

hDaxx 的克隆及其与 Pin1 之间的相互作用

陈明谅 王继锋 贺颖 李勤喜 叶志云*

(厦门大学生命科学学院, 教育部细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室, 厦门 361005)

摘要 克隆了 hDaxx 全长的 cDNA, 并证实 hDaxx 与肽基脯氨酰异构酶 Pin1 之间存在相互作用, 它们共定位于细胞核内。同时发现它们能够协同激活 p53 的转录活性, 揭示 Pin1 可能在 hDaxx 调节细胞凋亡的过程中发挥了重要作用。

关键词 hDaxx; Pin1; 相互作用

hDaxx 能够与 Fas 死亡结构域相结合, 并参与 Fas 通路诱导的 JNK 的激活和细胞凋亡^[1]。随着研究的深入, 人们发现 hDaxx 参与了细胞的各个生理学功能。在 TGF- β 信号刺激下, hDaxx 可激活 JNK 并诱导 B 淋巴细胞凋亡^[2]。Tang 等^[3]发现 hDaxx 对 p53 凋亡途径的重要调节作用。在不同条件下, hDaxx 与 MDM2 的结合发生改变, 从而影响 p53 的活性, 控制细胞凋亡。同时, 人们还发现 hDaxx 能与病毒分子相互作用, 如腺病毒 E1B55 癌蛋白。这种病毒蛋白能破坏 hDaxx 的细胞内分布及其功能^[4]。有关 hDaxx 在细胞凋亡中是起促进还是抑制作用, 目前还存在争议。

Pin1 是近几年才发现的一种新的肽基脯氨酰异构酶蛋白。跟其他的肽基脯氨酰异构酶不同的是, Pin1 能特异性地结合磷酸化的 Ser/Thr-Pro 结构域, 引起底物蛋白质构象的改变从而导致底物蛋白质性质发生改变(如与其他的蛋白质相互作用, 稳定性和蛋白质活性等等), 从而影响其生物学功能^[5]。Pin1 主要由两个功能域组成, 即 WW 结构域和 PPIase 结构域。WW 结构域是 Pin1 与底物结合的位点, 而 PPIase 结构域是 Pin1 的酶活性区域, 它催化底物在顺式和反式结构之间的转换^[6]。到目前为止, 人们已经发现许多重要蛋白质跟 Pin1 相互作用, 如 p53、Tau、c-Jun 和细胞周期蛋白 D1 等。Pin1 参与了细胞有丝分裂、细胞周期调控、细胞凋亡等重要功能。很多研究表明 Pin1 与老年痴呆症和癌症的发生相关, 这也为这些疾病的研究提供了一种思路^[7]。

本文成功地从 HeLa 细胞中克隆了 hDaxx 的 cDNA, 并通过体内和体外实验证实 hDaxx 与 Pin1 之间的相互作用。由于 Pin1 能够改变蛋白质的构象, 我们有望通过 hDaxx 和 Pin1 相互作用及其生物学功能的研究最终揭示 hDaxx 及 Pin1 在细胞凋亡中所起

的重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 Protein A/G plus beads 和各种抗体购自 Santa Cruz 公司, Pyrobest DNA 聚合酶、Trizol LS 和 Lipofectamine 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司, 各种 DNA 内切酶购自 TaKaRa 公司, Mass Ruler™ (1 kb, 100 bp) 和 Mix DNA Marker 购自 Fermentas 公司, 其他主要试剂来自 Sigma 公司。

1.1.2 质粒、菌株及细胞 pCMV5-myc-hDaxx 是从 HeLa 细胞提取 mRNA 并反转录而成, 利用 Trizol 法提取总 RNA, 再通过反转录 PCR 扩增出 cDNA, 最后通过 PCR 扩增出全长的 hDaxx 并插入到 pCMV5 从而构建出带有 myc 标签的 hDaxx 全长的表达质粒。pCMV5-myc-hDaxx aa 1-197 和 aa 198-740 是通过聚合酶链式反应 (PCR) 构建的。pCMV10-Pin1、pET42-Pin1、pET42-Pin1 WW domain 及 pET42-Pin1 PPIase domain 质粒是由新加坡国立大学的刘益成教授惠赠。

