

CD4 同源二聚化或寡聚化的间接检测及其介导的生物学功能的初步分析 Several Indirect Methods for Analysis of CD4 Self-association and its Function in Stable CD4-MHC-II Binding

肖 鹤¹, 李 松², 沈倍奋¹, 黎 燕^{1*}

XIAO He¹, LI Song², SHEN Bei-Fen¹ and LI Yan^{1*}

1. 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850

2. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850

1. Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

2. Institute of Pharmacology and toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

摘 要 近年来的研究表明, CD4 分子于细胞膜表面不仅以单体形式存在还可以通过其 D4 和 D1 形成同源二聚化及寡聚化, 并且二聚化及寡聚化的 CD4 分子才能稳定地与 MHC-II 类分子结合。通过分析 CD4 分子以及 CD4 缺失突变体分子融合 Fas 基因片段所诱导的转染靶细胞的凋亡, 以及携带绿色荧光蛋白的 CD4 分子转染 HEK293 细胞所筛选出的稳定克隆的不同荧光强度和与 MHC-II 类分子阳性细胞 Raji 之间的不同黏附效应间接鉴定 CD4 同源二聚体或寡聚体的存在, 并对二聚化或寡聚化 CD4 分子所介导的生物学功能进行初步分析。

关键词 同源二聚化, 间接检测, 激光共聚焦, 细胞黏附, 玫瑰花环, 缺失突变

中图分类号 Q2, Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)02-0239-05

Abstract To examine the self-association of CD4 molecules and preliminary studies on its biological function by several indirect methods. A series of CD4 chimeras were generated including truncated CD4 lacking the short cytoplasmic tail, deleted mutants-D1/D2 devoid of D3 and D4 and D3/D4 devoid of D1 and D2 by PCR techniques, as well as another three CD4 chimeric genes by fused human Fas cytoplasmic death domain to the downstream of the above chimeras respectively. All these molecules were subcloned into pEGFP-N1, forming the corresponding expression vectors. After introducing into HEK293 cells, gene-modified cell morphological changes and target protein subcellular localization were observed and analyzed by a confocal microscopy. Moreover, stable 293/CD4 clones were obtained by transfecting the truncated CD4 recombinant plasmid into the HEK293 cell line and selected by G418. The fluorescence intensity and rosette formation of different clones was each analyzed by a confocal microscopy and cell adhesive assays. It's seen that CD4-Fas fusion gene could induce approximately 80% cell apoptosis of transfected HEK293 cells, compared to FKBP12-Fas is about 30% and CD4 gene only is 7%. Furthermore, both D1/D2-Fas and D3/D4-Fas chimeras could trigger nearly all transfected HEK293 cells to death. Cell adhesion assays showed that neither the D1/D2 nor D3/D4 chimeras when expression in HEK293 cells binds to MHC class II⁺ Raji B cells. Interestingly, there were two type stable clones among 293/CD4. Fluorescence intensity analysis displayed that one's mean fluorescence intensity value is about twice of the other while cell-cell binding examination showed that the former is capable of forming rosette with Raji cells but the latter. All these results suggest that CD4 molecules most likely could exist as a dimer or even an oligomer on transfected HEK293 cell surface, which constitute a functional form for stable binding to MHC class II molecules.

Key words homodimerization, indirect detection, confocal, cell adhesion, rosette formation, deleted mutation

Received: August 20, 2004; Accepted: October 27, 2004.

This work was supported by the Special Funds for National Basic Research Program of China (No.2003 CB515508).

