

OMgp 不同结构域在抑制神经突起生长中的作用

樊拥军¹, 李 龙^{1,2}, 许 健¹, 于 涟^{1,2*}

(¹ 浙江大学生物医学工程与仪器科学学院, 杭州 310027; ² 浙江大学动物科学学院, 杭州 310029)

摘 要: OMgp (oligodendrocyte-myelin glycoprotein) 是一种在中枢神经系统表达的 GPI 连接的糖蛋白。最新发现, 它具有诱使生长锥溃变和抑制神经突起再生的作用, 这一作用是通过与 nogo-66 等神经再生抑制因子竞争结合同一受体 NgR 而实现的。但其相互作用的确切部位尚不能肯定。利用 GST 融合蛋白表达系统, 分段表达了含有不同 OMgp 结构域的片段, 对其与 NgR 作用的结构域进行了研究。结果表明, 在 OMgp 与 NgR 的黏附结合过程中, OMgp 的亮氨酸富含重复序列结构域是必需的, 只有含该结构域的 OMgp 蛋白片段才能黏附表达有 NgR 的 CHO 细胞, 并抑制神经突起的生长; 在体外, 含有丝/苏氨酸富含重复序列结构域的 OMgp 蛋白片段虽然具有微弱的沉降 NgR 的功能, 但并不能抑制神经突起的生长。该结果将有助于中枢神经系统损伤后神经再生的理论与治疗研究。

关键词: OMgp; GPI 连接蛋白; 神经再生

中图分类号: R338.2; R394.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)03-290-07

一个世纪前人们就发现, 周围神经损伤后具有较强的再生能力, 而成年哺乳动物的中枢神经系统(CNS)损伤后, 神经轴突不能再生。人们推断在中枢神经系统内可能存在某种抑制分子阻断了轴突的再生。直到最近对 Nogo^[1]的研究才阐明了成年哺乳动物某些 CNS 神经再生受限的机制。随后又发现 MAG(myelin-associated glycoprotein), OMgp (oligodendrocyte-myelin glycoprotein) 也具有抑制神经突起生长的功能^[2]。Nogo、MAG、OMgp 竞争使用同一个受体 nogo-Receptor (NgR) 介导其抑制神经突起生长的功能。实验表明, 应用抗 NgR 的多肽可以促进小鼠 CNS 损伤后运动功能的恢复^[3]。因此, 研究 NgR 以及与其相互作用的蛋白质, 将有助于临床对 CNS 损伤后神经再生的治疗。

人和小鼠的 OMgp 由 440 个氨基酸组成, 序列分析显示其基本结构分为四部分: 氨基端有一个半胱氨酸富含基序(cysteine-rich motif, CR), 紧接着是 7 个亮氨酸富含重复序列(leucine-rich repeat, LRR), 随后是 1 个丝/苏氨酸富含重复序列(serine/threonine repeat, S/T R), 其羧基端含一疏水片段。目前已知, 在 NgR 和 OMgp 的结合过程中, NgR 的 LRR 及其羧基端结构域都是必需的^[4]。但对与 NgR 作用的 OMgp 的功能结构域尚不能肯定。本文

采用 GST(glutathione-S-transferase)融合蛋白表达方法, 分别表达了含有 OMgp 不同结构域的蛋白片段, 对 OMgp 与 NgR 作用的结构域及其在神经突起生长中的作用进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

C57BL/6J 小鼠(4周, 雄性)、S-D 大鼠(孕 15~18 天)由浙江大学医学院实验动物中心提供。大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)、CHO 细胞系、载体 pGEM-T、pcDNA 3.1/zeo、pGEX-4T-1 为本室保存。One shot LA PCR mix 试剂盒购自 Takara 公司。Super-script preamplification system 为 Gibco 公司产品、抗 GST 抗体、抗 β -tubulin 抗体、DAPI dihydrochloride hydrate、PI-PLC(phosphatidylinositol-specific phospholipase C)、protease inhibitor cocktail 为 Sigma 公司产品。谷胱甘肽-琼脂糖亲和层析柱、FluoroLink Cy2 标记的羊抗鼠 IgG、FluoroLink Cy3 标记的羊抗兔 IgG 为 Pharmacia 公司产品。LIPOFECTAMINE 2000、DMEM/F12 培养液和 N2 添加剂为 Invitrogen

