

网络出版时间: 2019-1-3 17:25 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20181230.1809.006.html>

ARAP3-VAV2 新结合方式鉴定与功能分析

徐光生, 许文娟, 宋雪燕, 王峰松

摘要 目的 探索腺苷二磷酸糖基化因子 6 的鸟苷三磷酸酶激活蛋白 3 (ARAP3) 与 VAV 鸟苷交换因子 2 (VAV2) 新的作用方式及可能的生理功能。方法 通过构建 VAV2 和 ARAP3 的突变体, 在人宫颈癌细胞 (HeLa 细胞) 中共转 VAV2 的野生型和 ARAP3 的突变体或者在人胚胎肾细胞 (HEK-293T 细胞) 中共转 ARAP3 的野生型和 VAV2 的突变体, 免疫共沉淀揭示二者的相互作用方式; 在 HeLa 细胞中分别过表达 VAV2 和 ARAP3 野生型或突变体, 荧光标记实验观察它们对纤维状肌动蛋白 (F-actin) 的调控作用。结果 除了肉瘤基因同源 2 (SH2) 结构域以外, VAV2 的 N 端 (1-660 氨基酸) 区域亦能介导其与 ARAP3 的相互作用, HeLa 细胞中过表达 VAV2 和 ARAP3 均能影响细胞内 F-actin 的形成。结论 VAV2 多个结构域均能介导其与 ARAP3 相互作用, 两者之间的相互作用可能是促进大鼠肉瘤同源癌基因 A (RhoA) 活性的动态变化或循环, 从而调节细胞内 F-actin 动态性以及肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。

关键词 ARAP3; VAV2; 磷酸化; F-actin

中图分类号 Q 28

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)01-0027-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.01.006

小鸟苷三磷酸 (guanosine triphosphate, GTP) 酶 主要由 Ras、Rho、Rab、Arf 和 Ran 等家族蛋白组成, 而大鼠肉瘤同源癌基因 (rat sarcoma homologous onco-

genes, Rho) 家族蛋白包括大鼠肉瘤同源癌基因 A (rat sarcoma homologous oncogene A, RhoA)、Cdc42、Rac1、Rac2 等在内的二十多个成员, 它们参与了多种细胞生理过程, 包括纤维状肌动蛋白 (fibrous actin, F-actin) 的动态组装、细胞形态可塑性调控、肿瘤细胞的发生和转移等^[1]。细胞内, 典型的小 GTP 酶始终处于 GTP 结合形式和鸟苷二磷酸 (guanosine diphosphate, GDP) 结合形式的动态平衡中, GTP 酶激活蛋白 (GTPase-activating proteins, GAPs) 介导了其从 GTP 结合形式向 GDP 结合形式的转换, 而鸟苷交换因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF) 的作用则相反, 促进了 GDP 非活性形式向 GTP 活性形式的转换^[1]。

RhoA 在细胞内的活性受到包括腺苷二磷酸糖基化因子 6 的鸟苷三磷酸酶激活蛋白 3 (adenosine diphosphate ribosylation factor 6 guanosine triphosphatase activating protein 3, ARAP3)、VAV 鸟苷交换因子 2 (VAV guanine nucleotide exchange factor 2, VAV2) 等多个分子的综合调控。VAV 家族蛋白 (包括 VAV1、VAV2 和 VAV3) 是一类 Rho 家族小 GTP 酶的 GEF, 含有多个功能结构域, 其催化活性主要由 N 端的 Dbl 同源 (Dbl-homology, DH) 结构域介导, 并通过自身多个位点的磷酸化水平调控了 RhoA 的活性^[2-3]。ARAP3 是 RhoA 和腺苷二磷酸糖基化因子 6 (adenosine diphosphate ribosylation factor 6, Arf6) 小分子的特异性 GTP 酶激活蛋白 (GTPase-activating protein, GAP), 其活性受到磷脂酰肌醇 (3, 4, 5) -三磷酸 (Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-trisphos-

2018-07-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (编号: 31271518)

作者单位: 安徽医科大学生命科学院生物学系, 合肥 230032

作者简介: 徐光生, 男, 硕士研究生;