* Corresponding author. Tel: 86-10-66931325; E-mail: Liyan62033@yahoo.com.cn

国家 973 重点基础研究发展资助项目 (No.2003CB515508)。

CD4 分子是一类单链跨膜糖蛋白,表达于胸腺及成熟的 T 淋巴细胞表面。CD4 分子与 MHC-II 类分子之间的相互作用在 CD4 + T 细胞的激活过程中非常关键。其中 MHC-II 类分子主要参与移植排斥反应以及一系列自身免疫性疾病的发生。CD4 分子的胞外区包含有 4 个 Ig 样结构域-D1, D2, D3 及 D4。近年来的研究表明其 D1 主要参与 CD4 分子和 MHC-II 类分子及 HIV 包膜糖蛋白 gp120 的结合^[1], 而 D4 则介导 CD4 分子的同源二聚化。并且研究显示只有二聚化或寡聚化形式的 CD4 分子才能够稳定地与 MHC-II 类分子结合。但是由于 CD4 分子形成同源二聚化的亲和力很弱,我们很难用通常的生化方法对其进行检测,因此本实验的目的就是通过几个间接实验鉴定 CD4 同源二聚体的存在,并对二聚化 CD4 分子所介导的生物学功能进行初步分析。其中包括:1、分析 CD4 分子以及 CD4 缺失突变体分子融合 Fas 胞浆区基因片段所诱导的转染靶细胞的凋亡,从而粗略分析 CD4 分子是否能发生自身交联反应,即自身发生二聚化或寡聚化,并大致了解哪些结构域参与这种自身相关性;2、分析携带绿色荧光蛋白的 CD4 分子转染 HEK293 细胞所筛选出的稳定克隆的不同荧光强度,间接确定 CD4 分子二聚体形式存在的可能性;3、分析 CD4 分子以及 CD4 缺失突变体分子转染的 HEK293 细胞与 MHC-II 类分子阳性细胞 Raji 之间的不同黏附效应,初步认识二聚化或寡聚化 CD4 分子所介导的生物学功能。

1 材料和方法

1.1 材料

DH5 α 菌株、pEGFP-N1 载体及 HpB-ALL、Raji、HEK293、U937 细胞均由本室保存。pC4FV1E 质粒由李松教授提供。PE-CD4 Ab(Leu-3a)购自美国 BD 公司。PCR 采用 TaKaRa 公司的高保真酶及 Promega 公司的 Taq 酶。引物合成及测序均由上海生工公司完成。大量提取质粒 KIT、LipofectinAMINE 购自 Invitrogen 公司。所使用的限制酶、TRIZOL、MCV 反转录酶均购自 BioLab 公司,连接酶购自 GIBCOL 公司。

1.2 表达载体的构建

1.2.1 CD4-Fas 融合基因表达载体的构建:利用 RT-PCR 方法分别从 HpB-ALL 及 U937 细胞中钓取 CD4 的胞浆缺陷型基因($\approx 1.4\text{kb}$)和 Fas 胞浆区基因 175-304aa($\approx 387\text{bp}$),测序鉴定正确后首先将 CD4 基因片段插入到 pC4FV1E 载体中,后者经过 *Spe* I 和 *Xba* I 双酶切处理。然后将 Fas 基因片段克隆进重组质粒的 *Spe* I 位点,即融合于 CD4 分子的跨膜

端下游替代其胞浆区基因。分别利用酶切及 PCR 方法鉴定重组质粒的正确性。最后分别将 CD4 基因及 CD4-Fas 融合基因从构建的重组质粒克隆进绿色荧光表达载体 pEGFP-N1 中。

1.2.2 CD4 缺失突变体融合 Fas 基因表达载体的构建:合成 8 条引物,P1、P2、P3、P4、P5、P6、P7 及 P8,以重组质粒 pEGFP-N1/CD4-Fas 为模板,利用重叠 PCR 的方法分别扩增 CD4 缺失突变体包括 D3D4 缺陷型以及 D1D2 缺陷型连接 Fas 基因的融合基因。其中 P1、P2 扩增 CD4 分子的 D1D2 基因(包含信号肽分子),P3、P4 扩增 CD4 分子的跨膜区和 Fas 胞浆区的融合基因;P5、P6 扩增 CD4 分子的信号肽序列,而 P7 及 P8 扩增 CD4 分子的 D3D4 以及跨膜区携带 Fas 胞浆区的融合基因。分别将 P1、P2、P3、P4 及 P5、P6、P7、P8 的重叠 PCR 产物 D1D2-Fas 融合基因和 D3D4-Fas 融合基因插入到 pEGFP-N1 中。利用 *Bam*HI 及 *Eco*RI 鉴定获得的重组质粒 pEGFP-N1/D1D2-Fas 及 pEGFP-N1/D3D4-Fas。

