DOI:10.19893/j.cnki.ydyxb.2025-0045

耳聋相关蛋白FCHSD2内耳相互作用蛋白的筛选与鉴定

翟晓燕,杜嘉妮,洪银珊,杨彦玲*

(延安大学延安医学院,陕西 延安 716000)

摘 要:目的 以耳聋相关蛋白FCH和双SH3结构域蛋白2(FCH and double SH3 domains protein 2, FCHSD2)为钓饵,利用酵母双杂交筛选FCHSD2内耳相互作用蛋白,对蛋白相互作用进行验证,通过生物信息学分析FCHSD2与其内耳互作候选蛋白可能参与的信号转导通路,为揭示FCHSD2功能缺失导致渐进性听力障碍的分子机制提供新的线索。**方法** 构建pBD-Gal4-*musFchsd2*钓饵蛋白载体,通过酵母双杂交技术筛选鸡内耳cDNA文库筛选FCHSD2互作蛋白;利用免疫共沉淀和荧光共定位实验验证候选蛋白与FCHSD2的相互作用;通过生物信息学分析FCHSD2与候选蛋白共富集信号通路。**结果** FCHSD2在酵母系统中无自激活活性且无毒性,筛选获得内吞蛋白1(Intersectin1, ITSN1)、含SH3结构域的GRB2样蛋白1(SH3 domain-containing GRB2-like protein 1, SH3GL1)和泛素连接酶E2 I(Ubiquitin-conjugating enzyme E2 I, UBE2I)等候选互作蛋白;实验验证显示候选蛋白与FCHSD2存在相互作用;功能富集分析显示FCHSD2与ITSN1、SH3GL1等可能参与内吞、肌动蛋白聚合调控等过程。**结论** 内吞相关蛋白(ITSN1、SH3GL1)及泛素连接酶UBE2I与FCHSD2存在相互作用,它们与FCHSD2在内吞、肌动蛋白聚合调控等过程有富集。我们的研究为解析FCHSD2缺失引发静纤毛紊乱及渐进性听力损失的分子通路提供了关键靶点线索。

关键词:FCHSD2;酵母双杂交;免疫共沉淀;荧光共定位;生物信息学

中图分类号:R339.17 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2639(2025)03-0031-09

Screening and identification of cochlear interacting proteins for the deafness-associated protein FCHSD2

*ZHAI Xiaoyan, DU Jiani, HONG Yinshan, YANG Yanling**

(Yan'an Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, China)

Abstract: Objective Using the deafness-associated protein FCH and double SH3 domains protein 2(FCHSD2) as bait, this study aimed to screen for FCHSD2-interacting proteins in the inner ear via yeast two-hybrid (Y2H) assays, validate protein-protein interactions, and employ bioinformatics to analyze potential signaling pathways involving FCHSD2 and its candidate interactors. These efforts provide novel insights into the molecular mechanisms underlying progressive hearing loss caused by FCHSD2 deficiency. **Methods** A pBD-Gal4-*musFchsd2* bait protein vector was constructed to screen a chicken inner ear cDNA library using Y2H technology. Candidate interactions were validated via co-immunoprecipitation (Co-IP) and fluorescence co-localization assays. Bioinformatics tools were utilized to identify co-enriched signaling pathways associated with FCHSD2 and its interactors. **Results** FCHSD2 exhibited no auto-activation activity or toxicity in the yeast system. Screening identified candidate interacting proteins, including ITSN1 (Intersectin1), SH3GL1 (SH3 domain-containing GRB2-like protein 1), and UBE2I (Ubiquitin-conjugating enzyme E2 I). Experimental validation confirmed interactions between FCHSD2 and these candidates. Functional enrichment analysis revealed that FCHSD2, ITSN1, and SH3GL1 are likely involved in

基金项目:国家自然科学基金(82360223);延安大学科研项目(D2024065,YAU202507648)

作者简介:翟晓燕(1992—),女,山西吕梁人,讲师。研究方向:发育神经生物学。

* **通信作者:**杨彦玲(1972—),女,陕西子长人,教授。研究方向:中枢神经损伤与修复。E-mail:yangyanling8889@163.com

endocytosis and actin polymerization regulation. **Conclusion** Endocytosis-related proteins (ITSN1, SH3GL1) and the ubiquitin ligase UBE2I interact with FCHSD2, with co-enrichment in processes such as endocytosis and actin cytoskeleton regulation. These findings highlight key molecular targets for elucidating how FCHSD2 deficiency leads to stereocilia disorganization and progressive hearing loss.

Key words: FCHSD2; Yeast two-hybrid; Co-immunoprecipitation; Fluorescence co-localization; Bioinformatics

FCHSD2属于FCH与Bin-Amphiphysin-Rvs(F-BAR)家族一员,它包含N端的一个F-BAR结构域、中间两个SH3结构域和C端的脯氨酸富集区(Proline Rich Region, PRR),是经典的肌动蛋白(actin)调节蛋白之一[1-2]。F-BAR结构域能够通过反平行形式结合形成较为延展、弯曲程度较小的同源二聚体。F-BAR二聚体表面带有正电荷,能够与带负电荷的磷脂双分子层的细胞质膜结合[1]。SH3结构域及PRR区是与其他蛋白相互结合结构域。全长FCHSD2蛋白内部F-BAR与两个SH3结构域之间存在相互作用而导致其形成闭合失活构象,出现自抑制现象,需与其他蛋白质或与质膜结合方可解除自抑制被激活,进而调节actin聚合与解聚[1, 3-5]。Leonardo Almeida-Souza等[1]研究发现在网格蛋白介导的内吞(Clathrin-mediated endocytosis, CME)中支架蛋白ITSN1通过招募FCHSD2到内吞小泡(Clathrin-coated pits, CCP)细胞质膜的扁平处,激活N-WASP/ARP2/3通路,促进纤维状肌动蛋白(Fibros actin, F-actin)聚合,进而推动此处CCP成熟,使其从质膜脱落。Guan-Yu Xiao等[4]发现在非小细胞肺癌细胞中ERK1/2能通过激活FCHSD2加速CCP的起始速率,促进癌细胞表面表皮生长因子受体(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)内吞,减少其细胞膜表面滞留,从而抑制下游增殖和迁移信号。这些研究表明FCHSD2在网格蛋白介导的内吞过程中具有双重作用:促进网格蛋白介导的CCP的起始以及加速网格蛋白介导的CCP成熟。

