

RTN4- C 相互作用蛋白的筛选与鉴定

唐小军, 陈益存, 张锡然

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210097)

[摘要] 我们的前期工作发现过表达 RTN4- C 基因能够抑制肝癌细胞株 SMMC7721 的生长并且促进其发生凋亡. 为了进一步了解 RTN4- C 促进凋亡的机制, 本文采用酵母双杂交的方法从小鼠 7 d 胚胎文库中筛选其相互作用的蛋白. 最终筛选到其同源家族成员 RTN3 进一步采用间接免疫荧光和及构建的荧光载体表明, RTN4- C 和 RTN3 蛋白在 HEK293 和 HeLa 细胞中发生共分布. 本研究为进一步阐明 RTN4- C 抑制细胞生长和促进细胞凋亡的机制提供了新的依据.

[关键词] RTN4- C, RTN3 酵母双杂交, 免疫荧光, 共定位

[中图分类号] Q291 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2007)01-0074-04

Screening and Identification of the RTN4- C Interactive Proteins

Tang Xiaojun, Chen Yicun, Zhang Xiran

(School of Life Science, Nanjing Normal University, The Key Laboratory of Molecular and Medical Biotechnology of Jiangsu Province, Nanjing 210097, China)

Abstract Our previous study showed that overexpression of the RTN4- C might inhibit SMMC7721 cell growth and promote cell apoptosis. To investigate the mechanism of RTN4- C inhibition of cell growth and pro-apoptosis, the yeast two-hybrid method was adopted. By screening the mouse 7-day Embryo MATCHMAKER cDNA Library, we obtained the interacted protein RTN3, which has been reported to pro-apoptosis. Our further study indicated that RTN4- C and RTN3 colocalized in HEK293 and HeLa cells using immunofluorescence and fluorescence vectors. The present study could be useful to clarify the mechanism of RTN4- C inhibition of cell growth and pro-apoptosis.

Key words RTN4- C, RTN3, yeast two-hybrid, immunofluorescence, co-localization

0 引言

RTN4 基因又称为 *nogo* (neurite outgrowth inhibitor) 基因, 是编码内质网蛋白家族成员之一. 由于存在不同的剪接方式和启动子, RTN4 主要编码 3 种蛋白: RTN4- A, RTN4- B, RTN4- C. RTN4- A (又称 *Nogo- A*, RTN- α _L) 主要分布在中枢神经系统中 (CNS, central neurite system), 在成体中抑制中枢神经受损后的再生^[1, 2]. RTN4- B (又称 *Nogo- B*, *ASY*, RTN- α _S) 在各种组织中都有一定的表达, 有报道其能改造脉管系统^[3]和特异促进肿瘤的细胞的凋亡^[4], 但这还存在着争议^[5]. RTN4- C (又称 *Nogo- C*) 在骨骼肌中有大量表达, 另外在脑, 肾, 肝中也有一定的表达, 其过表达也能够延迟神经的再生和肝癌细胞的凋亡^[6], 但对于其功能的分子机制还不清楚.

目前 RTN 家族的 RTN4 基因受到越来越多的关注, 但主要集中在 RTN4- A, RTN4- B 这两个成员上, 而对于该基因最小的剪接变体 RTN4- C 研究的较少, 关于 RTN4- C 相互作用的蛋白也未见报道. 因此本文借助于酵母双杂交系统筛选 RTN4- C 相互作用的蛋白, 有助于阐明 RTN4- C 诱导细胞发生凋亡的机制.

收稿日期: 2006-06-06 修回日期: 2006-09-28
作者简介: 唐小军 (1981-), 硕士研究生, 主要从事细胞遗传及分子遗传的学习与研究. E-mail: xjtang09@yahoo.com.cn
通讯联系人: 张锡然 (1941-), 女, 研究员, 博士生导师, 主要从事细胞遗传与分子遗传的教学与研究. E-mail: zhangxiran@njnu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 质粒的构建

用 PCR 技术以 RTN4- C- pCDNA3.1 载体为模板扩增 RTN4- C, 引入 EcoRI 和 SalI 酶切位点, 与诱饵蛋白表达载体 pGBKT7 引入 EcoRI 和 SalI 酶切位点. 将 PCR 产物亚克隆到诱饵蛋白表达载体 pGBKT7 的相应位点, 得到 RTN4- C- pGBKT7. 构建载体 RTN4- C- pGBKT7. 用 PCR 技术从小鼠肝 cDNA 中扩增 RTN4- C, 引入酶切位点 EcoRI 和 KpnI 并克隆到 pEGFP 载体中, 构建 RTN4- C- pEGFP. 用 PCR 技术从小鼠肝 cDNA 中扩增 RTN3, 引入酶切位点 EcoRI 和 BamHI 并克隆到 pARed2 载体中, 构建 RTN3- pARed2. 以上构建的质粒均经过测序验证.

