

裂殖酵母TSC1和TSC2蛋白的昆虫细胞表达、 纯化和蛋白性质探讨

何爱梁 吴 更*

(上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

摘要 结节性硬化症是一种在多器官发生良性肿瘤而表现出不同临床病症的常染色体显性疾病, 由肿瘤抑制基因 *TSC1* (tuberous sclerosis 1) 和 *TSC2* 发生突变所致。这两个基因编码的蛋白形成 TSC1/2 复合物, 在 mTOR 信号通路中整合上游生长信号, 负调控细胞的合成代谢。该复合物的结构学研究有助于揭示其调控机理。利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统在昆虫细胞中表达来自裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) 与人同源的 TSC1 和 TSC2 及其截短和突变蛋白。纯化结果表明, 裂殖酵母 TSC1 以二聚体的形式存在; TSC1 结合 TSC2, TSC1/2 复合物会聚合成分子量大于 1 000 kDa 的多聚体; 亲和纯化带 Flag 标签的 TSC2, 同时 TSC2 结合 TSC1, 可得到纯度高的 TSC1/2 复合物; TSC1 需要其卷曲螺旋 (coiled-coil) 来稳定 TSC2; TSC1 1-718 aa 或 1-799 aa 和 TSC2 全长共表达有利于提高 TSC2 的表达量; TSC2 的 N-端和 GAP 结构域可以分开, TSC1 和 TSC2 的 N-端结合。总之, 该研究阐释了裂殖酵母 TSC1 和 TSC2 的一些结构性质, 提出的 TSC1 和 TSC2 表达纯化方法为其结晶研究奠定了重要基础。

关键词 结节性硬化症; 裂殖酵母 TSC1/2; 杆状病毒表达系统; 纯化

Research on Expression, Purification and Protein Feature of *Schizosaccharomyces pombe* TSC1 and TSC2

He Ailiang, Wu Geng*

(School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract Tuberous sclerosis complex (TSC) is an autosomal dominated disease characterized with benign tumors developed in multiple organs so that it has various clinical manifestations. Scientists have identified two tumor suppressor genes, *TSC1* and *TSC2*, whose mutations are responsible for TSC. These two genes respectively encode two proteins forming TSC1/2 complex. This complex can integrate a variety of growth related signals upstream mTOR pathway and then negatively regulate the anabolism of cells. The 3D structure of TSC1/2 complex will contribute to revealing its regulation mechanism. We expressed TSC1 and TSC2 proteins from *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) as well as their truncations and mutations by employing Bac-to-Bac baculovirus expression system. The purification results indicate that *S. pombe* TSC1 exists in the form of dimer; TSC1 binds to TSC2 and the TSC1/2 complex aggregates into a multimer whose molecular weight is over 1 000 kDa; affinity purification of Flag-fused TSC2 binding to TSC1 yields considerably pure TSC1/2 complex; TSC1 can stabilize TSC2 with the

收稿日期: 2015-03-20 接受日期: 2015-05-04

国家自然科学基金(批准号: 31470223、31230002)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-34205914, E-mail: geng.wu@sjtu.edu.cn

Received: March 20, 2015 Accepted: May 4, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant. No.31470223, 31230002)

*Corresponding author. Tel: +86- 21-34205914, E-mail: geng.wu@sjtu.edu.cn

网络出版时间: 2015-07-03 15:54

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150703.1554.002.html>

help of its coiled coil region; the co-expression of TSC1 1-718 aa or 1-799 aa with the full-length TSC2 benefits the expression of TSC2; the N-terminal and GAP domain of TSC2 can be divided, and TSC1 binds to the N-terminal of TSC2. In conclusion, our research has elucidated some structural features of *S. pombe* TSC1 and TSC2. Moreover, the expression and purification methods of TSC1 and TSC2 lay a solid foundation for their crystallization.

Keywords TSC; *Schizosaccharomyces pombe* TSC1/2; baculovirus expression system; purification

结节性硬化症(tuberous sclerosis complex, TSC)是一种常染色体显性的多系统疾病,通常在皮肤、大脑、心脏、肺和肾有良性肿瘤发生。该综合征表现出多种临床特征,如面部血管纤维瘤、神经疾病(癫痫、自闭症和智力低下等)、心脏横纹肌瘤、肺淋巴性肌瘤病和肾血管平滑肌脂肪瘤等^[1]。遗传学研究发现, TSC决定基因座(TSC-determining loci)位于染色体9q34和16p13^[2],相应的TSC1和TSC2基因是肿瘤抑制基因,结节性硬化症与这两个基因突变导致蛋白功能丧失密切相关^[3-4]。TSC1和TSC2基因分别编码TSC1蛋白和TSC2蛋白,二者形成的TSC1/2复合物在mTOR信号通路中发挥负调控作用。mTOR信号通路应答环境中生长相关的信号,调控细胞的生长和合成代谢。TSC1/2复合物是该通路中的一个关键整合子(integrator),整合上游的生长因子、细胞因子、氨基酸、能量和低氧等信号^[5-6]。生长因子通过PI3K-Akt和ERK-RSK信号通路磷酸化TSC2的Ser⁹³⁹/Thr¹⁴⁶²、Ser⁵⁴⁰、Ser⁶⁶⁴和Ser¹⁷⁹⁸等位点^[7-8];细胞因子经IKK β 介导TSC1的Ser⁵¹¹的磷酸化,抑制TSC1^[9];能量水平的降低激活AMPK,直接磷酸化TSC2,提高其活性^[10];对于氨基酸水平, TSC1/2复合物拮抗mTOR介导的应答^[11];低氧除影响AMP水平经AMPK激活TSC复合物外,还通过诱导REDD1的表达来反转Akt介导的对TSC1/2复合物的抑制作用^[12]。TSC1/2复合物是上游信号通路的交汇口,整合信号为不同的磷酸化状态,影响下游信号通路的状态。Rheb是TSC1/2复合物的下游靶蛋白, TSC2的GAP结构域激活Rheb的GTPase活性,促使Rheb-GTP转变为Rheb-GDP^[13]。TSC1/2复合物的磷酸化状态决定了TSC2的GAP结构域能否活化Rheb。如果TSC1/2复合物被抑制,则Rheb-GTP结合并活化mTOR的激酶结构域^[14],同时,解除mTORC1的抑制蛋白PRAS40^[15]。活化的mTORC1磷酸化其底物S6K和4E-BP1,促进蛋白翻译的起始和延伸。另外, mTORC1还能促进转录和核糖体合成,抑制自噬。因此, TSC1/2复合物通过mTOR信号通路抑制细胞

