

Ser84 是 spindlin1 定位与功能发挥的关键位点 *

丛 斌** 张 鹏** 王静雪 曾 泉 陈 琳 岳 文*** 裴雪涛***

(军事医学科学院野战输血研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850)

摘要 *spindlin1* 为作者所在研究组克隆并命名的肿瘤相关新基因, 之前研究表明 *spindlin1* 蛋白定位于细胞核, 并有可能通过对 TCF-4 通路的调节参与对肿瘤细胞生长和周期的调控. 为进一步探索 *spindlin1* 的作用机制, 明确 *spindlin1* 结构与功能的关系, 在生物信息学分析及晶体结构解析的基础上, 构建系列突变表达载体, 首先以 *spindlin1* 蛋白亚细胞定位为指标, 观察野生型及系列突变体 *spindlin1* 蛋白的亚细胞定位, 并进一步检测野生型及突变体 *spindlin1* 对 TCF-4 荧光素酶报告基因转录活性的调控作用, 以明确 *spindlin1* 定位与功能的关键位点. 结果表明: Ser14+Ser84、Ser84+Ser99、Ser14+Ser84+Ser99 位点 Ser 到 Ala 的联合突变能使野生型融合蛋白在细胞核内集中分布的特性消失, 成为全细胞弥散分布, 而 Ser14、Ser84、Ser99 各位点的单独突变或 Ser14+Ser99 联合突变对 *spindlin1* 蛋白的细胞核内分布没有影响. 与此同时, 对 TCF-4 荧光素酶报告基因活性的分析表明, Ser14+Ser84、Ser84+Ser99、Ser14+Ser84+Ser99 的联合突变使 *spindlin1* 对其活性的激活作用消失或降低. 上述结果表明, Ser84 是 *spindlin1* 细胞定位与功能发挥的关键位点, 其作用发挥需要 Ser14 与 Ser99 的协助.

关键词 *spindlin1*, 突变, 细胞定位, TCF-4

学科分类号 Q291

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00365

卵母细胞的发育与成熟一直是生命研究的重点, 对此过程中相关蛋白质功能的研究将有助于深入了解生命起始本质. 自 20 世纪 70 年代以来, 越来越多的研究关注精子、卵母细胞以及受精卵早期发育相关蛋白质^[1~6]. 其中, 一个 30 ku 的蛋白质在多个研究小组的报道中出现, 1997 年 Bermseok 小组在对小鼠卵母细胞发育过程进行研究时将其分离并命名为 *spindlin*. 研究表明, 小鼠 *spindlin* 蛋白表达具有时空特异性, 在减数分裂过程中与纺锤体密切相关, 表达随着卵母细胞成熟过程逐渐增高. 在 2 细胞时期开始降低, 随着受精卵发育其表达逐渐消失. 鼠 *spindlin* 蛋白可作为 MOS/MAPK 的作用底物被信号通路中被磷酸化修饰后发挥作用^[7~9]. 之后文献陆续报道 *spindlin* 在鸟类、鱼类等生殖细胞中表达, 与精子发生期特异转录子 *Ssty* (Y-linked spermiogenesis specific transcript) 共同组成一个进化高度保守的与生殖细胞发育密切相关的 Spin/*Ssty* 家族^[10~12].

我们研究小组最早从人卵巢癌细胞中克隆获得了与鼠 *spindlin* 基因高度同源的基因并命名为 *spindlin1*^[13, 14]. 前期研究结果表明, *spindlin1* 定位于细胞核, 为参与细胞周期调控的核蛋白, 外源性

spindlin1 的表达可以引起细胞丝裂灾变以及染色体不稳定, 使 NIH3T3 细胞发生恶性转化^[15, 16]. 进一步的分析表明, *spindlin1* 可能通过对 T 细胞因子 (T cell factor 4, TCF4) 通路的调节发挥其对细胞周期的调控作用. 为更深入了解 *spindlin1* 功能和作用机制, 我们原核表达 *spindlin1* 蛋白, 纯化后制备晶体, 并对其晶体结构进行分析. 结果表明, *spindlin1* 蛋白具有 3 个序列上非常类似的 Spin/*Ssty* 重复结构域, 每个结构域都由 4~5 个反向平行的 β 折叠构成^[17]. 在此基础上, 通过模建、突变与探讨蛋白质之间的相互作用等方法, 确认影响蛋白质定位与功能的关键氨基酸位点无疑是进一步研究的重要内容.