1.3 HEK293/CD4 稳定细胞克隆的筛选

利用脂质体转染方法将 pEGFP-N1/CD4 转染进 HEK293 细胞(阳性克隆称为 HEK293/CD4),同时做转 pEGFP-N1 质粒的空载对照(阳性克隆称为 HEK293/pEGFP-N1)。转染方法参见 LipofectinAMINE 说明书。转染 24~48h 后,400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 筛选 10~15d,挑取细胞克隆继续培养。

1.4 CD4 分子的细胞定位及膜表达检测

接种 HEK293/CD4 细胞克隆于小皿中,培养 24h 后去培养基,PBS + 0.5% FCS + 0.1% NaN₃ 洗细胞 3 次,加 PE-CD4 Ab(20 $\mu\text{L}/1 \times 10^6$ 细胞)直接标记,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15~30min,用洗液(同前)清洗 3 次后,激光共聚焦显微镜下观察。

1.5 细胞黏附实验

接种 HEK293/CD4 稳定细胞克隆于 35mm 培养小皿中,24h 后弃培养基,加 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7 \text{cell}/\text{mL}$ 1640 培养基 Raji 细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1h,1640 培养基充分清洗 3~5 次后,倒置显微镜下观察玫瑰花环的形成。同时作空载体对照。

1.6 CD4-Fas 融合基因诱导 HEK293 细胞的凋亡检测

利用脂质体转染方法分别将 pEGFP-N1/CD4、pEGFP-N1/CD4-Fas 及 pEGFP-N1/FKBP12-Fas 重组质粒转染进 HEK293 细胞,24~36h 后于荧光显微镜下观察细胞形态。以变圆的发绿色荧光的细胞为凋亡细胞计算细胞凋亡率。计算公式为:细胞凋亡率 = 变圆的绿色荧光细胞数/总的绿色荧光细胞数(变圆

的绿色荧光细胞数 + 正常形态的绿色荧光细胞数)。

1.7 CD4 缺失突变体融合 Fas 基因诱导 HEK293 细胞的凋亡检测

利用脂质体转染方法分别将 pEGFP-N1/D1D2-Fas 及 pEGFP-N1/D3D4-Fas 重组质粒转染进 HEK293 细胞,24 ~ 36h 后于荧光显微镜下观察细胞形态。

1.8 CD4 缺失突变体的细胞黏附分析

实验方法同 1.5。

1.9 两个 HEK293/CD4 稳定克隆的荧光强度及黏附分析

利用激光共聚焦显微镜扫描收集 HEK293/CD4 两个稳定克隆各 30 个细胞,统计荧光强度总值并计算平均荧光强度。然后分别将两个细胞克隆与 Raji 细胞进行孵育,置 37℃ 1h 后,1640 培养基充分清洗 3 ~ 5 次,倒置显微镜下观察玫瑰花环的形成。

2 结 果

2.1 重组表达质粒的酶切鉴定

分别以 *Bam*H I、*Eco*R I 双切重组载体 pEGFP-N1/CD4、pEGFP-N1/CD4-Fas、pEGFP-N1/D1D2-Fas 及 pEGFP-N1/D3D4-Fas,依次切下约 1.4kb、1.8kb、1.1kb 及 1.1kb 大小的片段(图 1)。