的生长和合成代谢。

然而,对于TSC1/2复合物不同位点的磷酸化是如何发挥调控作用的,存在不同的解释机理,包括磷酸化使TSC1和TSC2分开、TSC2的亚细胞定位的变化(从细胞内膜释放到胞质中)^[16-17]、TSC1和TSC2的降解^[18]以及14-3-3蛋白结合磷酸化的TSC2阻碍其GAP结构域对Rheb的活性激活^[19]等。解析TSC1/2复合物的三维结构为解释其磷酸化与功能间的关系提供重要的依据。目前关于TSC1和TSC2蛋白结构方面的研究成果非常有限,只解析了裂殖酵母TSC1 1-431 aa(yTSC1-CD)的结构,能挖掘的功能信息很少。因此,对TSC1/2复合物结构的认知还有待突破性的研究成果。

TSC1和TSC2蛋白的分子量都比较大,人源的TSC1有130 kDa, TSC2为200 kDa。真核生物中普遍存在TSC1/2直系同源的蛋白,在裂殖酵母中发现的TSC1/2复合物和人源的功能相似^[20]。我们利用Bac-to-Bac杆状病毒表达系统在昆虫细胞中表达裂殖酵母*Schizosaccharomyces pombe*(*S. pombe*)的TSC1和TSC2蛋白,该表达系统可以快速高效地制备重组杆状病毒,用昆虫细胞易于表达大分子量的真核蛋白且更接近天然结构。裂殖酵母TSC1和TSC2分子量分别为100 kDa和150 kDa,除了分子量小的优势之外,二级结构预测显示其蛋白序列中二级结构比较紧凑,预测为卷曲(coil)的区段比人源的短。可见酵母作为低等真核生物,其TSC蛋白结构相对简单。本研究基于蛋白序列分析设计不同截短和突变的重组蛋白,利用重组杆状病毒共感染昆虫细胞来共表达裂殖酵母TSC1和TSC2蛋白,亲和纯化和分子筛结果表明了TSC1和TSC2的一些结构性质,并为表达纯化得到适用于结晶的蛋白提供了思路和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)TSC1和

TSC2的编码DNA序列(密码子已优化, 适用于昆虫细胞表达)由上海生工工程技术有限公司合成; pFastBacHTb质粒; *E. coli* DH5 α 、DH10Bac感受态细胞由本实验室制备; Sf9昆虫细胞、Grace's Insect Cell Culture Medium、Unsupplemented和Cellfectin II转染试剂购自Life Technologies公司; SFX培养基购自HyClone公司; KOD和Taq DNA聚合酶分别购自TOYOBO和北京康为生物技术有限公司; 限制性内切酶购自NEB公司; 质粒小量制备试剂盒和回收试剂盒购自上海捷瑞生物技术公司; Ni-NTA Agarose购自Qiagen公司; Anti-Flag M2亲和树脂购自Sigma公司; Flag多肽购自北京中科亚光生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 蛋白序列的生物信息学分析 从NCBI网站获取裂殖酵母TSC1和TSC2的蛋白序列, 利用FoldIndex(<http://bip.weizmann.ac.il/fldbin/findex/>)进行折叠性预测; 运用COILS(http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)预测TSC1序列中的卷曲螺旋(coiled-coil); 使用PSIPRED(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)分析蛋白的二级结构; 采用DNAStar的序列比对软件Megalyn分析人、果蝇和酵母蛋白序列的保守性。根据序列分析结果, 设计不同截短和突变的重组蛋白。

1.2.2 基因克隆和重组质粒的构建 根据所合成的DNA序列, 设计不同克隆的引物。用KOD DNA聚合酶PCR扩增目的片段, 切胶回收。双酶切目的片段和载体质粒pFastBacHTb形成黏性末端, 再用T4连接酶连接。连接产物转化*E. coli* DH5 α 感受态细胞, 挑单菌落进行PCR鉴定, 对阳性克隆抽提质粒并测序验证。本研究还利用Dpn I消化法做基因突变, 在特定位点加入TEV酶切位点。设计的引物除了与模板配对的碱基, 突变位置碱基也互补配对。PCR扩增全质粒, Dpn I消化含有甲基化位点的模板, 再转化DH5 α , 最终测序验证重组质粒。

1.2.3 重组Bacmid和杆状病毒的制备 构建成功的pFastBacHTb重组质粒转化DH10Bac *E. coli*感受态细胞, 在37 °C、225 r/min摇菌4 h后, 取适量培养液涂布于含有Kana、Gen、Tet、X-gal和IPTG的固体培养基上。避光培养48 h后, 挑白色单菌落, 以目的基因上游引物和M13反向引物做PCR鉴定。鉴定结果正确的菌落于含Kana、Gen和Tet抗生素的液体

培养基培养过夜, 用异丙醇沉淀法抽提重组Bacmid质粒, 加无菌ddH₂O溶解DNA沉淀。取对数生长期、活率大于95%的Sf9细胞铺到6 cm细胞培养平板上, 汇合度为70%~80%。重组的Bacmid质粒用Cellfectin II试剂转染Sf9。4 d后, 吸取含有病毒的培养液并离心取上清, 即得到P1病毒。取200 μ L P1病毒加到铺好Sf9细胞的10 cm平板上, 3~4 d后收集P2病毒, P2病毒即可用于染毒进行表达测试, 或继续放大到P3用于表达。

1.2.4 昆虫细胞表达目的蛋白和亲和纯化 培养昆虫细胞Sf9用于蛋白表达, 对数期细胞数量达到 2.5×10^6 时, 按1:30比例加入重组杆状病毒P2或P3。染毒48~60 h后, 2 000 r/min离心15 min后收集细胞。按1:5的比例加细胞裂解缓冲液重悬[Ni柱纯化用的缓冲液为25 mmol/L Tris (pH8.0)、300 mmol/L NaCl、20 mmol/L咪唑; Anti-Flag柱纯化用的缓冲液为50 mmol/L Tris (pH7.4)、300 mmol/L NaCl、10%甘油], 再按1:100的比例加入Roche protein inhibitor cocktail (EDTA-free)。用液氮反复冻融3次以裂解细胞, 4 °C、14 000 r/min离心40 min, 取上清。平衡Ni-NTA或Anti-Flag亲和重力柱, 上清上样, 再用平衡缓冲液洗去结合弱的杂蛋白。Ni柱纯化用3~4倍柱体积的不同浓度咪唑的洗脱液[25 mmol/L Tris (pH8.0); 300 mmol/L NaCl; 40, 80, 110, 200, 300, 500 mmol/L咪唑]洗脱目的蛋白; Anti-Flag柱纯化依次用1倍柱体积的洗脱液[25 mmol/L Tris (pH8.0)、300 mmol/L NaCl、200 μ g/mL Flag肽]洗脱, 共5倍柱体积, 最后SDS-PAGE分析目的蛋白的表达情况和纯度。

