蛋白磷酸酶 4 的中心体定位区分析

黄秀清 宁丽峰 龙治涛 孙玲玲 张慧 连慕兰 桑建利*

(北京师范大学生命科学院细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室, 北京 100875; 卫生部北京医院, 卫生部北京老年医学研究所, 北京 100230. * 联系人, E-mail: sangjianli@263.net)

摘要 蛋白磷酸酶 4 (PP4) 是 PPP 家族中的重要成员, 它参与了众多细胞功能的调控, 包括中心体成熟、微管成核、剪切体组装、JNK 通路激活等. 与一些晶体结构已知的磷酸酶, 如 PP1 和 PP2B 不同, 目前对于 PP4 晶体结构的了解还非常少. 已有的研究仅表明 PP4 有一个保守的磷酸酶区域, 至于 PP4 结构区域的其他信息至今还不清楚, 这也制约了关于 PP4 定位区的研究. 同样, PP4 作为一个在果蝇、线虫和哺乳动物细胞等许多物种中都定位于中心体上、在调节中心体功能上有保守作用的蛋白磷酸酶, 与其他中心体蛋白不同, 目前也没有关于 PP4 中心体定位序列信息的报道. 本研究通过对一系列 GFP 标记的 PP4 缺失突变体定位研究, 发现 PP4 至少存在两个中心体定位区 68~136 和 134~220. 它们能够独立行使定位功能以确保 PP4 在中心体正确定位. 这个研究为 PP4 的结构区域和其他研究提供了新的研究结果和思路.

关键词 PP4 中心体 定位 结构域

中心体作为哺乳动物细胞中主要的微管组织中心, 参与了众多的细胞周期进程, 包括分裂期有丝分裂纺锤体的形成、间期细胞内细胞器的运输、细胞极性生长以及细胞的定向运动等 [1-3]. 蛋白磷酸化作用在中心体功能的调节中起了至关重要的作用. 已知一些激酶和磷酸酶, 如 p34cdc2 [4,5], cyclinA [6,7], PP4 [8,9] 以及 LK6 [10] 等定位于中心体上, 并参与了微管动力学和微管生长起始的调节.

PP4 是在果蝇、线虫和哺乳动物细胞等许多物种中定位于中心体的少数磷酸酶之一 [11], 在中心体功能的调节中起重要作用. 果蝇 PP4 基因 P 元件的插入导致 PP4 低水平表达的突变体胚胎出现半致死表型, 其中中心体微管组织被破坏, 暗示 PP4 可能参与了微管生长起始的调节 [8]. 用 RNA 干扰技术分析 PP4 在线虫中的同源基因 *PPH4-1*, 发现 PP4 在分裂期有丝分裂纺锤体形成和精母细胞的减数分裂过程中也起了重要作用 [9]. 我们前期的研究结果也表明, 利用 RNAi 技术抑制 PP4 在 A549 和 MCF-7 细胞中的表达, 发现细胞生长速率明显减慢, 细胞群体中 DNA 含量为 4N 的细胞比率明显增高 [12,13]. 近几年还陆续发现了 PP4 在细胞中的其他功能. Yeh 等人 [14] 用酵母双杂交系统寻找与 c-Rel 相互作用的磷酸酶或激酶, 结果发现, PP4 与 c-Rel 特异性结合并激活 NF- κ B 介导的转录. PP4 的调节亚基 R2 和 R3 与催化亚基形成复合物

可能参与了 DNA 损伤修复并影响细胞对抗癌药物顺铂的敏感性 [15]. 此外, 通过对 PP4 基因敲除小鼠的研究表明, PP4 与胸腺细胞的发育有一定的关系, PP4 可能参与 Pre-T 细胞的信号通路 [16].

尽管 PP4 在中心体功能的调节中起了重要作用, 但是目前还没有关于 PP4 中心体定位区的报道, 而这些研究对于中心体蛋白来说是非常重要的. 虽然 PP4 与 PP2A 有很高的序列相似性, 但是两者的亚细胞定位和功能却完全不同. 造成这些不同最根本的原因在于它们氨基酸序列的不同, 这些氨基酸可能决定了蛋白-蛋白间相互作用.

