

双分子荧光互补法 (BiFC) 精确 MICOS 复合物精细结构

刘文晓, 闫朝君, 宋质银*

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要: 在真核细胞中, 线粒体是能量合成与物质代谢的重要场所。线粒体是双层膜细胞器, 内膜向内折叠形成嵴, 其中 MICOS 复合物对于线粒体嵴的形成起着重要作用。Mic60、Mic19 和 Mic10 是 MICOS 复合物核心组成蛋白。采用双分子荧光互补技术 (BiFC, bimolecular fluorescence complementation) 方法在活细胞中直接观察研究 MICOS 复合物中各组成蛋白之间的相互作用关系。发现 Mic60 可以与 Mic19 发生较强的相互作用, 而 Mic60 与 Mic10 的相互作用较弱。

关键词: 线粒体; MICOS 复合物; 双分子荧光互补

中图分类号: Q2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)04-0690-05

Determining the relationship of mitochondrial MICOS complex subunits by BiFC

LIU Wenxiao, YAN Chaojun, SONG Zhiyin

(College of Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract: Mitochondria are double membrane-bound organelles which are the main sites of energy production and cellular metabolism. The conserved MICOS complex acts as a primary determinant of mitochondrial crista structure. The bimolecular fluorescence complementation (BiFC) was used to study the interaction of MICOS subunits in live cells. We found that the Mic60 can interact with Mic19 directly, but the interaction was weak. Our data are important for illuminating the relationships of mitochondrial MICOS complex subunits.

Key words: mitochondrial; MICOS complex; BiFC

在哺乳细胞中, 线粒体是重要的能量传递^[1]和物质代谢的重要场所^[2-5]。线粒体的稳态对于维持线粒体的各种功能的行使有重要意义^[6]。线粒体具有双层膜结构, 该结构为线粒体发挥作用提供了栖息地, 是不可缺少的^[7]。而在膜上存在多种复合物, 其中 MICOS 复合物的重要地位更是不言而喻的, 它决定着线粒体内膜的结构^[8-9]。MICOS 复合物中含有多种亚基, 各种亚基的大小、形状、空间位置以及相互关系错综复杂, 复合物中亚基的缺失会导致线粒体嵴的消失, 复合物亚基的稳定关系着线粒体结构的稳定。另外有发现表明 MICOS 复合物亚基减少可能与线粒体膜电势降低的积累有关。在 MICOS 复合物中各亚基之间是紧密联系的, 它们存在紧密的相互作用。在 MICOS 复合物中, Mic60、Mic19 和 Mic10 为 MICOS 复合物的核心蛋白^[10-12],

它们可以稳定该复合物的结构, 进而使线粒体结构稳定。目前, 对于 MICOS 复合物各亚基的相互作用关系的研究相对较少, 采用 BiFC^[13]系统来研究该课题。双荧光互补实验 (BiFC)^[14]是一种直观迅速地判断目标分子在或细胞中的定位以及相互作用关系的技术。采用此法, 可以直观的观察 MICOS 复合物中 Mic60、Mic19^[15-16]和 Mic10^[17-18]三者的相互作用关系。

1 材料与方法

1.1 材料

Hela 细胞系和 GP2-293, 均由本实验室保存。mscv-mic60-flg、mscv-mic19-flg 和 mscv-mic10-flg。以上所述质粒均来自武汉大学生命科学院实验室。

收稿日期: 2017-03-06

基金项目: 教育部高等学校博士科学点专项科研基金 (20110141120014) 和湖北省自然科学基金共同资助。

作者简介: 刘文晓, 硕士研究生。E-mail: 1248123321@qq.com

* 通信作者: 宋质银, 博士, 教授。E-mail: songzy@whu.edu.cn

pCE-BiFC-VC155 (addgene), pCE-BiFC-VN173 (addgene)。

1.2 方法

1.2.1 Bifc 系列质粒的构建 通过 addgene 查询 pCE-BiFC-VC155 以及 pCE-BiFC-VN173 的质粒图

谱, 确定 VC-155 和 VN-173 基因序列的酶切位点, 并综合 mscv-mic60-flg、mscv-mic19-flg 和 mscv-mic10-flg 的酶切位点图谱, 选取 *Bam*H I、*Not* I 为酶切位点并设计引物 (表 1)。

