

研究简讯

睾丸生殖细胞瘤易感基因 **Dnd1** 互作蛋白质的筛选与鉴定*张菁¹ 罗畅² 亦凤² 张健^{2**} 彭小宁^{1**}

1. 湖南师范大学医学院, 长沙 410006; 2. 湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081

摘要 小鼠睾丸生殖细胞瘤(testicular germ cell tumour, TGCT)易感基因 *Dnd1* 属于 RNA 结合蛋白基因家族成员。*Dnd1* 在进化中具有保守性, *Dnd1* 缺乏导致小鼠原始生殖细胞(primordial germ cell, PGC)的丧失、TGCT 的发生和部分胚胎死亡, 但 *Dnd1* 作用机制还未明了。利用酵母双杂交系统, 构建小鼠 *Dnd1* 基因诱饵载体 pDBLeu-*Dnd1*, 筛选 10.5 d 的小鼠胚胎 cDNA 文库, 成功筛选到 4 个与 *Dnd1* 相互作用蛋白, 其中之一为原癌基因 *Jun* 蛋白; 进一步的酵母双杂交实验和 GST pull down 实验再次确认 *Dnd1* 与 *Jun* 蛋白之间的相互作用。研究发现 *Dnd1* 新的相互作用蛋白, 这为探明其信号传导通路及 *Dnd1* 致病机制研究建立了基础。

关键词 酵母双杂交系统 *Dnd1* 蛋白质相互作用 睾丸生殖细胞瘤

睾丸生殖细胞瘤(testicular germ cell tumour, TGCT)好发于 15—30 岁的青年男性, 占 20—40 岁年龄段的男性恶性肿瘤的 60%, 在全球过去的 40 年内发病率已经翻番, 目前仍呈增长趋势^[1,2]。在我国目前还没有系统的流行病学研究报告。TGCT 在组织学上分为精原细胞瘤和非精原细胞瘤, 后者包括胚胎瘤、绒毛膜上皮癌、卵黄囊肿瘤等多种病理类型。TGCT 起源于原位癌细胞(carcinoma in situ, CIS), 也就是转化的原始生殖细胞(primordial germ cell, PGC)^[3,4]。与一般的人群相比, 兄弟和父子患病的相对危险多达 8—10 倍, 明显高于其他肿瘤(大多数的肿瘤只有 2—4 倍)。部分患者有明显的家族史, 而且主要在青少年和青年期发病, 强烈提示 TGCT 的遗传倾向^[3-6]。

我们的前期工作用位置克隆和转基因等方法, 于 2005 年克隆了小鼠 TGCT 的易感基因 *Dnd1*,

该基因位于染色体 18 B2 区域, 基因 cDNA 全长为 1825 bp, 包括 3 个外显子, 分别为 1—72, 73—987 以及 988—1804 位碱基, 编码 340 个氨基酸残基, 分子质量为 37.5 ku。*Dnd1* 具有一个保守的 RNA 识别结构域(RNA recognition motif, RRM), 因此 *Dnd1* 属于 RNA 结合蛋白家族成员。*Dnd1* 基因在进化中具有保守性, 人和小鼠 *Dnd1* 具有完全相同的 RRM^[7]。*Dnd1* 基因在成年小鼠的睾丸和心脏中表达, 在肺、肌肉、肝脏、脾脏、脑、肾脏组织中未检测到表达。*Dnd1* 与斑马鱼和小鼠的 PGC 的存活有关, *Dnd1* 缺乏导致小鼠 PGC 的丧失、TGCT 的发生和部分胚胎死亡^[7,8]。最近研究表明, *Dnd1* 蛋白结合在 mRNAs 上通过抑制 miRNAs 与其靶标位点相互作用, 从而阻碍人类和斑马鱼 PGC 中的几种 miRNAs 的功能^[9]。人 *Dnd1* 基因位于染色体 5q31, 细胞遗传学研究表明这个

