

应用酵母双杂交系统筛选 DAXX 相互作用蛋白

刘芳¹ 杜志银² 余秋波³ 王应雄^{4*}

(¹重庆市江北区第一人民医院检验科, 重庆 400020; ²重庆医科大学信息管理系, 重庆 400016;

³重庆医科大学公共卫生学院, 重庆 400016; ⁴重庆医科大学基础医学院, 重庆 400016)

摘要 应用酵母双杂交系统, 以 DAXX 全长为诱饵, 筛选成人肝 cDNA 文库, 寻找能与之发生相互作用的蛋白。利用生物信息学分析, 一对一回复性酵母杂交等提供的信息进行验证, 筛除假阳性。经过酵母双杂交共获得 158 个克隆, 经过验证分析, 最终确定 3 个无重复性克隆, 其中 1 个为已知的能够与 DAXX 发生相互作用的蛋白。获得的另 2 个基因编码的蛋白可能揭示 DAXX 新的作用机制。

关键词 DAXX; 酵母双杂交; 蛋白质相互作用

死亡结构域相关蛋白(death domain-associated protein, DAXX)是 Yang 等^[1]在 1997 年发现的一种 Fas 死亡结构域结合蛋白, 可激活 JNK 通路诱导细胞凋亡。DAXX 作为蛋白相互作用的一种转接子(adapter), 调节多种细胞因子的转录, 参与多种细胞反应。DAXX 不仅有促细胞凋亡的作用, 在某些条件下还有抗凋亡作用。但是有关 DAXX 在细胞凋亡中的作用以及作用机制尚未明确, 在细胞凋亡中 DAXX 究竟是起促凋亡还是抗凋亡作用, 目前还存在一定的争议。通过对 DAXX 和其他蛋白质之间相互作用的研究, 来了解 DAXX 的调控和功能, 具有重要的意义。本研究通过对 DAXX 相互作用蛋白的筛选, 不但可为其功能研究奠定基础, 还可以为凋亡蛋白的蛋白质网络图谱研究提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

酵母双杂交系统为 ProQuest™ Two-Hybrid System, 购自 Invitrogen 公司, 该系统的酵母菌株是 MaV203, 诱饵质粒载体是 pDBLeu, 猎物质粒载体是 pPC86。X- α -半乳糖苷酶(gal)购自 Clontech 公司。半乳糖、醋酸锂等购自 Sigma 公司。酵母抽提物(yeast extract)和胃蛋白胨(peptone)均购自美国 BD 公司。PEG3350、葡萄糖、各种氨基酸购于百灵克生物科技公司。3-AT、212~300 μ m 玻璃珠购自美国 Sigma 公司。酵母质粒提取试剂盒购于天为时代公司。细菌质粒小量提取试剂盒购于美国 Promega 公司。细菌质粒大量提取试剂盒购于德国 Qiagen 公司。Taq 酶、DNA 限制性内切酶购于大连宝生物工程(TaKaRa)有限公司。

T4 DNA 连接酶购于纽英伦生物技术(北京)有限公司。X-gal 购于美国 Gibco 公司。JM109 细菌感受态为实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 PDBleu-DAXX 诱饵载体的构建 利用 PCR 扩增的方法从成人肝 cDNA 文库中扩增全长的 DAXX 开放阅读框, DAXX 引物序列设计为: P1: 5'-GCG TCG ACC ATG GCC ACC GCT AAC AGC ATC-3'; P2: 5'-TT G CGG CCG CTA ATC AGA GTC TGA GAG CA-3'; PCR 反应的条件: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 45 s, 64℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 2 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 7 min。将回收的 PCR 片段利用 *Sal* I 和 *Not* I 酶切, 随后与同样酶切好的 pDBLeu 载体连接, 转化大肠杆菌 JM109 感受态, 经卡那霉素抗性筛选, 挑选阳性克隆, 提取转化子质粒进行 PCR 和酶切鉴定后测定 DNA 序列。