表 1 pCE-BiFC-VC155 以及 pCE-BiFC-VN173 引物序列
Table 1 Target sequences of pCE-BiFC-VC-155 and pCE-BiFC-VN173

名称 Name	序列 Sequence
VC upstream	5' -GAGGATCCCGTCCGGCGTGCAAAATC-3'
VC downstream	5' -CCCGCGGCCGCTTACTTGTA-3'
VN upstream	5' -CCAGATCCTCTAGAAGATCCATCGCC-3'
VN dpwnstream	5' -ATAGCGGCCGCTACTCGATGTTGTGGCG-3'

将上述合成的引物干粉加入适量超纯水配成 50 μmol 浓度的引物, 取上下游引物各 0.5 μL , easy taq 1 μL , easy-taq Buffer 5 μL , pCE-BiFC 质粒 1 μL , dNTP1 μL 超纯水补足 20 μL 体系。放入 PCR 仪, 进行 VC155 以及 VN173 的基因片段的扩增。通过琼脂糖凝胶电泳来鉴定回收 VC155 以及 VN173 的基因片段。使用 *Bam*H I、*Not* I 2 种限制性内切酶对扩增的 VC155 和 VN173 基因片段以及 mscv-mic60-flg、mscv-mic19-flg 和 mscv-mic10-flg 质粒进行酶切, 回收、连接以及转化。12 h 后菌落 PCR 鉴定菌落。挑取鉴定正确的菌落摇菌过夜, 抽提质粒。即将 VC155、VN173 替换 flg 标签, 构建质粒 pmscv-mic60-vc-155、mscv-mic60-vn-173、mscv-mic19-vc-155、mscv-mic19-vn-173、mscv-mic10-vc-155 和 mscv-mic10-vn-173。

1.2.2 细胞系构建 将适量 HeLa 传代于 6 孔板并放入 5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 12 h, 细胞达到 70%~80%, 按照 Lipofectamine 2000 的说明书, 将连接好的质粒以及适量的 Opti-MEM I 混合, 静置 18 min, 轻柔均匀的滴加入 HeLa 细胞上, 36 h 后获得 HeLa mscv-mic60-vc-155、HeLa mscv-mic60-vn-173、HeLa mscv-mic19-vc-155、HeLa mscv-mic19-vn-173、HeLa mscv-mic10-vc-155 和 HeLa mscv-mic10-vn-173 细胞系。

1.2.3 蛋白质免疫印迹实验 将上述细胞消化 3 min, 2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min 收取细胞, 加入 40 μL PBS 以及等量的 2 \times Sample Buffer, 置于金属域上, 95 $^{\circ}\text{C}$ 煮样 12 min。制备 8% 以及 15% 浓度的聚丙烯酰胺凝胶, 将样品分别依次加入浓缩胶, 低电压 90~100 V 电泳, 当样品进入分离胶以后, 电压调为 110 V, 电泳 1.5 h 后终止电泳, 使用 PVDF 膜转膜, 2 h 后 5% 的脱脂牛奶封闭, 孵育一抗

2~3 h, TBST 清洗 3 次, 每次 15 min, 孵育二抗 1 h, TBST 清洗 3 次, 每次 15 min, 压片显影。

1.2.4 激光共聚焦显微镜实验 将适量的 HeLa mscv-mic60-vc-155、HeLa mscv-mic60-vn-173、HeLa mscv-mic19-vc-155、HeLa mscv-mic19-vn-173、HeLa mscv-mic10-vc-155 和 HeLa mscv-mic10-vn-173 过表达细胞系种植到预先用多聚赖氨酸处理过的玻片上, 12 h 后, 细胞状态稳定, 加入 4% 多聚甲醛于 37 $^{\circ}\text{C}$ 固定 15 min, 弃去多聚甲醛, PBS 清洗 3 次, 每次 10 min。0.1% 的 TritonX-100 处理细胞 10 min, PBS 清洗 3 次, 每次 10 min。10% 的 FBS 室温封闭 30 min。孵育 TOM20 1 h, PBS 清洗 3 次, 每次 10 min。孵育荧光二抗兔抗 1 h, PBS 清洗 3 次, 每次 10 min。封片, 风干, 使用激光共聚焦显微镜观察并拍照记录。