课题组前期研究发现FCHSD2呈点状定位于小鼠耳蜗毛细胞静纤毛上,FCHSD2缺失小鼠表现出毛细胞静纤毛的紊乱与缺失,进而造成毛细胞的死亡,小鼠出现渐进性听力损失[6]。毛细胞顶端静纤毛是细胞膜包被F-actin的突起结构,FCHSD2可能通过调控F-actin聚合与解聚调控静纤毛维持,然而具体分子机制尚不明了[7]。

酵母双杂交技术广泛用于真核细胞内大规模筛选已知蛋白的未知相互作用蛋白[8],利用转录因子Gal4两个独立功能结构域即DNA结合结构域BD(DNA-Binding Domain)、转录激活结构域AD(Activation Domain)的分离与重组机制,将蛋白质相互作用转化为易于检测的报告基因表达[8-9]。本研究中我们构建了pBD-Gal4-*musFchsd2*钓饵蛋白酵母细胞表达载体,通过酵母双杂交筛选了鸡的内耳cDNA文库,利用酵母双杂交筛选了FCHSD2在内耳中可能的相互作用蛋白,为阐明FCHSD2在毛细胞静纤毛维持中的分子机制提出新的可能性。

1　实验材料与方法

1.1　实验材料及试剂

菌株AH109、质粒pBD-Gal4 Cam、pGADT7(AD vector)、氨基酸缺陷型培养基、SD固体及液体培养基、YPD固体及液体培养基均来自美国Clontech公司。ColiRollers™Planting Beads来自德国Merk公司。3-AT(3-氨基-1,2,4-三唑)、鱼精DNA、醋酸锂等从Sigma公司购买。PrimeSTAR DNA聚合酶、限制性核酸内切酶(如EcoR1、Sal1)、T4 DNA连接酶等购自TAKARA公司,质粒提取、纯化试剂盒购自美国OMEGA公司。Trans 5α、Trans1-T-1感受态细胞来自北京全式金公司。anti-Myc beads来自Sigma (Cat. No. E6654)。LipoMax转染试剂(Cat. No. 32012)购自Sudgen公司。Mouse anti-GFP单克隆抗体(Cat. No. M20004)购自Abmart公司,Mouse anti-Myc单克隆抗体(Cat. No. M4439)来自Sigma公司。HRP标记的羊抗鼠二抗(Cat. No. 170-6516)购自Bio-Rad。

1.2　实验方法

1.2.1　*诱饵载体pBD-Gal4-musFchsd2的构建及测序*　根据小鼠*Fchsd2*基因组数据库信息,设计*Fchsd2*基因CDS克隆引物(引物序列见表1),以小鼠耳蜗cDNA为模板进行PCR扩增,扩增产物与pBD-Gal4连接,转化Trans 5α感受态细胞,利用pBD-Gal4 Cam通用引物进行阳性克隆筛选,并将阳性菌液送Sanger测序及序列比对,正确的菌液提取重组质粒后测浓度放-20 ℃冰箱备用。

表1　引物序列信息

引物名称	引物序列(5′-3′)	用途
BD-Fchsd2-F/R	F：aagaattcatgcagccgccgcc R：agcccgggttcacaccagtgtgat	诱饵载体构建
BD检测F/R	F：gcctctaacattgagacagc R：aagagttactcaagaacaagaa	pBD-Gal4载体检测引物
AD检测F/R	F：aataccactacaatggatgatg R：agatggtgcacgatgcacag	pAD-Gal4载体检测引物
pEGFP-C2-*mus Itsn1* F/R	F：cggtaccgcatggctcagtttcccacacctt R：acccgggctacggctcatcaaacaact	候选蛋白Itsn1表达载体构建
pEGFP-C2-*mus Ube2i* F/R	F：agaattcatgtcggggatcgcc R：ccgtcgactttatgaggggcaaacttct	候选蛋白Ube2i表达载体构建
pEGFP-C2-*mus Sh3gl1* F/R	F：agaattcatgtcggtggcggggc R：ccgtcgacttcactgaggcagaggcacca	候选蛋白Sh3gl1表达载体构建
pEGFP-C2-*mus Sh3gl2* F/R	F：agaattcatgtcggtggcagggctg R：ccgtcgactctaatggggcagagcaacc	Sh3gl1同源家族蛋白表达载体构建
pEGFP-C2-*mus Sh3gl3* F/R	F：tcaagcttcatgtcggtggctgggctc R：ccgtcgactttacggaggtaaaggcac	Sh3gl1同源家族蛋白表达载体构建

1.2.2　pBD-Gal4-*musFchsd2*诱饵蛋白自激活检测　将pGADT7空载分别与pBD-Gal4(阴性对照)/pBD-Gal4-*musFchsd2*/pBD-Gal4-*musFchsd1*(阳性对照)转入AH109酵母菌中，利用无菌ColiRollers™-Planting Beads将菌液均匀涂布在SD/-Trp-Leu的二缺固体平板培养基上，30 ℃倒置培养直到培养基上长出较大的清晰单克隆酵母菌落(以下培养酵母菌均以此为标准)。配制不同3-AT浓度(0、2.5、5、7.5、10、12.5、15 mM)SD/-Trp-Leu-His固体培养基备用，挑选SD/-Trp-Leu培养基上的转化酵母菌落在不同3-AT浓度的SD/-Trp-Leu-His三缺板上划线，根据酵母菌生长情况选取抑制效应最低的3-AT浓度作为筛选文库的固体培养基最适浓度。

1.2.3　FCHSD2内耳相互作用蛋白筛选

1.2.3.1　转化　将pBD-Gal4-*musFchsd2*转化入AH109酵母菌，涂布于SD/-Trp一缺固体培养基上，30 ℃倒置培养数天。将鸡内耳cDNA文库转入扩大培养的酵母菌中。将菌液梯度稀释(1∶10，1∶100，1∶1000，1∶1000)分别均匀涂布到SD/-Trp-Leu计数板，30 ℃倒置培养数天。剩余的酵母菌液每500 μL均匀涂布9 cm SD/-Trp-Leu-His(5 mM 3-AT)大板，30 ℃倒置培养数天。