表1 构建原核表达质粒所用引物序列及条件

引物	引物序列	退火温度(°C)
OMf 上游	5'-GGGAATTCATTTGCTCTCCAGTGTACATGC-3'	53.9
下游	5'-AACGTCGACTCAGCCTGCCAGCATGACCACAGCA-3'	
OM1 上游	5'-GGGAATTCATTTGCTCTCCAGTGTACATGC-3'	55.5
下游	5'-AACGTCGACTCATGACCACCTGTTATTAT-3'	
OM2 上游	5'-GGGAATTCGTGTACCATAAAACAAA CATTAC-3'	56
下游	5'-AATGTCGACTCAGCCTGCCAGCATGACCACAGCA-3'	
OM3 上游	5'-GGGAATTCATGCTGGAAAAGGTTGTT-3'	55
下游	5'-ACGGTCGACTCATTGTTGGGTGTGTCTTC-3'	

公司产品。其他未注明的试剂均为国产。引物合成和DNA测序由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.2 OMgp 原核表达载体的构建

以Trizol试剂提取C57BL/6J小鼠脑总RNA,以superscriptase II反转录试剂盒合成cDNA第一链。按照Genbank公布序列设计一对引物:上游引物5'-tcccggagaaaatgagata-3',下游引物5'-aaaatagcagcaagtaccaagaca-3'。以反转录产物为模板扩增OMgp cDNA。反应条件为94°C变性1min,58°C退火1min,72°C延伸2min,共进行35个循环。扩增产物T-A克隆入pGEM-T easy载体进行测序。测序后以pGEM-T-OMgp为模板,对OMgp进行PCR分段扩增。设计四对引物(见表1),分别扩增OMgp全长(OMf,编码氨基酸残基25~440)及三个亚克隆片段OM1(编码氨基酸残基25~228),OM2(编码氨基酸残基229~440)和OM3(编码氨基酸残基133~342)(见图1)。在四对引物的上游引物中引入酶切位点EcoRI,在下游引物中加入终止密码子TGA并引入酶切位点SalI。PCR扩增产物经酶切、纯化回收后与原核表达载体pGEX-4T-1连接,转化大肠杆菌DH5 α 。挑取阳性克隆,抽取质粒后测序。测序后将四种质粒pGEX-OMf、pGEX-OM1、pGEX-OM2和pGEX-OM3分别转入大肠杆菌BL21表达蛋白质。

1.3 OMgp 融合蛋白的表达与鉴定

重组菌的培养、诱导、裂解按文献^[5]介绍的方法进行。pGEX-OMf、pGEX-OM1、pGEX-OM2和pGEX-OM3阳性克隆以及对照组pGEX-4T-1接种含氨苄青霉素的LB培养基,37°C活化过夜,按1%比例接种新鲜培养基。培养至对数期后,加入IPTG至终浓度为0.5mmol/L,在30°C诱导3~5h后,离心收集细菌。细菌经超声裂解后,收集裂解液上清,用谷胱甘肽-琼脂糖亲和层析柱纯化GST-OMgp融合蛋白。表达的蛋白分别命名为OMf1、OM1s、OM2s、OM3s,收集蛋白进行SDS-PAGE电泳。采用Lowry's法进行蛋白定量。用Western印迹对

表达的GST-OMgp融合蛋白进行鉴定。将OMgp融合蛋白SDS-PAGE电泳后转移到硝酸纤维素膜上,与抗GST的单克隆抗体反应,单抗使用浓度为1:5000。

1.4 表达有NgR的CHO细胞系(NgR-CHO)的建立

1.4.1 NgR真核表达载体的构建 以C57BL/6J小鼠脑mRNA反转录合成的cDNA第一链为模板,按照GenBank公布序列合成一对引物5'-cgctcgaccccgaagatgaagag-3'和5'-tggcggcgtggaggagaga-3'扩增小鼠NgR cDNA。条件为94°C 1min,61°C 1min,72°C 2min,共35个循环。另外合成一对引物5'-aagaattcggccaccatgaagaggcgtcc-3'和5'-agctcgagtcagcagggcccaagcactgtc-3',5'端分别带有EcoRI和XhoI酶切位点,以cDNA为模板进行再次PCR。PCR产物经EcoRI和XhoI双酶切,插入真核细胞表达载体pcDNA3.1/zeo。构建好的载体经酶切鉴定并测序。

