论文

L-periaxin 与 DRP2 蛋白互作的精细分析

杨艳^{①②}, 石亚伟^{①*}

① 山西大学生物技术研究所, 教育部化学生物学与分子工程重点实验室, 太原 030006;

② 太原科技大学化学与生物工程学院, 太原 030006

* 联系人, E-mail: yaweishi@sxu.edu.cn

收稿日期: 2014-11-06; 接受日期: 2015-07-30; 网络版发表日期: 2015-08-11

国家自然科学基金(批准号: 31170748)资助项目

doi: 10.1360/052014-0277

摘要 轴周蛋白 L-periaxin 作为外周神经系统中特异表达的骨架蛋白之一, 在髓鞘成熟与维护过程中发挥重要作用. 肌营养不良相关蛋白 2(DRP2)是目前报道与 L-periaxin 存在明确相互作用的唯一蛋白, 但两蛋白精细的互作区域及互作的分子机制仍不清楚. 本研究通过双分子荧光互补、免疫共沉淀、GST pull-down、荧光光谱、细胞定位等技术, 进一步揭示了 periaxin 蛋白的核定位信号 NLS 结构域上 3 段不同的亚结构域中, NLS1 只参与 periaxin 蛋白的核定位, NLS2 和 NLS3 参与 DRP2 蛋白的互作; DRP2 蛋白中 spectrin like 2 和 WW 结构域参与和 L-periaxin 蛋白的互作. L-periaxin 与 DRP2 互作区域的精细定位, 为进一步在蛋白水平探讨 L-periaxin 与脱髓鞘型腓骨肌萎缩症 4F 亚型的发生机制之间的关系提供参考.

关键词L-periaxin
NLS 结构域
DRP2
spectrin like 结构域
蛋白相互作用
腓骨肌萎缩症 4F

腓骨肌萎缩症(Charcot-Marie-Tooth, CMT), 亦称为遗传性运动感觉神经病(hereditary motor and sensory neuropathy, HMSN), 为累及腓骨肌及下肢远端肌肉为主的一类外周神经系统的遗传性疾病. 自从 1992 年发现 17 号染色体短臂 11.2 区周围神经髓鞘蛋白 22(peripheral myelin protein 22, PMP22)的基因突变导致 CMT 1A 至今, 已有 30 个不同的 CMT 遗传位点被定位^[1]. CMT 可分为脱髓鞘型及轴突突变型两种, 其中定位于人类第 19 号染色体长臂, 编码轴周蛋白 periaxin 的 PRX 基因突变可导致脱髓鞘型 CMT 4F 亚型的发生^[2,3]. CMT 4F 临床表现主要为: 儿童期隐袭发病, 早期运动性神经发育迟缓、后期病情进展缓慢等. 多数病人从下肢远端肌肉无力向上

发展为感觉和运动神经萎缩, 肌电图可见运动或感觉传导速度减慢, 组织病理学主要表现为有髓纤维缺失明显和施旺氏细胞增殖明显, 并伴洋葱头样髓鞘结构改变等^[4].

PRX 基因可编码 L 和 S 两种长短不同的 periaxin 蛋白, L-periaxin 和 S-periaxin, 二者共同调节髓鞘的延展与修复、维护轴突的直径大小^[5,6]. 其中 L-periaxin 在 N 端拥有 1 个 PDZ 结构域(PSD-95/Dlg-/Zo-1 domain)^[7], 单体 PDZ 结构域(PDB ID: 4CMZ)为 5 个反向平行 β -折叠及 2 个 α -螺旋构成的折叠桶状结构^[8], 该结构域可介导 periaxin 蛋白形成同源二聚体^[8,9]; 同时, PDZ 结构域中 73~86 位氨基酸(V⁷³FFENFKYEDALRLL⁸⁶)富含的核输出信号

引用格式: 杨艳, 石亚伟. L-periaxin 与 DRP2 蛋白互作的精细分析. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 777-788

Yang Y, Shi Y W. Refined analysis of protein interaction between L-periaxin and DRP2. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 777-788, doi: 10.1360/052014-0277

(nuclear export signal, NES)引导 L-periaxin 蛋白的核输出^[10]。

L-periaxin 蛋白除 PDZ 结构域外, 还包括有核定位信号(nuclear localization signal, NLS)结构域、重复区域(repeat domain)以及 C 端的酸性区域(acidic domain)(图 1A)^[11]。其中 NLS 结构域属于非典型“双分型”核定位信号, 主要包含有 NLS1(118~139 aa), NLS2(162~175 aa)和 NLS3(183~194 aa) 3 个亚单位, 该结构域是介导 L-periaxin 在神经发育早期施旺氏细胞核定位的主要因素^[12]; 同时, NLS 结构域还能识别肌营养不良相关蛋白 2(dystrophin related protein 2, DRP2), 通过 Dystroglycan(肌营养不良聚糖)-DRP2-L-periaxin(PDG)的三元跨膜蛋白复合物开启基底膜(laminin, LN)与施旺氏细胞内信号传递的通路^[13]。DRP2 是 1 个含有 954 个氨基酸残基的蛋白, N 端含有 2 个类血影蛋白(spectrin like repeat)结构域和 1 个 WW 结构域, 在 C 端有 1 个 ZZ-type 的锌指结构域等(图 1A)^[13,14]。