1.2.3.2　转化克隆计数　对计数板中的转化克隆计数，选取在30-300之间菌落数的计数板，根据公式：转化克隆数=1 μl菌液中的克隆×涂布菌液总体积。

1.2.3.3　阳性克隆筛选　将9 cm SD/-Trp-Leu-His(5 mM 3-AT)大板的克隆进行编号以划线的方式转接于新的三缺板，30 ℃倒置培养数天至最后一条线有清晰菌落生长。按同样划线的方式挑取上述新板中的菌并转接到新配制的9 cm SD/-Trp-Leu-His-Ade(5 mM 3-AT)固体培养基培养。对转接菌后新的三缺大板利用Z-buffer和X-gal进行显色，筛选出作用较强的阳性克隆。

1.2.3.4　提取阳性酵母克隆DNA并鉴定　提取1.2.3.1中SD/-Trp-Leu-His(5 mM 3-AT)平板上与阳性克隆相同编号的酵母菌DNA并将其转入Trans1-T-1感受态细胞，提取转化板上2~3个克隆的质粒，酶切鉴定一致后送Sanger测序。NCBI网站对测序结果进行比对寻找候选蛋白信息。

1.2.4　FCHSD2与候选蛋白相关表达载体的构建　利用NCBI在线设计相关表达载体的引物，以小鼠耳蜗cDNA为模板进行扩增。对获得的扩增目的片段与相应的载体进行连接、转化，转化后阳性克隆菌扩大培养后菌液送测序。测序结果比对正确的菌液抽提质粒放-20 ℃冰箱备用。

1.2.5　FCHSD2与候选蛋白相互作用的验证　采用荧光共定位和免疫共沉淀(Co-inmunoprecipitation，Co-IP)实验对相互作用进行进一步验证。在非洲绿猴肾成纤维细胞(CV-1 in Origin Simian-7，COS7)中转染相应表达载体，通过DAPI染色后，倒置相差荧光显微镜(Nikon)或共聚焦显微镜(LSM700，Zeiss)观察定位结果。在人胚肾293T细胞(Human Embryonic Kidney 293T，HEK-293T)细胞中转染pEGFP-C2/ pMyc-C2候选蛋白表达载体和pEGFP-

C2/ pMyc-C2-*Fchsd2* 表达载体。转染 24 h 后收集细胞总蛋白备用。根据实验需求设置实验组与对照组,而后将准备好的细胞总蛋白取出一部分作为内参,剩余样品按照实验组与对照组所需的过表达蛋白量,根据相同蛋白等体积原则,加入培养基中,对照组用 150 mM NaCl 细胞裂解液补齐,置于旋转摇床上 4 ℃孵育 2~4 h。而后清洗 Beads 上的非特异结合蛋白。Western blot 检测蛋白共沉淀情况。

1.2.6　生物信息学分析　(1)PPI 网络分析:以 FCHSD2 及内耳互作候选蛋白等输入 String 数据库进行 PPI 网络分析,利用 Cytoscape 软件对得到的结果进行可视化。

(2)GO(Gene Ontology)与 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)功能富集分析:将 PPI 分析得到的蛋白利用 Cytoscape 中 ClueGO 模块进行 GO 与 KEGG 功能富集分析,利用在线工具 Bioinformatics 对结果进行可视化。

2　结果

2.1　FCHSD2 内耳互作蛋白的筛选

根据小鼠 *Fchsd2* 基因组数据库信息,对鸡和小鼠 FCHSD2 氨基酸序列进行了比对,二者相似性为 85%(图 1),在进化上是相对保守的。因此,本研究采用小鼠 FCHSD2 为诱饵蛋白对鸡的内耳 cDNA 文库进行酵母双杂交筛选。通过自激活检测我们确定 5 mM 的 3-AT 浓度是抑制 pBD-Gal4-*musFchsd2* 的最低浓度,通过克隆计数板计数确定筛选了 2.3×10^6 个克隆,经 X-gal 和 SD/-Trp-Leu-His-Ade 培养基筛选后得到 29 个阳性克隆。通过测序和 NCBI 基因组数据库信息比对发现这 29 个克隆分为 7 个基因编码蛋白,相关信息如表 2 所示。其中内吞蛋白(Intersectin1, ITSN1)、含 SH3 结构域的 GRB2 样蛋白 1(SH3 domain-containing GRB2-like protein 1, SH3GL1)和泛素连接酶 E2 I(Ubiquitin-conjugating enzyme E2 I, UBE2I)分别有 19、3、3 个克隆,对其进行了后续的验证。

2.2　FCHSD2 与 ITSN1 相互作用的验证

酵母双杂交作为常用的筛选目的蛋白相互作用蛋白的手段有其不可替代的优势,但也有其不可忽视的缺点,如假阳性问题。因此,本文对筛选出的几个克隆数较多的阳性克隆进行了后续的验证。在 COS7 细胞中分别单独转染 pCS2-RFP-*Fchsd2* 和 pEGFP-C2-*Itsn1* 发现,FCHSD2 均匀定位于细胞质中,ITSN1 呈点状聚集于细胞质中。然而,当二者的表达载体共转时,FCHSD2 的定位转变为点状,并与 ITSN1 的点状分布聚集于一处,说明 ITSN1 能改变 FCHSD2 的定位,二者存在相互作用(图 2a)。使用 pCS2-RFP-*Fchsd2*$^{1-527aa}$(去除第二个 SH3 结构域及之后的部分,图 2b)再与 pEGFP-C2-*Itsn1* 共转时,发现 FCHSD2 仍在细胞质中均匀表达没有出现点状聚集,说明二者不再相互作用(图 2b)。通过 Alphafold 3 大模型预测了 FCHSD2 与 ITSN1 相互作用(iPTM=0.32,PTM=0.38),经解析二者的相互作用位点主要存在于 ITSN1 第四个 SH3 结构域与 FCHSD2 的第二个 SH3 结构域及之后的部分(图 2c)。这与之前 Leonardo Almeida-Souza 团队[1]研究结果一致,间接说明本研究中酵母双杂交结果是真实可信的。ITSN1 是一种多功能衔接和支架蛋白,其最显著的特征是在 5 个五个串联的 SH3 结构域(SH3 a-e),这在信号转导和细胞骨架蛋白中很常见[10]。ITSN1 在大脑中高度富集,可以直接或间接地与 F-actin 或 F-actin 调节因子(如 N-WASP 和 Cdc42)相互作用,参与调控细胞骨架[11-12]。

