

Dvl2-DIX 结构域的 Site III 相关突变体结晶 及其与 Ccd1-DIX 的共结晶*

但琼洁^{1, 2)} 刘奕彤³⁾ 吴嘉炜³⁾ 王志新^{1, 3)**}

¹⁾中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; ²⁾中国科学院研究生院, 北京 100049;

³⁾清华大学生命科学学院结构生物中心, 北京 100084)

摘要 Dvl(Dishevelled)是 Wnt 信号通路传递的核心分子, 无论内源的还是过表达的 Dvl 在细胞体内都能因自聚而形成 puncta. 研究已报道, Dvl 主要通过其 DIX 结构域上的三个作用区域来介导自聚: Site I、Site II 和 Site III, 其中 Site I 和 Site II 还参与了 Dvl-DIX 与 Ccd1-DIX 的异聚. 为了进一步得到 Dvl2-DIX 上 Site I 和 Site II 的直接三维结构, 本研究设计了一系列的 Site III 突变体. 通过体内和体外实验进一步证实了这些突变氨基酸确实参与了 Dvl2-DIX 的自聚, 然后对这些 Site III 突变体蛋白成功地进行了纯化和结晶, 最终得到 3.1Å 的 Dvl2-DIX(G65A)晶体数据. 分析表明该晶体存在片层位移现象, 需对数据进行一定修正后才能进行后续的结构分析. 体外实验又证实了这些突变氨基酸不影响 Dvl2-DIX 与 Ccd1-DIX 的异聚, 为了进一步研究 Dvl2-DIX 与 Ccd1-DIX 相互作用, 我们对这些 Site III 突变体蛋白与 Ccd1-DIX 进行共结晶. 最终获得 Dvl2-DIX (G65A)与 Ccd1-DIX 复合物的初晶, 利于进一步的晶体优化及数据收集.

关键词 Wnt 信号通路, Dishevelled, DIX 结构域, 结晶

学科分类号 Q71

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00216

Wnt 信号通路调控着生物体的生长、发育、疾病、衰老与死亡等生命过程, 能影响细胞形态与功能的分化和维持、免疫、应激、细胞癌变与细胞凋亡等^[1-9]. Dvl 蛋白是调控 Wnt 信号通路的核心分子. 无论内源的还是过表达的 Dvl 在细胞体内都能形成 puncta^[5-9]. 失去形成 puncta 能力的 Dvl 突变体(例如 Dvl2-Y27D)不再能激活 Wnt 信号通路. 研究证明 Dvl 的 puncta 是在动态聚合的情况下形成的^[10]. 因此这种动态聚合与 Dvl 激活 Wnt/ β -catenin 通路的能力有着紧密关系. 而 Dvl 的聚合是通过它的 DIX 结构域作用的. 因此 Dvl-DIX 多聚体的三维结构一直是人们的研究重点.

2007 年, Schwarz Romond 研究组也曾试图解析 Dvl2-DIX 的晶体结构, 却未能成功. 但是他们成功地解析了 Axin-DIX 的晶体结构. 鉴于 Dvl2-DIX 与 Axin-DIX 较高的序列保守性及相似的聚合功能, 他们推测 Dvl2-DIX 同 Axin-DIX 一样, 也采用了头对尾的方式进行多聚化. 而分子间的疏水作用力在这一过程中起着重要的作用^[10], 该作用区

域即是 Site I. 2011 年, 我们组解得 Ccd1-DIX 和突变体 Dvl1-DIX(Y17D)(在 Dvl2 中是 Y27D)的晶体结构^[11]. 通过二者的结构分析和序列比对推得在 Dvl-DIX 上还存在着一个重要的作用区域 Site II 参与自聚. 但目前突变体 Dvl1-DIX(Y17D)是个单体. 它的晶体结构显示, 在一个晶胞内 8 个分子形成 2 条长的螺旋纤维结构. 但与 Axin-DIX 和 Ccd1-DIX 的螺旋比较起来, Dvl1-DIX(Y17D)的螺旋更为松散. 因此它的晶体堆积很可能与野生型不同, 这是由于突变了 Y17 使得 Site I 被破坏. Site II 虽然还存在, 但由于同一螺旋纤维上的 2 个分子间距离较大, 使得其空间距离被拉开, 因此这个晶体结构中的 Site I 和 Site II 并非天然构象. 意外的是, 与 Axin-DIX 和 Ccd1-DIX 不同, 在 Dvl1-DIX

* 国家自然科学基金面上资助项目(31070643).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62789387, E-mail: zhixinwang@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2012-05-02, 接受日期: 2012-05-18

(Y17D)的螺旋纤维之间还存在着影响相互作用的区域 Site III. 突变这三个作用区域的关键氨基酸都能影响 Dvl 的 puncta 形成和 Wnt 信号通路的激活.