2 结果与分析

2.1 外源表达细胞系的获得

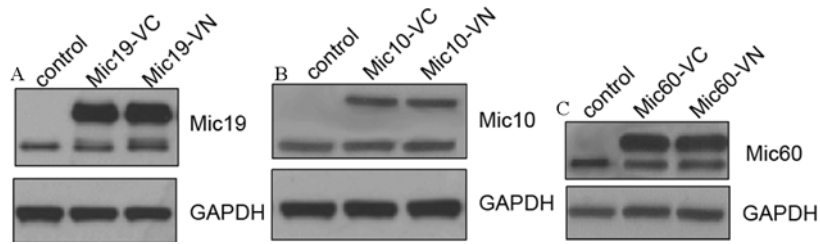
为了研究 MICOS 复合物各组成蛋白质之间的相互关系, 使用双分子荧光互补技术 (BiFC)。在 HeLa 细胞分别构建了 Mic19-VC、Mic19-VN、Mic60-VC、Mic60-VN、Mic10-VC 以及 Mic10-VN 外源表达细胞系, 而且利用 Mic19、Mic60 和 Mic19 抗体通过 Western blotting 检测蛋白表达情况 (见图 1)。结果显示各种 VC 和 VN 融合蛋白在 HeLa 细胞中成功表达。

2.2 MICOS 复合物的精细结构

2.2.1 Mic60、Mic19 以及 Mic10 均发生寡聚化 以 Mic60 为例, 当 HeLa 细胞只过表达 Mic60-VC 或者 Mic60-VN 时, VC 或 VN 肽段不能自体发光, 这排除了 VC 与 VN 2 肽段自发光的干扰影响, 保证了实验的正确性; 而当 HeLa 细胞同时过表达

Mic60-VC 以及 Mic60-VN 时,通过荧光显微镜观察可见到明显的绿色荧光(图 2A),这说明 Mic60 单体之间存在紧密的相互作用, Mic60 蛋白分子可以

发生寡聚化反应。通过同样的方法,发现 Mic19(图 2B)和 Mic10(图 2C)单体之间均可以发生寡聚化反应。

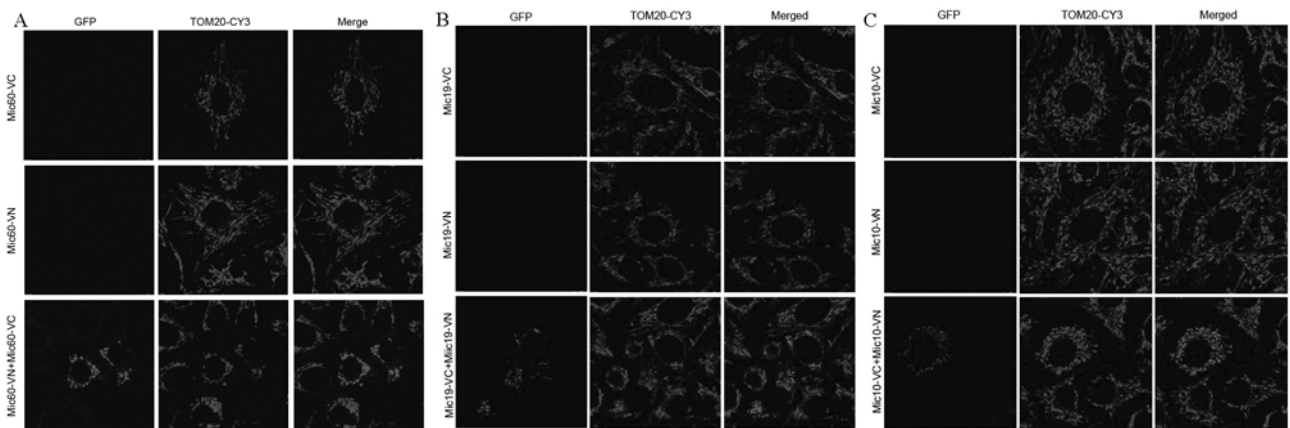


在 HeLa 细胞中表达 Mic19-VC 以及 Mic19-VN (A)、Mic10-VC 和 Mic10-VN (B)、Mic60-VC 和 Mic60-VN (C), GAPDH 为内参,并分别用 Mic19、Mic10 和以及 Mic60 抗体进行 Western blotting 检测