本研究中在生物信息学和蛋白质晶体结构解析基础上, 构建 *spindlin1* 系列突变体, 首先以蛋白

* 国家高技术研究发展计划(863)(2006AA02A107)和国家重点基础研究发展规划(973)(2005CB522702)资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人. Tel: 010-66931974, 010-66932240

岳 文. E-mail: wenyue26@yahoo.com

裴雪涛. E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2008-05-19, 接受日期: 2008-08-19

质亚细胞定位作为其功能变化的直观标示, 确定在 *spindlin1* 生物功能发挥中具有重要作用的氨基酸位点, 并在此基础上进一步明确突变体对 *spindlin1* 基因功能的影响. 研究表明, Ser84 是 *spindlin1* 细胞定位与功能发挥的关键位点, 其作用发挥需要 Ser14 和 Ser99 位点的协助. 研究结果将为更深入了解 *spindlin1* 功能和作用机制提供有价值线索.

1 材料与方法

1.1 材料

E. coli Top10 感受态细胞、表达载体 pEGFP-C1、重组克隆载体 pGEM-T-*spindlin1*、pEGX-2T/*spindlin1*、pEGX-2T/ β -catenin 和 pCDNA3.1-TCF-4-myc 表达载体由本室构建. HeLa 细胞由本室保存. Pfu 高保真酶、限制性内切酶 *Xho* I 和 *Bam*H I、快速连接试剂盒购自 TaKaRa 公司; 胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自道普公司; Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司; QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit 标准点突变试剂盒购自 Stratagene 公司. 含有 TCF-4 结合位点的荧光素酶报告基因载体 TOPFlash/FTOPFlash 与 β -半乳糖苷酶表达载体 pCMV β 由美国匹兹堡大学的 Shunqian Jin 博士馈赠. 鼠抗 c-myc 的单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司.

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析. *spindlin1* 潜在的蛋白磷酸化位点利用 CBS Prediction Servers 中的 NetPhos 2.0 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>); *spindlin1* 蛋白定位信号的分析利用 PSORT WWW Server 中的 PSORT II (<http://www.psort.org/>)程序.

1.2.2 引物设计. 根据 GenBank 中登录数据, 设计引入限制性内切酶切识别位点的 *spindlin1* 引物为, 引物 1, 5' *CTCGAGCTATGATGAAGAAGAGGAC*, 引物 2, 5' *GGATCCCTAGGATGTTTTTCA CCAA*. 其中斜体部分为加入的酶切位点, 下划线部分为不影响读码框架加入的填充碱基. 为获得 14、84 与 99 位点 Ser-Ala 的突变, 设计突变引物. Ser14-Ala Forward: 5' *AAAACATCGGAGCGCTGTGGGTCCGAGC*, Reverse: 5' *GCTCGGACCCACAGCGCTCCGATGTTTT*; Ser84-Ala Forward: 5' *ATAAAGATGAAAGAGTTGCCGCTCTTGAAGTCCTCCC*, Reverse: 5' *GGGAGGACTTCAAGAGCGGCAACTCTTTCATCTTTAT*; Ser99-Ala Forward: 5' *CGACATCTCGAATCGCCGACGC-*

ACACTTGG, Reverse: 5' *CCAAGTGTGCGT-CGGCGATTTCGAGATGTCG*.

1.2.3 *spindlin1* 与 EGFP 融合蛋白表达载体构建. 以 pGEM-T-*spindlin1* 为模板扩增带酶切位点的 *spindlin1* 开放阅读框. PCR 产物经琼脂糖电泳, 回收电泳产物, 然后用限制性内切酶 *Xho* I、*Bam*H I 处理, 酶切产物再次进行胶回收, 相同步骤酶切回收 pEGFP-C1 载体, 将两者连接获得 pEGFP-*spindlin1* 表达载体. 连接产物转化至 *E. coli* Top10 感受态细胞, 挑单克隆菌株摇菌扩增, 提质粒, 酶切鉴定, 并交英骏公司测序.

1.2.4 点突变构建 *spindlin1* 突变表达载体. 分别应用 3 种突变引物, 以 pEGFP-C1-*spindlin1* 为模板进行 PCR 构建 *spindlin1* 的 Ser14、Ser84 和 Ser99 3 个位点的 7 种突变体 (pEGFP-*spindlin1*-Ser14M、pEGFP-*spindlin1*-Ser84M、pEGFP-*spindlin1*-Ser99M、pEGFP-*spindlin1*-Ser14+84M、pEGFP-*spindlin1*-Ser84+99M、pEGFP-*spindlin1*-Ser14+99M 和 pEGFP-*spindlin1*-Ser14+84+99M). 反应体系为 5 μ l 反应缓冲液、2 μ l 模板、2.5 μ l 引物混合液、1 μ l dNTP、3 μ l Pfu 酶、36.5 μ l 水, 反应条件为: 95°C 1 min; 95°C 50 s, 60°C 50 s, 68°C 8 min, 18 个循环; 68°C 7 min. PCR 产物加 1 μ l *Dpn* I 酶消化模板质粒, 混匀, 离心 1 min, 37°C 1 h, 消化未突变的 pEGFP-C1-*spindlin1*. 消化产物转化入 XL-Blue 感受态细胞, 加入 500 μ l, 培养基振荡培养 1 h, 常规取 100 μ l 转化反应液涂布含氨苄青霉素的 LB 平板, 37°C 倒置培养 16~18 h, 挑选 1~3 个克隆酶切鉴定并测序验证. 联合突变时使用其他突变引物完成进一步的突变.