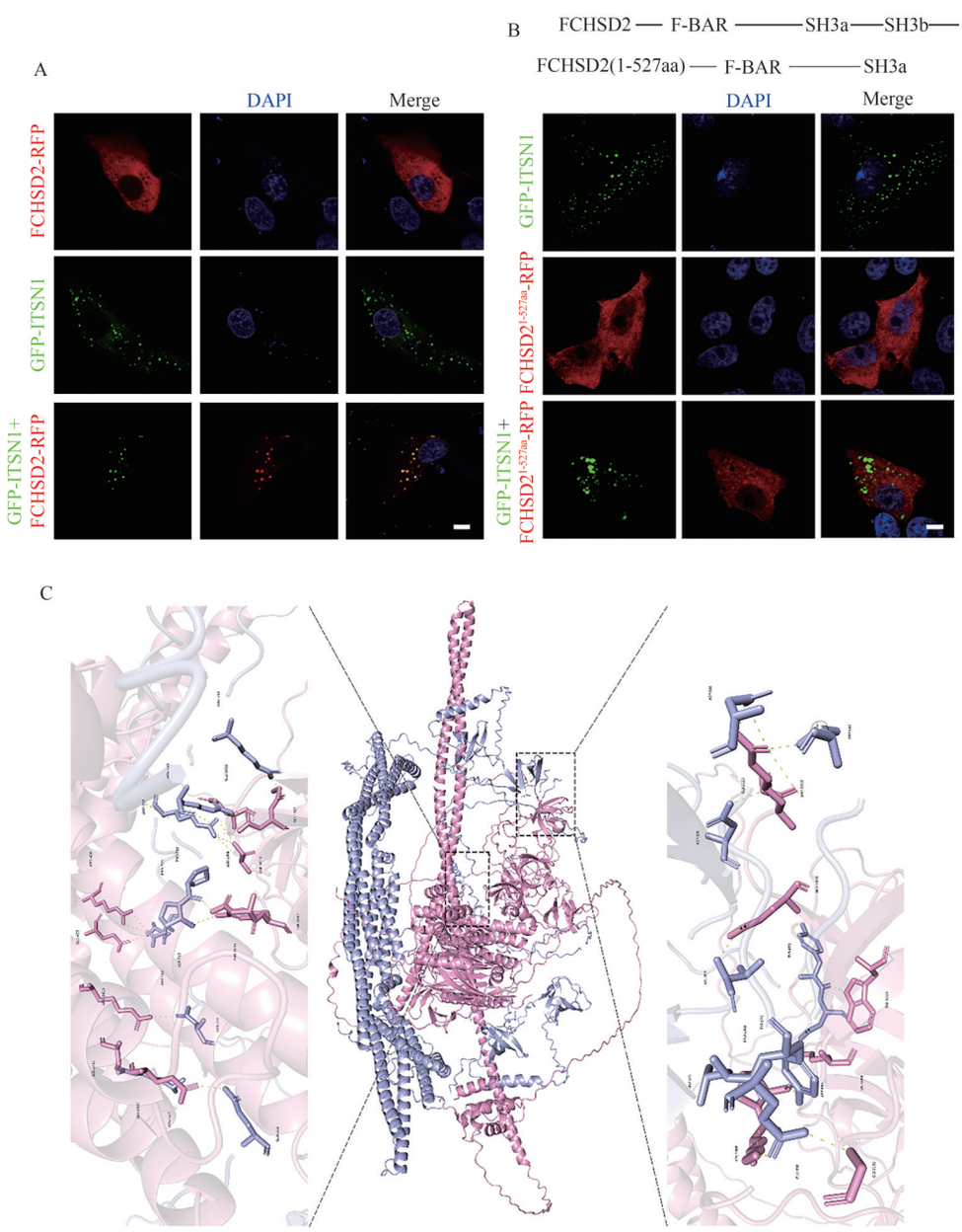
```
mus_Fchsd2      MQPPPRKVKVTQELRNIQGEQMTKLQAKHQAECDLLEDMRTFSQKKAAIEREYAQGIQKL
gg_Fchsd2       MQPPPRKVKVTQELKNIQVEQMTKLQAKHQAECELLEDIRAFSQKRAAIEKEYAQSIQKL
                **************:*** ***************:****:*:*****:****:****.*****

mus_Fchsd2      ASQYLKRDWPGIKTDDRNDYRSMYPVWKSFLEGTMQVAQSRINICENYKNFISEPARAVR
gg_Fchsd2       ASQYLKKDWLGMKADERADYRSMYSVWKSLLEGTMQVAQSRLNICENYKNLISEPARTVR
                ******:** *:*:*:* ******.****:************:*********:******:**

mus_Fchsd2      SLKEQQLKRCVDQLTKIQTELQETVKDLVKGKKKYFETEQMAHAVREKADIEAKSKLSLF
gg_Fchsd2       CFKEQQLKKYVDQLTRIQAELQETVKDLAKGKKKYFETEQMAQAVREKADIEAKSKLSLF
                .:******: ******:**:**********.***************:*****************

mus_Fchsd2      QSRISLQKASVKLKARRSECNTKATHARNDYLLTLAAANAHQDRYYQTDLVNIMKALDGN
gg_Fchsd2       QSRISLQKASVKLKARRSECNSKAIHARNDYLLTLAAANAHQDRYYQTDLVNIMKALDGN
                **********************:** ************************************

mus_Fchsd2      VYDHLKDYLIAFSRTELETCQAIQNTFQFLLENSSKVVRDYNLQLFLQENAVFHKPQPFQ
gg_Fchsd2       VYDHLKDYLMAFSRTELETCQAVQNTFQFLLETSSRVVRDYNLQQFLQENSVFHKPQPFQ
                **********:************:**********.**:********* *****:**********

mus_Fchsd2      FQPCDSDTSR----------------------------QLESETGTTEEHSLNKEARKWATRVA
gg_Fchsd2       FQPSDSDTSFNTVQLVDIEPSPVSAMRMTIAESRQLESETGTTEEHSLNKEARKWATRVA
                ***.*****                            ****************************

mus_Fchsd2      REHKNIVHQQRVLNELECHGVALSEQSRAELEQKIDEARESIRKAEIIKLKAEARLDLLK
gg_Fchsd2       REHKNIIHSQRTLEELECHGPVMSEQTRVELEQKIDEARESIRKAEIIKLKAEARLDLLK
                ******:*.**.*:****** .:***:*.**********************************

mus_Fchsd2      QIGVSVDTWLKSAMNQVMEELENERWARPPAVTSNGTLHSLNADAEREEGEEFEDNMDVF
gg_Fchsd2       QIGVSVDTWLKSAMNQVMEELENERWASLPSVTNNGSAHLINADAEKEEGEEFEDSMDVF
                **************************  *:**.**: * :*****:********.*****

mus_Fchsd2      DDSSSSPSGTLRNYPLTCKVVYSYKASQPDELTIEEHEVLEVIEDGDMEDWVKARNKVGQ
gg_Fchsd2       DDSSSSPSGTLRNYPLTCKVVYSYKASQPDELTIEEHEVLEVIEDGDMEDWVKARNKAGQ
                ************************************************************.**

mus_Fchsd2      VGYVPEKYLQFPTSNSLLSMLQSLAALDSRSHTSSNSTEAELVSGSLNGDASVCFVKALY
gg_Fchsd2       VGYVPEKYLQFPTSSSLLSMLQSLAALDSRSHTSNNSTEADLVSGSLNGDSSVCFVKALY
                **************.**********.******:**********:*********

mus_Fchsd2      DYEGQTDDELSFPEGAIIRILNKENQDDDGFWEGEFSGRIGVFPSVLVEELSASENGDTP
gg_Fchsd2       DYEGQTDDELSFPEGAIIRILNKENQDDDGFWEGEFNGRVGVFPSVLVEELTASENGETQ
                ************************************.**:***********:*****:*

mus_Fchsd2      WTREIQISPSPKPHTSLPPLPLYDQPPSSPYPSPDKRSSQFFPRSPSANENSLHAESPGF
gg_Fchsd2       WIGDIQVSPTPKPNHTLPPLPLYDQPPTSPFHSPDKRGSQYFPRSPSTNENSFSSESPGF
                *  :**:**:***: :************:**: ******.**:*******:****: :*****

mus_Fchsd2      SQASRQTPDTSYGKLRPVRAAPPPPTQNHRR-TTEKMEDVEITLV
gg_Fchsd2       SQPPRLPPETSYGKLRPVRAAPPPPTQQHHRRPTEKIEDVEITLV
                **..* .*:*********************:*:* .***:*********
```