(A) Analysis of MIC19 and GAPDH levels in HeLa cells after transduction with a control empty vector, mic19-vc and mic19-vn, followed by western blot analysis. (B) Analysis of MIC10 and GAPDH levels in HeLa cells after transduction with a control empty vector, mic10-vc and mic10-vn, followed by western blot analysis. (C) Analysis of MIC60 and GAPDH levels in HeLa cells after transduction with a control empty vector, mic60-vc and mic60-vn, followed by western blotting analysis

图 1 过表达细胞系构建

Figure 1 Western blotting analysis of protein expression of cell line after transfection



(A)在 HeLa 细胞中单独表达 Mic60-VC 或者 Mic60-VN 时,进行免疫荧光检测未发现荧光;而同时表达 Mic60-VC 以及 Mic60-VN 时,可见绿色荧光,且与线粒体共定位。(B)在 HeLa 细胞中单独表达 Mic19-VC 或者 Mic19-VN 时,进行免疫荧光检测未发现荧光;而同时表达 Mic19-VC 以及 Mic19-VN 时,可见绿色荧光,且与线粒体共定位。(C)在 HeLa 细胞中单独表达 Mic10-VC 或者 Mic10-VN 时,进行免疫荧光检测未发现荧光;而同时表达 Mic10-VC 以及 Mic10-VN 时,可见绿色荧光,且与线粒体共定位。TOM20 标记线粒体。

(A) Fluorescence were not observed in the cells which were transfected with pMSCV-Mic60-VC or pMSCV-Mic60-VN, independently. And HeLa cells were co-transfected with Mic60-VC and Mic60-VN, observed green fluorescence under fluorescence microscopy. (B) Fluorescence were not observed in the cells which were transfected with pMSCV-Mic19-VC or pMSCV-Mic19-VN, independently. And HeLa cells were co-transfected with Mic19-VC and Mic19-VN, observed green fluorescence under fluorescence microscopy. (C) Fluorescence were not observed in the cells which were transfected with pMSCV-Mic10-VC or pMSCV-Mic10-VN, independently. And HeLa cells were co-transfected with Mic10-VC and Mic10-VN, observed green fluorescence under fluorescence microscopy.

图 2 Mic60、Mic19 以及 Mic10 均发生寡聚化

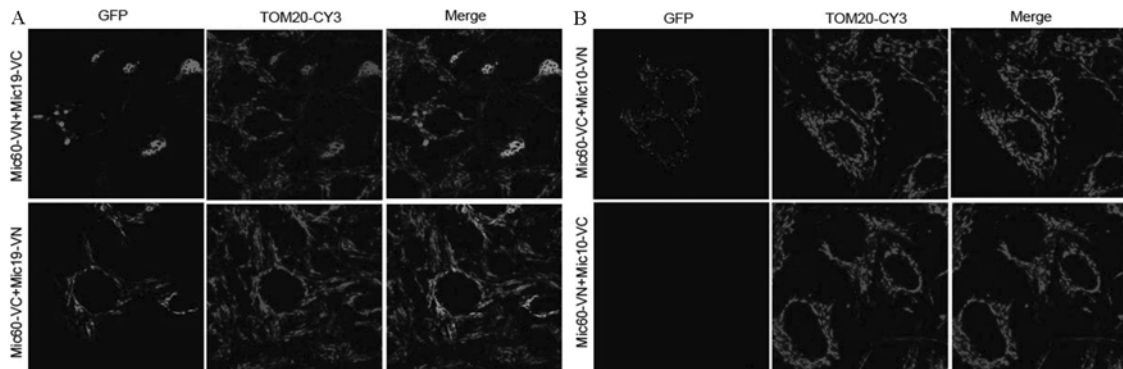
Figure 2 Immunofluorescence experimental analysis of the oligomerization reaction of Mic60, Mic19 and Mic10

2.2.2 Mic60 与 Mic19、Mic10 的相互作用 当 HeLa 细胞中同时表达 Mic60-VC 和 Mic19-VN 或同时表达 Mic60-VN 和 Mic19-VC 时,在活细胞内利用激光共聚焦显微镜在激发光刺激下可观察到绿色荧光(图片未显示);将细胞固定利用 TOM20 抗体进行免疫

