

小鼠 FAAP 蛋白对细胞黏附的影响*

胡劲松 丁乃峥 滕俊林 陈建国**

(北京大学生命科学学院, 细胞增殖与分化教育部重点实验室, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 黏着斑相关蛋白(focal adhesion associated protein, FAAP)由小鼠 *D10Wsu52e* 基因编码, 在进化上十分保守, 但该蛋白质的生物学功能并不清楚. 为此, 首先通过细胞组分离的方法研究了 FAAP 蛋白分布的细胞组分, 结果表明 FAAP 主要存在于细胞质和细胞膜中. 细胞蛋白表达量分析表明, 细胞中 FAAP 与黏连蛋白受体(LR)表达量呈现正相关性. 同时, 细胞黏附实验表明, FAAP 与 LR 对细胞黏附影响类似, 也能够抑制细胞的黏附. 这些实验结果为深入研究 FAAP 蛋白功能提供了依据.

关键词 小鼠, *D10Wsu52e* 基因, FAAP, 67 ku 层粘连蛋白受体, 细胞黏附

学科分类号 Q291

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00344

黏着斑相关蛋白(focal adhesion associated protein, FAAP)是一个由小鼠 *D10Wsu52e* 基因编码的含有 505 个氨基酸残基的蛋白质(GenBank accession No. AY424364)^[1]. FAAP 在进化上十分保守, 其氨基酸序列与人类同源基因蛋白 HSPC117 相似度高达 99.7%以上, 并且这些同源蛋白都属于一个名为 UPF0027 的蛋白质家族, 它们共有一个被称为 UPF0027 结构域的保守序列. FAAP 与其同源蛋白在小鼠和其他哺乳动物各种器官、组织和细胞中广泛表达^[1], 并且在许多肿瘤细胞中还出现了高表达现象^[1, 2]. 目前, 虽然有些研究结果表明, FAAP 的同源蛋白 HSPC117 存在于许多蛋白质复合物中, 例如在参与 RNA 运输的与 kinesin(KIF5)结合的蛋白质复合物^[3]、与 TNF- α mRNA 3' AU-rich 元件结合的蛋白质复合物^[4]、与渗透压反映元件 KIAA0827 结合的蛋白质复合物^[5], 以及与细胞铺展结构相关的蛋白质复合物^[6]等. 我们前一阶段的结果也证明了该蛋白质不仅能和 vinculin 结合, 而且能促进 vinculin 和 paxillin 的结合, 同时下调 paxillin 和 FAK 的相互作用, 抑制细胞黏着斑运动从而抑制细胞铺展^[7]. 但对于 FAAP 及其同源蛋白 HSPC117 在细胞中存在状态和发挥的功能却知之甚少.

小鼠 67 ku 层粘连蛋白受体(67 ku laminin

receptor, LR)是由 37 ku 层粘连蛋白受体前体(37 ku laminin receptor precursor, LRP)通过多种蛋白质修饰而来的, 但这些修饰的完整机制还不是十分清楚^[8~11]. LRP 由小鼠 *Lamr1(laminin receptor 1)* 基因编码, 含有 295 个氨基酸残基, 在进化上也十分保守. 同时, LRP 也是 40 S 核糖体的一个亚基, 参与细胞内蛋白质的合成^[12]. 通过 LRP 修饰而来的 LR 是一类高亲和力、非整合素家族的细胞外基质受体, 能够和细胞外基质蛋白 laminin、fibronectin 和 collagen 结合, 并影响细胞的黏附和迁移^[13~15]. LR 在一些肿瘤细胞中呈现高表达的现象, 并伴随着与细胞黏附相关的一些蛋白质分子表达异常^[14, 16, 17]. 同时, LR 表达量变化还可通过影响一些细胞信号转导蛋白质分子的表达量或者活性来影响细胞蛋白的表达和细胞功能的发挥, 进而影响肿瘤细胞的黏附和转移^[15, 18~20]. 因此, LR 可以作为一些肿瘤细胞, 例如乳腺癌细胞等的标记性蛋白分子^[18].

本研究中, 为了研究 FAAP 功能, 首先用细胞

* 国家 973 项目资助项目(2003CB715900, 2006CB500700 和 2004cb720003).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62755786, E-mail: chenjjg@pku.edu.cn

收稿日期: 2008-05-11, 接受日期: 2008-06-10

组分分离的方法研究 FAAP 存在的细胞组分, 结果表明 FAAP 存在于细胞膜和细胞质组分中. 通过筛选比较发现, FAAP 与细胞黏附分子 LR 在细胞中的表达呈正相关性. 最后, 我们发现类似 LR 对细胞黏附的影响, FAAP 也能抑制细胞黏附作用. 这些实验结果为研究 FAAP 功能提供了线索.