本文所采用的 PCR 引物见表 1。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及反转录聚合酶链式反应 利用 Trizol 法提取 RNA, 将细胞铺到 60 mm 培养皿中至大约 90% 的密度, 吸去培养基, 用 PBS 清洗一遍, 加入 1 ml Trizol LS 试剂并混匀, 样品在室温放置 5 min 后加入 270 μ l 氯仿摇匀后室温放置 15 min。然

收稿日期: 2007-02-13 接受日期: 2007-05-14

国家自然科学基金 (No. 30500273) 及厦门市科技计划项目 (No. 3502Z20055004) 资助

* 通讯作者: Tel: 0592-2187986, Fax: 0592-2184687, E-mail: yzy1893@xmu.edu.cn

表1 PCR 引物

引物名称	引物序列(5'-3')
hDaxxF1	GCCATATGGCCACCGCTAACAGC
hDaxxR740	GCGGATCCCTAATCAGAGTCTGAGAG
hDaxxF1	GCCATATGGCCACCGCTAACAGC
hDaxxR197	GCGGATCCGAGCGCCAGCAGCTGCTC
hDaxxF198	GCCATATGTATGTGGCAGAGATCCGG
hDaxxR740	GCGGATCCCTAATCAGAGTCTGAGAG

菌株: 大肠杆菌菌株 DH5 α 、BL21。细胞: 人胚胎肾细胞 (HEK) 293T、293 和 HeLa 细胞。

后将样品 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 g 离心 15 min。将水相转移到新管并加入 670 μl 异丙醇, 室温放置 20 min, 然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 g 离心 10 min 并去掉上清液。用 75% 乙醇洗 RNA 沉淀一次, 4 $^{\circ}\text{C}$ 7 500 g 离心 5 min 后控干沉淀, 最后用 50 μl 无 RNase 的水溶解并电泳检测, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 细胞培养 人胚胎肾细胞(HEK) 293T细胞、293 细胞和 HeLa 细胞用含有 10% 小牛血清、100 IU 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的 DMEM 培养液培养, 培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 。

1.2.3 细胞瞬时转染 瞬时转染在 60 mm 培养皿中进行。293T 细胞、293 细胞和 HeLa 细胞使用 Lipofectamine 2000 转染试剂。转染步骤按说明书进行。为使每盘细胞所转染的 DNA 量相同, 在必要的时候加入 pCMV5 空载体进行调整。

1.2.4 免疫共沉淀 免疫共沉淀实验参照参考文献^[8]。转染后 36~40 h 收获细胞。吸去培养液并加入 500 μl 裂解缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1% Triton X-100, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 1 mmol/L β -磷酸甘油, 2.5 mmol/L 焦磷酸钠, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 亮抑酶肽, 1 mmol/L PMSF), 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 10 min 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 13 200 r/min 离心 30 min。加入相应的抗体和琼脂糖珠子置于混匀器 4 $^{\circ}\text{C}$ 混匀 3 h。琼脂糖珠用裂解缓冲液洗 3 次, 最后用 30 μl 裂解缓冲液重悬, 再加入等量的 2 $\times$ SDS 样品缓冲液, 沸水煮 10 min, 存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.5 GST-pull down 实验 分别用 pGEX 4T-1 空载体, pET42-Pin1, pET42-Pin1 WW domain, 和 pET42-Pin1 PPIase domain 质粒转化大肠杆菌菌株 BL21, 用 1 mmol/L IPTG 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导蛋白质表达, 再用谷胱甘肽琼脂糖珠子纯化相应的 GST 融合蛋白。同时, 将 293T 细胞接种到 60 mm 的细胞培养板, 待细胞密度达到 90% 时用 Lipofectamine 2000 将 2 μg pCMV5-myc hDaxx 转入细胞中, 30 h 后用细胞裂解液裂解,