关于 PP4 的功能结构域, 目前仅通过生物信息学的方法预测到 PP4 有一个位于 [(54~56)-(81~85)-(112~116)] 的磷酸酶保守区域 DXH-(25)-GDXXD-(25)-RGNHD/E. 为了深入了解 PP4 的结构, 确定与 PP4 的中心体定位相关的区域, 我们在 MCF-7 细胞中表达 GFP 标记的 PP4 及其系列缺失突变体. 通过对一系列 GFP 标记的 PP4 缺失突变体定位研究, 发现 PP4 至少存在两个中心体定位区 68~136 和 134~220. 它们能够独立行使定位功能以确保 PP4 在中心体正确定位. 这个结果为进一步研究 PP4 的定位域及功能提供了基础和思路.

1 材料和方法

() 表达质粒的构建. RT-PCR 法获得全长人 PP4 cDNA, 并将其插入 pGEX-2Z 质粒构建 pGEX-2Z-PP4 重组质粒. 扩增获得可读框(ORF)序列. 然后用 *EcoR* /*Sal* 或 *EcoR* /*Xho* 进行双酶切 ORF 和质粒, 并将 ORF 的酶切片段连到 pEGFP-C1 和 pEGFP-N2 (Clontech, Inc) 质粒载体上, 构建成 pEGFP-C1-PP4 和 pEGFP-N2-PP4 重组质粒. 为了构建一系列缺失突变体的重组表达质粒, 我们用 PCR 从 pGEX-2Z-PP4 质粒中扩增出相应的片段, 经 *EcoR* /*Sal* 双酶切后插入 pEGFP-C1 质粒. 所有的 PCR 引物都在赛百盛公司合成. 所有的重组子插入片段列都用 DNA 测序软件核对.

() 细胞培养以及转染. MCF-7 细胞在 37 以及 5% CO₂ 条件下用含 10% 胎牛血清(GIBCO BRL)的 RPMI 1640 (GIBCO BRL) 培养基培养. 用 VIGOROUS High efficient Transfection kit 转染细胞: 处于对数生长期的 MCF-7 细胞以 1×10^5 密度接种在放置有盖玻片的 24 孔板中, 于转染前培养 24 h. 转染前 1 h 更换新鲜培养基(0.5 mL 培养基/孔). 2.25 μ g 质粒 DNA 及 0.5 μ L VIGOROUS High efficient Transfection 分别用 25 μ L 150 mmol/L NaCl 稀释, 充分混匀, 室温下放置 5 min. 混合两种溶液, 充分混匀, 于室温下放置 15 min. 将转染混合物加入细胞培养液中, 混匀, 37 培养 6 h. 弃去培养基, 用无血清培养基洗涤细胞, 再加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37 , 5% CO₂ 条件下培养 24 h 后, 在荧光显微镜(SPOT)蓝光激发下观察细胞, 其中绿色荧光细胞为转染的阳性细胞.

() 免疫荧光分析法. MCF-7 细胞接种在放置有盖玻片的 24 孔板中培养 36 h 后, 用 3.7% 甲醛-PBS 37 固定 15 min. 然后用含 0.5% Triton X-100 的 PBS 洗 3 次, 10 min/次. 用 3% BSA 1 : 500 稀释的 γ -微管蛋白抗体 37 孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 10 min/次. 用 3% BSA 1 : 50 稀释且用 TRITC 标记的抗鼠二抗 IgG (2.5 μ g/mL) 37 孵育 40 min. PBS 洗 3 次, 10 min/次. 封片(封片剂: 防淬灭甘油与 PBS 以 9 : 1 混合), 利用 Olympus Fluoview 300 (FV300) 系统对本进行观察, 采集的荧光图像进行图像叠加合成.

