

RNF122 诱导细胞凋亡功能依赖于其 RING 结构域*

彭 智^{1, 3)} 吉兆宁³⁾ 石太平^{1, 2)**} 马大龙^{1, 2)}

¹⁾ 国家人类基因组北方研究中心, 北京 100176; ²⁾ 北京大学医学部基础医学院医学免疫学实验室, 北京 100191;

³⁾ 皖南医学院弋矶山医院肿瘤内科, 芜湖 241001)

摘要 人类功能基因 RNF122 能够明显抑制细胞生长, 导致细胞凋亡. RNF122 含有 RING-H2 结构域. 为了研究 RNF122 的 RING 结构域和凋亡的相互关系, 构建了 RING 结构域突变体. MTT 和凋亡实验发现, RNF122 与细胞存活的密切关系依赖于其 RING 结构域. 进一步的实验提示, RNF122 能够负向调节 ERK 通路, 而 RING 结构域突变型 RNF122 则能够增强 ERK 的磷酸化, 提示 RNF122 可能通过 ERK 通路调节细胞的存活. 总之, RING 结构域对于 RNF122 发挥功能起至关重要的作用.

关键词 RING 结构域, RNF122, 细胞凋亡, ERK 通路

学科分类号 Q987, R34

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00680

含 RING finger 结构域蛋白质最早在 1991 年被发现, 称为 RING 1 (really interesting new gene 1)^[1], 后来被命名为 RING finger^[2]. 随后大量的含 RING finger 结构域的蛋白质被发现, 其功能各异, 但是普遍被认为介导了蛋白质-蛋白质相互作用和蛋白质降解. RING 结构域大约为 70 个氨基酸大小. RING finger 结构域的普遍特征是富含半胱氨酸基序, 同锌指(Zinc finger)相似, 其共同基序是 Cys-X2-Cys-X9-39-Cys-X1-3-His-X2-3-Cys / His-X2-Cys-X4-48-Cys-X2-Cys, 其中 X 可以为任意氨基酸^[3]. 8 个半胱氨酸和组氨酸形成了结合 2 个锌原子的结合位点. C3HC4 亚类为第 4 个氨基酸也为半胱氨酸, 当第 4 个半胱氨酸被组氨酸替代后, 即 RING-H2 亚类, 还有 C4C4 亚类, 其所有的锌原子结合相关氨基酸残基均为半胱氨酸.

在人类基因组中有超过 380 个基因编码环指状蛋白质, 而在所有真核细胞中已有 1 200 个含环指状结构域基因被发现. 但在原核细胞中至今尚未发现有此类基因的存在, 可能也同原核细胞中不存在泛素化降解这一功能相关. 最初 RING 结构域的功能并不明确, 虽然已有文献提示 RING 结构域可能同蛋白质-蛋白质相互作用, 并与发育、肿瘤、凋亡和病毒复制等相关联. 1999 年含有 RING 结构域的 c-Cbl 功能被阐明, 发现 c-Cbl 介导蛋白质-

蛋白质相互作用, 与蛋白质泛素化和 26S 蛋白酶体降解途径有关^[4]. 随之又发现数种 RING 蛋白质的相似功能^[5]. 至今大量的 RING finger 蛋白质已经被证明本身具有泛素连接酶活性或作为 E3 的一部分, 并在肿瘤、信号传导、免疫调节、发育等过程中发挥着重要的作用.

RNF122 是本实验室建立的“报告基因-表型-荧光染料”筛选模型首次发现的一个影响细胞存活的基因^[6], 过表达 RNF122 能够诱导 HEK293T 细胞发生凋亡. 进一步实验提示, RNF122 广泛地表达于多种正常组织、肿瘤组织和细胞系, 亚细胞定位研究发现 RNF122 定位于内质网和高尔基体^[7]. 生物信息学分析发现 RNF122 含一个典型的 RING finger 结构域. 在 Yu 等^[8]的研究论文中报道, RNF122 在未分化甲状腺癌中表达量升高, 提示该基因与未分化甲状腺癌有关. 我们虽首次发现了