1.4.2 细胞系建立及免疫荧光鉴定 pcDNA3.1/zeo-NgR经酶切鉴定及测序后,按说明以脂质体(LIPOFECTAMINE 2000)转染CHO细胞(同时以空载体转染CHO细胞)。以Zeosin(250u/ml)筛选单细胞克隆,每3天更换一次培养液,7~10天后挑选单细胞克隆培养。免疫荧光法鉴定NgR-CHO、PI-PLC处理过的NgR-CHO(PIPLC-CHO)以及CHO细胞。一抗为兔抗NgR多克隆抗体(新加坡中央医院肖志成博士惠赠),使用浓度为1:200,二抗为FluoroLink Cy3(红色)标记的羊抗兔抗体,使用浓度为1:500。细胞核用DAPI标记。

1.5 OMgp与NgR-CHO细胞的黏附实验(cell binding assay)

按文献^[6]的方法,将硝酸纤维素膜溶于甲醇溶液,均匀地铺在3.5cm直径的六孔组织培养板。以GST蛋白为对照,取GST融合蛋白OMf1、OM1s、OM2s和OM3s各1 μ l(调蛋白浓度为0.1mg/ml)点在培养板内,每组做3个复孔。2h后以Hank's液轻轻漂洗1次。随后每孔加入2ml(1×10^6 个/mL)NgR-

CHO 细胞悬液。另外一组为 PI-PLC 处理 (0.06/ μ l, 37°C 孵育 2h) 过的 NgR-CHO 细胞。将培养板置 37°C 培养箱中, 2h 后开始观察, 12h 后以 Hank's 液洗 3 次, 以 2.5% 戊二醛固定后, 考马斯亮蓝染色观察结果。细胞对照组为仅转染空载体的 CHO 细胞。黏附的细胞计数后, 以 Dunnett *t* 检验检验各组与对照组间的差异。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

1.6 GST 沉降实验(GST pull down assay)

按照文献^[7]的方法改进, 取 4 周的 C57BL/6J 小鼠脑, 用匀浆器在冰冷的匀浆缓冲液中[320mmol/L 蔗糖; 10 mmol/L Tris-HCL (pH7.4); 1mmol/L NaHCO₃ (pH7.4); 1mmol/L MgCl₂; 1% protease inhibitor cocktail,]匀浆。匀浆液离心(5000 g)15min 后, 收集上清, 以高速离心机(sorvall ultra pro 80)于 4°C 离心(40 000 g)60min。收集沉渣, 溶于裂解缓冲液中[10mmol/L Tris-HCL(pH9.0); 150mmol/L NaCl; 0.5% Triton X-100; 1% DOC; 0.5% SDS; 2mmol/L EDTA; 1% protease inhibitor cocktail]。取样本 100 μ l, 加入 10 μ l 结合有 GST、OMf1、OM1s、OM2s 和 OM3s 融合蛋白的谷胱甘肽琼脂糖球珠, 于 4°C 轻摇过夜。然后以冰冷的 PBS 洗四次, 将谷胱甘肽琼脂糖球珠加入 SDS-PAGE 上样液, 95°C 加热 5min, 离心后取上清进行 SDS-PAGE 电泳。电泳后转移到硝酸纤维素膜上, 以抗 NgR 抗体为一抗(抗体浓度为 1:1000)进行 Western 印迹。

1.7 神经生长抑制实验^[8]

1.7.1 神经元的培养 培养的神细胞取材于孕 16~18 天的 S-D 大鼠胚胎。用断髓法处死孕鼠, 取出胚胎。解剖显微镜下取出胎鼠海马, 将海马在无钙镁的 Hank's 平衡盐溶液中切碎, 加入 0.125% 的胰蛋白酶溶液, 于 37°C 消化 10 min, 用吸管反复吹打使成单细胞悬液。用胎牛血清终止胰蛋白酶的作用, 以 10% DMEM/F12 培养液洗涤细胞两次。用孔径为 100 μ m 的网筛过滤。1000 r/min 离心 5min 后计数细胞。将细胞培养在盖玻片上, 以免疫荧光双标法鉴定培养细胞。一抗为抗 NgR 抗体和抗 β -tubulin 抗体, 抗体浓度为 1: 200。二抗为 FluoroLink Cy3 标记的羊抗兔 IgG 抗体(红色)和 FluoroLink Cy2 标记的羊抗鼠 IgG 抗体(绿色), 使用浓度为 1:500。标记后在荧光显微镜下观察结果。

1.7.2 神经突起生长抑制实验 用多聚左旋赖氨酸(5 mg /L)于 37°C 处理培养板 2h。无菌去离子水洗 3 次, 在无菌橱中干燥。每孔中点 1 μ l 蛋白。将