DIX 结构域不仅能介导 Dvl 的自聚, 还参与了 Dvl、Axin 和 Ccd1 三者间的相互作用. 虽然单独的 Dvl-DIX 不能与 Axin-DIX 发生相互作用, 但 Dvl-DIX 对于 Dvl 与 Axin 相互识别非常关键. 删除 Dvl-DIX 后, Dvl 与 Axin 无法结合, 但删除 Axin-DIX 后, 二者仍然可以结合^[8]. 而 Dvl 与 Ccd1 间的相互作用则简单得多, 直接通过 DIX 结构域的异聚相互作用^[12-13]. 3 个含有 DIX 结构域的蛋白质, 虽然序列保守度较高, 但由于关键部位 Site I 和 Site II 的氨基酸不同而导致异聚的差异. 因此研究这三者之间的具体相互作用, 尤其是 Site I 和 Site II 的差异, 也是现在人们所关心的.

为了研究清楚 DIX 的自聚和异聚, 就需要获得准确的 Site I 和 Site II 的三维结构. 突变体 Dvl1-DIX(Y17D)的晶体结构里不能准确地显示 Site I 和 Site II, 而野生型的 Dvl-DIX 又因为多聚而造成结晶困难. 所以我们设计了一系列的 Site III 突变体, 并且通过体外和体内的实验证实这些突变体能够影响到 Dvl2-DIX 的自聚, 从而影响到其细胞体内的功能. 这样既保证了 Site I 和 Site II 在结构上的完整性, 又使 Dvl-DIX 聚合状态均一、利于结晶. 最后通过纯化和结晶 Dvl2-DIX 的 Site III 突变体蛋白, 得到了突变体 Dvl2-DIX(G65A) 3.1Å 的晶体结构.

虽然通过点突变实验证实 Dvl2-DIX 与 Ccd1-DIX 是直接通过头对尾的方式相互作用, 但目前还没有二者复合物晶体结构的报道. 因此我们通过体外实验证明我们设计的这些突变体仍能与 Ccd1-DIX 有相互作用, 也证实这些 Site III 突变体不影响 Dvl2-DIX 与 Ccd1-DIX 之间的相互作用. 于是再对这些复合物蛋白进行纯化和结晶. 最终获得了 Dvl2-DIX(G65A)与 Ccd1-DIX 复合物较好的初晶, 利于后续的晶体优化和数据收集.

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠 Dvl2(NP_031914)和人源 Ccd1 isoform B (NP_219493)的 cDNA 由厦门大学的林圣彩教授惠赠.

镍亲和柱(Ni-NTA)购自 Qiagen 公司; 阴离子交换柱 Source 15Q HR10/10 购自 GE Healthcare 公

司; GST 柱购于 GE Healthcare 公司; Anti-Myc 抗体购自 Santa Cruz 公司; ECL 显色系统购自碧云天公司; X 胶片购自 Eastman Kodak 公司; DEME 培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium) 购自 Invitrogen 公司; VigoFect Vigorous 的双报告基因检测试剂盒购于 Vigorus 公司. NaCl 等其他化学试剂均为分析纯试剂. 实验中所用的水均为双蒸去离子水.

1.2 表达载体构建及蛋白质表达和纯化

我们利用标准的克隆方法将鼠源 Dvl2-DIX (10~114)基因亚克隆到 pET15b 载体中, 并利用两轮 PCR 突变的方法构建了相应的突变体克隆. 同样将人源 Ccd1-DIX(386~472)亚克隆到 pGEX2T 载体中. 所有克隆都经 DNA 测序鉴定(Invitrogen 公司). 然后利用大肠杆菌 BL21(DE3)表达体系表达 N 端带有 His6 融合标签的 Dvl2-DIX(10~114), 相应的 Dvl1-DIX 突变体蛋白以及 N 端带有 GST 融合标签的 Ccd1-DIX(386~472). 在 37°C 培养, A_{600} 值达到 0.6 时降温至 20°C, 加入 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导 12 h. 表达的蛋白质通过镍亲和柱或谷胱甘肽亲和柱, 再通过阴离子交换柱 Source15Q 和分子筛(Superdex-200, GE Healthcare)进行纯化. 为了制备复合物, 我们先将 GST-Ccd1-DIX 的 N 端 GST 切除并除净, 再将无标签的 Ccd1-DIX 与相应的 Dvl1-DIX 突变体蛋白孵育后利用分子筛进一步纯化. 得到的所有蛋白质通过 SDS-PAGE 鉴定, 纯度都在 95%以上. 纯化的蛋白质保存在缓冲液(20 mmol/L HEPES pH 7.5、100 mmol/L NaCl 和 2 mmol/L DTT)中, 于 -80°C 条件下保存, 用于后续的结晶和生化实验.

1.3 细胞免疫染色

我们利用标准的克隆方法将 Dvl2 全长基因亚克隆到真核表达载体 pCMV5-Myc 中, 并利用两轮 PCR 突变的方法构建了相应的突变体克隆. 所有克隆都经 DNA 测序鉴定(Invitrogen 公司). 非洲绿猴肾细胞 COS7 用含有 10%小牛血清、100 U 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基培养, 培养条件为 37°C, 5% CO₂. 将总量为 2 μg 的 DNA 转染至 COS7 细胞中, 使用 VigoFect 转染试剂. 转染进行 48 h 后, 吸去培养基, 用 3%多聚甲醛固定 20 min, 再用 2% Triton X-100 穿透 10 min, 然后用 5% BSA 室温下封闭 1 h, 再用 anti-Myc 一抗室温孵育 1 h 后, 用荧光二抗孵育 1 h. 最后加入 DAPI(4, 6- 联脒 -2- 苯基吡啶), PBS 清洗后封片.

