000),以及p38磷酸化抗体(1:1000稀释)购买于Cell Signaling Technology(Beverly, 美国)。琼脂糖凝胶蛋白G/A来源于GE Healthcare(Piscataway, 美国)。化学发光液购买于Thermo Scientific(Massachusetts, 美国)。蛋白分子量marker购买于Fermentas(Maryland, 美国)。蛋白酶抑制剂购买于Roche(Indianapolis, 美国)。双荧光素酶检测系统来源于Promega(Wisconsin, 美国)。

1.2 质粒构建

以下载体 pMyc-IFN- λ R1, pFlag-IFN- λ R1, pMyc-RanBPM, pHARanBPM, pFlag-TRAF6, pMyc-RanBPM-SPRY, pMyc-RanBPM-CRA 以及 IFN- λ R1, RanBPM点突变载体由本实验室构建。PCR扩增截短的IFN- λ R1和RanBPM基因,并将其克隆到哺乳动物表达载体pCMV-Myc中,将这些载体分别命名为pMyc-IFN λ R1-ICD, pMyc-IFN λ R1-ICD Δ 1, pMyc-IFN λ R1-ICD Δ 2, pMyc-RanBPM-N, pMyc-RanBPM-M和pMyc-RanBPM-C,所构建的载体均已DNA测序证实正确。本研究中使用其他质粒由本实验室保存。

1.3 细胞培养、转染、IFN- λ 1处理条件

HEK293T或人肝癌细胞(Huh7和Hep3B)在含有10%胎牛血清和青霉素/链霉素的Dulbecco's改良Eagle培养基中于37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂培养箱中培养。根据说明书,用Lipofectamine 2000瞬时转染细胞。根据实验室之前报道的方法表达和纯化IFN- λ 1^[28]。IFN- λ 1的浓度为200 ng/mL。转染后24 h后,用含有3% FBS的培养基继续培养HEK293T和Huh7至少3 h,然后用IFN- λ 1处理指定的时间。

1.4 免疫共沉淀和蛋白印迹

用SDS-PAGE和western印迹分析蛋白的具体方法参考文献[11]。表达质粒转染HEK293T细胞后,进行免疫沉淀实验。将细胞在含有蛋白酶抑制剂混合物(Indianapolis, 美国)的冰冷的细胞裂解缓冲液(150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris(pH 7.6), 1% NP40, 10%(V/V)甘油)中裂解。将预清除的细胞裂解液与1 μ g抗体在4 $^{\circ}$ C下孵育4 h,然后加入40 μ L蛋白质A/G琼脂糖珠,4 $^{\circ}$ C

继续孵育2 h. 用细胞裂解缓冲液洗涤琼脂糖珠4次, 结合的蛋白用2 $\times$ 上样缓冲液(40%甘油, 240 mmol/L Tris/HCl pH 6.8, 8% SDS, 0.04%溴酚蓝, 5% β -巯基乙醇)洗脱, 并进行SDS-PAGE和免疫印迹反应.

1.5 GST pull-down实验

pMyc-IFN- λ R1转染HEK293T细胞后, 在冰上用细胞裂解缓冲液将细胞裂解30 min. 然后将裂解液与GST或重组GST-RanBPM融合蛋白混匀, 然后加入谷胱甘肽琼脂糖珠(Piscataway, 美国), 4 $^{\circ}$ C孵育. 用冷细胞裂解缓冲液将谷胱甘肽琼脂糖珠洗涤3次, 并重悬于2 $\times$ 上样缓冲液中. 然后用SDS-PAGE和Myc抗体分析结合的蛋白.

1.6 荧光素酶报告基因

根据此前的研究^[11]进行荧光素酶测定. 细胞转染和IFN- λ 1处理后, 进行双荧光素酶报告基因的检测. 荧光素酶活性用TD-20/20光度计(Turner Biosystem, Sunnyvale, 美国)测定.