() 细胞总蛋白的提取以及 Western blot 分析. 胰酶消化细胞, 1000 r/min, 4 离心 10 min 收集细胞, PBS 洗 1 次, 弃 PBS, 向细胞沉淀中加入裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 0.5 mmol/L PMSF)冰上孵育 10 min. 然后

13000 r/min, 4 离心 20 min, 取上清, Bradford 法定蛋白浓度. 12% SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 电泳结束后, 将蛋白转到 PVDF 膜上, 400 mA 恒压, 电泳 70 min. 一抗使用 PP4 抗兔抗体(1 : 500)(Chemicon)/GFP 抗兔抗(1 : 2000)(Sigma), 二抗使用 AP 标记的抗兔二抗(1 : 1000), 最后用 NBT/BCIP 显色(Promega).

2 结果

2.1 GFP 标记的 PP4 正确定位于中心体

将全长 PP4 基因分别连接到 GFP 的 N 末端和 C 末端, 构建 PP4-EGFP 和 EGFP-PP4 两个质粒(图 1(a)). 将其分别转染到 MCF-7 细胞中. 首先, 用抗 GFP 抗体和抗 PP4 抗体(图 1(b))分别对转染了 EGFP-PP4, PP4-EGFP 及对照质粒的细胞蛋白提取物进行免疫印迹检测, 证实了 PP4 的正确表达. 然后, 借助 GFP 标签直接观察外源蛋白的定位. 最后, 利用中心体特异性蛋白 γ -微管蛋白的抗体染色进行共定位, 发现转染 EGFP 质粒的细胞无论是间期还是有丝分裂期都没有特异定位, GFP 蛋白弥散在整个细胞中; 而在转染 PP4-EGFP 和 EGFP-PP4 两种重组质粒的细胞中, 间期和有丝分裂期细胞(图 1(c))都能表现出明显的中心体定位, 说明外源性 GFP-PP4 融合蛋白在 MCF-7 细胞中的中心体定位不受 GFP 和细胞周期进程的影响. 由于分别转染 EGFP-PP4 和 PP4-EGFP 两种重组质粒在中心体定位上没有明显的差异, 在后述的研究中将 GFP 连接到缺失突变体的 N 末端.

2.2 分析 PP4 缺失突变体确定两个中心体定位区

由于 GFP 标记的 PP4 在 MCF-7 细胞中能够正确定位于中心体, 因此可以通过将 GFP 标记的 PP4 缺失突变体转入 MCF-7 细胞, 分析它们在细胞中的定位行为来确定 PP4 的中心体定位区. 因此构建了一系列从 N 末端或 C 末端逐段缺失的 PP4 缺失突变体(图 2(a)), 并将这些突变体转染到 MCF-7 细胞. 将细胞固定, 同时用抗 γ -微管蛋白抗体染色. 图 2(b)是免疫印迹法显示的一系列缺失突变体以及内源 PP4 的表达情况. 观察分析 C 末端缺失突变体的定位结果, 发现含氨基酸残基片段 1~136 能够正确定位到中心体(图 3(c)), 但是更短的 1~101 无法定位到中心体(图 3(d)). 随后分析 N 末端缺失突变体的定位结果发现, 134~307 能够定位到中心体(图 3(g)), 更短的 173~307

图1 GFP-PP4 的中心体定位

(a) GFP-PP4 融合蛋白示意图. 将 PP4 蛋白分别连在 GFP 蛋白的 C 端或 N 端. (b) 免疫印迹法检测 GFP-PP4 蛋白在 MCF-7 细胞中的表达情况. 转染 24 h 后收集蛋白, 用抗 GFP 的抗体以及抗 PP4 的抗体分别检测外源和内源 PP4 的表达情况. (c) GFP-PP4 定位在中心体上. 分别用 GFP, PP4-EGFP 以及 EGFP-PP4 质粒转染 MCF-7 细胞, 然后用抗 γ -微管蛋白抗体转染微管(红色). GFP 显示无论在间期还是分裂期, 外源 PP4 蛋白与中心体有明显共定位现象. 标尺示 10.0 μ m

无法定位到中心体(图 3(h)). 分析发现, 1~136 和 134~307 只有 3 个氨基酸交叠, 但是它们都能定位在中心体. 基于以上结果推测, PP4 上至少存在两个与中心体定位相关的区域, 1~136 和 134~307 各自含有至少一个中心体定位区.

