

## A 型流感病毒 PB1-F2 蛋白与 MOAP-1 的相互作用

崔雨明, 侯佩莉, 张茂林, 段铭, 关振宏\*

吉林大学人兽共患病教育部重点实验室, 人兽共患病研究所, 长春 130062

**摘要:** 【目的】探讨 A 型流感病毒 PB1-F2 蛋白和人类凋亡调节因子 1 (MOAP-1) 之间的相互作用。【方法】构建 pACT2-MOAP-1 重组质粒, 与 pGBKT7-PB1-F2 质粒共转化酵母 AH109, 检测转化菌在四缺培养基的生长情况及  $\beta$  半乳糖苷酶报告基因的活性; 利用 GST pull-down 和免疫共沉淀 (Co-IP) 技术进一步验证 PB1-F2 与宿主细胞蛋白 MOAP-1 的相互作用; 通过过表达 PB1-F2 和 MOAP-1, 检测 PB1-F2 对 MOAP-1 蛋白表达水平的影响。【结果】酵母双杂交结果表明, PB1-F2 和 MOAP-1 可以在酵母细胞内特异性结合。GST pull-down 和 Co-IP 实验也进一步证实了这两种蛋白的相互作用, 而且 PB1-F2 可上调外源 MOAP-1 的蛋白水平。【结论】流感病毒 PB1-F2 与 MOAP-1 存在相互作用, PB1-F2 可能通过与 MOAP-1 的相互作用参与调控细胞生长及凋亡过程。

**关键词:** A 型流感病毒, PB1-F2, MOAP-1, 蛋白相互作用

**中图分类号:** Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 09-1122-07

PB1-F2 是在寻找 A 型流感病毒 (AIV) 感染后呈递到 CD8 + T 细胞的未知多肽的研究中发现的<sup>[1]</sup>。它是由聚合酶亚单位 PB1 基因中的第 2 个读码框编码的, 因此被命名为 PB1-F2。定位于线粒体的内膜和外膜的 PB1-F2, 通过其羧基末端的线粒体定向序列诱导细胞凋亡<sup>[2]</sup>。与流感病毒其他蛋白相比, PB1-F2 有一些独特的特点: 它由 PB1 基因内的可变阅读框编码, 并且不同的 IAV 分离株 PB1-F2 长度各异; 在每个病毒感染细胞中的表达水平是不同的, 表现出快速的蛋白酶体介导的降解; 在表达细胞中, 约 50% 的 PB1-F2 定位于线粒体<sup>[1]</sup>。目前它被认为是与线粒体蛋白 ANT3 和 VDAC1 结合, 改变线粒体膜通透性, 导致线粒体损伤, 细胞色素 C

的释放和随后的凋亡的发生<sup>[2-4]</sup>。此外, 它还能与 PB1 亚单位相互作用, 上调病毒聚合酶的活性<sup>[5]</sup>。虽然 PB1-F2 不是病毒包装所必需的蛋白, 但它在病毒的致病性和复制增殖中发挥重要的作用。PB1-F2 作为一个新的流感病毒的毒力因子, 导致流感感染后发生继发的细菌感染<sup>[6-7]</sup>。研究表明 PB1-F2 能直接诱导线粒体膜的渗透性增强, 并能增强 Bid 的促凋亡作用<sup>[8]</sup>。PB1-F2 的详细作用机制尚不清楚, 因此研究它与宿主细胞蛋白的相互作用, 是研究蛋白分子作用机制及病毒致病机制的重要方面。

凋亡调节因子 1 (modulator of apoptosis 1, MOAP-1) 最初命名为 MAP-1, 是在利用 Bax 作为诱饵的酵母双杂交筛选过程中被首次分离的蛋白<sup>[9]</sup>,

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (30800824); 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (2012CB518900)