培养板放入 37°C 温箱中, 使蛋白沉淀于板上。PBS 洗涤 1 次, 加入 2 ml 分离的神经元悬液(2×10^6 个/孔)在神经元培养液(DMEM/F12 和 N2 添加剂)培养 24~48 h, 2.5% 戊二醛固定, 考马斯亮蓝染色观察结果。

2 结果

2.1 OMgp 原核表达载体的构建及融合蛋白的表达与鉴定

以小鼠 OMgp cDNA 为模板, 使用 PCR 法构建了与 GST 融合表达的含有编码全长 OMgp 的原核表达载体 pGEX-OMf, 同时按照其结构特征将其分为三段, 构建了原核表达载体 pGEX-OM1(含有 CR 区和 LRR 区)、pGEX-OM2(含有 S/T 区和羧基末端)和 pGEX-OM3(含有部分 LRR 区及部分 S/T 区)(图 1)。酶切鉴定(图 2)及序列分析表明, pGEX-OMf、pGEX-OM1、pGEX-OM2 和 pGEX-OM3 两端引入了 *EcoRI/SalI* 酶切位点, 3' 端引入终止密码子 TGA, 无错误碱基掺入及密码缺失发生, 与预期序列一致。GST 蛋白的分子量为 26kD, OMf1, OM1s, OM2s 和 OM3s 与 GST 的融合蛋白预期分子量分别为 72 kD、49 kD、49 kD、49 kD。表达的 GST 融合蛋白经谷胱甘肽-琼脂糖亲和层析柱纯化后进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色观察, 在相应分子量大小的部位有清晰的条带出现。使用抗 GST 的单克隆抗体与其反应(Western 印迹), 证实为 GST 融合蛋白(图 3)。

2.2 NgR-CHO 对 OMgp 蛋白的黏附实验

构建的真核细胞表达载体 pcDNA3.1-NgR 经酶切及测序鉴定, 结果与设计完全一致(图 4)。转入 CHO 细胞后表达于 CHO 细胞膜表面。免疫荧光染



图 1 OMf1、OM1s、OM2s 和 OM3s 蛋白结构示意图 SS, signal sequence; CR, cysteine-rich motif; LRR, leucine-rich repeat; S/T, serine/threonine repeat.

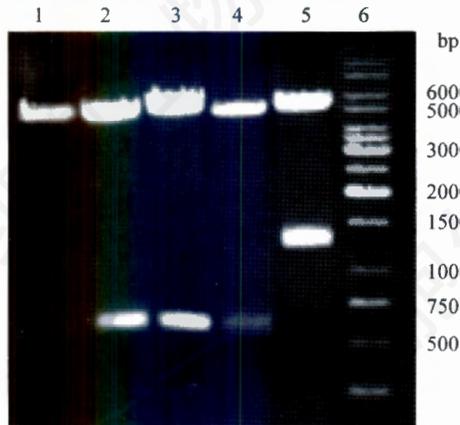


图2 pGEX-OMf、pGEX-OM1、pGEX-OM2、pGEX-OM3 质粒的 *EcoRI/SalI* 双酶切结果
1: pGEX-4T-1; 2: pGEX-OM1; 3: pGEX-OM2; 4: pGEX-OM3; 5: pGEX-OMf; 6: 1kb DNA ladder.

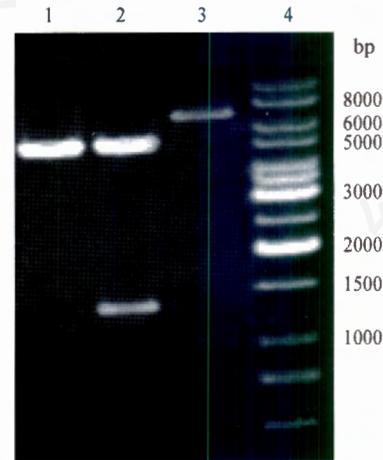


图4 pcDNA3.1-NgR 质粒的双酶切鉴定

1: *EcoRI/XhoI* 双酶切的 pcDNA3.1-zeo 质粒; 2: *EcoRI/XhoI* 双酶切的 pcDNA3.1-NgR 质粒; 3: *EcoRI* 单酶切的 pcDNA3.1-NgR 质粒; 4: DNA marker.