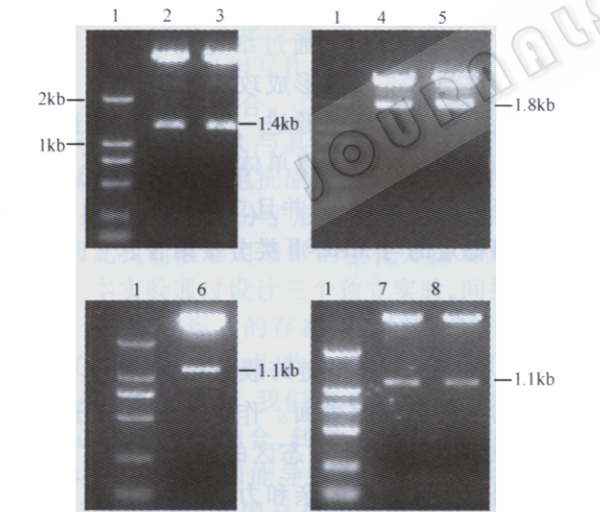


图 1 重组质粒酶切鉴定图

Fig.1 Restrictive enzyme digestion analyses of recombinant plasmid

1:DL2000 marker; 2,3: pEGFP-N1/CD4 cut with *Bam*H I and *Eco*R I; 4, 5: pEGFP-N1/CD4-Fas cut with *Bam*H I and *Eco*R I; 6: pEGFP-N1/D1D2-Fas cut with *Bam*H I and *Eco*R I; 7,8: pEGFP-N1/D3D4-Fas cut with *Bam*H I and *Eco*R I.

2.2 CD4 分子的膜表达检测

激光共聚焦显微镜下可看到:pEGFP-N1/CD4 转染的 HEK293 细胞,绿色荧光呈细胞核外周尤其是

胞膜分布,HEK293/CD4 细胞进一步用 PE-CD4 抗体 (Leu-3a)标记后,细胞膜表面呈现一圈红色荧光,这圈红色荧光与细胞自身发出的绿色荧光重叠显示出黄色荧光(图 2)。

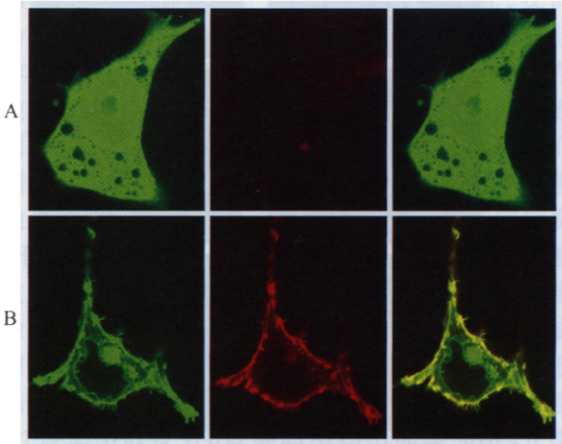


图 2 CD4 分子的膜表达检测

Fig.2 Detection of CD4 expression on cell membrane surface by PE-CD4 Ab

A: HEK293/pEGFP-N1 cell stained by PE-CD4 Ab; B: HEK293/CD4 cell stained by PE-CD4 Ab.

2.3 HEK293/CD4 细胞与 Raji 细胞介导的细胞黏附

倒置显微镜下可看到:HEK293/CD4 细胞与 Raji 细胞形成典型的玫瑰花环,即 HEK293/CD4 细胞膜表面黏附有 3 ~ 5 个以上 Raji 细胞,而空载对照 HEK293/pEGFP-N1 细胞与 Raji 细胞之间无玫瑰花环的形成(图 3)。

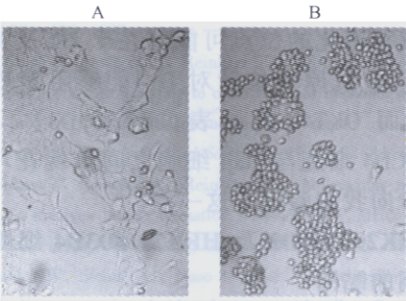


图 3 HEK293/CD4 细胞与 Raji 细胞之间的细胞黏附

Fig.3 Rosset formation between cells HEK293/CD4 and Raji
A: cell HEK293/pEGFP-N1 and Raji; B: cell HEK293/CD4 and Raji.