1 材料和方法

1.1 材料

蛋白酶抑制剂 PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride)、RNase A、soybean trypsin inhibitor、Hepes、Tris、TEMED、Glycine、Tween 20、acrylamide 和 actin 抗体(Sigma 公司); leupeptin 和 aprotinin(Roche 公司); HSPC117 抗体(制备抗体的抗原氨基酸序列与 FAAP 完全一致, 也即 FAAP 抗体)由 Hirokawa 教授友情提供^[3]; 其余常规试剂为国产分析纯试剂.

1.2 质粒构建

合成并退火后得到的 HA tag 核苷酸序列用 *Kpn* I /*Sma* I (New England Biolabs, Fermentas, USA)接入 pIRES-EGFP 载体中(Clontech 公司). FAAP cDNA 序列从小鼠脑 cDNA 库中用 PCR 的方法获得, 并用 *Eco*R I /*Kpn* I 接入上述 pIRES-EGFP 载体中.

LRP/LR cDNA 及其 161~295 氨基酸序列突变体(LRP/LR: 161~295), 从小鼠大脑的 RT-PCR 产物通过 PCR 得到, 用 *Bgl* II (5')/*Sal* I (3')双酶切后按照开放阅读框接入 pGEX-4T-1(Amersham 公司)、pCMV tag 5A(Stratagene 公司). 所有的 cDNA 序列都经过 DNA 测序来确定其序列的正确性.

用于转染细胞的质粒 DNA 都用 Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System(Promega 公司)制备, 并测定 DNA 浓度.

1.3 HeLa 细胞培养和转染

HeLa 细胞系在 37℃, 5% CO₂ 条件下, 含 10% 胎牛血清的 DMEM(Gibco 公司)培养基中培养.

转染前, 将培养的细胞用 0.25%的胰酶消化, 按照适当细胞数接种到培养皿或培养板中, 培养 18~24 h 后, 用 LipofectAMINE2000 (Life Technologies, Inc.)试剂转染细胞, 质粒浓度和转染方法依照试剂盒说明书.

1.4 蛋白质表达与纯化

含有 LRP/LR 缺失突变 pGEX-4T-1 的质粒转

化到 *E. coli* BL21-DE3 细菌株中. 原核蛋白的表达根据各载体公司的操作手册方法(Amersham 公司和 Novagen 公司), 12 h 培养 1~2 ml, 再扩增至 500 ml, 用 1 mmol/L IPTG(Sigma 公司)在 30℃ 诱导 5 h 以上. 得到的细菌用 6 000 *g* 离心 10 min 置于 -70℃ 保存.

GST 和 GST 融合的蛋白质纯化方法参考 Amersham Biosciences 公司的操作手册, 用 Amersham 公司的 Glutathione Sepharose 4B Fast Flow 柱子纯化. 所得到的纯化蛋白质用 SDS PAGE 分离后用 Coomassie G 250(Sigma 公司)染色或者 Western blot 检测. 所有纯化的蛋白质透析到 PBS 溶液中置于 -20℃ 短期保存.

1.5 抗体制备与纯化

为了制备 LRP/LR 的抗体, 将根据上述方法纯化好的 GST 融合的 LRP/LR: 161~295 蛋白根据标准方法免疫 Bal b/c 小鼠. 免疫后的小鼠血清用 0.5 ml 含有大约 3 mg GST 的 Glutathione Sepharose 4B beads 吸附, 再用偶联 GST-LRP/LR: 161~295 蛋白 Glutathione Sepharose 4B beads 吸附, 根据 Amersham 公司的 Antibody Purification Handbook 方法纯化抗 LRP/LR 蛋白的抗体, 用 Western blot 方法进行抗体检测.