王峰松, 男, 副教授, 责任作者, E-mail: fengsongw@ahmu.edu.cn

associated with tumor size, lymph metastasis and TNM staging. Functional studies showed that HOTTIP over-expression promoted cell proliferation, while HOTTIP silencing induced cell apoptosis. Silencing HOTTIP expression could promote the increase of bax and caspase-3 active fragments, inhibit the expression of bcl-2 and induce apoptosis. In addition, the basestar software showed that sequence of HOTTIP contain potential binding sites for miR-137, and HOTTIP expression is negative correlated with miR-137 expression in lung cancer tissues. **Conclusion** HOTTIP acts as an endogenous competing sponge of miR-137, which may attenuate the antitumor activities of miR-137 and promote lung tumorigenesis and development.

Key words lung cancer; HOTTIP; miR-137

phate, PtdIns(3,4,5)P₃ 分子的调控^[4]。该研究根据 VAV2 的结构特点构建了一系列缺失突变体,通过免疫共沉淀方法鉴定出了 VAV2 与 ARAP3 新的结合方式,并初步分析了其可能的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系、菌株、克隆载体 HeLa、HEK-293T 细胞均购自美国 ATCC 公司; TOP10 大肠杆菌感受态细胞购自北京康为世纪生物科技有限公司; pEG-FP-C2、pEGFP-N3、pCMV-3xFLAG-myc 等载体购自美国 BD 和 Sigma 公司。

1.1.2 主要试剂 GFP 单克隆抗体购自美国 BD Biosciences 公司; FLAG-M2 beads 和 FLAG 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司; ECL 发光显色液购自美国 Thermo 公司; 硝酸纤维素膜购自美国 GE 公司; 二抗购自美国 Jackson 公司; DMEM、Opti-MEM 培养基、Lipofectamine™ 2000 均购自美国 Invitrogen 公司; 血清购自美国 Hyclone 公司; 限制性内切酶购自日本 TaKaRa 公司; 质粒小量制备试剂盒、PCR 产物回收试剂盒购自美国 Promega 公司; LB 培养基配制试剂及其他溶液配制试剂均购自上海生工生物工程股份有限公司。

1.1.3 主要仪器 恒温培养振荡器(型号: ZWY-1102C) 购自上海智诚分析仪器制造有限公司; 超净工作台(型号: SW-CJ-1D) 购自苏州净化设备有限公司; 二氧化碳培养箱(型号: NU-5810E)、生物安全柜(型号: NU-425-400S) 购自美国 NUAIRE 公司; 凝胶成像仪(型号: 1600)、化学发光成像仪(型号: Fine-do X6) 购自上海天能科技有限公司; 倒置荧光显微镜(型号: DeltaVision) 购自美国 GE 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建 从美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) 数据库查询到目的蛋白的人源全长 DNA 序列, 根据全长序列, 利用 Omiga 2.0 软件设计引物, 引物由深圳华大基因科技服务有限公司合成。以 cDNA 为模板, 根据日本 TaKaRa 公司提供的 PrimeSTAR 配制反应体系进行 PCR 扩增, 产物通过凝胶电泳切胶回收, 并用 TaKaRa 公司的限制性内切酶进行酶切目的片段和载体, 产物由凝胶回收试剂盒回收纯化, 用 T4 DNA 连接酶于常温水浴反应 4 h。连接产物进行质粒转化、涂板, 37 °C 培养箱倒置培养过夜, 挑克隆于相应抗性的 2 ml 溶菌肉汤(lysogeny broth,

LB) 培养基摇菌过夜, 用北京康为世纪生物科技有限公司的质粒小量制备试剂盒进行质粒提取, 提取的质粒进行后续的质粒酶切鉴定, 并选取对应条带正确的质粒取样送测序。

1.2.2 质粒小量制备 将构建好的质粒样品 20 倍稀释后, 取 1 μl 进行转化、涂板, 37 °C 培养箱倒置培养过夜。挑取单克隆接种于 12 ml LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 摇菌过夜, 于 1.5 ml 离心管中收集细菌, 按 Promega 质粒小量制备试剂盒操作步骤提取质粒。

1.2.3 细胞培养 HeLa、HEK-293T 细胞均培养于含 10% (V/V) 血清的 DMEM 培养基(含青霉素、链霉素双抗), 37 °C、5% CO₂ 的培养箱培养。