1.2 酵母双杂交实验

我们用诱饵蛋白质粒 RTN4- C- pGBKT7 去筛选克隆在 pACT2 载体上的小鼠 7 d 胚胎文库 (cblnthech 公司), 按照酵母双杂交的操作手册 (MATCHMAKER GAL4 Two- Hybrid System 3& Libraries User Manual) 进行操作. 首先, 进行了毒性实验和自激活实验, 并通过 Western Blotting 的方法验证 RTN4- C 在酵母菌 AH109 中的表达. 我们用 SD /- Leu /- Trp /- His /- Ade 选择性培养基进行筛选, 并将长出的克隆置于新的 SD /- Leu /- Trp /- His /- Ade 选择性培养板上, 接着用 X- Gal 检测其 β - 半乳糖苷酶的活性, 确定阳性克隆. 提取阳性克隆的质粒, 转化入大肠杆菌 DH5 α 中, 然后提取质粒用 Bgl 酶切验证, 并进行测序. 所得到的阳性克隆, 再转入酵母细胞 AH109 中进行回复验证.

1.3 细胞培养

人胚肾细胞 HEK293 细胞株和 Hela 细胞株均由本实验室保存. 细胞在 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中, 用含 10% 胎牛血清 (杭州四季青) 和抗生素 (100 U /mL 青霉素和 100 U /mL 的链霉素) 的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco 公司) 进行培养.

1.4 免疫荧光分析

将人的胚胎肾细胞 HEK293 接种到预先用 0.1% 明胶处理过的盖玻片上, 培养 24 h 后, 用磷酸钙转染的方法将 RTN3- pCMV- HA 和 RTN4- C- pCMV- Myc 转染至 HEK293 细胞. 转染后 36 h 用 0.1 mol/L 的 PBS 将细胞轻轻漂洗 2 次, 然后用 4% 的多聚甲醛将细胞室温固定 30 min, 0.1 mol/L PBS 将细胞轻轻漂洗两次, PBS 封闭液室温封闭 2 h. 加入 c- Myc 抗体 (1: 100) (clontech 公司) 和羊抗 HA 抗体 (1: 50) (Santa Cruz Biotechnology 公司) 4℃ 孵育过夜. 0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次, 5 min /次, 加入 FITC 标记的兔抗鼠抗体 (1: 100) (武汉博士德) 和 Cy3 标记的兔抗羊抗体 (1: 100) (武汉博士德) 室温孵育 1 h. 0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次, 5 min /次, 用 DAPI 复染细胞核, 封片后用荧光显微镜观察.

2 实验结果

2.1 RTN4- C- pGBKT7 在酵母菌 AH109 中表达

RTN4- C 在酵母菌 AH109 中没有毒性和自激活作用. 诱饵蛋白的表达如图 1: 泳道 1, 酵母菌 AH109 中提取的蛋白, 未检测到任何条带. 泳道 2, pGBKT7 空载体转化的酵母菌 AH109 提取的蛋白, 检测到一条大小约为 22 000 的条带, 与 pGBKT7 空载自身所带的 "Gal4 DNA 结合域 c- Myc" 相对分子质量大小相符. 泳道 3, RTN4- C- pGBKT7 转化酵母菌 AH109 提取的蛋白检测到一条大小约为 45 000 与 RTN4- C 融合蛋白预测的相对分子质量大小一致, 较弱的为非特异性条带. 本结果表明所构建的诱饵蛋白能在酵母菌 AH109 中稳定表达.