2.4 CD4-Fas 融合基因诱导 HEK293 细胞的凋亡检测

荧光显微镜下可看到,CD4-Fas 融合基因可诱导约 80% 转染靶细胞的死亡,而 FKBP12-Fas 仅能诱导约 30% 转染靶细胞的死亡,CD4 基因能诱导约 7% 的转染靶细胞的死亡(图 4)。实验结果提示我们,CD4 分子的确有可能在细胞膜表面形成同源二聚化,从而介导与其融合的 Fas 双聚,激活 Fas 的凋

亡信号途径进而导致转染的 HEK293 细胞的死亡。

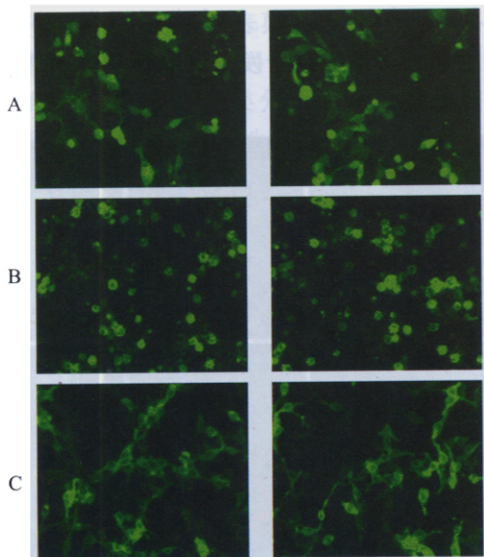


图 4 CD4-Fas 融合基因诱导的 HEK293 细胞凋亡

Fig.4 Detection of apoptosis percent of HEK293 cells induced by CD4-Fas fusion gene

A: HEK293 transiently transfected by pEGFP-N1/FKBP12-Fas; B: HEK293 transiently transfected by pEGFP-N1/CD4-Fas; C: HEK293 transiently transfected by pEGFP-N1/CD4.

2.5 CD4 缺失突变体融合 Fas 基因诱导 HEK293 细胞的凋亡检测

荧光显微镜下可看到:不论是 D1D2-Fas 还是 D3D4-Fas 融合基因均能导致几乎全部转染靶细胞的死亡(图 5)。这个实验向我们提示:CD4 分子的确可能以二聚化或寡聚化的形式存在,并且其形成二聚化或寡聚化的位点可能存在于 D4 及 D1。CD4 抗体 Leu-3a(抗原表位针对 D1)能够阻断玫瑰花环的形成,而 OKT4(抗原表位针对 D3)不能阻断 HEK293/CD4 细胞与 Raji 细胞之间玫瑰花环的形成则进一步向我们验证了这一点。

2.6 HEK293/D1D2 及 HEK293/D3D4 细胞与 Raji 细胞之间的黏附

倒置显微镜下可看到:与 HEK293/CD4 细胞不

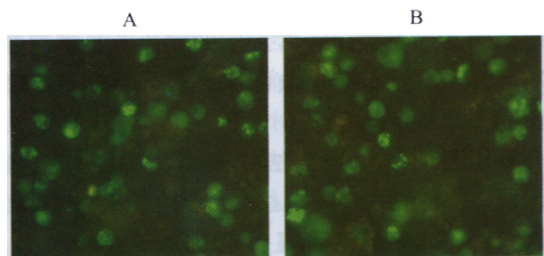


图 5 CD4 缺失突变体融合 Fas 基因诱导的 HEK293 细胞凋亡

Fig.5 Detection of apoptosis percent of HEK293 cells induced by D1D2-Fas and D3D4-Fas fusion gene

A: HEK293 transiently transfected by pEGFP-N1/D1D2-Fas; B: HEK293 transiently transfected by pEGFP-N1/D3D4-Fas.

同,HEK293/D1D2 及 HEK293/D3D4 细胞均不能与 Raji 细胞形成玫瑰花环(图 6)。实验结果显示,CD4 分子虽然主要通过其 D1 与 MHC-II 类分子结合,但这种结合的稳定性依赖于 CD4 分子通过其 D4 形成同源二聚化。也就是说,CD4 分子与 MHC-II 类分子之间的稳定结合,其 D1 和 D4 缺一不可。

2.7 HEK293/CD4 1、2 号稳定克隆的荧光强度及黏附比较

收集 1、2 号克隆各 30 个细胞,计算平均荧光强度发现,1 号克隆的荧光强度约为 2 号克隆的 2 倍(1 号克隆平均荧光强度值 ≈ 47.81 , 2 号克隆平均荧光强度值 ≈ 21.85)。通过细胞黏附实验发现,1 号克隆能够与 Raji 细胞形成玫瑰花环,而 2 号克隆却不能(图 7)。这个实验进一步向我们验证:CD4 分子在细胞膜表面不仅以单体形式存在,还可能以同源二聚体的形式存在,并且二聚化形式的 CD4 分子才能够稳定的与 MHC-II 类分子结合。