荧光染色在激光共聚焦显微镜下可观察到绿色荧光与 TOM20 标记的线粒体(红色荧光)重合(图 3A),这说明 Mic60 与 Mic19 均定位于线粒体膜上,且荧光强度较强,(图 3A),表明 Mic60 与 Mic19 发生了直接相互作用。而在 Mic60 与 Mic10 的相互

作用中, 只有当 Mic60-VN 与 Mic10-VC 同时表达时细胞才可见绿色荧光, 且呈现的荧光强度相对较弱 (图 3B), 这说明 Mic60 与 Mic10 之间的相互作用较为微弱, 可能是间接相互作用, 由于 Mic60 与

Mic10 同处于线粒体的 MICOS 复合物中, 二者空间上无限接近而使它们所连接 VC 与 VN 两肽段靠近从而激发出微弱的绿色荧光。



(A) 在 HeLa 细胞中同时瞬转 pMSCV-Mic60-VC 和 pMSCV-Mic19-VN 或者在 HeLa 细胞同时瞬转 pMSCV-Mic19-VC 和 pMSCV-Mic60-VN 时, 进行免疫荧光检测均见绿色荧光, 且与线粒体共定位。(B) 在 HeLa 细胞中同时瞬转 pMSCV-Mic60-VC 和 pMSCV-Mic10-VN 进行免疫荧光检测可见绿色荧光, 且与线粒体共定位; 而在 HeLa 细胞同时瞬转 pMSCV-Mic10-VC 和 pMSCV-Mic60-VN 时, 进行免疫荧光检测未见绿色荧光。TOM20 标记线粒体。

(A) HeLa cells were co-transfected with pMSCV-Mic60-VC and pMSCV-Mic19-VN, or pMSCV-Mic19-VC and pMSCV-Mic60-VN, observed green fluorescence under fluorescence microscopy. (B) HeLa cells were co-transfected with pMSCV-Mic60-VC and pMSCV-Mic10-VN, observed green fluorescence under fluorescence microscopy. But the green fluorescence were not observed in the cells which were co-transfected with pMSCV-Mic10-VC and pMSCV-Mic60-VN.

图 3 Mic60 与 Mic19、Mic10 的相互作用

Figure 3 Immunofluorescence experimental analysis of the interaction among Mic60, Mic19 and Mic10

3 讨论

当前, 对于哺乳动物的线粒体中的 MICOS 复合物的研究甚少, 其中对于 MICOS 复合物中的各亚基之间的大小、形状、位置以及相互作用关系的了解更是不明朗^[19-20]。而研究发现, 在 MICOS 复合物中各亚基之间关系紧密, 而且它们之间存在一定的秩序关系。线粒体 MICOS 复合物相对较大, 且在其中存在多种亚基, 各亚基的大小形状皆不同。其中 Mic60、Mic19 以及 Mic10^[21]为 MICOS 复合物中的核心蛋白。利用 BiFC^[14,22]系统成功构建了 HeLa mscv-mic60-VC-155、HeLa mscv-mic60-vn-173、HeLa mscv-mic19-VC-155、HeLa mscv-mic19-vn-173、HeLa mscv-mic10-VC-155、HeLa mscv-mic10-vn-173 过表达细胞系, 并采用激光共聚焦显微镜实验方法观察到了 Mic60、Mic19 以及 Mic10 之间的相互作用关系。研究发现 Mic60 与 Mic19^[23-24]之间直接相互作用并作用密切, 且 Mic60 的 C 端可以与 Mic19 的 N 端发生相互作用, 与此同时 Mic60 的 N 端也可以与 Mic19 的 C 端发生相互作用。而 Mic60 与 Mic10 的关系并不这么紧密, Mic60 的 C 端可以与 Mic10 的 N 端发生相互作用, 反之则不可以。而且在 BiFC

系统中而且背激发出的荧光的强度相对较弱, 所以认为 Mic60 与 Mic10 之间相互作用相对较弱, 但二者在 MICOS 复合物中的空间位置相对较近。在 BiFC 系统中, 发现随着 2 个相互作用蛋白的关系的紧密程度的提升, 荧光强度也随之提升。推测其中富含线性关系, 这需要大量数据的统计分析。同时 MICOS 复合物亚基种类复杂, 而且它是一个有机的整体, 其中的关系复杂, 有待进一步的验证。