在激光共聚焦显微镜下用紫外光(波长 356 nm)激发观测。

1.4 Wnt 报告基因的检测

人胚胎肾细胞 HEK 293T 用含有 10% 小牛血清、100 U 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基培养, 培养条件为 37°C, 5% CO₂。我们采用的是 Vigorous 的双报告基因检测试剂盒。首先将 HEK 293T 细胞接种于 96 孔板, 待细胞密度至 60% 左右进行转染。每 3 个孔作为一组样品, 加入相同的转染质粒。每一孔内 DNA 总量为 150 ng, 其中荧光素报告基因质粒为 15 ng, 内参质粒 Ranillia 为 0.5 ng, 待测质粒 20 ng, 最后用 pCMV 空载体补齐。转染 24~48 h 后收集细胞, 用 PBS 润洗一遍后, 加入 50 μl 裂解缓冲液(0.1 mmol/L Tris-HCl pH 7.4、150 mmol/L NaCl、0.5% NP-40、1 mmol/L PMSF、1 mg/L aprotinin、1 mg/L leupeptin、25 mmol/L NaF 和 2 mmol/L Na₃VO₄)处理细胞, 均匀摇动 15~20 min。待细胞裂解完全后加入底物, 在荧光测量仪上读数。将萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶的比值作为报告基因的转录活性, 通过 3 个样品的读值得到均方差。

1.5 GST Pull down 实验

先将 0.2 ml 的 GST 柱用裂解缓冲液(25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0、150 mmol/L NaCl 和 2 mmol/L DTT)平衡, 再将约 0.4 mg 带 GST 融合标签的 Ccd1-DIX 结合在柱上。随后将约 0.6 mg 的野生型 Dvl2-DIX 及相应的突变体蛋白通过该柱, 清洗去除未结合蛋白。最后用洗脱缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 5 mmol/L GSH)洗脱, 并用 SDS-PAGE 进行检测。

1.6 蛋白质的结晶、优化和数据收集

我们对所获得的 Dvl2-DIX 突变体蛋白进行结晶条件筛选。选用 Hampton Research 公司晶体生长试剂盒 Crystal Screen、Crystal Screen 2、Crystal Screen Lite、Index、PEG/Ion 和 SaltRx 以及 Emerald Biosystems 公司的晶体生长试剂盒 Wizard I 和 Wizard II。对初筛的生长条件进行分析和总结后, 在 20°C 下通过大量的组合尝试不同的 pH 缓冲液、沉淀剂和盐的种类、浓度以及蛋白质浓度, 最后锁定了最优的结晶条件。最终在 0.1 mol/L Bicine pH 8.8、4.2 mol/L NaCl、0.1 mol/L NaF 和 0.3 mol/L NDSB-211 的条件下获得 Dvl2-DIX(G65A)单晶。该晶体在上海同步辐射中心收得分辨率达 3.1 Å 的数据。用同样的方法对 Ccd1-DIX 与 Dvl2-DIX 突

变体复合物的结晶条件进行筛选。目前已得到一些初晶, 利于后续的晶体优化。

2 结 果

2.1 Dvl2-DIX 的 Site III 突变体影响自身聚合

Dvl1-DIX(Y17D)的晶体结构表明 Dvl 通过 Site I 和 Site II 形成螺旋纤维结构, 而且两条纤维链之间可以通过 Site III 进一步聚集(图 1a)。参与 Site III 的氨基酸主要是一些疏水氨基酸, 在 Dvl2 中是 M60、V66 和 G65。我们之前的研究中曾将这些疏水氨基酸分别突变成性质差异很大的带电荷的天冬氨酸(Asp), 为验证这些疏水侧链的重要性, 我们将这些氨基酸突变成依然疏水但侧链基团更小的丙氨酸(Ala)。

体外表达纯化这些突变体蛋白。通过分子筛实验发现: Dvl2-DIX 突变体(M60A、V66A 和 M60A/V66A)的峰位比野生型位置要稍微靠后, 说明它们形成的多聚体的分子质量要小于野生型, 即发生轻微解聚。而 Dvl2-DIX(G65A)则能解聚成双体(图 1b), 已报道的突变体 Y27D 则完全解聚成单体。