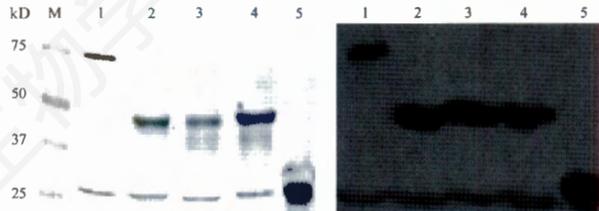


图3 GST-OMgp 融合蛋白的 SDS-PAGE(左)和 Western 印迹分析(右)

M: marker; 1: OMf1 蛋白; 2: OM1s 蛋白; 3: OM2s 蛋白; 4: OM3s 蛋白; 5: GST 蛋白。

色可见强烈红色荧光(图 5p), 表明转染 pcDNA3.1-NgR 质粒的 CHO 细胞膜表达有 NgR。

不表达 NgR 的 CHO 细胞(转染空载体)不能与 OMgp 蛋白结合。将 NgR cDNA 转染 CHO 细胞后, 表达的 NgR 通过 GPI 联结在 CHO 细胞表面(免疫荧光染色呈红色), 带有 NgR 的 CHO 可以和 OMgp 蛋白发生黏附。将 NgR-CHO 细胞培养在含有 OMf1、OM1s、OM2s、OM3s 以及 GST 蛋白的培养板内, 结果发现 NgR-CHO 能很快黏附在 OMf1 和 OM1s 蛋白上, 仅在培养 2h 后即可观察到。NgR-CHO 也可黏附在 OM3S 上, OM2s 则作用不明显。细胞计数证明 OMf1、OM1s、OM3s 与对照组比较有显著性差异($P < 0.01$), OM2s 与对照组比较无显著性差异($P > 0.05$)。为进一步证实此黏附作用是由 NgR 与 OMgp 的结合介导, 使用 PI-PLC 处理 NgR-CHO 细胞后(PI-PLC 处理后, 大部分细胞表面的 NgR 被剪切掉, 见图 5q), 再与 OMgp 蛋白作用, 发现大部分细胞丧失了与 OMgp 的黏附功能(图 5)。Dunnett

t 检验证明各组与对照组间无显著性差异($P > 0.05$)。

2.3 GST 沉降实验

所表达的 OMgp 蛋白是 GST 融合蛋白, 因此可以通过 GST 将 OMgp 蛋白联结在谷胱甘肽琼脂糖球珠上。与 NgR 结合了的 OMgp 融合蛋白则会连接在谷胱甘肽-琼脂糖球珠上沉降下来。小鼠 NgR 由 473 个氨基酸组成, SDS-PAGE 时呈现约 80 kD 左右的条带。结果表明, 不仅全长的 OMgp 可沉降 NgR, 仅含有 LRR 的 OM1s 和含有部分 LRR 的 OM3s 也可沉降 NgR。而不含 LRR, 仅含有 S/T 区和羧基末端的 OM2s 蛋白则仅沉降微量 NgR。单纯的 GST 蛋白不能沉降 NgR(图 6)。

2.4 OMgp 对神经突起生长的抑制实验

原代培养的海马神经元表达 NgR, OMgp 蛋白可以通过与 NgR 的作用抑制神经突起生长及诱使生长锥溃变。结果显示, OMf1 对神经元的抑制作用明显(图 7), 在不含 OMgp 蛋白的区域内, 神经突起相互接触形成网络, 但却无法长入 OMgp 蛋白区内。在含有 OMf1 蛋白的区域内, 生长在培养板上的神经元数量明显减少, 且少有突起伸出。仅含有 LRR 的 OM1s 对神经元的抑制作用与 OMf1 相比无明显差异。含有部分 LRR 的 OM3s 蛋白区域内可见少量神经元存在, 但也不能形成神经网络, 可见 OM3s 对神经突起生长也具有一定的抑制作用。OM2s 则不能抑制神经突起的生长, 神经元生长在蛋白区内, 与对照组相比无明显差异。

