

## RNF149 通过泛素化介导的CD9降解调控细胞增殖\*

李燕<sup>1, 2)</sup> 阮林浩<sup>1, 2)</sup> 索塔林<sup>1, 2)</sup> 王鹏<sup>1, 3)</sup> 唐捷<sup>1)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup>中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; (<sup>2)</sup>中国科学院大学, 北京 100049; (<sup>3)</sup>中国科学技术大学, 合肥 230026)

**摘要** 选取功能未知的泛素连接酶 RNF149 作为研究对象. 该分子同 GRAIL(gene related to anergy in lymphocytes)具有较高的同源性, 属于 I 型跨膜蛋白. 激光共聚焦显微镜的观察结果显示, RNF149 是一个定位在溶酶体上的蛋白质, 它与 CD9 在细胞内有共定位. 免疫共沉淀实验证明 RNF149 与 CD9 有相互作用. RNF149 通过泛素分子的第 48 位赖氨酸多泛素化 CD9. 在 HeLa 细胞中转染数量一定的 CD9 质粒和数量梯度增加的 RNF149 质粒 24 h 后, 蛋白质印迹检测外源 RNF149 和 CD9 的表达, 结果表明, 随外源 RNF149 表达量梯度增高, 外源 CD9 的表达量梯度降低. 在 HEK293T 细胞内以 shRNA 敲低内源的 RNF149, 并检测内源 CD9 的变化, 发现 RNF149 被敲低后内源 CD9 的量增多. 上述结果提示, CD9 很有可能是 RNF149 的底物, 被 RNF149 通过泛素化降解. 此外, RNF149 被敲低的 HEK293T 细胞增殖受到抑制, 这可能与内源 CD9 的量增多有关, 提示 RNF149 可能是一种细胞增殖的调控因子.

**关键词** RNF149, CD9, 细胞增殖, 泛素化, 泛素连接酶, 溶酶体

**学科分类号** Q5, Q2

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2013.00135

蛋白质是生命活动的主要执行者, 蛋白质可以通过共价修饰的方式结合种类繁多的分子. 这类修饰会使蛋白质的构象、酶活性、细胞定位、同其他蛋白质的相互作用以及蛋白质的稳定性等性质发生改变. 蛋白质通过这种改变对生命活动发挥重要的调控作用. 泛素化修饰作为一种重要的蛋白质共价修饰方式已被证明在细胞正常生理活动的各方面有着重要的调控作用<sup>[1]</sup>. 在蛋白质泛素化修饰过程中, 泛素连接酶是对被泛素化的底物有特异识别作用的关键酶, 在泛素化反应中起着重要作用. 2008 年, Anandasabapathy 等<sup>[2]</sup>首次发现, RNF128 (gene related to anergy in lymphocytes, GRAIL)与 CD4<sup>+</sup>T 细胞的免疫无能有关, 并将 GRAIL 家族的分子定义为定位于内吞通路且含有 RING 结构的 I 型跨膜蛋白. 目前已证实 RNF128 具有泛素连接酶活性, 并且该分子所具有的重要生理功能是由其具有的泛素连接酶活性所介导. GRAIL(RNF128)从被发现至今对它的研究已较为深入, 但该家族中大部分分子的功能是未知的. 这些分子也可能具有泛素连接

酶活性, 并在生理活动中发挥重要的调控作用.

为了进一步揭示 GRAIL 家族其他分子对于细胞生理活动的重要意义, 我们在 BioGPS 网站上检索了功能未知的 GRAIL 家族分子在不同组织和细胞系中 mRNA 的水平. 分析检索结果发现, 人 RNF149 在大多数细胞系中广泛表达, 且在 T 细胞高表达. 这一现象提示, RNF149 可能具有重要生理功能, 所以我们选取了 RNF149 作为研究对象.

GRAIL 家族也被称为 PA-TM-RING 家族, 这是因为该家族的分子在其 N 端有一个与蛋白酶相关的结构域(PA), 该结构域很可能与结合其他蛋白质有关, 在其 C 端有一个 RING 锌指结构(RING-finger), 中部有一段跨膜区(TM)<sup>[3]</sup>. Lineberry 等<sup>[4]</sup>在 GRAIL(RNF128)的研究中发现, 该

\* 国家“十一五”传染病重大专项资助项目(2008ZX10002-008).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 001-408-6097577, E-mail: jtang@ibp.ac.cn

收稿日期: 2013-04-09, 接受日期: 2013-05-27

分子同 Tetraspanin 家族分子 CD151 和 CD81 有相互作用, 并且泛素化降解 CD151 分子. Tetraspanin 家族是一类在各种生命体中广泛表达的细胞表面蛋白家族. 该家族分子在细胞迁移、细胞黏附和细胞增殖等方面有着重要的功能. 其分子的结构特征是一个 4 次跨膜蛋白, 含有 4 个跨膜区(TM), 并且每一个 TM 都有保守的极性和非极性氨基酸. 第一个和第二个跨膜区之间形成一个小的环状结构(SEL), 第三个和第四个跨膜区之间形成一个大的环状结构(LEL)<sup>[9]</sup>. GRAIL 家族的分子都是 I 型跨膜蛋白, 在该蛋白的 N 端胞外区含有一个非典型的同蛋白酶结合的结构域(PA), 该结构域能够同相应的 Tetraspanin 家族的 LEL 结构域结合<sup>[4]</sup>. RNF149 与 RNF128 属同一家族, 具有与 RNF128 相似的结构. 因此推测, RNF149 很有可能也通过其 N 端的 PA 结构域识别并结合 Tetraspanin 家族中某个分子的 LEL 结构域, 并通过 C 端的 RING 结构对 Tetraspanin 家族相应的分子进行泛素化修饰. 基于上述推测, 我们克隆了 20 多个 Tetraspanin 家族分子作为筛选库, 筛选 RNF149 的底物分子, 并且通过 RNF149 的底物分子信息进一步分析 RNF149 可能的生理功能.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂.** Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; 实时荧光定量 PCR 所用的 SYBR Green Mixture 购自 QIAGEN 公司; 嘌呤霉素、蛋白酶体抑制剂 MG132 和转染试剂 PEI 购自 Sigma 公司; 蛋白酶抑制剂(PMSF、Aprotinin、Leupeptin、Pepstatin)购自 Amresco 公司; 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; Protein A/G Beads 购于 Santa Cruz 公司; LysoTracker Red、ER-Tracker Red 等细胞器探针购自 Molecular Probe 公司; 羊抗鼠 IgG-HRP、羊抗兔 IgG-HRP、Anti- $\beta$ -tubulin、Anti- $\beta$ -actin、anti-flag 等抗体均购自 Sigma 公司; 羊抗鼠 IgG Fc 段 -HRP 购自 Thermo Scientific 公司; Anti-HA 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Anti-CD9 抗体购于 ABCam 公司; ECL 底物显色液购自 GE HealthCare 公司; WST-1 细胞增殖检测试剂盒购自碧云天公司.