1.2.4 免疫共沉淀 采用脂质体或磷酸钙转染的方法将质粒瞬时转入 HeLa 或 HEK-293T 细胞中, 24 h 后使用不同的方法处理并收集细胞, 然后使用裂解液(Hepes 50 mmol/L, TRIS-HCl 20 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, pH 7.4, 0.1% Triton X-100, mammal cocktail 1:500 (V/V), PMSF 1 mmol/L) 裂解细胞。12 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 取上清液与 FLAG-M2 beads 混合于 4 °C 孵育 2 h, 裂解液洗涤 4 次后于上样缓冲液中 100 °C 煮沸 5 min。样品用 10% 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离, 并使用特异性抗体进行免疫印迹检测。

1.2.5 荧光标记实验 使用胰酶消化细胞, 将细胞悬液滴加于盖玻片上, 过夜培养后使用 Lipofectamine™ 2000 进行转染, 24 h 后使用 2% 甲醛固定 5 min, 再用含有 0.1% Triton X-100 的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS) 处理 3 min, 含有 0.025% Tween-20 的 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。加 1% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA) 封闭 45 min 后, 加罗丹明偶联鬼笔环肽染色 30 min, 同样洗涤 3 次, 用 4,6-二脒基-2-苯基吲哚(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染细胞核 1 min, 再次洗涤 3 次后封片, 显微镜观察。

2 结果

2.1 ARAP3 与 VAV2 野生型和突变体重组质粒的构建 ARAP3 与 VAV2 都是含有多结构域分子, ARAP3 含有 Arf-GAP、Rho-GAP、普列克底物蛋白同源(pleckstrin-homology, PH) 等结构域; VAV2 含有钙调蛋白同源(calponin-homology, CH)、DH、

PH、N 端肉瘤基因同源 3 (N-sarcoma gene homology 3, N-SH3)、肉瘤基因同源 2 (sarcoma gene homology 2, SH2) 和 C-SH3 等结构域。根据结构特点,设计并构建了野生型和突变体(定点或缺失突变体) 重组质粒,见图 1。以 cDNA 为模板,设计引物,进行 PCR 扩增,PCR 产物经过限制性内切酶酶切并连接到载体上,其中 ARAP3 野生型及突变序列连接到

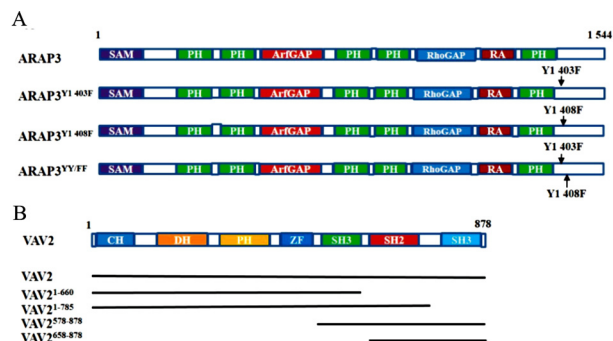


图1 ARAP3 与 VAV2 野生型和突变体的结构

pEGFP-C2 载体,VAV2 野生型及突变序列连接到 pEGFP-N3 载体,经转化、涂板、摇菌等步骤,提取的质粒进行酶切验证和测序,测序结果使用 Omiga 2.0 软件比对,插入片段序列与目的序列一致。见图 2~4。

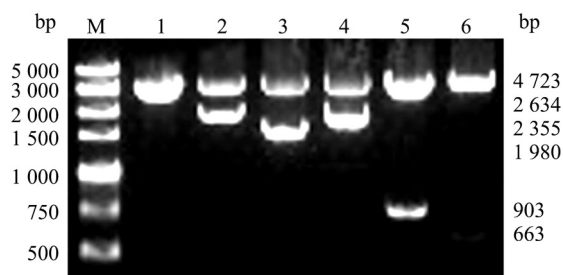


图2 EcoR I 和 Sal I 双酶切质粒电泳图

M: Marker; 1: pEGFP-N3 空载体质粒酶切; 2: GFP-VAV2 质粒酶切; 3: GFP-VAV2¹⁻⁶⁶⁰ 质粒酶切; 4: GFP-VAV2¹⁻⁷⁸⁵ 质粒酶切; 5: GFP-VAV2⁵⁷⁸⁻⁸⁷⁸ 质粒酶切; 6: GFP-VAV2⁶⁵⁸⁻⁸⁷⁸ 质粒酶切