* 国家自然科学基金(30600547), 国家高技术研究发展计划(863)“十一五”重大专项“功能基因组与蛋白质组”(2006AA02A305)和国家重大新药创制专项“新药研究开发关键技术研究”(2009ZX09503-004)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-67883332, Fax: 010-67873016, E-mail: tpshi@126.com

收稿日期: 2010-12-24, 接受日期: 2011-07-08

RNF122 影响细胞存活的功能, 但是 RNF122 的真正生理功能尚未完全明确. 深入研究其结构和功能, 有助于了解 RNF122 参与凋亡调节的途径和分子机制, 为开发具有我国自主知识产权的基因工程药物奠定基础, 为某些肿瘤治疗奠定一定的理论基础并提供新的思路.

1 材料和方法

1.1 真核细胞表达质粒 RNF122C92A-myc 和 RNF122C95A-myc 的构建

使用基于 PCR 的定点突变方法构建突变型 RNF122, 其突变位点分别位于 RNF122 第 92 和第 95 位氨基酸, 为 RING finger 结构域的第一和第二个半胱氨酸. 所使用引物分别为 P1: 5' CCG CTC GAG ATG CAC CCA TTC CAG TGG TG, P2: 5' CGC GGA TCC GGC ACC AGC TCA TCC AAT AGA AT, P3: 5' AG ACC GCC GCA GTC TGT, P4: 5' ACA GAC TGC GGC GGT CT, P5: 5' A GTC GCT CTG GAA GAC TT 和 P6: 5' AA GTC TTC CAG AGC GAC T. 方框标记为引入的突变位点. RNF122C92A-myc 以 RNF122-myc(国家人类基因组北方研究中心功三实验室克隆构建)为模板, 先用 P1 和 P4 为引物扩增, 再用 P3 和 P2 为引物扩增, 回收二者产物混合; 以此为模板, 用 P1 和 P2 为引物进行扩增回收纯化, 使用 *Xho* I 和 *Bam*H I 酶切回收产物和 pcDB 载体并纯化, 然后用 T4 连接酶连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , PCR 筛选阳性克隆, 并进行测序验证. RNF122C95A-myc 同上述方法, 用引物 P5 和 P6 替换 P3 和 P4.

1.2 细胞培养与瞬时转染

SV40 T 抗原转化 HEK293 所得细胞系 HEK293T 为 Dr. Tadashi Matsuda 馈赠. HEK293T 细胞培养使用 10% FCS/DMEM(4.5 g/L 葡萄糖, 4 mmol/L L-谷氨酸)置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中传代培养. 用 0.25% 胰酶+EDTA 消化细胞, 每 2 天传代一次, 维持细胞指数生长. HEK293T 细胞在转染前一天以 1.5 \times 10⁵ 个/ml 的密度接种于 6 孔细胞培养板中, 用 vigorous 转染试剂进行转染, 在相应的时间点收获细胞, 进行相应的处理.

1.3 MTT 法绘制细胞的生长曲线

按照 1 000 个/孔的密度接种细胞于 96 孔板中, 每种细胞设 6 个平行复孔, 连续培养 6 天. 每 24 h 加入 5 mmol/L MTT(Promega 公司, 美国)

10 μ l, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育 4~6 h 后, 加入细胞裂解液(Solubilization/Stop solution) 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后利用 Model 550 Microplate Reader 于 570 nm 测量吸光度值, 记录不同组、各时间点结果, 并用 Excel 软件绘制细胞的生长曲线.

1.4 细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻分析

采用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(宝赛生物技术有限公司, 中国)检测细胞凋亡. 目的基因转染 24 h 后, 分别取 5 \times 10⁵ 个 HEK293T 和 HeLa 细胞, 胰酶消化并用 PBS 洗 2 遍. 细胞用 200 μ l 结合缓冲液重悬, 加入 Annexin V-FITC 标记外翻的磷脂酰丝氨酸(终浓度为 0.5 mg/L), PI 标记细胞核(终浓度为 1 mg/L), 室温下避光孵育 20 min 后加入 400 μ l 结合缓冲液, 立即使用 FACS Calibur 流式细胞仪(BD 公司, 美国)检测. 用 FL1 通道(激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm)检测 Annexin V-FITC 荧光信号, 用 FL2 通道(>600 nm 滤镜)检测 PI 荧光信号. Annexin V-FITC 和 PI 双染能将样品中的坏死和晚期凋亡细胞(Annexin V+, PI+)与早期凋亡细胞(Annexin V+, PI-)区分开来.