\* 通信作者。Tel /Fax: +86-431-87836715; E-mail: gzheileen@163.com

**作者简介:** 崔雨明 (1988 -), 男, 辽宁盘锦人, 硕士研究生, 主要从事流感病毒与宿主相互作用方面的研究。E-mail: cuiyuming25@163.com

**收稿日期:** 2012-05-15; **修回日期:** 2012-06-04;

诱导细胞凋亡时可与 Bax 相互作用。MOAP-1 包含一个 BH3 类似基序, 当在哺乳动物细胞中过表达时能够引发凋亡<sup>[10]</sup>。凋亡刺激物促使 Bax 从胞浆移位到线粒体, 诱发其与 MOAP-1 发生相互关联。另外, 死亡受体活化后, MOAP-1 可与肿瘤抑制剂 RASSF1A 相互作用, 并与死亡受体形成复合体, 这个复合体是随后的 Bax 构象变化和凋亡所必须的<sup>[11-12]</sup>。活化的 K-Ras 也被发现能够增强 RASSF1A-MOAP-1 的相互作用, 导致 Bax 活化和细胞死亡<sup>[13]</sup>。因此, 我们推测 PB1-F2 与 MOAP-1 蛋白之间可能存在相互作用。

本研究构建了 MOAP-1 酵母表达载体, 首先在酵母双杂交系统中检测了 PB1-F2 和 MOAP-1 在酵母细胞内的相互作用。利用 GST pull-down 和 Co-IP 实验进一步验证这两种蛋白之间的相互作用, 为研究 PB1-F2 的作用机制及流感病毒的致病机制提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒、菌种和细胞株:** pGBKT7-PB1-F2、pGEX-6P-1-PB1-F2 和 pEGFP-PB1-F2 表达载体以及 pACT2 和 pcDNA3.0-FLAG 空载体由吉林大学人兽共患病研究所病毒室保存, PB1-F2 基因来源于流感病毒 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)。大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 和 SV40 转化的人胚胎肾细胞 293T 由本实验室保存。

**1.1.2 主要试剂:** Matchmaker GAL4 Two-hybrid System 3 酵母双杂交系统, AD 克隆质粒 pACT2、酵母菌株 AH109、人工合成营养缺陷型培养基 SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade、X- $\alpha$ -半乳糖苷酶 (X- $\alpha$ -gal) 均购自 Clontech 公司; Etoposide、鲑鱼精 DNA、醋酸锂、PEG 3350 和抗 FLAG 单克隆抗体 M2 偶联的琼脂糖凝胶 (anti-FLAG M2-Agarose) 购自 Sigma 公司; 酵母质粒小提试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。所需的限制性内切酶、高保真 *pfu* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、反转录酶均购自 TaKaRa 公司; Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 购自 Invitrogen 公司。抗 FLAG 和 GFP 标签的单克隆抗体、辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠和羊抗兔 IgG 均购自 Santa Cruz 公司; 其它试剂均为国产或进口分

析纯。

### 1.2 重组质粒 pACT2-MOAP-1 的构建

收集生长状态好的 293T 细胞, 用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA。反转录反应根据 M-MLV 反转录酶说明书方法进行。以 cDNA 为模板, 按常规方法用高保真的 *pfu* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。根据 GenBank 上已经发表的 MOAP-1 的序列设计了一对引物, 用于扩增 MOAP-1 的全长基因 (MOAP-1 的编码区为 1056 bp)。引物序列如下: 上游引物: 5'-CGGAATTCGAATGACTTTGAGGCTTTTAGAAG-3' (含 *EcoR* I 酶切位点); 下游引物: 5'-CCGCTCGAGTCAGGTGAAATTACCTTCCAATATTG-3' (含 *Xho* I 酶切位点)。反应程序如下: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后, 按以下参数进行 30 次循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 58 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

上述方法扩增的 MOAP-1 的 PCR 产物, 用 *EcoR* I 及 *Xho* I 双酶切后克隆于用同样酶切的 pACT2 酵母载体中。PCR 和酶切鉴定获得的阳性重组质粒进行 DNA 测序分析。