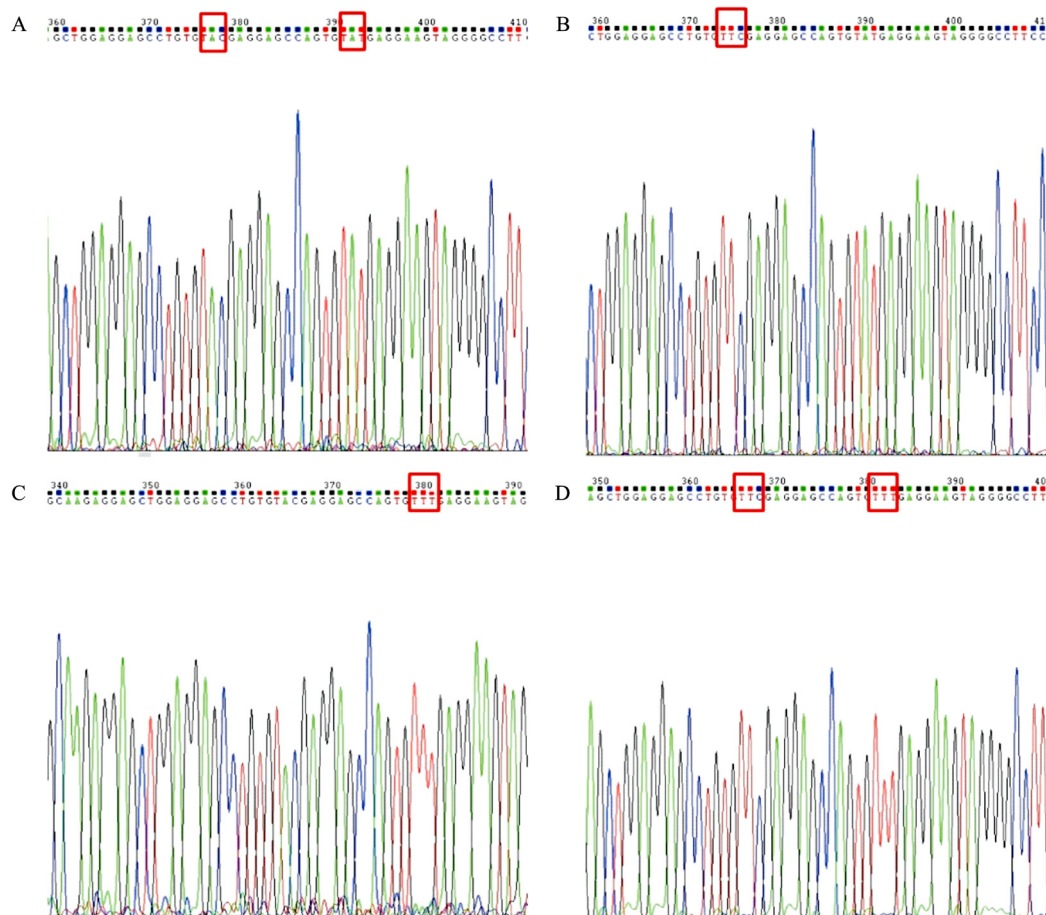


图3 质粒正向测序图谱(部分截图)

A: GFP-ARAP3 序列4 191 ~ 4 241 bp; B: GFP-ARAP3^{Y1403F} 序列4 192 ~ 4 244 bp; C: GFP-ARAP3^{Y1408F} 序列4 182 ~ 4 234 bp; D: GFP-ARAP3^{YY/FF} 序列4 190 ~ 4 242 bp; 红框代表磷酸化位点(第1 403和1 408位酪氨酸) 或其突变位点