### 1.1.2 表达载体和基因.

实验中使用的 PCI-neo 哺乳动物表达载体购自 Promega 公司, 根据实验需要通过连入不同的 Tag

对其进行改造. pRFP-C1 载体由中国科学院生物物理研究所杭海英实验室赠送. 实验中所用到的质粒: pRFP-C1-CD9、PCI-RNF149-eGFP-C、PCI-CD9-eGFP-C、PCI-RNF149-HA-C、PCI-CD9-3 $\times$ Flag-C, 上述质粒中连入的基因均为人源基因, 并且截去基因 CDS 区的终止密码子, 用于融合表达不同的 Tag. PCI-Ub-Myc-N、PCI-UbK48R-Myc-N 和 PCI-UbK63R-Myc-N 这三个质粒中, 第一个质粒是人源 Ubiquitin 基因的 N 端融合 Myc 的 Tag, 另外两个质粒分别是 Ubiquitin 基因的第 48 位和第 63 位赖氨酸突变为精氨酸, 并在 N 端融合表达 Myc 的 Tag.

实验中用于敲低 RNF149 的 shRNA 和对照序列质粒构建在 pSUPER.retro.puro 载体上.

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养.** 本实验所用的 HeLa 细胞和 HEK293T 细胞最初来源于美国模式培养物保藏中心(ATCC), 均为贴壁细胞. 细胞在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中培养, 培养条件为 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>. 在 HEK293T 细胞的培养液中加入 2.5 mg/L 的嘌呤霉素来保持稳定细胞株的性状.

**1.2.2 激光共聚焦显微镜观察.** 将 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 个 HeLa 细胞铺在孔径为 5 mm $\times$ 5 mm 的激光共聚焦细胞培养皿中, 用 Lipofectamine 2000 转染质粒, 转染步骤详见 Lipofectamine 2000 说明书. 细胞转染 24 h 后, 样品制备, 用 Olympus FV500 荧光共聚焦显微镜观察.

**1.2.3 细胞转染.** 将 2 $\times$ 10<sup>6</sup> 个细胞铺于 60 mm 细胞培养皿中, 经 12 h 培养后, 用 PEI 转染试剂瞬时转染质粒总量为 8  $\mu$ g, 36 h 后进行相关检测试验.

### 1.2.4 免疫共沉淀实验(IP)和蛋白质泛素化检测.

配制细胞裂解缓冲液(0.5% NP40, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris $\cdot$ Cl pH 7.4, 1 mmol/L EDTA), 并在细胞裂解缓冲液中加入蛋白酶抑制剂(1 mmol/L PMSF, 1 mg/L 抑蛋白酶肽, 1 mg/L 亮抑蛋白酶肽, 1 mg/L 胃蛋白酶抑制剂), 在裂解细胞前将细胞裂解缓冲液冰预冷.

先用冰预冷的 PBS 洗细胞 2 次, 将 PBS 彻底吸除干净后, 用 600  $\mu$ l 冰预冷的细胞裂解缓冲液在冰上裂解细胞 30 min, 将全细胞裂解液转移到 1.5 ml 离心管中, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min. 收集上清裂解液, 取出 80  $\mu$ l 做为全细胞裂解液样品. 其余的约 520  $\mu$ l 细胞裂解液中加入 1  $\mu$ g Anti-Flag 抗体, 于 4 $^{\circ}$ C 旋转孵育 2 h 后, 加入 15  $\mu$ l Protein

A/G Beads 于 4℃ 旋转孵育 1 h, 4℃ 3 000 r/min 离心 3 min 收集 Protein A/G Beads. 用冰上预冷的细胞裂解液洗 Protein A/G Beads 至少 5 次, 每次使用细胞裂解缓冲液 1 ml. 去除最后一次离心的上清, 加入适量细胞裂解缓冲液(一般 40  $\mu$ l)重悬 Beads, 加入适量 5 $\times$ 样品缓冲液, 100℃ 加热 15 min, 在 10% 的凝胶中行 SDS-PAGE, 用 Western blotting 检测相应的蛋白质条带.

检测蛋白质泛素化时, 裂解细胞前在细胞培养液中加入 MG132(10  $\mu$ mol/L), 于 37℃ 细胞培养箱内孵育 4 h, 其余详细步骤参见文献[4].