2008-05-21 收稿, 2008-06-18 收修稿稿

* 教育部留学归国人员启动基金(教外司留 2005383)和湖南省自然科学基金(批准号: 07JJ6059)资助项目

** 通信作者, E-mail: pxiaoning@hunnu.edu.cn, zhangjian@hunnu.edu.cn

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

区域以及 5q33 的缺失与人的 TGCT 发生有关^[10, 11], 这提示 Dnd1 基因与人 TGCT 可能存在重要的关系. 为了进一步研究小鼠 Dnd1 蛋白的功能, 实验以 Dnd1 蛋白为诱饵, 利用酵母双杂交系统筛选小鼠 10.5 d 胚胎 cDNA 文库, 以期获得与 Dnd1 蛋白相互作用的分子, 为探明 Dnd1 基因信号传导通路及其在男性不育和 TGCT 发生中的分子机制研究建立基础.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒载体、菌株、文库 酵母双杂交系统为 ProQuest™ Two-Hybrid System, 购自 Gibco-BRL 公司. 该系统的酵母菌株是 MaV203. 诱饵质粒载体是 pDBLeu, 猎物质粒载体是 pPC86. 载体 pQE-N3、pGEX-4T-2 为本室保存. pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司. 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* DH10B 和 BL21 为本室保存. 小鼠 10.5 d 胚胎 cDNA 文库购自 GibcoBRL 公司.

1.1.2 酶、抗体、试剂 限制性内切酶 *Sal* I, *Not* I, *Pvu* II 和 T4 DNA 连接酶均购自 New England Biolabs 公司. Taq DNA 聚合酶、质粒 DNA 提取与回收试剂盒均购自 Qiagen 公司. PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司. 鲑鱼精 DNA 为 Invitrogen 公司产品. X-gal 为 Clontech 公司产品. 3AT, LiAc, DMSO, PEG3350 及酸处理的玻璃珠为 Sigma 公司产品. 酵母培养基为英格兰 OXOID 产品. His 单克隆抗体为 Pharmacia 公司产品. 其他为本室保存.

1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒的构建、自身激活与毒性检测 根据 GenBank 中小鼠 Dnd1 序列, 设计 Dnd1 编码区序列的特异性引物并分别引入相应酶切位点: 上游引物 5' - CGCGTCGACCCAA TATTTCCAGATG-GTCTCC - 3', 下划线表示 *Sal* I 酶切位点; 下游引物: 5' - TATGCGGCCGCTCACTGCTTAAC-CATAGTACC - 3', 下划线表示 *Not* I 酶切位点. PCR 法从小鼠 10.5 d 胚胎 cDNA 文库扩增 Dnd1

基因编码区全序列, 将纯化后的 PCR 产物克隆至 pMD18-T 载体, 酶切验证及测序正确后, 将重组质粒 pMD18-T-Dnd1 和 pDBLeu 载体分别经 *Sal* I、*Not* I 内切酶处理, 将得到的 Dnd1 基因片段与 pDBLeu 载体连接构建诱饵质粒 pDBLeu-Dnd1. 经 *Sal* I, *Not* I 及 *Pvu* II 内切酶酶切和测序验证. 融合区域的通读框经序列分析正确后, 采用 PEG/LiAc 法将该诱饵质粒 pDBLeu-Dnd1 转化酵母菌株 MaV203, 并采用 β -半乳糖苷酶滤纸显色法检测其自身激活活性; 观察缺陷培养平板上酵母菌 MaV203(pDBLeu) 和 MaV203(pDBLeu-Dnd1) 的颜色、形状、生长状态, 并比较表达 BD-Dnd1 融合蛋白的酵母菌生长速度与仅表达 BD 多肽的酵母菌的生长速度的差异等指标检测毒性.

1.2.2 酵母双杂交筛选 Dnd1 相互作用蛋白 采用 PEG/LiAc 方法将诱饵质粒 pDBLeu-Dnd1 和构建在 pPC86 载体上的小鼠 10.5 d 胚胎 cDNA 文库质粒共转化酵母菌株 MaV203. 小鼠 10.5 d 胚胎 cDNA 文库 (250 μ g) 与鲑鱼精 DNA (20 μ g) 混合后再加入新鲜制备的 MaV203(pDBLeu-Dnd1) 感受态细胞 (8 mL)、1 \times PEG3350/LiAc 溶液 (6 mL), 30 $^{\circ}$ C 200 r/min 震荡孵育 30 min 后, 加入 7 mL DMSO, 轻轻颠倒混匀, 42 $^{\circ}$ C 水浴热休克 15 min, 冰浴 5 min, 离心后的菌体重悬于 15 mL 1 \times TE/LiAc 溶液中, 涂布于 15 cm SC-Leu-Try-His+3AT 平板上, 30 $^{\circ}$ C 恒温培养 6-8 d. 将第一轮阳性克隆分别划线至 SC-Leu-Try-Ura 平板上及 SC-Leu-Try-His-Ura+3AT 营养缺陷平板上, 并进行第二、三轮筛选.