1.2.5 凝胶过滤层析纯化和分析 亲和纯化得到的蛋白进一步用凝胶过滤层析(分子筛)纯化, 并初步判断蛋白的均一性和聚合状态。主要使用Superdex 200 10/300 GL和Superose 6 10/300 GL两种不同孔径的凝胶过滤柱。用缓冲液[20 mmol/L Tris (pH8.0), 250 mmol/L NaCl, 2 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA]平衡柱子至UV和电导曲线稳定, 再将浓缩至2 mL的蛋白样品上样, 流速为0.4 mL/min, 每管收集0.5 mL。根据UV吸收图谱, 对特定收集管的蛋白样品进行SDS-PAGE检测。

2 结果

2.1 蛋白序列分析

裂殖酵母TSC1的FoldIndex^[21]预测结果显示,

TSC1 N-端1-450 aa可折叠, 已解析的TSC1 1-431 aa证实了该预测结果; C-端不可折叠, COILS预测存在大段的卷曲螺旋(coiled-coil)。C-端可能形成卷曲螺旋并以展开的非折叠形式存在。裂殖酵母TSC2预测可以形成折叠良好的三维结构。TSC1的COILS(window width 28)^[22]的预测结果显示, 卷曲螺旋大约为530-850 aa, 该区域580、720和800氨基酸残基附近有较短的非卷曲螺旋间隔, 可设计不同的C-端截短。

TSC2的PSIPRED二级结构预测发现, α 螺旋和 β 折叠整体上分布比较紧凑均一, 不存在较大区域的卷曲。Megalign序列比对显示, TSC2 C-端GAP结构域为1 070-1 339 aa, 连接TSC2 N-端和GAP结构域的1 020-1 060 aa的序列保守性较低。

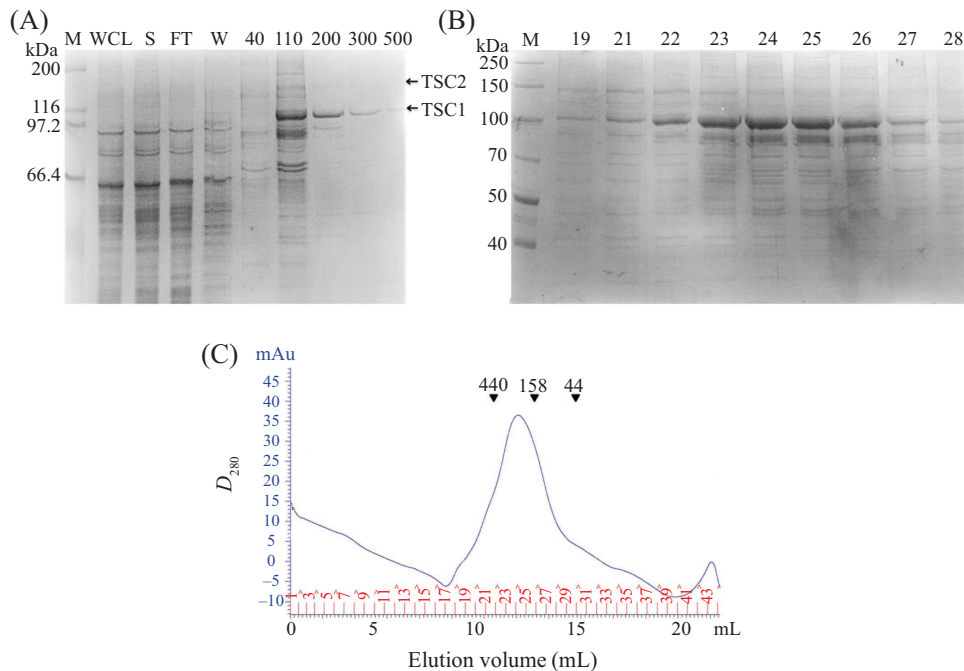
2.2 裂殖酵母全长TSC1和TSC2共表达

裂殖酵母全长TSC1和TSC2的重组杆状病毒共感染Sf9细胞表达48 h, Ni柱纯化(图1A)。SDS-PAGE结果显示, 昆虫细胞成功表达了TSC1(100 kDa marker位置)和TSC2(150 kDa marker位置)。TSC1表

达较好, 但TSC2蛋白表达量低。进一步过分子筛(Superdex 200)纯化, UV曲线(图1C)显示, 洗脱体积9.2 mL(第19管)处有一凸起, 主峰位于12.1 mL(第24管)处。分子筛SDS-PAGE结果(图1B)表明, 在19管TSC1和TSC2的蛋白量比例约为1:1; 在24管两侧, TSC1蛋白量远大于TSC2, TSC2逐渐减少, 右侧基本都是TSC1。这说明19管处为TSC1/2复合物的蛋白峰, 24管处是TSC1的蛋白峰。根据标定的蛋白标准曲线(19管处分子量约850 kDa, 24管处分子量约230 kDa), 可以判断TSC1/2复合物聚合形成异源寡聚体; 而TSC1最多形成二聚体。胶图显示Ni柱纯化的全长TSC1和TSC2蛋白纯度低, 杂蛋白比较多。

2.3 裂殖酵母TSC1 C-端截短和TSC2共表达

根据COILS和PSIPRED的预测结构, 设计TSC1 1-716 aa和1-795 aa两个C-端截短的克隆。TSC1 1-716 aa和1-795 aa的重组杆状病毒分别与TSC2共感染Sf9细胞, 48 h后收细胞, Ni柱纯化后过分子筛(Superdex 200)。SDS-PAGE结果(图2)可以看出, TSC1截短的蛋白表达量明显高于TSC1全长, 纯度提