1.6 细胞组分分离

根据 Graham 等^[2]的方法通过离心的方法来分离得到细胞组分, 鉴定 FAAP 蛋白所存在的组分. 培养的 HeLa 细胞用预冷的缓冲液 A(0.12 mol/L NaCl, 2.6 mmol/L KCl, 8.1 mmol/L Na₂HPO₄, 1.5 mmol/L KH₂PO₄)洗涤 3 次, 细胞刮入 1 ml 预冷的缓冲液 B(1.2 mol/L glycerol, 5 mmol/L Tris, pH 7.4)中. 细胞在缓冲液 B 中轻摇 20 min, 并用 1 000 *g* 离心 5 min 收集细胞. 收集的细胞用 100 μl 预冷的缓冲液 C(0.25 mol/L sucrose, 0.2 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L Tris, pH 7.4, 10 mg/L leupeptin, 10 mg/L aprotinin, 10 mg/L soybean trypsin inhibitor, 1 mmol/L PMSF 和 20 mg/L RNase A)裂解 5 min, 1 000 *g* 离心 5 min 得到沉淀即为细胞核, 用 100 μl 缓冲液 C 洗涤 3 次(P1). 上清用 10 000 *g* 离心 10 min 后得到的沉淀为重膜组分(P2), 得到的上清为细胞质组分(C1).

为了得到细胞的精细组分, 用蔗糖密度梯度离心的方法来分离得到的细胞粗组分 P1、P2 和 C1. P1 组分用 40%(重量比)的蔗糖溶液(5 mmol/L Tris,

pH 7.4, 10 mg/L Leupeptin, 10 mg/L aprotinin, 10 mg/L soybean trypsin inhibitor, 1 mmol/L PMSF 和 20 mg/L RNase A) 悬浮, 小心铺在 50% (重量比) 的蔗糖溶液层上, 用 21 000 *g* 在 4°C 离心 2 h (Sigma 3K 15 转子), 沉淀即为纯化的细胞核组分(Nuc). P2 和 C1 组分分别用 30% (重量比) 溶液悬浮, 小心铺在 40% (重量比) 蔗糖溶液层上, 用 100 000 *g* 在 4°C 离心 3 h (Beckman 公司), 从 P2 组分中得到的沉淀即为纯化的线粒体组分(Mit), 在 30% (重量比) 和 40% (重量比) 之间得到的组分为纯化的细胞膜组分(PM), 从 C1 组分得到的沉淀为纯化的细胞质中大颗粒组分(Cyt).

得到的 PM 组分分别用含有 0.1 mol/L Na₂CO₃ (pH 11.5) 溶液、1% Triton X-100 或者修饰的 RIPA 缓冲液 (50 mmol/L Tris, pH 7.2, 1 mmol/L EDTA, 1% NP 40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate (Sigma 公司)) 4°C 处理 1 h, 用 10 000 *g* 离心 10 min 后, 得到的沉淀用 PBS 洗涤 3 次. 所有的操作均在 4°C 低温进行. 所得到的沉淀和上清用 SDS-PAGE 2× sample loading 缓冲液处理, SDS-PAGE 分离, Western blot 检测.

1.7 Western blot 实验

蛋白质样品沸水浴 5~10 min 后 12 000 *g* 离心, 取适量上清在合适浓度 (6%~10%) 的 SDS-PAGE 上进行蛋白质电泳, 转 PVDF 膜 (Millipore 公司). SDS-PAGE、蛋白质转膜方法参照《分子克隆实验指南》(J. 萨姆布鲁克等, 1999 年). 然后, 在 37°C 下用含 5% 脱脂牛奶 TBST 溶液 (150 mmol/L NaCl, 25 mmol/L Tris, 0.06% Tween 20, pH 7.5) 封闭 PVDF 膜 30 min, 加入稀释好浓度的一抗, 4°C 孵育过夜, TBST 洗涤, 加入稀释好浓度的 HRP 偶联的二抗 (Vector 公司) 37°C 孵育 1 h. TBST 溶液洗涤后, 用化学发光荧光底物检测试剂盒 (Pierce 公司) 显色, X 光片曝光检测.

1.8 细胞黏附实验

转染 pIRES-EGFP-FAAP 或 pIRES-EGFP 的 HeLa 细胞培养 24 h 后, 用无血清的 DMEM 洗涤细胞, 1 mmol/L EDTA 处理细胞后用无血清 DMEM 洗去 EDTA, 轻吹细胞悬浮于无血清 DMEM 中. 细胞培养用的 12 孔板事先加入 1 mg/L 外源纯化的不同细胞外基质蛋白 (laminin、fibronectin、collagen, Sigma 公司) 和 1 g/L 的 BSA, 37°C 孵育 30 min 以上, 并用 PBS 洗涤 3 次. 悬浮的细胞按照 50 000 个 / 孔的浓度加入到事先处理好的 12 孔

培养板上, 置于 37°C, 5%~10% CO₂ (体积比) 潮湿的细胞培养箱中培养 30~60 min. 将贴壁细胞和悬浮细胞分别用 PBS 洗涤, 用含 2% 多聚甲醛的 PBS 置于 4°C 中孵育 30 min 以上后, 轻吹细胞使之悬浮在 PBS 中, 用流式细胞仪测定贴壁与未贴壁细胞中 EGFP⁺ 细胞的个数. 计算出 EGFP⁺ 细胞中已贴壁细胞占 EGFP⁺ 细胞总数的比例, 分析 FAAP 蛋白对细胞黏着的影响.