1.7 核和细胞质提取

根据说明书, 用细胞核和细胞质提取试剂盒(Massachusetts, 美国)提取细胞核组分和细胞质组分.

1.8 统计分析

荧光素酶测定实验重复3次, 结果表示为 $\bar{x} \pm SD$. $P < 0.01$ 被认为具有统计学意义.

2 结果

2.1 鉴定RanBPM为新的与IFN- λ R1相互作用蛋白

前期研究证明, IFN- λ R1与TRAF6相互作用, 同时发现RanBPM与TRAF6相互作用, 并且抑制其自身泛素化水平以及NF- κ B的活化. 首先用谷胱甘肽S-转移酶pull-down实验鉴定IFN- λ R1是否与RanBPM相互作用. 用SDS-PAGE和考马斯亮蓝染色分析GST蛋白和融合的GST-RanBPM蛋白的表达(图1A, 上图). GST蛋白和融合的GST-RanBPM蛋白结合琼脂糖珠后, 然后与转染有pMyc-IFN- λ R1的HEK293T细胞裂解液孵育. 结合的蛋白在SDS-PAGE上电泳, 然后用Myc抗体进行蛋白质印迹检测. 与GST相比, 在GST-RanBPM复合

体中检测到IFN- λ R1条带. 因此, RanBPM在体外特异性结合IFN- λ R1(图1A, 下图).

pMyc-IFN- λ R1和pHA-RanBPM共转染HEK293T细胞, 然后进行免疫共沉淀实验. IFN- λ R1和RanBPM的免疫共沉淀证实这两个蛋白之间的相互作用(图1B). 以上结果证明, IFN- λ R1和RanBPM在体外和体内的特异性相互作用.

同时研究了IFN- λ 1在IFN- λ R1和RanBPM结合中的作用. pMyc-IFN- λ R1和pHA-RanBPM共转染HEK293T细胞, 24 h后用IFN- λ 1处理细胞一定的时间. 然后用Myc抗体进行免疫沉淀, 然后进行SDS-PAGE和免疫印迹(图1C), 结果显示免疫沉淀出的RanBPM随时间变化而变化. 数据表明IFN- λ 1能够增强IFN- λ R1与RanBPM的结合.

2.2 RanBPM与IFN- λ R1的相互作用与保守的TRAF6结合位点不相关

研究表明, 野生型RanBPM(318LQTPGEVVD326)和IFN- λ R1(477ESSPEEEEE485)都具有与TRAF6相互作用的保守序列(图2A). 为了确定RanBPM和IFN- λ R1中保守的TRAF6结合位点是否参与RanBPM和IFN- λ R1之间的相互作用, 以前工作中构建的IFN- λ R1和RanBPM的点突变体用于免疫沉淀实验^[9,11]. IFN- λ R1(P480A, E482Q)的野生型和点突变体都与瞬时转染的HEK293T细胞中的RanBPM相互作用(图2B). 当RanBPM 323位氨基酸残基由保守谷氨酸突变为丙氨酸(E323A)时, 或者将残基318位的中性氨基酸亮氨酸突变为碱性氨基酸精氨酸(L318R), IFN- λ R1与RanBPM相互作用(图2C). 在免疫沉淀实验中, IFN- λ R1和突变的RanBPM蛋白之间的相互作用略弱于与野生型RanBPM的相互作用. 为了证实TRAF6结合序列不是必需的, 并且TRAF6不是该相互作用的中间蛋白, 用RanBPM的突变体和IFN- λ R1突变体质粒共转染细胞. 免疫沉淀结果显示, 突变体RanBPM与突变型IFN- λ R1相互作用(图2D).