"*"表示相同氨基酸,":"表示性质较强相近的氨基酸,"•"表示性质微弱相近的氨基酸。

图 1　鸡与小鼠 FCHSD2 氨基酸序列比对

表2　FCHSD2内耳候选互作蛋白信息

蛋白名称	GenBank登录号	克隆数
Intersectin 1（ITSN1）	LOC 418506	19
SH3-domain GRB2-like 1（SH3GL1/ Endophilin A2）	LOC 395202	3
Ubiquitin-conjugating enzyme E2I（UBE2I）	LOC 374123	3
ATP-binding cassette（Abcb10）	LOC 421537	1
SNW domain containing 1（Snw1）	LOC 423381	1
sperm associated antigen 6（Spag6）	LOC 420505	1
RNA polymerase II subunit F（Polr2F）	LOC 395486	1

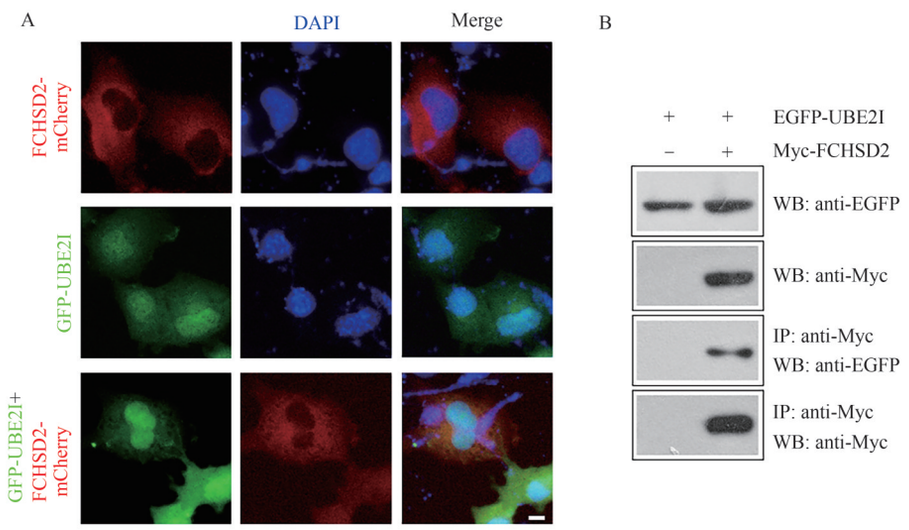


A：COS7细胞共转染FCHSD2-RFP、GFP-ITSN1融合蛋白表达载体，DAPI染料对细胞核染色，标尺：5 μm。B：FCHSD2截断结构示意图，COS7细胞共转染FCHSD2$^{1-527aa}$-RFP、GFP-ITSN1融合蛋白表达载体，DAPI染料对细胞核染色，标尺：5 μm。C：Alphafold3大模型预测FCHSD2与ITSN1相互作用（<3.4Å），紫色表示FCHSD2，粉色表示ITSN1。

图2　FCHSD2与ITSN1相互作用分析

2.3　FCHSD2与UBE2I相互作用的验证

小泛素样修饰(Small Ubiquitin-like Modifier，SUMO)涉及广泛的生物过程，包括转录调节、染色质结构和DNA修复，以及蛋白质-蛋白质相互作用和亚细胞定位。UBE2I也称为SUMO E2连接酶，在许多生理过程中发挥作用。本研究通过荧光共定位实验发现UBE2I主要在细胞核中表达，与FCHSD2-mCherry融合表达载体共转后都有细胞质表达的部分，但无法确认二者是否存在共定位。通过Co-IP实验检测到UBE2I与FCHSD2能够共沉淀，表明二者存在相互作用(图3)。



A:ACOS7细胞共转染FCHSD2-mCherry、GFP-UBE2I融合蛋白表达载体，DAPI染料对细胞核染色，标尺:10 μm。B:HEK293T细胞中转染相应表达载体，提取总蛋白后进行Co-IP。IP表示用于免疫沉淀的抗体，WB表示用于Western blot检测的抗体。