DRP2 或 L-periaxin 的缺失对于外周神经组织的结构与功能具有不同的影响^[14,15], 将小鼠(*Mus musculus*)坐骨神经施旺氏细胞中 *Prx* 基因敲除 6 周后, 髓鞘特异性标志物, 如髓鞘相关糖蛋白(myelin associated glycoprotein, MAG)、外周髓磷脂 P0 蛋白(peripheral myelin protein zero, MPZ)和髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)等蛋白表达维持正常水平, 但明显检测到 DRP2 蛋白定位的紊乱及神经传导速度下降, 伴有多发性硬化及髓鞘改变呈松散、变形及多层状等; 当 *Prx* 基因敲除 6 个月后, 小鼠的感觉神经、运动神经及迷走神经等表现出广泛的脱髓鞘, 坐骨神经有髓纤维数目明显增多, 髓鞘较前增厚及洋葱头样病变^[16]。同样 *Drp2* 基因敲除后, 小鼠表现出缓慢且阶段性脱髓鞘或异常的髓鞘再生等腓骨肌萎缩症的症状^[14,17]。L-periaxin 与 DRP2 的相互作用可能构成了周围神经组织中一条重要的信号通路, 调控着外周基底膜、髓鞘及轴突之间物质与信息传递等^[17]。

尽管 L-periaxin 与 DRP2 蛋白存在明确的相互作用, 但参与二者彼此互作的区域以及具体互作机制并不清楚。本文利用基因克隆、重组蛋白表达纯化等技术提取 L-periaxin 与 DRP2 蛋白的彼此关键结构域, 结合双荧光分子互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)、免疫共沉淀(co-immunopreci-

pitation, Co-IP), GST pull down 及细胞共定位等蛋白相互作用研究手段对 L-periaxin 和 DRP2 蛋白发生相互作用的关键区段进行精细定位分析, 揭示了 L-periaxin 和 DRP2 的相互作用发生在 L-periaxin 的 NLS 区域 2 和 3, NLS 区域 1 仅介导 L-periaxin 蛋白的核输入, 而在 DRP2 几个结构域中 spectrin like domain 2 和 WW 结构域共同参与和 L-periaxin 蛋白的相互作用。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠 RSC 96 细胞购于中国科学院细胞库, HeLa 细胞株系由本实验室保存。培养细胞所用的高糖达氏修正依氏培养基(high glucose Dulbecco's modified eagle smedium, H-DMEM), 改良型 RPMI-1640 培养基, TurboFect *in vivo* Transfection Reagent 转染试剂以及限制性内切酶 *EcoR* I, *Sal* I, *Xho* I 等购自 Fermentas 公司(立陶宛), T4 DNA ligase 购自 TransGen Biotech 公司(北京)。胰蛋白酶(Trypsin) 1:250、青链霉素混合液(100×)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、抗荧光衰减封片剂、无支原体胎牛血清等均为 Solarbio 公司(北京)产品。IP 细胞裂解液、Protein A+G Agarose 为碧云天生物技术有限公司(海门)产品。兔抗 GST 及鼠抗 Myc, His, EGFP 等单克隆抗体购自全式金生物技术有限公司(北京)。异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的羊抗鼠二抗、四甲基异硫氰酸罗丹明(tetramethyl rhodamine isothiocyanate, TRITC)标记的羊抗兔二抗等为博士德生物工程有限公司(武汉)产品。

用于构建质粒的载体增强型 pEGFP-N1, pCMV-Tag-3B, pmCherry-C1, pGEX-6P-1 及 pET-MG 均为本实验室保存。PCR 产物纯化试剂盒, DNA 片段胶回收试剂盒, 质粒抽提试剂盒, 引物合成等来自上海生物工程有限公司。GST-琼脂糖凝胶亲和柱、镍 NTA 亲和柱, Sephacryl S-200 凝胶层析柱为 GE 公司(美国)产品。其他试剂均为分析纯。

1.2 质粒的构建

L-periaxin(1~1461 aa)及不同结构域包括 PDZ(1~102 aa), NLS(118~196 aa), 重复区域(197~

1059 aa)以及酸性结构域(1060~1461 aa)等重组表达质粒构建,以人源 *L-PRX* 基因为模板经 PCR 扩增获取上述蛋白片段的 DNA 编码序列,然后分别克隆到 pEGFP 和 pCMV-Tag-3B 载体(图 1A). *L-periaxin* 的 NLS 结构域的不同片段,包括 *NLS*, *NLS1*, *NLS2* 和 *NLS3* 克隆到 pET-MG 表达载体.

DRP2(1~954 aa)及其不同结构域包括 N1-384(1~384 aa), C385-954(385~954 aa), N1-179 (spectrin like 1, 1~179 aa), N180-384(spectrin like 2+WW domain, 180~384 aa)等重组表达质粒构建,以人源 *DRP2* 基因为模板经 PCR 扩增获取上述蛋白片段的 DNA 编码序列,然后分别克隆到 pEGFP, pmCherry-C1 以及 pGEX-6P-1 载体(图 1A).

BiFC 双分子互补表达载体的构建参见 2005 年 Nyfeler 等人^[18]的研究,将编码黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)分割为编码 N(1~155 aa)和 C(156~239 aa)两个 DNA 片段,利用 *Bam*H I 和 *Not* I 将编码 YFP-N(1~155 aa)DNA 片段插入连接到切除 EGFP 的 pEGFP-N1 载体,利用 *Nhe* I 和 *Xho* I 将编码 YFP-C(156~239 aa)DNA 片段插入到切除 EGFP 标签的 pEGFP-C1 载体,分别命名为 pYN 和 pYC. 进一步将编码 *L-periaxin* 的 NLS 结构域连接到 pYN 表达载体构建 pYN-NLS; 将编码 *DRP2* 蛋白的 *N1-384*, *N1-179*, *N180-349* 及 *N350-384* 不同片段的 DNA 序列连接到 pYC 构建 pYC-*DRP2-N1-384*, pYC-*DRP2-N1-179*, pYC-*DRP2-N180-349*, pYC-*DRP2-N350-384*.

