

人心脏发育候选基因 *hole* 在 MAPK 信号传导途径中的作用

Role of Human Heart Developmental Candidate Gene *hole* in MAPK Signaling Pathway

周军媚/ZHOU Jun-mei^{1,2}, 吴秀山/WU Xiu-shan²

1. 南华大学生命科学与技术学院生物教研室, 湖南衡阳 421001

2. 湖南师范大学生命科学学院心脏发育研究中心, 长沙 410081

1. School of Life Sciences and Technology, Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

2. School of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China

[摘要] MAPK 信号传导途径是存在于真核细胞中的最广泛的一种调节机制,它与心血管的发育、心肌肥大等心脏疾病的发生有着密切的关系。利用荧光素酶的活性分析讨论人 *hole* 基因在 MAPK 信号途径中的作用。实验表明, COS-7 细胞中过表达 *hole* 蛋白能够强烈抑制 MAPK 信号途径的 2 个下游转录因子 AP-1 和 SRE 的转录活性。*hole* 的突变体报道基因分析表明, *hole* 基因可能是通过其 N' 端的 ERK 结合区和 C' 端的多聚脯氨酸序列来行使其抑制作用的。研究表明, 该基因可能通过参与 MAPK 信号途径而在心脏发育的过程中起作用。

[关键词] 心脏病, *hole* 基因, MAPK 信号途径

[中图分类号] Q342

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2005)09-0023-03

Abstract: Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal transduction pathways are among the most widespread mechanisms of eukaryotic cell regulation, and MAPK has a close relationship with cardiovascular development and diseases such as cardiomyotrophy. Overexpression of *hole* in the COS-7 cells inhibits strongly the transcriptional activities of AP-1 and SRE. *Hole* functions as a inhibitor probably through its ERK D-domain in N-terminal and proline-rich region in C-terminal. The results suggest that *hole* might be involved in heart development through MAPK signaling pathway.

Key Words: heart disease, *hole*, MAPK signal pathway

CLC Number: Q342

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2005)09-0023-03

1 引言

心脏发育从中胚层细胞的分化、线性心管的形成、到最终复杂四腔室心脏的形成,都受到多种信号途径严密而精确的调控。目前,我们对于心脏发育过程所涉及的调控蛋白与信号途径仍知之甚少,因此,发现新的参与心脏发育过程的信号途径调控蛋白具有重要的理论和应用意义。

hole 基因是我们在寻找与心脏发育相关的基因时克隆的一个人的新基因^[1]。*hole* 基因位于 14 号染色体,我们从 mRNA 水平对该基因进行了 Northern blot 分析,结果显示:*hole* 基因在心脏组织中的表达非常强烈。*hole* 基因在心脏中的表达谱分析表明,它可能与心脏的发育有关。通过构建增强型绿色荧光蛋白与 *hole*

融合基因的真核表达系统,转染 COS-7 细胞系,瞬时表达后荧光显微镜观察了它的编码蛋白的活细胞定位及表达,表明 *hole* 蛋白主要在细胞膜和细胞质中表达,而且在细胞质中点缀着大小不一的点状荧光。

本论文利用报告基因分析测试 *hole* 对 SRE 和 AP-1 的转录活性,荧光素酶分析试验发现 *hole* 蛋白在 COS-7 细胞中过表达能强烈抑制 MAPK 信号途径的 2 个下游转录因子 AP-1 和 SRE 的转录活性。*hole* 突变体的荧光素酶分析试验表明,*hole* 基因可能通过其 N' 端的 ERK 结合区和 C' 端的多聚脯氨酸序列来行使其抑制作用。

收稿日期: 2005-06-27

基金项目: 国家自然科学基金(3021010392, 30270722, 30270644, 30470867), 科技部 973 项目(2005CB522505), 湖南省科技厅重点项目基金(04FJ2006)资助

作者简介: 周军媚, 女, 湖南衡阳南华大学北校区南华大学生命科学与技术学院生物教研室, 助教, 研究方向为分子发育遗传学;