图3　FCHSD2与UBE2I相互作用的验证

2.4　FCHSD2与SH3GL1相互作用的验证

我们对酵母双杂交筛选到的候选蛋白SH3GL1(又称Endophilin A2)与FCHSD2的相互作用也进行了验证。SH3GL1是内吞蛋白Endophilin A家族成员之一，包含N端的BAR结构域与C端的SH3结构域，在囊泡运输和神经递质释放方面发挥重要作用[13-14]。在听觉系统中Endophilin A缺陷型内毛细胞的膜片钳记录揭示了Ca^{2+}内流和胞吐作用的减少，被认为可反映CME受到损害。Endophilin A可能通过耦联胞吐作用和胞吞作用，助力膜修复和囊泡回收重建[15]，但并没有表明是Endophilin A家族哪个蛋白在听觉系统发挥必不可少的作用，因此我们分别构建了SH3GL1、SH3GL2、SH3GL3小鼠来源的表达载体，它们分别表示Endophilin A2、A1、A3[16]。同上，在COS7细胞中共转pmCherry-N1-*Fchsd2*和Endophilin A家族三个蛋白的pEGFP-C2融合表达载体。荧光定位结果显示，FCHSD2可能与SH3GL1、SH3GL2、SH3GL3都存在相同或相似的细胞质定位，但不确定是否存在相互作用(图4a)。因此，我们在HEK-293T细胞中转染FCHSD2的pEGFP-C2表达载体与SH3GL1、SH3GL2、SH3GL3 pMyc-C2表达载体，而后对提取的蛋白进行Co-IP实验。结果显示FCHSD2能够与SH3GL1、SH3GL2共沉淀，SH3GL3没有与FCHSD2共沉淀，表明FCHSD2仅与SH3GL1、SH3GL2存在相互作用(图4b)。

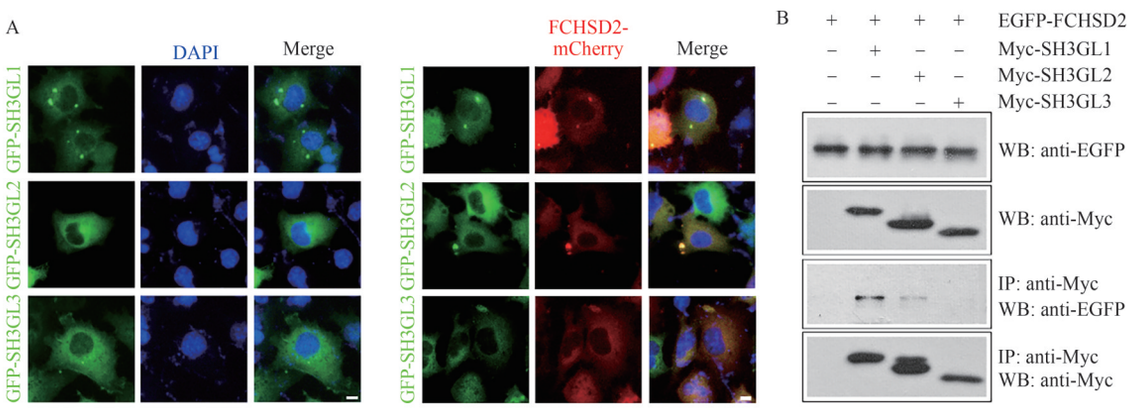
2.5　FCHSD2与内耳互作候选蛋白PPI网络及功能富集分析

将FCHSD2、ITSN1等互作相关蛋白的编码基因输入String数据库进行PPI网络互作分析，如图5a显示，这些基因构成了46个节点与324条边的一个互作网络。UBE2I由于其单独为节点与其他蛋白没有预测到相互关联而被排除。而后对PPI网络中相关基因进行了功能富集分析，GO富集结果如图5b显示，这些基因主要富集在Arp2/3介导的actin成核、突触囊泡内吞等9大类生物学过程(Biological Process，BP)。其中*Fchsd2*、*Itsn1*、*Sh3gl1*共有的生物学过程为内吞。KEGG富集结果显示，这些蛋白主要在内吞、肌动蛋白细胞骨架调控等通路中富集(图5c)。