加入相应的 GST 融合蛋白琼脂糖珠子并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢旋转 3 h。琼脂糖珠用裂解缓冲液洗 3 次, 最后用 50 μl 裂解缓冲液重悬琼脂糖珠子, 再加入等量的 2 $\times$ SDS 样品缓冲液, 沸水煮 10 min, 存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.6 细胞免疫荧光染色 将目的基因转染到 HeLa 细胞中, 24 h 后吸去培养液并用 PBS 洗涤一次, 4% 甲醛固定 20 min 后 0.2% Triton X-100 透膜 10 min, 再加入 5% BSA 封闭 1 h。封闭后的细胞先后加入相对应的一抗和二抗放置 1 h 后用 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33258 染核 10 min, 最后 90% 甘油封片并在显微镜下观察蛋白质定位情况, 具体实验步骤可参考文献^[8]。

1.2.7 荧光素酶报告基因检测实验 将目的表达载体转染到 293 细胞中, 30 h 后吸去培养基并用 PBS 洗涤 3 次后加入 350 μl Triton/ 甘氨酸甘氨酸裂解液裂解 10 min 后取 100 μl 置于发光计的比色杯中, 并加入 360 μl 荧光素酶分析缓冲液后读数, LacZ 的表达量作为内参^[9]。取 5 次实验结果求平均值。

2 结果

2.1 hDaxx 基因的克隆

为得到带有 hDaxx 全长基因的真核表达质粒, 以宫颈癌 HeLa 细胞总 RNA 为模板, 经过逆转录 PCR 扩增出全长的 hDaxx, 然后进行 PCR 克隆, 通过引入的 *Nde*I 和 *Bam*HI 酶切位点将其连接到 pCMV5-myc 真核表达载体, DNA 测序结果经过 NCBI 的 BLAST 确定为 hDaxx(NM_001350)。RNA 提取和 hDaxx 酶切鉴定的结果如图 1a 和图 1b 所示。

2.2 hDaxx 与 Pin1 之间的相互作用

为了验证 hDaxx 与 Pin1 之间是否存在相互作用, 将 myc-hDaxx 和 flag-Pin1 质粒共转染到 293T 细胞中, 并通过免疫共沉淀实验验证二者之间的结合。通过图 2a 可以看到, 在用抗 flag 抗体 M2 共沉淀下来的产物中可以检测到 myc-hDaxx。接着我们进行 GST-pull down 实验, 如图 2b 所示, 在 GST-Pin1 的沉淀产物中能够检测到 myc-hDaxx, 而在单独的 GST 的沉淀产物中则检测不到 myc-hDaxx, 说明 Pin1 和 hDaxx 在体外也可以相互作用。体内和体外实验都充分证实了 hDaxx 和 Pin1 之间存在着相互作用。

2.3 Pin1 在 hDaxx 上结合位点的确定

为了精确定位 Pin1 在 hDaxx 分子上的结合位点, 利用 PCR 在 pCMV5-myc 载体上构建了 hDaxx 的两个缺失突变体, 即 aa 1-197 和 aa 198-740, 两个突变体均经通过 *Nde*I 和 *Bam*HI 酶切位点克隆到 pCMV5-myc

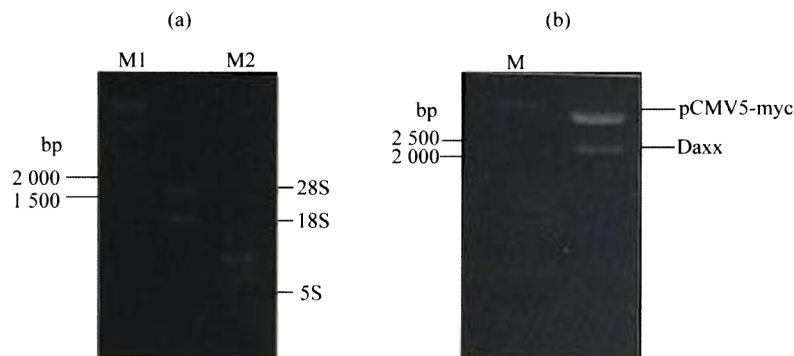


图1 hDaxx 真核表达质粒的构建

(a) HeLa 细胞总 RNA 提取效果的鉴定。M1、M2 分别为 1 kb 和 100 bp marker。(b)pCMV5-myc hDaxx 质粒酶切检测图。hDaxx 的 cDNA 全长为 2 223 bp。M 为混合 Mix Marker。