E-mail: zhoujunmei2003@yahoo.com.cn

吴秀山(通讯作者), 男, 湖南长沙河西二里半湖南师范大学生命科学学院心脏发育研究中心, 教授, 研究方向为分子发育遗传学; E-mail: xiushanwu2003@yahoo.com.cn

2 材料与方法

2.1 质粒的构建

用 *XhoI* 将含有 *hole* 基因的 pMD18-T-*hole* 质粒进行酶切, 所得片段纯化后与经过 *XhoI* 酶切处理的 pCMV-tag 2B 连接循环水浴过夜, 转化大肠杆菌 DH5 α , 转化后提质粒, 经酶切鉴定并测序, 得到 pAS 1[pCMV-tag2B-*hole*]。由于 *hole* 基因含有 1 个 *PstI* 酶切位点, 位于 *hole* 基因的 1 003 bp 处, 即在 *hole* 蛋白的 284 氨基酸处, 可以将 *hole* 酶切分成两段, 即: N'端的 ERK 结合区 (DD) 和 C'端的多聚脯氨酸序列 (PP)。于是我们将 pAS1 [pCMV-tag2B-*hole*] 进行 *PstI* 酶切, 分别纯化酶切产物, 所得小片段为 N'端的 ERK 结合区 (DD), 大片段为载体与 C'端的多聚脯氨酸序列 (PP)。将小片段与经 *PstI* 酶切后并磷酸化的 pCMV-tag2B 载体连接, 大片段纯化后自连, 则得到分别含氨基酸 1~284 和氨基酸 284~319 的 *hole* 蛋白的 2 个突变体: pAS 2 [pCMV-tag2B-DD] 和 pAS 3[pCMV-tag2B-PP]重组质粒。

2.2 细胞培养与瞬时转染

COS-7 细胞培养于含氨苄青霉素 (100 μ g/ml) 和链霉素 (100 μ g/ml) 以及 10% 胎牛血清的 DMEM (购自 Gibco) 培养基, 维持单层贴壁生长, 在细胞处于对数生长期时进行传代。细胞复苏、接种、传代、冻存均按常规操作进行。转染脂质体 Lipofect AMINE, Opti-MEM (OMEM) 购自美国 Invitrogen 公司。细胞转染方法按 Invitrogen 公司的说明书进行。

2.3 荧光素酶活性检测

按常规转染方法, 将重组质粒 pAS 1、带荧光素酶报告基因 pSRE-LUC (or pAP-1-LUC), lacZ (β -半乳糖苷酶) 基因进行共转染。LacZ 为测转染效率用。荧光素酶活性检测方法如下: 经过 2 天培养后的转染细胞用 PBS 洗涤 2 次, 然后用 1 X 裂解液裂解细胞, 室温静置, 离心收集细胞, 取上清, 加入 ONPG assay, 在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱反应 30 min, 直至溶液变黄; 然后加入 trisbase 终止反应; 再用分光光度计测 420 nm 的吸光值, 计算其转染效率; 根据转染效率计算每管与荧光素酶底物反应所需的蛋白量; 最后将荧光素酶底物和蛋白混匀, 利用荧光发光计 Turner Designs TD-20/20 检测报告基因的荧光强度。实验共重复 3 次。

3 结果与讨论

3.1 *hole* 蛋白的结构特点

用 SMART 程序分析 *hole* 编码的氨基酸序列, 发现 *hole* 蛋白无明显的结构域, 但是含有 6 个跨膜区, 可能是膜蛋白。为了进一步分析跨膜蛋白的特征, 我们利用 CBS 在线工具对 *hole* 蛋白进行拓扑结构分析。分析表明 *hole* 蛋白含有 6 个跨膜区, N'端位于膜内, 可能是一个充当转运和结合功能的蛋白[图 1]。

