

AWP1 抑制 TNF α 诱导的 NF- κ B 转录活性

穆蕊¹ 高彦飞¹ 陈亮¹ 李腾¹ 甄诚¹ 于鸣² 巩伟丽¹ 潘欣¹ 夏晴^{1*}

(国家生物医学分析中心¹,北京 100850; 军事医学科学院基础医学研究所细胞免疫学教研室²,北京 100850)

摘要 AWP1 含有 A20 样锌指蛋白结构域。在人乳腺文库中克隆了 AWP1 cDNA 序列。双荧光报告基因检测系统证明过表达 AWP1 抑制 TNF α 诱导的 NF- κ B 转录激活,并且 AWP1 与 TNF α 受体复合物中的 TRAF2、IKK γ 存在外源相互作用,为 AWP1 抑制 TNF α 信号通路的机制研究提供线索。

关键词 AWP1 TNF α NF- κ B

中图分类号 Q579.13; **文献标志码** A

A20 是一个胞浆锌指蛋白,具有负向调节 NF- κ B 的功能^[1]。A20 羧基端包含 7 个重复的 C2/C2 锌指结构,其发挥泛素连接酶活性,可以对 RIP 进行 48 位多泛素链修饰,促使 RIP 发生泛素蛋白酶体通路降解,最终抑制 NF- κ B 通路激活^[2,3]。AWP1 同样含有 A20 样锌指蛋白结构域^[4],已有文献报道过表达 AWP1 抑制 NF- κ B 的转录活性,但其抑制机制不清楚^[5]。本文在人乳腺文库中克隆了 AWP1 基因,并验证过表达 AWP1 抑制 TNF α 诱导的 NF- κ B 转录激活的现象,免疫沉淀实验结果表明 AWP1 与 TRAF2、IKK γ 存在外源相互作用,为其抑制 TNF α 信号通路的机制研究提供线索。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

293T 细胞(人胚胎肾细胞)采用 DMEM + 10% 胎牛血清(Hyclone),培养于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中。

1.2 AWP1 真核表达载体的构建

根据 NCBI 公布的 AWP1 cDNA 序列,设计 AWP1 PCR 扩增引物。引物序列为: F-5'CGCGG

ATCCATGGCTCAAGAAAC3'; R-5'CCGCTCGAGTCA AATCTTTTGG 3'。以人乳腺文库为模板,利用 pfu 酶扩增 AWP1 的 cDNA 序列。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30 次循环。用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho*I 双酶切 PCR 片段及 pcDNA3.0-Flag 载体,将回收的片段与载体连接,转化 *E. coli* DH5 α 。双酶切鉴定后,进行测序。将测序正确的 pcDNA 3.0-Flag-AWP1 转染 293T 细胞,通过 Western Blot 鉴定质粒表达。

1.3 AWP1 对 TNF α 诱导的 NF- κ B 转录活性影响

293T 细胞转染 pNF- κ B-Luc 报告基因质粒和海肾荧光素酶质粒,及 0 μ g、0.1 μ g、0.5 μ g Flag-AWP1。细胞转染后 24 h 加入 TNF α (10 ng/mL) 刺激,利用荧光素酶检测系统(promega 公司)测定 NF- κ B 的转录活性。

1.4 AWP1 与 TRAF2、TRAF3、IKK α 、IKK γ 外源相互作用检测

293T 细胞中 Flag-AWP1 分别与 HA 空载体、HA-TRAF2、HA-TRAF3、HA-IKK α 、HA-IKK γ 共转染,转染 48 h 后使用与 Flag 抗体偶联的珠子进行免疫沉淀实验及 Western Blot 检测。