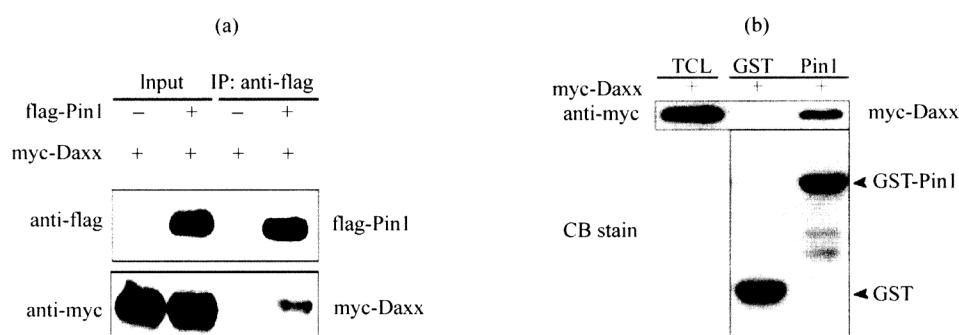


图2 hDaxx 和 Pin1 之间的相互作用

(a)将 flag-Pin1 和 myc-hDaxx 的质粒共转染到 293T 细胞中,并用免疫共沉淀检测 hDaxx 和 Pin1 之间相互作用;(b)利用 GST-pull down 实验检测 hDaxx 与 Pin1 之间的相互作用。myc-hDaxx 用 anti-myc 的抗体检测, GST 融合蛋白则用考马斯亮蓝染色检测。

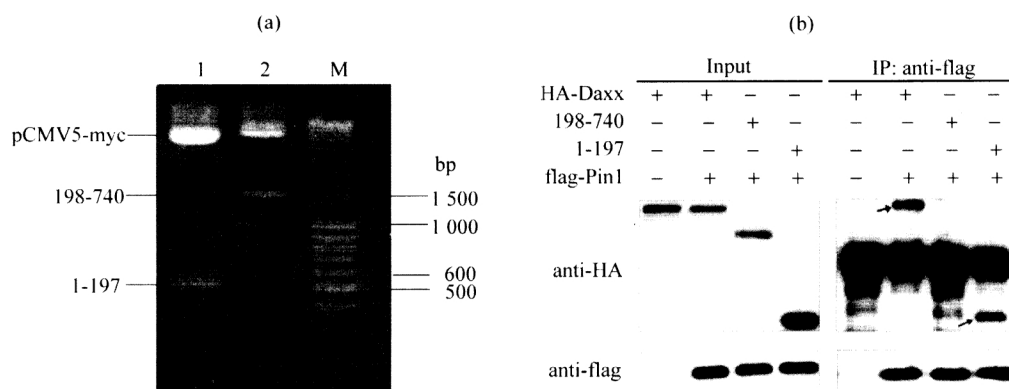


图3 Pin1 在 hDaxx 上结合位点的确定

(a)hDaxx 的两个片段的酶切检测。1、2 和 M 分别是 pCMV5-myc hDaxx aa 1-197、pCMV5-myc hDaxx aa 198-740 和 Mix DNA marker。(b)利用免疫共沉淀确定 Pin1 在 hDaxx 上面的结合位点。箭头表示被 Pin1 免疫共沉淀下来的 hDaxx 及其片段, aa 1-197 是 hDaxx 与 Pin1 作用的结合位点。