### 1.3 MOAP-1 真核及原核表达载体的构建

以 pACT2-MOAP-1 质粒为模板, 用下列引物进行亚克隆。纯化后的 PCR 产物用 *Bam*H I 和 *EcoR* I 双酶切消化, 回收的酶切产物, 分别与经同样内切酶消化的 pGEX-6P-1 及 pcDNA3.0-FLAG 载体用 T4 连接酶进行连接, PCR 鉴定和酶切鉴定阳性的克隆进行测序验证。构建 pcDNA3.0-FLAG-MOAP-1 和 pGEX-6P-1-MOAP-1 载体的上游引物: 5'-CGGGATCCATGACTTTGAGGCTTTTAGAAG-3' (含 *Bam*H I 酶切位点); 下游引物: 5'-CCGCTCGAGTCAGGTGAAATTACCTTCC-3' (含 *Xho* I 酶切位点)。

### 1.4 酵母双杂交系统检测 PB1-F2 与 MOAP-1 的相互作用

用 PEG/LiAc 法, 按照 Clontech 公司酵母双杂交系统 3 说明书转化酵母菌。分以下 4 组: 1. pGBKT7-PB1-F2 + pACT2-MOAP-1; 2. pGBKT7-P53 + pACT2-T antigen (阳性对照); 3. pGBKT7 + pACT2; 4. pACT2-T + pGBKT7-LaminC (阴性对照)。把 4 组转化菌分别接种于 SD/-Trp-Leu (二缺) 固体平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 2-4 天。将单个菌落接种于 SD/-Trp-Leu-His-Ade (四缺) 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养

2-4 天,观察酵母菌的生长情况。进一步利用滤纸法定性检测  $\beta$  半乳糖苷酶报告基因的活性。

### 1.5 重组蛋白的表达与纯化

测序正确的 pGEX-6P-1-PB1-F2 或 pGEX-6P-1-MOAP-1 重组质粒分别转化 *E. coli* BL21,挑单菌落于含氨苄青霉素(Amp)的液体 LB 培养基中,37℃ 培养过夜。将过夜菌按 1/100 接种量转接,37℃ 摇菌至  $OD_{600}$  值 0.6-0.8 之间时,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,16℃ 诱导表达过夜。收集菌体,重悬于 PBS (加入终浓度为 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 1% Triton X-100) 中,超声破碎后高速离心,上清、沉淀及对照样品进行 SDS-PAGE 电泳分析。收集大量上述诱导菌超声破碎的上清液,加入适量谷胱甘肽 Sepharose 4B 凝胶,4℃ 结合过夜;用 PBS 充分洗脱掉未结合蛋白质后,沉淀即为纯化的 GST-PB1-F2 或 GST-MOAP-1 融合蛋白。

### 1.6 GST pull-down 实验

将 293T 细胞接种到 10 cm 板上,培养过夜,使细胞达到 80% 的汇合度。根据 Invitrogen 公司说明用 Lipofectamine™ 2000 试剂将 pcDNA3.0-FLAG-MOAP-1 或 pEGFP-PB1-F2 质粒转染细胞,培养 24 h 后,用裂解液 [50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L DTT, 0.1% NP-40, 20% 甘油以及 0.1% 蛋白酶抑制剂] 裂解细胞,超声破碎后高速离心收集上清;谷胱甘肽 Sepharose 4B 纯化的融合蛋白 10  $\mu$ L 加入 EP 管中,用 PBS 洗涤 3 次,然后加入到上述细胞裂解液中。阴性对照以凝胶纯化的 GST 蛋白代替 GST-PB1-F2 或 GST-MOAP-1 融合蛋白。4℃ 结合 3 h,再用缓冲液洗 Sepharose 凝胶珠 4 次,进行 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 免疫印迹分析。

