文章编号:1000-5404(2010)14-1495-04

论著

应用酵母双杂交方法筛选与鉴定组蛋白乙酰基转移酶 hTIP60β 相互作用蛋白

黄 轶[1],曾昭淳[2] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院临床分子医学中心[1];400016 重庆,重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室[2])

[摘要] 目的 克隆人组蛋白乙酰基转移酶 TIP60β 基因,应用酵母双杂交技术研究筛选与 TIP60β 发生相互作用的蛋白。**方法** 运用 RT-PCR 方法从人脑组织克隆 TIP60β cDNA,构建酵母双杂交 BD 诱饵载体 pGBKT7- TIP60β,以其为诱饵从成人肝 cDNA 文库中筛选与之相互作用的阳性克隆,并对阳性克隆进行序列测定和相关生物学分析。**结果** 诱饵载体 pGBKT7-TIP60β 经双酶切可释放出 1 443 bp DNA 片段,与理论值大小一致,测序比对分析表明序列正确。以其为诱饵经酵母双杂交筛选共获得 32 个克隆,进一步验证与测序分析,最终确认 HDAC7A、DMD2、CREB1、BD73、PHF17、AR 等 9 个克隆基因。**结论** 以 TIP60β 为诱饵利用酵母双杂交系统获得 9 个基因编码的蛋白,它们很可能与 TIP60β 转录活性调节功能有关。

[关键词] 组蛋白乙酰基转移酶;TIP60β;酵母双杂交
[中图法分类号] R394-33;R341;R394.3 **[文献标志码]** A

Screening and identification of interaction proteins of human TIP60β by yeast two-hybrid system

Huang Yi[1], Zeng Zhaochun[2]([1]Center for Clinical Molecular Medicine, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014; [2]Department of Biochemistry and Molecular, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To construct a yeast expression vector containing human TIP60β gene (a spliced form of HIV-1 tat interactive protein, HTATIP, 60×10^3) and screen its interaction proteins by yeast two-hybrid. **Methods** Human TIP60β gene fragment was amplified by RT-PCR and cloned into pGBKT7 vector. Using TIP60β as bait, the proteins interacting with TIP60β were screened from a human liver cDNA library. The positive clones were analyzed by bioinformatic methods. **Results** Human TIP60β cDNA was successfully amplified and cloned into the pGBKT7 vector and indentified by double enzyme digestion and DNA sequencing. Using yeast two-hybrid, 32 clones were screened from a human liver cDNA library, and 9 positive clones including histone deacetylase 7A (HDAC7A), mouse double minute 2 (DMD2), B-cell CLL/lymphoma 3 (BCL3), endothelin receptor type A (EDNRA), androgen receptor (AR), PHD finger protein 17 (PHF17), Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM), CAMP responsive element binding protein 1 (CREB1), orphan steroid receptor BD73 were verified after sequencing. **Conclusion** The screened interaction proteins with TIP60β by yeast two-hybrid may be involved in the roles of transcriptional regulation of TIP60β.

[Key words] histone acetyltransferases; TIP60β; yeast two-hybrid

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30701004). Corresponding author: Zeng Zhaochun, Tel: 86-23-68485398, E-mail: zengzc88@yahoo.com.cn

真核生物基因转录起始是转录调控机制的限速和关键步骤,而染色质和核小体构型改变在转录起始中起到重要的调控作用。与转录有关的组蛋白末端的乙酰化状态在多种组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferases, HATs)和去乙酰基酶(histone deacetylases, HDACs)共同作用下保持着可逆的动态平衡状态并使染色质结构发生动态的改变,从而控制染色质的结构变化及基因的转录及表达,与染色质的转录活性状态密切相关[1,2]。

TIP60(HIV-1 tat interactive protein, HTATIP, 60 ×

[基金项目] 国家自然科学基金(30701004)
[通信作者] 曾昭淳,电话:(023) 68485398, E-mail:zengzc88@yahoo.com.cn