1.5 细胞总蛋白提取

以下操作均在冰上或 4 $^{\circ}$ C 进行, 所有液体预先致冷. 收集细胞, 用 PBS 洗细胞 2 次, 并转移入 EP 管, 离心弃尽上清; 将细胞重悬于细胞裂解液(20 mmol/L Tris-HCl、pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1% Triton X-100, 蛋白酶抑制剂 Cocktail), 冰浴 30 min; 18 000 g 离心 10 min, 收集上清, 即为细胞总蛋白. 用 BCA protein assay kit(Vigorous 公司, 北京)进行蛋白质含量的测定.

1.6 Western blot 检测

取等量提取的细胞蛋白, 进行 12% SDS-PAGE, 再电转(恒压 100V, 120 min)至硝酸纤维膜上. 用 TBST(TBS+0.1% Tween-20)配制的 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 再加入一抗, 4 $^{\circ}$ C 反应过夜. 用 TBST 充分洗膜 3~5 次, 每次 10 min. 然后加入相应的 HRP 标记的二抗(1:5 000), 室温避光反应 1 h. 再用 TBST 充分洗膜 3 次, 每次 10 min. 使用 ECL 发光试剂盒, 发光后 X-胶片曝光, 显影定影后分析蛋白质条带. 抗 EGFR 抗体、抗 ERK 和磷酸化 ERK 抗体购自美国 Cell Signaling 公司, 抗 β -actin 抗体购自 Sigma 公司. 表皮生长因子购自美国 Peprotech 公司.

2 结 果

2.1 细胞生长曲线

转染了突变型 RNF122 的细胞中, 显微镜下观察其细胞状态明显好于野生型 RNF122. 为了准确定量观察突变型和野生型 RNF122 对细胞存活的影响, 我们使用 MTT 方法检测了突变型及野生型 RNF122 对于细胞生长的影响. 结果如图 1 所示, 相比空载体对照 pcDB, RNF122 明显抑制细胞的生长, 而突变型 RNF122 则不再抑制细胞的生长.

2.2 RING finger 结构域对 RNF122 诱导细胞凋亡的影响

我们进一步研究了 RING finger 结构域对于 RNF122 分子诱导细胞凋亡的影响. 在 293T 细胞中, 通过流式细胞术分析 PS 外翻结果表明, 突变

型 RNF122 分子转染后没有诱导细胞凋亡(图 2), 统计结果如图 3 所示. 这些功能实验的结果显示 RING finger 结构域对于 RNF122 分子在细胞内功能的发挥起着关键作用.

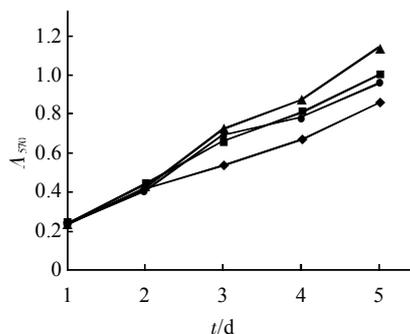


Fig. 1 Cell growth curve using MTT

◆◆ : RNF122; ■■ : pcDB; ▲▲ : RNF122C92A; ●● : RNF122C95A.