1.2.3 β -半乳糖苷酶活性检测 将酵母克隆依次点至 Whatman 滤纸上, 30 $^{\circ}$ C 培养 1 d, 液氮中冻融 2 次, 每次 15 s. 恢复至室温后将长有酵母菌的滤纸小心置于浸有分析液 [10 mL Z Buffer (Na₂HPO₄ \cdot 7H₂O 16.1 g/L, NaH₂PO₄ \cdot H₂O 5.5 g/L, KCl 0.75 g/L, MgSO₄ \cdot 7H₂O 0.246 g/L, 60 μ L β -巯基乙醇, 10 mg X-gal)] 的 Whatman 滤纸上, 30 $^{\circ}$ C 孵育, 观察克隆呈现蓝色的时间, 时间为 30 min-24 h.

1.2.4 阳性克隆文库质粒的自身激活检测及转回验证 选取阳性克隆转化子接种于 SC-Leu-Try

液体培养基, 30℃ 培养过夜, 用苯酚/氯仿/异戊醇抽提酵母质粒, 转化大肠杆菌 DH5 α , 转化产物涂布于 LB Amp^r 平板; 提取大肠杆菌质粒, 并与诱饵质粒共同转化酵母 MaV203 感受态细胞, 转化产物涂布于 SC-Leu-Try 营养缺陷平板上, 待克隆长出后再用 β -半乳糖苷酶滤纸法检测各转化子的 LacZ 表型.

1.2.5 阳性酵母克隆的鉴定与分析 采用电穿孔转化法将酵母菌阳性克隆文库质粒转化宿主菌 *E. coli* DH10B 感受态细胞, 转化产物涂布于 Amp^r LB 平板, 挑取单克隆在液体培养基中扩增后, 提取文库质粒 DNA. 以制备好的阳性文库质粒为模板, 使用系统提供的 pPC86 载体的测序引物, PCR 法扩增 pPC86-Library 中插入片段, 确定插入片段大小. 将转回验证仍为阳性克隆质粒测序, 对所测得的序列在 NCBI 上进行同源性搜索, 得到可能与诱饵蛋白 Dnd1 相互作用的因子. pPC86-Library 质粒的测序引物为: 正向引物: 5' - TATAACGCGTTT-GGAATCACT - 3', 反向引物: 5' - GTA-AATTTCTGGCAAGGTAGAC - 3'.

1.2.6 GST pull-down 实验 构建 His-Dnd1 和 GST-Jun 融合蛋白表达质粒并分别转化 BL21 感受态细胞, IPTG 诱导融合蛋白表达. 大量表达后, 低速离心收集菌体, 适量细菌裂解液(含 100 mg/L PMSF)重悬, 冰浴超声破碎. 高速离心后, His-Dnd1 取沉淀, 该融合蛋白以包涵体形式存在, 而 GST-Jun 取上清. 前者经 8 mol/L 尿素变性缓冲液溶解及复性液后得到 His-Dnd1 融合蛋白, 后者加适量谷胱甘肽琼脂糖珠结合经洗脱后得到纯化的 GST-Jun 融合蛋白. 在 1.5 mL 离心管中混合 4 g HIS-Dnd1 融合蛋白及适量 GST-Jun 融合蛋白、作为对照的 GST 接头蛋白, 1 \times PBS 缓冲液补足体积到 1 mL, 4℃ 摇动 4 h 后, 加入谷胱甘肽琼脂糖珠 4℃ 摇动 1 h. 4℃ 2000 rpm 离心 1 min 去上清, 用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 缓冲液洗涤 4 次, 每次 10 min. 离心后用适量上样缓冲液重悬, 105℃ 处理 10 min, SDS-PAGE 电泳后, 进行 Western blot 分析.