### 1.2.5 RNF149 敲低的稳定株构建.

在 HEK293T 细胞中, 用 PEI 瞬时转染质粒 pSuper - RNF149 shRNA. 该质粒和阴性对照质粒 pSuper- NC 的载体上都有抗嘌呤霉素细胞毒性的遗传元件. 质粒 pSuper-NC 来源于中国科学院生物物理研究所高光侠实验室. 阴性对照质粒 pSuper-NC 上连入的是对任何基因都没有敲除作用的随机序列. 质粒 pSuper -RNF149 shRNA 中插入的片段是由两条引物 (S1:GATCCCCGAACATGTCCAATGTGTAATTACACATTGGACATGTTCTTTT, S2: AGCTTAAAAGAACATGTCCAATGTGTAATCTCTTGAATTACACATTGGACATGTTCTGGG) 扩增的, 先将两条引物分别溶解于引物退火溶液 (NaCl 100 mmol/L, Hepes 50 mmol/L, pH 7.4) 中, 配成终浓度为 0.3 g/L 的溶液. 在 PCR 管中, 分别加入两种引物溶液各 10  $\mu$ l, 引物退火溶液 30  $\mu$ l, 将样品放到 PCR 仪中, 90℃ 加热 4 min, 再 70℃ 加热 10 min, 然后将样品移到约 500 ml 的 70℃ 热水中缓慢退火, 当热水冷却到室温时, 取 7  $\mu$ l 样品溶液用 T4 DNA 连接酶同线性化的载体 pSUPER.retro.puro(用限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Hind* III 于 37℃ 双酶切载体) 进行连接构建质粒 pSuper - RNF149 shRNA.

将构建好的质粒 pSuper -RNF149 shRNA 和阴性对照质粒 pSuper-NC, 用转染试剂 PEI 分别瞬时转染 HEK293T 细胞, 继续培养 24 h. 将转染细胞培养液更换为含有 2.5 mg/L 嘌呤霉素的细胞培养液. 被转染的 HEK293T 细胞在该种对阴性细胞具有选择性杀伤作用的细胞培养液中, 继续筛选培养 2 周. 得到 RNF149 敲低的多克隆细胞和对照组的多克隆细胞. 将这两种多克隆细胞继续进行亚克隆, 便可以得到单克隆细胞株. 多克隆细胞用来检测内源 CD9 的变化, 并于倒置显微镜中观察细胞

生长情况. 单克隆细胞株则用于 WST-1 法绘制细胞的增殖曲线.

### 1.2.6 实时定量 PCR 检测 RNF149 mRNA 水平.

经典 Trizol- 氯仿法提取 HEK293T 细胞总 RNA, 依照 mRNA 逆转录试剂盒说明书构建细胞的表达 cDNA 文库. 用 QIAGEN 公司 SYBR Green Mixture 试剂盒, 按照说明书进行检测.

检测细胞中人 RNF149 的 mRNA 水平所用引物是: S1, AACATCACCTTGCCCATGTCT; S2, CCCCTATGGTCATCGTTACTGG. 检测细胞中人  $\beta$ -actin mRNA 水平的引物是: S1, CCAACCGCGAGAAGATGA; S2, GGAAGGAAGGCTGG-AAGAGT.

1.2.7 细胞增殖检测. 在 96 孔细胞培养板中, 每孔加入含 200 个细胞、总体积为 100  $\mu$ l 的细胞培养液, 每株单克隆细胞铺 3 个孔用于平行检测. 细胞培养 24 h 后, 每孔细胞中加入 10  $\mu$ l WST-1 溶液, 将 96 孔细胞培养板置于 37℃ 细胞培养箱中孵育 2 h 后, 检测 450nm 吸光度值( $A_{450}$ ), 并记录为细胞增殖的增殖原点. 按照上述相同的方法, 每隔 24 h 检测一次, 共检测 6 天的细胞增殖情况, 记录不同时间点的  $A_{450}$  值, 并绘制细胞增殖曲线. 关于细胞增殖检测更为详细的内容, 参考碧云天公司的 WST-1 细胞增殖试剂盒说明书.