1.3 细胞的培养和转染

RSC96 细胞培养采用含 10% 胎牛血清的 H-DMEM 培养基; BiFC 荧光双分子互补实验选用 HeLa 细胞株系,培养基为含 10% 无支原体胚胎牛血清的改良型 RPMI-1640 培养基. 细胞于 25 cm² 培养瓶, 37℃, 5%CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养. 用于转染的细胞生长于 6 孔板内的盖玻片或 6 cm 培养皿上, 传代 24 h 细胞长满 60% 时, 脂质体转染. 转染后 24~48 h 进行荧光定位及 Western blot 检测.

1.4 荧光共定位及双分子荧光互补

将不同真核表达载体及双分子荧光互补载体分别或共转染 RSC 96 或 HeLa 细胞 24 h 后, 弃培养基, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS) (140 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L

Na₂HPO₄, 1.8 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.3)洗涤细胞 3 次, 每孔内加入 1 mL 冰冻的甲醇 4℃ 固定 5 min, PBS 洗涤细胞 3 次, 1 μg/mL DAPI 室温避光染色 10 min 后封片. 在高分辨活细胞工作站 Delta Vision 下检测荧光分布, 观测通道 DAPI, FITC 或 TRITC, 曝光条件及图片处理同组实验均采用同等参数.

1.5 流式分析

双分子互补载体 pYN/pYC, pYN-NLS/pYC-*DRP2-N1-384*, pYN-NLS/pYC-*DRP2-N1-179*, pYN-NLS/pYC-*DRP2-N180-349* 及 pYN-NLS/pYC-*DRP2-N350-384* 共转染 HeLa 细胞 24 h 后, 4℃ 继续培养 4 h, 经 PBS 洗涤, 胰酶消化后重悬于 1 mL PBS 中, Gallios 流式细胞仪(Beckman, 美国)检测绿色荧光细胞数目. 实验空白对照组为 pYN/pYC, 检测细胞数目为每组实验 10000~20000 个, 实验重复 3 次.

1.6 免疫共沉淀及 Western blot 分析

6 cm 培养皿中 RSC 96 细胞长满 60% 时, 分别将 pCMV-tag-3B-*L-periaxin*/pEGFP-*DRP2*, pCMV-tag-3B-*L-periaxin*/pEGFP-*DRP2-N1-384*, pCMV-tag-3B-*L-periaxin*/pEGFP-*DRP2-N180-384*, pCMV-tag-3B-*NLS*/pEGFP-*DRP2-N1-179* 以及 pCMV-tag-3B-*NLS*/pEGFP-*DRP2-N180-384* 等分别共转染 RSC96 细胞, 37℃ 培养 48 h, 收集细胞, 用 300 μL 预冷的细胞裂解液(20 mmol/L Tris-HCL pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF), 焦磷酸钠(sodium pyrophosphate), β-磷酸甘油(β-glycerophosphate), 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA), 亮氨酸酶(leupeptin)), 4℃ 裂解 30 min, 离心收集上清加入 2 μg anti-EGFP 或 anti-Myc 抗体及小鼠 IgG 蛋白, 4℃ 孵育过夜; 次日加入 20 μL 蛋白 A+G 琼脂糖珠, 4℃ 孵育 3 h, PBS 缓冲液洗涤琼脂糖珠抗原抗体复合物, 加入 20 μL 1×SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis)上样缓冲液, SDS-PAGE 后转印于聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜, 进行 Western blot 检测.

1.7 重组蛋白的表达纯化

分别将重组质粒 pGEX-6P-1-*DRP2-N1-384* 与 pET-MG-NLS, *NLS1*, *NLS2*, *NLS3* 转入 *E. coli* BL21

中,涂布于 LB 琼脂平板(含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素),37℃倒置培养过夜,第 2 天挑取单菌落于 5 mL 含氨苄青霉素(100 $\mu\text{g/mL}$)的 LB 液体培养基中,37℃培养约 7 h,以 2%接种量转移至 1 L 含氨苄青霉素(100 $\mu\text{g/mL}$) LB 液体培养基中,当 A_{600} 达到 0.6~0.8 时,加入终浓度为 0.3 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG),16℃过夜诱导蛋白表达,然后 5000 $\times g$ 4℃离心 10 min 收集菌体。

谷胱甘肽 S 转移酶(glutathione-S-transferase, GST)标签的重组蛋白用 30 mL PBS 重悬,冰浴超声破碎($\phi 15$, 工作 4 s, 间歇 6 s, 超声时间 15 min),以 20000 $\times g$ 4℃离心 30 min 收集上清。上样于 PBS 预平衡的 GST-琼脂糖亲和树脂柱,4℃结合 30 min, PBS 洗脱杂蛋白后,10 mL 洗脱缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 谷胱甘肽(glutathione, GSH), pH 8.5)洗脱目的蛋白,再经超滤浓缩上样于 20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, pH 8.0 缓冲液预平衡的 Sephacryl S-200 凝胶层析柱,收集目标蛋白洗脱峰,样品经超滤浓缩-20℃保存。

His 标签的重组蛋白用 1 $\times$ binding buffer(20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑, pH 7.9)重悬,经冰浴超声破碎、离心,将上清上样于经 1 $\times$ binding buffer 平衡的镍 NTA 亲和柱,4℃结合 30 min,洗脱杂蛋白后用 10 mL 洗脱缓冲液(500 mmol/L 咪唑, pH 7.4)洗脱目的蛋白,经超滤浓缩后上样于 Sephacryl S-200 凝胶层析柱,收集目标蛋白并浓缩-20℃保存备用。