3　讨论

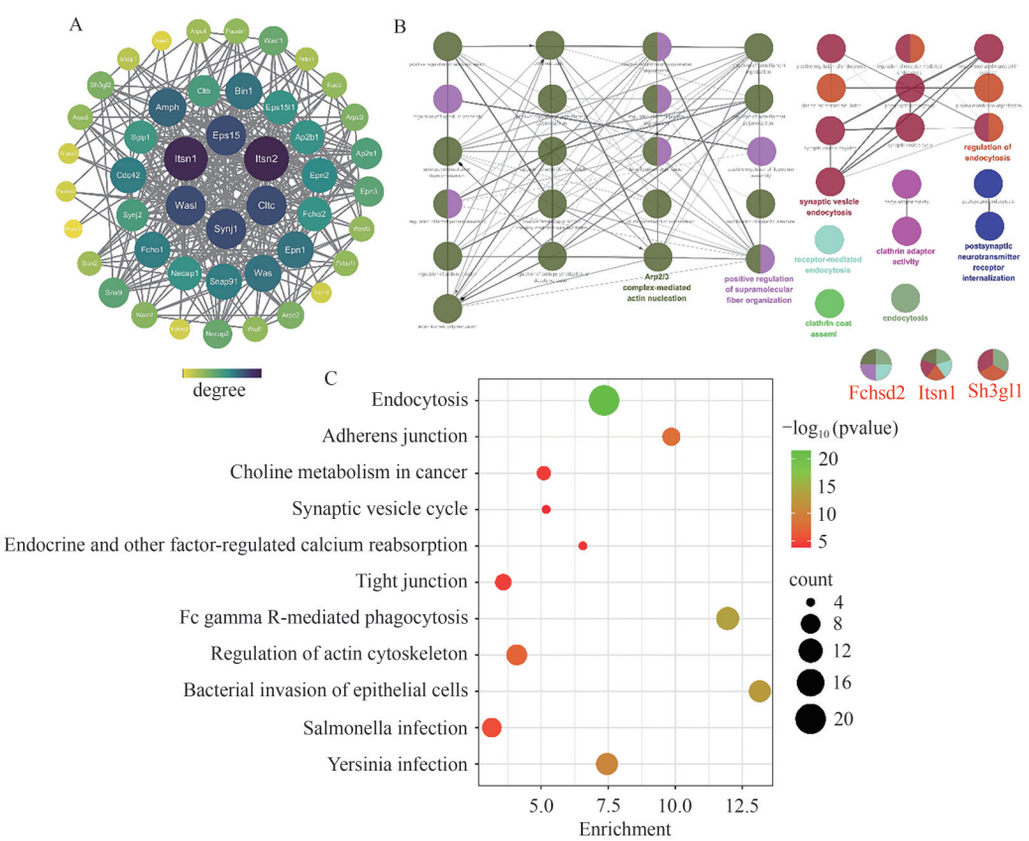
酵母双杂交作为低成本的大规模筛选已知蛋

白相互作用蛋白的分子生物学手段具有其独特的优势，其基于转录因子的模块化结构，将目标蛋白与转录因子的功能域结合，利用酵母细胞内的报告基因表达来间接反映蛋白质间的结合情况。但其筛选结果的准确性还需进一步验证，本文利用与鸡同源性较高的鼠源FCHSD2为诱饵蛋白筛选了鸡的内耳cDNA文库，筛选出3个超过1个克隆的阳性克隆，并对它们与FCHSD2的相互作用进行了验证。其中ITSN1和SH3GL1都具有SH3结构域，均与细胞骨架调控及内吞作用和囊泡运输有关。



A：COS7细胞共转染FCHSD2-mCherry、GFP-SH3GL1等融合蛋白表达载体，DAPI染料对细胞核染色，标尺：10 μm。B：HEK293T细胞中转染相应表达载体，提取总蛋白后进行Co-IP。IP表示用于免疫沉淀的抗体，WB表示用于检测的抗体。

图4　FCHSD2与UBE2I相互作用的验证



A：PPI网络互作分析，渐变颜色表示degree（一个节点与之相连的边的数量）由小到大变化；B：FCHSD2互作相关蛋白GO功能富集分析，每种颜色代表一种生理过程；C：FCHSD2互作相关蛋白KEGG富集分析。

图5　FCHSD2蛋白互作网络图的构建

ITSN1 作为一个大型的支架适配器,能够将神经末梢中的各种细胞过程相互连接,通过内吞作用调节突触囊泡的循环和细胞信号转导,ITSN1 与神经退行性疾病的发生密切相关[17-19]。PPI 网络分析结果显示,FCHSD2 与 ITSN1 有直接或通过常见的 actin 聚合调控相关蛋白 WASL、CDC42 等间接的相互作用。GO 及 KEGG 功能富集分析结果显示,FCHSD2 与 ITSN1 在内吞、受体介导的内吞、actin 聚合与解聚调控等方面有共同富集。结合 FCHSD2 与 ITSN1 在内耳中的相互作用,提示 ITSN1 可能通过内吞作用调节内耳毛细胞底部由囊泡介导的突触递质的释放与回收,这一猜测需要进一步验证。SH3GL1 与 Dynamin、Synaptojanin 等 F-actin 聚合调控蛋白通过网格蛋白介导的内吞作用和 F-actin 网络动态调控,在神经元突触囊泡回收中发挥作用[16]。GO 及 KEGG 功能富集分析结果显示,SH3GL1 与 FCHSD2 在内吞这一过程有共富集,SH3GL1 与 ITSN1 在突触囊泡内吞、内吞调节等方面共富集。在内耳中 SH3GL1 又通过胞吞、胞吐参与毛细胞底部突触囊泡回收[13]。因此,推测此蛋白与 FCHSD2 在内耳中的作用与听纤毛维持无关,可能参与突触递质释放和囊泡运输过程,这需要后续深入研究。SUMO 化修饰能改变蛋白构象,结果是调节蛋白质-蛋白质相互作用、活性或稳定性的改变,这些调节反过来影响各种细胞生物学过程,如核质运输、亚细胞定位、基因表达、细胞周期进程、染色质组织、DNA 修复、凋亡和印迹等[20]。UBE2I 作为 SUMO 连接酶可能在蛋白翻译后修饰中发挥作用,例如,卵泡发生过程中卵母细胞发育的调节中 SUMO 化修饰的缺失会影响减数分裂能力、纺锤体结构和染色体排列,导致卵母细胞发育缺陷[20-21]。UBE2I 被发现可抑制人类脂肪细胞分化,并且脂肪细胞中该酶的缺失已被证明会导致高胰岛素血症和肝脂肪变性[21]。这些发现强调了 UBE2I 在各种生物学过程中的多方面作用,包括肿瘤发生、性别决定和细胞分化,凸显了其作为各种疾病的治疗靶点和生物标志物的潜力。UBE2I 与 FCHSD2 在内耳中的相互作用对于 FCHSD2 调节毛细胞静纤毛维持方面的作用还有待深入研究,是否通过 SUMO 化直接或间接修饰 FCHSD2 而改变 FCHSD2 与其他蛋白相互作用需要进一步探索。

本研究通过酵母双杂交筛选出耳聋相关蛋白 FCHSD2 的内耳互作蛋白 ITSN1、SH3GL1 等,通过生物信息学分析得到了相关蛋白可能参与的信号转导通路为内吞及 actin 聚合与解聚调控等,为将来解析 FCHSD2 缺失引起渐进性听力损失的分子机制提供了新的思路和方向。

参考文献:

[1]ALMEIDA-SOUZA L, FRANK R A W, GARCÍA-NAFRÍA J, et al. A flat BAR protein promotes actin polymerization at the base of clathrin-coated pits[J]. Cell, 2018, 174(2): 325-337. e14.

[2]FRISBY D, MURAKONDA A B, ASHRAF B, et al. Endosomal actin branching, fission and receptor recycling require FCHSD2 recruitment by MICAL-L1[J]. bioRxiv, 2024:2024. 06. 27. 601011.

[3]XIAO G Y, MOHANAKRISHNAN A, SCHMID S L. Role for ERK1/2-dependent activation of FCHSD2 in cancer cell-selective regulation of clathrin-mediated endocytosis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(41): E9570-E9579.