通过 DIX 结构域多聚化, Dvl2 蛋白在胞内可形成特征的 puncta 结构。我们随后把这些突变做到 Dvl2 的全长蛋白中, 转染进 COS7 细胞, 用荧光显微镜观察 Dvl2 各个突变体在胞内定位的变化(图 1c)。结果显示: 野生型 Dvl2 在胞内显著寡聚, 形成 puncta; 能轻微影响 DIX 解聚的突变体 M60A、V66A 和 M60A/V66A 仍保持较明显的寡聚, puncta 的形成能力与野生型 Dvl2 无明显差异; 而解离为低聚体的突变体 G65A 在胞内的 puncta 形成能力大大削弱, 有明显的弥散样分布, 说明这个突变体的全长蛋白寡聚化能力大大削弱; 而已报道的突变体 Y27D 则完全弥散, 不能形成 puncta。

之前的研究表明 Dvl2 传递 Wnt 信号的能力与它的寡聚状态密切相关, 寡聚程度降低的突变体传递 Wnt 信号的能力也相应减弱。于是我们利用荧光素酶报告系统, 在 293T 细胞内过量表达野生型 Dvl2 及其 Site III 突变体, 并观察它们对 Wnt 信号通路的激活作用(图 1d)。结果显示: Dvl2 野生型能明显激活 Wnt 基因的表达, 而突变体 Y27D 则完全丧失了激活 Wnt 通路的能力; 能轻微影响解聚的突变体, M60A、V66A 和 M60A/V66A, 激活能力与野生型相当或略低; 而低聚的 Dvl2 突变体