1.8 GST pull-down

GST-DRP2-N1-384, GST-DRP2-N1-179, GST-DRP2-N180-384 及 GST 等重组蛋白,以相同摩尔数分别结合等量 GST-琼脂糖凝胶 4B 亲和柱材料, PBS 洗涤柱材料 3 次,4℃备用。含编码 L-periaxin 及其不同片段 DNA 重组质粒,转染 RSC 96 细胞 48 h 后,加入预冷的细胞裂解液,裂解细胞后离心取上清。加入已经准备好的结合有 GST 融合蛋白的 GST-琼脂糖凝胶 4B 亲和柱材料到上述细胞裂解物上清中,4℃孵育 2~4 h。离心收集沉淀物,并经 PBS 洗涤 3 次后加入 20 μL 1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液,100℃变性 10 min,以 anti-EGFP 和 anti-GST 抗体进行 Western blot 检测。

1.9 His-NLS 重组蛋白 FITC 标记及荧光实验

以 1:100 (protein:FITC)的比例,用 FITC 标记重组表达的 NLS 及 NLS1, NLS2, NLS3 蛋白片段。具体方法为:二甲基亚砜(dimethyl sulphoxide, DMSO)溶解适量 FITC,稀释于结合缓冲液 0.1 mol/L NaHCO_3 -NaOH(pH 9.0)中,立刻加入一定量的蛋白,4℃过夜标记。次日经 50 mmol/L Tris 封闭,样品上样于 Hepes buffer(20 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes), 100 mmol/L NaCl, pH 7.4)预平衡的预装 P10 柱,收集 FITC 标记的多肽片段,多肽浓度测定根据公式(1)计算。

$$[pr] = \frac{A_{280} - A_{494} \times 0.3}{\epsilon} \times 0.2 \quad (1)$$

Perkin-Elmer LS-55 荧光分光光度计(PE, 美国)执行滴定实验,反应体系:20 mmol/L Hepes, 100 mmol/L NaCl, pH 7.4, 测定温度为室温,激发波长 495 nm, 激发狭缝 5 nm, 发射狭缝 5 nm, 滴定反应时间间隔 2 min, 实验重复 3 次。滴定结束后取 520 nm 荧光值为纵坐标,不同剂量 DRP2 蛋白为横坐标作图,数据处理用 Origin8.0 软件。

2 结果

2.1 L-periaxin 和 DRP2 互作区段位于 L-periaxin 蛋白 NLS 结构域及 DRP2 蛋白 N 端(1~384 aa)

pCMV-tag-3B-L-periaxin 和 pEGFP-DRP2 重组质粒共转染施旺氏细胞 RSC 96, 利用 anti-EGFP 抗体进行免疫沉淀,检测 L-periaxin 与 DRP2 蛋白之间的相互作用。如图 1B 所示,在 Western blot 中,anti-Myc 抗体能够检测到 150 kD Myc-L-periaxin 的存在,anti-EGFP 抗体检测到 130 kD EGFP-DRP2 蛋白的存在,而对照组中未检测到相应目的蛋白。进一步以 anti-Myc 抗体免疫沉淀 EGFP-DRP2-N1-384 和 EGFP-DRP2-C385-954 两个产物,利用 anti-EGFP 抗体进行 Western blot 检测。如图 1C 所示,检测到 60 kD 左右 EGFP-DRP2-N1-384,而对照组及 DRP2-C385-954 组未检测到相应目的片段,上述结果表明 L-periaxin 结合在 DRP2 蛋白的 N 端(1~384 aa)部分。

为进一步明确 L-periaxin 不同结构域与 DRP2 之

图 1 Co-IP 和 GST pull down 验证 L-periaxin 和 DRP2 蛋白之间相互作用

A: L-periaxin 和 DRP2 蛋白不同区域及结构域分布, 数字代表相应氨基酸残基位置; B: Co-IP 验证 Myc-L-periaxin 和 EGFP-DRP2 存在相互作用, 上样量 80 μ g, IgG(M)为小鼠 IgG 阴性对照组; C: Co-IP 验证 Myc-L-periaxin 与 EGFP-DRP2-N1-384 存在相互作用, 通道 1 和 2 为 DRP2-N1-384 和 C385-954 上样组, 通道 3 和 5 为小鼠 IgG 阴性对照组, 通道 4 和 5 为 Myc 抗体沉淀组; D: GST pull down 验证 GST-DRP2-N1-384 与 L-periaxin 及 N118-196 存在相互作用; 上样组为带有 EGFP 标签的 L-periaxin 及其不同区域 N1-102, N118-196, M197-1059, C1060-1461 在 RSC 96 细胞表达产物, 对照组 GST 为 GST 蛋白结合 EGFP-L-periaxin

间的相互作用, 以结合在 GST-琼脂糖凝胶 4B 的 GST-DRP2-N1-384 融合蛋白为诱饵蛋白, 以表达带有 EGFP 标签的 L-periaxin 及其不同结构域片段的细胞裂解液上清与之孵育, 分别以 anti-EGFP 和 anti-GST 抗体检测目的蛋白. 结果表明, 与 DRP2-N1-384 存在特异性相互作用的是 L-periaxin 的 NLS 结构域(图 1D).

2.2 L-periaxin-NLS 结构域结合 DRP2 蛋白 N 端 spectrin like 2 和 WW 结构域(N180~384 aa)

DRP2 蛋白 N 端(1~384 aa)部分包括 2 个 spectrin like repeat(spectrin like 1(1~179 aa)和 spectrin like 2(180~349 aa))和 1 个 WW(350~384 aa)结构域. 为了进一步分析 N 端部分与 L-periaxin-NLS 区域相互作用的精细区域. 分别纯化 GST-DRP2-N1-179 和 GST-

DRP2-N180-384 及 His-L-periaxin-NLS 融合蛋白, 利用 GST pull down 进行互作分析. 图 2A 所示, DRP2-N180-384 与 NLS 蛋白存在相互作用, 但是 DRP2-N1-179 与 NLS 并未检测到相应的结合. 为进一步证明 DRP2-N180-384 区域与 L-periaxin-NLS 在 RSC96 细胞中存在相互作用, 对 RSC96 细胞中共转染的 pEGFP-DRP2-N1-179/pCMV-tag-3B-NLS 和 pEGFP-DRP2-N180-384/pCMV-tag-3B-NLS 进行 Co-IP 实验, 如图 2C 结果所示, 转染有 pEGFP-DRP2-N180-384/pCMV-tag-3B-NLS 的细胞裂解物在 Western blot 中检测到复合物, 但 pEGFP-DRP2-N1-179/pCMV-tag-3B-NLS 共转染组未检测到目的复合物的存在. 以上结果表明, DRP2 蛋白 N 端 N180-384, 即 spectrin like 2 结构域和 WW 结构域是与 L-periaxin 蛋白 NLS 结构域互作的关键区域.