## 2 结 果

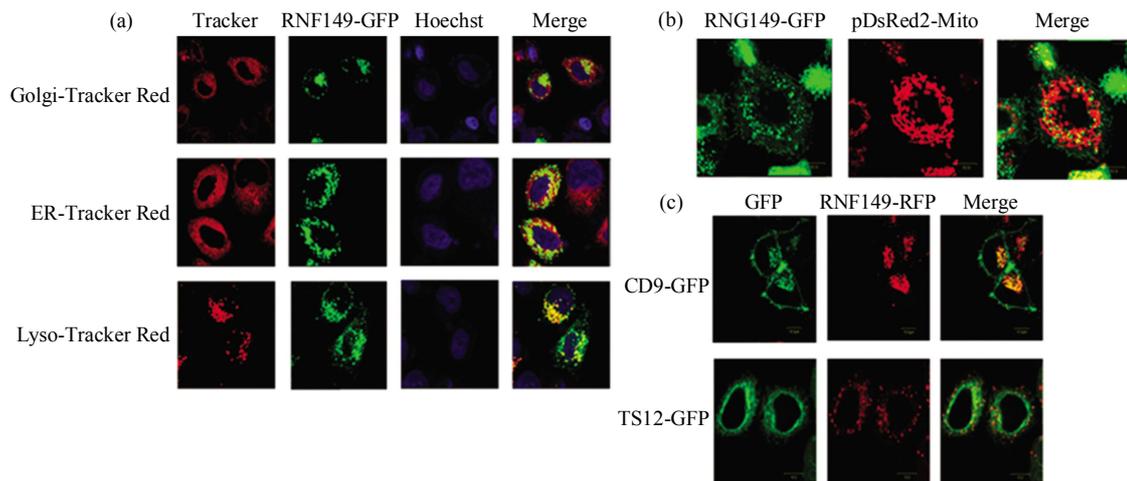
### 2.1 RNF149 的细胞器定位及其与 CD9 的细胞共定位

用质粒 PCI-RNF149-GFP-C 瞬时转染 HeLa 细胞, 继续培养 24 h. 之后, 用以下的细胞器染料: ER-Tracker Red(标记内质网)、Lyso-Tracker Red(标记溶酶体)、Golgi-Tracker Red(标记高尔基体)分别同细胞核染料 Hoechst 组合共同标记细胞. 分别用标记高尔基体、内质网和溶酶体的细胞探针标记表达 RNF149-GFP 的细胞后, 观察 RNF149 在细胞器的定位状况(图 1a). 因为标记线粒体的细胞探针在实验过程中发现有假阳性, 所以用转染 pDsRed2-Mito 质粒代替标记线粒体的细胞探针来标记线粒体. 图 1b 所示为在 HeLa 细胞内通过瞬时转染, 共同表达质粒 RNF149-GFP 和 pDsRed2-Mito, 检测 RNF149 是否定位于线粒体. 通过分析以上数据, 发现融合蛋白 RNF149-GFP 在细胞内的分布形态与溶酶体非常相似, 而且与用 Lyso-Tracker Red 标记的溶酶体有很好的重合, 这

些数据表明 RNF149 在细胞内主要定位于溶酶体, 在内质网上可能也有部分分布, 在细胞核和线粒体内没有分布。

在 HeLa 细胞中共同瞬时转染质粒 CD9-GFP 和 RNF149-RFP, 用于观察 RNF149 是否同 CD9 有共定位。用相似的实验体系还检测了 RNF149 与其

他 Tetraspanin 家族的分子是否存在共定位。如图 1c 所示, 在细胞内 CD9 和 RNF149 有明显的共定位。而 RNF149 与大多数其他 Tetraspanin 家族分子, 如 Tetraspanin 12 (TS12), 却不存在明显的细胞共定位现象。结果提示在细胞内 RNF149 和 CD9 的共定位是比较特异的。



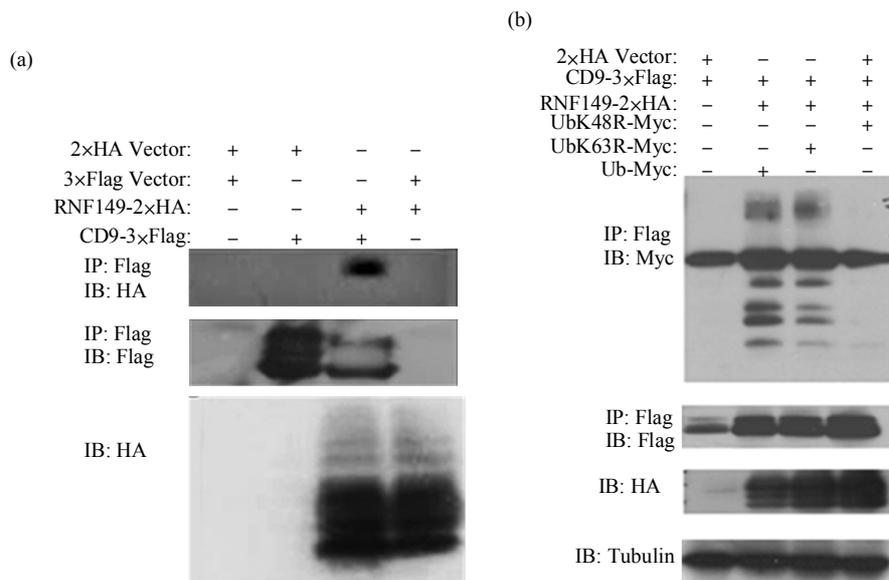
**Fig. 1 RNF149 is located at lysosome and co-located with CD9**

(a) HeLa cells were transfected with RNF149-GFP then LysoTracker Red, ER-Tracker Red and Gogi-Tracker Red were used to marker the different cell organelles. The samples were observed by confocal fluorescent microscopy. (b) HeLa cells were co-transfected with RNF149-GFP and pDsRed2-Mito. The samples were observed by confocal fluorescent microscopy. (c) HeLa cells were co-transfected with RNF149-RFP and CD9-GFP or TS12-GFP. The samples were observed by confocal fluorescent microscopy.

## 2.2 E3 连接酶 RNF149 与 CD9 相互作用并参与 CD9 的多泛素化修饰

用 CD9 免疫共沉淀 RNF149 (图 2a), 即在 HEK293T 细胞中, 过表达质粒 RNF149-2×HA/PCI 和 CD9-3×Flag/PCI, 这两种质粒与阴性对照质粒的不同组合以及各种转染质粒组合如图所示。用 Flag 小鼠单抗免疫沉淀 CD9, 用 HA 小鼠单抗做蛋白质印迹 (Western blot)。通过 IP 实验, 进一步确定 CD9 和 RNF149 有相互作用。在共同转染了质粒 RNF149-2×HA/PCI 和 CD9-3×Flag/PCI 的实验组中, 于蛋白质分子质量为 55 ku 和 72 ku 之间能检测到一条特异阳性条带, 而阴性对照组却不能检测到该条带, 另外该条带的大小与 RNF149 一致。这一实验结果说明, RNF149 能免疫共沉淀 CD9。

RNF149 作为具有 RING 结构的泛素连接酶, 该分子究竟是通过 Ub 的哪一位赖氨酸对 CD9 进行多泛素化修饰的? 如图 2b 所示, 在 HEK293T 细胞中, 过表达质粒 RNF149-2×HA/PCI 和 CD9-3×Flag/PCI, 且同时分别同 Ub-myc、UbK48R-myc、UbK63R-myc 和阴性对照质粒进行组合表达。实验揭示了 Ub 分子上不同位点的赖氨酸突变体对于 RNF149 参与 CD9 多泛素化修饰的影响。当将 Ub 的第 48 位赖氨酸突变为精氨酸以后, RNF149 多泛素化 CD9 的条带消失了。这一实验结果说明 RNF149 参与 CD9 的多泛素化修饰, 并且 RNF149 对于 CD9 的多泛素化修饰是通过 Ub 分子的第 48 位赖氨酸形成多泛素链。