1.2.5 细胞培养与重组质粒转染. HeLa 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 完全培养液培养. 将盖玻片铺入 24 孔板中, 种入 HeLa 细胞, 待细胞密度为 95%时, 分别将 pEGFP-C1、pEGFP-*spindlin1* 野生型和 7 种 pEGFP-*spindlin1* 突变体质粒与 Lipofectamine 2000 按 0.8 μ g : 2 μ l 比例稀释于 50 μ l 无血清的 DMEM 中, 按说明方法进行转染到 HeLa 细胞中, 转染 24 h 后换液, 48 h 收集细胞, PBS 洗细胞, 5%多聚甲醛固定.

1.2.6 免疫标记与激光共聚焦显微镜观察蛋白质定位. 将经 5%多聚甲醛固定的细胞用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 加入抗 α -tubulin 的抗体室温孵育 30 min, PBS 漂洗, 用带 TRITC 二抗孵育 15 min, PBS 漂洗, DAPI 复染, 倒置于载玻片上. 进一步

应用 ZEISS 激光共聚焦显微镜对转染的细胞进行激光断层扫描以确定蛋白质在细胞内的定位。

1.2.7 TCF-4 荧光素酶报告基因的活性分析. TCF-4 报告基因的活性分析采用文献[18]报道的方法进行. 简单描述如下: HeLa 细胞常规培养, Lipofectamine 2000 包装后, 将 pEGFP-C1 空载体、pEGFP-spindlin1 野生型表达载体或 spindlin1 的突变载体分别与 TCF-4 荧光素酶报告基因载体 pTOPFlash 和作为转染对照的 β -galactosidase 载体共转染 HeLa 细胞. 转染 48 h 后收集细胞裂解液后对其荧光素的活性进行检测. 与此同时, 设立实验, 以结合位点失活的 TCF-4 报告基因载体 pFOPFlash 代替 pTOPFlash 作为参照.

1.2.8 GST pull-down. GST pull-down 采用文献[19]报道的方法进行. 将收集转染 pCDNA3.1-TCF-4-myc 的 HeLa 细胞裂解液和纯化的 GST-spindlin1 融合蛋白 4℃ 共同孵育 2 h, 以 Western blot 方法分析

实验结果. 体系以 GST 蛋白和 GST- β -catenin 蛋白作为阴性和阳性对照.

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 标识, 采用 GraphPad Prism IV 软件进行分析两组间均数的 Student *t* 检验, 显著性分析, $P < 0.05$ 差异被认为具有统计学意义.

2 结 果

2.1 生物信息学分析

利用 NetPhos 2.0 Server 软件, spindlin1 潜在的磷酸化位点预测结果表明(图 1), spindlin1 蛋白中含 11 个潜在的磷酸化丝氨酸位点. 根据前期对 spindlin1 蛋白晶体结构的分析结果, 我们选取分布于蛋白质表面 14、84 和 99 位的 3 个潜在的丝氨酸位点进行突变, 并在获得突变体的基础上研究不同磷酸化位点对 spindlin1 蛋白定位与功能之间的关系.

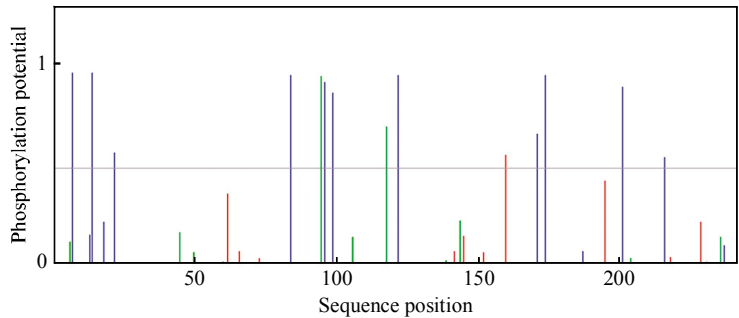


Fig. 1 Predicted phosphorylation sites of spindlin1 protein

11 Serine, 2 Threonine and 1 Tyrosine phosphorylation sites that were predicted using bioinformatics analysis indicated by vertical lines with different color. —: Serine; —: Threonine; —: Tyrosine; —: Threshold.