G65A 激活能力则大大下降。

以上实验都充分证明这些 Dvl1-DIX 的 Site III 突变体能影响自身聚合，这也与之前的报道是一致

的。但 Site III 内突变位点不同会造成解聚程度的差异，而无论是突变成 Asp，还是 Ala，只要能破坏 Site III 的疏水作用即能影响聚合。

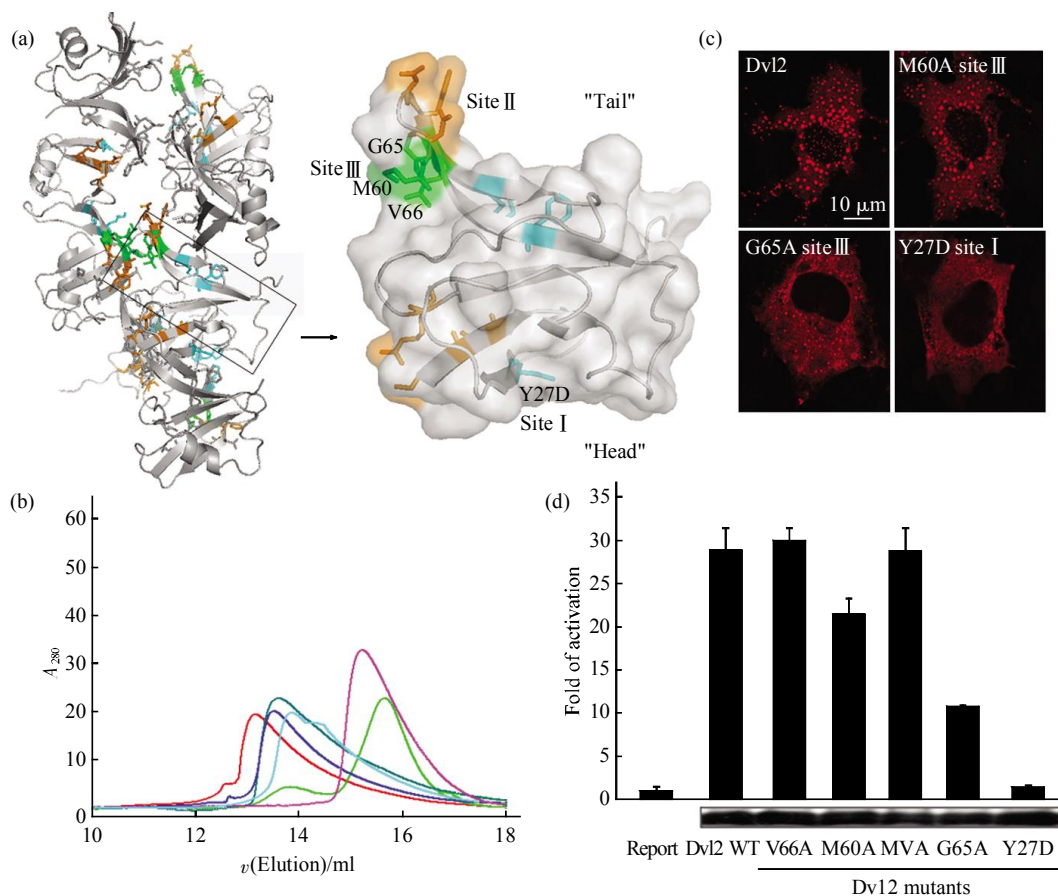


Fig. 1 Mutants at Site III of Dvl2-DIX weaken the ability of homo-interaction

(a) Dvl-DIX assembled *via* three sites. The molecules forming two filaments are colored in gray. Site I (cyan), Site II (orange) and Site III (green) for Dvl homopolymerization are indicated. (b) Oligomerization states of Dvl2-DIX Site III mutants determined by gel filtration analyses. The protein concentration used is approximate 50 $\mu\text{mol/L}$. —: Dvl2-DIX; —: Dvl2-DIX(M60A); —: Dvl2-DIX(V66A); —: Dvl2-DIX(M60A/V66A); —: Dvl2-DIX(G65A); —: Dvl2-DIX(Y27D). (c) Puncta formation of full-length Dvl2 wildtype and mutants. COS7 cells were transfected with 2 μg of Myc-tagged Dvl2, and the localization of Dvl2 was visualized by indirect immunofluorescence. (d) Wnt activities of full-length Dvl2 wildtype and mutants. Some 20 ng of Myc-Dvl2 mutants were transfected into HEK293T, and TOPFLASH reporter assays were performed to determine the Wnt activities after 36 h. The bottom panel shows the expression levels of all Dvl2 mutants detected by Western blotting using anti-Myc antibodies.

2.2 Dvl2-DIX 的 Site III 突变体的初步晶体学研究

目前唯一得到有关 Dvl2-DIX 的结构是 Site I (Y27D) 突变体的晶体结构。而该突变体的晶体结构显示关键的 Site I 相互作用面因关键氨基酸 Tyr27 突变为酸性氨基酸 Asp 而基本被破坏，而且 Site II 相互作用面也与 Ccd1-DIX 结构中有所不同，可能是 Site I Tyr27 突变间接导致的。野生型

Dvl2-DIX 的寡聚状态会因浓度不同而发生变化，不利于结晶。我们的结晶实验也证实了这一点。我们前面的实验中已能得到一些聚合状态稳定的 Site III 的突变体，结构分析和前面的实验也证实这些突变体不会影响到 Site I 和 Site II。所以我们希望能够解析 Site III 突变体的晶体结构，阐明 Site I 和 Site II 的具体作用模式。

我们纯化了大量高纯度的 Site III 突变体蛋白, 包括不同关键位点突变成 Asp 或 Ala 的多个蛋白质, 进行了结晶尝试. 同时, 还将相应的突变也引入到 Dvl1-DIX 和 Dvl3-DIX 中, 进行蛋白质纯化和结晶实验. 这些聚合状态稳定的突变体在很多条件下都较容易结晶出来, 但晶体都较小, 呈针状, 衍射能力弱.

通过对结晶条件的分析和总结, 进行不同过程的优化, 我们最终得到衍射较好的 Dvl2-DIX(G65A) 单晶. 该晶体是长棱柱体, 在上海同步辐射 17U1 线站收集了分辨率为 3.1 Å 的数据, 用于最终的结构解析. 该晶体属于 $P6_1$ 空间群, 其晶胞参数为 $a=b=100.7\text{Å}$, $c=81.4\text{Å}$; $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$. 由晶体的衍射图可见衍射点有拖尾现象, 经过数据分析得知这是由于晶体结晶时发生了片层位移(图 2). 片层位移是由于晶体在生长过程中不同片层之间发生滑动造成的. 该现象最早是由 Bragg 和 Howells 在 1954 年报道的^[14]. 此后, 关于此类报道逐渐增加. 报道中显示需要对最终的衍射数据进行一定的密度修正后再进行分子置换才能最终得到较好的晶体结构数据. 在已发表的报道中介绍了许多种对片层位移数据进行修正的方法^[15-18]. 参考这些方法进行进一步的结构解析正在进行中.

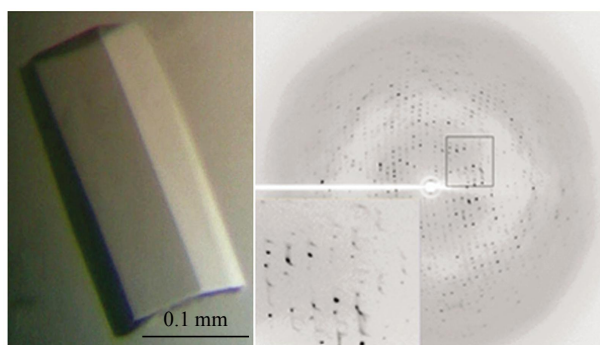


Fig. 2 Single crystal and diffraction pattern of Dvl2-DIX (G65A)

The condition for crystallization is 0.1 mol/L Bicine pH 8.8, 4.2 mol/L NaCl, 0.1 mol/L NaF and 0.3 mol/L NDSB-211 at 20°C.

2.3 Dvl2-DIX 的 Site III 突变体与 Ccd1-DIX 的共结晶

Ccd1-DIX 是已报道的第三个含有 DIX 结构域的蛋白质. 我们之前的结构分析和点突变实验发现 Dvl2-DIX 与 Ccd1-DIX 间主要通过 Dvl2-DIX 的

“头部”与 Ccd1-DIX 的“尾部”相互作用, 其中 Site I 起着关键作用, 而 Site II 被破坏也能削弱二者间的相互作用.