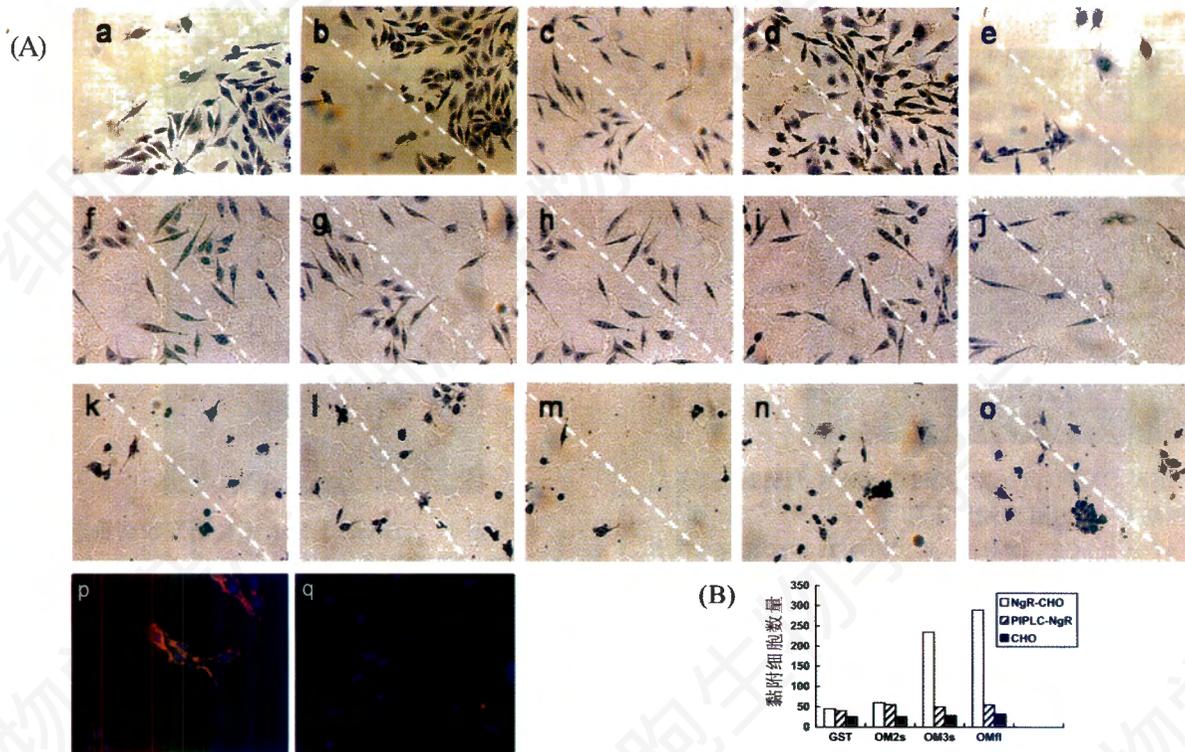


图5 不同OMgp片段与NgR-CHO细胞的黏附结果

A:NgR-CHO(a~e), PI-PLC处理的NgR-CHO(f~j)和CHO细胞(k~o)培养在点有OM1l(a,f,k), OM1s(b,g,l), OM2s(c,h,m), OM3s(d,i,n)和GST(e,j,o)蛋白的培养板内(虚线右侧为蛋白区), 12h后观察结果。(p)使用抗NgR抗体进行荧光染色的NgR-CHO细胞。(q)使用抗NgR抗体进行荧光染色的PI-PLC处理的NgR-CHO细胞。红色示NgR, 蓝色示胞核。 $\times 400$; B:各组间细胞黏附结果的比较。

