

· 基础论著 ·

HCV NS4A 与钙离子信号调节亲环素配体相互作用位点的确定

程勇前 王琳 成军 刘妍 徐东平 钟彦伟 李晓东 戴久增

【摘要】 目的 明确丙型肝炎病毒非结构蛋白 4A (HCV NS4A) 与钙离子信号调节亲环素配体 (CAML) 相互结合的具体位点。**方法** 构建 CAML 不同剪接体及缺失突变体的酵母表达载体, 转化入酵母 Y187 菌株, 分别与转化了 HCV NS4A 的酵母 AH109 菌株进行配合, 在含 X- α -gal 的酵母四缺培养基上培养观察。**结果** 转化了 CAML 不同剪接体及 CAML 缺失突变体 pGADT7/CAML-1-211, pGADT7/CAML-1-57 的酵母 Y187 菌株与转化了 HCV NS4A 的酵母 AH109 菌株配合后在四缺培养基上均有菌落生长, 并且菌落呈现蓝色。转化了 CAML 缺失突变体 pGADT7/CAML-58-211, pGADT7/CAML-234-296 的酵母 Y187 菌株与转化了 HCV NS4A 的酵母 AH109 菌株配合后在四缺培养基上未见菌落生长。**结论** HCV NS4A 与 CAML 的相互结合位点位于 CAML 的 N-末端 1~57 位氨基酸残基, CAML 不同剪接体与 HCV NS4A 均可以相互结合。

【关键词】 丙型肝炎病毒; 钙离子信号调节亲环素配体; 结合位点

The interaction site of HCV NS4A and Ca²⁺-modulating cyclophilin ligand
CHENG Yong-qian*, WANG Lin, CHENG Jun, LIU Yan, XU Dong-ping, ZHONG Yan-wei, LI Xiao-dong, DAI Jiu-zeng. *Viral Hepatitis Research Center, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Corresponding author: CHENG Jun, Email: cj@genetherapy.com.cn

【Abstract】 Objective To identify the interaction site of HCV NS4A protein to Ca²⁺-modulating cyclophilin ligand (CAML). **Methods** The yeast expression vectors of different spliceosomes and deletion mutants of CAML gene was constructed and transfected into yeast Y187, matching experiment with AH109 transfected pGBKT7-NS4A was performed. Diploid yeast was plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing X- α -gal. **Results** The yeast Y187 transfected with the yeast expression vectors of different spliceosomes and the mutants pGADT7/CAML-1-211 and pGADT7/CAML-1-57 of CAML gene could match successfully with AH109 transfected pGBKT7-NS4A, but pGADT7/CAML-58-211 and pGADT7/CAML

基金项目: 国家重点基础研究项目 (2004CB518908)

作者单位: 100039 北京, 解放军第三〇二医院传染病研究所病毒性肝炎研究室 (程勇前、王琳、刘妍、徐东平、钟彦伟、李晓东、戴久增); 北京地坛医院传染病研究所 (成军)

通讯作者: 成军 Email: cj@genetherapy.com.cn

-234-296 could not. **Conclusions** The interaction site of HCV NS4A and CAML located at the hydrophilic N-terminal 1-57 amino acid of CAML protein. All of the spliceosomes of CAML could bind with HCV NS4A.

【Key Words】 Hepatitis C virus; Ca^{2+} -modulating cyclophilin ligand; Interaction site

病毒蛋白与受感染细胞蛋白之间相互作用是病毒致病的关键步骤之一,它们的相互作用可介导病毒进入细胞,它们的网络作用可改变蛋白的正常生物学功能,影响病毒自身的复制、持续感染和致病。本课题组在利用酵母双杂交技术对 HCV NS4A 相互作用蛋白筛选实验中发现,HCV NS4A 可与钙离子信号调节亲环素配体(calcium-modulating cyclophilin ligand, CAML)相互作用^[1],并且利用免疫共沉淀技术证实了两者在哺乳动物细胞中也可以发生相互作用^[2]。CAML 是 1994 年 Bram 等^[3]在利用酵母双杂交技术研究人亲环素 B(cyclophilin B)的相互作用蛋白时克隆到的一个新基因。目前许多研究证实其在钙离子信号转导、细胞凋亡、免疫调节以及病毒感染等方面具有重要作用^[4]。为明确两者相互作用的具体结合位点,本课题组利用 CAML 不同剪接体及缺失突变体的酵母表达载体进行了研究。