参考文献:

- [1] BUSIELLO R A, SAVARESE S, LOMBARDI A. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism[J]. *Front Physiol*, 2015, 6:36.
- [2] CHAN D C. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development[J]. *Cell*, 2006, 125(7): 1241-1252.
- [3] WALLACE D C, BROWN M D, MELOV S, et al. Mitochondrial biology, degenerative diseases and aging[J]. *Biofactors*, 1998, 7(3): 187-190.
- [4] CHEN H, CHAN D C. Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases[J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(R2): R169-R176.
- [5] CHEN H, VERMULST M, WANG Y E, et al. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations [J]. *Cell*, 2010,

- 141(2): 280-289.
- [6] CHEN H, MCCAFFERY J M, CHAN D C. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum[J]. *Cell*, 2007, 130(3): 548-562.
- [7] JOHN G B, SHANG Y, LI L, et al. The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology[J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(3): 1543-1554.
- [8] HORVATH S E, RAMPELT H, OELJEKLAUS S, et al. Role of membrane contact sites in protein import into mitochondria[J]. *Protein Sci*, 2015, 24(3): 277-297.
- [9] KOSHIBA T, DETMER S A, KAISER J T, et al. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes[J]. *Science*, 2004, 305(5685): 858-862.
- [10] KOOB S, BARRERA M, ANAND R, et al. The non-glycosylated isoform of MIC26 is a constituent of the mammalian MICOS complex and promotes formation of crista junctions[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853(7): 1551-1563.
- [11] SAKOWSKA P, JANS D C, MOHANRAJ K, et al. The oxidation status of Mic19 regulates MICOS assembly[J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 35(24): 4222-4237.
- [12] YANG R F, SUN L H, ZHANG R, et al. Suppression of Mic60 compromises mitochondrial transcription and oxidative phosphorylation[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 7990.
- [13] KERPPOLA T K. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells[J]. *Annu Rev Biophys*, 2008, 37: 465-487.
- [14] MILLER K E, KIM Y, HUH W K, et al. Bimolecular fluorescence complementation (bifc) analysis: advances and recent applications for genome-wide interaction studies[J]. *J Mol Biol*, 2015, 427(11): 2039-2055.
- [15] DARSHI M, MENDIOLA V L, MACKEY M R, et al. ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function[J]. *J Biol Chem*, 2010, 286(4): 2918-2932.
- [16] AN J, SHI J, HE Q, et al. CHCM1/CHCHD6, novel mitochondrial protein linked to regulation of mitofilin and mitochondrial cristae morphology[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(10): 7411-7426.
- [17] MILENKOVIC D, LARSSON N G. Mic10 oligomerization pinches off mitochondrial cristae[J]. *Cell Metab*, 2015, 21(5): 660-661.
- [18] BARBOT M, JANS D C, SCHULZ C, et al. Mic10 oligomerizes to bend mitochondrial inner membranes at cristae junctions[J]. *Cell Metab*, 2015, 21(5): 756-763.
- [19] MUÑOZ-GÓMEZ S A, SLAMOVITS C H, DACKS J B, et al. The evolution of MICOS: Ancestral and derived functions and interactions[J]. *Commun Integr Biol*, 2015, 8(6): e1094593.
- [20] VAN DER LAAN M, HORVATH S E, PFANNER N. Mitochondrial contact site and cristae organizing system[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2016, 41: 33-42.
- [21] BOHNERT M, ZERBES R M, DAVIES K M, et al. Central role of Mic10 in the mitochondrial contact site and cristae organizing system[J]. *Cell Metab*, 2015, 21(5): 747-755.
- [22] HIATT S M, SHYU Y J, DUREN H M, et al. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis of protein interactions in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Methods*, 2008, 45(3): 185-191.
- [23] SCHAUBLE S, KING C C, DARSHI M, et al. Identification of ChChd3 as a novel substrate of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) using an analog-sensitive catalytic subunit[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(20): 14952-14959.
- [24] DARSHI M, TRINH K N, MURPHY A N, et al. Targeting and import mechanism of coiled-coil helix coiled-coil helix domain-containing protein 3 (ChChd3) into the mitochondrial intermembrane space[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(47): 39480-39491.