2 结果

2.1 诱饵质粒 pDBLeu-Dnd1 的构建、鉴定、及其自激活作用和毒性检测

重组诱饵质粒 pDBLeu-Dnd1 经 *Sal*I 和 *Nod*I 双酶切后, 酶切产物中应有 1 kb 左右的条带(1023 bp), 这是插入的编码区序列; 重组诱饵质粒 pDBLeu-Dnd1 中有 4 个 *Pvu*II 酶切位点, 载体和插入片段各有两个, 经 *Pvu*II 单酶切后产物中应有 4 条特征性条带为 615, 772, 3951 和 5588 bp(图 1(a)). 结果显示与预期值大小一致, 证实重组质粒 pEGFP-Dnd1 中插入的 Dnd1 基因片段大小及方向均正确(图 1(a)). 将酶切鉴定正确的质粒 pDBLeu-Dnd1 进行测序, 测序结果表明插入序列和 ORF 正确(结果未显示), 诱饵质粒 pDBLeu-Dnd1 构建成功. 在将成功构建的 pDBLeu-Dnd1 转入酵母菌感受态细胞 MaV203, 并涂布于相应的营养缺陷培养平板上, β -半乳糖苷酶滤纸法检测, 结果显示诱饵质粒 pDBLeu-Dnd1 自身不能激活下游报告基因 LacZ 的转录(图 1(b)). 将诱饵质粒 pDBLeu-Dnd1 和空载体 pDBLeu 分别转化酵母菌 MaV203 感受态细胞后, 酵母菌 MaV203(pDBLeu) 和 MaV203(pDBLeu-Dnd1) 在 SC-Leu 平板中生长状态良好, 在颜色、数量、菌落形态上没有明显差别, 在液体培养基中的增值速度也近乎一致(结果未显示), 说明 pDBLeu-Dnd1 对 MaV203 无明显毒性. 以上结果表明, pDBLeu-Dnd1 适用于酵母双杂交系统筛选文库相互作用蛋白.

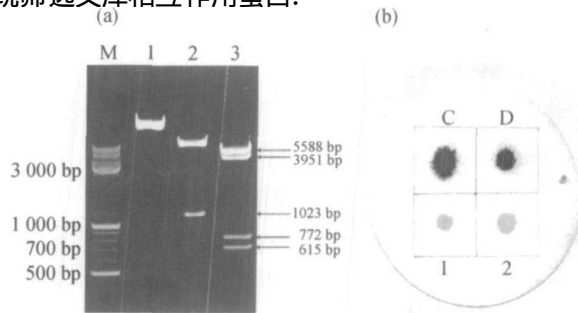


图 1 诱饵质粒 pDBLeu-Dnd1 酶切鉴定与自身激活检测 (a) 酶切鉴定 M: DNA 标准(DL2000); 1 诱饵载体 pDBLeu-Dnd1; 2 pDBLeu-Dnd1 双酶切产物; 3 pDBLeu-Dnd1 经 *Pvu*II 单酶切产物 (b) 自身激活检测, C 和 D 阳性对照; 1 MaV203 (pDBLeu)(pPC86) 阴性对照; 2 MaV203(pDBLeu-Dnd1) (pPC86)

2.2 与 Dnd1 相互作用蛋白的小鼠胚胎 cDNA 文库筛选

小鼠胚胎 cDNA 文库质粒转化酵母菌 MaV203(pDBLeu-Dnd1) 感受态细胞, 并涂布于 15 cm SC-Leu-Try-His+3AT 营养缺陷平板, 经 30 °C 恒温培养 6 d 后, 有白色克隆长出, 分别编号, 至第 15 d 时, 共计 172 个克隆. 按照前述方法逐一将已长出的直径大于 2 mm 的菌落再次划线至 15 cm SC-Leu-Try-Ura 营养缺陷培养板, 经过 3 轮筛选, 最终鉴定出 8 个与 Dnd1 有相互作用的阳性克隆(图 2).

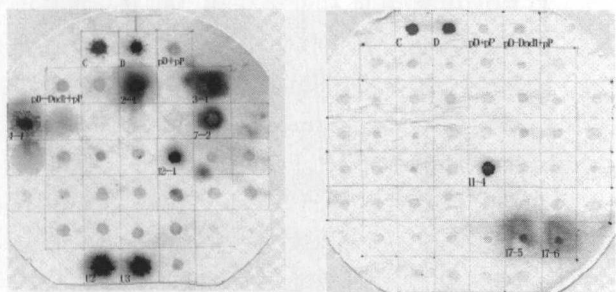


图 2 第 3 轮筛选(15-cm SC-Leu-Try-His+30mM3AT) 中的阳性克隆

C, D: 阳性对照菌株; pD+pP: MaV203(pDBLeu)(pPC86) 阴性对照; pD-Dnd1+pP: MaV203(pDBLeu-Dnd1)(pPC86) 阴性对照; 阳性克隆序号(2-1, 3-1, 4-1, 7-2, 11-4, 12-1, U2, U3)