2.3 BiFC 验证 DRP2-N180-349, DRP2-N350-384 与 L-periaxin-NLS 的互作

利用 BiFC 双分子荧光互补技术进一步验证 DRP2 蛋白的 N180-384 区域与 L-periaxin-NLS 的相互作用. pYN-NLS 分别与 pYC-DRP2-N1-179, pYC-

DRP2-N180-349, pYC-DRP2-N350-384 以及 pYC-DRP2-N1-384 共转染 HeLa 细胞, 培养 24 h 后, Delta Vision FITC 通道可检测到阳性对照组 pYC-DRP2-N1-384/pYN-NLS 与实验组 pYC-DRP2-N180-349/pYN-NLS 和 pYC-DRP2-N350-384/pYN-NLS 共转染组由于彼此蛋白间相互作用将两个 YFP 多肽片段拉近重新产生强的荧光信号, pYC-DRP2-N1-179/pYN-NLS 及 pYN/pYC 共转染组荧光信号较弱(图 3A).

利用流式细胞仪进一步量化蛋白片段间的相互作用. 不同分子互补载体组合 pYN/pYC, pYC-DRP2-N1-384/pYN-NLS, pYC-DRP2-N1-179/pYN-NLS, pYC-DRP2-N180-349/pYN-NLS 与 pYC-DRP2-N350-384/pYN-NLS 共转染 HeLa 细胞 24 h, Dot Plot 统计结果与上述荧光镜检结果相似(图 3B). 以 pYC-DRP2-N1-384/pYN-NLS 流式检测结果定义为 100%, 计算得到 pYC-DRP2-N180-349/pYN-NLS, pYC-DRP2-N350-384/pYN-NLS 共转染 HeLa 细胞后, 细胞群体中阳性细胞百分比达 80% 左右; pYC-DRP2-N1-179/pYN-NLS 共转染后, 细胞群体中阳性细胞百分比为 4%(图 3C). 这些结果进一步表明, DRP2 蛋白 N180-384 区域, 即 DRP2-spectrin like 2 和 WW 结构域与 L-periaxin-NLS 结构域存在相互结合.

图 2 DRP2 蛋白 N180-384 区段与 L-periaxin 的 NLS 结构域之间存在相互作用

A: GST pull down 验证 GST-DRP2-N180-384 与 His-NLS 重组蛋白之间存在相互作用, 上样组为 His-L-periaxin-N118-196, 上样量 80 μ g; B 和 D 分别为 DRP2-N1-179, DRP2-N180-384 重组蛋白与 NLS 重组蛋白结合能力的定量检测结果, 上样组为 His-L-periaxin-N118-196(B)与 Myc-L-periaxin-N118-196(D); C: Co-IP 验证 DRP2-N180-384 与 NLS 在 RSC 96 细胞内形成复合物; Co-IP 组为 Myc-NLS 分别与 EGFP-DRP2-N1-179, EGFP-DRP2-N180-384 共表达, EGFP 抗体免疫沉淀检测 Myc-NLS

图3 BiFC技术验证DRP2与L-periaxin的相互作用区段

A: pYN-NLS 分别与 pYC-DRP2-N1-384, pYC-DRP2-N1-179, pYC-DRP2-N180-349, pYC-DRP2-N350-384, 共转染 HeLa 细胞后荧光观测结果, 其中 pYN/pYC 为阴性对照组, 蓝色为 DAPI 通道, 绿色为 FITC 通道; B: 流式细胞仪检测 pYN-NLS 分别与 pYC-DRP2-N1-384, pYC-DRP2-N1-179, pYC-DRP2-N180-349, pYC-DRP2-N350-384 之间的相互作用. 上面一行为流式 Dot Plot 统计结果, 下面一行为直方图显示细胞总群中荧光强度的分布; C 为 B 图的柱状统计结果图, 定义 pYC-DRP2-N1-384/pYN-NLS 共转染流式检测结果为 100%, 实验重复 3 次

2.4 L-periaxin 蛋白 3 段 NLS 亚结构域具有不同的生物学功能

L-periaxin 蛋白 NLS 结构域包括有 NLS1, NLS2 以及 NLS3 3 个亚结构域. 为明确哪一个 NLS 亚结构域特异性地结合 DRP2 蛋白, 以结合在 GST-琼脂糖凝胶 4B 的 GST-DRP2-N180-384 融合蛋白为诱饵蛋白, 分别与 His 标签 NLS1, NLS2, NLS3 孵育, GST-Pull down 结果如图 4A 所示, NLS2 和 NLS3 与 DRP2-N180-384 存在直接作用, 且与 NLS2 结合能力强于 NLS3(图 4B). 但是 NLS1 并不存在与 DRP2-

N180-384 的相互结合, 同样 GST 对照组中未检测到相应大小目的片段.