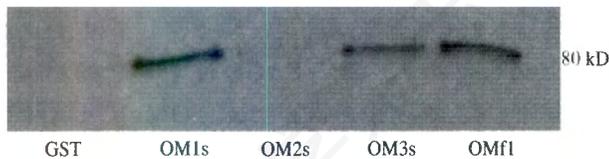


图6 GST-OMgp蛋白沉降NgR

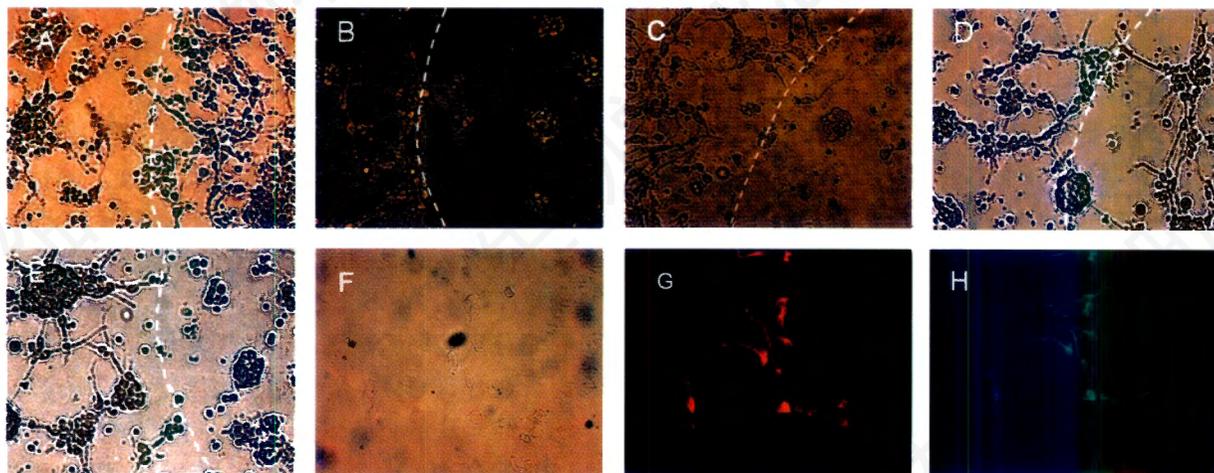


图7 不同OMgp片段对神经轴突的抑制作用($\times 400$)

15~18天的胎鼠海马神经元培养在点有GST(A), OM1l(B), OM1s(C), OM2s(D)和OM3s(E)的培养板内, 24h后固定观察。虚线右侧为蛋白区。(F)免疫荧光标记前的海马神经元。(G)以抗NgR抗体免疫荧光标记的海马神经元(红色)。(H)以抗 β -tubulin抗体免疫荧光标记的海马神经元(绿色)。(I)图G和图H的合并图像。

3 讨论

OMgp 是一种 GPI 连接的糖基化蛋白质, 属于 LR 家族成员。LR 家族成员包括许多受体和黏附分子, 多数情况下该家族成员参与蛋白质-蛋白质的相互作用, 如 DNA 修复、RNA 加工、细胞生长、细胞黏附和信号传导^[10]。最早发现, OMgp 是与成人中枢神经系统白质内多肽结合的花生凝集素^[11], 主要存在于少突胶质细胞和髓鞘上, 也存在于部分神经元上^[12]。Wang 等人用磷脂酶处理中枢神经系统的髓磷脂, 筛选了其释放出来的具有神经突起生长抑制作用的蛋白质, 发现 OMgp 具有诱使生长锥溃变以及抑制神经突起生长的功能。后来的研究证明, OMgp 的这一功能是通过 NgR 来介导的^[4]。

我们的结果表明, 在 OMgp 与 NgR 的结合过程中, 含有全部 LRR 的 OM1s 蛋白与 OMfl 的功能相比较, 无明显差异。而不含有 LRR, 仅含有 S/T 结构域及羧基端的 OM2s 则不能将 NgR-CHO 细胞黏附在蛋白上。含有部分 LRR 及部分 S/T 结构域的 OM3s 也具有较强的与 NgR 结合的功能, 说明在 OMgp 与 NgR 的结合过程中, OMgp LRR 区是与 NgR 结合的主要部位。GST 沉降实验也证明, 仅含有 LRR 或部分 LRR 的 OM1s、OM3s 即足以将鼠脑中的 NgR 沉降下来, 可见在 OMgp 与 NgR 的结合过程中, OMgp S/T 结构域以及羧基端、GPI 序列并不是必需的。那么 OMgp S/T 结构域以及羧基端是否与抑制信号的激活有关呢? 表达有 NgR 的神经细胞在 OM2s 上的培养表明, OMgp S/T 结构域及羧基端片段并不能抑制神经突起的生长。OMgp LRR 仍是激活抑制信号所必须的。推测在 OMgp 的神经突起生长抑制作用中, OMgp LRR 具有结合与传递抑制性信号的双重功能。而其 S/T 结构域及羧基端片段在 LRR 与 NgR 的结合过程中起一定的辅助作用。由于 NgR 只是由 GPI 连结在胞膜上, 并不穿过胞膜, 因此其生长抑制信号的传递必须通过一个与胞内结构直接联系的辅助受体起作用, 除非存在目前还未确认的 NgR 的异构体。对新发现的 NgR 的两个同源体 NgRH1 和 NgRH2 的研究表明, 尽管其结构以及在脑内的表达都与 NgR 很相似, 但它们并不能结合 nogo-66 或 MAG^[13]。而至今还未有人对 NgR 同源体与 OMgp 的关系进行研究, 因此目前认为 NgR 与 OMgp 结合后, 通过其辅助受体 P75(NTR) 将抑制性信号传导到细胞内, 引起细胞骨架重排, 导致生长锥的溃变。