2.3 阳性克隆的 PCR 鉴定、自身激活检测和转回验证

以制备好的 8 个文库质粒 pPC86-Library 为模板, 使用 pPC86 载体的测序引物扩增得到文库质粒 pPC86-Library 中的插入片段, 确定了插入片段大小的同时也检测了质粒的纯度(图 3). 用 β -半乳糖苷酶滤纸法检测阳性克隆文库质粒自身激活, 结果显示 8 个阳性克隆的文库质粒均不能自身激活 LacZ 的转录(图 4(a)). 将 8 个文库质粒与 pDBLeu-Dnd1 共同转化酵母菌 MaV203 感受态细胞, 结果显示 β -半乳糖苷酶活性为阳性, 从而确定为阳性克隆(图 4(b)). 将得到的 8 个阳性克隆质粒, 利用 pPC86 引物进行测序后, 对测序结果首先利用 NCBI 的在线工具 Vectorscreen 分析并除去目的片段两

端所含的部分载体序列, 然后将余下的目的基因利用序列比对工具 BLASTn 对其进行相似性比较、比对并归纳整理, 结果证实 8 个阳性文库 DNA 分别为 4 个基因, 其中之一是 Jun 癌基因.

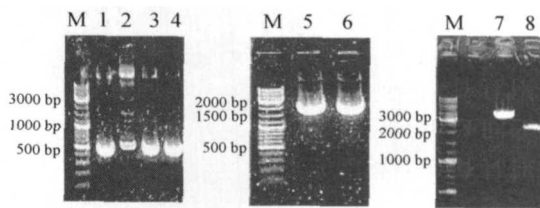


图 3 阳性克隆文库质粒 pPC86-Library 的 PCR 鉴定
M: DNA 分子量标准; 1 pPC86-2-1; 2 pPC86-3-1; 3 pPC86-4-1; 4 pPC86-7-2; 5 pPC86-11-4; 6 pPC86-12-1; 7 pPC86-U3-1; 8 pPC86-U3-2

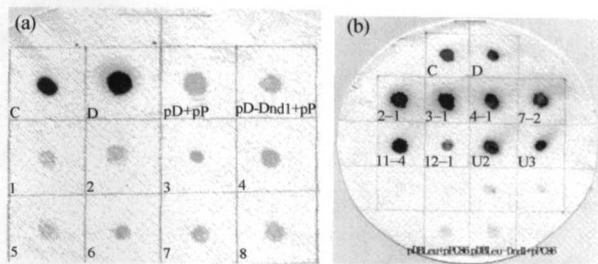


图 4 阳性文库质粒 pPC86-Library 的自身激活检测与回复性验证

(a) 自身激活检测 C, D: 阳性对照菌株; pD+pP: MaV203(pDBLeu)(pPC86) 阴性对照; pD-Dnd1+pP: MaV203(pDBLeu-Dnd1)(pPC86) 阴性对照; 1-8: 8 个阳性文库质粒分别与 pDBLeu 共转后的酵母菌; (b) 回复性验证 C, D: 阳性对照菌株; pD+pP: MaV203(pDBLeu)(pPC86) 阴性对照; pD-Dnd1+pP: MaV203(pDBLeu-Dnd1)(pPC86) 阴性对照; 其他标记为对应的阳性克隆编号

2.4 Dnd1 蛋白与 Jun 蛋白之间的在酵母中的相互作用

为了进一步验证 Dnd1 蛋白与 Jun 蛋白之间的相互作用, 我们将 Jun 全长编码序列构建到酵母表达载体 pPC86 上, 经酶切鉴定和序列分析成功构建 pPC86-Jun(结果略). 将 pPC86-Jun 质粒与 pDBLeu-Dnd1 质粒共同转化酵母菌 MaV203 感受态细胞, β -半乳糖苷酶滤纸显色法分析结果显示, pDBLeu-Dnd1 和 pPC86-Jun 的相互作用结果为阳性(图 5).