10^3)基因变体之一——TIP60α 属具有 HATs 活力的 MYST(MOZ-Ybf2/Sas3-Sas2- TIP60)家族,在染色质的结构与转录活性调节过程中具有多重功能[3-5]。近来发现另一种变体——TIP60β 在胞内定位及蛋白结构上与 TIP60α 有着明显差异[6],由此推测 TIP60β 功能可能与 TIP60α 具有不同的表达调控作用。因此我们拟利用酵母双杂交 GAL4 系统构建 TIP60β 诱饵蛋白,以期从人组织的 cDNA 文库中钓取可与之结合的相互作用蛋白分子,为研究 TIP60 β 在细胞中功能提供思路和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

正常人脑组织标本由第三军医大学新桥医院神经外科提供。大肠杆菌 DH5α、pMD18-T 环状自连载体为本室保存;总 RNA 抽提试剂 RNAout 为天泽基因生物公司产品, KOD Plus 高保真 DNA 聚合酶与 T_4DNA 连接酶分别为日本 ToYoBo 公司与美国 NEB 公司产品,RT-PCR 试剂盒 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV)Ver 3.0、实验用限制性核酸内切酶、DNA Marker 购自大连宝生物公司,PCR 产物纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒及质粒抽提试剂盒均购自 Omega 公司,酵母细胞 AH109 其他各种与酵母双杂交系统有关的试剂均购自 Clontech 公司,转化有成人肝 cDNA 文库质粒的 Y187 酵母菌液为原西南医院全军烧伤研究所袁顺宗博士惠赠。其余试剂均为国产化学分析纯。引物合成与序列测定由上海英骏生物公司完成。

1.2 方法

1.2.1 TIP60β 基因的克隆 结合酵母表达载体读框及多克隆位点自行设计引物,BLAST 分析排除异源基因同源性序列,序列如下:P1: 5′-GTGGAGGGAGGGAAGATGG-3′, P2: 5′-CAGTCCTGCTGCCGTCTTG-3′; P3:5′-TCGGAATTCATGGCGGAGGTGGGGGAG-3′(*Eco*R Ⅰ), P4:5′-TCGGGATCCAGTCCTGCTGCCGTCTTG-3′(*Bam*H Ⅰ)。按 RNAout 的产品说明书提取脑组织的 RNA。cDNA 合成按 RT-PCR Kit 说明书进行,20 μl 逆转录体系,反应条件为:42 ℃ 60 min,99 ℃ 5 min。以人脑 cDNA 为模板,P1 与 P2 为引物,KOD PLUS 高保真酶 PCR 扩增 TIP60β 1 443 bp 片段,扩增条件为 95 ℃ 20 s, 56 ℃ 30 s, 68 ℃ 1 min 40 s, 35 个循环后 68 ℃延伸 7 min,0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果。

1.2.2 重组质粒 pMD18-T-TIP60β 的构建与鉴定 *Eco*R Ⅴ处理 pMD18-T 环状自连载体,线性化后与纯化回收的 TIP60β PCR 特异产物经 T_4 DNA 连接酶 22 ℃连接,1 × TSS 法转化大肠杆菌 DH5α,在含有 X-gal、IPTG 及 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 板进行蓝白斑筛选,挑取白色阳性克隆抽提质粒,电泳判定质粒大小,测序鉴定。重组质粒命名为 pMD18-T-TIP60β。

1.2.3 重组诱饵质粒 pGBKT7-TIP60β 的构建及鉴定 以测序正确的 pMD18-T-TIP60β 质粒为模板, 引物 P3、P4 扩增的 PCR 产物经 *Eco*R Ⅰ/*Bam*H Ⅰ双酶切后经 T_4 DNA 连接酶连接插入 pGBKT7 质粒的 *Eco*R Ⅰ/*Bam*H Ⅰ位点间,1 × TSS 法转化大肠杆菌 DH5α,卡那霉素筛选阳性克隆,提取质粒,双酶切鉴定及测序鉴定,命名为 pGBKT7-TIP60β。