材料与方法

一、实验材料

酿酒酵母 AH109 酵母株、Y187 酵母株, pGBKT7-BD、pGADT7-AD 克隆载体及酵母 YPD 培养基、SD/-Trp、SD/-Leu, SD/-Trp-Leu-His, SD/-Trp-Leu-His-Ade 等培养基、X- α -gal 购于 Clontech 公司;Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*Bam* H I 和 *Xho* I 购于 Takara 生物公司;pGEM-T-easy 载体购于 Promega 公司。玻璃奶回收试剂盒购自博大泰克公司;大肠埃希菌 DH5 α 为本室保存;PCR 引物由上海生工公司合成。DNA 测序由北京联合基因科技集团有限公司承担。

二、实验方法

1. CAML 不同剪接体酵母表达载体构建:将本课题组构建的含 CAML 不同剪接体的 pGEM-T-easy 载体经 *Bam* H I 和 *Xho* I 的酶切,产物用玻璃奶回收试剂盒进行回收,将酶切产物分别与酶切后的 pGADT7 载体连接,连接产物转化 DH5 α 感受态细菌,在含氨苄青霉素的 LB 培养板上,37℃ 培养 12 ~ 16 h。挑取阳性菌落,增菌。提取质粒进行限制性酶切分析鉴定。

2. CAML 不同缺失突变体酵母表达载体构建:设计 CAML 的 4 种缺失突变体(分别包括 N-末端 1 ~ 211 氨基酸残基(aa)、1 ~ 57 aa、58 ~ 211 aa 及 234 ~ 296 aa 的上下游引物,上游引入 *Bam* H I 酶切位点,下游引入 *Xho* I 酶切位点,以构建的含有 CAML 基因全长编码序列的 pGEM-T-easy/CAML 质粒为模板进行 PCR,PCR 参数如下:95℃ 5 min 预变性,95℃ 1 min 变性,63.5℃ 1 min 退火,72℃ 1 min 延伸,共 35 个循环后,72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用玻璃奶回收试剂盒回收后分别

与 pGEM-T-easy 载体连接。经测序及酶切鉴定后与 pGADT7 载体连接,连接产物转化 DH5 α 感受态细菌,在含氨苄青霉素的 LB 培养板上,37℃ 培养 12 ~ 16 h。挑取阳性菌落,增菌。提取质粒进行限制性酶切分析鉴定。不同剪切体的引物: CAML-FL、CAML-D212-233、CAML-D58-211、CAML-D58-233 的上游引物 5' -GGA TCC AC ATG GAG TCG ATG GCC GTC-3',下游引物 5' -CC CTC GAG TCA TGG TAC TTC AGA GCC-3'。不同突变体的引物: CAML-1-211、CAML-1-57 的上游引物 5' -ATG GAG TCG ATG GCC GTC-3'; CAML-58-211 的上游引物 5' - GGA TCC ACA TGG AAG AAG AAA GTC AAA C-3'; CAML-234-296 的上游引物 5' - GGA TCC ACA GTG AAA AGA AGA TAA AGA C-3'。CAML-1-211、CAML-1-57 的下游引物 5' -CTC GAG TCA CAA GTA TTT GCA AAC AAA AG-3'; CAML-58-211 的下游引物 5' -CTC GAG TCA CGC GCC GCT CCC GGG CCC TCG AGT CAC AAG TAT TTG CAA ACA AAA G -3'; CAML-234-296 的下游引物 5' -CCC TCG AGT CAT GGT ACT TCA GAG CC-3'。