### 1.7 免疫共沉淀实验

利用转染试剂 Lipofectamine™ 2000 将质粒 pEGFP-PB1-F2 和 pcDNA3.0-FLAG-MOAP-1 共同瞬时转染 293T 细胞,同时转染质粒空载体作对照,培养 48 h 后收获细胞。用 0.5 mL 细胞裂解液裂解细胞,超声后取上清做免疫共沉淀实验<sup>[14]</sup>。取含相等量蛋白的上清加 25  $\mu$ L 抗 FLAG 单克隆抗体 M2 偶联的琼脂糖凝胶珠悬液,4℃ 孵育 4 h,回收凝胶珠子,用细胞裂解液洗涤 4 次。最后,沉淀与未结合琼脂糖凝胶珠的细胞裂解液(作为内参 Input)一起进行 SDS-PAGE 电泳分析,用抗 GFP、FLAG 标签蛋白

的抗体进行 Western blot 免疫印迹分析,检测蛋白质之间是否相互作用。

### 1.8 Western blot 分析

样品进行 SDS-PAGE 后,电转移至 PVDF 膜,然后用 5% 脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜,加入用 5% 脱脂奶粉稀释的一抗(抗 GFP 和抗 FLAG 的单克隆抗体),室温轻摇 1 h;TBST 洗膜 3 次后,加入用 5% 脱脂奶粉稀释的二抗(抗 GFP 抗体为辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠 IgG,抗 FLAG 抗体为辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔 IgG),室温轻摇 1 h, TBST 洗膜 3 次后,用 ECL 化学发光法显色 5 min,压片显影。

## 2 结果

### 2.1 载体的构建与鉴定

设计适当引物,以 293T 细胞 cDNA 为模板扩增 MOAP-1 基因,获得预期大小的 1056 bp 片段,经 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切,克隆于相同双酶切后的 AD 载体 pACT2 质粒,从而构建出重组目标质粒 pACT2-MOAP-1,其 PCR 鉴定及酶切鉴定如图 1,测序结果表明序列与 GenBank 上公布的 MOAP-1 基因相符。构建的 pGEX-6P-1-MOAP-1 及 pcDNA3.0-FLAG-MOAP-1 重组质粒经双酶切后得到的片段与预期结果一致(结果未显示)。

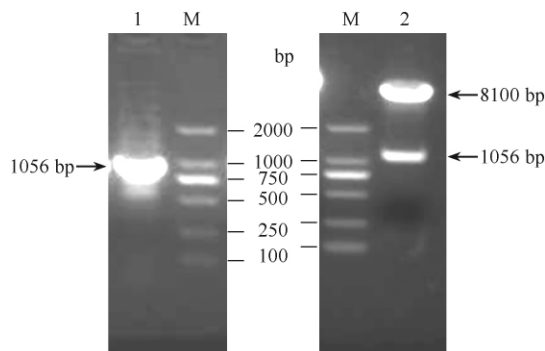


图 1 重组质粒 pACT2-MOAP-1 的鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pACT2-MOAP-1. M. DNA Marker DL 2 000; 1. PCR product; 2. Product from pACT2-MOAP-1 digested by *EcoR* I and *Xho* I.

### 2.2 PB1-F2 与 MOAP-1 在酵母菌中的相互作用

重组质粒 pGBKT7-PB1-F2 和 pACT2-MOAP-1 的共转化子在四缺陷平板上有生长现象,阳性对照共转化子生长最好,而阴性对照的共转化子没有任何生长(图 2-A)。滤纸法  $\beta$ -半乳糖苷酶活性检测

结果表明含 pGBKT7-PB1-F2 和 pACT2-MOAP-1 的酵母细胞和阳性对照能够产生蓝斑,而阴性对照则不能产生蓝斑(图 2-B)。酵母双杂交实验结果表明