2.2 pEGFP-spindlin1 融合蛋白的亚细胞定位

酶切和测序结果表明 pEGFP-spindlin1 载体构建成功. 转染 48 h 后融合蛋白的检测结果表明:

EGFP 与野生型 spindlin1 的融合蛋白集中于细胞核中, 而表达 EGFP 空载体的绿色荧光成全细胞分布(图 2).

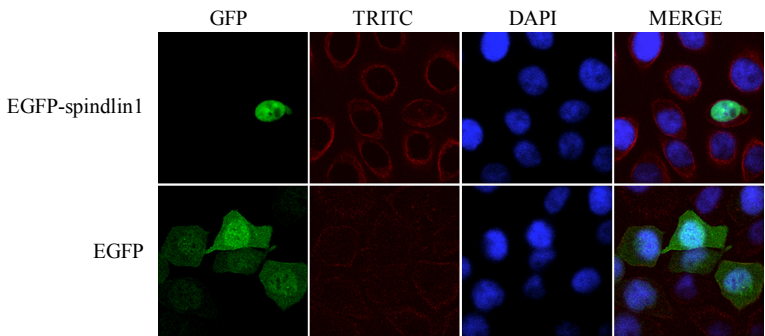


Fig. 2 Subcellular localization of EGFP and EGFP-spindlin1

pEGFP-spindlin1 or control pEGFP vector was transfected into HeLa cells. The localization of EGFP or EGFP-spindlin1 protein was checked 48 h after transfection with confocal microscopy. Nuclei were stained with DAPI and cytoplasm was stained with TRITC.

2.3 突变体的亚细胞定位

Spindlin1 蛋白的 14、84 以及 99 氨基酸位点 Ser 到 Ala 7 种突变体转染后的定位信号明显不同: pEGFP-spindlin1-Ser14M、pEGFP-spindlin1-Ser84M、pEGFP-spindlin1-Ser99M、pEGFP-spindlin1-Ser14 +

99M GFP-spindlin1 绿色荧光信号分布与野生型 spindlin1 相同, 主要分布在细胞核内(图 3a). 而 pEGFP-spindlin1-Ser84+99M、pEGFP-spindlin1-Ser14+84M 和 pEGFP-spindlin1-Ser14+84+99M 3 种突变体的绿色荧光呈无规则弥散分布(图 3b).