载体上,并用这两种酶酶切检测及 DNA 测序鉴定,酶切鉴定结果如图 3a 所示。然后我们把全长 hDaxx 和这两个片段分别与 Pin1 共转染到 293T 细胞中,然后经过免疫共沉淀和 Western 免疫印迹检测。如图 3b 所示,发现 Pin1 在 hDaxx 上的结合位点位于氨基端的

aa 1-197。

2.4 hDaxx 在 Pin1 上结合位点的确定

为了确定 hDaxx 在 Pin1 分子上的结合位点,进行了 GST-Pull down 实验。通过原核表达系统,分别提纯了偶联在谷胱甘肽琼脂糖珠子上的 GST、

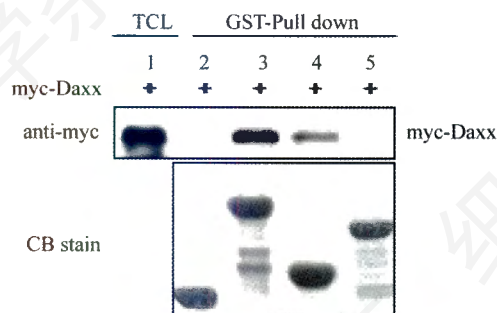


图4 hDaxx 在 Pin1 上结合位点的确定

通过 GST-Pull down 实验证实了 hDaxx 在 Pin1 的结合位点为 WW 区域。图中 1 道为总的细胞裂解液中的 myc-hDaxx 的表达量, 2、3、4 和 5 道分别表示用结合 GST、GST-Pin1、GST-WW 结构域和 GST-PPIase 结构域的琼脂糖珠子进行 GST-Pull down 后的产物, myc-hDaxx 用抗 myc 的抗体检测, 各种 GST 融合蛋白用考马斯亮蓝染色检测。

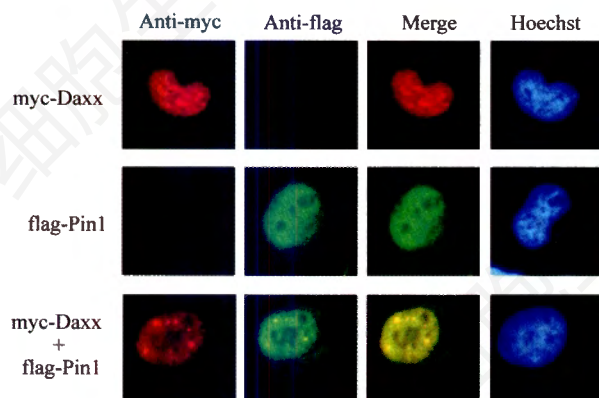


图5 hDaxx 在 Pin1 在细胞内的共定位

将 Myc-hDaxx 和 flag-Pin1 分别或共转染到 HeLa 细胞中, 30 h 后固定并进行免疫荧光染色。Myc-hDaxx 使用兔抗 Myc 一抗和罗丹明偶联的羊抗兔二抗染色(红色), flag-Pin1 使用小鼠抗 flag 一抗和 FITC 偶联的羊抗小鼠二抗染色(绿色); 细胞核用 Hoechst 33258 染色(蓝色); 共定位情况则通过图片重叠(Merge)来判断, 若 Merge 显示为黄色表示两种分子有共定位。

GST-Pin1、GST-WW 结构域和 GST-PPIase 结构域蛋白, 并将它们加到过量表达 myc-hDaxx 的 293T 细胞裂解液中于 4 °C 轻轻混合 3 h 后用细胞裂解液洗涤并通过 Western 印迹检测产物(图 4)。从图中我们看到 hDaxx 在 Pin1 上的结合位点为 WW 结构域。这个结果也再一次证实了 WW 结构域是 Pin1 与其底物特异性结合的位点。

2.5 hDaxx 与 Pin1 在细胞内的共定位

为了进一步观察 hDaxx 和 Pin1 在细胞内的共定位情况, 将 hDaxx 和 Pin1 分别或者共转染到 HeLa 细胞中并进行免疫荧光染色。如图 5 所示, hDaxx 全部分布在细胞核中, 而 Pin1 则有少量分布在细胞质中。