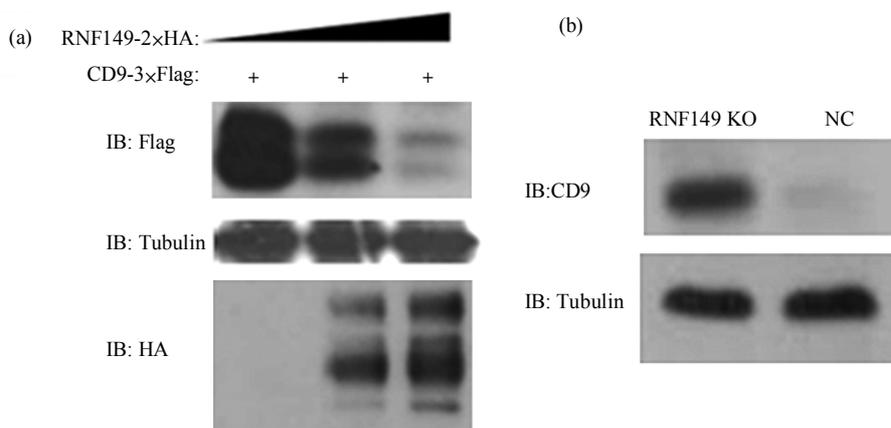
**Fig. 2 The RNF149 interacts with CD9 and polyubiquitinates CD9 via ubiquitin Lys-48**

(a) HEK293T cells were co-transfected with 2xHA-tagged human RNF149 and 3xFlag-tagged human CD9, and transfected with empty vectors as control. Cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-Flag-conjugated beads and immunoblotted (IB) with anti-HA, anti-Flag. (b) HEK293T cells were transfected with 2xHA-tagged RNF149 or vector alone, 3xFlag-tagged CD9 and either 3xMyc-tagged wild-type ubiquitin (Ub), K48R ubiquitin, or K63R ubiquitin. Cell lysates were denatured in SDS, diluted in lysis buffer, immunoprecipitated (IP) with anti-Flag beads, and immunoblotted (IB) with anti-Myc, anti-Flag and anti-HA.

### 2.3 RNF149 可以介导 CD9 的降解

在 HEK293T 细胞中转染了浓度递减的 RNF149-2xHA/PCI 质粒及定量的 CD9-3xFlag/PCI 质粒后, 检测到当 RNF149 蛋白表达量逐步下降时, CD9 更加趋于稳定而不被降解(图 3a)。为了

进一步证明 RNF149 可以介导 CD9 的降解, 我们还用敲低内源 RNF149 的试验, 来验证其与 CD9 的降解有关。用可以敲低内源 RNF149 的质粒 RNF149 shRNA 和阴性对照组质粒 NC, 分别瞬时转染 HEK293T 细胞, 通过抗生素(嘌呤霉素)筛选



**Fig. 3 RNF149 is related to the degradation of CD9**

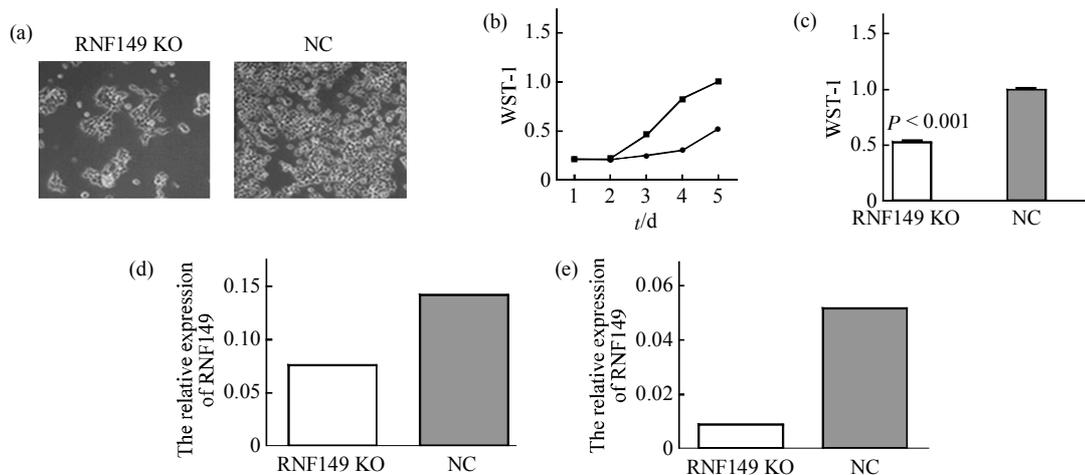
(a) HEK293T cells were transfected with 0.7 μg of 3xFlag-tagged CD9 and 2xHA-tagged RNF149 at 0, 0.8 and 1.6 μg respectively. Cell lysates were separated by SDS-PAGE and blotted with the indicated antibodies. (b) The multi-clone cells of RNF149 knocking down or negative control were respectively constructed with RNF149 shRNA and negative shRNA. Cell lysates were separated by SDS-PAGE and blotted with the indicated antibodies.

出 RNF149 敲低的多克隆细胞和阴性对照组的多克隆细胞, 并检测这两种多克隆细胞中内源 CD9 的量是否有差别. 结果显示, 当细胞内 RNF149 的表达被敲低时, 通过蛋白质印迹检测到内源 CD9 的量增加了(图 3b). 为了证明细胞中的 RNF149 确实是被有效敲除, 我们检测了 RNF149 被敲低的多克隆细胞中 RNF149 的 mRNA 水平, 相应的数据见图 4d.