于是我们通过 GST pull down 实验来分析所设计的这一系列 Dvl2-DIX 的 Site III 突变体与 Ccd1-DIX 之间的相互作用情况(图 3a). 由结果可知这些突变体仍能与 Ccd1-DIX 发生相互作用, 因此我们纯化了这些复合物. 但其中大部分复合物由于 Dvl2-DIX 的聚合程度较高, 导致复合物不均一. 但也有性质比较好的复合物, 如 Dvl2-DIX(G65D)与 Ccd1-DIX, Dvl2-DIX(G65A)与 Ccd1-DIX(图 3b). 对这些复合物进行结晶优化, 最终得到一些 Dvl2-DIX(G65A)与 Ccd1-DIX 的初晶(图 3c), 利于后续的晶体优化与数据收集.

3 讨 论

目前已发现的含有 DIX 结构域的蛋白质只有 3 个: Dvl、Axin 和 Ccd1. 其中 Dvl 和 Axin 都是 Wnt 信号通路的核心分子, Ccd1 则是 Wnt 信号通路的正调控因子. 关于这 3 个蛋白质间相互作用的研究报道已有很多, DIX 结构域在其中起着重要的作用. Dvl 若缺失 DIX 结构域, 则不能再和 Axin 及 Ccd1 发生相互作用, 其自身也在细胞中呈弥散分布, 不能聚合. 因此研究 DIX 结构域的三维结构有助于更好地理解这 3 个蛋白质间的相互作用以及它们是如何影响 Wnt 信号通路的.

Dvl-DIX 蛋白因为寡聚化程度很高、状态不够均一, 所以结晶较为困难. 很多研究组都尝试结晶 Dvl-DIX, 但都以失败告终, 其中包括 Schwarz Romond 研究组. 但他们最终仍获得 Axin-DIX 的晶体结构, 并以此为基础推测得出 Dvl-DIX 的结构模型. 2009 年 Ehebauer 研究组^[19]根据前面 Schwarz Romond 解析的 Axin-DIX 结构, 经过序列分析和分子模拟, 给出了 Dvl-DIX 可能的结构模型. 与 Schwarz Romond 不同的是, 他们分析指出可能还存在其他的保守氨基酸也参与了 Dvl-DIX 的自聚, 但并没有给出晶体结构或者生化实验证明.

我们在 2011 年解得 Ccd1-DIX 的晶体结构^[1], 该晶体结构对 Schwarz Romond 的 Dvl-DIX 结构模型又有了新的补充. 由 Axin-DIX 的晶体结构推得 Dvl-DIX 分子间存在着一个重要的疏水区域 Site I, 而由 Ccd1-DIX 推得 Dvl-DIX 分子间作用还存在着另一个重要的作用区域 Site II. 而唯一的 Dvl1-DIX 突变体(Y17D)的晶体结构, 由于突变发生在最重