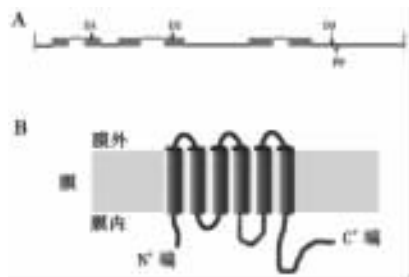


图 1 *hole* 蛋白的结构图

注: (A) *hole* 蛋白的拓扑结构分析图: 利用在线工具分析 *hole* 蛋白的拓扑结构发现 *hole* 蛋白有 6 个跨膜区 (13aa~30aa, 40aa~62aa, 75aa~97aa, 112aa~131aa, 182aa~204aa, 214aa~236aa), 红色表示膜区域, 蓝色表示膜内, N'端和 C'端均位于膜内, 粉红色表示膜外。ERK D-domain (D1, D2 和 D3) 和多聚脯氨酸的位置均用箭头表示。 (B) *hole* 蛋白的拓扑结构模型图。

为了进一步分析 *hole* 蛋白的潜在功能, 我们利用网上在线工具 motif scan 程序对 *hole* 蛋白进行分析。分析发现: *hole* 蛋白的 N'端有 3 个 ERK 的结合区 (D-domain), D1 (36~50, PRKIGVC[IVLVGDV]), D2 (110~124, RKALTLLSVCVPGL), D3 (272~284, RDFPPPALSLLELQ), C'端有一个 SH3 (Src homology 3) 的结合位点 PP (284~303, QPPPPQRNSVPPPPPLHGP) [图 1A]。

3.2 *hole* 蛋白在 MAPK 信号途径中的作用

正如前面所分析, *hole* 蛋白具有 ERK 的结合位点 (D-domain) 和与 SH3 结构域结合的多聚脯氨酸序列。大量文献证明与 SH3 结构域结合的多聚脯氨酸序列能通过含有 SH3 结构域的蛋白结合从而抑制 MAPK 信号途径^[2], 而 ERK 本身就是 MAPK 信号途径中的一个重要激酶。因此我们认为 *hole* 蛋白可能参与 MAPK 信号途径的调节, 于是构建 pCMV-tag2B-*hole* 重组质粒, 利用报告基因分析测试 *hole* 对 SRE 和 AP-1 转录活性的影响。AP-1 与 SRE 是 MAPK 信号途径中 ERK 组的重要因子, AP-1 是 C-JUN 与 C-FOS 的复合物, SRE 是 C-FOS 的上游应答因子序列。SRE 可以与 1 个二聚体结合, 这个二聚体由 1 个血清应答因子 (SRF) 与另 1 个四聚体 (TCF) 组成。结果表明, *hole* 分别抑制了报告基因 AP-1-Luc (A) 和 SRE-Luc (B) 的约 91% 的活性 (图 2)。因此, *hole* 基因在 COS-7 细胞中的过度表达强烈地抑制由 SRE 和 AP-1 介导的 MAPK 信号传导。

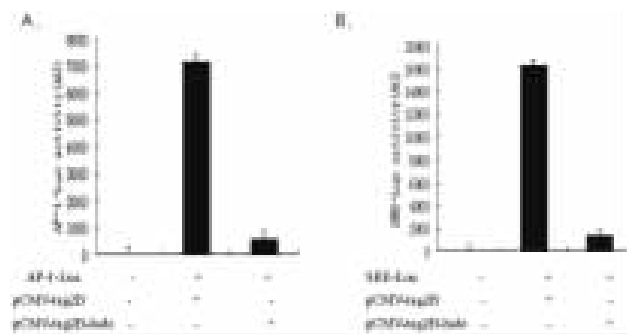


图 2 *hole* 强烈地抑制 AP-1-Luc (A) 和 SRE-Luc (B) 的转录活性

3.3 *hole* 蛋白突变体在 MAPK 信号途径中的作用

为了进一步测试哪个位点在 MAPK 中起重要作用, 我们构建了 *hole* 蛋白的突变体 pAS 2、pAS 3 重组载体。利用报告基因分别测试 pAS 1、pAS 2、pAS 3 对 SRE 和 AP-1 转录活性的影响。将 pAS 1、pAS 2、pAS 3 分别与 SRE-Luc 或者 AP-1 共转染测试其荧光素酶的活性。结果表明, *hole* 蛋白的 N'端的 ERK 结合区 (DD) 和 C'端的多聚脯氨酸序列 (PP) 都能够抑制报告基因的荧光活性 (图 3)。但是与 *hole* 蛋白的全长相比, 抑制能力有所减弱。在 SRE 介导的信号途径中, pAS 2 抑制了报告基因 SRE-Luc 约 78% 的活性, 而 pAS 3 则抑制了 61% (图 3A)。同样, 将这两个 *hole* 的突变体与 AP-1-Luc 共转染时也得到类似的结果 (图 3B)。