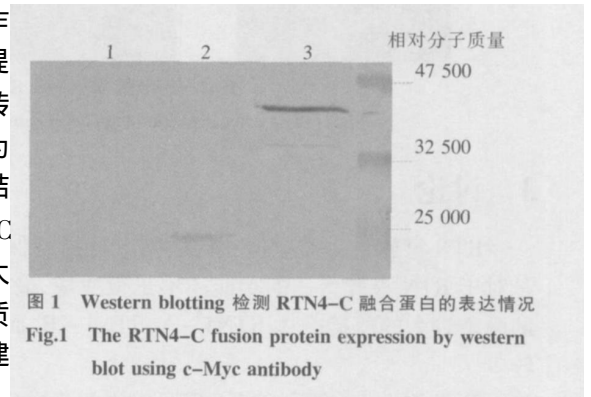


图 1 Western blotting 检测 RTN4-C 融合蛋白的表达情况
Fig.1 The RTN4-C fusion protein expression by western blot using c-Myc antibody

2.2 RTN4- C 蛋白与 RTN3 蛋白在酵母细胞内发生相互作用

从 5.6×10^6 个克隆中, 通过 SD /- Leu /- Trp /- His /- Ade 选择性培养基和 β - 半乳糖苷酶的实验进行筛选, 共得到 11 个阳性克隆. 经过测序分析表明它们分为 7 种不同的序列, 有 2 个是 RTN3 的 cDNA

序列, 1 个编码 GPI 锚定的高密度脂蛋白结合蛋白的大部分序列, 5 个带有 2 种不同的未知的 cDNA 序列, 还有 3 个发生移码突变. 进一步回复验证表明, 只有 RTN3 能够与 RTN4- C 发生相互作用 (见图 2 其中 A 为实物图, B 为示意图).

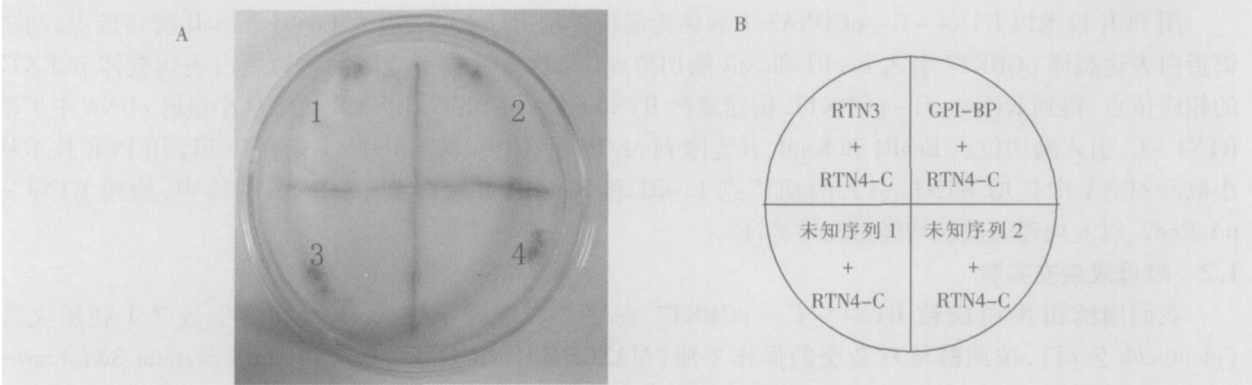


图 2 RTN3 和 RTN4- C 相互作用在酵母菌中的回复验证
Fig.2 The interaction of RTN4- C and RTN3 redetection in yeast

2. 3 RTN4- C 蛋白与 RTN 3 蛋白在哺乳动物细胞内有着共同的分布

用 lipofectam ineTM 2000 转染试剂将 RTN 4- C- pEGFP 和 RTN 3- pAsRed2 共转染到 HeLa 细胞中, 36 h 后, 直接用荧光显微镜观察到两者主要共分布在细胞的内质网上 (见图 3)