实验中所用的统计方法均为 paired student's *t* 检验, *P* < 0.05 视为差异显著.

2 结 果

2.1 FAAP 主要存在于细胞膜和细胞质组分中

为了了解 FAAP 在细胞内的分布状态, 用蔗糖密度梯度离心的方法分离得到了细胞的各个组分, 并用 FAAP 抗体检测各组分中 FAAP 蛋白的含量. 结果表明, FAAP 主要分布在细胞质中和细胞膜上 (图 1b). 其中, 细胞质中 FAAP 蛋白是沉降在 40% 蔗糖底部, 说明这个蛋白质在细胞质中是分布在一些沉降系数较大的大颗粒上, 这与 Kanai 等^[3]证实 HSPC117 在细胞质中分布在一类沉降系数较大的转运颗粒上的结果一致.

为了进一步研究 FAAP 在细胞膜上的结合情况, 对分离得到的细胞膜组分分别用不同的溶液处理后, 离心分离结果表明, FAAP 能够被高 pH 值的溶液从细胞膜组分上处理下来. 有趣的是, 细胞膜组分用非离子型去垢剂 Triton X-100 处理后, FAAP 并没有从细胞膜上分离下来, 而用离子型的去垢剂溶液 RIPC 处理后, FAAP 可以从细胞膜上分离下来 (图 1d).

2.2 FAAP 与 LRP 蛋白表达水平的相关性

以前的实验结果都表明, LRP/LR 和 FAAP 在一些肿瘤细胞中都呈现出高表达现象, 并且在细胞中转染含有 LRP 的质粒, 可以同时促进 LRP 和 LR 表达量的升高^[1, 2, 14, 16~18]. 为验证 FAAP 与 LRP/LR 蛋白表达水平是否存在相关性, 将不同浓度的 pIRES-EGFP-FAAP-HA 或 pCMV 5A tag-LRP 质粒分别转染 HeLa 细胞, 48 h 后用 FAAP、LRP/LR 抗体分别检测各自蛋白质表达水平. 如图 2 所示, 随着转染质粒浓度的增大, 细胞中表达的 FAAP 或 LRP/LR 蛋白量逐渐增大, 伴随着 FAAP 或 LRP/LR 表达水平升高, 细胞中的 LRP/LR 或 FAAP 表达水平也逐步升高, 细胞中 FAAP 与 LRP/LR 的表达水平呈现正相关性.