为了进一步确定包含在 1~136 和 134~307 中的中心体定位区, 在 1~136 和 134~307 中分别构建了一系列 GFP 标记的短片段(图 2(a)). 将这些片段分别转染到 MCF-7 细胞中, 经细胞固定和抗 γ -微管蛋白抗体染色后, 观察分析包含在 1~136 中的不同短片段的定位结果, 发现片段 1~70, 68~101 和 100~136 不能正确定位于中心体(图 3(j)~(l)), 片段 68~136 显示出明显的中心体定位(图 3(m)). 同时还分析了包含在

134~307 中的几个短片段, 其中片段 134~177, 173~220, 220~243, 243~307, 173~243, 220~307 不能定位到中心体(图 2(i), (n)~(q), (s)), 片段 134~220 表现出明显的中心体定位(图 3(r)). 为了验证以上结果, 在 PP4 的中间区域构建了 5 个短片段 68~177, 100~220, 68~243, 100~243 和 68~220, 它们包含一个或两个前面已确定的定位片段, 重复上述实验, 结果表明, 它们均能定位到中心体(图 3(t)~(x)). 综上所述, 68~136 和 134~220 是 PP4 的中心体定位相关区域.

3 讨论

3.1 GFP 标记的 PP4 的定位情况

利用分子标签. 结合缺失突变体或点突变技术

对蛋白区域进行分析是一个广泛使用的方法 [11,17-20]。然而, PP4 作为一个定位于中心体并参与了中心体功能的重要的蛋白磷酸酶, 其正确定位于中心体所需的相关信息还知之甚少。因此深入了解 PP4 结构方

面的信息是非常必要的。我们选择使用 GFP 作为标签检测 PP4 及其缺失突变体在细胞中的定位情况以获得更多的相关信息。但是在最初进行检测分析时, 发现并不是所有 GFP 标记的 PP4 都能定位到中心体

图 2 PP4 有两个独立的中心体定位区

(a) GFP-PP4 融合蛋白构建示意图及其中心体定位情况总结。数字表示 PP4 包含的氨基酸起始序列, 加号表示相应的突变体与中心体可以共定位, 减号表示不能共定位。(b) 分别用抗 GFP 抗体和抗 PP4 抗体检测外源 PP4 蛋白(上)以及内源 PP4 蛋白(下)的表达。抗 GFP 抗体可检测出融合蛋白在细胞中的正常表达, 不同的突变体对应不同的分子质量。抗 PP4C 端的抗体不仅可检测到所有细胞中内源 pp4 (34 kD)的正常表达, 也可以检测到外源 PP4 (aa68~307), PP4 (aa100~307), PP4 (aa134~307), PP4 (aa173~307)和 PP4 (aa 220~307)的表达

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2007-52-16-1896>

图3 GFP-PP4 突变体的定位

用抗 γ -微管蛋白的抗体(红色)处理转染 GFP-PP4 质粒的 MCF-7 细胞, 进行共定位分析. 标尺示 10.0 μm

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2007-52-16-1896>

上,在转染的细胞中GFP标记的PP4除了能定位于中心体外,还有一部分出现了弥散的分布.为了探究其原因,首先,检测弥散分布是否由于GFP的影响.我们将PP4基因连接到小标签HA上,构建了HA-PP4质粒.转染后,用HA抗体染色,发现其定位情况与GFP标记的PP4的定位情况相似,PP4仍有部分出现非中心体定位.其次,检测弥散的分布是否与细胞周期相关联.在转染细胞24 h后加入TDR阻断细胞周期使细胞同步化,然后分别分析PP4在S、G2/M、G1各个时相的定位.结果表明不同时相的细胞出现相似的中心体定位结果.最后,检测部分细胞中这种弥散的分布是否由于蛋白表达水平的影响.在重复实验中,保持其他条件不变,只将细胞培养温度降到30℃,外源PP4基因在细胞中的表达水平降低.结果显示,GFP标记的PP4出现弥散分布的细胞显著减少.以上结果证明,外源性PP4在MCF-7细胞中的中心体定位不受GFP和细胞周期进程的影响,细胞中出现部分的GFP弥散分布是外源性PP4蛋白表达水平过高所致.已有的研究结果也显示,表达外源性蛋白会导致非特异的定位^[21,20].在我们的研究中再次得到证实.对于过表达外源性PP4导致非特异分布的原因,我们认为一个可能的原因是中心体上能容纳PP4的含量是有限的,因此它不可能接受所有表达的蛋白,而多余的蛋白就会出现随机分布.另一个可能的原因是PP4到中心体上的定位需要其他蛋白的介导.已有研究表明,PP4的调节亚基之一PP4R2定位于中心体上,它参与了PP4在中心体上的定位.因此,过表达PP4而没有相应的过表达PP4R2也可能导致非特异的分布.综合以上结果,认为只要表达水平合适,GFP-PP4是一个研究PP4中心体定位的可行的模型.