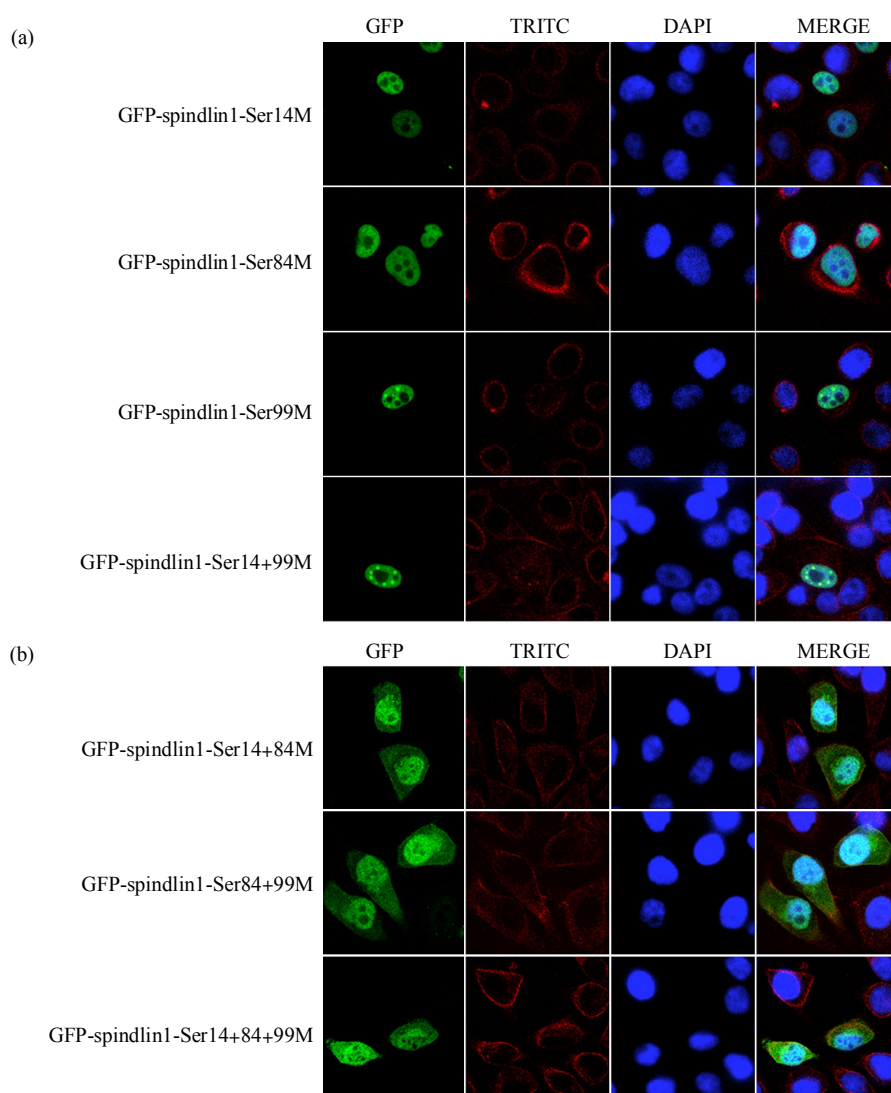


Fig. 3 Localization of spindlin1 mutants in HeLa cells

pEGFP-spindlin1 with 14, 84, 99 or 14 + 84 Ser-Ala mutation was transfected into HeLa cells. EGFP-spindlin1 mutants were checked 48 h after transfection with confocal microscopy. Nuclei were stained with DAPI and cytoplasm was stained with TRITC.

2.4 体外 spindlin1 与 TCF-4 相互作用并抑制 TCF-4 荧光素酶报告基因的活性

GST-pulldown 实验结果表明, 体外 spindlin1 可以与 TCF-4 相互作用(图 4a). 与对照载体 pEGFP-C1 质粒相比, pEGFP-spindlin1 与 TCF-4 荧光素酶报告基因载体 pTOPFlash 载体共转染后, TCF-4 荧光素酶报告基因的转录活性明显上升(图 4b).

2.5 突变体对 TCF-4 荧光素酶报告基因活性的影响

Spindlin1 7 种突变体与 TCF-4 荧光素酶报告基因载体 pTOPFlash 载体共转染 HeLa 细胞, 转染 48 h 后检测荧光素酶报告基因的活性, 结果表明: pEGFP-spindlin1-Ser14M、pEGFP-spindlin1-Ser84M、pEGFP-spindlin1-Ser99M、pEGFP-spindlin1-Ser14 + 99M GFP-spindlin1 对荧光素酶报告基因的活性有

与野生型的 spindlin1 相似的促进作用。而 pEGFP-spindlin1-Ser84+99M、pEGFP-spindlin1-Ser14+84M

和 pEGFP-spindlin1-Ser14+84+99M 3 种突变体对荧光素酶报告基因活性的促进作用明显下降(图 5)。

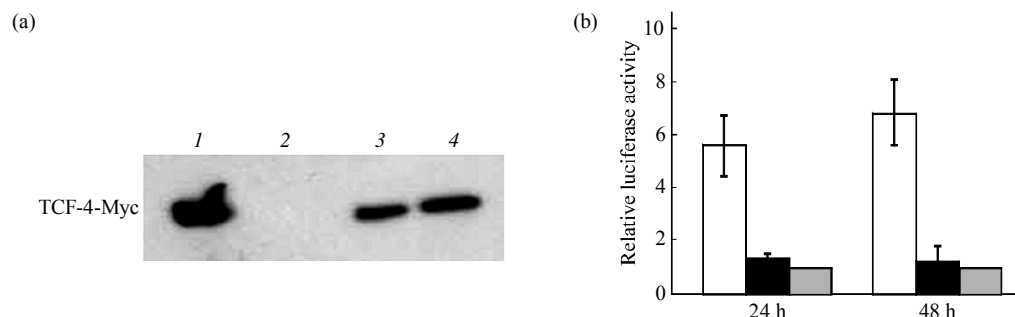


Fig. 4 Spindlin1 interacts with TCF-4 and increase the TCF-4 luciferase reporter activity

(a) *In vitro* interaction of spindlin1 and TCF-4. Interaction between spindlin1 and TCF-4 was analyzed with GST-pull-down assay. Recombinant bacterially expressed GST-spindlin1 or GST-β-catenin was incubated with myc tagged TCF-4 proteins in GST-binding buffer overnight at 4°C. The precipitate was washed and subjected to Western blot analysis. Ten percent of TCF-4-myc protein used in GST-pulldown assay were loaded in lanes denoted "input". 1: TCF-4-myc input; 2: GST; 3: GST-spindlin1; 4: GST-β-catenin. (b) Spindlin1 increased TCF-4 luciferase reporter activity. HeLa cells were transfected with pEGFP-spindlin1 along with the TCF-4 reporter pTOPFlash (OT) or the control inactive reporter pFOPFlash (OF). Luciferase activity was determined 48 h after transfection. The activity of the pEGFP was defined as 1. □: OT+spindlin1; ■: OF+spindlin1; ▒: OT+pEGFP.