3. 转化 CAML 不同剪接体及缺失突变体酵母表达载体至酵母 Y187 菌株:将含 CAML 不同剪接体的酵母表达载体 pGADT7/CAML-D212-233、pGADT7/CAML-D58-211、pGADT7/CAML-D58-233 以及含 CAML 不同缺失突变体 pGADT7/CAML-1-211、pGADT7/CAML-1-57、pGADT7/CAML-58-211、pGADT7/CAML-234-296 用醋酸锂法转入酵母菌株 Y187,铺 SD/-Leu-His-Ade /kana (4 缺 + 色氨酸)培养基,观察 2 周,排除自激活现象,同时铺 SD/-Leu/kana (缺亮氨酸)培养基,30℃ 孵育 5 ~ 7 d。

4. 转化 HCV NS4A 酵母表达载体至酵母 AH109 菌株:HCV NS4A 的酵母表达载体 pGBKT7-NS4A 用醋酸锂法转入酵母菌株 AH109,铺 SD/-Trp-His-Ade /Kana (4 缺 + 亮氨酸)培养基,观察 2 周,排除自激活现象,同时铺 SD/-Trp/kana (缺色氨酸)培养基,30℃ 孵育 57 d。

5. 酵母细胞中配合试验:挑取鉴定好的转化了 CAML 不同剪接体及缺失突变体的 Y187 单个酵母菌落 (直径 2 ~ 3 mm),分别与鉴定好的可表达 NS4A 的酵母 AH109 单个菌落在 1 ml 2 × YPDA 中振荡混匀,在 5 ml 2 × YPDA 中 30 ℃ 及 30 ~ 50 rpm/min 振荡条件下配合 18 ~ 24 h,离心后用 0.25 × YPDA 重悬细胞。将配合产物按 1:100、1:1000、1:10 000、1:100 000、1:1 000 000 倍比稀释后铺于含 X- α -gal 的 4 缺培养基上 30 ℃ 孵箱中培养 7 d。

结 果

一、CAML 不同剪接体酵母表达载体酶切鉴定

构建的 CAML 不同剪接体的酵母表达载体 (pGADT7/CAML-FL、pGADT7/CAML-D212-233、pGADT7/CAML-D58-211、pGADT7/CAML-D58-233) 经 *Bam* H I、*Xho* I 双酶切后得到不同大小的酶切产物,产物大小分别为 891 bp、825 bp、430 bp、364 bp (图 1)。

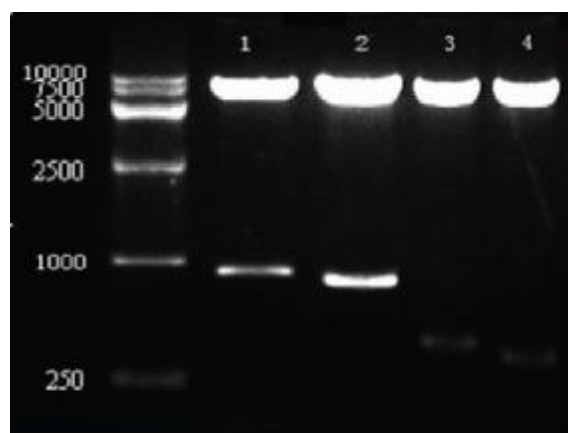


图 1 pGADT7-CAML 不同剪接体的酵母表达载体酶切鉴定 (Bam H I/Xho I)
①pGADT7-CAML-FL;②pGADT7-CAML-D212-233;③pGADT7-CAML-D58-211;④pGADT7-CAML-D58-233 CS

二、CAML 不同缺失突变体酵母表达载体酶切鉴定

构建的 CAML 不同缺失突变体的酵母表达载体 (pGADT7/CAML-1-211、pGADT7/CAML-1-57、pGADT7/CAML-58-211、pGADT7/CAML-234-296) 经 *Bam* H I、*Xho* I 双酶切后得到不同大小的酶切产物,产物大小分别为 171 bp、462 bp、633 bp 和 192 bp (图 2)。