1.2.2 酵母的转化与自激活检测、3-AT 的确定 将所构建好的 pDBLeu-DAXX 转化到酵母 MaV203 中, 通过对 3-氨基-1, 2, 4-三唑(3-Amino-1, 2, 4-Triazole, 3-AT)浓度梯度平板上的生长情况来确定抑制 His 基础表达的 3-AT 水平, 观察有无自激活作用。

1.2.3 双杂交系统对成人肝 cDNA 文库的筛选和阳性克隆的鉴定 用转化了 DAXX 的酵母制备感受态, 然后转化成人肝 cDNA 文库质粒, 通过对 His、Ura 和 X-gal 的分析, 对转化的酵母进行筛选。提取能同

收稿日期: 2010-05-06 接受日期: 2010-07-30

国家重点基础研究发展规划(973计划)(No.2006CB910802)资助项目

* 通讯作者。Tel: 023-68485218, E-mail: wyx61221@yahoo.com.cn

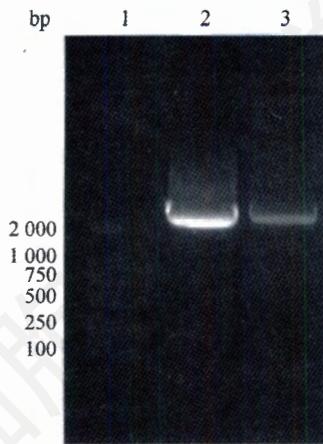


Fig.1 Electrophoresis analysis of PCR production of DAXX cDNA
1: DL2 000 marker; 2, 3: DAXX cDNA, the full length of DAXX is 2 223 bp.

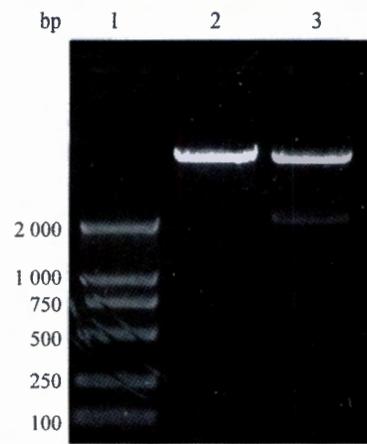


Fig.2 Electrophoresis analysis of Restriction enzyme digestion production of DAXX
1: DL2 000 marker; 2: pDBLeu control vector; 3: pDBLeu-DAXX.

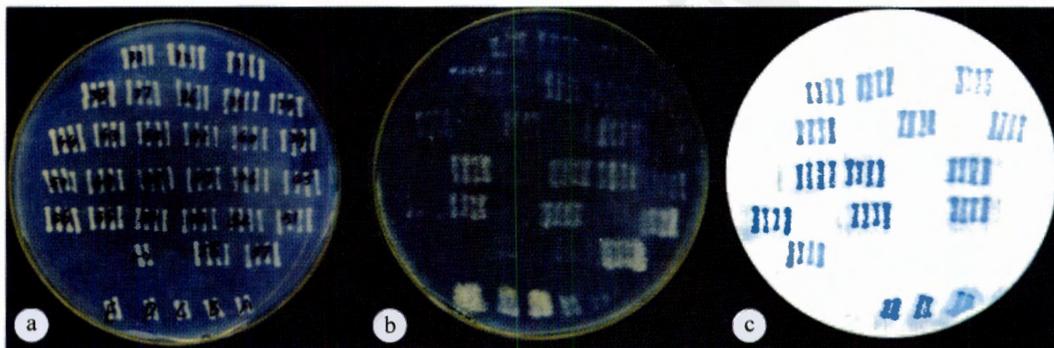


Fig.3 Reporter gene phenotypes of yeast strains

Yeast strains were patched from isolated colonies onto an SC-Leu-Trp master plate and incubated for 18h at 30°C. Cells from this master plate were replica plated onto SC-Leu-Trp-His+3AT(25 mM) and a YPAD plate containing a nylon membrane for x-Gal Assay.
a: master plate (SC-Leu-Trp); b: SC-Leu-Trp -His+3AT(25mM); c: x-Gal assay.