为了明确RanBPM的过表达是否影响IFN- λ R1和TRAF6之间的相互作用, 用等量的pFlag-TRAF6, pMyc-IFN- λ R1和不同质粒量的pHA-RanBPM共转染HEK293T细胞. 随着RanBPM的表达增加, IFN- λ R1与更多的RanBPM相互作用, 但免疫沉淀出的TRAF6的量没有变化. 这些结果表明, RanBPM和IFN- λ R1之间

图 1 IFN-λR1和RanBPM相互作用的鉴定

A: 大肠杆菌中表达GST蛋白或GST-RanBPM融合蛋白和pMyc-IFN-λR1转染的HEK293T细胞进行GST pul-down实验. 考马斯亮蓝(上图)对GST和GST-RanBPM染色. 使用Myc抗体(下图)检测复合体中的IFN-λR1; B: HEK293T细胞中RanBPM与IFN-λR1相互作用. 用pMyc-IFN-λR1和pHA-RanBPM共同转染细胞. 用HA抗体或Myc抗体进行免疫沉淀, 利用Myc或HA抗体检测沉淀复合体; C: pHA-RanBPM和pMyc-IFN-λR1瞬时转染HEK293T细胞. 细胞未经处理或用200 ng/mL IFN-λ1处理指定时间. 用Myc抗体检测沉淀复合体

的相互作用不涉及TRAF6保守序列, 并且RanBPM不会妨碍IFN-λR1和TRAF6之间的相互作用(图2E). 基于这些数据, RanBPM和IFN-λR1之间的相互作用与其保守的TRAF6结合位点无关.

为了鉴定参与相互作用的结构域, 构建了一系列表达载体(图2A). 为鉴定负责与RanBPM相互作用的IFN-λR1的结构域, 用编码IFN-λR1及其截断体IFN-λR1ICDΔ1或IFN-λR1ICDΔ2同表达全长RanBPM的质粒共转染细胞. RanBPM结合全长IFN-λR1和

IFN-λR1ICD, IFN-λR1ICDΔ1和IFN-λR1ICDΔ2截短体(图2F), 除IFN-λR1ICD中的TRAF6结合位点之外, IFN-λR1ICDΔ1和IFN-λR1ICDΔ2结构域有助于相互作用. 为了鉴定与IFN-λR1结合的RanBPM的结构域, 将表达RanBPM截短体的质粒和pFlag-IFN-λR1质粒共转染细胞. 免疫沉淀显示, IFN-λR1不与RanBPM的相互作用域SPRY或CRA结构域相互作用, 而在RanBPM-N和RanBPM-C免疫复合物中特异性检测到IFN-λR1(图2G). 这些实验表明, RanBPM和IFN-λR1的多个结构域参与

图2 RanBPM和IFN-λR1的相互作用与保守的TRAF6结合序列不相关(网络版彩图)

A: IFN-λR1和RanBPM的结构图。列出了IFN-λR1和RanBPM一系列截短体; B: pHA-RanBPM和pMyc-IFN-λR1或其突变型pMyc-IFN-λR1-P480A E482A(含有突变的TRAF6结合位点)瞬时转染HEK293T细胞。Myc抗体检测沉淀复合物; C: pFlag-IFN-λR1和pMyc-RanBPM或突变体pMyc-RanBPM-E323A(含有突变的TRAF6结合基序)或pMyc-RanBPM-L318R瞬时转染的HEK293T细胞的裂解物。Myc抗体检测沉淀复合物; D: 突变体pMyc-IFN-λR1-P480A E482A(含有突变的TRAF6结合基序), 突变体pMyc-RanBPM-E323A(含有突变的TRAF6结合基序)或pMyc-RanBPM-L318R瞬时转染HEK293T细胞。IFN-λR1抗体检测沉淀复合物; E: 用pMyc-IFN-λR1, pFlag-TRAF6和不同质粒量的pHA-RanBPM转染HEK293T细胞。用Myc抗体进行免疫沉淀, 用Flag抗体, HA抗体或Myc抗体分析免疫复合物; F: 用质粒pHA-RanBPM和pMyc标记的IFN-λR1, pIFN-λR1-ICD, pIFN-λR1-ICDΔ1或pIFN-λR1-ICDΔ2共转染HEK293T细胞, 用Myc抗体进行免疫沉淀, 然后用HA抗体分析免疫复合物; G: 用pFlag-IFN-λR1和不同RanBPM结构域的质粒共转染HEK293T细胞。用Myc抗体进行免疫沉淀, 然后用Flag抗体分析免疫复合物