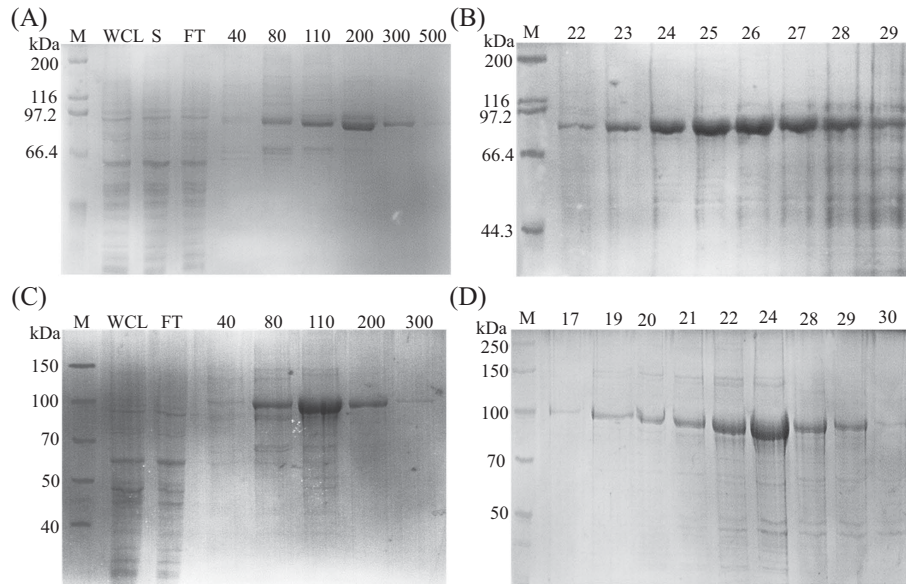


A: 全长裂殖酵母TSC1和TSC2 Ni柱纯化结果。M: marker; WCL: 全细胞裂解液; S: 上清; FT: 流出液; W: 漂洗; 数字代表洗脱液对应的咪唑浓度(mmol/L); B: 蛋白分子筛(Superdex 200 10/300 GL)纯化的SDS-PAGE检测。泳道上方数字代表收集管的编号; C: 分子筛UV吸收曲线图。▼标出了标准分子量蛋白所在位置, ▼上方数字代表分子量大小(kDa)。横坐标上方数字代表收集管编号。

A: the Ni-NTA affinity purification result of full-length *S. pombe* TSC1 and TSC2. M: marker; WCL: whole cell lysis; S: supernatant; FT: flow through; W: wash. The numbers are the concentration of imidazole (mmol/L); B: TSC1 and TSC2 loaded to Superdex 200 10/300GL column, the fractions of SEC are detected by SDS-PAGE. The numbers above lanes are collection tubes' number; C: the UV curve of SEC. "▼" show the positions of standard molecular weight markers and the numbers above ▼ are corresponding molecular weight. The figures above the X-axis indicate the serial number of collection tubes.

图1 裂殖酵母TSC1和TSC2全长共表达Ni柱纯化和分子筛结果

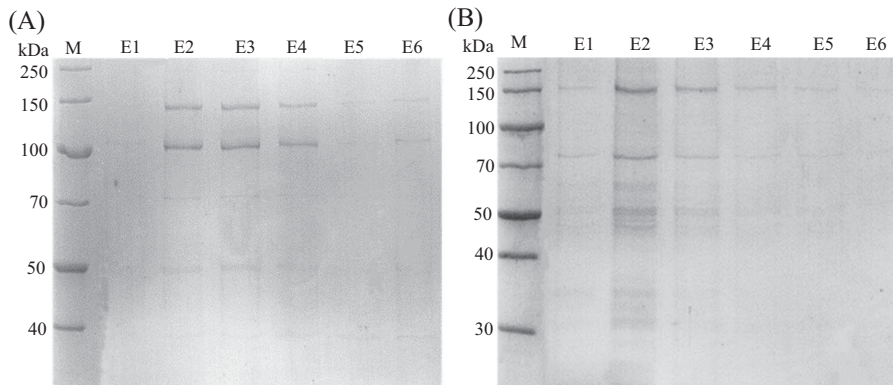
Fig.1 The Ni-NTA affinity purification and SEC results of co-expressed full-length *S. pombe* TSC1 and TSC2



A、C: 分别是裂殖酵母TSC1 1-716 aa和1-795 aa与TSC2共表达的Ni柱纯化结果, A、C泳道上方数字代表洗脱液的咪唑浓度; B、D: 分别是TSC1 1-716 aa/TSC2和TSC1 1-795 aa/TSC2过分子筛(Superdex 200 10/300 GL)的SDS-PAGE结果, B、D泳道上方数字代表收集管编号。
A,C: the Ni-NTA affinity purification result of *S. pombe* TSC1 1-716 aa and 1-795 aa co-expressed with TSC2, the numbers above A and C' lanes are the concentration of imidazole of eluates; B,D: the SDS-PAGE results of SEC (Superdex 200 10/300 GL) of TSC1 1-716 aa/TSC2 and TSC1 1-795 aa/TSC2, the numbers above B and D' lanes are collection tubes' serial numbers.

图2 裂殖酵母TSC1 1-716 aa和1-795 aa分别与TSC2共表达Ni柱纯化和分子筛结果

Fig.2 The Ni-NTA affinity purification and SEC results of *S. pombe* TSC1 1-716 aa and 1-795 aa co-expressed with TSC2 respectively



A: 裂殖酵母TSC1和Flag-TSC2共表达Anti-Flag亲和纯化结果; B: TSC2单独表达Anti-Flag亲和纯化结果。M: marker; E1到E6是顺序洗出液。

A: the Anti-Flag affinity purification result of *S. pombe* TSC2 co-expressed with TSC1; B: the Anti-Flag affinity purification result of *S. pombe* TSC2 expressed alone. M: marker; E1 to E6 are eluates in turn.

图3 裂殖酵母Flag-TSC2和TSC1共表达与单独表达Anti-Flag亲和纯化结果

Fig.3 The Anti-Flag affinity purification results of *S. pombe* Flag-TSC2 co-expressed with TSC1 or alone

高; TSC1 1-716 aa和TSC2共表达没有明显的TSC2条带(图2B); TSC1 1-795 aa和TSC2共表达纯化得到的TSC2条带较弱(图2D)。TSC1 1-716 aa和1-795 aa的UV曲线峰型对称(图未示), 说明这两个蛋白比较均一, 折叠正常。TSC1 1-716 aa的峰在26管处; TSC1 1-795 aa的峰在24管处。根据分子量判断TSC1这两个C-端截短和全长一样, 可能形成二聚体。

2.4 Anti-Flag亲和纯化共表达的Flag-TSC2和His-TSC1

由上文可知, TSC1的表达量远高于TSC2。我们将TSC2构建到经改造的pFastBacHTb质粒上, 表达N-端融合2×Flag标签的TSC2蛋白。Flag-TSC2和His-TSC1感染Sf9细胞共表达, 用Anti-Flag亲和纯化, 得到了TSC1/2复合物(图3A), TSC1和TSC2的蛋白量

相近,且纯度比Ni柱亲和纯化大大提高。另外,单独表达Flag-TSC2, Anti-Flag亲和纯化(图3B)。比较单独表达TSC2和TSC1/2共表达的纯化结果可以看出,共表达纯化得到的TSC2蛋白量高于单独表达,且杂带明显减少。