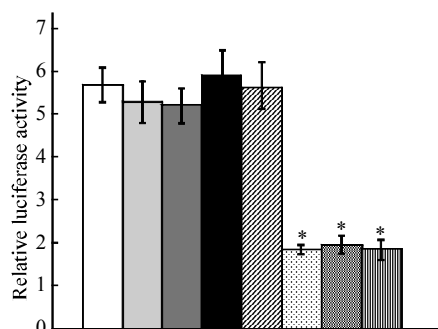


Fig. 5 Effects of spindlin1 mutants on TCF-4 luciferase reporter activity

HeLa cells were transfected with pEGFP-spindlin1 or spindlin1 mutants along with the TCF-4 reporter pTOPFlash or pFOPFlash. Luciferase activity was determined 48 h after transfection. Number on the y-axis indicated the relative luciferase activity normalized to that of FOPFlash value. The data represented average values from 3 separate experiments. Error bars indicate standard deviations. * Compared with that of spindlin1, $P < 0.05$, student's *t* test. □: Spindlin1; ▒: Spindlin1-Ser14M; ■: Spindlin1-Ser84M; ■: Spindlin1-Ser99M; ▒: Spindlin1-Ser14+99M; ▒: Spindlin1-Ser14+84M; ▒: Spindlin1-Ser84+99M; ▒: Spindlin1-Ser14+84+99M.

3 讨 论

Spindlin 是在卵母细胞成熟和受精卵发育过程中高表达的蛋白质, 其磷酸化一度被认为是减数分裂成熟的标志^[8,9]。Spindlin 与 Ssty 基因共同构成的

Spin/Ssty 基因家族在进化中高度保守, 其成员间的同源性在 70%以上, 具有 3 个独立的 Spin/Ssty 重复序列^[10]。我们从卵巢癌细胞中获得的 spindlin1 亦属 Spin/Ssty 基因家族, 定位于 9 号染色体的 9q22.1~22.3 区域, 与小鼠 spindlin 氨基酸同源性为 98%。研究表明, spindlin1 还广泛表达于肝癌、乳腺癌、宫颈癌及血液系统肿瘤细胞中, 而在正常的基质细胞, 成纤维细胞中不表达, 在造血干祖细胞等分化较低的细胞中少量表达。

迄今为止, 人们对 Spin/Ssty 家族的功能还缺乏深入的研究。对小鼠 spindlin 的研究表明其在卵母细胞中可能作为 MOS/MAPK 信号通路中某种激酶的底物发挥作用, 但对于人的 spindlin1 基因我们并未发现其参与 MOS/MAPK 通路的调节。我们研究小组对 spindlin1 的功能开展系列研究, 结果表明, 人 spindlin1 蛋白定位于细胞核^[13], spindlin1 高表达使细胞 G2/M 期比例增加, 对 3T3 细胞具有转化作用^[15]。进一步的研究表明, 外源性的 spindlin 蛋白在有丝分裂过程中呈动态分布, 在分裂前期与中期主要定位于纺锤体, 进入后期, 与纺锤体共定位的 spindlin1 蛋白明显增加, 当胞质完成分裂后, 该蛋白质离开微管集中于子代细胞核。外源性的 spindlin1 过表达引起细胞的分裂阻滞、分类中期丝裂灾变以及基因组不稳定等变化。表明 spindlin1 的核定位在其功能发挥中具有重要意义,

可能通过影响基因组的稳定性等因素促进细胞发生恶性转化^[20]。令人感兴趣的是, 这些表型与 Aurora-A 表达异常所引起的细胞改变非常一致, 提示 spindlin1 可能与 Aurora-A 之间存在相互作用, 可能作为 Aurora-A 的作用底物发挥作用。

Aurora-A 是新近发现的具有调节中心体、微管功能的丝/苏氨酸激酶, 是对有丝分裂正常进行起着至关重要作用的 Aurora 激酶家族重要成员之一。Aurora-A 在细胞中的表达呈现周期依赖性, 在 G1 期最低, S 期逐渐升高, G2/M 期增至最高, M 期结束后迅速下降。Aurora-A 在细胞内随细胞周期的变化呈动态分布, 广泛参与中心体的成熟、分离和纺锤体的组装、稳定, 以及染色体的浓集、中板聚合和稳定等细胞周期不同阶段的各种事件, 在细胞分裂过程中具有重要的调控作用, 是基因组信息在子代细胞中精确传递的保障之一。其过量表达导致 G2 检测点、纺锤体检测点及胞质分裂异常, 进而影响染色体稳定性^[21, 22]。