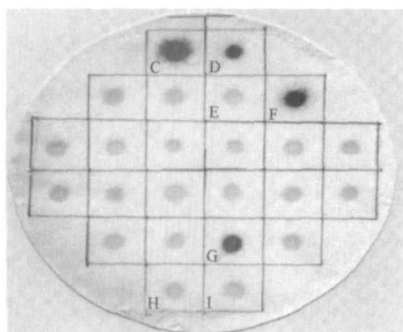


图 5 pDBLeu-Dnd1 和 pPC86-Jun 在酵母双杂交系统中的验证

C, D, G: 系统提供的阳性对照酵母菌; E: pDBLeu+pPC86-Jun 自激活阴性对照; F: pDBLeu-Dnd1+pPC86-Jun 阳性结果; H: pDBLeu+pPC86 阴性对照; I: pDBLeu-Dnd1+pPC86 阴性对照

2.5 Dnd1 蛋白与 Jun 蛋白之间的体外相互作用

成功构建 His-Dnd1 和 GST-Jun 融合蛋白表达质粒 (结果略); 将大肠杆菌中表达、纯化得到的 His-Dnd1 融合蛋白分别 GST-Jun 融合蛋白与 GST 接头蛋白混合进行体外 GST-pull down 实验. 结合产物洗脱珠子后, 经过变性及 SDS-PAGE 电泳, His-Dnd1 蛋白和 GST-Jun 蛋白分开, 用 His 单克隆抗体进行 Western blot 检测 (His-Dnd1 蛋白). 结果显示 His-Dnd1 能够与 GST-Jun 结合, 但不能与 GST 蛋白结合 (图 6), 阳性对照是 His-Dnd1 融合蛋白 (Input). 这一结果表明 Dnd1 与 c-Jun 能够在体外发生特异性的相互作用, 而与单纯的 GST 无结合作用.

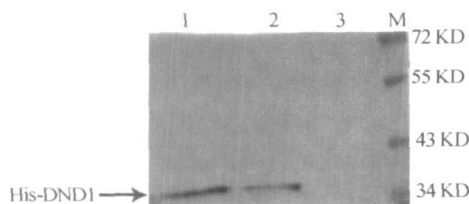


图 6 Dnd1 和 Jun 蛋白的 GST-pull down 实验

M: 蛋白质标准分子量; 1 His-Dnd1 直接点样作为阳性对照; 2 GST-Jun 和 His-Dnd1 混合经 GST 特异性结合珠子沉淀; 3 GST 和 His-Dnd1 混合经 GST 特异性结合珠子沉淀, 作为阴性对照

3 讨论

细胞内或细胞间的生物学事件最终要靠蛋白质

间的相互作用来完成, 能够直接相互作用的蛋白质在功能上往往密切相关, 因此蛋白质相互作用的研究是认识基因功能的一个重要途径. 酵母双杂交系统以其简便、灵敏、高效等特点之前已被广泛应用于生物学研究的各个领域, 如细胞信号转导、细胞周期调控、基因转录和翻译调控等.

Dnd1 属于 RNA 结合蛋白基因家族成员, 目前已经明确 RNA 结合蛋白参与 RNA 剪接、多聚腺苷化作用、序列编辑、RNA 转运、维持 RNA 的稳定和降解、细胞内定位和翻译控制等 RNA 代谢的各个方面^[12-14], RNA 结合蛋白与男性不育密切相关^[15], 在肿瘤发生中具有重要作用^[16]. Dnd1 基因 RNA 识别结构域的点突变(C→T)引入了一个终止密码子, 这个具有 RNA 识别元件的蛋白质变成了一个截尾蛋白(truncated protein)从而导致它本身失活, 造成小鼠胚胎发育中 PGC 大量丧失, TGCT 的发生和部分胚胎死亡. 转基因研究表明 Dnd1 具有抑制肿瘤生长和逆转 PGC 缺失等重要的生物学功能^[7]. 细胞遗传学研究也提示 Dnd1 基因与人 TGCT 可能存在重要的关系. 但易感基因 Dnd1 在 TGCT 发生中的分子机制目前尚不明确, 作为了解其致瘤机制的第一步, 需要找到与它相互作用的蛋白, 通过了解这些蛋白的功能探明其信号传导通路及 Dnd1 基因的在 TGCT 发生中的分子机制. 最近有研究用免疫共沉淀技术发现 Dnd1 与另一个 RNA 结合蛋白家族成员 Apobec3 相互作用, 但 Dnd1-Apobec3 相互作用的功能还未阐明, 根据 Dnd1 和 Apobec3 都分别能结合在 mRNAs 上抑制 miRNAs 与其靶标位点相互作用, 从而推测 Dnd1 可能通过与 Apobec3 相互作用调节 miRNAs 介导 mRNA 上的抑制可能是维持 PGC 存活和防止 TGCT 的一个重要机制^[9, 17, 18].