1.2.4 酵母细胞 AH109 感受态的制备、转化及 3′-AT 浓度的优化 酵母细胞 AH109 感受态的制备与转化参照 Clontech 说明书进行。由于 HIS3 报告基因的低水平的泄漏可能导致 AH109 [pGBKT7-TIP60β]在缺乏 HIS3 的培养基生长形成低背景。为消除干扰,将生长在 SD/-Trp 板上 AH109 [pGBKT-TIP60β]菌划线转接到 3′-AT 浓度分别为 0 ~ 6.0 mmol/L 的 SD/-His/-Trp 板上进行 3′-AT 浓度的优化,同时以 AH109[pGBKT7 空载体]为对照。

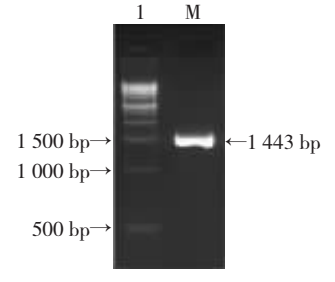
1.2.5 诱饵质粒 pGBKT7-TIP60β 的对酵母细胞的毒性及自激活效应检测 同时将 pGBKT7-TIP60β 诱饵质粒与空载体 pGBKT7 分别转化酵母细胞 AH109,观察其生长情况,同时随机挑选含 pGBKT7- TIP60β 与 pGBKT7 质粒的 AH109 酵母细胞单克隆(直径 >2 mm),划线接种于含 50 μg/ml 卡那霉素的 SD/-Trp/X-α-gal,SD/-His/-Trp/X-α-gal(另含 2.0 mmol/L 3′-AT), SD/-Ade/-Trp/X-α-gal 营养缺陷型选择培养基板上,30 ℃倒置培养 4 ~ 6 d,观察其生长情况。

1.2.6 酵母双杂交筛选及生物信息学分析 按照 Clontech 公司的说明书及参考文献[7]进行人肝 cDNA 文库的酵母接合筛选阳性克隆。将 AH109 [pGBKT7-TIP60β]与 Y187 [文库重组质粒]进行接合后涂布于 SD/-Leu/-Trp/- His/-Ade/X-a-gal 平板上,30 ℃培养,筛选蓝色的阳性克隆。经 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/ X-a-gal 平板上 3 次筛选验证。对阳性克隆中的重组质粒经扩增、抽提并测序、分类整理后,交换宿主菌株,再次进行回复杂交实验验证阳性相互作用。利用 BLAST 同源性分析,GenBank 生物信息学分析确定相关基因。

2 结果

2.1 TIP60β 的克隆

以脑组织总 RNA 反转录的 cDNA 为模板,应用 P1 与 P2 引物第一轮 PCR 扩增出的 TIP60β DNA 片段约 1 443 bp ,片段大小与预期值一致(图 1)。重组载体 pMD18-T -TIP60β 的测序结果经 BLAST 证实插入片段为人 TIP60β 序列(GenBank NM_182709)。

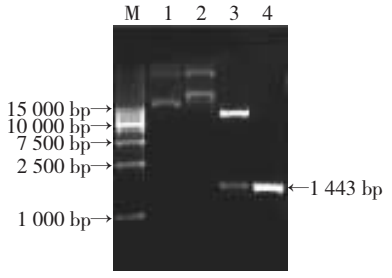


M:DNA 标准; 1:TIP60β

图 1 TIP60β 基因 PCR 电泳结果

2.2 诱饵质粒 pGBKT7-TIP60β 的构建及鉴定

*Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ分别双酶切 pGBKT7-TIP60β 后，释放出 1 443 bp DNA 片段，与理论扩增大小一致（图 2）。测序结果表明融合区域的读码框正确并有正确的方向。经 BLAST 分析证实为序列正确的人 TIP60β 基因，表明诱饵质粒构建成功。