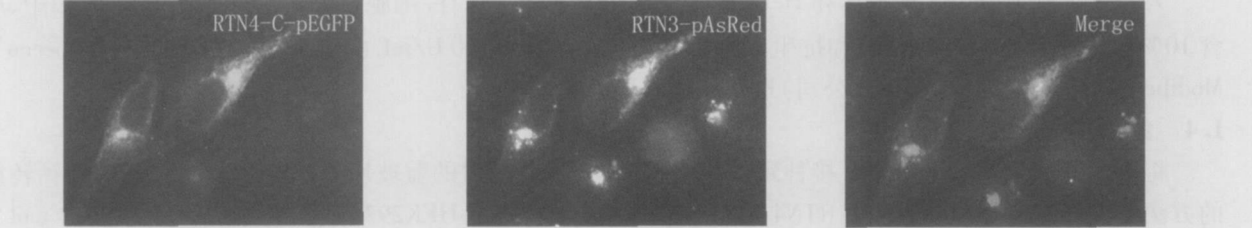


图 3 过表达 RTN4- C 和 RTN3 在 HeLa 细胞中共分布
Fig.3 The colocalization of overexpressed RTN4- C and RTN3 in HeLa cells by fluorescence vectors

我们再次用磷酸钙法将 RTN3- pCMV - HA 和 RTN4- C- pCMV - myc 转染至 HEK293 细胞中, 进行间接免疫荧光分析也发现同样的结果 (见图 4)

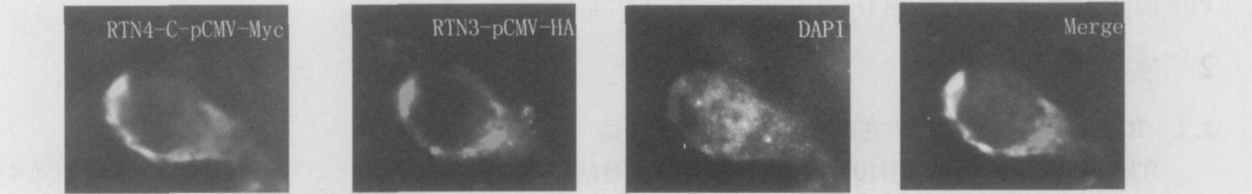


图 4 间接免疫荧光显示 RTN4- C 和 RTN3 在 HEK293 细胞中共分布
Fig.4 The colocalization of RTN4- C and RTN3 in HEK293 cells by indirect immunofluorescence

3 讨论

RTN 家族是一类定位在内质网上且高度保守的蛋白, 其最初是作为神经内分泌细胞的分子标记. 但是对于 RTN 家族蛋白的功能还不是很清楚, 最近对于该家族的 RTN 4/ Nogo 研究较多, 但也仅限于该基因的两个较大的剪接变体 RTN 4- A, RTN 4- B, 而对于该基因的一个较小的剪接变体 RTN 4- C 的功能研究较少.

到目前为止, 有关 RTN 4 相互作用的蛋白已经有较多的研究, 在 2000 年 S Tagami 等运用酵母双杂交技术以 Bcl- x_L 为诱饵筛选胚胎和成人的脑文库, 发现 RTN 4- A (RTN - x_L) 和 RTN 4- B (RTN - X_S) 都可以与 Bcl- x_L 结合, 并且进一步发现 RTN 4- B (RTN - X_S) 还可以与 Bcl- 2 结合, 可能通过改变 Bcl- x_L 和 Bcl- 2 在细胞中的亚定位来抑制它们的抗凋亡活性^[7]. 2001 年 A. E. Fournier 等证明 RTN 4- A (Nogo-

A)能够抑制中枢神经的再生,并进一步了解到该功能区在其N端和其C端的两跨膜区域的中间部分又称为Nogo-66并且在神经元的表面筛选到与其相互作用的Nogo-66受体NgR^[8]。2002年W. H. Hu运用酵母双杂交技术以Nogo-A的胞外/内质网腔内的区域为诱饵筛选成人的脑文库,获得3个与Nogo-A胞外/内质网腔区域相互作用的蛋白。这3个蛋白均为线粒体蛋白,其中2个为泛醇-细胞色素C还原酶的核心蛋白,是线粒体呼吸链复合体3的组分。还有一个未知蛋白(NMP),其定位在线粒体上^[9]。另外Nogo-A还可以与 α -微管蛋白,鞘磷脂碱基蛋白以及 K^+ 通道相关蛋白Caspr相互作用^[10-11]。