了相互作用。

2.3 IFN-λ1 影响RanBPM的分布

细胞核和细胞质分离实验显示, 细胞核组分中的RanBPM部分略有减少, 而当用IFN-λ1刺激细胞时RanBPM在细胞质中的表达增加(图3A), 推断IFN-λ1促进RanBPM在细胞质分布。

2.4 RanBPM与IFN-λ1一起抑制TRAF6的泛素化

前期研究中证明, IFN-λR1抑制TRAF6的自泛素化和随后的TRAF6诱导的NF-κB活化^[29]。因此检测了TRAF6的泛素化和NF-κB在IFN-λR1和RanBPM存在下的活性, 发现RanBPM抑制TRAF6的泛素化不依赖于IFN-λ1。用IFN-λR1外源表达时, 抑制作用优于IFN-λR1

或RanBPM单独表达(图4A)。

双荧光素酶报告基因分析RanBPM和IFN-λR1相互作用对TRAF6诱导的NF-κB活性的影响。RanBPM的过表达显著降低了HEK293T细胞和Hep3B细胞中的NF-κB信号(图4B)。综上, RanBPM通过与IFN-λR1相互作用增强IFN-λ信号通路。

2.5 RanBPM通过上调IRF9的表达增强ISRE活性

为了确定RanBPM的生物学功能, 分析了RanBPM对IFN-λ信号通路的影响。使用ISRE荧光素酶报告基因来研究RanBPM的反式激活活性。如图5A所示, 在HEK293T和Hep3B细胞中, 荧光素酶活性的水平表明在IFN-λ1刺激下, RanBPM的过表达增强了ISRE的转录活性。然而存在IFN-λ1的情况下, 单独的RanBPM的

图3 IFN-λ影响RanBPM的分布(网络版彩图)

pMyc-RanBPM转染Huh7细胞。24 h后, 细胞用IFN-λ1处理或未处理12 h。分离细胞的细胞质蛋白和细胞核蛋白, 进行SDS-PAGE, 然后用Myc抗体进行免疫印迹。β-微管蛋白和laminA分别是细胞质和细胞核标志蛋白。*: $P < 0.05$

图4 RanBPM与IFN-λ1抑制TRAF6的泛素化

A: pMyc-RanBPM, pMyc-IFN-λR1, pFlag-TRAF6和pHA-Ub共转染HEK293细胞. 转染24 h后用IFN-λ1处理细胞12 h, 细胞裂解液用TRAF6抗体免疫沉淀, 随后用Ub抗体检测确定TRAF6的泛素化水平; B: 双荧光素酶报告基因质粒转染HEK293T细胞或Hep3B细胞. 转染24 h后, 用200 ng/mL IFN-λ1刺激细胞12 h. 用双荧光素酶报告基因检测荧光素酶活性, 结果以 $\bar{x} \pm SD$ 表示. *: $P < 0.05$

过表达不协同增加ISRE的活性. IFN-λR1是膜受体蛋白, 未有IFN-λR1被剪切进入细胞核直接激活基因的报道. 因此检测了IFN-λ信号通路效应物复合物ISGF3的表达, ISGF3是直接结合ISRE元件复合体. 用IFN-λ1刺

激细胞后, ISGF3复合物的IRF9组分蛋白水平增加并且在细胞核中分布存在更多的IRF9. 同样当RanBPM过表达时, IRF9蛋白的水平在细胞质和细胞核中都增加(图5B). 从这些数据中得出结论, RanBPM在调节