2.5 Anti-Flag柱纯化TSC2和不同C-端截短的TSC1

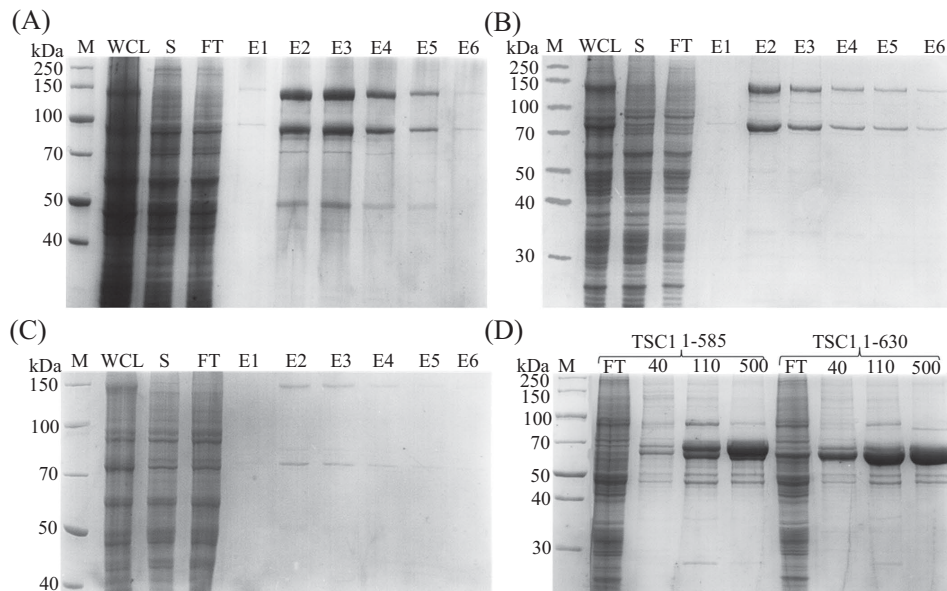
前文实验结果显示,裂殖酵母TSC1 C-端截短的表达量大于全长,且TSC1/2共表达有利于提高TSC2的表达量和纯度。据此,我们探究不同C-端截短的TSC1和TSC2共表达对TSC2表达量的影响。我们构建了带6×His标签的不同C-端截短:TSC1 1-799 aa、1-718 aa、1-675 aa、1-630 aa和1-585 aa与Flag-TSC2共表达,再用Anti-Flag亲和纯化(图4)。结果表明,TSC1 1-799 aa、1-718 aa和1-675 aa与TSC2共表达纯化得到了TSC1 Δ C/TSC2复合物,而TSC1 1-630 aa和1-585 aa与TSC2共表达没有看到明显的TSC1和TSC2的条带(SDS-PAGE结果未示)。而TSC1 1-630 aa和1-585 aa Anti-Flag亲和纯化后的流出液再过Ni柱,得到了TSC1 1-630 aa和1-585 aa(图4D),且表达量较大。其中,TSC1 1-585 aa目的条带位置有两条分子量接近的条带,可能是TSC1 1-585 aa的C-端氨基酸残基发

生降解。TSC1 1-799 aa和1-718 aa分别和TSC2共表达,二者纯化得到的蛋白量比TSC1/2全长共表达大大提高,而TSC1 1-675 aa和TSC2共表达得到的蛋白较少。虽然TSC1截短的蛋白表达量提高,但如果卷曲螺旋太短,可能起不到稳定TSC2的作用,降低了TSC2的表达量。

纯化得到的TSC1 1-799 aa/TSC2和TSC1 1-718 aa/TSC2蛋白浓缩后过分子筛(Superose 6),UV吸收曲线和SDS-PAGE结果见图5。TSC1 1-799 aa/TSC2复合物的峰在洗脱体积12.2 mL处(第26管);TSC1 1-718 aa/TSC2复合物的蛋白峰在13.4 mL处(第27管)。根据标定的标准蛋白曲线估计,裂殖酵母TSC1/2复合物以4~5聚体的形式存在(TSC1 Δ C/TSC2复合物的分子量约230 kDa,峰所在位置的分子量约1 200 kDa),即TSC1和TSC2形成8~10聚的大分子量寡聚体。TSC1 Δ C/TSC2复合物的峰形比较宽,且SDS-PAGE显示16~20管有较弱的目的条带,可见TSC1/2复合物形成的多聚体存在不同的聚合程度,有的多聚体非常大。

2.6 裂殖酵母TSC2的N-端结构域和GAP结构域

根据TSC2的二级结构预测和序列比对结果,TSC2可以分为N-端结构域和C-端GAP结构域两部

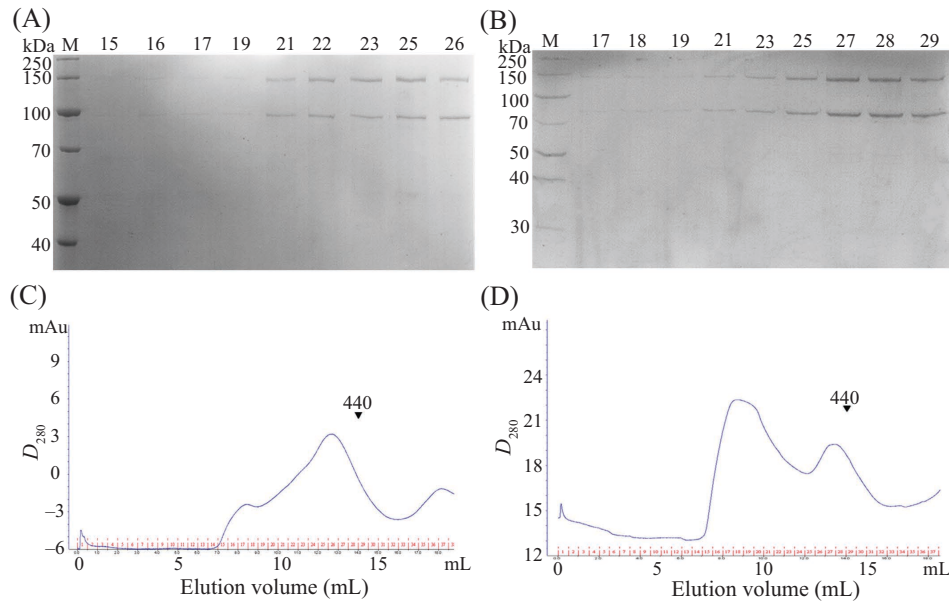


A: 裂殖酵母TSC1 1-799 aa和TSC2共表达Anti-Flag亲和纯化结果; B: TSC1 1-718 aa和TSC2共表达Anti-Flag亲和纯化结果; C: TSC1 1-675 aa与TSC2共表达Anti-Flag亲和纯化结果; D: TSC1 1-585 aa和1-630 aa分别与TSC2共表达过Anti-Flag柱的流出液Ni柱纯化结果。

A: the Anti-Flag affinity purification result of *S. pombe* TSC1 1-799 aa co-expressed with TSC2; B: the Anti-Flag affinity purification result of TSC1 1-718 aa co-expressed with TSC2; C: the Anti-Flag affinity purification result of TSC1 1-675 aa co-expressed with TSC2; D: the Ni-NTA affinity purification results of TSC1 1-585 aa and 1-630 aa co-expressed with TSC2 after flowing through Anti-Flag affinity column.