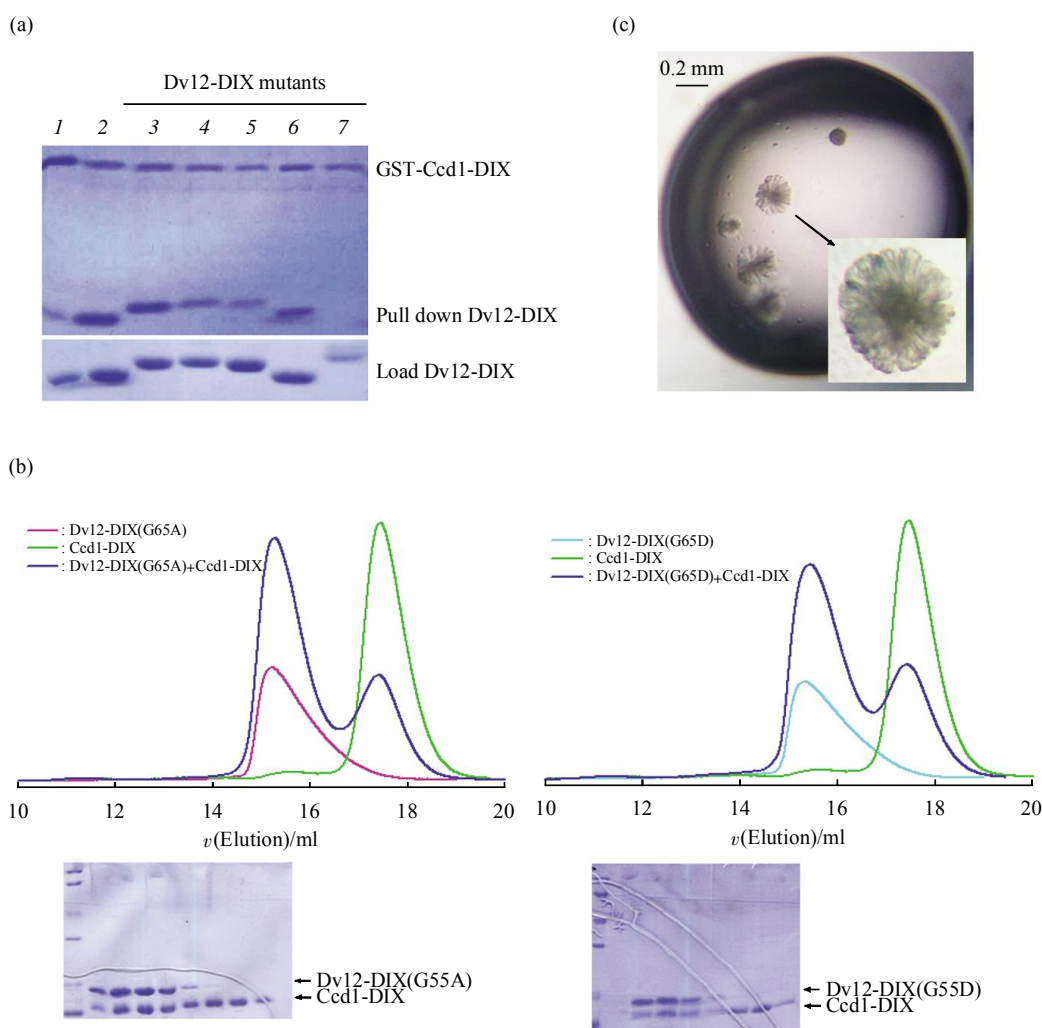


Fig. 3 Mutations at Site III of Dvl2-DIX retained the ability to form hetero-complex with Ccd1-DIX

(a) The GST-mediated pull down assays were carried out with GST-tagged wild type Ccd1-DIX and various Dvl2-DIX mutants. The top panel is the electrophoretic pattern of Dvl2-DIX and Ccd1-DIX after GST pulldown assays. The protein amounts of Dvl2-DIX mutants used are shown at the bottom. 1: WT; 2: M60A; 3: V60A; 4: M60A/V60A; 5: G65A; 6: G65D; 7: Y27D. (b) Profile of size-exclusion chromatography showed shifted elution of each DIX protein due to Ccd1-DIX-Dvl2-DIX mutant complexing. SDS-PAGE analysis of the collected fractions was in figure. (c) Crystals of the Dvl2-DIX(G65A)-Ccd1-DIX complex were showed.

要的 Site I，导致它的整体构象与天然的 Dvl-DIX 存在着较大的不同，主要表现在分子间形成的螺旋更为松散。Ccd1-DIX 和 Axin-DIX 的螺旋每圈包括 6 个分子，高度为 65~80Å；Dvl1-DIX(Y17D) 每圈包括 8 个分子，高度为 140Å。这也反映了 Dvl1-DIX(Y17D)的晶体结构中 Site I 和 Site II 并非天然构象，在空间上被拉开了。

与 Ccd1-DIX 和 Axin-DIX 不同，Dvl1-DIX (Y17D)结构还明确地呈现出一个新的分子间作用区域 Site III，它发生在两条螺旋之间。2011 年 Liu

等的实验结果^[11]及我们本文中的实验都证明 Site III 区域内的氨基酸确实参与了 Dvl-DIX 的自聚作用。这 3 个 Site 上的重要氨基酸与 Ehebauer 的 Dvl-DIX 模型中指出的氨基酸一致，但通过晶体学研究和点突变实验使结果更为精准和可信。另外 Ehebauer 的 Dvl-DIX 模型根据保守性也指出了其他的可能起作用的氨基酸，一些已证明影响不大，另一些则还没有直接的实验表明是否有影响。因此还是有必要获得野生型的 Dvl-DIX 结构或者其他能使 Site I 和 Site II 保留天然构象的晶体结构。

根据前人的实验结果, 我们将 Site III 上的重要氨基酸突变为 Asp 或者 Ala. 在这些突变体中, 将氨基酸突变为 Asp 的与以前的结果一致, 突变为 Ala 的蛋白质性质与突变为 Asp 的蛋白质性质类似. 虽然蛋白质性质一致, 但在结晶上, 二者仍存在微弱的差别. 在我们的实验中, 突变体 Dvl2-DIX (G65A) 更容易结晶优化出来. 因此, 虽然有时突变为不同的氨基酸造成的蛋白质性质变化不大, 但仍然有可能改善结晶. 我们最终得到 3.1 Å 的 Dvl2-DIX(G65A) 的衍射点有明显的拖尾现象, 经过文献查阅和数据分析得知这是由于晶体结晶发生片层位移造成的. 这种现象在之前的报道中也出现过很多次. 如果不进行数据修正则最后得到的密度会出现部分弥散. 而报道中也介绍了多种修正方法, 参考这些文献, 进一步的数据解析正在进行中.

在我们组之前的研究中, 虽然通过体外实验证实了有很多氨基酸参与 Dvl-DIX 与 Ccd1-DIX 的相互作用^[1], 但目前还没有二者复合物结构的报道. 于是我们也考虑利用这些特殊的 Site III 突变体去制备 Dvl-DIX 与 Ccd1-DIX 的复合物, 由此可避免因 Dvl-DIX 的动态聚合而造成 Dvl-DIX 与 Ccd1-DIX 复合物的不均一. 首先 pull down 实验证实了我们设计的 Site III 区域内的氨基酸突变体并不会影响它们与 Ccd1-DIX 的相互作用, 即 Site III 不参与 Dvl-DIX 的异聚. 随后我们进一步制备了相应的复合物蛋白用于结晶. 目前已获得一些初晶, 后续的晶体优化尚在进行中.