PB1-F2 与 MOAP-1 两种外源蛋白在酵母细胞内同时存在且发生了相互作用。

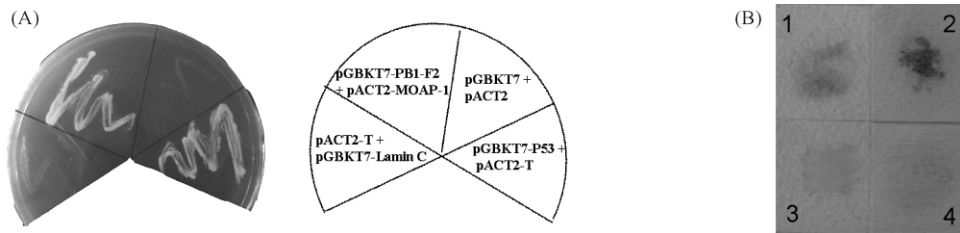


图 2 PB1-F2 与 MOAP-1 在酵母菌中的相互作用

Fig. 2 Interaction between PB1-F2 and MOAP-1 in yeast. A: Screening of positive clones using quadruple dropout plates; B: Detection of  $\beta$ -galactosidase activity. 1. pGBKT7-PB1-F2 + pACT2-MOAP-1; 2. pGBKT7-P53 + pACT2-T antigen (positive control); 3. pGBKT7 + pACT2; 4. pACT2-T + pGBKT7-Lamin C (negative control).

2.3 PB1-F2 与 MOAP-1 的体外相互作用

用 Lipofectamine™ 2000 试剂将 pcDNA3.0-FLAG-MOAP-1 或 pEGFP-PB1-F2 转染 293T 细胞,转染后 24 h 收获细胞。小号探头超声,取上清做 GST 沉淀实验。谷胱甘肽 Sepharose 4B 纯化的 GST-PB1-F2 或 GST-MOAP-1 融合蛋白及 GST 纯化蛋白分别与真核细胞表达的 MOAP-1 或 PB1-F2 蛋白混合后进行 GST 沉淀实验,沉淀物进行 Western blot 分析。正反两个方向的 GST pull-down 实验均表明 PB1-F2 与 MOAP-1 在体外特异性结合,而阴性对照 GST 不能与 MOAP-1 或 PB1-F2 蛋白结合(图 3)。

所示,证明了 PB1-F2 与 MOAP-1 在哺乳动物细胞内能特异地相互作用。

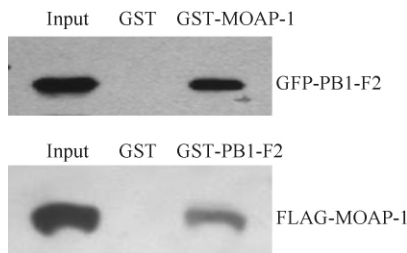


图 3 PB1-F2 和 MOAP-1 的 GST pull-down 实验

Fig. 3 GST pull-down assays of PB1-F2 and MOAP-1.

2.4 PB1-F2 与 MOAP-1 在哺乳动物细胞中的相互作用

GST 沉淀实验证明 PB1-F2 与 MOAP-1 在体外结合,需要细胞内的免疫共沉淀实验来进一步验证。将带有 FLAG 标签的 MOAP-1 和带有 GFP 标签的 PB1-F2 共转染 293T 细胞,并转染空载体作对照。用抗 FLAG 抗体偶联的琼脂糖珠免疫沉淀 MOAP-1,用抗 GFP 和 FLAG 抗体做 Western blot 分析,检测免疫沉淀物中是否含有 GFP-PB1-F2。结果如图 4

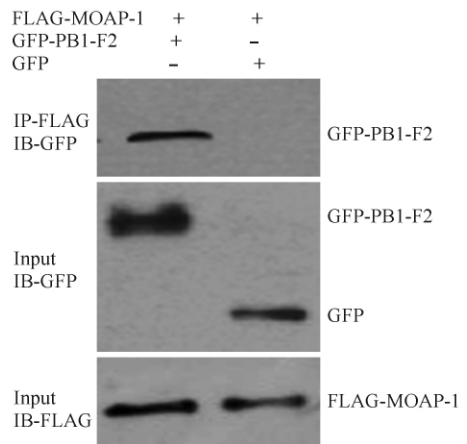


图 4 PB1-F2 和 MOAP-1 的免疫共沉淀实验

Fig. 4 Co-IP assay of PB1-F2 and MOAP-1.