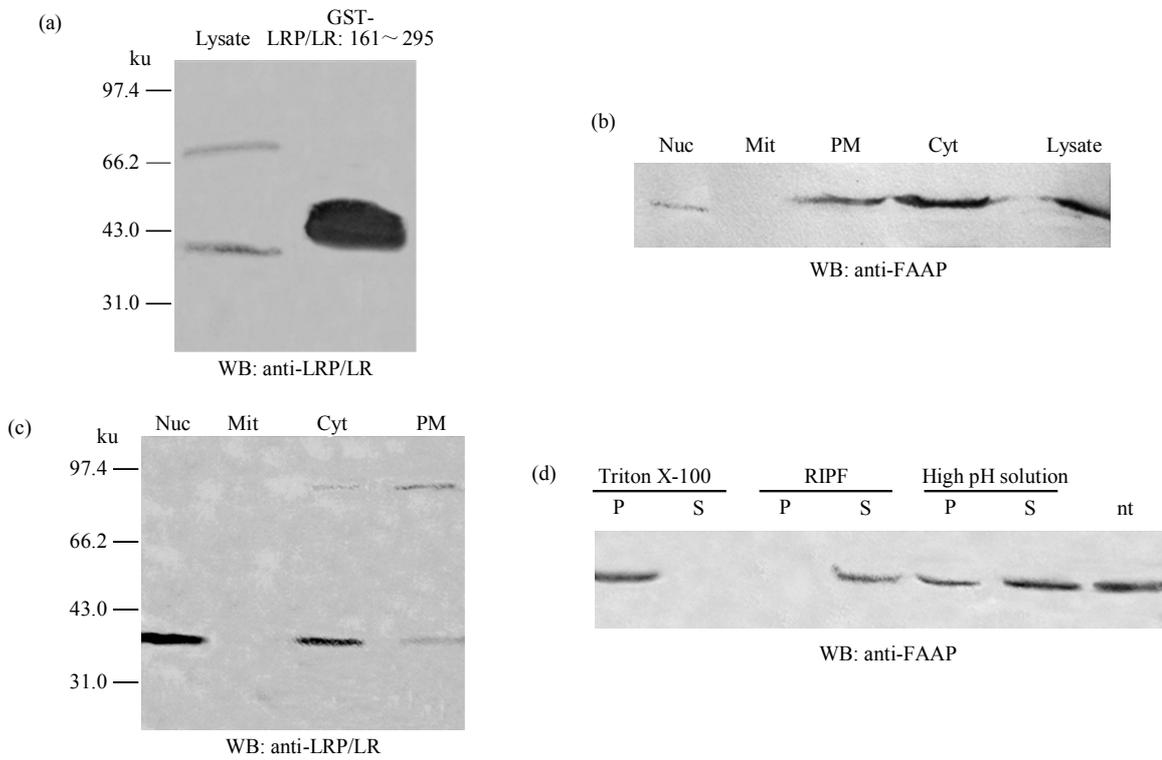


Fig. 1 Identification of the FAAP subcellular localization

(a)LRP/LR antibody was prepared and used to test GST fusion LRP/LR mutant: 161~295 or LRP and LR molecules forms in HeLa cells lysate. The subcellular fractions were isolated from HeLa cells by the ultra-speed centrifugation. All obtained fractions, nuclear (Nuc), mitochondria (Mit), cytoplasm (Cyt), plasmic membrane (PM), were detected by the Western blot with anti-FAAP antibody (b) or anti-LRP/LR antibody (c). The obtained plasmic membrane fractions were treated with 1% Triton X-100, RIPF solution and high pH solution (0.1 mol/L Na₂CO₃, pH 11.5). After centrifugation, the supernatants (S), the pellets (P) and the non-treatment (nt) were detected by Western blot with anti-FAAP antibody (d).

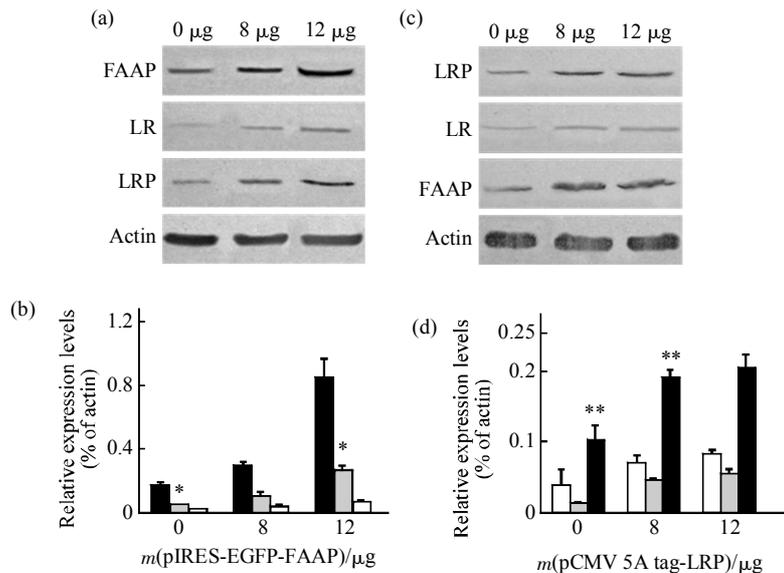


Fig. 2 The expression level of LRP/LR is associated with the FAAP expression

HeLa cells in 60 mm dishes were transfected with 0 μg, 8 μg and 12 μg pIRES-EGFP-FAAP (a) or pCMV 5A tag-LRP (c) plasmids respectively and cultured for 48 h. Cells lysate were detected with FAAP antibody, LRP/LR antibody and actin antibody. (b), (d)The relative protein expression levels were the quantifications of the FAAP, LRP and LR bands vs actin by intensity measurements. Results shown were representative of three independent experiments. *: $P < 0.01$, $n=3$. ■: FAAP; □: LR; □: LRP.