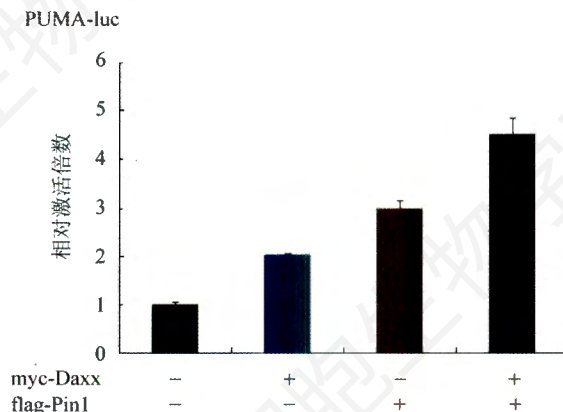


图6 hDaxx 和 Pin1 协同激活 p53 的转录活性

将 myc-hDaxx 和 flag-Pin1 分别或共转染到 293 细胞中, 同时转染等量的 PUMA-Luc 和 LacZ 质粒。转染后 30 h 进行荧光素酶活性检测, LacZ 作为内参。实验结果表示为 5 次实验的平均值, 误差线代表标准差。

当 hDaxx 和 Pin1 共转染的时候, 我们可以清楚地看到两者共定位于细胞核中, 这个结果进一步表明了细胞内 hDaxx 和 Pin1 之间的相互作用。

2.6 hDaxx 和 Pin1 协同激活 p53 转录活性

最近研究表明 hDaxx 能够与 Axin 和 p53 结合形成三聚体, 这个三聚体的形成能够促进 p53 Ser46 的磷酸化而引起其下游促凋亡因子 PUMA 的表达^[9]。为了研究 Pin1 与 hDaxx 结合后是否影响 hDaxx 对 p53 的转录活性, 利用 PUMA 作为报告基因进行荧光素酶报告基因检测实验。如图 6 所示, hDaxx 和 Pin1 单独转染都可以激活 PUMA-Luc, 而两者共转染可以最大强度地激活 PUMA-Luc, 说明 hDaxx 和 Pin1 能够协同激活 p53 的转录活性。

3 讨论

Ser/Thr-Pro 结构域中的丝氨酸或苏氨酸的磷酸化在多种细胞过程中起着重要的作用, 比如细胞周期调控、基因转录、细胞分化和细胞增殖等。这个细胞调控机制的失调会导致肿瘤的发生。Pin1 是目前磷酸化后调节机制研究的一个热门蛋白质。它能够特异性地结合磷酸化的 Ser/Thr-Pro 结构域并异构化其底物蛋白, 这种构象的变化对底物蛋白的活性、稳定性及与其他蛋白质的相互作用有着重要的作用。hDaxx 是一个高度磷酸化的, 多功能蛋白质。hDaxx 的磷酸化对其生理学功能有着深刻的影响, 比如糖饥饿的情况下, hDaxx 可以从细胞核转移到细胞浆中。这个过程的关键步骤是 Ser667 位点的磷酸化^[10], 可见磷酸化的状态对 hDaxx 功能有很大的影