进一步荧光滴定实验结果显示, 随着 DRP2-N180-384 蛋白的不断加入, FITC-NLS2 和 FITC-NLS3 实验组在 520 nm 处的荧光强度逐渐增大至平台期. 以 520 nm 处滴定后荧光强度值与初始荧光强度值之差 $F-F_0$ 为纵坐标, DRP2-N180-384 浓度为横坐标作图. 由图 4C 可见, 在 L-periaxin 的 3 段 NLS 片段中 NLS2 和 NLS3 片段参与和 DRP2 的 N180-384 区域结合.

利用荧光定位实验分析融合有 EGFP 标签的

图 4 L-periaxin-NLS2 及 NLS3 亚结构域与 DRP2-N180-384 区段存在相互作用

A: GST pull down 验证 GST-DRP2-N180-384 与带有 His 标签的 NLS1, NLS2 以及 NLS3 的相互作用; B: GST-DRP2-N180-384 与不同 NLS 亚结构域 GST pull down 结果的统计学分析; C: 重组蛋白 DRP2-N180-384 与 FITC 标记的 NLS, NLS1, NLS2, NLS3 荧光滴定结果. 以 520 nm 吸光值的(F-F0)为纵坐标, 重组 GST-DRP2-N180-384 蛋白浓度为横坐标作图, 实验重复 3 次, 取平均值

图 5 L-periaxin-NLS 不同片段在 RSC 96 细胞中的荧光定位

RSC 96 细胞分别转染带有 EGFP 标签的 NLS, NLS1, NLS2 以及 NLS3, 活细胞工作站 Delta Vision 下分析细胞定位结果, 蓝色为 DAPI 通道, 绿色为 FITC 通道

L-periaxin 和 NLS 及其 3 个亚结构域 NLS1, NLS2, NLS3 各自在 RSC 96 细胞中的定位. 图 5 结果显示, pEGFP-*L-periaxin* 在细胞质中检测到明显的荧光分布 (图 5A); pEGFP-NLS 在细胞中定位较广泛, 细胞核、细胞膜及细胞质近核处均可以检测到荧光信号, 但主要以细胞核和细胞膜处荧光信号最为集中 (图 5B). 融合 EGFP 标签的 NLS1 的细胞定位结果与 NLS 定位结果相似, 但以核为主, 膜质处荧光信号分布较弱 (图 5C); 但 NLS2 及 NLS3 则主要定位于细胞质中 (图 5D 和 E). 以上结果表明, periaxin 的核输入主要由其 NLS1 序列介导, 而 NLS2 和 NLS3 则主要参与 DRP2 的相互作用. NLS 不同亚结构域的分布对于 L-periaxin 的核输出及膜上定位, 以及 PDG 蛋白复合物的形成提供条件.

2.5 L-periaxin-NLS 不同亚结构域与 DRP2-N180-384 在 RSC 96 细胞内的荧光共定位

为进一步对 periaxin 蛋白 NLS 不同亚结构域与 DRP2-N180-384 的相互作用进行分析, 利用荧光共定位实验分析带有 EGFP 标签的 L-periaxin-NLS 及其 3 个亚结构域 NLS1, NLS2, NLS3 与 Cherry 标签 DRP2-N180-384 的蛋白片段在 RSC96 细胞中的荧光共定位. 活细胞工作站 Delta Vision 观察结果显示, 单独表达的 L-periaxin 与 DRP2, DRP2-N180-384 在施旺氏细胞中主要定位于细胞质 (图 6A~C); 共表达 Cherry-DRP2/EGFP-*L-periaxin* 以及 Cherry-DRP2-N180-384/EGFP-*L-periaxin*, 二者红色和绿色荧光以重叠形式共定位于细胞质 (图 6D 和 E), 共表达 EGFP-NLS 与 Cherry-DRP2-N180-384 在细胞质及细胞膜上存在明显共定位图 (6F), 同时 NLS2, NLS3 与 DRP2-N180-384 蛋白在细胞质中也存在明显的共定位现象 (图 6H 和 I), 但 NLS1 与 DRP2-N180-384 共定位现象不明显 (图 6G). 以上结果表明 DRP2-N180-384 与 NLS2 和 NLS3 空间上存在相互结合的可能.

3 讨论

L-periaxin 蛋白是神经细胞中重要支架蛋白之一, 其在周围神经系统中的正确表达, 将直接影响神经冲动的快速传递及运动神经和感觉神经的功能. 小鼠坐骨神经组织中 L-periaxin 蛋白在胚胎期 (E12~E14

周), L-periaxin 主要集中于细胞核内, 进一步伴随个体的成熟, 施旺氏细胞逐步包裹轴突形成髓鞘, L-periaxin 蛋白的表达逐步上调, 并检测到从细胞核到细胞质中的转移, 并最终定位与远离轴突的细胞膜处^[19]. 2000 年 Sherman 和 Brophy^[12]指出 NLS 结构域是介导 L-periaxin 蛋白入核的主要因素.

L-periaxin 的 PDZ 结构域内含一段核输出信号序列是引导该蛋白从细胞核到细胞质中的重要因素^[10]. 那么对于 L-periaxin 的 NLS 区域所含的 3 段非典型的“NLS”区段, 在执行 L-periaxin 的两种功能: 入核和结合 DRP2 蛋白时有何异同? 序列分析表明, L-periaxin 的 3 个 NLS 区域中, 正电荷 Lys 和 Arg 的含量分别占该区氨基酸残基总数的 36%, 40% 和 50%, 均属富含碱性氨基酸的区段, 在 L-periaxin 入核及与 DRP2 结合中是否存在差异? 本文数据揭示大致相同的 3 段 NLS 序列却执行不同的功能, NLS 结构域中第 1 段 NLS 序列, 是介导 L-periaxin 蛋白核输入的关键区域, NLS1 区域可能通过和不同配体蛋白诸如 DRP2 或核 NLS 受体, 如 importin 不同配体二聚体等结合, 引导 L-periaxin 蛋白入核; 而 NLS2 和 NLS3 可能通过与 DRP2 的结合共同锚定到膜上, 形成 PDG 的三元跨膜蛋白复合物开启基底膜 (laminin, LN) 与施旺氏细胞内信号传递的通路. L-periaxin 的蛋白位置变化和其生物学功能的发挥密切相关, L-periaxin 通过不同配体的结合调节其位置和功能的变化, 如 L-periaxin 与埃兹蛋白 Ezrin 的相互作用^[20], 以及体外培养施旺氏细胞接触抑制均可影响 L-periaxin 蛋白表达、细胞定位和功能发挥^[12].