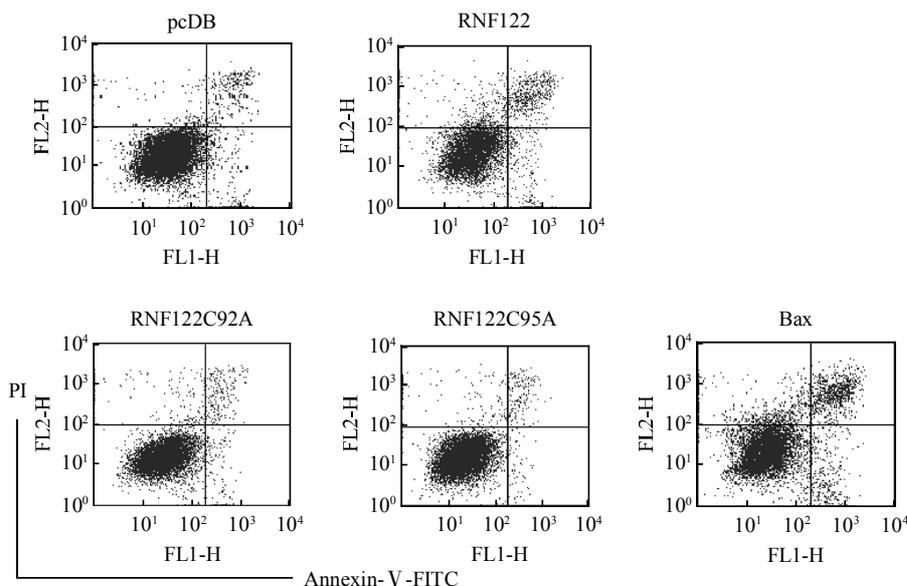


Fig. 2 Annexin-V/PI staining analysis using FACS

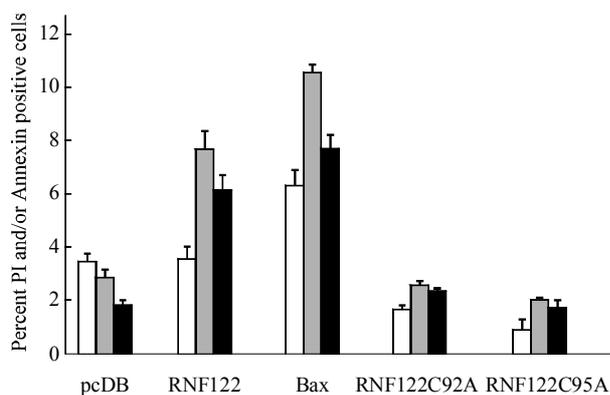


Fig. 3 Graphical representation of 2-color flow analyses

□ : Early apoptosis; ■ : Late apoptosis/Necrosis; ■ : Necrosis.

2.3 RNF122 抑制 ERK 通路的活化

为了明确 RNF122 的作用通路, 我们通过免疫印迹分析实验验证 RNF122 调节的细胞通路. 用 pcDB、RNF122、RNF122C92A、RNF122C95A 转染 HEK293T, 转染后 24 h, 提取细胞总蛋白进行 Western blot 分析 pERK、ERK 的表达量. 如图 4 显示, 用抗磷酸化 ERK 抗体和抗非磷酸化 ERK 抗体检测, 与 pcDB 组比较, RNF122 组磷酸化 ERK 的水平明显降低, 而转染两个突变型 RNF122 组则能够明显提高了 ERK 的磷酸化. 以上结果证实, RNF122 有可能抑制 ERK 磷酸化参与调控了 ERK MAPK 通路.

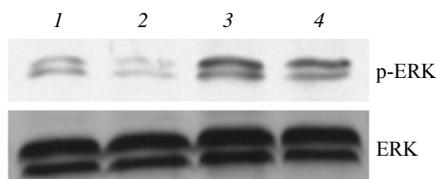


Fig. 4 Western blot analysis of ERK phosphorylation

1: pcDB; 2: RNF122; 3: RNF122-C92A; 4: RNF122-C95A.

2.4 RNF122 对 EGF 刺激产生信号的影响

用 EGF 刺激 pcDB、RNF122、RNF122C92A、RNF122C95A 转染的 HEK293T 细胞, 在刺激的不同时间观察 EGFR 表达量的变化, 结果如图 5 所示, 表明在 EGF 的作用下, 突变型 RNF122 能够明显增强 EGF 刺激 5 min 后 EGFR 的量. 我们还同时观察了在 EGF 刺激不同时间 ERK 磷酸化的情况. 与 pcDB 转染组相比, 在突变型 RNF122 转染的细胞, ERK 磷酸化的程度在 EGF 刺激时间为 5 min 时明显增高. 以上结果表明, RNF122 的表达对 EGFR 介导的信号可能具有调节作用.