2.3 FAAP 能够抑制培养细胞的黏附

由于 LR 在细胞中表达量变化与细胞黏附密切相关^[13~15], 因此, 用转染表达质粒的细胞来验证 FAAP 蛋白对细胞黏附的影响. 转染 p-IRES-EGFP-FAAP(EGFP⁺/FAAP⁺)或 p-IRES-EGFP(EGFP⁺/FAAP⁻)质粒的 HeLa 细胞培养 24 h 后, 分离处理后铺到含有 1 mg/L 的不同细胞外基质蛋白(laminin、fibronectin、collagen)的培养皿中, 培养 30~60 min 后, 用流式细胞仪测定出贴壁细胞和未贴壁细胞中 EGFP⁺ 细胞的个数, 分析细胞中 FAAP 蛋白表达上升后对细胞黏附的影响. 结果显示(图 3), 在细胞黏附 30 min 时, 在不同细胞外基质蛋白上黏附的 EGFP⁺/FAAP⁺ HeLa 细胞比例约为 50%, 而 EGFP⁺/FAAP⁻ 的 HeLa 细胞黏附比例为 70%. 在细胞黏附 60 min 后, EGFP⁺/FAAP⁺ HeLa 细胞比例约为 70%, 而 EGFP⁺/FAAP⁻ 的 HeLa 细胞黏附比例为 80%. 这些结果也说明, 细胞内 FAAP 蛋白表达量上升能够抑制细胞的初始黏附, 但是随着细胞黏附时间的增加, 这种黏附抑制作用逐渐减弱.

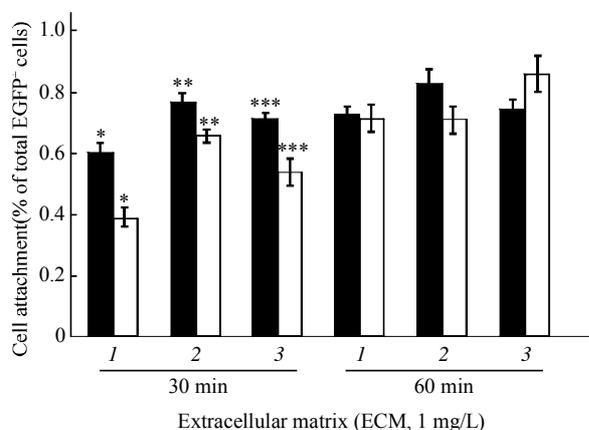


Fig. 3 FAAP restrains HeLa cells attachment

HeLa cells in 60 mm dishes were transfected with 8 μ g pIRES-EGFP-FAAP or pIRES-EGFP plasmids respectively and cultured for 24 h. Then cells were disattached with 1 mmol/L EDTA and added to 96 wells plates coated with 1 mg/L various extracellular matrix, laminin, fibronectin or collagen. After cultured for 30 min or 60 min, the attachment and floating cells were counted using flow cytometry (FCM). The relative cells attachments were counted from three independent experiments. ■: EGFP⁺; □: FAAP/EGFP⁺. 1: Laminin; 2: Fibronectin; 3: Collagen. *: $P < 0.01$; **,***: $P < 0.05$, $n=3$.

3 讨 论

细胞组分分离的实验结果表明, FAAP 在细胞

中主要分布在细胞膜和细胞质中. 对于分布在细胞质中的 FAAP, 在整个离心分离实验过程中, 细胞裂解液中始终加入足够浓度的 RNase, 而 FAAP 仍能够通过离心沉降到 40% 蔗糖的底部, 说明此蛋白质经过 RNase 处理后, 仍分布在细胞质中一些沉降系数较大的颗粒或者颗粒亚单位中, 而对 RNase 不敏感.

对于分布在细胞膜上的 FAAP, 由于其对非离子型的去垢剂 Triton X-100 不敏感, 而对离子型去垢剂 RIFP 敏感, 并且可以通过改变溶液的离子强度或者 pH 值就能破坏其与细胞膜的结合. 因此推测该蛋白质可能是一种外周膜蛋白, 并且其与细胞膜的结合为与细胞膜上的一些蛋白质或者细胞膜脂分子通过离子键结合. 这与细胞膜上的微结构——膜穴系统上的一些蛋白质类似, 这些蛋白质能够抵御非离子性去垢剂的溶解作用. 细胞中这些膜穴系统主要发挥着生物合成转运、信号转导等功能^[22, 23].