2 结果

2.1 AWP1 真核表达载体构建及表达

pcDNA3.0-Flag-AWP1 质粒经过 *Bam*H I 和

2011 年 3 月 22 日收到 国家自然科学基金(30900754)资助

第一作者简介:穆蕊(1982—),女,博士研究生。

* 通讯作者简介:夏晴,E-mail: xiaqingduke@gmail.com。

*Xho*I 双酶切,得到大小在(750—500) bp 之间的基因插入片断(图 1),测序结果显示,pcDNA3.0-Flag-AWP1 编码区序列完全正确。在 293T 细胞中外源转染不同剂量的质粒,结果如图 2 所示,证明 pcDNA3.0-Flag-AWP1 蛋白质表达正常。

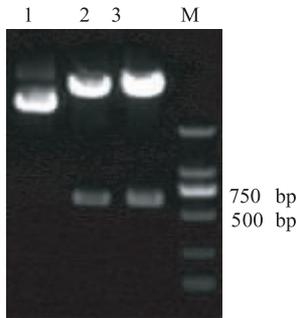


图 1 pcDNA3.0-Flag-AWP1 酶切鉴定
1—酶切前,2,3—酶切后,M—Marker

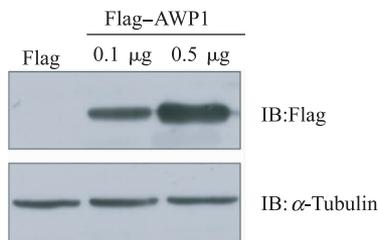


图 2 pcDNA3.0-Flag-AWP1 表达鉴定

2.2 AWP1 抑制 TNF α 诱导的 NF- κ B 转录活性

利用双荧光报告系统,检测 AWP1 对 TNF α 诱导的 NF- κ B 转录活性影响。如图 3 所示,过表达 AWP1 可以抑制 TNF α 诱导的 NF- κ B 的激活并且呈剂量依赖的趋势,这种抑制 NF- κ B 转录活性的现象与文献报道一致^[5]。

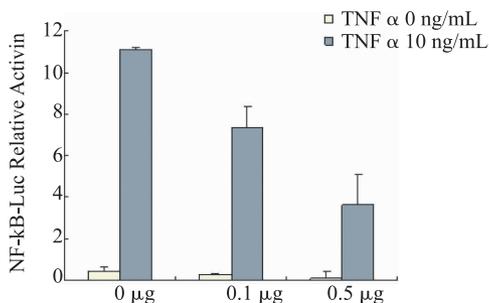


图 3 AWP1 抑制 TNF α 诱导的 NF- κ B 转录活性

2.3 AWP1 与 TRAF2、IKK γ 存在外源相互作用

为寻找 AWP1 抑制 TNF α 诱导的 NF- κ B 转录激活的分子机制,采用免疫沉淀实验检测 AWP1 与 TNF α 受体家族相关信号通路重要蛋白质的相互作用。结果表明 AWP1 与 TRAF2、IKK γ 存在外源相互作用(图 4),为 AWP1 抑制 TNF α 信号通路的机制研究提供线索。

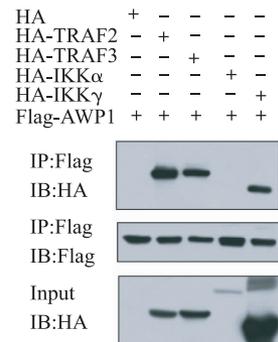


图 4 AWP1 与 TRAF2/IKK γ 外源相互作用检测

3 讨论

AWP1 是含有 A20 样锌指结构的蛋白质,其与 A20 一样可以抑制 TNF α 信号通路的激活。A20 通过两个对泛素进行编辑的结构域的协调作用抑制 TNF α 信号通路,包括去 K-63 位泛素连接的 DUB 结构域和 K-48 位泛素连接酶活性的 C2/C2 锌指结构域。AWP1 同样含有 A20 样锌指结构域,因此提示 AWP1 抑制 TNF α 信号通路的分子机制可能与 A20 相类似。同时有文献报道 AWP1 可以与多泛素链结合^[6]。TRAF2 和 IKK γ 是 TNF α 信号通路的重要组分,调控受体的信号向下游信号分子 NF- κ B 传递,文中采用免疫沉淀实验证明 AWP1 与 TRAF2 和 IKK γ 存在外源相互作用,提示 TRAF2/IKK γ 有可能是 AWP1 的作用位点。但 AWP1 是否有其他的作用位点,其抑制作用是否依赖于 A20 样锌指结构域等问题仍需要进一步的探索。