2.5 PB1-F2 上调 MOAP-1 的蛋白水平

MOAP-1 在细胞内是低丰度蛋白,而且 MOAP-1 的表达水平是影响哺乳动物细胞对凋亡信号敏感性的重要决定因素<sup>[10]</sup>。因此,我们推测 PB1-F2 可能与 MOAP-1 相互作用而影响其蛋白表达。Etoposide 作为 DNA 拓扑异构酶的抑制剂,是一种广谱的抗肿瘤药物,能够引起多种细胞的凋亡。有研究证实,etoposide 是一种能够上调内源性 MOAP-1 的凋亡刺激物<sup>[15]</sup>。我们在 293T 细胞中过表达 MOAP-1 和 PB1-F2 蛋白,并且设置 PB1-F2 剂量梯度,用 etoposide (100  $\mu$ mol/L) 处理 12 小时后,检测外源性 MOAP-1 蛋白的表达水平。结果如图 5 所示,随着 PB1-F2 蛋白量增加,MOAP-1 的蛋白表达水平也呈递增趋势,即 PB1-F2 对 MOAP-1 的上调存在剂量依

赖关系。

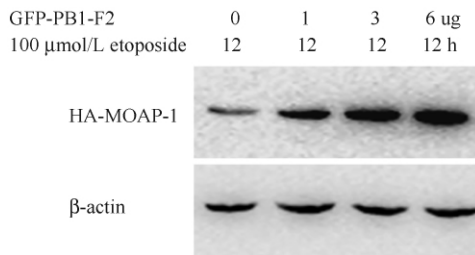


图5 PB1-F2 上调 MOAP-1 的蛋白水平

Fig. 5 PB1-F2 upregulates MOAP-1 protein level.

### 3 讨论

PB1-F2 是最近发现的流感病毒毒力相关蛋白,能靶向诱导肺泡巨噬细胞凋亡,不仅导致感染病毒的清除延迟,而且促进继发的细菌感染,有助于增强病毒的致病性。该蛋白是导致流感病毒高致病性的关键蛋白之一,1968年、1957年和1918年的3次流感大流行的流感病毒中都发现了这种蛋白<sup>[16]</sup>。许多研究均表明 PB1-F2 具有多种生物学功能,包括诱导细胞凋亡,增强炎症反应和调节病毒聚合酶的活性,而且这些特性表现出一定程度的毒株和宿主特异性<sup>[17]</sup>。PB1-F2 蛋白可能与病毒或宿主细胞中多种蛋白质相互作用,影响宿主细胞的多个信号转导通路,干扰和改变宿主细胞的生命活动。但是, PB1-F2 蛋白在病毒变异、复制和致病机制方面的确切机制尚不清楚,因此深入研究该蛋白与宿主蛋白的相互作用,将有助于揭示 IAV 的致病机理,从而为 IAV 感染的预防和治疗奠定基础。

线粒体是涉及细胞内信号转导和凋亡的生化执行者的主要细胞器。Bcl-2 家族蛋白是生存和凋亡信号的中心传导者,在调控线粒体功能和细胞色素 C 释放中起重要作用。Bax 和 Bak 是该家族中的促凋亡分子,可通过多重信号调控细胞凋亡。MOAP-1 是作为 Bax 相互作用蛋白被首次分离出来,是凋亡信号的关键调节者之一。它的表达水平在哺乳动物细胞中被严格的调控,半衰期大约为 25 min,被泛素蛋白酶系统选择性地降解<sup>[15]</sup>。当用 RNAi 干扰降低 MOAP-1 的表达时可抑制多种凋亡刺激物引发的凋亡信号,促使肿瘤细胞生长。在原代或肿瘤细胞系中,多种凋亡刺激信号均可通过抑制 MOAP-1 的泛素化过程而使其迅速地上调<sup>[18]</sup>。本研究发现,