3.2 PP4 序列中至少有两个中心体定位区

PP4是PPP家族中重要的丝/苏氨酸磷酸酶,与其他一些晶体结构已知的磷酸酶,如PP1和PP2B不同,有关PP4的晶体结构方面的研究还处于初级阶段,这在很大程度上限制了对PP4结构信息的研究.已有研究结果仅仅表明,PP4包含了一个位于[(54~56)-(81~85)-(112~116)]的保守的磷酸酶区域DXH-(25)-GDXXD-(25)-RGNHD/E.本研究中发现,PP4至少存在两个可以独立行使功能的中心体定位区.经过观察分析确定1~136,134~307,68~136,134~220仅包含了一个定位区的质粒,与那些包含两

个定位区的质粒68~177,100~220,68~220,100~243,68~243的中心体定位结果是相似的.因此,认为PP4至少存在两个中心体定位区,这两个中心体定位区的存在是确保PP4正确定位到中心体上发挥功能的机制.

通过BLASTp对两个定位区序列的相似性作了比较,我们发现两个序列并不存在显著同源性.因此,推测这两个区域很有可能是与不同的中心体蛋白相互作用或者与同一蛋白的不同区段相互作用来行使功能.此外,虽然中心体定位区和磷酸酶保守区域都位于PP4序列的中间,但是这两个中心体定位区都不包含完整的磷酸酶保守区域.也不包含对磷酸酶活性起重要作用的Arg237,表明PP4磷酸酶活性区与定位区是分开的.这些研究结果提供了PP4的一些基本定位信息,这对于深入研究PP4结构与功能提供了有用的帮助.

3.3 PP4 中心体定位区的特征

在PPP家族中,PP4与PP2A最为相似,两者的氨基酸有65%同源.尽管在序列上高度相似,但是PP2A并不定位于中心体上.研究发现,两个中心体定位区位于与PP2A同源性为75%的中央区段68~220,而不是相对独特的N末端(61%)或者C末端(54%).定位区位于保守区里,表明PP4的特异定位很有可能是保守区里的独特的氨基酸决定的.与PP2A相比在中心体定位区中有37个氨基酸是不同的.这些氨基酸很有可能是形成中心体定位独特区域所必需的.此外,通过PROSITE进行预测,发现这37个氨基酸中,苏氨酸203和204是被O-糖基化及磷酸化修饰的^[22].O-糖基化修饰是许多核-胞质蛋白常见的修饰,通常只发生在丝氨酸和苏氨酸残基上,它的功能是暂时阻止这些残基的磷酸化作用.磷酸化修饰是PP2A家族常见的修饰.PP2A活性是通过磷酸化作用调节的^[23].PP4的磷酸化作用能够改变PP4与他的调节亚基及其他底物之间的相互作用.本研究鉴定了两个独立的PP4中心体定位区的一些基本信息,但是要获得更详细的关于中心体定位的信息,还需要更多的更精确的突变分析,本文为进一步深入研究PP4定位提供了有用的帮助.