响,然而目前 hDaxx 磷酸化后的调节机制还不清楚。我们通过 hDaxx 的序列分析发现 hDaxx 中含有 13 个潜在的 Pin1 结合位点(即 Ser/Thr-Pro 结构域),因此我们猜测 hDaxx 和 Pin1 之间可能存在相互作用。通过 GST-Pull down 实验和免疫共沉淀实验我们证实了 hDaxx 和 Pin1 确实能够相互结合(图 2)。同时我们通过免疫荧光染色确定了 Pin1 与 hDaxx 共定位于细胞核内(图 5),从而进一步表明了 hDaxx 和 Pin1 之间确实存在着相互作用。因为 Pin1 是一个重要的磷酸化后修饰酶,所以我们推测它对 hDaxx 这个高度磷酸化的蛋白质功能有着重要的影响。最近研究显示 hDaxx 能够通过 Axin 与 p53 形成三聚复合体并增强 p53 Ser46 的磷酸化从而促进 p53 下游促凋亡基因如 PUMA 的表达。我们发现 Pin1 与 hDaxx 的共转染能最大强度地激活 PUMA 报告基因的表达(图 6),表明 Pin1 能够和 hDaxx 协同激活 p53 的转录活性。这个结果预示了 Pin1 与 hDaxx 的结合可能增强 p53 诱导的细胞凋亡,而且这种凋亡可能依赖于 p53 转录活性的增加,如增强促凋亡基因 PUMA 的表达,从而引起细胞色素 c 的释放及随后的凋亡事件如 Apaf-1 的激活等^[11]。我们将通过以下方面进一步研究 Pin1 对 hDaxx 通过 hDaxx/Axin/p53 复合体诱导细胞凋亡的调节机制: (1) 检测 Pin1 的过量表达是否会增强 hDaxx 诱导的 p53 Ser46 的磷酸化; (2) 通过流式细胞技术检测过量表达的 Pin1 是否会增加 hDaxx 诱导的细胞

凋亡; (3) 通过 RNAi 降低内源 Pin1 的表达来进一步检测 Pin1 对 hDaxx 激活 p53 转录活性的影响。

另外,目前研究表明 hDaxx 参与了细胞有丝分裂过程。在细胞分裂期 S 期 hDaxx 与 α -地中海贫血智力低下综合征致病因子 ATRX 结合并共定位于异染色质上。hDaxx 是染色质重塑复合体的组成成分,并调控着细胞分裂期 S 期的染色体变化,但是到目前为止具体的调控机制还不清楚^[12]。由于 Pin1 能够结合多种与有丝分裂有关的磷酸化的蛋白质(如 Cdc25、Cdc27 和 NIMA 等)并调节这些蛋白质的活性,从而参与有丝分裂的调控^[5],这预示 Pin1 有可能也参与了 hDaxx 对细胞有丝分裂的调控,因此我们还将进一步研究 Pin1 在 hDaxx 对细胞有丝分裂调控中的作用。

参考文献(References)

- [1] Yang X *et al.* *Cell*, 1997, **89**: 1067
- [2] Perlman R *et al.* *Nat Cell Biol*, 2001, **3**: 708
- [3] Tang J *et al.* *Nat Cell Biol*, 2006, **8**: 855
- [4] Zhao LY *et al.* *J Virol*, 2003, **77**: 11809
- [5] Lu KP *et al.* *Trends Cell Biol*, 2002, **12**: 164
- [6] Pastorino L *et al.* *Nature*, 2006, **440**: 528
- [7] Ryo A *et al.* *J Cell Sci*, 2003, **116**: 773
- [8] Rui Y *et al.* *EMBO J*, 2004, **23**: 4583
- [9] Li Q *et al.* *Cancer Res*, 2007, **67**: 66
- [10] Song JJ *et al.* *J Biol Chem*, 2004, **279**: 30573
- [11] Gostissa M *et al.* *J Biol Chem*, 2004, **279**: 48013
- [12] Ishov AM *et al.* *J Cell Sci*, 2004, **117**: 3807

The Cloning of hDaxx and the Interaction between hDaxx and Pin1

Ming-Liang Chen, Ji-Feng Wang, Ying He, Qin-Xi Li, Zhi-Yun Ye*

(Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract In this paper we cloned hDaxx gene and showed the evidence that hDaxx interacted and co-localized with the peptidyl-prolyl isomerase Pin1. By using luciferase reporter assay, we found that hDaxx and Pin1 synergically stimulated the transcriptional activity of p53. This founding implicated the Pin1's role in the regulation of hDaxx-modulated cell death and provided a potential approach to the understanding of the function of hDaxx.

Key words hDaxx; Pin1; interaction

Received: February 13, 2007 Accepted: May 14, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30500273) and the Science and Technology Project of Xiamen (No.3502Z20055004)

*Corresponding author. Tel: 86-592-2187986, Fax: 86-592-2184687, E-mail: yzy1893@xmu.edu.cn