过表达 PB1-F2 可上调 MOAP-1 蛋白表达,且上调作用存在剂量依赖关系。这一结果提示,流感病毒 PB1-F2 可能通过影响 MOAP-1 蛋白的稳定性而调控线粒体途径介导的细胞凋亡。

到目前为止,PB1-F2 诱导凋亡的作用机制尚不十分明确。本研究首先利用酵母双杂交系统证实了 PB1-F2 可能与凋亡调节因子 MOAP-1 发生相互作用。然后,正反两个方向的 GST pull-down 实验证明了 PB1-F2 蛋白能与 MOAP-1 蛋白在体外相互作用。免疫共沉淀实验也表明,PB1-F2 能与 MOAP-1 蛋白在哺乳动物细胞中特异地相互作用。进一步研究发现,PB1-F2 蛋白可上调外源性 MOAP-1 蛋白水平。本研究从分子水平上提供了 MOAP-1 和 PB1-F2 蛋白相互作用的实验依据,暗示 PB1-F2 可能通过与 MOAP-1 的相互作用发挥诱导细胞凋亡的作用,为深入探讨二者互作的生物学意义及在流感病毒发病过程中的作用提供了线索。

### 参考文献

- [1] Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature Medicine*, 2001, 7(12): 1306-1312.
- [2] Gibbs JS, Malide D, Hornung F, Bennink JR, Yewdell JW. The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *Journal of Virology*, 2003, 77(13): 7214-7224.
- [3] Yamada H, Chouhan R, Higashi Y, Kurihara N, Kido H. Mitochondrial targeting sequence of the influenza A virus PB1-F2 protein and its function in mitochondria. *FEBS Letters*, 2004, 578(3): 331-336.
- [4] Zamarin D, Garcia-Sastre A, Xiao X, Wang R, Palese P. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathogen*, 2005, 1: e4.
- [5] Mazur I, Anhlán D, Mitzner D, Wixler L, Schubert U, Ludwig S. The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiology*, 2008 10(5): 1140-1152.
- [6] McAuley JL, Hornung F, Boyd KL, Smith AM, McKeon

- R, Bennink J, Yewdell JW, McCullers JA. Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe*, 2007, 2 (4) : 240-249.
- [7] Conenello GM, Zamarin D, Perrone LA, Tumpey T, Palese P. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathogens*, 2007, 3 (10) : 1414-1421.
- [8] Giam M, Huang DC, Bouillet P. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene*, 2008, 27 Suppl 1: S128-136.
- [9] Tan KO, Tan KM, Chan SL, Yee KS, Bevort M, Ang KC, Yu VC. MAP-1, a novel proapoptotic protein containing a BH3-like motif that associates with Bax through its Bcl-2 homology domains. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (4) : 2802-2807.
- [10] Tan KO, Fu NY, Sukumaran SK, Chan SL, Kang JH, Poon KL, Chen BS, Yu VC. MAP-1 is a mitochondrial effector of Bax. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2005, 102 (41) : 14623-14628.
- [11] Baksh S, Tommasi S, Fenton S, Yu VC, Martins LM, Pfeifer GP, Latif F, Downward J, Neel BG. The tumor suppressor RASSF1A and MAP-1 link death receptor signaling to Bax conformational change and cell death. *Molecular Cell*, 2005, 18 (6) : 637-650.
- [12] Foley CJ, Freedman H, Choo SL, Onyskiw C, Fu NY, Yu VC, Tuszyński J, Pratt JC, Baksh S. Dynamics of RASSF1A/MOAP-1 association with death receptors. *Molecular and Cellular Biology*, 2008, 28 (14) : 4520-4535.
- [13] Vos MD, Dallol A, Eckfeld K, Allen NP, Donniger H, Hesson LB, Calvisi D, Latif F, Clark GJ. The RASSF1A tumor suppressor activates Bax via MOAP-1. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281 (8) : 4557-4563.
- [14] 李耀东, 关振宏, 严景华. 免疫共沉淀筛选细胞内与 A 型流感病毒 M2 蛋白相互作用的蛋白. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 49 (8) : 1081-1085.
- [15] Fu NY, Sukumaran SK, Yu VC. Inhibition of ubiquitin-mediated degradation of MOAP-1 by apoptotic stimuli promotes Bax function in mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2007, 104 (24) : 10051-10056.
- [16] Krumbholz A, Philipps A, Oehring H, Schwarzer K, Eitner A, Wutzler P, Zell R. Current knowledge on PB1-F2 of influenza A viruses. *Medical Microbiology and Immunology*, 2011, 200 (2) : 69-75.
- [17] Meunier I, von Messling V. PB1-F2 Modulates Early Host Responses but Does Not Affect the Pathogenesis of H1N1 Seasonal Influenza Virus. *Journal of Virology*, 2012, 86 (8) : 4271-4278.
- [18] Lee SS, Fu NY, Sukumaran SK, Wan KF, Wan Q, Yu VC. TRIM39 is a MOAP-1-binding protein that stabilizes MOAP-1 through inhibition of its poly-ubiquitination process. *Experimental Cell Research*, 2009, 315 (7) : 1313-1325.