时激活三个报告基因的阳性克隆的质粒, 转化大肠杆菌 JM109 感受态, 经氨苄抗性筛选, 提取猎物质粒。

1.2.4 阳性克隆的回转验证和序列分析 将候选质粒与 DAXX 回转酵母 MaV203, 验证表型, 将回转阳性的质粒送公司测序, 随后利用 NCBI 上 BLAST 工具, 对测序结果进行分析。

2 结果

2.1 诱饵蛋白 PDBLeu-DAXX 构建和鉴定

参考 GenBank 中编号为 NM_001350 的 DAXX 基因序列, 成功利用 PCR 技术在成人肝 cDNA 文库中扩增出 2 223bp 大小的目的 DNA 片段, 结果如图 1 所示。将目的片段与 pDBLeu 同时双酶切后连接, 随后转化 *E.coli* JM109 感受态。将卡那平板上生长的菌落, 摇菌提取质粒, 进行 PCR 扩增和酶切鉴定, 结果如图 2 所示, 符合目的片段大小, 随后送测序验证。

测序结果证明 pDBLeu-DAXX 载体构建正确。

2.2 诱饵蛋白自激活的检测和 3-AT 的确定

将 pDBLeu-DAXX 转入酵母菌生长后, 长出的克隆菌落的大小、颜色正常, 表明目的蛋白的表达对酵母细胞没有毒性。根据加入了不同浓度的 3-AT 的 SC-Leu-Trp-His 营养缺陷平板上的菌落生长情况, 可以观察到抑制转化子细胞生长的最低的 3-AT 浓度为 25 mmol/L, 25 mmol/L、50 mmol/L、75 mmol/L、100 mmol/L 浓度的平板不能生长, 表明 pDBLeu-DAXX 无自激活作用, 我们采用 25 mmol/L 的 3-AT 浓度作为筛库浓度。

2.3 成人肝 cDNA 文库的筛选和阳性克隆的鉴定

大量提取成人肝 cDNA 文库后, 将其转入已经含有 pDBLeu-DAXX 质粒的酵母 MaV203 感受态中, 涂布于 SC-Leu-Trp-His+25 mmol/L 3-AT 平板上生长, 共得到 1.8×10^6 个转化子。经过复制清除后, 挑取生

Table 1 Comparison between positive clones and similar sequences in GenBank

High similarity to known genes	GenBank number	Frequency
FTH1	NM_002032	10
SPOP	NM_001007227	2
BTBD6	NM_033271	1

长的克隆 158 个进行 His、Ura、LacZ 表型分析。结果共有 23 个阳性克隆通过了 His、Ura 和 LacZ 这 3 个报告基因的验证。按照天为时代酵母质粒提取试剂盒说明书,提取阳性酵母质粒,通过氨苄抗性筛选得到 pPC86 猎物质粒,随后与 pDBLeu-DAXX 共转酵母 MaV203,再次进行 3 个报告基因的分析。将这 23 个阳性克隆回转后 3 个报告基因仍然阳性的克隆为 13 个(图 3)。随后将这 13 个 pPC86 猎物质粒送测序。将测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对,进一步分析这些测序结果,注意删除不符合读框和公认的假阳性蛋白,最终确定 3 个无重复阳性克隆(表 1)。