本研究首先成功地构建诱饵质粒 pDBLeu-Dnd1, 诱饵质粒 pDBLeu-Dnd1 的质控结果表明 pDBLeu-Dnd1 的对报告基因无自身激活作用和对宿主菌 MaV203 无毒性作用. 以 Dnd1 为诱饵蛋白, 利用酵母双杂交系统筛选小鼠 10.5 d 胚胎 cDNA 文库成功筛选到 4 个与 Dnd1 相互作用蛋白, 其中之一为原癌基因 Jun, 再次的酵母双杂交和 GST pull down 实验进一步确认了 Dnd1 和 Jun 蛋白之间的相互作用. Jun 原癌基因属于 bZIP 家族核内转录

因子成员之一, 可以结合在许多基因的启动子上参与基因转录的调控. 其蛋白编码产物能通过亮氨酸拉链形成同源二聚体或与 AP-1 家族其他成员形成异源二聚体, 与某些基因的 DNA 区域特异结合以调控下游基因的转录活性, 参与细胞增殖、分化、凋亡等过程, 在胚胎的发育、机体免疫系统功能的调节中发挥作用^[19-21]. 大量研究工作证实, 原癌基因参与了精子发生的过程, 但对其明确的分子作用机制还缺乏统一而系统的认识. 如原癌基因启动精子发生的具体信号传导途径、原癌基因之间与其他基因相互作用在精子发生中的作用目前远未阐明^[22-26]. Jun 蛋白定位于精原细胞、初级精母细胞和次级精母细胞的胞质内, 细胞核内也有表达. 通过对小鼠精子发生周期中 c-Jun 在 mRNA 和蛋白质水平的研究发现, c-Jun 参与生精上皮更替特定时期生精细胞增殖和分化的转录调控^[27-29]. 因此 Jun 与 Dnd1 之间的相互作用提示具有抑癌特性的 Dnd1 可能作为 Jun 蛋白的负调控因子与其正调控因子共同调节 Jun 的转录或表达, 从而通过 Jun 信号通路来调节生精细胞的增殖和分化; 若细胞中 Dnd1 基因发生突变或者缺失, 减弱或失去了这种调节作用, 就可能导 致生精细胞的过度增殖以及向癌细胞转化, 最终导致睾丸生殖细胞瘤的发生. Dnd1 转基因则可能通过恢复 Dnd1 对 Jun 的正常调控, 恢复生精细胞的增殖和分化动态平衡, 从而逆转 PGC 缺失和抑制肿瘤生长.

综上所述, 利用酵母双杂交系统成功筛选到 Dnd1 新的互作蛋白—原癌基因 Jun 蛋白. 进一步的酵母双杂交实验和 GST pull down 实验再次确认 Dnd1 与 Jun 蛋白之间的相互作用. 接下来我们还将用免疫共沉淀、荧光共定位、染色质免疫共沉淀及报告基因分析等系列技术来证明 Dnd1 和 Jun 生理上的结合与功能上的联系, 并进一步明确 Dnd1-Jun 相互作用与睾丸生殖细胞瘤发生的关系, 为明确 Dnd1 的信号传导通路及其 Dnd1 突变导致睾丸生殖细胞瘤发生的分子机制建立基础.