图4 不同C-端截短的裂殖酵母TSC1和TSC2共表达的纯化结果

Fig.4 The affinity purification results of distinct *S. pombe* TSC1 C-terminal truncations co-expressed with TSC2

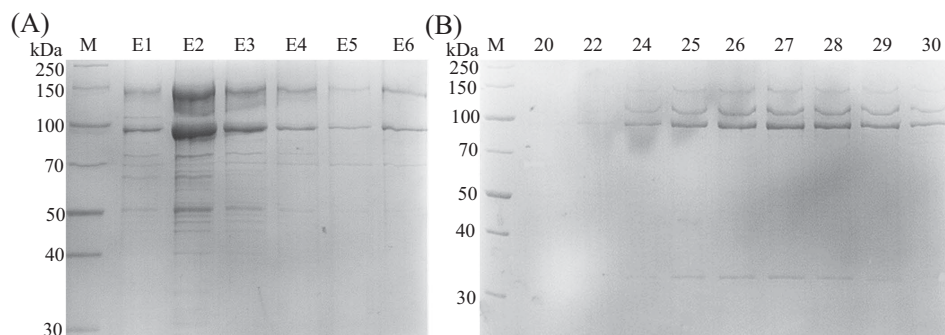


A: 裂殖酵母TSC1 1-799 aa/TSC2过分子筛(Superose 6 10/300 GL)的SDS-PAGE结果; B: 裂殖酵母TSC1 1-718 aa/TSC2过分子筛(Superose 6 10/300 GL)的SDS-PAGE结果; C: TSC1 1-799 aa/TSC2对应的UV吸收曲线图; D: TSC1 1-718/TSC2的UV吸收曲线图。M: marker; 泳道上方数字代表收集管的编号; ▼标出了标准分子量蛋白所在的位置, ▼上方数字代表分子量大小(kDa)。横坐标上方数字代表收集管编号。

A,B: the SDS-PAGE results of SEC (Superose 6 10/300 GL) of *S. pombe* TSC1 1-799 aa/TSC2 (A) and TSC1 1-718 aa/TSC2 (B); C: the UV curve of TSC1 1-799 aa/TSC2; D: the UV curve of TSC1 1-718 aa/TSC2. M: marker; The numbers above lanes are collection tubes' number; "▼" show the positions of standard molecular weight markers and the numbers above ▼ are corresponding molecular weight. The figures above the X-axis indicate the serial number of collection tubes.

图5 裂殖酵母TSC1 1-799 aa/TSC2和TSC1 1-718 aa/TSC2分子筛纯化结果

Fig.5 The SEC results of *S. pombe* TSC1 1-799 aa/TSC2 and TSC1 1-718 aa/TSC2



A: 裂殖酵母TSC1 1-799 aa和TSC2 1030-TEV共表达Anti-Flag亲和和纯化结果; B: TSC1 1-799 aa和TSC2 1030-TEV蛋白TEV酶切后过分子筛(Superose 6 10/300 GL)的SDS-PAGE结果。M: marker; E1到E6是洗出液; 泳道上方数字代表收集管的编号。

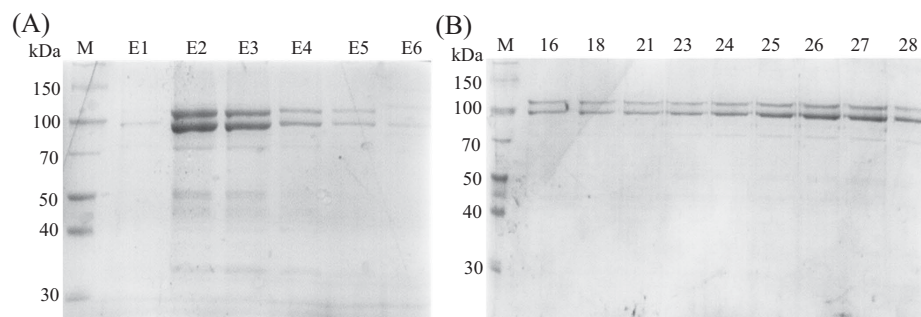
A: the Anti-Flag affinity purification result of *S. pombe* TSC2 1030-TEV co-expressed with TSC1 1-799 aa; B: the SDS-PAGE result of SEC (Superose 6 10/300 GL) of TEV protease digested TSC1 1-799 aa/TSC2 1030-TEV. M: marker; E1 to E6 are eluates. The numbers above lanes are collection tubes' number.

图6 裂殖酵母TSC1 1-799 aa和TSC2 1030-TEV共表达Anti-Flag亲和和纯化与TEV酶切过分子筛结果

Fig.6 The Anti-Flag affinity purification result of *S. pombe* TSC1 1-799 aa/TSC2 1030-TEV and the SEC result after TEV protease digestion

分。GAP结构域是具有独立功能的结构模块, N-端和GAP间的序列不保守, 那么二者可能在结构上相对独立。为了验证这种假设, 我们在TSC2第1 030个氨基酸残基后面加入TEV酶切位点。共表达TSC1 1-799 aa和TSC2 1 030-TEV蛋白, Anti-Flag纯化(图6A)。按质量比1:25加TEV酶, 4 °C酶切过夜, 只有少

量的TSC2被切开; 加大酶量并延长酶切时间, 酶切仍然不完全。酶切产物过分子筛(Superose 6), 蛋白峰在洗脱体积13.0 mL处, 与TSC1 1-799 aa/TSC2相比没有明显变化。SDS-PAGE结果(图6B)显示, 酶切后TSC1 1-799 aa、TSC2全长、TSC2 1-1 030 aa和TSC2 1 031-1 339 aa仍然聚合在一起。



A: 裂殖酵母TSC1 1-799 aa和TSC2 1-1 001 aa共表达Anti-Flag亲和纯化结果; B: TSC1 1-799 aa/TSC2 1-1 001 aa过分子筛(Superose 6 10/300 GL)的SDS-PAGE结果。M: marker; E1到E6是洗出液; 数字代表收集管的编号。

A: the Anti-Flag affinity purification result of *S. pombe* TSC2 1-1001 aa co-expressed with TSC1 1-799 aa; B: the SDS-PAGE result of SEC (Superose 6 10/300 GL) TSC1 1-799 aa/TSC2 1-1 001 aa. M: marker; E1 to E6 are eluates. The numbers are collection tubes' number.