有丝分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号途径是细胞信号转导过程的重要组成部分。目前的研究表明, 在细胞水平上, MAPK 将膜转导蛋白与其细胞内的关键调控靶蛋白联系起来, 从而介导胞外的多种信号, 并将这些信号级联放大后传递给相应的下游因子, 通过激活包括 SRE、ELK-1、c-Jun、c-fos、MEF 2 等多种转录因子, 最终开启细胞特定功能基因的表达。在个体水平, MAPK 信号途径涉及了包括心脏在内的多种组织器官的发育过程。

心脏发育涉及大量心脏组织特异性基因的时空表达调控, 在这一过程中胞外信号及其传导和特异性转录因子的表达起到了关键性作用。在 MAPK 途径的作用下, ELK1、SRE 和 SRF 结合而

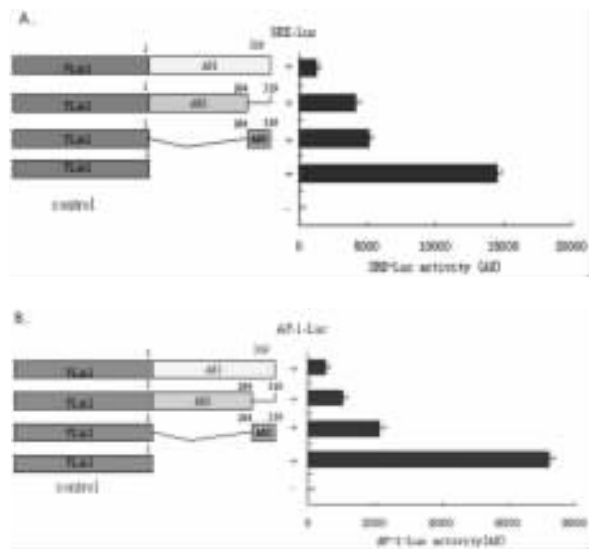


图 3 *hole* 蛋白的突变体对 SRE-Luc(A)和 AP-1-Luc(B)转录活性的抑制作用示意图

注: pAS1 [pCMV-tag2-*hole* (1~319)] 含有全长的 *hole* 基因, pAS2 [pCMV-tag2-DD (1~284)] 含有 ERK 结合区 (D-domain), pAS3 [pCMV-tag2-PP (284~319)] 含有多聚脯氨酸序列 (PP)。Control, 没有转染质粒的空白对照。

成的复合物诱导早期基因。大量的研究表明, SRF 的表达具有组织特异性, 它能与 Nkx2. 5 和 GATA4 等心脏特异性转录因子相结合。在成纤维细胞中, SRF 和 GATA4 共同作用可以激活肌源性或非肌源性的 SRF 依赖性的启动子; SRF 与 GATA4 及 Nkx2.5 的相互作用可激活心脏 α -actin 的启动子, 从而诱导这一蛋白在成纤维细胞中的表达^[3]。ELK 1、SRF 和 SRE 形成的复合物在启动早基因表达过程中的密切关系, 让我们有理由相信 MAPK 也极有可能通过 ELK1 和 SRF 的相互作用参与调节心血管的发育过程。最近的研究发现, MAPK 不仅与心血管细胞对外界压力的反应有关, 而且还可能与心血管的发育调节有关。打断鼠的 MAPK 信号途径, 发现该鼠在 11 天时死在子宫里, 并且这些鼠有严重的血管发育不全^[4]。还有研究证明 MAPK 信号途径在心肌肥大发生过程中有着重要的作用^[5]。