图5 RanBPM增强ISRE活性

A: 用双荧光素酶质粒同pMyc-IFN-λR1和pMyc-RanBPM转染HEK293T细胞或Hep3B细胞。用200 ng/mL IFN-λ1刺激细胞12 h。用双荧光素酶报告基因测定系统(Promega)测定荧光素酶活性; B: 用pMyc-RanBPM转染HEK293T细胞, 或用IFN-λ1处理12 h。然后提取细胞的细胞核核组分和细胞质组分, 并用Myc或p48抗体检测。*: $P < 0.05$

IFN-λ信号通路中发挥新的作用。

3 讨论

IFN-λ引起的信号通路与I型IFN类似, 都是通过结合IFN-λR1和IL-10R2组成的细胞膜受体发挥作用。IFN-λR1也称为IL-28RA, 是IFN-λ特异结合的受体, 而IL10R2可以结合IL-10, IL-22和IL-26等多个配体^[30]。两种膜受体的结构中均有细胞外结构域, 跨膜结构域和细胞内结构域。IFN-λR1的细胞内结构域含有可磷酸化的酪氨酸残基, 决定了IFN-λ信号的特异性。IL10R2细胞膜内结构域含有82个氨基酸残基, 可以与酪氨酸

酸激酶TYK2结合, 但不提供STAT结合位点^[31]。因此, IFN-λR1可能在介导STAT激活的过程中发挥关键作用。然而对IFN-λR1的理解仍然不足, 需要鉴定更多潜在的与IFN-λR1相关的细胞蛋白以了解IFN-λ信号通路。

本研究GST pull down和免疫共沉淀实验鉴定RanBPM为新的与IFN-λR1相互作用的蛋白(图1A和B)。RanBPM在体内和体外均与IFN-λR1相互作用。在免疫共沉淀实验中发现IFN-λ1存在的条件下, 更多的RanBPM与IFN-λR1相互作用(图1C)。IFN-λ1增加了RanBPM在细胞质的分布, 并减少RanBPM在核内的

分布(图3A和B). RanBPM可被磷酸化形成超磷酸化异构体, 这种异构体定位于细胞膜中. 在细胞外刺激, 如紫外线照射和渗透胁迫下, 磷酸化的RanBPM增加^[15]. 转化生长因子 β (TGF- β)也影响RanBPM的分布. 在TGF- β 1刺激下, 分布在细胞核中的RanBPM减少, 而更多的RanBPM结合T β RI, 增加了RanBPM在细胞质的表达^[11]. 许多蛋白质相互作用是通过翻译后修饰来调控的. RanBPM的磷酸化在与多个细胞膜受体相互作用中发挥重要作用. RanBPM作为膜受体的支架蛋白, 可以与p75NTR, TrKA, T β RI复合物和TRAF6相互作用.

RanBPM在细胞核内的分布对其转录激活的功能是至关重要的. 在细胞核中, RanBPM稳定促凋亡转录因子p73的表达, 增强p73 α 的转录活性^[32]. RanBPM与转录调节因子TAF4(TBP相关因子4)^[32]和病毒早期转录调节因子Rta相互作用^[20]. RanBPM调节雄激素受体、糖皮质激素受体^[17]和甲状腺激素受体^[18]的转录活性. 淀粉样蛋白 β 蛋白前体(A β PP)细胞内结构域(AICD)可以转位到细胞核并调节转录, 而RanBPM可以抑制AICD介导的转录激活^[21]. RanBPM与Epstein-Barr病毒Rta和Zta的两种立即早期蛋白质相互作用^[19,20]. Rta-RanBPM-Zta复合物结合Zta反应元件转录激活病毒关键基因. 当敲低RanBPM表达时, Zta和Rta的协同活性降低. RanBPM可能通过与转录因子的直接相互作用或间接通过调节细胞内信号传导途径影响基因表达^[33]. 本研究表明, RanBPM的表达激活ISRE活性(图5A). RanBPM定位于细胞质和核中, 推断细胞核中的RanBPM负责转录激活.