图7 裂殖酵母TSC1 1-799 aa和TSC2 1-1 001 aa共表达Anti-Flag亲和纯化和分子筛结果

Fig.7 The Anti-Flag affinity purification and SEC results of *S. pombe* TSC1 1-799 aa and TSC2 1-1 001 aa

我们还构建了TSC2删去GAP结构域的克隆TSC2 1-1 001 aa, 与TSC1 1-799 aa共表达并纯化。Anti-Flag纯化结果见图7A, 纯化得到了TSC1 1-799 aa/TSC2 1-1 001 aa复合物, 说明TSC1和TSC2的N-端结构域结合。分子筛(Superose 6)结果(图7B)显示, 蛋白峰在洗脱体积13.0 mL处, 与TSC2全长的情况基本一致, 但16~23管的蛋白复合物的量明显增多, 说明C-端截短的TSC2和TSC1更易形成不同聚合程度的复合物。

3 讨论

结节性硬化症是由于肿瘤抑制基因TSC1和TSC2突变, 导致TSC1/2蛋白复合物丧失负调控mTOR信号通路的功能, 在多器官发生肿瘤引起多种临床病征的一种综合征。研究发现, TSC1和TSC2上有多个磷酸化位点, 能被上游不同信号路径磷酸化, 整合生长相关的信号, 调控下游的合成代谢。对TSC1和TSC2蛋白的序列比对分析, 没有发现与TSC1同源的已知蛋白, TSC2只有C-端的GAP结构域(约25 kDa)和其他GTP酶激活蛋白(GAPs)同源。除了GAP结构域的功能和yTSC1-CD的结构外, TSC1和TSC2 N-端的结构和功能还未知。

在本研究中, 我们利用杆状病毒表达系统在昆虫细胞中表达裂殖酵母TSC1和TSC2。TSC1的分子筛结果显示该蛋白可能形成二聚体。从TSC1 1-795 aa和1-716 aa的分子筛结果来看, C-端部分卷曲螺旋(coiled-coil)截短对聚合状态没有影响。TSC1 1-431 aa结构中的H16、H18和H19参与yTSC1-CD形成二聚体^[23], 说明卷曲螺旋是否介导裂殖酵母TSC1

聚合还有待研究。而在COS细胞胞内过量表达的人TSC1会形成不溶的聚合物, 这与TSC1的卷曲螺旋能使蛋白聚合有关^[24]。人TSC2可以阻止TSC1的聚合, 并和TSC1形成可溶的复合物^[24], 可见人TSC1的结构更复杂。有趣的是, 原核表达的裂殖酵母TSC1全长过分子筛估计形成的寡聚体分子量约为900 kDa^[23], 而我们利用真核系统表达的TSC1估计只有230 kDa。二者巨大的差距可能与蛋白的折叠方式不同有关, 真核系统表达的裂殖酵母TSC1蛋白应该更接近天然的折叠状态, 而原核系统中该蛋白的卷曲螺旋可能更加舒展, 导致其能介导蛋白聚合, 所以TSC1卷曲螺旋的空间状态可能会影响聚合程度。从序列分析来看, 人和裂殖酵母TSC1蛋白卷曲螺旋的长度都是400多个氨基酸, 但人TSC1的N-端核心结构域与卷曲螺旋间的卷曲结构长度有400多个氨基酸, 其中351-509 aa也参与TSC1间的相互作用^[25]; 而裂殖酵母TSC1上该区域只有100多个氨基酸。人TSC1的N-端结构域(NTD 36-304 aa)对TSC1的稳定性有重要作用^[26], 利用裂殖酵母TSC1的N-端结构预测的人TSC1 NTD结构表面平坦带有正电荷, 可能保护了TSC1与降解相关的结构组分。裂殖酵母TSC1 1-431 aa是个能抵抗蛋白酶水解的稳定紧实的结构^[23], 因此, 我们推测TSC1的N-端作为结构核心, 可能遮盖卷曲螺旋展开的部分空间。

人TSC1和TSC2主要定位于胞质中, 这两个蛋白合成后会很快形成复合物^[24]。共表达裂殖酵母TSC1和TSC2, Anti-Flag亲和纯化带Flag标签的TSC2可以拉出带6×His标签的TSC1, 验证了TSC1结合TSC2; 分子筛结果显示二者形成一定聚合度的复合物。该

结果与人源TSC1和TSC2形成复合物发挥生物学功能^[27]的情况一致。裂殖酵母TSC1 1-799 aa、1-718 aa和1-675 aa都能够和TSC2结合,但TSC1 1-675 aa和TSC2共表达纯化得到的目的蛋白量较少,TSC1 1-630 aa和TSC2共表达没有纯化得到TSC2,可推测卷曲螺旋中630-718 aa对稳定TSC2有一定作用。对TSC1的卷曲螺旋稳定TSC2的机理,我们期待结构学上的解释。

裂殖酵母TSC1和TSC2形成复合物,复合物聚合形成多聚体。TSC1ΔC/TSC2复合物过分子筛(Superose 6)估计的分子量大小达1 000~1 500 kDa,而且存在不同聚合程度的复合物。这和人TSC1/2蛋白一样,亲和纯化得到的人TSC1/2复合物的形成分子量达1 200 kDa的寡聚体,TSC1和TSC2以4:4形成异八聚体,多聚的GAP复合物可能更利于应答的协同调控^[28]。因此,TSC1/2复合物聚合形成大分子量的多聚体是该蛋白的一个重要特性。不同的是,裂殖酵母TSC1形成二聚体,如果只有TSC1参与TSC1/2复合物的聚合,那么复合物是2:2的四聚体。但裂殖酵母TSC2和TSC1结合后,提高了TSC1/2复合物的聚合度,说明TSC2相互结合,促使TSC1/2复合物形成更大的多聚体。TSC2的N-端和C-端都参与TSC2之间的相互作用,这已在人TSC2中得到验证^[28]。裂殖酵母TSC2除了聚合性质外,TSC2 1030-TEV用TEV酶切的难度较大,说明TSC2的N-端和C-端结构域间的连接并不是松散和舒展的,该肽段的柔性也不高。酶切后TSC2的C-端结构域仍然结合在TSC1/2复合物上,可能C-端结构域与TSC2的N-端存在相互作用,TSC1是否参与也未可知。对于人TSC1和TSC2,TSC1不和TSC2的C-端结合,但TSC2的N-端和C-端结合^[28]。因此,裂殖酵母TSC2的GAP可能和N-端结合。人TSC2的N-端是结合TSC1所必需的^[23],同样,裂殖酵母TSC2的N-端1-1 001 aa可以表达并和TSC1结合。这和TSC2 1030-TEV蛋白的酶切结果共同说明TSC2的N-端和C-端GAP结构域是两个相对独立的结构域,而且研究已证实在大鼠(rat)体内,TSC2 N-端和C-端的GAP结构域共表达能发挥生物学功能^[29]。