参 考 文 献

- 1 Andersen S S. Molecular characteristics of the centrosome. *Int Rev Cytol*, 1999, 187: 51-109

- 2 Tassin A M, Bornens M. Centrosome structure and microtubule nucleation in animal cells. *Biol Cell*, 1999, 91: 343—354[DOI]
- 3 Hinchcliffe E H, Sluder G. It takes two to tango: Understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes Dev*, 2001, 15: 1167—1181[DOI]
- 4 Belmont L, Hymann A A, Sawin K D, et al. Realtime visualization of cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts. *Cell*, 1990, 62: 579—589[DOI]
- 5 Verde F, Labbé J C, Dorée M, et al. Regulation of microtubule dynamics by cdc2 protein kinase in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Nature* 1990, 343: 233—238[DOI]
- 6 Bailly E, Dorée M, Nurse P, et al. p34cdc2 is located in both nucleus and cytoplasm; part is centrosomally associated at G₂/M and enters vesicles at anaphase. *EMBO J*, 1989, 8: 3985—3995
- 7 Pagano M, Pepperkok R, Verde F, et al. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J*, 1992, 346: 760—763
- 8 Helps N R, Brewis N D, Lineruth K T, et al. Protein phosphatase 4 is an essential enzyme required for organisation of microtubules at centrosomes in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci*, 1998, 111: 1331—1340
- 9 Sumiyoshi E, Sugimoto A, Yamamoto M. Protein phosphatase 4 is required for centrosome maturation in mitosis and sperm meiosis in *C. elegans*. *J Cell Sci*, 2002, 115: 1403—1410
- 10 Kidd D, Raff J W. LK6, a short lived protein kinase in *Drosophila* that can associate with microtubules and centrosomes. *J Cell Sci*, 1997, 110: 209—219
- 11 Mollinari C, Kleman J P, Jiang W, et al. PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *Biochem J*, 2002, 157: 1175—1186
- 12 黄秀清, 龙治涛, 宁丽峰, 等. 蛋白磷酸酶 4 在人肺癌细胞 A549 增殖中的功能分析. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33: 730—737
- 13 宁丽峰, 龙治涛, 黄秀清, 等. PP4 低表达对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的影响. *科学通报*, 2006, 51: 2119—2125
- 14 Yeh P Y, Yeh K H, Chuang S E, et al. Suppression of MEK/ERK signaling pathway enhances cisplatin induced NF- κ B activation by protein phosphatase 4-mediated NF- κ B p65 Thr dephosphorylation. *J Biol Chem*, 2004, 279: 26143—26148[DOI]
- 15 Gingras A C, Caballero M, Zarske M, et al. A novel, evolutionarily conserved protein phosphatase complex involved in cisplatin sensitivity. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4: 1725—1740[DOI]
- 16 Shui J W, Hu M C, Tan T H. Conditional knockout mice reveal an essential role of protein phosphatase 4 in thymocyte development and Pre-T-Cell receptor signaling. *Mol Cell Biol*, 2007, 27: 79—91[DOI]
- 17 Leask A, Stearns T. Expression of amino- and carboxyl-terminal γ - and α -tubulin mutants in cultured epithelial cells. *Biochem J*, 1998, 237: 2661—2668
- 18 Lanini L, McKeon F. Domains required for CENP-C assembly at the kinetochore. *Mol Biol Cell*, 1995, 6: 1049—1059
- 19 Song K, Gronemeyer B, Lu W, et al. Mutational analysis of the central centromere targeting domain of human centromere protein C (CENP-C). *Exp Cell Res*, 2002, 275: 81—91[DOI]
- 20 Wagner S, Chiosea S, Nickerson J A. The spatial targeting and nuclear matrix binding domains of SRm160. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 3269—3274[DOI]
- 21 Brewis N D, Street A J, Prescott A R, et al. PPX, a novel protein serine/threonine phosphatase localized to centrosomes. *EMBO J*, 1993, 12: 987—996
- 22 Hu M C, Shui J W, Mihindukulasuriya K A, et al. Genomic structure of the mouse PP4 gene: A developmentally regulated protein phosphatase. *Gene* 2001, 278: 89—99[DOI]
- 23 Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: A highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signaling. *Biochem J*, 2001, 353: 417—439[DOI]