3 讨论

CD4 分子是一类单链跨膜糖蛋白,表达于胸腺及成熟的 T 淋巴细胞表面。作为共受体分子,它通过与 MHC-II 类分子非多态区的结合增强了 T 细胞与抗原提呈细胞之间的亲和力,而这一步在 T 细胞

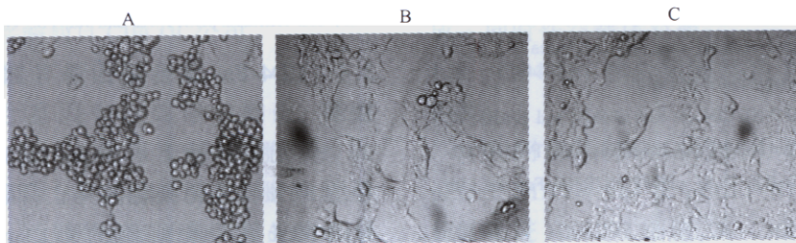


图 6 HEK293/D1D2 及 HEK293/D3D4 细胞与 Raji 细胞之间的黏附

Fig.6 Cell adhesion between HEK293/D1D2 or HEK293/D3D4 with Raji

A: cell HEK293/CD4 with Raji; B: cell HEK293/D1D2 with Raji; C: cell HEK293/D3D4 with Raji.

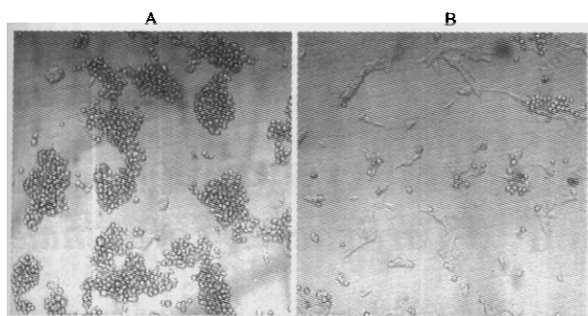


图7 HEK293/CD4 1、2号稳定克隆与 Raji 细胞之间的黏附
Fig.7 Cell adhesion between HEK293/CD4 number 1 and 2 clone with Raji

A: cell HEK293/CD4 number 1 clone with Raji; B: cell HEK293/CD4 number 2 clone with Raji.

激活过程中非常关键。激活的 T 细胞参与移植排斥反应以及一系列自身免疫性疾病的发生^[1]。从结构上来看,CD4 分子的胞外区包含有 4 个 Ig 样结构域(D1, D2, D3, D4)。近年来一些研究者通过点突变分析确定 CD4 分子远膜端的 D1 及 D2 结构域主要参与 CD4 分子和 MHC-II 类分子及 HIV 包膜糖蛋白 gp120 的结合,而近膜端 D3 及 D4 结构域则介导 CD4 分子的二聚化或寡聚化^[2-6]。但也有些研究者认为 CD4 分子的 D4 结构域介导其二聚化形式的形成,二聚化的 CD4 分子进一步通过 D1 结构域的 CDR3 及 C-C' 环寡聚化^[7]。不管怎样,研究一致认为,CD4 二聚化及寡聚化能通过增加 CD4 分子与 MHC-II 类分子之间相互作用的亲和力稳定 CD4 与 MHC-II 类分子的结合。二聚化及寡聚化形式的 CD4 分子有助于 TCR 与其配体分子之间的稳定和交联,从而提高 T 细胞抗原识别的敏感性及特异性。