[4]XIAO G Y, SCHMID S L. FCHSD2 controls oncogenic ERK1/2 signaling outcome by regulating endocytic trafficking[J]. PLoS Biology, 2020, 18(7): e3000778.

[5]CAO H R, YIN X L, CAO Y J, et al. FCHSD1 and FCHSD2 are expressed in hair cell stereocilia and cuticular plate and regulate actin polymerization *in vitro*[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56516.

[6]ZHAI X Y, DU H B, SHEN Y X, et al. FCHSD2 is required for stereocilia maintenance in mouse cochlear hair cells[J]. Journal of Cell Science, 2022, 135(16): jcs259912.

[7]MCGRATH J, ROY P, PERRIN B J. Stereocilia morphogenesis and maintenance through regulation of actin stability[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2017, 65: 88-95.

[8]GNANASEKARAN P, PAPPU H R. Yeast two-hybrid technique to identify protein-protein interactions[J]. Methods in Molecular Biology, 2023, 2690: 1-8.

[9]MITCH ELMORE J, VELÁSQUEZ-ZAPATA V, WISE R P. Next-generation yeast two-hybrid screening to discover protein-protein interactions[J]. Methods in Molecular Biology, 2023, 2690: 205-222.

[10]PECHSTEIN A, SHUPLIAKOV O, HAUCKE V. Intersectin 1: A versatile actor in the synaptic vesicle cycle[J]. Biochemical Society Transactions, 2010, 38(Pt 1): 181-186.

[11]MARTIN N P, MOHNEY R P, DUNN S, et al. Intersectin regulates epidermal growth factor receptor endocytosis, ubiquitylation, and signaling[J]. Molecular Pharmacology, 2006, 70(5): 1643-1653.

[12]HUMPHRIES A C, DONNELLY S K, WAY M. Cdc42 and the Rho GEF intersectin-1 collaborate with Nck to promote

N-WASP-dependent actin polymerisation[J]. Journal of Cell Science,2014,127(Pt 3):673-685.
[13]MEHAWEJ C,CHOUERY E,FARAH R,et al. Endophilin A2 deficiency impairs antibody production in humans[J]. Journal of Clinical Immunology,2024,45(1):37.
[14]CHAN WAH HAK L, KHAN S , DI MEGLIO I, et al. FBP17 and CIP4 recruit SHIP2 and lamellipodin to prime the plasma membrane for fast endophilin-mediated endocytosis[J], Nature Cell Biology,2018,20(9) 1023-1031.
[15]KROLL J, JAIME TOBON L M, VOGL C, et al. Endophilin-A regulates presynaptic Ca(2+) influx and synaptic vesicle recycling in auditory hair cells[J]. The EMBO Journal,2019,38(5):n. pag.
[16]SODA K , BALKIN D M , FERGUSON S M, et al. Role of dynamin, synaptojanin, and endophilin in podocyte foot processes[J]. Journal of Clinical Investigation, 2012, 122(12):4401-4411.
[17]YU Y,CHU P Y,BOWSER D N,et al. Mice deficient for the chromosome 21 ortholog Itsn1 exhibit vesicle-trafficking abnormalities[J]. Human Molecular Genetics,2008,17(21):3281-3290.
[18]SKULADOTTIR A T,TRAGANTE V,SVEINBJORNSSON G, et al. Loss-of-function variants in ITSN1 confer high risk of Parkinson's disease[J]. NPJ Parkinson's Disease, 2024,10(1):140.
[19]LIAQAT K, TREAT K, WILSON T E, et al. Further evidence of involvement of ITSN1 in autosomal dominant neurodevelopmental disorder[J]. Clinical Genetics, 2024, 105(4):455-456.
[20]IHARA M,STEIN P,SCHULTZ R M. UBE2I (UBC9), a SUMO-conjugating enzyme, localizes to nuclear speckles and stimulates transcription in mouse oocytes[J]. Biology of Reproduction,2008,79(5):906-913.
[21]COX A R,CHERNIS N,KIM K H,et al. Ube2i deletion in adipocytes causes lipoatrophy in mice [J]. Molecular Metabolism,2021,48:101221.

[收稿日期 2025-03-19;责任编辑 刘敏丽]

(上接第30页)

[33]LIU L Y, NING Y X, YI J J, et al. miR-6089/MYH9/β-catenin/c-Jun negative feedback loop inhibits ovarian cancer carcinogenesis and progression[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy,2020,125:109865.
[34]HAEUSGEN W, HERDEGEN T, WAETZIG V. The bottleneck of JNK signaling: Molecular and functional characteristics of MKK4 and MKK7[J]. European Journal of Cell Biology,2011,90(6/7):536-544.
[35]REDMER T, RAIGEL M, STERNBERG C, et al. JUN mediates the senescence associated secretory phenotype and immune cell recruitment to prevent prostate cancer progression[J]. Molecular Cancer,2024,23(1):114.
[36]PENG Y,ZHANG P,HUANG X T,et al. Direct regulation of FOXK1 by C-Jun promotes proliferation, invasion and metastasis in gastric cancer cells [J]. Cell Death & Disease,2016,7(11):e2480.
[37]SOLER A,SERRA H,PEARCE W,et al. Inhibition of the p110α isoform of PI 3-kinase stimulates nonfunctional tumor angiogenesis [J]. The Journal of Experimental Medicine,2013,210(10):1937-1945.
[38]SHU Y J,WENG H,YE Y Y,et al. SPOCK1 as a potential cancer prognostic marker promotes the proliferation and metastasis of gallbladder cancer cells by activating the PI3K/AKT pathway[J]. Molecular Cancer,2015,14(1):12.
[39]ASTLE M V,HANNAN K M,NG P Y,et al. AKT induces senescence in human cells *via* mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: Implications for targeting mTOR during malignancy[J]. Oncogene, 2012, 31(15): 1949-1962.
[40]PIRES M M,HOPKINS B D,SAAL L H,et al. Alterations of EGFR, p53 and PTEN that mimic changes found in basal-like breast cancer promote transformation of human mammary epithelial cells[J]. Cancer Biology & Therapy, 2013,14(3):246-253.
[41]ZHAO Y K,ZHANG L L,WU Y F,et al. Selective anti-tumor activity of wogonin targeting the Warburg effect through stablizing p53 [J]. Pharmacological Research, 2018,135:49-59.

[收稿日期 2025-01-06;责任编辑 刘敏丽]