参 考 文 献

- [1] Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 2006, **127**(3): 469-480
- [2] Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2008, **8**(5): 387-398
- [3] Logan C Y, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, **20**: 781-810
- [4] Moon R T, Kohn A D, De Ferrari G V, *et al.* WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet*, 2004, **5**(9): 691-701
- [5] Yanagawa S, van Leeuwen F, Wodarz A, *et al.* The Dishevelled protein is modified by wingless signaling in *Drosophila*. *Genes Dev*, 1995, **9**(9): 1087-1097
- [6] Yang-Snyder J, Miller J R, Brown J D, *et al.* A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. *Curr Biol*, 1996, **6**(10): 1302-1306
- [7] Axelrod J D, Miller J R, Shulman J M, *et al.* Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev*, 1998, **12**(16): 2610-2622
- [8] Kishida S, Yamamoto H, Hino S, *et al.* DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-catenin stability. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**(6): 4414-4422
- [9] Capelluto D G, Kutateladze T G, Habas R, *et al.* The DIX domain targets Dishevelled to actin stress fibres and vesicular membranes. *Nature*, 2002, **419**(6908): 726-729
- [10] Schwarz-Romond T, Fiedler M, Shibata N, *et al.* The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, **14**(6): 484-492
- [11] Liu Y T, Dan Q J, Wang J, *et al.* Molecular basis of Wnt activation via the DIX domain protein Ccd1. *J Biol Chem*, 2011, **286**(10): 8597-8608
- [12] Shiomi K, Uchida H, Keino-Masu K, *et al.* Ccd1, a novel protein with a DIX domain, is a positive regulator in the Wnt signaling during zebrafish neural patterning. *Curr Biol*, 2003, **13**(1): 73-77
- [13] Wong C K, Luo W, Deng Y, *et al.* The DIX domain protein coiled-coil-DIX1 inhibits c-Jun N-terminal kinase activation by Axin and Dishevelled through distinct mechanisms. *J Biol Chem*, 2004, **279**(38): 39366-39373
- [14] Bragg L. X-ray studies of biological molecules. *Nature*, 1954, **174**(4419): 55-59
- [15] Hare S, Cherepanov P, Wang J. Application of general formulas for the correction of a lattice-translocation defect in crystals of a lentiviral integrase in complex with LEDGF. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2009, **65**(Pt 9): 966-973
- [16] Tsai Y, Sawaya M R, Yeates T O. Analysis of lattice-translocation disorder in the layered hexagonal structure of carboxysome shell protein CsoS1C. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2009, **65**(Pt 9): 980-988
- [17] Wang J, Rho S H, Park H H, *et al.* Correction of X-ray intensities from an HslV-HslU co-crystal containing lattice-translocation defects. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2005, **61**(Pt 7): 932-941
- [18] Zhu X, Xu X, Wilson I A. Structure determination of the 1918 H1N1 neuraminidase from a crystal with lattice-translocation defects. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2008, **D64**(Pt 8): 843-850
- [19] Ehebauer M T, Arias A M. The structural and functional determinants of the Axin and Dishevelled DIX domains. *BMC Struct Biol*, 2009, **9**: 70

Crystallization of Mutations at Site III of Dvl2-DIX and Co-crystallization of Dvl2-DIX(G65A) With Ccd1-DIX*

DAN Qiong-Jie^{1,2}, LIU Yi-Tong³, WU Jia-Wei³, WANG Zhi-Xin^{1,3}**

¹ Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

² Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

³ MOE Key Laboratory of Bioinformatics, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Dvl (Dishevelled) is a key effector molecule of the Wnt signaling pathway. The DIX domain of Dvl (Dvl-DIX) can homo-oligomerize into cytoplasmic puncta *via* the intra-filament Site I, Site II and the inter-filament Site III, and form hetero-complex with the DIX domain of Ccd1 (Ccd1-DIX) through Site I and Site II. Since all efforts to solve the wildtype Dvl2-DIX structure were unsuccessful, we carried out crystallization trials with the Site III mutants of Dvl2-DIX that display impaired homo-oligomerization and Wnt activity. Crystals of Dvl2-DIX(G65A) protein were obtained, but the diffraction data encountered an unexpected lattice-translocation defect. These Site III mutations of Dvl2-DIX retained the ability to hetero-interact with Ccd1-DIX, and we thus successfully generated various complexes between Dvl2-DIX mutants and wildtype Ccd1-DIX. After extensive trials, crystals of the Dvl2-DIX(G65A)-Ccd1-DIX complex were produced, but of poor quality and unsuitable for diffraction studies. Optimization is under way.

Key words Wnt signaling, Dishevelled, DIX domain, crystal

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00216

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (31070643)

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62789387, E-mail: zhixinwang@mail.tsinghua.edu.cn

Received: May 2, 2012 Accepted: May 18, 2012