LR 在许多肿瘤细胞中均发现有高表达现象, 并伴随其他细胞黏附及其相关分子, 例如整合素(interin) α 6 亚基、MMP-2(matrix metalloproteinase-2)、磷脂酶 MKP-1 和 PAC-1 等表达异常, 能破坏肿瘤细胞与细胞外基质的结合, 从而促进肿瘤细胞迁移^[14, 16, 17]. 同时 LR 还可以通过影响细胞内一些信号分子活性, 例如 LR 的高表达可以降低 JNK(c-Jun NH2-terminal protein kinase)、ERK (extracellular signal-regulated kinase) 和 p38 等的分子活性, 从而来调节细胞的黏附作用, 在肿瘤细胞黏附和转移过程中发挥着重要的作用^[15, 18~20]. 先前的报道也表明, FAAP 在某些肿瘤细胞, 例如乳腺癌细胞等表达水平较正常同类细胞高, 与 LR 表达量升高的肿瘤细胞类型基本吻合^[1, 2]. 通过筛选比较发现, FAAP 与 LR 在细胞中的表达量呈现出了正相关性, 并且与 LR 分子类似, FAAP 表达量上升也能抑制 ERK 的磷酸化水平, 影响 ERK 的活性^[7]. 因此, FAAP 类似 LR 一样也可以作为某些肿瘤细胞的标记蛋白分子, 并且 FAAP 可以通过影响 LR 的表达量来影响细胞黏附, 进一步的实验结果也表明了此推测.

67 ku LR 参与细胞外基质蛋白诱导的细胞黏附和迁移, 特别是在肿瘤细胞的生长与转移过程发挥着重要的作用^[13~17]. 细胞黏附实验结果表明, 细胞中的 FAAP 蛋白表达升高也能够有效地抑制细胞初始黏附作用, 这与细胞中 LR 表达水平升高抑制细胞黏附作用相似^[8]. 结合上述 FAAP 与 LR 表达水平的相关性, FAAP 蛋白可以通过影响 LR 蛋白表

达水平变化, 从而引起细胞中与黏附相关的蛋白质分子表达量或信号分子活性的变化, 进而影响了细胞黏附。但是, 随着细胞黏附时间的延长, FAAP 对细胞黏附的影响逐渐减弱, 这可能与 FAAP 对细胞铺展影响有关。以前的结果表明, FAAP 在细胞铺展过程中能够抑制黏着斑的运动从而抑制细胞的铺展^[7]。我们推测在细胞黏附初始阶段, 通过 LR 影响细胞黏附的分子途径来抑制细胞黏附作用, 而在随后的细胞铺展阶段, 黏附的细胞中 FAAP 又通过抑制黏着斑的运动、稳定初始黏着斑来抑制细胞的铺展, 因此, 由于 FAAP 在细胞黏附和铺展两个过程中发挥的功能不同, 形成 FAAP 对细胞黏附抑制作用随时间延长而减弱。

我们的实验结果揭示了 FAAP 主要分布在细胞膜和细胞质中, 并证实了 FAAP 与 LR 两种蛋白质分子在细胞中的表达量具有正相关性, 进一步实验结果验证了细胞中 FAAP 蛋白对细胞黏附抑制作用。结合 FAAP 在细胞的分布, LR 在细胞中表达水平变化对细胞黏附影响机制以及 LR 和 FAAP 在一些肿瘤细胞中共同高表达量现象, 我们得出 FAAP 可以通过其表达水平升高影响 LR 表达量, 进而通过 LR 影响细胞黏附的途径抑制细胞黏附的推论。