RanBPM中两个结构域决定其在细胞核的定位, 位于氨基端的脯氨酸/谷氨酰胺富集区和C末端的结构域^[8]. RanBPM的这两个结构域参与其与IFN- λ R1的结合(图2F). 通过荧光素酶测定发现, RanBPM增强了HEK293细胞和Hep3B细胞中的ISRE活性(图5A). RanBPM的过表达促进了IRF9(ISGF3的亚基)及其在HEK293细胞中的细胞核的表达(图5B). 推测RanBPM在细胞质中可能有助于IRF9的翻译. 在IFN- λ 1的刺激下, IRF9引起ISRE激活.

以前的研究中发现, IFN- λ R1序列和RanBPM序列中含有TRAF6结合保守序列^[9,28]. IFN- λ R1与TRAF6相互作用并抑制TRAF6诱导的NF- κ B活化, 这可能是由于TRAF6自身泛素化减少的结果, RanBPM通过其与TRAF6的相互作用来影响TRAF6泛素化和TRAF6诱导的NF- κ B信号通路. 本研究发现, IFN- λ R1和RanBPM之间的相互作用与保守的TRAF6结合序列无关(图2B~E). RanBPM中传统的蛋白质相互作用结构域SPRY和CRA结构域未参与与IFN- λ R1的结合(图2D和G). RanBPM的过表达减少了TRAF6的泛素化和随后的NF- κ B活化(图4A和B). 因此, RanBPM可降低NF- κ B激活带来的炎症反应的风险. IFN- λ 1在不同的细胞和组织类型中的特异性, IFN- λ 与I型IFN的显著不同, 这表明IFN- λ 可以降低I型IFN治疗中典型的不良反应^[34]. RanBPM在几乎所有的细胞系和组织中表达, 在子宫和胸腺中表达相对较高^[15]. 考虑到RanBPM在激活ISRE中的作用, 需要更深一步的研究其联合IFN- λ 在治疗肿瘤中的应用.

致谢 感谢清华大学常志杰和中国科学院张学军提供的质粒.

参考文献

- 1 Lopušná K, Režuchová I, Betáková T, et al. Interferons lambda, new cytokines with antiviral activity. *Acta Virol*, 2013, 57: 171–179
- 2 Yoneyama M, Fujita T. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev Med Virol*, 2010, 20: 4–22
- 3 Xie D, Zhu S, Bai L. Lactic acid in tumor microenvironments causes dysfunction of NKT cells by interfering with mTOR signaling. *Sci China Life Sci*, 2016, 59: 1290–1296
- 4 Brzostek-Racine S, Gordon C, Van Scoy S, et al. The DNA damage response induces IFN. *J Immunol*, 2011, 187: 5336–5345
- 5 Kotenko S V, Gallagher G, Baurin V V, et al. IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*, 2003, 4: 69–77
- 6 Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*, 2003, 4: 63–68