M：标准（DL 15 000）；1：pGBKT7；2：pGBKT7-TIP60β；3：*Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ酶切 pGBKT7-TIP60β；4：TIP60 β 产物

图 2 诱饵质粒 pGBKT7-TIP60β 酶切鉴定

2.3 诱饵质粒 pGBKT7-TIP60β 的毒性及自激活效应检测

将 pGBKT7-TIP60β 诱饵质粒与空载体 pGBKT7 分别转化酵母细胞 AH109，在含有的 SD/-Trp 板上生长良好，菌落大小基本一致（>2 mm）。AH109［pGBKT7-TIP60β］PCR 鉴定为阳性，说明转化成功且无酵母毒性。由于 HIS3 报告基因的低水平的泄漏可能导致 AH109［pGBKT7-TIP60β］在缺乏 HIS3 的培养基生长形成低背景。AH109［pGBKT7 -TIP60β］在 3′-AT 浓度为 0、1.0、1.5 mmol/L 的 SD/-His/-Trp 板上有少量 <2 mm 的菌落生长，在 3′-AT 浓度为 2.0 ~ 6.0 mmol/L 的 SD/-His/-Trp 板上均不生长，表明 2.0 mmol/L 3′-AT 为最优抑制浓度。AH109［pGBKT7-TIP60β］与 AH109［pGBKT7］单克隆在 SD/-Trp/X-α-gal 生长出白色菌落，在含 2.0 mmol/L 3′-AT 的 SD/-His/-Trp/X-α-gal 板与 SD/-Ade/-Trp/X-α-gal 板均不生长，排除了 pGBKT7- TIP60β 激活自身报告基因的能力。

2.4 筛选的阳性克隆基因序列的测定与分析

30 ℃培养 22 d，在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-a-gal 平板上筛选蓝色的阳性克隆。连续重复 3 次酵母菌落 PCR 后，鉴定出同时含有诱饵和文库序列的阳性克隆 32 个。一对一的回复性杂交实验表明，阳性克隆均能生长且呈 α-半乳糖苷酶蓝色显色反应。将排除假阳性后的质粒提取后进行测序分析筛选出 9 种蛋白，其中主要涉及各种酶、激酶以及相关受体（表 1）。

表 1 酵母双杂交系统筛选与 TIP60β 具有相互作用的 9 种蛋白分子

序号	蛋白（Human）
1	Histone deacetylase 7A（HDAC7A）
2	Mouse Double Minute 2（DMD2）
3	B-cell CLL/lymphoma 3（BCL3）
4	Endothelin receptor type A（EDNRA）
5	Androgen receptor（AR）
6	PHD finger protein 17（PHF17）
7	Ataxia Telangiectasia Mutated（ATM）
8	CAMP responsive element binding protein 1（CREB1）
9	orphan steroid receptor BD73

3 讨论

TIP60 组蛋白乙酰基转移酶在染色质的转录活性调控中具有重要作用。TIP60 基因由 14 个外显子组成，其蛋白产物分为 TIP60-1、TIP60-2（TIP60α）、TIP60-3（Tip60β）三种亚型[6, 8]，其中 TIP60α 亚型为目前研究焦点，迄今所获得的 TIP60 功能均是围绕 TIP60α 而进行。TIP60 分子除具有 HATs 活性外，还作为其他多种蛋白大分子复合体的组分，如雄性激素 AR 受体、IL-9 受体、癌基因 Myc，转录因子 STAT3、NF-κB，E2F、p53、CREB、Notch1 以及程序性死亡因子 PDCD5 等参与这些因子转录活性调节，并在信号传导、DNA 损伤修复、细胞周期调节、细胞凋亡等多种进程中发挥重要的生物学效应[9-20]。