根据前面对 *hole* 蛋白的结构分析和实验结果分析, 表明 *hole* 蛋白在 MAPK 信号途径中具有一定的作用。在 MAPK 信号途径中, 激酶可以通过其结合位点来激活, *hole* 蛋白 N' 端含有的 ERK 结合位点 D-domain, 含有疏水性残基 L-X-L。疏水性残基 L-X-L 在 D-domain 序列中具有高度的保守性, 它对于激酶与靶转录因子的结合有着重要的作用。研究证明, 把疏水残基 L-X-L 突变成 A-E-A, 则严重影响了结合区 D-domain 的功能^[6]。D-domain 能与 ERK 发生表面相互作用, 介导 ERK 结合到底物上进行磷酸化, 从而激活 MAPK 信号途径。许多研究表明, 多聚脯氨酸序列, 尤其是 PXXP 序列能与含有 SH3 结构域的蛋白结合, 通过阻断含 SH3 结构域的蛋白的功能进而调节细胞中的信号传导^[7]。因此, *hole* 蛋白可能是通过其 N' 端的 ERK 结合位点 D-domain 和 C' 端的多聚脯氨酸序列来影响 MAPK 信号传导的 (图 4)。

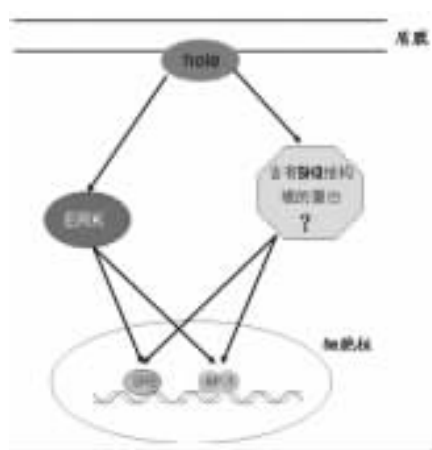


图 4 *hole* 蛋白在 MAPK 信号途径中的假想模式图

4 结论

虽然 *hole* 基因是个未知基因, 也没有功能性的结构域, 但到目前为止, 在其它物种中还没有其功能性研究的报道。但我们对 *hole* 基因的研究结果表明, *hole* 可能是一个参与了细胞中的 MAPK 信号途径的抑制因子。对 *hole* 基因的 Northern blot 的表达谱分析, 说明 *hole* 基因可能对心脏发育起作用。由于 *hole* 蛋白在 MAPK 信号途径中具有强烈的抑制作用, 而 MAPK 与心血管的发育、心肌肥大等心脏疾病的发生有着密切的关系, 因此我们认为 *hole* 基因可能是通过 MAPK 信号途径来参与心脏发育的调节, 但是其具体的作用机制仍不清楚, 还有待于进一步的研究证明。

参考文献 (References)

[1] Zhou J, Li Y, Liang P, et al. A novel six-transmembrane protein *hole* functions as a suppressor in MAPK signaling pathways[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333: 344~352

[2] Feng S, Chen K J, Yu H, et al. Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions[J]. *Science*, 1994, 266: 1 241~1 247

[3] Belaguli N S, Sepulveda J L, Nigam V, et al. Cardiac tissue enriched factors serum response factor and GATA-4 are mutual coregulators[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20: 7 550~7 558

[4] Yang B J M, McCarthy M, Bucana C, et al. Mek3 is essential for early embryonic cardiovascular development[J]. *Nature Genet*, 2000, 4: 309~313

[5] Kuwahara K, Saito Y, Kishimoto I, et al. Cardiotrophin-1 phosphorylates akt and BAD, and prolongs cell survival via a PI3K-dependent pathway in cardiac myocytes[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32: 1 385~1 394

[6] Buchwalter G, Gross C, Wasyluk B. Ets ternary complex transcription factors[J]. *Gene*, 2004, 324: 1~14

[7] Lee K Y, Hyeok Y J H, Kim M, et al. A dipalmitoyl peptide that binds SH3 domain, disturbs intracellular signal transduction, and inhibit tumor growth in vivo [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296: 434~442

(责任编辑 王 芷)

·读者·编者·作者·

更正启事

由于我们工作失误, 本刊 2005 年第 8 期师昌绪院士的“卷首寄语”文章英文题目有误, 正确的英文标题应为 It's High Time to Value Fundamental Researches, 谨向作者和读者表示歉意。感谢梁思礼院士也指出此错误。

(本刊编辑部)