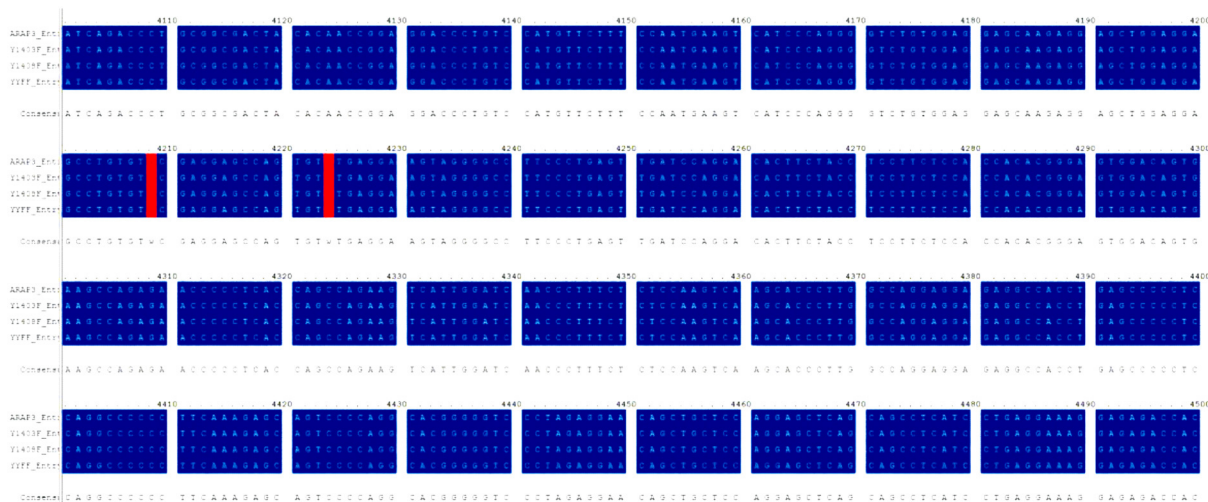


图4 质粒测序结果比对
红色为突变位点

2.2 EGF 刺激诱导的酪氨酸磷酸化对 ARAP3 与 VAV2 结合能力的影响 在 HeLa 细胞中使用脂质体法共转染 FLAG-VAV2 野生型和 GFP-ARAP3 野生型及其定点突变体, 24 h 后饥饿处理细胞 6 h, 然后使用表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 刺激 10 min 后收集细胞进行免疫共沉淀实验, 免疫印迹证实了在 HeLa 细胞中, ARAP3 的第 1 403 酪氨酸和第 1 408 位酪氨酸的磷酸化参与了 VAV2 与 ARAP3 之间结合能力的调节, 同时发现第 1 403 位酪氨酸的调控能力表现得更加明显。见图 5。

2.3 VAV2 与 ARAP3 新结合方式的发现 为进一步研究 VAV2 和 ARAP3 两者之间精细的相互作用方式, 使用磷酸钙法将 GFP-VAV2 野生型及其缺失突变体分别与 FLAG-ARAP3 质粒共转入 HEK-293T 细胞中, 24 h 后收集细胞进行免疫共沉淀实验, 免疫印迹揭示了除了 SH2 结构域 (673 - 767 氨基酸) 以外, VAV2 的 N 端区域 (含 1-660 氨基酸) 也能与 ARAP3 相互作用, 并且发现同时含有 N-SH3 和 SH2 结构域的缺失突变体 (VAV2¹⁻⁷⁸⁵ 和 VAV2⁵⁷⁸⁻⁸⁷⁸) 与 ARAP3 的结合能力明显强于仅含有其中一个结构域的缺失突变体 (VAV2¹⁻⁶⁶⁰ 和 VAV2⁶⁵⁸⁻⁸⁷⁸)。见图 6。

2.4 ARAP3 的野生型和突变体的过表达对 F-actin 的影响 ARAP3 作为 RhoA 和 Arf6 GTP 酶的特异性 GAP, 其在细胞中过量表达会促进应力纤维 (stress fibers) 的减少。将 GFP-ARAP3 野生型及其模拟酪氨酸非磷酸化突变体利用 LipofectamineTM 2000 分别转染 HeLa 细胞, 24 h 后使用 2% 甲醛固