参 考 文 献

- Oosterhuis JW, Looijenga LH. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(3): 210—222
- Reuter VE. Origins and molecular biology of testicular germ-cell tumors. *Mod Pathol*, 2005, 18 Suppl 2S: 51—60
- Dieckmann KP, Skakkebaek NE. Carcinoma *in situ* of the testis: Review of biological and clinic feature. *Int J cancer*, 1999, 83(6): 815—822
- Hussain A. Germ cell tumors. *Curr Opin Oncol*, 2005, 17(3): 268—274
- Nicholson PW, Harland SJ. Inheritance and testicular cancer. *Br J Cancer*, 1995, 71(2): 421—426
- Lutke Holzik MF, Rapley EA, Hoekstra HJ, et al. Genetic predisposition to testicular germ-cell tumours. *Lancet Oncol*, 2004, 5(6): 363—371
- Weidinger G, Stebler J, Slanchev K, et al. Dnd1, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Current Biology*, 2003, 13: 1429—1434
- Youngren KK, Coveney D, Peng X, et al. The Ter mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours. *Nature*, 2005, 435(7040): 360—364
- Kedde M, Strasser MJ, Boldajipour B, et al. RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell*, 2007; 131(7): 1273—1286
- Peng HQ, Bailey D, Bronson D, et al. Loss of heterozygosity of tumour suppressor genes in testis cancer. *Cancer Research*, 1995, 55(13): 2871—2875
- McIntyre A, Summersgill B, Jafer O, et al. Defining minimum genomic regions of imbalance involved in testicular germ cell tumors of adolescents and adults through genome wide microarray analysis of cDNA clones. *Oncogene*, 2004, 23(56): 9142—9147
- Chen SH, Habib G, Yang CY, et al. Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science*, 1987, 238 (4825): 363—366
- Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, et al. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell*, 1987, 50(6): 831—840
- Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, et al. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett*, 2008, 582(14): 1977—1986
- Venables JP, Eperon I. The roles of RNA-binding proteins in spermatogenesis and male infertility. *Curr Opin Genet Dev*, 1999, 9(3): 346—354
- Erkinheimo TL, Lassus H, Sivula A, et al. Cytoplasmic Hu R expression correlates with poor outcome and with cyclooxygenase2 expression in serous ovarian carcinoma. *Cancer Res*, 2003, 63(22): 7591—7595
- Bhattacharya C, Aggarwal S, Kumar M, et al. Mouse apolipoprotein B editing complex 3 (APOBEC3) is expressed in germ cells and interacts with dead-end (DND1). *PLoS ONE*, 2008,

- 3(5): 1—10
- 18 Huang J, Liang Z, Yang B, et al. Derepression of microRNA-mediated protein translation inhibition by apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) and its family member. *J Biol Chem*, 2007, 282: 33632—33640
- 19 Vogt PK. Jun, the oncoprotein. *Oncogene*, 2001, 20(19): 2365—2377
- 20 Dam HV, Castellazzi M. Distinct roles of Jun, Fos and Jun, ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene*, 2001, 20(19): 2453—2464
- 21 Behrens A, Haigh J, Mehta-Grigoriou F, et al. Impaired intervertebral disc formation in the absence of Jun. *Development*, 2003, 130(1): 103—109
- 22 Yu Z, Guo R, Ge Y, et al. Gene expression profiles in different stages of mouse spermatogenic cells during spermatogenesis. *Biol Reprod*, 2003, 69(1): 37—47
- 23 Eddy EM. Male germ cell gene expression. *Recent Prog Horm Res*, 2002, 57: 103—128
- 24 Braydich-Stolle L, Kostereva N, Dym M, et al. Role of Src family kinases and N-Myc in spermatogonial stem cell proliferation. *Dev Biol*, 2007, 304(1): 34—45
- 25 Liu G, Tezian T, Xiong S, et al. The p53-Mdm2 network in progenitor cell expansion during mouse postnatal development. *J Pathol*, 2007, 213(4): 360—368
- 26 Fujino RS, Tanaka K, Morimatsu M, et al. Spermatogonial cell-mediated activation of an IkappaBzeta-independent nuclear factor-kappaB pathway in Sertoli cells induces transcription of the lipocalin-2 gene. *Mol Endocrinol*, 2006, 20(4): 904—915
- 27 Wolfes H, Kogawa K, Millette CF, et al. Specific expression of nuclear proto-oncogenes before entry into meiotic prophase of spermatogenesis. *Science*, 1989, 245(4919): 740—743
- 28 Chieffi P, Angelini F, Pierantoni R. Proto-oncogene activity in the testis of the lizard, *Podarcis s. sicula*, during the annual reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol*, 1997, 108(2): 173—181
- 29 Shalini S, Bansal M P. Role of selenium in spermatogenesis: Differential expression of c jun and c fos in tubular cells of mice testis. *Mol Cell Biochem*, 2006, 292(1—2): 27—38