参 考 文 献

- 1 Lee E G, Boone D L, Chai S, *et al.* Failure to regulate TNF-induced NF- κ B and cell death responses in A20-deficient mice. *Science*,

- 2000;289;2350—2354
- 2 Oipari A W Jr, Boguski M S, Dixit V M. The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. *J Biol Chem*, 1990; 265:14705—14708
 - 3 Wertz I E, O'Rourke K M, Zhou H, *et al.* De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*, 2004; 430:694—699
 - 4 Duan W, Sun B, Li T W, *et al.* Cloning and characterization of AWP1, a novel protein that associates with serine/threonine kinase PRK1 in vivo. *Gene*, 2000; 256:113—121
 - 5 Diatchenko L, Romanov S, Malinina I, *et al.* Identification of novel mediators of NF-kappaB through genome-wide survey of monocyte adherence-induced genes. *J Leukoc Biol*, 2005; 78:1366—1377
 - 6 Fenner B J, Scannell M, Prehn J H. Identification of polyubiquitin binding proteins involved in NF-kappaB signaling using protein arrays. *Biochim Biophys Acta*, 2009; 1794:1010—1016

The Inhibition of TNF α -induced NF- κ B Transcriptional Activity by AWP1

MU Rui¹, GAO Yan-fei¹, CHEN Liang¹, LI Teng¹, ZHEN Cheng¹, YU Ming²,
GONG Wei-li¹, PAN Xin¹, XIA Qing^{1*}

(National Center of Biomedical Analysis¹, Beijing 100850, P. R. China; Department of Molecular Immunology, Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences², Beijing 100850, P. R. China)

[**Abstract**] AWP1 is a A20-like zinc finger domain containing protein. Here AWP1 cDNA sequence using human breast cDNA library is cloned, overexpression of AWP1 could inhibit TNF α -induced NF- κ B transcriptional activation. Moreover AWP1 interact with TRAF2/IKK γ which are TNF α receptor complex component.

[**Key words**] AWP1 TNF α NF- κ B

(上接第 4135 页)

Construction and Expression of CUEDC2 Mutants in BL21 (DE3) and Sf9 Cells

WANG Yu-bo, GAO Yan-fei, LI Teng, CHANG Yan, MU Rui, XU Jin-jing, WANG Qian-yi,
GONG Wei-li, YU Ming, LI Hui-yan*

(National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850, P. R. China; Beijing Institute of Basic Medicine, Beijing 100850, P. R. China)

[**Abstract**] To generate a serious of mutated CUEDC2 expression clones, and to testify the expression of them in BL21 (DE3) and Sf9 cells, the primers were designed according to the CDS of CUEDC2. A serious of CUEDC2 mutants were cloned to expression vectors such as pFastBac1-Flag-N, pFastBac-HTA and pET28a and transformed into the host cells *E. coli* BL21 (DE3) and DH10Bac respectively. The expressed CUEDC2 mutant proteins in BL21 (DE3) were purified by the His-tag affinity chromatography and tested by SDS-PAGE. After isolation of recombinant bacmid DNA and transfection of Sf9 cells with them, the recombinant proteins were testified by Western-Blot. It is resulted that CUEDC2 mutants are successfully cloned to three expression vectors and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and Sf9 cells. It is concluded that recombinant proteins are expressed in *E. coli* and Sf9 cells, which would be useful for the functional and structural research of CUEDC2.

[**Key words**] CUEDC2 expression Sf9 mutant