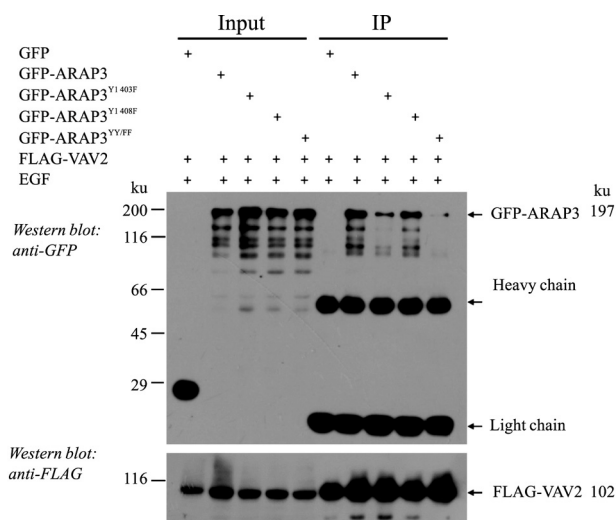


图5 EGF 刺激诱导的酪氨酸磷酸化参与了对 ARAP3 与 VAV2 间结合能力的调控

Input: 未与 FLAG-M2 beads 结合的细胞裂解液; IP: 免疫共沉淀样品

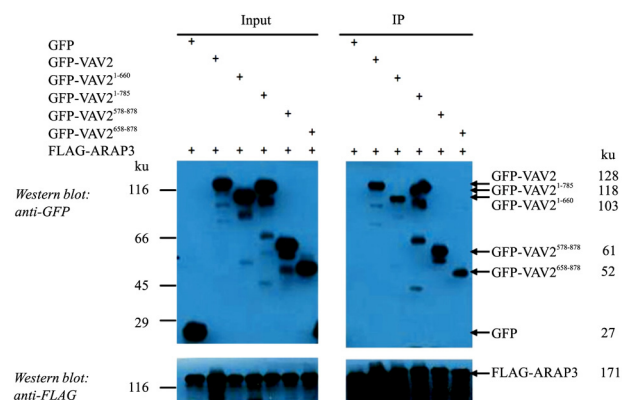


图6 VAV2 与 ARAP3 新结合区域的筛选

Input: 未与 FLAG-M2 beads 结合的细胞裂解液; IP: 免疫共沉淀样品

定 5 min, 并对 actin 进行特异性标记, 荧光标记实验显示: ARAP3 过表达可促进 HeLa 细胞 F-actin 形成的减少, 且这种功能不依赖于其第 1 403 和第 1 408 位酪氨酸的磷酸化。见图 7。

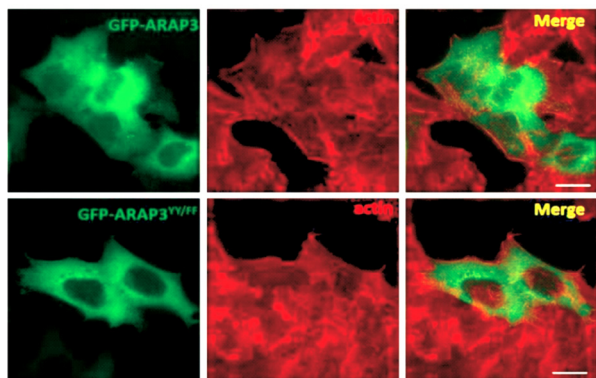


图 7 ARAP3 的野生型和突变体的过表达

对 F-actin 形成的影响 荧光标记 $\times 600$

绿色: GFP 标签融合蛋白; 红色: 罗丹明偶联的鬼笔环肽对 actin 骨架的染色; Merge: 组合

2.5 过表达 VAV2 的野生型和突变体对 F-actin 动态组装的影响 将 GFP-VAV2 野生型及其突变体利用 LipofectamineTM2000 转染 HeLa 细胞, 24 h 后固定细胞, 对 F-actin 和细胞核进行染色, 结果显示 VAV2 的过表达在一定程度上可以促进 F-actin 的形成, 并且仅含有 N-SH3、SH2 和 C-SH3 结构域 (585–878 氨基酸) 的突变体相比野生型及其他突变体 F-actin 的形成减少。因此, F-actin 形成的增加可能依