#### 2.4 敲低内源 RNF149 抑制 HEK293T 细胞增殖

为了进一步研究 RNF149 的生理功能, 我们分别构建了 RNF149 敲低的稳定株和阴性对照组的稳定株. 在细胞培养过程中, 发现 RNF149 被敲低的多克隆细胞和阴性对照组相比, 其生长速度明显变慢. 将这两种多克隆细胞以  $3 \times 10^4$  个作为起始数, 铺到 35 mm 细胞培养皿中, 培养 1 周后用显微镜拍摄细胞的生长状况. 结果显示, RNF149 被敲低

组的细胞数明显少于阴性对照组(图 4a). 多克隆细胞在传代过程中存在性状丢失的问题, 因此筛选了单克隆稳定株. 从所筛选出来的单克隆细胞株中挑选出敲低 RNF149 效率最高的一株单克隆细胞. 将该单克隆细胞和阴性对照组的单克隆细胞一起, 以每孔 200 个细胞作为起始值, 铺于 96 孔板(每种单克隆细胞 3 个复孔), 培养 5 天, 每隔 24 h 用 WST-1 法检测细胞生长情况, 并绘制细胞生长曲线(图 4b). RNF149 被敲低后细胞的生长受到明显抑制. 在第 5 天时, 两组细胞的生长情况存在明显差异( $P < 0.001$ , 图 4c). 为了确认在此实验体系中 RNF149 确实被有效敲低, 我们用实时定量 RT-PCR 分别检测了 RNF149 敲低的多克隆细胞、RNF149 敲低的单克隆细胞及对照组细胞中 RNF149 的 mRNA 水平. 结果如图 4d, e 所示.



**Fig. 4 RNF149 knockdown leads to the inhibition of cell proliferation in HEK293T cells**

(a) RNF149 knockdown polyclonal cells or control cells were seeded in 96-well-plate to culture. The cell growth was observed by the inverted microscope. (b) The growth curve of the RNF149 knockdown monoclonal cells (RNF149 KO) or control(NC). ●—●: RNF149 KO; ■—■: NC. (c) The Graphpad Prism statistics software was used to analyse the fifth day WST-1 data of Figure (b) by two-trial *t* test ( $P < 0.001$ ). (d) Using the real-time quantitative RT-PCR data of the RNF149 knockdown polyclonal cells (RNF149 KO) or control (NC) to analyse the relative gene expression by  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. (e) Using the Real-time quantitative RT-PCR data of the RNF149 knockdown monoclonal cells (RNF149 KO) or control (NC) to analyse the relative gene expression by  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.

### 3 讨 论

在多泛素化修饰蛋白质这一生物过程中, 有三种关键的酶共同参与. 这三种酶分别是: 泛素活化酶 E1(ubiquitin activating enzyme)、泛素结合酶 E2

(ubiquitin conjugating enzyme) 和泛素连接酶 E3 (ubiquitin ligase). 其中泛素连接酶对底物分子有识别功能, 故也称之为底物识别分子(substrate recognition factor). 蛋白质泛素化的过程现已基本清楚: 首先由 E1 通过其活性中心的 Cys 残基同泛

素的 C 端形成硫脂键活化单个游离的泛素, 然后由 E1 将活化的泛素递交给 E2. 之后, 由 E3 募集特异的底物和 E2, 并催化泛素从 E2 转移到底物靶蛋白<sup>[6]</sup>. E1 可以激活所有 E2 酶, 每一个 E2 酶可与多个 E3 酶相互作用而发挥功能<sup>[7]</sup>. 泛素连接酶 E3 是泛素化反应系统中数量最大、结构最多样、调控机制最为复杂的酶<sup>[8]</sup>. E3 酶是实现泛素化底物特异识别的关键酶, 其在泛素化反应中起着重要作用.

大量研究表明 RING 结构 E3 泛素连接酶同生物体的疾病有着紧密的关系. 有些神经退行性疾病以及癌症的发生是由泛素连接酶功能紊乱导致. 到目前为止, 被研究的泛素连接酶大多是存在于细胞基质中的可溶性蛋白, 例如, Haupt 等发现, Mdm2 能泛素化并快速降解 P53, Skp2 能结合 c-Myc 促使 c-Myc 的泛素化和降解<sup>[9-10]</sup>, 这里提及的泛素连接酶 Mdm2 和 Skp2 都是存在于细胞基质中. 能被这类泛素连接酶泛素化并降解的底物也都是存在于细胞基质中.

然而, 对于类似 RNF128 和 RNF5 等膜蛋白类泛素连接酶的功能及其对底物泛素化修饰的研究却很少. 已有的实验证据表明, 膜蛋白类泛素连接酶具有相当重要的生理功能, 例如, RNF5 在乳腺癌细胞系和病例标本中特异性高表达, 如果在乳腺癌细胞系里抑制 RNF5 分子的表达, 则癌细胞的生长将受到抑制. 另外, 有关乳腺癌标本的研究还发现, 高表达 RNF5 的病人生存期缩短<sup>[11]</sup>. 这些研究暗示 RNF5 可能是一个新的肿瘤促进因子.

膜蛋白的亚细胞定位, 对于其功能研究有很重要的提示作用. 因此, 我们首先研究了 RNF149 在细胞器中的定位情况, 发现 RNF149 主要定位在溶酶体上, 提示其功能很可能与蛋白质的代谢相关. 定位于溶酶体的蛋白大多数是糖基化修饰的, 因此 RNF149 可能是一个糖蛋白. 溶酶体中存在大量水解蛋白酶, 溶酶体中的蛋白质大多是以糖蛋白的形式稳定存在. 我们使用 Netnglyc 1.0 软件对 RNF149 的蛋白质序列进行分析, 发现 RNF149 至少存在两个可能性较大的糖基化位点和两个可能性较小的糖基化位点. 综合 RNF149 的亚细胞定位和 Netnglyc 1.0 软件的预测结果, 我们认为 RNF149 很可能是一个定位在溶酶体上的糖蛋白, 其糖基化位点主要存在于该蛋白的 N 端. 这些结果暗示 RNF149 的 N 端是在溶酶体囊腔内, 而其带有 RING 结构的结构域则处于细胞基质内.