Liu Q Z等^[12]通过酵母双杂交的方法发现RTN4-B与RTN3相互作用,并且RTN4-B和RTN3自身分别能形成同源二聚体,这两种同源二聚体都有促进细胞凋亡的能力,而RTN4-B和RTN3形成的异源二聚体促进细胞凋亡的能力下降。过表达RTN3能够通过引起细胞内内质网的 Ca^{2+} 的消耗及细胞质中 Ca^{2+} 浓度的升高,从而引发细胞的凋亡,具有诱导细胞发生凋亡的功能区主要在它的两个跨膜区,而RTN3缺少内质网滞留信号的突变体诱发细胞凋亡的能力并没有降低^[13]。进一步研究表明RTN3是一种新的能够引起内质网压力的蛋白^[14]。

有趣的是,本文通过酵母双杂交的方法筛选到RTN4-C相互作用的蛋白也是该家族的同源蛋白RTN3,因此推测RTN3和RTN4-C可能共同参与了调节细胞凋亡的过程,我们将进一步研究RTN3和RTN4-C相互作用主要发生在RTN4-C的哪个结构域,以及两者相互作用是否参与了细胞的凋亡过程,如果是,是通过哪条通路引起的,或者还是仅仅因为由于该内质网蛋白在细胞内的过表达,引起内质网上非折叠蛋白增加而导致的内质网的压力,从而引起细胞发生凋亡^[15]。

[参考文献]

- [1] Fournier A E, G and Pre T, Strittmatter S M. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration [J]. Nature, 2001, 409: 341-346.
- [2] Chen M S, Huber A B, van der Haar M E W, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody N-1 [J]. Nature, 2000, 403: 434-439.
- [3] Acevedo L, Yu J, Erdjument-Bromage H, et al. A new role for Nogo as a regulator of vascular remodeling [J]. Nat Med, 2004, 10(4): 382-388.
- [4] Li Q, Qi B, Oka K, et al. Link of a new type of apoptosis-inducing gene ASY/Nogo-B to human cancer [J]. Oncogene, 2001, 20(30): 3929-3936.
- [5] Oertle T, Meckler D, Schwab M E. Do cancer cells die because of Nogo-B? [J]. Oncogene, 2003, 22(9): 1390-1399.
- [6] Chen Y C, Lu D D, Zhang X R, et al. RTN4-C gene expression in hepatocellular carcinoma and its influence on SMMC7721 cell growth and apoptosis [J]. Acta Genetica Sinica, 2005, 32(9): 891-897.
- [7] Tagami S, Eguchi Y, Kinoshita M, et al. A novel protein, RTN-X₅, interacts with both Bcl-X_L and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity [J]. Oncogene, 2000, 19: 5736-5746.
- [8] Fournier A E, G and Pre T, Strittmatter S M. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration [J]. Nature, 2001, 403: 439-444.
- [9] Hu W H, Hausmann O N, Yan M S, et al. Identification and characterization of a novel Nogo-interacting mitochondrial protein (NMP) [J]. J Neurochem, 2002, 81: 36-45.
- [10] Taketomi M, Kinoshita N, Kinura K, et al. Nogo-A expression in mature oligodendrocytes of rat spinal cord in association with specific molecules [J]. Neurosci Lett, 2002, 322: 37-40.
- [11] Nie D, Zhou Z, Ang B T, et al. Nogo-A at CNS paranodes is a ligand of Caspr: possible regulation of K^+ channel location [J]. EMBO J, 2003, 22: 5666-5678.
- [12] Liu Q Z, Gan M, Qi B, et al. Dimerization of two novel apoptosis-inducing proteins and its function in regulating cell apoptosis [J]. Science in China (Series C), 2003, 46(3): 225-235.
- [13] Qu X L, Qi Y P, Lan Q, et al. The novel endoplasmic reticulum (ER)-targeted protein HAP induces cell apoptosis by the depletion of the ER Ca^{2+} stores [J]. FEBS Letters, 2002, 529: 325-331.
- [14] Kuang E, Wan Q, Qi Y P, et al. ER Ca^{2+} depletion triggers apoptosis signals for endoplasmic reticulum (ER) overload response induced by overexpressed reticulon 3 (RTN3/HAP) [J]. J Cell Physiol, 2005, 204: 549-559.
- [15] Xu C Y, Maitre B B, Reed J C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions [J]. J Clin Invest, 2005, 115(10): 2656-2664.

[责任编辑: 孙德泉]