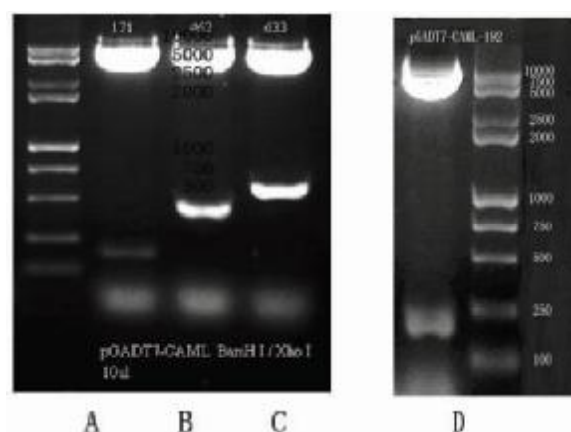


图 2 pGADT7-CAML 缺失突变体酵母表达载体酶切鉴定 (Bam H I/Xho I)
A:pGADT7/CAML-1-211;B:pGADT7/CAML-1-57;C:pGADT7/CAML-58-211;D:pGADT7/CAML-234-296

三、HCV NS4A 酵母表达载体酶切鉴定结果

构建的 HCV NS4A 酵母表达载体 pGBKT7-NS4A 经 *Bam* H I、*Eco* R I 双酶切后得到大小约为 162 bp 的产物 (图 3)。

四、CAML 不同剪接体与 HCV NS4A 在酵母细胞中相互配合后生长情况

分别转化了 pGADT7/CAML-D212-233、pGADT7/CAML-D58-211、pGADT7/CAML-D58-233 的酵母 Y187 菌株与转化了 HCV NS4A 的酵母 AH109 菌株配合后在四缺培养基上均有菌落生长,并且菌落呈现蓝色图 4。

五、CAML 不同缺失突变体与 HCV NS4A 在酵母细胞中相互配合后生长情况
转化了 pGADT7/CAML-1-211、pGADT7/CAML-1-57 的酵母 Y187 菌株与转化了 HCV NS4A 的酵母 AH109 菌株配合后均可以在四缺培养基上生长,并且菌落呈现蓝色。转化了 pGADT7/CAML-58-211、pGADT7/CAML-234-296 的酵母 Y187 菌株与转化了 HCV NS4A 的酵母 AH109 菌株配合后在四缺培养基上未见菌落生长(图 5)。

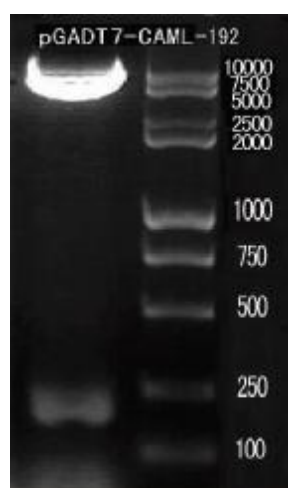


图 3 pGBKT7-NS4A 酶切鉴定 (*Bam* H I/*Eco* R I)