综合前人的研究成果以及我们实验室对于 GRAIL 家族分子的研究, 发现 GRAIL 家族 E3 酶的作用底物通常也是膜蛋白. 对于 RNF149 底物分子的推测, 主要的理论依据有三个: a. RNF149 属于单亚基 RING 结构类 E3 酶, 这类 E3 酶的作用机制为 E3 酶的 N 端结构域特异识别并结合底物分子, E3 酶的 RING 结构域结合 E2-Ub 复合物, 并催化活化的泛素连接到底物分子上<sup>[12]</sup>. b. RNF149 属于 GRAIL 家族蛋白, 在 GRAIL 家族 E3 酶分子中, 能够识别并结合其底物的 PA 结构域处于细胞膜外, 而可以进行泛素传递的 RING 结构域在细胞质中. c. RNF149 同 RNF128 同源性较高, 具有十分相似的蛋白质结构域, 而 RNF128 的底物分子有两个属于 Tetraspanin 家族. 综上所述, 我们推测 RNF149 的底物如果既能满足在胞外同 RNF149 的 PA 结构域特异结合, 同时该底物分子的胞内区又能被 RNF149 的 RING 结构域泛素化, 那么这个底物很有可能是 Tetraspanin 家族的某个膜蛋白. 基于上述推测, 我们克隆了 Tetraspanin 家族中的大部分成员(共 22 个), 在这些分子中筛选 RNF149 的底物分子. 作为 RNF149 的底物应该具备以下 3 个特征: a. 底物和 RNF149 有相互作用; b. 底物和 RNF149 存在细胞共定位; c. RNF149 能够泛素化修饰底物分子.

另外, 如果 RNF149 是通过泛素的第 48 位赖氨酸对底物进行的多泛素化, 被泛素化的底物随后应该发生蛋白酶体介导的蛋白降解. 考虑到细胞共定位分析和梯度降解实验(当底物分子表达量一定时, 梯度增加 RNF149 表达量, 检测 RNF149 是否介导该分子的降解)较易进行, 我们假设 RNF149 的底物能同其有共定位并且被其降解, 在这个前提下去筛选 RNF149 的底物. 实验结果证明, RNF149 同 CD9 不仅存在明显的细胞共定位, 而且在梯度降解实验中发现, 随着外源 RNF149 表达量梯度增加, CD9 的降解加剧. 在筛选过程中我们还发现, 除 CD9 以外, 还有其他功能未知的 Tetraspanin 家族分子同 RNF149 存在细胞共定位(数据未在本文显示). 因为 RNF149 的功能未知, 如果选择研究的底物分子功能也是未知的, 想要继续研究 RNF149 的功能就没有明确的方向. 所以, 我们选择了已经研究相对深入的 CD9 分子作为 RNF149 的重要备选底物进行下一步的验证.

RNF149 能免疫共沉淀 CD9, 说明 RNF149 确

实同 CD9 有相互作用. 利用泛素的突变体, 验证了不同的泛素突变体对于 RNF149 泛素化修饰 CD9 的影响. 我们发现, RNF149 泛素化修饰 CD9 的方式是通过泛素的第 48 位赖氨酸形成异肽键, 并采用多泛素化修饰而不是单泛素化的修饰. Pickart 等<sup>[13]</sup>的研究表明, 如果有多于 7 个泛素单体能彼此之间形成异肽键并最终形成多泛素链, 被泛素化底物上所连接的泛素单体的数量, 以及泛素化修饰利用泛素单体上哪一位赖氨酸来形成异肽键, 这两点会影响该底物的命运. 通过泛素单体第 48 位赖氨酸来形成异肽键, 并且多泛素链有超过 4 个以上泛素单体的底物, 通常都是通过蛋白酶体降解. 如果是通过泛素单体的第 63 位赖氨酸所形成的异肽键来泛素化底物, 这种修饰方式能使被泛素化底物的稳定性、活化状态或细胞定位发生变化. RNF149 对于 CD9 的泛素化修饰方式暗示被多泛素化的 CD9 的命运是被蛋白酶体降解. 为了确认 RNF149 对于 CD9 是否确实有降解作用, 我们进行了更符合自然状态的敲低内源 RNF149 的实验. 在 HEK293T 细胞系中, 通过敲低 RNF149 并检测内源 CD9 的变化, 发现当在细胞内敲低 RNF149 的表达时, CD9 的表达量增加, 这个实验结果进一步验证 RNF149 能降解 CD9.

在 Ovalle 等<sup>[14]</sup>的研究报告中提到, 在食道癌细胞表面表达 CD9 分子, 会增强整合素依赖的细胞黏附, 并且抑制细胞的生长. 还有研究报告指出, 如果下调 CD9 的表达会促进 B 淋巴瘤和前列腺癌的恶化<sup>[15-16]</sup>. 在 MKN-28 细胞中发现 CD9 和表皮生长因子受体(EGFR)有相互作用, 并且这两者结合所形成的复合体存在于细胞表面, 特别是细胞与细胞相接触的位点. 如果在 CHO-HER 细胞里表达 CD9 会特异地减弱 EGFR 的信号, 并抑制细胞生长. CD9 被认为不仅同 EGFR 有相互作用, 而且可能是一种新的 EGFR 信号通路的调控因子<sup>[17]</sup>. 前人的研究表明, CD9 表达量高时会减弱 EGFR 信号, 从而抑制细胞的生长. 在我们的研究中, 在 HEK293T 细胞里当敲低 RNF149 时, 一方面能观察并检测到细胞的生长受到抑制, 另一方面能检测到内源 CD9 的表达量增多.