致谢 感谢 Hirokawa 教授提供 FAAP(HSPC117 蛋白)抗体。

参 考 文 献

- Miki R, Kadota K, Bono H, *et al.* Delineating developmental and metabolic pathways *in vivo* by expression profiling using the RIKEN set of 18 816 full-length enriched mouse cDNA arrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(5): 2199~2204
- Diehn M, Sherlock G, Binkley G, *et al.* SOURCE: a unified genomic resource of functional annotations, ontologies, and gene expression data. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(1): 219~223
- Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*, 2004, **43**(4): 513~525
- Rousseau S, Morrice N, Peggie M, *et al.* Inhibition of SAPK2a/p38 prevents hnRNP A0 phosphorylation by MAPKAP-K2 and its interaction with cytokine mRNAs. *Embo J*, 2002, **21**(23): 6505~6514
- Sweeney M J, Ko B C B, Chung S S M, *et al.* Protein identification by automated nanospray mass spectrometry- "zoomscan walking". *J Biomol Tech*, 2005, **13**(2): 43~48
- de Hoog C L, Foster L J, Mann M. RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers. *Cell*, 2004, **117**(5): 649~662
- Hu J S, Teng J L, Ding N Z, *et al.* FAAP, a novel murine protein, is involved in cell adhesion through regulating vinculin-paxillin association. *Frontiers in Biosciences*, 2008, **13**: 7123~7131
- Landowski T H, Dratz E A, Starkey J R. Studies of the structure of the metastasis-associated 67 kDa laminin binding protein: fatty acid acylation and evidence supporting dimerization of the 32 kDa gene product to form the mature protein. *Biochemistry*, 1995, **34**(35): 11276~11287
- Castronovo V, Claysmith A P, Barker K T, *et al.* Biosynthesis of the 67 kDa high affinity laminin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **177**(1): 177~183
- Buto S, Tagliabue E, Ardini E, *et al.* Formation of the 67 kDa laminin receptor by acylation of the precursor. *J Cell Biochem*, 1998, **69**(3): 244~251
- Rao C N, Castronovo V, Schmitt M C, *et al.* Evidence for a precursor of the high-affinity metastasis-associated murine laminin receptor. *Biochemistry*, 1989, **28**(18): 7476~7486
- Auth D, Brawerman G. A 33 kDa polypeptide with homology to the laminin receptor: component of translation machinery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(10): 4368~4372
- Chung J W, Hong S J, Kim K J, *et al.* 37 kDa laminin receptor precursor modulates cytotoxic necrotizing factor 1-mediated RhoA activation and bacterial uptake. *J Biol Chem*, 2003, **278**(19): 16857~16862
- Menard S, Castronovo V, Tagliabue E, *et al.* New insights into the metastasis-associated 67 kDa laminin receptor. *J Cell Biochem*, 1997, **67**(2): 155~165
- Chen J, Carcamo J M, Borquez-Ojeda O, *et al.* The laminin receptor modulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor complex formation and modulates its signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(24): 14000~14005
- Canfield S M, Khakoo A Y. The nonintegrin laminin binding protein (p67 LBP) is expressed on a subset of activated human T lymphocytes and, together with the integrin very late activation antigen-6, mediates avid cellular adherence to laminin. *J Immunol*, 1999, **163**(6): 3430~3440
- Menard S, Tagliabue E, Colnaghi M I. The 67 kDa laminin receptor as a prognostic factor in human cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1998, **52**(1~3): 137~145
- Givant-Horwitz V, Davidson B, Reich R. Laminin-induced signaling in tumor cells: the role of the M(r) 67 000 laminin receptor. *Cancer Res*, 2004, **64**(10): 3572~3579
- Satoh K, Narumi K, Abe T, *et al.* Diminution of 37 kDa laminin binding protein expression reduces tumour formation of murine lung cancer cells. *Br J Cancer*, 1999, **80**(8): 1115~1122
- Vande Broek I, Vanderkerken K, De Greef C, *et al.* Laminin-1-induced migration of multiple myeloma cells involves the high-affinity 67 kDa laminin receptor. *Br J Cancer*, 2001, **85**(9): 1387~1395
- Graham J M, Sandall J K. Tissue-culture cell fractionation.

- Fractionation of membranes from tissue-culture cells homogenized by glycerol-induced lysis. *Biochem J*, 1979, **182**(1): 157~164
- 22 Cerneus D P, Ueffing E, Posthuma G, *et al.* Detergent insolubility of alkaline phosphatase during biosynthetic transport and endocytosis. *J Biol Chem*, 1993, **268**(5): 3150~3155
- 23 Casey P J. Protein lipidation in cell signaling. *Science*, 1995, **268**(5208): 221~225

FAAP is Involved in Cell Attachment*

HU Jin-Song, DING Nai-Zheng, TENG Jun-Lin, CHEN Jian-Guo**

(The Key Laboratory of Cell Proliferation and Differentiation of Ministry of Education and The State Key Laboratory of Bio-membrane and Membrane Bio-engineering, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract FAAP (focal adhesion associated protein), encoded by murine *D10Wsu52e* gene, is a member of function-unknown protein family, UPF0027. These protein family homologues are conserved and ubiquitously expressed in various species, organs and cells. But the functions are quite unclear yet. Here, FAAP were demonstrated to deposited in the cytoplasmic fractions and the plasma membrane fractions by ultra-speed centrifugation. The expression levels of FAAP are significantly correlative with 67 ku Laminin receptor (LR) in HeLa cells. Moreover, FAAP, similar with LR, could effectively restrain the cultured cells attachment. Together, these results suggest the effects of FAAP on cell attachment.

Key words mouse, *D10Wsu52e* gene, FAAP, 67 ku Laminin receptor, cell attachment

*This work was supported by a grant from The Major State Basic Research Development Program of China (2003CB715900, 2006CB500700 and 2004cb720003).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62755786, E-mail: chenjk@pku.edu.cn

Received: May 11, 2008 Accepted: June 10, 2008