蛋白分子间的相互作用在胞内代谢、信号转导等方面起着重要作用，而蛋白分子的结构差异或变化对其自身胞内定位分布，及对与其相互作用蛋白对象的功能具有重要的调控功能。近来研究显示 TIP60β 亚型无论在蛋白分子结构还是在胞内定位分布上，与 TIP60α 都有明显的差异[6]，提示 TIP60β 可能与 TIP60α 具有不同的相互作用蛋白对象，从而行使不同的生物学功能。首先，TIP60α 蛋白中具有脯氨基富集区域，但这一在蛋白间相互作用中具有重要作用的区域在 TIP60β 缺失，这使得 TIP60β 与 TIP60α 很可能具有不同的相互作用分子。其次，TIP60α 定位于胞核，而 TIP60β 却同时具有细胞质与胞核的分布特点，这表明 TIP60β 很可能与部分细胞质蛋白形成蛋白复合物在细胞质行使其功能。因此从蛋白组学角度分析研究 TIP60β 的相互作用蛋白分子，有助于深入拓展 TIP60 分子的生物学功能及作用机制。

为有利于深入研究 TIP60β 的胞内作用，本研究利用酵母双杂交 Gal4-BD 融合的 pGBKT7-TIP60β 诱饵表达载体，首先从成人肝脏 cDNA 文库中筛选出与其具有蛋白间相互作用的与细胞内信号转导功能相关 9 种基因包括酶、激酶以及相关受体。结果表明，核激素孤儿受体（orphan steroid receptor）BD73 与 TIP60β 蛋白之间的相互作用尚不清楚。BD73 又名 Rev-Erb-β；与 Rev-Erb-α 同属于人类核受体超家族 1-D 组中的孤儿受体蛋白，在各种组织和细胞系中广泛表达[20]。两者均拥有保守的锌指结构 DNA 结合及配体结合结构域，且 DNA 结合结构域中含有核定位序列可能导致调控细胞定位的方式上与其他核受体有所区别。功能上两者可能具有甾族激素受体的特性并有转录因子的活

性[21]。目前研究发现 Rev-Erb-a 能够上调 IL-6 和 CoxⅡ 的表达,增强 NF-kB 的反式激活,促 p65 的转位入核[22]。但对 BD73 的调控功能研究并不多见。由此 TIP60β 与其蛋白间的相互作用有可能对 BD73 的转录活性具有调控作用,重点探讨 TIP60β 与 BD73 间的调控将有助于深入拓展两者功能。

此外,我们也注意到 TIP60β 的细胞质与胞核定位特点,这使得 TIP60β 与蛋白相互作用行使功能的部位可能由细胞核扩展到细胞质及细胞质内的细胞器。尽管我们的结果表明,TIP60β 与 TIP60α 具有相同的相互作用蛋白分子如 CREB 及 HDAC7;由于 TIP60 能以生物大分子复合物的结合形式,调控其相互作用分子转录活性,使得 TIP60β/CREB 蛋白复合物作用部位可能比 TIP60α/CREB 复合物更广泛。再者,TIP60α 可通过募集组蛋白去乙酰化酶 HDAC7 与 stat3 形成 TIP60/HDAC7/stat3 蛋白复合体在胞核内抑制信号转导因子 Stat3 介导的转录活性[12]。然而最新研究发现在多种细胞的胞浆细胞器-线粒体中也存在 Stat3(S727)定位,且在线粒体的呼吸链的电子传递中具有重要功能[21]。这些研究提示 TIP60β 与这些蛋白相互作用行使功能的部位可能由细胞核扩展到线粒体,参与呼吸链的功能调节。

通过研究与 TIP60β 相互作用蛋白,我们获得了与一些与 TIP60α 不同的相互作用蛋白分子如 BD73,为 TIP60β 与 TIP60α 结构上的差异所具有的不同作用蛋白假设提供了有利的佐证。同时结合分析 TIP60 目前已有的功能,对于 TIP60β 与 TIP60α 的两者细胞内的亚分布差异对相互作用分子功能的影响需进一步证实,也将是我们下一步深入研究的重点。

参考文献:

[1] Sterner D E, Berger S L. Acetylation of histones and transcription-related factors [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(2): 435 – 459.