综上所述, RNF149 很可能是通过调控 CD9 的蛋白质表达量来促进或抑制细胞的生长. 有许多研究提到 Tetraspanin 家族分子并不是通过单一分子发挥功能, 而是通过富集 Tetraspanin 分子的微区结构来实现其功能. 在该类富集 Tetraspanin 分子

的微区中, 通常同时存在多种 Tetraspanin 家族分子. 这些 Tetraspanin 分子通过彼此的结合, 以及伴侣蛋白的结合, 甚至同胞内分子的结合来形成所谓的 Tetraspanin 网络(Tetraspanin web), 从而实现其功能<sup>[9]</sup>. 这提示我们, 可能还有其他 Tetraspanin 家族的分子作为 RNF149 的底物并受其调控, 而 RNF149 除了影响细胞的增殖可能还具有其他的生理功能.

## 参 考 文 献

- [1] Robinson P A, Ardley H C. Ubiquitin-protein ligases. *J Cell Sci*, 2004, **117**(Pt 22): 5191-5194
- [2] Anandasabapathy N F, Ford G S, Bloom D, *et al.* GRAIL: an E3 ubiquitin ligase that inhibits cytokine gene transcription is expressed in anergic CD4+ T cells. *Immunity*, 2003, **18**(1074-7613): 534-547
- [3] Bocock J P. The PA-TM-RING protein RING finger protein 13 is an endosomal integral membrane E3 ubiquitin ligase whose RING finger domain is released to the cytoplasm by proteolysis. *FEBS J*, 2009, **276**(7): 1860-1877
- [4] Lineberry N, Carmicle S, Soares L, *et al.* The single subunit transmembrane E3 ligase gene related to anergy in lymphocytes (GRAIL) captures and then ubiquitinates transmembrane proteins across the cell membrane. *J Biol Chem*, 2008, **283**(42): 28497-28505
- [5] Levy S, Shoham T. The tetraspanin web modulates immunosignalling complexes. *Nat Rev Immunol*, 2005, **5**(2): 136-148
- [6] Pickart C M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 2001, **70**: 503-533
- [7] Huang D T. Ubiquitin-like protein activation. *Oncogene*, 2004, **23**(11): 1958-1971
- [8] Hershko A, Walden H, Elias S, *et al.* Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem*, 1983, **258**(13): 8206-8214
- [9] Haupt Y, Maya R, Kazaz A, *et al.* Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 1997, **387**(6630): 296-299
- [10] Kim S Y, Herbst A, Tworkowski K A, *et al.* Skp2 regulates Myc protein stability and activity. *Mol Cell*, 2003, **11**(5): 1177-1188
- [11] Bromberg K D, Kluger H M, Delaunay A, *et al.* Increased expression of the E3 ubiquitin ligase RNF5 is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res*, 2007, **67**(17): 8172-8179
- [12] Passmore L A, Barford D. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem J*, 2004, **379**(Pt 3): 513-525
- [13] Pickart C M, Fushman D. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, **8**(6): 610-616
- [14] Ovalle S, Gutiérrez-López M D, Olmo N, *et al.* The tetraspanin CD9 inhibits the proliferation and tumorigenicity of human colon carcinoma cells. *Int J Cancer*, 2007, **121**(10): 2140-2152
- [15] Yoon S O, Zhang X, Freedman A S, *et al.* Down-regulation of CD9

- expression and its correlation to tumor progression in B lymphomas. *Am J Pathol*, 2010, **177**(1): 377-386
- [16] Wang J C, Bégin L R, Bérubé N G, *et al.* Down-regulation of CD9 expression during prostate carcinoma progression is associated with CD9 mRNA modifications. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**(8): 2354-2361
- [17] Murayama Y, Shinomura Y, Oritani K, *et al.* The tetraspanin CD9 modulates epidermal growth factor receptor signaling in cancer cells. *J Cell Physiol*, 2008, **216**(1): 135-143

## RNF 149 Regulates The Cell Proliferation by The Polyubiquitination Mediated CD9 Degradation\*

LI Yan<sup>1,2</sup>, RUAN Lin-Hao<sup>1,2</sup>, SUO Ta-Lin<sup>1,2</sup>, WANG Peng<sup>1,3</sup>, TANG Jie<sup>1,2</sup>\*\*

(<sup>1</sup> Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; <sup>2</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; <sup>3</sup> University of Science and Technology, Hefei 230026, China)

**Abstract** Our research selected the RNF149, the novel ubiquitin ligase which owned the high identity to GRAIL and belonged to the type I transmembrane protein, as our object. By the confocal laser scanning microscope, it was demonstrated that RNF149 is located at lysosome and the RNF149 is co-located with CD9. The interactions between RNF149 and CD9 were demonstrated by immune co-precipitation. RNF149 polyubiquitinates CD9 *via* ubiquitin Lys-48. The HeLa cells were co-transfected with the same quantity of the CD9 plasmids and the gradient increase quantity of the RNF149 plasmids. We found that the exogenous quantity of CD9 was decreasing with the increased expression of the exogenous RNF149. In HEK293T cells, the knocking down RNF149 by shRNA led to the increase of the endogenous CD9. All these evidence suggested that CD9 maybe regulated by RNF149. In addition, the knocking down RNF149 by shRNA led to the inhibition of the cell proliferation in HEK293T cells. This phenomenon suggested that the RNF149 possibly could be considered as the regulatory factor of the cell proliferation.

**Key words** RNF149, CD9, cell proliferation, ubiquitylate, ubiquitin ligase, lysosome

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2013.00135

\*This work was supported by a grant from National Major Science and Technology Special Project of China (2008ZX10002-008).

\*\*Corresponding author.

Tel: 001-408-6097577, E-mail: jtang@ibp.ac.cn

Received: April 9, 2013 Accepted: May 27, 2013