赖于 VAV2 的 N 端 DH 结构域的催化活性, 即 GEF 活性。见图 8。

3 讨论

基于前期对 ARAP3 和 VAV2 相互作用的作用区域和机制的解析, 本研究证实了 VAV2 蛋白的 N-SH3 结构域可能介导了与 ARAP3 新的相互作用方式, 且这种相互作用可能调控了 F-actin 在细胞内的动态组装。VAV2 在多种肿瘤细胞和组织中高表达, 包括肺癌、甲状腺乳头状癌和乳腺癌等, 参与了肿瘤细胞丝状伪足、片状伪足以及膜褶皱的形成, 调控细胞迁移和侵袭^[5-7]。作为大鼠肉瘤相关 C3 肉毒杆菌毒素底物 1 (rat sarcoma-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1) 和 RhoA GTP 酶的特异性 GEF, VAV2 通常与多种分子相互作用来调控 GTP 酶的活性, 其 SH2 和 SH3 结构域主要介导与其他分子之间的相互作用^[8]。

已有研究^[8]表明 ARAP3 是 VAV2 的一个相互作用分子, 并且 VAV2 的 SH2 结构域能够特异性地识别 ARAP3 磷酸化的第 1403 和第 1408 位酪氨酸。本研究显示, 在 ARAP3 酪氨酸处于非磷酸化状态时, 两者之间仍然有一定的结合能力, 这提示除了已有的结合位点和方式以外, 在 ARAP3 和 VAV2 之间可能还存在其他的结合方式。为了进一步探索更多的 VAV2 与 ARAP3 的结合位点, 构建了 VAV2 的一系列缺失突变体, 利用免疫共沉淀和免疫印迹实验, 发现在 VAV2 的 N-SH3 区域仍然存在一个可能与

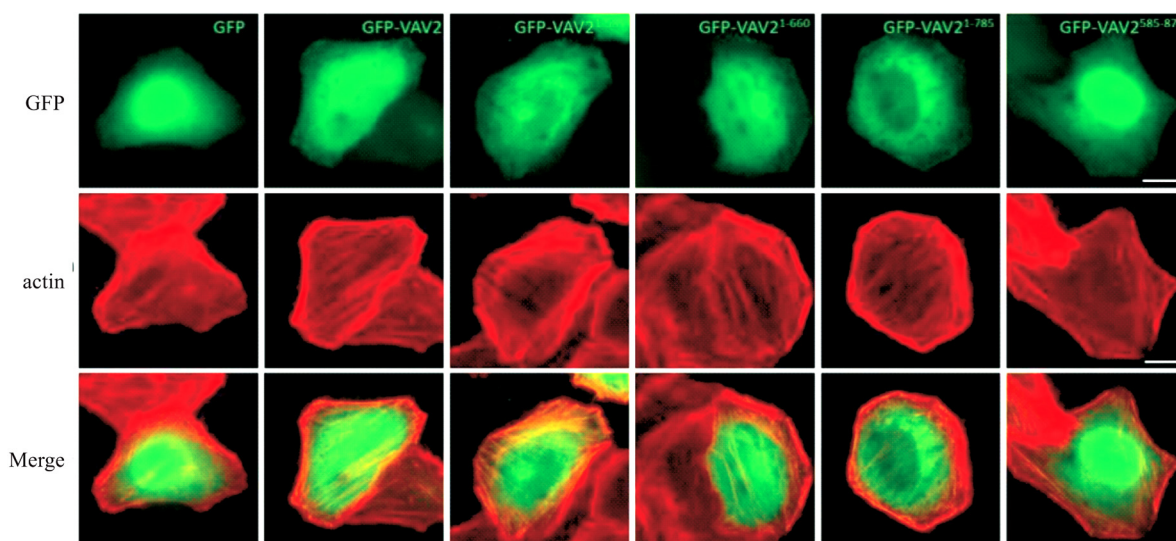


图 8 VAV2 野生型和突变体的过表达对 F-actin 动态组装的影响 荧光标记染色 $\times 600$

绿色: GFP 标签融合蛋白; 红色: 罗丹明偶联的鬼笔环肽对 actin 骨架的染色; Merge: 组合

ARAP3 的结合位点。VAV2 除了 SH2 以外还可能通过其 N 端 SH3 结构域与 ARAP3 结合,SH3 结构域一般介导与靶蛋白的多聚脯氨酸基序相结合,根据 ARAP3 氨基酸序列分析,发现其含有多个多聚脯氨酸基序(如 81 ~ 98、129 ~ 139、387 ~ 395 和 1 462 ~ 1 470 氨基酸区段),可能正是这些多聚脯氨酸基序介导了 ARAP3 与 VAV2-SH3 结构域之间的结合。