DRP2 与肌萎缩相关蛋白 dystrophin 和 utrophin 等共同构成脊椎动物肌营养不良蛋白超家族的不同分支. 该家族不同成员可通过 C 端结构域与肌营养不良聚糖 (dystroglycan) 和神经肌肉接头蛋白 (syntrophins) 等组成一系列肌营养不良蛋白 (dystroglycan) 和糖蛋白 (glycoprotein) 的复合物 DGC^[21]. DRP2 蛋白一级结构序列分析揭示, C 端保守性的 EF 和 ZZ 结构域, 及相对松散的 CC 结构域使 DRP2 与该家族的几个成员同源, 但是与其他成员 N 端不同, DRP2 蛋白 N 端含有 2 个类血影蛋白结构域, dystrophin 和 utrophin 等蛋白 N 端则富含超过 24 个类血影蛋白结构域, 这使 DRP2 成为生命起源研究最理想的材料. 类血影蛋白结构域富含螺旋, 其螺旋结构域疏水核心富含的芳香族氨基酸残基是类血影

图6 EGFP-L-periaxin 及 NLS 不同片段与 Cherry-DRP2 及 N180-384 在 RSC 96 细胞中的荧光共定位

A~C: RSC 96 细胞分别单独转染 pEGFP-L-periaxin, pmCherry-C1-DRP2 以及 pmCherry-C1-DRP2-N180-384 的细胞定位; D~I: RSC 96 细胞分别共转染 pEGFP-L-periaxin/pmCherry-C1-DRP2, pEGFP-L-periaxin/pmCherry-C1-DRP2-N180-384 以及 pEGFP-NLS, NLS1, NLS2, NLS3 与 pmCherry-C1-DRP2-N180-384 的荧光共定位结果

蛋白结构域与细胞膜上磷脂分子结合的关键因素^[22,23]。该结构域通过与 actin 肌动蛋白、锚蛋白等相互作用,形成支持生命系统的细胞膜骨架,参与维持细胞形态及灵活性^[22,24];一些研究表明,该结构域还通过参与 Rac 蛋白及 Rho GTP 酶的活化,调节 Rac 蛋白的活性,影响细胞伸展及黏附^[25];类血蛋白结构域同样是 G 蛋白偶联受体复合体及突触多蛋白质复合物的组成部分,通过调节细胞膜受体的表达影响细胞周期^[22,24,26]。2008 年谭斯品等人^[27]应用酵母双杂交系统,运用 DRP2 蛋白的 N-Bait 筛选大鼠

(*Rattus norvegicus*)脑 MATCHMAKER CDNA 文库得到 Zwint-1 蛋白。Zwint-1 蛋白是有丝分裂激酶 Aurora B 的底物,主要定位于着丝粒,在有丝分裂过程中,控制着丝粒聚集,并通过与外部蛋白的连接决定纺锤体装配的时间点^[28]。

本文进一步证实了 L-periaxin 的 NLS 区域只结合在 DRP2 含有的 spectrin like 2 和 WW 结构域部分, spectrin like 1 不参与 L-periaxin 的互作,但其是否影响 spectrin like 2+WW 结构域与 L-periaxin 的结合并不可知? 这样留待后续的一个实验就是要进一步明

确 DRP2 蛋白 spectrin like 结构域或 WW 结构域哪个是结合 L-periaxin 的 NLS2 和 NLS3 的关键区域? 是共同结合还是各有差异? 另外由于 Zwint-1 与 L-periaxin 结合在 DRP2 的区域存在部分重叠, 是否 Zwint-1 参与调节 L-periaxin 与 DRP2 相互作用? 还是

L-periaxin 与 DRP2 的互作竞争性影响了 DRP2 与 Zwint-1 的结合, 从而调节施旺氏细胞的增殖与分化的信号转导? 一系列问题有待进一步研究. 总之, 本文对于进一步理解 L-periaxin 蛋白在外周神经髓鞘化形成过程的蛋白分子机制提供了新的素材.