- 7 Stark G R, Kerr I M, Williams B R G, et al. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 227–264
- 8 Dumoutier L, Tounsi A, Michiels T, et al. Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon- λ 1. *J Biol Chem*, 2004, 279: 32269–32274
- 9 Xie Y F, Cui Y B, Hui X W, et al. Interaction of IFN λ R1 with TRAF6 regulates NF- κ B activation and IFN λ R1 stability. *J Cell Biochem*, 2012, 113: 3371–3379
- 10 Menon R P, Gibson T J, Pastore A. The C terminus of fragile X mental retardation protein interacts with the multi-domain Ran-binding protein in the microtubule-organising centre. *J Mol Biol*, 2004, 343: 43–53
- 11 Zhang J, Ma W, Tian S, et al. RanBPM interacts with T β RI, TRAF6 and curbs TGF induced nuclear accumulation of T β RI. *Cell Signal*, 2014, 26: 162–172
- 12 Suresh B, Ramakrishna S, Kim Y S, et al. Stability and function of mammalian lethal giant larvae-1 oncoprotein are regulated by the scaffolding protein RanBPM. *J Biol Chem*, 2010, 285: 35340–35349
- 13 Ponting C, Schultz J, Bork P. SPRY domains in ryanodine receptors (Ca²⁺-release channels). *Trends Biochem Sci*, 1997, 22: 193–194
- 14 Wang D, Li Z, Messing E M, et al. Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM. *J Biol Chem*, 2002, 277: 36216–36222
- 15 Denti S, Sirri A, Cheli A, et al. RanBPM is a phosphoprotein that associates with the plasma membrane and interacts with the integrin LFA-1. *J Biol Chem*, 2004, 279: 13027–13034
- 16 Wu Y, Sun X, Kaczmarek E, et al. RanBPM associates with CD39 and modulates ecto-nucleotidase activity. *Biochem J*, 2006, 396: 23–30
- 17 Rao M A, Cheng H, Quayle A N, et al. RanBPM, a nuclear protein that interacts with and regulates transcriptional activity of androgen receptor and glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*, 2002, 277: 48020–48027
- 18 Poirier M B, Laflamme L, Langlois M F. Identification and characterization of RanBPM, a novel coactivator of thyroid hormone receptors. *J Mol Endocrinol*, 2006, 36: 313–325
- 19 Huang H H, Chen T Y, Chang L K, et al. RanBPM regulates Zta-mediated transcriptional activity in Epstein-Barr virus. *J Gen Virol*, 2015, 96: 2336–2348
- 20 Chang L K, Liu S T, Kuo C W, et al. Enhancement of transactivation activity of Rta of Epstein-Barr virus by RanBPM. *J Mol Biol*, 2008, 379: 231–242
- 21 Domingues S C, Konietzko U, Henriques A G, et al. RanBP9 modulates aicd localization and transcriptional activity via direct interaction with tip60. *J Alzheimers Dis*, 2014, 42: 1415–1433
- 22 Atabakhsh E, Wang J H, Wang X, et al. RanBPM expression regulates transcriptional pathways involved in development and tumorigenesis. *Am J Cancer Res*, 2012, 2: 549–565
- 23 Liu T, Roh S E, Woo J A, et al. Cooperative role of RanBP9 and P73 in mitochondria-mediated apoptosis. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e476
- 24 Cheng L, Lemmon S, Lemmon V. RanBPM is an L1-interacting protein that regulates L1-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurochem*, 2005, 94: 1102–1110
- 25 Bai D, Chen H, Huang B R. RanBPM is a novel binding protein for p75NTR. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 309: 552–557
- 26 Yuan Y, Fu C, Chen H, et al. The Ran binding protein RanBPM interacts with TrkA receptor. *Neurosci Lett*, 2006, 407: 26–31
- 27 Yin Y X, Sun Z P, Huang S H, et al. RanBPM contributes to TrkB signaling and regulates brain-derived neurotrophic factor-induced neuronal morphogenesis and survival. *J Neurochem*, 2010, 114: 110–121
- 28 Wang L, Fu C, Cui Y, et al. The Ran-binding protein RanBPM can depress the NF- κ B pathway by interacting with TRAF6. *Mol Cell Biochem*, 2012, 359: 83–94
- 29 Uzé G, Monneron D. IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. *Biochimie*, 2007, 89: 729–734
- 30 Walter M R. Structural analysis of IL-10 and type I interferon family members and their complexes with receptor. *Adv Protein Chem*, 2004, 68: 171–223
- 31 Kramer S, Ozaki T, Miyazaki K, et al. Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells. *Oncogene*, 2005, 24: 938–944
- 32 Brunkhorst A, Karlén M, Shi J, et al. A specific role for the TFIID subunit TAF4 and RanBPM in neural progenitor differentiation. *Mol Cell Neurosci*, 2005, 29: 250–258
- 33 Salemi L M, Loureiro S O, Schild-Poulter C. Characterization of RanBPM molecular determinants that control its subcellular localization. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0117655
- 34 Xie Y F, Chen H, Huang B R. Expression, purification and characterization of human IFN- λ 1 in *Pichia pastoris*. *J Biotech*, 2007, 129: 472–480