# PB1-F2 protein of influenza A virus interacts with human MOAP-1 protein

Yuming Cui, Peili Hou, Maolin Zhang, Ming Duan, Zhenhong Guan\*

Key Laboratory of Zoonosis Ministry of Education, institute of zoonosis, Jilin University, Changchun 130062, China

**Abstract:** [Objective] To identify the interaction between influenza A virus PB1-F2 and human modulator of apoptosis 1 (MOAP-1). [Methods] The recombinant plasmid pACT2-MOAP-1 was constructed and co-transformed into yeast AH109 with pGBKT7-PB1-F2. The growth of the co-transformants on quadruple dropout medium and  $\beta$ -galactosidase activity of the reporter gene were tested. We further confirmed the interaction of cellular protein MOAP-1 and PB1-F2 by glutathione S-transferase (GST) pull-down and co-immunoprecipitation (Co-IP) assays. In addition, we investigated the effect of PB1-F2 on MOAP-1 protein level by Western blot. [Results] The results of yeast two-hybrid assay showed that MOAP-1 specifically interacted with PB1-F2 in yeast cells. Furthermore, the binding of MOAP-1 with PB1-F2 was demonstrated by glutathione S-transferase pull-down and Co-IP assays. PB1-F2 could upregulate exogenous MOAP-1 protein level. [Conclusion] These results suggested that influenza virus PB1-F2 interacted with MOAP-1 and it might be involved in the regulation of cell growth and apoptosis via association with MOAP-1.

**Keywords:** Influenza A virus, PB1-F2, MOAP-1, protein-protein interaction

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30800824) and the National Key Basic Research Program of China (973 Program) (2012CB518900)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-431-87836715; E-mail: gzheileen@163.com

Received: 15 May 2012/Revised: 4 June 2012

## 《微生物学报》投稿方式

2012年3月修订

从2006年起,本刊采用“稿件远程处理系统”,全面实行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

- (1) 远程投稿:请先登陆本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>, 点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿,请先进行“注册”,注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿,则可直接投稿。如果忘了用户名和密码,请联系本刊编辑部找回登录口令。
- (2) 收稿回执:编辑部看到远程投稿后,当日或者次日给作者发“收稿回执”,通知作者投稿成功。
- (3) 编辑部内审:编辑看到远程投稿后,还要对稿件进行内审。内审会有2个结果,直退或受理,请接到“受理通知”的作者再补交其它材料(纸样介绍信和稿件、受理费)。
- (4) 介绍信:为了保护知识产权,请作者提供“研究内容所属单位”出具的介绍信(请到本刊网页的“下载专区”中下载“介绍信”模板),要求责任作者(即通信作者)亲笔签名,并盖有公章。
- (5) 受理费:150元(2011年3月由原来的100元调为150元)。