参考文献

- 1 Pareyson D, Marchesi C. Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *Lancet Neurol*, 2009, 8: 654–667
- 2 Tokunaga S, Hashiguchi A, Yoshimura A, et al. Late-onset Charcot-Marie-Tooth disease 4F caused by periaxin gene mutation. *Neurogenetics*, 2012, 13: 359–365
- 3 Azzedine H, Senderek J, Rivolta C, et al. Molecular genetics of charcot-marie-tooth disease: from genes to genomes. *Mol Syndromol*, 2012, 3: 204–214
- 4 Boerkoel C F, Takashima H, Stankiewicz P, et al. Periaxin mutations cause recessive Dejerine-Sottas neuropathy. *Am J Hum Genet*, 2001, 68: 325–333
- 5 Patzig J, Jahn O, Tenzer S, et al. Quantitative and integrative proteome analysis of peripheral nerve myelin identifies novel myelin proteins and candidate neuropathy loci. *J Neurosci*, 2011, 31: 16369–16386
- 6 Williams A C, Brophy P J. The function of the Periaxin gene during nerve repair in a model of CMT4F. *J Anat*, 2002, 200: 323–330
- 7 Dytrych L, Sherman D L, Gillespie C S, et al. Two PDZ domain proteins encoded by the murine periaxin gene are the result of alternative intron retention and are differentially targeted in Schwann cells. *J Biol Chem*, 1998, 273: 5794–5800
- 8 Han H, Kursula P. Periaxin and AHNK nucleoprotein 2 form intertwined homodimers through domain swapping. *J Biol Chem*, 2014, 289: 14121–14131
- 9 任贞玖, 石亚伟. 双分子荧光互补系统分析 S-periaxin 蛋白的聚合. *中国细胞生物学学报*, 2014, 8: 1060–1067
- 10 Shi Y, Zhang L, Yang T. Nuclear export of L-periaxin, mediated by its nuclear export signal in the PDZ domain. *PLoS One*, 2014, 9: e91953
- 11 Gillespie C S, Lee M, Fantes J F, et al. The gene encoding the Schwann cell protein periaxin localizes on mouse chromosome 7 (Prx). *Genomics*, 1997, 41: 297–298
- 12 Sherman D L, Brophy P J. A tripartite nuclear localization signal in the PDZ-domain protein L-periaxin. *J Biol Chem*, 2000, 275: 4537–4540
- 13 Sherman D L, Fabrizi C, Gillespie C S, et al. Specific disruption of a schwann cell dystrophin-related protein complex in a demyelinating neuropathy. *Neuron*, 2001, 30: 677–687
- 14 Sherman D L, Wu L M, Grove M, et al. Drp2 and periaxin form Cajal bands with dystroglycan but have distinct roles in Schwann cell growth. *J Neurosci*, 2012, 32: 9419–9428
- 15 Gillespie C S, Sherman D L, Fleetwood-Walker S M, et al. Peripheral demyelination and neuropathic pain behavior in periaxin-deficient mice. *Neuron*, 2000, 26: 523–531
- 16 Wu L M, Williams A, Delaney A, et al. Increasing internodal distance in myelinated nerves accelerates nerve conduction to a flat maximum. *Curr Biol*, 2012, 22: 1957–1961
- 17 Masaki T, Matsumura K. Biological role of dystroglycan in Schwann cell function and its implications in peripheral nervous system diseases. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 740403
- 18 Nyfeler B, Michnick S W, Hauri H P. Capturing protein interactions in the secretory pathway of living cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 6350–6355
- 19 Scherer S S, Xu Y T, Bannerman P G, et al. Periaxin expression in myelinating Schwann cells: modulation by axon-glial interactions and polarized localization during development. *Development*, 1995, 121: 4265–4273
- 20 王慧, 任贞玖, 段英俊, 等. L-Periaxin 蛋白与 Ezrin 蛋白相互作用初步分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 3: 279–283
- 21 Jin H, Tan S, Hermanowski J, et al. The dystrotelin, dystrophin and dystrobrevin superfamily: new paralogues and old isoforms. *BMC Genomics*, 2007, 8: 19
- 22 Djinovic-Carugo K, Gautel M, Ylanne J, et al. The spectrin repeat: a structural platform for cytoskeletal protein assemblies. *FEBS Lett*, 2002, 513: 119–123

- 23 Ipsaro J J, Huang L, Mondragon A. Structures of the spectrin-ankyrin interaction binding domains. *Blood*, 2009, 113: 5385–5393
- 24 Machnicka B, Czogalla A, Hryniewicz-Jankowska A, et al. Spectrins: a structural platform for stabilization and activation of membrane channels, receptors and transporters. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1838: 620–634
- 25 Metral S, Machnicka B, Bigot S, et al. AlphaII-spectrin is critical for cell adhesion and cell cycle. *J Biol Chem*, 2009, 284: 2409–2418
- 26 张锐, 李冬海. 血影蛋白结构与功能研究进展. *中国科学: 生命科学*, 2013, 43: 478–491
- 27 谭斯品, 肖献忠, Roberts Roland G. 运用酵母双杂交系统筛选肌营养不良相关蛋白 2(DRP2)相互作用蛋白. *中国现代医学杂志*, 2008, 18: 133–137
- 28 Kasuboski J M, Bader J R, Vaughan P S, et al. Zwint-1 is a novel Aurora B substrate required for the assembly of a dynein-binding platform on kinetochores. *Mol Biol Cell*, 2011, 22: 3318–3330

Refined Analysis of Protein Interaction between L-periaxin and DRP2

YANG Yan^{1,2} & SHI YaWei¹

1 Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of the Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2 Chemical and Biological Engineering College, Taiyuan Science and Technology University, Taiyuan 030006, China

Periaxin is a cytoskeletal-associated protein that was initially identified in peripheral nervous system, and periaxin has been confirmed to play an essential role in myelination and myelin maintenance. DRP2 is the only reported protein to interact with periaxin, but the accurate binding mechanism of DRP2 and L-periaxin is still not clear. In this report, the interaction between L-periaxin and DRP2 was further investigated by bimolecular fluorescence complementation (BiFC), Co-IP, GST pull-down, fluorescence spectroscopy, and subcellular localization. The result demonstrated that L-periaxin possesses three unusual nuclear localization signals, NLS1 of the NLS domain involved in nucleocytoplasmic shuttling of L-periaxin protein, both NLS2 and NLS3 of the NLS domain participated in interaction with spectrin-like domain 2 and WW domain of DRP2. These data revealed a previously unknown binding model between DRP2 and L-periaxin, and provided valuable data for finding the relationship between L-periaxin and pathogenesis of demyelinating Charcot Marie tooth type 4F disease.

L-periaxin, NLS domain, DRP2, spectrin-like domain, protein-protein interaction, Charcot Marie tooth type 4F

doi: 10.1360/052014-0277