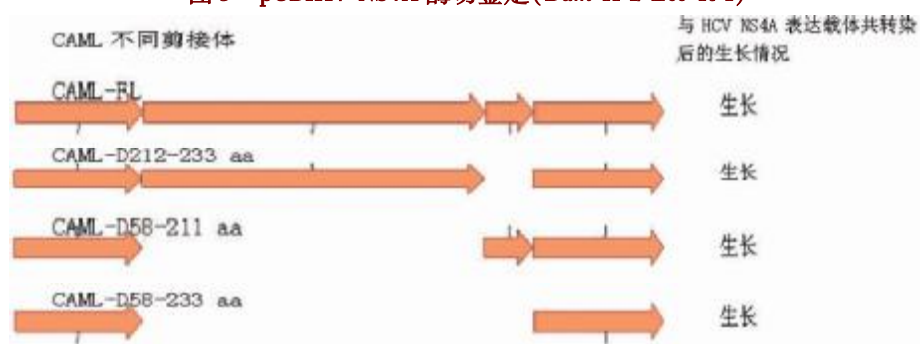


图 4 CAML 不同剪接体与 HCV NS4A 在酵母细胞中相互配合结果示意图

讨 论

CAML 基因定位于人 5 号染色体 q23^[5], 由 891 nt 组成, CAML cDNA 含一个 888 bp 的开放读码框架, 编码一个含 296 aa 的蛋白。CAML 是一个膜内在蛋白, 包括亲水的 N-末端、C-末端以及 3 个推测的跨膜区, N-末端朝向胞浆, 是与其他分子相互作用的部位。Holloway 等^[6]通过限制酶消化分析显示, CAML 亲水的 N-末端位于胞浆, 这将有利于 CAML 与其他蛋白在胞浆中相互作用。

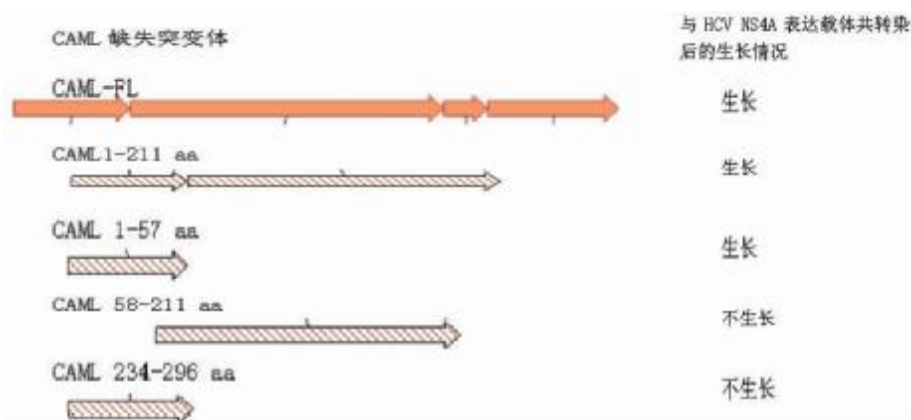


图 5 CAML 不同缺失突变体与 HCV NS4A 在酵母细胞中相互配合

目前已经报道的与其相互作用的蛋白主要有:跨膜激活因子和 CAML 相互作用因子(TACI)^[7]、表皮生长因子(EGF)受体^[8],人立早基因(IEX-1)^[9]、血管紧张素 II 的 I 型受体相关蛋白(ATRAP)^[10]、淋巴细胞特异蛋白质酪氨酸激酶(p56Lck)^[11]、常染色体隐性遗传性多囊肾疾病的相关基因 PKHD1 编码的蛋白纤维囊蛋白^[12],以及霍普金氏肉瘤相关疱疹病毒 K7 蛋白(KSHV)^[13]等。这些蛋白与 CAML 相互作用位点均位于 CAML 亲水的 N-末端,分别位于 TACI 的 1~201 aa、EGFR 的 1~189 aa、ATRAP 的 1~189 aa、纤维囊性蛋白的 1~53 aa 和 KSHV 的 1~160 aa。

本课题组既往研究证实 CAML 基因在细胞中存在不同的剪接体,而且这些剪接体的组成中均包含了 CAML 与其他蛋白相互结合的亲水的 N-末端,以及 CAML 发挥调节钙离子内流作用所必需的第 2、3 跨膜结构域,说明这些剪接体均具有发挥 CAML 基本功能的可能。

本研究结果显示 CAML 不同剪接体与 HCV NS4A 配合后均可以在四缺培养基上生长,并且菌落呈现蓝色,说明 CAML 不同剪接体与 HCV NS4A 均可以发生相互作用,也就是说在剪接体中缺失 N-末端 58~211 aa, N-末端 212~233 aa 或者同时缺失二者,均不影响 NS4A 与 CAML 的结合,由此推测二者的结合部位可能位于 CAML 的 N-末端 1~57 aa 或者 C-末端的 63 aa(234~296 aa)。因此,本课题组构建了分别包含 CAML 的 N-末端 1~57 aa、58~211 aa、1~211 aa 及 C-末端 234~296 aa 的缺失突变体。结果显示,转化了 pGADT7/CAML-234-296 的酵母 Y187 菌株与转化了 HCV NS4A 的酵母 AH109 菌株配合后在四缺培养基上未见菌落生长,说明二者的结合部位不在 CAML 的 C-末端。转化了 pGADT7/CAML-1-57、pGADT7/CAML-1-211 的酵母 Y187 菌株与转化了 HCV NS4A 的酵母 AH109 菌株配合后在四缺培养基上均可见菌落生长,并且菌落呈现蓝色,说明 CAML 与 HCV NS4A 相互结合的部位在 CAML 亲水的 N-末端;而转化了 pGADT7/CAML-58-211 的酵母 Y187 菌株与转化了 HCV NS4A 的酵母 AH109 菌