为了表达纯化获得适合结晶的裂殖酵母TSC1和TSC2蛋白,利用昆虫细胞表达是可行的。在纯化方面,TSC2的表达量低,我们利用带Flag标签的TSC2拉出TSC1。由于TSC1和TSC2带不同标签,与

pull down原理一样,TSC2结合TSC1得到摩尔比为1:1的TSC1/2复合物,解决了二者的蛋白量差异较大的问题。由于Anti-Flag亲和纯化具有较高的特异性,大大提高了亲和纯化的蛋白纯度;TSC1和TSC2共表达提高了TSC2的蛋白量,且蛋白纯度比TSC2单独表达高,可能原因是TSC2不稳定,易发生降解,而共表达的TSC1能稳定TSC2。因此,共表达TSC1和TSC2提高了蛋白表达量和纯度,有利于复合物晶体的培养。从不同TSC1和TSC2的截短蛋白表达情况来看,TSC1 1-799 aa或TSC1 1-718 aa和TSC2全长共表达可以提高蛋白产率。对于结晶来说,蛋白表达量仍要进一步提高,由于TSC1对TSC2具有稳定作用,构建昆虫表达的双元载体可能是更优的方案。在TSC1和TSC2的表达纯化中,我们遇到的难题还有TSC1/2复合物比较容易沉淀,如低盐、机械晃动和蛋白浓度提高等都能导致絮状沉淀产生;而且TSC1/2复合物的聚合情况对结晶来说是个巨大的挑战。综上所述,本研究加深了我们对裂殖酵母TSC1和TSC2蛋白性质的认知,对表达纯化获得用于结晶的TSC1/2复合物具有重要的指导意义。

参考文献 (References)

- 1 Crino PB, Nathanson KL, Henske EP. The tuberous sclerosis complex. *N Eng J Med* 2006; 355(13): 1345-56.
- 2 Povey S, Burley MW, Attwood J, Benham F, Hunt D, Jeremiah SJ, *et al.* Two loci for tuberous sclerosis: One on 9q34 and one on 16p13. *Ann Hum Genet* 1994; 58(Pt 2): 107-27.
- 3 European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium. Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* 1993; 75 (7): 1305-15.
- 4 Slegtenhorst MV, Hoogt Rd, Hermans C, Nellist M, Janssen B, Verhoef S, *et al.* Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science* 1997; 277(5327): 805-8.
- 5 Wullschlegler S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006; 124(3): 471-84.
- 6 Huang J, Manning Brendan D. The TSC1-TSC2 complex: A molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J* 2008; 412(2): 179.
- 7 Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell* 2002; 10(1): 151-62.
- 8 Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk: Implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 2005; 121(2): 179-93.
- 9 Lee DF, Kuo HP, Chen CT, Hsu JM, Chou CK, Wei Y, *et al.* IKKβ suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* 2007; 130(3): 440-55.

- 10 Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003; 115(5): 577-90.
- 11 Gao X, Zhang Y, Arrazola P, Hino O, Kobayashi T, Yeung RS, *et al.* Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nat Cell Biol* 2002; 4(9): 699-704.
- 12 Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, *et al.* Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev* 2004; 18(23): 2893-904.
- 13 Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* 2003; 17(15): 1829-34.
- 14 Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol* 2005; 15(8): 702-13.
- 15 Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, *et al.* PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* 2007; 25(6): 903-15.
- 16 Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 2002; 4(9): 648-57.
- 17 Cai SL, Tee AR, Short JD, Bergeron JM, Kim J, Shen J, *et al.* Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *J Cell Biol* 2006; 173(2): 279-89.
- 18 Plas DR, Thompson CB. Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. *J Biol Chem* 2003; 278(14): 12361-6.
- 19 DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev* 2008; 22(2): 239-51.
- 20 Matsumoto S, Bandyopadhyay A, Kwiatkowski DJ, Maitra U, Matsumoto T. Role of the Tsc1-Tsc2 complex in signaling and transport across the cell membrane in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 2002; 161(3): 1053-63.
- 21 Prilusky J, Felder CE, Zeev-Ben-Mordehai T, Rydberg EH, Man O, Beckmann JS, *et al.* FoldIndex: A simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics* 2005; 21(16): 3435-8.
- 22 Lupas A, van Dyke M, Stock J. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 1991; 252(5009): 1162-4.
- 23 Sun W, Zhu YJ, Wang Z, Zhong Q, Gao F, Lou J, *et al.* Crystal structure of the yeast TSC1 core domain and implications for tuberous sclerosis pathological mutations. *Nat Commun* 2013; 4: 2135.
- 24 Nellist M, van Slegtenhorst MA, Goedbloed M, van den Ouweland AM, Halley DJ, van der Sluijs P. Characterization of the cytosolic tuberin-hamartin complex. Tuberin is a cytosolic chaperone for hamartin. *J Biol Chem* 1999; 274(50): 35647-52.
- 25 Hoogeveen-Westerveld M, Exalto C, Maat-Kievit A, van den Ouweland A, Halley D, Nellist M. Analysis of TSC1 truncations defines regions involved in TSC1 stability, aggregation and interaction. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802(9): 774-81.
- 26 Santiago Lima AJ, Hoogeveen-Westerveld M, Nakashima A, Maat-Kievit A, van den Ouweland A, Halley D, *et al.* Identification of regions critical for the integrity of the TSC1-TSC2-TBC1D7 complex. *PLoS One* 2014; 9(4): e93940.
- 27 Plank TL, Yeung RS, Henske EP. Hamartin, the product of the tuberous sclerosis 1 (TSC1) gene, interacts with tuberin and appears to be localized to cytoplasmic vesicles. *Cancer Res* 1998; 58(21): 4766-70.
- 28 Hoogeveen-Westerveld M, van Unen L, van den Ouweland A, Halley D, Hoogeveen A, Nellist M. The TSC1-TSC2 complex consists of multiple TSC1 and TSC2 subunits. *BMC Biochem* 2012; 13(18): 1471-2091.
- 29 Momose S, Kobayashi T, Tada N, Itoyama S, Hino O. N-terminal hamartin-binding and C-terminal GAP domain of tuberin can separate *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356(3): 693-8.