研究表明, 无论在核酸水平还是在蛋白质水平上, OMgp 的 LRR 区都是高度保守的。因此认为, 和 LR 家族的其他成员一样, OMgp LRR 具有重要的功能。Patrick^[14]等人也证实, 去除了 LRR 的 OMgp 失去了对 COS7 细胞的生长抑制功能。目前对 OMgp 在中枢神经系统发育和损伤后神经再生过程中的作用知之甚少。研究结果表明 OMgp LRR 在 CNS 损伤后神经生长抑制过程中起着重要的作用, OMgp LRR 结构域是其神经生长抑制功能的主要功能区。

感谢新加坡中央医院的肖志成博士和新加坡国立大学的 Alan Lee 博士对本研究提供的帮助与指导

参 考 文 献

- [1] CHEN M S, HUBER A B, VAN DER HAAR M E, *et al.* Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature*, 2000, **403**(6768): 434 - 439.
- [2] MCKERRACHER L, DAVID S, JACKSON D L, *et al.* Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron*, 1994, **13**(4): 805 - 811.
- [3] GRANDPRE T, LI S, STRITTMATTER S M. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature*, 2002, **417**(6888): 547 - 551.
- [4] WANG K C, KOPRIVICA V, KIM J A, *et al.* Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature*, 2002, **417**(6892): 941 - 944.
- [5] *GST Gene Fusion System Handbook*, Amersham Biosciences, 2002, 9 - 26.
- [6] LAGENAUR C, LEMMON V. An L1-like molecule, the 8D9 antigen, is a potent substrate for neurite extension. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**(21): 7753 - 7757.
- [7] LEI G, XUE S, CHERY N, *et al.* Gain control of N-methyl-D-aspartate receptor activity by receptor-like protein tyrosine phosphatase alpha. *EMBO J*, 2002, **21**(12): 2977 - 2989.
- [8] XIAO Z C, TAYLOR J, MONTAG D, *et al.* Distinct effects of recombinant tenascin-R domains in neuronal cell functions and identification of the domain interacting with the neuronal recognition molecule F3/11. *Eur J Neurosci*, 1996, **8**(4): 766 - 782.
- [9] MIKOL D D, STEFANSSON K. A phosphatidylinositol-linked peanut agglutinin-binding glycoprotein in central nervous system myelin and on oligodendrocytes. *J Cell Biol*, 1988, **106**(4): 1273 - 1279.
- [10] HABIB A A, GULCHER J R, HOGNASON T, *et al.* The OMgp gene, a second growth suppressor within the NF1 gene. *Oncogene*, 1998, **16**(12): 1525 - 1531.
- [11] HABIB A A, MARTON L S, ALLWARDT B, *et al.* Expression of the oligodendrocyte-myelin glycoprotein by neu-

- rons in the mouse central nervous system. *J Neurochem*, 1998, **70**(4): 1704 — 1711.
- [12] PIGNOT V, HEIN A E, BARSKE C, *et al*. Characterization of two novel proteins, NgRH1 and NgRH2, structurally and biochemically homologous to the Nogo-66 receptor. *J neurochemistry*, 2003, **85**: 717 — 728.
- [13] VOURCH P, MOREAU T, ARBION F, *et al*. Oligodendrocyte myelin glycoprotein growth inhibition function requires its conserved leucine-rich repeat domain, not its glycosylphosphatidyl-inositol anchor. *J Neurochem*, 2003, **85**(4): 889 — 897.

Distinct Effects of OMgp Domains in Neurite Outgrowth Inhibition

FAN Yong Jun¹, LI Long^{1,2}, XU Jian¹, YU Lian^{1,2*}

(¹College of Biomedical Engineering and Instrument Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; ²College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp), a phosphatidylinositol-linked membrane glycoprotein expressed in the brain, was found to be an inhibitor of neurite outgrowth and axonal regeneration after brain injury. Several observation suggest that the LRR domain of OMgp may play an important role in inhibition of cell proliferation. Here we report an analysis of the domain requirement of OMgp in neurite outgrowth inhibition. The distinct domain of OMgp was subcloned into pGEX-4T vector and GST-fusion protein comprised distinct domain of OMgp were expressed. The protein were used to culture with NgR-expressing CHO and hippocampal neurons. Results show that the fragment consisting of the S/T domain and C-terminal of OMgp can not bind with NgR-expressing CHO cell. The fragment representing of LRR can bind with NgR-expressing CHO and inhibit the neurite outgrowth of primary neurons. It can also pull down NgR from mouse brain. The results suggest that the LRR domain of OMgp is required and sufficient for binding of NgR and neurite outgrowth inhibition.

Key words: OMgp; GPI-linked protein; neurite outgrowth

*Corresponding author, E-mail: yulian@zju.edu.cn