为进一步梳理 spindlin1 功能研究的思路, 早日明确 spindlin1 的作用机制, 在本实验中, 在原有的晶体结构解析的基础上, 结合生物信息学分析结果, 选取分布于蛋白质表面的 3 个潜在的 Aurora-A 磷酸化位点(Ser14、Ser84 和 Ser99)作为候选研究对象, 构建针对这些位点的系列 spindlin1 表达突变体, 利用核定位为指标, 期望为明确以下问题提供线索: spindlin1 磷酸化是否与其定位及功能相关? 如果是, 关键的磷酸化位点是什么? 而本课题的结果也证实了我们的设想, 在 spindlin1 三维结构中位于表面的 Ser14、Ser84 和 Ser99 3 个丝氨酸位点是该蛋白质进入细胞核的重要因素, 其中 Ser84 是影响 spindlin1 蛋白定位的关键位点, 其功能的发挥还需要 Ser14 或 Ser99 的辅助。如前所述, Ser14、Ser84 和 Ser99 3 个丝氨酸位点是 Aurora-A 激酶潜在的作用靶点, 提示 spindlin1 可能作为 Aurora-A 激酶的作用底物发挥作用。迄今为止, 还没有发现 Spin/Ssty 家族成员与 Aurora-A 相互作用的报道。

我们之前的实验初步提示, spindlin1 蛋白在细胞核内可能通过与转录因子 TCF-4 结合而发挥作用(结果未显示)。在本实验中, 首先利用 GST pull-down 的方法证实了 spindlin1 和 TCF-4 之间在体外具有物理相互作用, 外源性的 spindlin1 表达对 TCF-4 荧光素报告基因的转录活性有激活作用。在此基础上, 进一步检测突变体对 TCF-4 活性的影

响, 并以此为指标验证以上几个关键位点对 spindlin1 蛋白功能的影响。突变体的实验结果表明, Ser84 与 Ser14 或 Ser99 突变使 spindlin1 对 TCF-4 荧光素酶报告基因转录活性的影响降低和消失。表明 Ser84 位点不仅是其定位的关键位点, 同时对其功能的发挥具有至关重要的作用。

Wnt 信号通路在胚胎发育中具有决定性的作用, 其功能的异常激活参与多种肿瘤的发生发展过程。T 细胞因子 TCF4 是 Wnt 信号通路中的关键分子, 当 Wnt 通路激活, β -catenin 进入细胞核竞争结合 TCF4, 进而开启包括 c-Myc 和 cyclin D1 等靶基因的转录表达^[23]。在这个过程中, 一些辅助激活因子(co-activator)的存在能够促进或抑制 Wnt 信号通路的激活^[24]。我们的研究结果提示, Ser84 是 spindlin1 细胞定位的关键位点, 进入细胞核 spindlin1 有可能作为转录因子或者共激活因子参与 Wnt 信号通路的激活, 从而在肿瘤发生发展过程中发挥作用, 在此研究基础上进一步明确 spindlin1 的功能及作用信号通路将具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Cullen B R, Emigholz K, Monahan J J. Protein patterns of early mouse embryos during development. *Differentiation*, 1980, **17**(3): 151~160
- 2 Howlett S K. A set of proteins showing cell cycle dependent modification in the early mouse embryo. *Cell*, 1986, **45**(3): 387~396
- 3 Howlett S K, Bolton V N. Sequence and regulation of morphological and molecular events during the first cell cycle of mouse embryogenesis. *J Embryol Exp Morphol*, 1985, **87**: 175~206
- 4 Levinson J, Goodfellow P, vadeboncoeur M, *et al.* Identification of stage-specific polypeptides synthesized during murine preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, **75**(7): 3332~3336
- 5 Van Blerkom J. Structural relationship and posttranslational modification of stage-specific proteins synthesized during early preimplantation development in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**(12): 7629~7633
- 6 Vitale A M, Calvert M E, Mallavarapu M, *et al.* Proteomic profiling of murine oocyte maturation. *Mol Reprod Dev*, 2007, **74**(5): 608~616
- 7 Oh B, Hwang S, McLaughlin J, *et al.* Timely translation during the mouse oocyte-to-embryo transition. *Development*, 2000, **127**(17): 3795~3803
- 8 Oh B, Hampl A, Eppig J J, *et al.* SPIN, a substrate in the MAP kinase pathway in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*, 1998, **50**(2): 240~249
- 9 Oh B, Hwang S Y, Solter D, *et al.* Spindlin, a major maternal transcript expressed in the mouse during the transition from oocyte to embryo. *Development*, 1997, **124**(2): 493~503
- 10 Staub E, Mennerich D, Rosenthal A. The Spin/Ssty repeat: a new