但是,由于 CD4 分子形成同源二聚化的亲和力很低,因此我们很难用通常的生化方法对其进行检测^[6,7]。本实验通过设计三个独立实验,间接鉴定了 CD4 分子二聚化形式的存在,并对其介导的生物学功能,尤其是与 MHC-II 类分子之间的结合作用进行了初步分析。首先,我们将 CD4 分子与凋亡相关基因 Fas 的胞浆区融合,转染进 HEK293 细胞后发现:CD4-Fas 融合基因能导致 80% 转染靶细胞的死亡。为了排除 Fas 基因自身的细胞毒性^[8,9]以及脂质的细胞毒性,我们同时作了转染 FKBP12-Fas 融合基因和 CD4 基因的对照(前者能导致 30% 左右转染靶细胞的死亡,而后者仅能导致 7% 转染靶细胞的死亡)。实验结果向我们提示,CD4 分子的确有可能于细胞膜表面形成同源二聚化,从而介导与其融合的 Fas 双聚,激活 Fas 的凋亡信号途径进而导致转染的 HEK293 细胞的死亡。其次,我们在筛选 HEK293/CD4 稳定细胞克隆的过程中发现,HEK293/CD4 细胞存在两类细胞克隆,1 号克隆的荧光强度约为 2 号的两倍,通过细胞黏附实验发现 1 号克隆

能够与 Raji 细胞形成玫瑰花环,而 2 号克隆却不能。这个实验进一步向我们提示:CD4 分子在细胞膜表面不仅以单体形式存在,还可能以同源二聚体的形式存在,并且二聚化形式的 CD4 分子才能够稳定的与 MHC-II 类分子结合。根据近年来的研究,我们认为 CD4 分子形成同源二聚化的位点存在于 D4,但不排除 D1 形成二聚化的可能性,因为 D1 和 D4 存在类似结构的 C-C' 环,而这个 C-C' 环是 CD4 分子形成同源二聚化的结构基础。为了确定这一点,我们分别构建了 CD4 分子 D1D2 缺陷型以及 D3D4 缺陷型融合 Fas 基因的表达质粒,转染 HEK293 细胞后发现,不论是 D1D2-Fas 还是 D3D4-Fas 融合基因均能导致 85% 以上的转染靶细胞的死亡。而细胞黏附实验显示:CD4 分子 D1D2 缺陷型基因以及 D3D4 缺陷型基因转染的 HEK293 细胞均不能与 Raji 细胞形成黏附,也就是说,CD4 分子的缺失突变体包括 D1D2 缺陷型以及 D3D4 缺陷型均不能与 MHC-II 类分子结合。实验进一步向我们验证,1:CD4 分子的确能够通过其 D4 及 D1 形成二聚化;2:CD4 分子虽然主要通过其 D1 与 MHC-II 类分子结合,但这种结合的稳定性依赖于 CD4 分子通过其 D4 形成同源二聚化。也就是说,CD4 分子与 MHC-II 类分子之间的稳定结合,其 D1 和 D4 缺一不可。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Huang Z, Li S, Korngold R. Immunoglobulin superfamily proteins: structure, mechanisms, and drug discovery. *Biopolymers*, 1997, 43(5):367-382
- [2] Wu H, Kwong PD, Hendrickson WA. Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature*, 1997, 387(29):527-530
- [3] Sakihama T, Smolyar A, Reinherz EL. Oligomerization of CD4 is required for stable binding to class II major histocompatibility complex proteins but not for interaction with human immunodeficiency virus gp120. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(8):6444-6448
- [4] Sakihama T, Smolyar A, Reinherz EL. Molecular recognition of antigen involves lattice formation between CD4, MHC class II and TCR molecules. *Immunology Today*, 1995, 16(12):581-587
- [5] Lynch GW, Sloane AJ, Raso V *et al.* Direct evidence for native CD4 oligomers in lymphoid and monocytoid cells. *Eur J Immunol*, 1999, 29(8):2590-2602
- [6] Moldovan MC, Yachou A, Levesque K *et al.* CD4 dimers constitute the functional component required for T cell activation. *J Immunol*, 2002, 169(11): 6261-6268
- [7] Li S, Satoh T, Korngold R *et al.* CD4 dimerization and oligomerization: implication for T-cell function and structure-based drug design. *Immunology Today*, 1998, 19(10):455-462
- [8] Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z *et al.* A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem*, 1995, 270(14): 7795-7798
- [9] Maccorkle RA, Freeman KW, Spencer DM. Synthetic activation of caspases:artificial death swithes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(7):3655-3660