3 讨论

DAXX 的最早发现是作为一种 Fas 受体胞浆死亡结构域结合蛋白,经 Fas-DAXX-ASK1-JNK1 信号通路介导细胞凋亡^[1]。但是 DAXX 介导细胞凋亡过程中的信号通路目前仍不完全清楚。Song 等^[2]研究结果表明,DAXX 缺失突变体(501~625aa)可介导凋亡,其凋亡信号是通过蛋白酶 caspase 家族来调节的,Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)依赖的线粒体机制和 JNK/P38 的激活对 caspase 的活化起关键作用。DAXX 可加强 p53 介导的凋亡,一方面,DAXX 抑制 p53 依赖的抗凋亡分子 p21 的活化作用,另一方面,DAXX 可使靶基因如 BAX、PIG3、AIP1 等表达轻微增加,从而加强 p53 介导的细胞凋亡。此外,由于 p53 参与多种凋亡途径如 DNA 损伤、药物及 TGF- β 介导的凋亡过程,所以 DAXX 也可加强这些通路中凋亡的敏感性。

DAXX 不仅有促细胞凋亡的作用,有时候也可发挥抗凋亡效应。Michaelson 等^[3]发现缺失 DAXX 基因的小鼠胚胎发育受损,且有大量的胚胎干细胞出现凋亡,表明 DAXX 在胚胎发育中有抗凋亡效应。Chen 等^[4]用针对 DAXX 的 siRNA 封闭内源性 DAXX,使细胞对 Fas 和应激介导的凋亡更加敏感。DAXX 通过抑制 PML 外的促凋亡基因的表达,发挥抗 Fas 和应激介导凋亡的作用。Zobalova 等^[5]发现,在心肌细胞中,DAXX

能抑制应激状态下的凋亡进程。McDonough 等^[6]也发现,应激状态下的 DAXX 与 CHIP 蛋白的相互作用,能够抑制 p53 的凋亡过程。

为了进一步了解 DAXX 的复杂功能,本研究构建了全长 DAXX,以此为诱饵,利用酵母双杂交系统在成人肝 cDNA 文库筛选与之相互作用的蛋白。在筛选到的 23 个阳性克隆中,经回转验证、测序和生物信息学分析,确定了 3 个与 DAXX 有相互作用的蛋白。其中,SPOP 与 DAXX 的相互作用已有报道,更进一步验证了本研究的正确性^[7-9]。DAXX 和 FTH1 的相互作用在酵母双杂交结果中出现高达 10 次。FTH1 是铁蛋白的重链亚单位,是原核细胞和真核细胞内的主要的储铁蛋白。不同组织中铁蛋白亚单位的组成不同,对铁离子的吸收和释放的效率也不一样。铁蛋白最主要的功能是以可溶性和非毒性状态储存铁元素。其次,已经有越来越多的研究发现 FTH1 不仅在铁的储存中具有重要作用,在一些生物学进程方面,也发挥着越来越重要的作用。比如,在受到外源性有害物质及一些抑癌剂影响时,FTH1 的表达受到 Nrf2 的调控^[10]。而在巨噬细胞中,Nrf2 是带负电的低密度脂蛋白诱导凋亡的一种补偿机制^[11]。Nrf2 信号途径的减弱会导致蛋白酶体降解途径的减弱^[12]。FTH1 同时也是 NF- κ B 转录因子的下游分子,抑制 JNK 信号途径的过度活化,因此,调节着 TNF α 诱导的凋亡^[13]。这些数据表明 FTH1 与 DAXX 都能够参与凋亡途径。而且,DAXX 通过 Fas-DAXX-ASK1-JNK1 信号通路介导细胞凋亡,而 FTH1 又能够抑制 JNK 信号途径的过度活化,本实验所显示的 FTH1 与 DAXX 的相互作用提示在 JNK 信号通路中,FTH1 与 DAXX 有可能共同参与重要的生理作用。

本研究以酵母双杂交技术,首次以 DAXX 为诱饵蛋白从成人肝 cDNA 文库筛选到了 3 个相互作用的蛋白。其中,DAXX 与 SPOP 蛋白的相互作用已有报道,而 DAXX 与另两个蛋白在体内相互作用的真实性,以及它们的相互作用可能潜在的意义有待进一步的功能研究与证实。

参考文献(References)