- motif identified in proteins involved in vertebrate development from gamete to embryo. *Genome Biol*, 2002, **3**(1): RESEARCH0003
- 11 de Kloet R S, de Kloet S R. The evolution of the spindlin gene in birds: sequence analysis of an intron of the spindlin W and Z gene reveals four major divisions of the Psittaciformes. *Mol Phylogenet Evol*, 2005, **36**(3): 706~721
 - 12 Itoh Y, Hori T, Saitoh H, *et al.* Chicken spindlin genes on W and Z chromosomes: transcriptional expression of both genes and dynamic behavior of spindlin in interphase and mitotic cells. *Chromosome Res*, 2001, **9**(4): 283~299
 - 13 岳文, 孙丽亚, 李春海, 等. 人 spindlin 1 基因全长 cDNA 的克隆与定位. *自然科学进展*, 2004, **14**(2): 173~178
Yue W, Sun L Y, Li C H, *et al.* *Prog Natur Sci*, 2004, **14**(2): 173~178
 - 14 岳文, 孙丽亚, 李春海, 等. 卵巢癌相关基因的筛选与鉴定. *癌症*, 2004, **23**(2): 141~145
Yue W, Sun L Y, Li C H, *et al.* *Cancer*, 2004, **23**(2): 141~145
 - 15 Gao Y, Yue W, Zhang P, *et al.* Spindlin1, a novel nuclear protein with a role in the transformation of NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **335**(2): 343~350
 - 16 Yuan H, Zhang P, Qin L, *et al.* Overexpression of SPINDLIN1 induces cellular senescence, multinucleation and apoptosis. *Gene*, 2008, **410**(1): 67~74.
 - 17 Zhao Q, Qin L, Jiang F, *et al.* Structure of human spindlin1. Tandem tudor-like domains for cell cycle regulation. *J Biol Chem*, 2007, **282**(1): 647~656
 - 18 Yue W, Sun Q, Dacic S, *et al.* Downregulation of Dkk3 activates β -catenin/TCF-4 signaling in lung cancer. *Carcinogenesis*, 2008, **29**(1): 84~92
 - 19 Toualbi K, Güller M C, Mauriz J L, *et al.* Physical and functional cooperation between AP-1 and beta-catenin for the regulation of TCF-dependent genes. *Oncogene*, 2007, **26**(24): 3492~3502
 - 20 Zhang P, Yuan H F, Chen L, *et al.* Overexpression of spindlin1 induces metaphase arrest and chromosomal instability. *J Cell Physiology*, 2008, **217**(2): 400~408
 - 21 Carvajal R D, Tse A, Schwartz G K. Aurora kinases: new targets for cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 2006, **12**(23): 6869~6875
 - 22 Fu J, Bian M, Jiang Q, *et al.* Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res*, 2007, **5**(1): 1~10
 - 23 Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 2006, **127**(3): 469~480
 - 24 叶雄俊, 张志文, 张新军, 等. ATF5 与 TCF4 相互作用及其对 Wnt 信号通路的调控. *科学通报*, 2003, **48**(3): 582~586
Ye X J, Zhang Z W, Zhang X J, *et al.* *Chin Sci Bull*, 2003, **48**(3): 582~586

Ser84 is The Key Point of Spindlin1 Nuclear Localization and Function*

CONG Bin**, ZHANG Peng**, WANG Jing-Xue, ZENG Quan, CHEN Lin, YUE Wen***, PEI Xue-Tao***

(Department of Stem Cell and Regenerative Medicine, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract The previous study suggested that spindlin1 is a new tumor related protein which is localized to nuclear and may be involved in regulating cell cycle *via* TCF-4 pathway. To further study mechanism of spindlin1 function, based on the bioinformatics analysis of spindlin1 structure, A series of spindlin1 wild or mutant expression vectors was constructed to determine the key amino acid points for spindlin1 localization and function. As previously reported, wild type spindlin1 protein was localized in the nuclei of HeLa cells. Cells transfected with construct either with mutation of Ser14+Ser84, Ser84+Ser99 or Ser14+Ser84+Ser99 exhibited a cytoplasm spindlin1 expression in a diffused manner, while in those cells transfected with construct with mutation of Ser14, Ser84, Ser99 or Ser14+Ser 99, the spinlin1 showed a similar subcellular nuclear location as wild type spindlin1. Further TCF-4 reporter assay were performed using these wild type or mutant spindlin1 constructs, and the results indicated that mutation of Ser84 with either Ser14 or Ser99 could abolish the promotion of spindlin1 on TCF-4 reporter activity. All these result suggested that Ser84 of spindlin1, with the cooperation of Ser14 or Ser99 play a key role in it nuclear localization and its function in regulation of TCF-4 pathway.

Key words spindlin1, mutation, localization, TCF-4

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00365

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02A107) and National Basic Research Program of China (2005CB522702).

**CONG Bin and ZHANG Peng contributed equally to this work.

***Corresponding author. Tel: 86-10-66931974, 86-10-66932203

YUE Wen. E-mail: wenyue26@yahoo.com

PEI Xue-Tao. E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

Received: May 19, 2008 Accepted: August 19, 2008