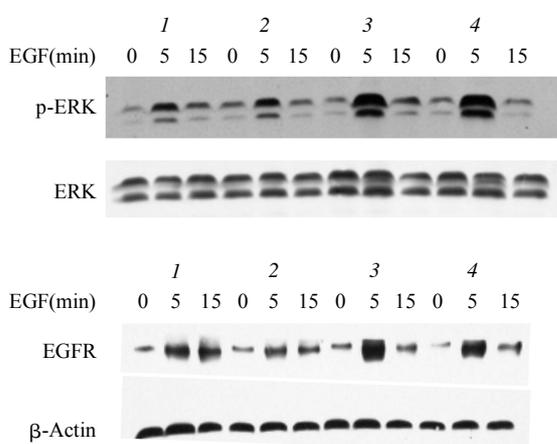


Fig. 5 ERK phosphorylation and EGFR analysis under EGF stimulation

1: pcDB; 2: RNF122; 3: RNF122-C92A; 4: RNF122-C95A.

3 讨 论

国家人类基因组北方研究中心功三实验室通过建立的“报告基因 - 表型 - 荧光染料”筛选体系, 对克隆的近 500 个人类新基因开放读码框进行细胞存活相关基因的筛选. 通过该方法发现人的新基因 RNF122 可以明显抑制细胞生长, 导致细胞凋亡^[6].

RNA 印迹结果和 RT-PCR 结果表明 RNF122 广泛表达. 激光共聚焦显微镜观察结果显示, 人 RNF122 定位于高尔基体和内质网上^[7]. RNF122 含有 RING-H2 结构域. RING 结构域被认为介导了蛋白质 - 蛋白质相互作用, 在体内发挥重要的生理作用. 最近我们的结果也证实 RNF122 是一个新的泛素连接酶, 并以 RING finger 和蛋白酶体依赖的方式促进自身的降解^[9].

本研究进一步探讨 RNF122 诱导细胞凋亡与 RING 结构域的相互关系. RING 结构域的半胱氨酸对其稳定性非常关键, 我们通过定点突变分别将第 92 位和第 95 位半胱氨酸突变为丙氨酸, 破坏 RNF122 的 RING 结构域, 构建了 RNF122 的 RING 结构域突变体 RNF122C92A 和 RNF122C95A. 通过生长曲线提示突变型 RNF122 不再抑制 HEK293T 细胞的生长. 进一步使用流式细胞仪检测野生型和突变型 RNF122 诱导细胞凋亡的能力, 结果显示 RING 结构域突变型 RNF122 不再诱导 HEK293T 细胞发生凋亡. 该结果提示 RING 结构域对 RNF122 诱导 HEK293T 细胞发生凋亡具有重要的作用.

为了明确 RNF122 诱导凋亡发生的通路, 我们使用 Western blot 发现, RNF122 能够抑制 ERK 的磷酸化, 而突变型 RNF122 则相反, 能够增强 ERK 的磷酸化. ERK 信号传导通路是目前研究得最为深入的 MAPK 通路. ERK 信号通路广泛存在, 在不同条件下被多种配体和细胞外界刺激所激活, 具有细胞种类特异性^[10]. 如在成纤维细胞中, 可被血清、生长因子、细胞因子、某些应激、G 蛋白偶联受体(GPCR)的配体和转化物质等激活. 表皮生长因子(EGF)可以结合表皮生长因子受体(EGFR), 激活酪氨酸激酶, 从而激活 ERK 信号通路. 我们进一步使用 EGF 处理细胞, 发现在 EGF 的作用下, 突变型 RNF122 的 ERK 磷酸化和 EGFR 的量明显增强. 这些结果均提示 RNF122 可能通过抑制 ERK 的磷酸化从而诱导了细胞的凋亡. 一般认为 EGFR 信号灭活过程主要有内化与降解两部分, 内化的 EGFR 可以转移到内质网、线粒体或细胞核调控基因表达^[11]. 我们的结果提示, RNF122 作为定位于内质网和高尔基体的 E3 泛素连接酶, 可能结合于内化的 EGFR 使其进一步泛素化而降解, 并终止下游信号转导过程, 包括 Ras/Raf/MEK/ERK/MAPK 通路, 从而通过抑制 ERK 磷酸化和活化并诱导细胞凋亡. 但 RNF122 的底物以及具体的作用