- 1 Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 1997; 89 (7): 1067-76.
- 2 Song JJ, Lee Y. Daxx deletion mutant (amino acids 501-625) induced apoptosis occurs through the JNK/p38/Bax dependent mitochondrial pathway. *J Cell Biochem* 2004; 92(6): 1257-70.
- 3 Michaelson JS, Leder P. RNAi reveals anti-apoptotic and transcriptionally repressive activities of DAXX. *J Cell Sci* 2003; 116(2): 345-52.
- 4 Chen LY, Chen JD. Daxx silencing sensitizes cells to multiple apoptotic pathways. *Mol Cell Biol* 2003; 23(20): 7108-21.
- 5 Zabalova R, Swettenham E, Chladova J, Dong LF, Neuzil J. Daxx inhibits stress-induced apoptosis in cardiac myocytes. *Redox Rep* 2008; 13(6): 263-70.
- 6 McDonough H, Charles PC, Hilliard EG, Qian SB, Min JN, Portbury A, *et al.* Stress-dependent Daxx-CHIP interaction suppresses the p53 apoptotic program. *J Biol Chem* 2009; 284 (31): 20649-59.
- 7 Zhuang M, Calabrese MF, Liu J, Waddell MB, Nourse A, Hammel M, *et al.* Structures of SPOP-substrate complexes: insights into molecular architectures of BTB-Cul3 ubiquitin ligases. *Mol Cell* 2009; 36(1): 39-50.
- 8 Kwon JE, La M, Oh KH, Oh YM, Kim GR, Seol JH, *et al.* BTB domain-containing speckle-type POZ protein (SPOP) serves as an adaptor of Daxx for ubiquitination by Cul3-based ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 2006; 281(18): 12664-72.
- 9 La M, Kim K, Park J, Won J, Lee JH, Fu YM, *et al.* Daxx-mediated transcriptional repression of MMP1 gene is reversed by SPOP. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320(3): 760-5.
- 10 Pietsch EC, Chan JY, Torti FM, Torti SV. Nrf2 mediates the induction of ferritin H in response to xenobiotics and cancer chemopreventive dithiolethiones. *J Biol Chem* 2003; 278(4): 2361-9.
- 11 Pedrosa AM, Faine LA, Grosso DM, de Las Heras B, Boscá L, Abdalla DS. Electronegative LDL-induction of apoptosis in macrophages: Involvement of Nrf2. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1801(4): 430-7.
- 12 Malhotra D, Thimmulappa R, Vij N, Navas-Acien A, Sussan T, Merali S, *et al.* Heightened endoplasmic reticulum stress in the lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease: the role of Nrf2-regulated proteasomal activity. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180(12): 1196-207.
- 13 Pham CG, Bubici C, Zazzeroni F, Papa S, Jones J, Alvarez K, *et al.* Ferritin Heavy Chain Upregulation by NF- κ B Inhibits TNF- α -Induced Apoptosis by Suppressing Reactive Oxygen Species. *Cell* 2004; 119(4): 529-42.

Screening the Interaction Protein of DAXX by Yeast Two-hybrid System

Fang Liu¹, Zhi-Yin Du², Qiu-Bo Yu³, Ying-Xiong Wang^{4*}¹Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital in Jiangbei District, Chongqing 400020, China;²Faculty of Information Management, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China;³College of Public Health, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China;⁴Faculty of Basic Medical Sciences, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China)

Abstract To study interaction proteins of DAXX by yeast two-hybrid system, we use the full length of DAXX as bait to screen the human liver cDNA library and to find the proteins interacting with DAXX. The false clones were eliminated by bioinformatics methods and one to one yeast two-hybrid system. Three true positive clones from yeast clones were obtained after verification. The encoding proteins we obtained may play important roles in finding the new function of DAXX.

Key words DAXX; yeast two-hybrid; protein-protein interaction

Received: May 6, 2010 Accepted: July 30, 2010

This work was supported by the National Program on Key Basic Research Project (973 Program)(No.2006CB910802)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68485218, E-mail: wyx61221@yahoo.com.cn