[2] Berger S L. Histone modifications in transcriptional regulation [J]. Curr Opin Genet Dev, 2002, 12(2): 142 – 148.

[3] Utley R T, Cote J. The MYST family of histone acetyltransferases [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2003, 274: 203 – 236.

[4] Polevoda B, Sherman F. The diversity of acetylated proteins [J]. Genome Biol, 2002, 3(5): reviews0006.

[5] Sapountzi V, Logan I R, Robson C N. Cellular functions of TIP60 [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(9): 1496 – 1509.

[6] Ran Q, Pereira-Smith O M. Identification of an alternatively spliced form of the Tat interactive protein (Tip60), Tip60(beta) [J]. Gene, 2000, 258(1/2): 141 – 146.

[7] 袁顺宗, 吴军, 易绍萱, 等. 以酵母双杂交系统从成人肝 cDNA 文库中筛选与研究 P311 相互作用蛋白的基因序列[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(14): 1428 – 1431.

[8] Legube G, Trouche D. Identification of a larger form of the histone acetyl transferase TIP60[J]. Gene, 2003, 310: 161 – 168.

[9] Brady M E, Ozanne D M, Gaughan L, *et al*. TIP60 is a nuclear hormone receptor coactivator [J]. J Biol Chem, 1999, 274 (25): 17599 – 17604.

[10] Sliva D, Zhu Y X, Tsai S, *et al*. TIP60 interacts with human interleukin-9 receptor alpha-chain[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 263(1): 149 – 155.

[11] Awasthi S, Sharma A, Wong K, *et al*. A human T-cell lymphotropic virus type 1 enhancer of Myc transforming potential stabilizes Myc-TIP60 transcriptional interactions[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(14): 6178 – 6198.

[12] Xiao H, Chung J, Kao H Y, *et al*. Tip60 is a co-repressor for STAT3 [J]. J Biol Chem, 2003, 278(13): 11197 – 11204.

[13] Dechend R, Hirano F, Lehmann K, *et al*. The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF-kappaB/Rel and nuclear co-regulators [J]. Oncogene, 1999, 18(22): 3316 – 3323.

[14] Legube G, Linares L K, Tyteca S, *et al*. Role of the histone acetyl transferase TIP60 in the p53 pathway[J]. J Biol Chem, 2004, 279 (43): 44825 – 44833.

[15] Taubert S, Gorrini C, Frank S R, *et al*. E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the TIP60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(10): 4546 – 4556.

[16] Col E, Caron C, Chable-Bessia C, *et al*. HIV-1 Tat targets TIP60 to impair the apoptotic cell response to genotoxic stresses[J]. EMBO J, 2005, 24(14): 2634 – 2645.

[17] Gavaravarapu S, Kamine J. Tip60 inhibits activation of CREB protein by protein kinase A [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 269 (3): 758 – 766.

[18] Kim M Y, Ann E J, Kim J Y, *et al*. Tip60 histone acetyltransferase acts as a negative regulator of Notch1 signaling by means of acetylation [J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(18): 6506 – 6519.

[19] Ikura T, Ogryzko V V, Grigoriev M, *et al*. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis[J]. Cell, 2000, 102(4): 463 – 473.

[20] XU L, Chen Y, Song Q, *et al*. PDCD5 interacts with Tip60 and functions as a cooperator in acetyltransferase activity and DNA damage-induced apoptosis[J]. Neoplasia, 2009, 11(4): 345 – 354.

[21] Wegrzyn J, Potla R, Chwae Y J, *et al*. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration[J]. Science, 2009, 323(5915): 793 – 797.

[22] Dussault I, Giguere V. Differential regulation of the N-myc proto-oncogene by ROR alpha and RVR, two orphan members of the superfamily of nuclear hormone receptors [J]. Mol Cell Biol, 1997, 17 (4): 1860 – 1867.

(收稿:2010-01-02;修回:2010-02-28)

(编辑 王 红)