作为 RhoA 活性调节的重要分子,ARAP3 和 VAV2 在 F-actin 动态组装调控中具有重要功能。系列实验结果进一步证实两者确实具有对胞内 F-actin 动态性的调节作用。推测 ARAP3 与 VAV2 之间的相互作用可能不会影响它们各自的 GEF 和 GAP 的活性,两者之间的相互作用更大程度上可能是一起协调共同促进 RhoA-GTP 活性形式和 RhoA-GDP 非活性形式在细胞内的不断转换和循环,从而调节肿瘤细胞的迁移和侵染能力。当然,VAV2 与 ARAP3 不同相互作用方式之间是否具有调节关系以及它们之间结合的生理学功能仍有待进一步地研究。

参考文献

- [1] Cromm P M, Spiegel J, Grossmann T N. Direct modulation of small GTPase activity and function [J]. *AngewChemInt Ed Engl*, 2015,54(46): 13516 - 37.
- [2] Peng F, Zhang B, Ingram A J, et al. Mechanical stretch-induced RhoA activation is mediated by the RhoGEF Vav2 in mesangial cells [J]. *Cell Signal*, 2010,22(1): 34 - 40.
- [3] Bustelo X R. Vav family exchange factors: an integrated regulatory and functional view [J]. *Small GTPases*, 2014,5(2): 9.
- [4] Krugmann S, Anderson K E, Ridley S H, et al. Identification of ARAP3, a novel PI3K effector regulating both Arf and Rho GTPases, by selective capture on phosphoinositide affinity matrices [J]. *Mol Cell*, 2002,9(1): 95 - 108.
- [5] Havel L S, Kline E R, Salgueiro A M. Vimentin regulates lung cancer cell adhesion through a VAV2-Rac1 pathway to control focal adhesion kinase activity [J]. *Oncogene*, 2015,34(15): 1979 - 90.
- [6] Li J J, Sun Z J, Yuan Y M, et al. EphB3 stimulates cell migration and metastasis in a kinase-dependent manner through Vav2-Rho GTPase axis in papillary thyroid cancer [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(3): 1112 - 21.
- [7] Rosenberg B J, Gil-Henn H, Mader C C, et al. Phosphorylated cortactin recruits Vav2 guanine nucleotide exchange factor to activate Rac3 and promote invadopodial function in invasive breast cancer cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2017,28(10): 1347 - 60.
- [8] Wu B, Wang F, Zhang J, et al. Identification and structural basis for a novel interaction between Vav2 and Arap3 [J]. *J StructBiol*, 2012,180(1): 84 - 95.
- [9] Cromm P M, Spiegel J, Grossmann T N. Direct modulation of small GTPase activity and function [J]. *AngewChemInt Ed Engl*,

Identification and functional analysis of new ARAP3 and VAV2 interaction model

Xu Guangsheng, Xu Wenjuan, Song Xueyan, et al

(Dept of Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the new interaction model between adenosine diphosphate ribosylation factor 6 guanosine triphosphatase activating protein 3 (ARAP3) and VAV guanine nucleotide exchange factor 2 (VAV2), further to analyze their possible physiological functions. **Methods** Eukaryotic expression wild type and mutation plasmids of ARAP3 and VAV2 were constructed respectively. The co-immunoprecipitation assays with transfected human cervical carcinoma cells (HeLa cells) and human embryonic kidney cells (HEK-293T cells) were used to detect the interaction model between ARAP3 and VAV2. The fluorescence labeling experiments were used to test the effect of overexpression of ARAP3, VAV2 and their mutants on fibrous actin (F-actin) assembly. **Results** N-terminal region of VAV2(1-660aa) could also mediate its interaction with ARAP3 besides sarcoma gene homology 2 (SH2) domain of VAV2. Overexpression of VAV2 and its mutants in HeLa cell respectively could regulate the F-actin organization as same as ARAP3. **Conclusion** Several domains of VAV2 mediate its interaction with ARAP3, which may promote the dynamic changes of rat sarcoma homologous oncogene A (RhoA) activity and F-actin assembly, even cell migration and cell invasion.

Key words ARAP3; VAV2; phosphorylation; F-actin