分子机制尚有待进一步的研究明确。

总结全文, RNF122 的 RING 结构域对其诱导凋亡至关重要。RNF122 负向调节 ERK 通路, 而突变型 RNF122 则能够增强 ERK 磷酸化。我们推测 RNF122 诱导凋亡可能同 ERK 通路相关。因此, RING 结构域对于 RNF122 发挥功能起到了非常重要的作用。这将为进一步研究探讨 RNF122 的生理功能奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Freemont P S, Hanson I M, Trowsdale J. A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell*, 1991, **64**(3): 483-484
- [2] Lovering R, Hanson I M, Borden K L, *et al.* Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**(6): 2112-2116
- [3] Borden K L, Freemont P S. The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr Opin Struct Biol*, 1996, **6**(3): 395-401
- [4] Joazeiro C A, Wing S S, Huang H, *et al.* The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science*, 1999, **286**(5438): 309-312
- [5] Lorick K L, Jensen J P, Fang S, *et al.* RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(20): 11364-11369
- [6] Wang L, Gao X, Gao P, *et al.* Cell-based screening and validation of human novel genes associated with cell viability. *J Biomol Screen*, 2006, **11**(4): 369-376
- [7] 汪立, 石太平, 王露, 等. 人类新基因 RNF122 克隆、表达和亚细胞定位. *北京大学学报(医学版)*, 2006, **38**(3): 239-243
Wang L, Shi T P, Wang L, *et al.* *J Peking University (Health Sciences)*, 2006, **38**(3): 239-243
- [8] Yu W, Imoto I, Inoue J, *et al.* A novel amplification target, DUSP26, promotes anaplastic thyroid cancer cell growth by inhibiting p38 MAPK activity. *Oncogene*, 2007, **26**(8): 1178-1187
- [9] Peng Z, Shi T, Ma D. RNF122: A novel ubiquitin ligase associated with calcium-modulating cyclophilin ligand. *BMC Cell Biol*, 2010, **11**: 41
- [10] Qi M, Elion E A. MAP kinase pathways. *J Cell Sci*, 2005, **118**(Pt 16): 3569-3572
- [11] Sebastian S, Settleman J, Reshkin S J, *et al.* The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover. *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1766**(1): 120-139

RNF122 Induces Cell Apoptosis Dependent on Its RING Domain*

PENG Zhi^{1,3}, JI Zhao-Ning^{1,3}, SHI Tai-Ping^{1,2**}, MA Da-Long^{1,2}

¹ Chinese National Human Genome Center, Beijing 100176, China;

² Laboratory of Medical Immunology, School of Basic Medical Science, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China;

³ Department of Medical Oncology, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241001, China)

Abstract RNF122 is a novel gene which can inhibit cellular growth and induce apoptosis. RNF122 contains a RING-H2 domain. RING domain mutant was constructed to explore the relationship between RING domain and apoptosis. MTT and apoptosis experiments revealed that RNF122 closely related to cell viability dependent on its RING domain. Further exploration implied that RNF122 can negatively regulate ERK pathway, whereas RING domain mutant RNF122 can enhance the phosphorylation of ERK. It can be concluded that RNF122 may regulate cellular viability through ERK pathway. In short, RING domain is critical to the function of RNF122.

Key words RING domain, RNF122, cell apoptosis, ERK pathway

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00680

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30600547), High-Tech Research and Development Program of China (2006AA02A305), and The Key National S&T Program-"Major New Drug Development" (2009ZX09503-004).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-67883332, Fax: 86-10-67873016, E-mail: tpshi@126.com

Received: December 24, 2010 Accepted: July 8, 2011