株配合后在四缺培养基上未见菌落生长,说明缺失 N-末端 58 ~ 211 aa 并不影响二者的相互结合,CAML 的 N-末端 1 ~ 57 aa 足以发挥与 HCV NS4A 的相互结合作用。这一结果与目前研究证实的其他蛋白与 CAML 相互作用位点基本一致,但在其他研究报道中对 CAML 基因均采用随机缺失的方法,而本实验则是根据本课题组发现的 CAML 剪接体切割位点进行缺失突变分析,这样可能更接近 CAML 在细胞内与其他蛋白相互作用的自然状态。

参 考 文 献

- 1 程勇前,王琳,成军,等. 酵母双杂交技术筛选人白细胞 cDNA 文库中 HCV NS4A 结合蛋白及 CAML 基因的克隆. 中华实验和临床病毒学杂志,2007,21:47-49.
- 2 程勇前,成军,王琳,等. 体内免疫共沉淀对 HCV NS4A 与参与 Ca^{2+} 信号调节的 CAML 蛋白相互作用的证实. 中华传染病杂志,2007,25:76-79.
- 3 Bram RJ, Valentine V, Shapiro DN, et al. The gene for calcium-modulating cyclophilin ligand (CAMLG) is located on human chromosome 5q23 and a syntenic region of mouse chromosome 13. Genomics,1996,31:257-260.
- 4 程勇前,成军. 钙离子信号调节亲环素配体研究进展. 世界华人消化杂志,2007,15:56-60.
- 5 Schwaller J, Schneider P, Mhawech-Fauceglia P, et al. Neutrophil-derived APRIL concentrated in tumor lesions by proteoglycans correlates with human B-cell lymphoma aggressiveness. Blood,2007,109:331-338.
- 6 Holloway MP, Bram RJ. Co-localization of calcium-modulating cyclophilin ligand with intracellular calcium pools. J Biol Chem, 1998,273:16346-16350.
- 7 von Bulow GU, Bram RJ. NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. Science,1997,278:138-141.
- 8 Tran DD, Russell HR, Sutor SL, et al. CAML is required for efficient EGF receptor recycling. Dev Cell,2003,5:245-256.
- 9 Kumar R, Lutz W, Frank E, et al. Immediate early gene X-1 interacts with proteins that modulate apoptosis. Biochem Biophys Res Commun,2004,323:1293-1298.
- 10 Guo S, Lopez-Illasaca M, Dzau VJ. Identification of calcium-modulating cyclophilin ligand (CAML) as transducer of angiotensin II-mediated nuclear factor of activated T cells (NFAT) activation. J Biol Chem,2005,280:12536-12541.
- 11 Tran DD, Edgar CE, Heckman KL, et al. CAML is a p56Lck-interacting protein that is required for thymocyte development. Immunity,2005,23:139-152.
- 12 Nagano J, Kitamura K, Hujer KM, et al. Fibrocystin interacts with CAML, a protein involved in Ca^{2+} signaling. Biochem Biophys Res Commun,2005,338:880-889.
- 13 Feng PH, Park J, Lee BS, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus mitochondrial K7 protein targets a cellular calcium-modulating cyclophilin ligand to modulate intracellular calcium concentration and inhibit apoptosis. J Virol,2002,76:11491-11504.

(收稿日期:2007-01-10)

(本文编辑:曾辉)