

泛素连接酶 Smurf1 不同亚型的功能研究*

汪 呈¹⁾ 黄思斯²⁾ 路 丽³⁾ 顾永清^{1, 4)**} 张令强^{4)**}

⁽¹⁾ 石河子大学医学院, 石河子 832000; ⁽²⁾ 中南大学生命科学学院, 长沙 410083; ⁽³⁾ 北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京 100124;

⁽⁴⁾ 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要 Smad 泛素调节因子 1(Smad ubiquitination regulatory factor 1, Smurf1)是一种 HECT 类的泛素连接酶, 它参与许多生命活动的调节, 如神经发育、细胞极性、骨的重塑和肿瘤形成等。虽然目前对 Smurf1 的了解较为深入, 但在研究过程中并未对它的两种亚型 Smurf1 L 和 Smurf1 S(两者在一级结构上仅相差 26 个氨基酸残基)进行详细区分, 且偏重于对 Smurf1 S 的研究。因此本文对 Smurf1 上述两种亚型的功能(特别是 Smurf1 L)进行了更加深入的探索。利用 RT-PCR、免疫荧光和蛋白质印迹(Western blot)等实验技术, 我们从组织表达、亚细胞定位和对底物的降解能力这三个方面深入研究了 Smurf1 S 和 Smurf1 L 的不同之处。实验结果表明: 一方面, Smurf1 S 的组织分布比 Smurf1 L 更加广泛, 表达量更高; 另一方面, 两者的亚细胞定位也有所不同, Smurf1 L 在有丝分裂期定位于纺锤体, 而 Smurf1 S 则可能主要分布于胞质中。此外, Smurf1 S 对底物的降解比 Smurf1 L 更彻底, 且前者的降解效应有剂量依赖性。上述成果对今后更为精确地研究 Smurf1 的功能具有重要意义。

关键词 泛素连接酶, Smurf1 S, Smurf1 L, 组织表达, 亚细胞定位

学科分类号 Q55

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0035

众所周知, 蛋白质是各种生命活动中必不可少的一种生物大分子, 而且在许多细胞活动中发挥着关键作用。因此它在体内的活性与丰度都受到严密的调控, 以保证机体的正常运行。例如蛋白质的合成、运输及降解等一系列变化都处于动态平衡之中。值得关注的是, 与蛋白质合成相比, 虽然人们对蛋白质降解的研究较晚, 但对其研究成果却毫不逊色。蛋白质的降解曾长期被认为是一个自发的过程, 且该过程发生于细胞内含有各种蛋白酶的溶酶体中。然而, 直到泛素化修饰和蛋白酶体被发现之后, 这种单一的认识才得以改变^[1]。蛋白质的降解包括溶酶体降解和蛋白酶体降解这两大途径。我们所关注的是泛素-蛋白酶体降解途径, 是由以色列的 Ciechanover 和 Herskho 以及美国的 Irwin Rose 等提出的^[2-4], 它表明细胞中蛋白质的降解是一个特异、主动与耗能的过程。在泛素化修饰的过程中, 一个或多个泛素通过泛素激活酶、泛素结合酶及泛素连接酶而被循序传递并标记到靶蛋白中特异的赖氨酸残基上^[5-7]。最后, 被泛素化的靶蛋白在

蛋白酶体被降解。

在蛋白酶体降解途径中, 泛素连接酶(E3)的作用十分关键。目前已知的 E3 可达数百种, 它们对底物的选择具有特异性, 主要分为 RING 和 HECT 两大类型。而本文所研究的 Smurf1 则是一个 HECT 类的 E3, 它属于 Nedd4 家族。大体来说, Smurf1 的功能十分广泛, 它参与调节神经发育、骨的重塑、免疫反应及肿瘤形成等多种生命活动。从结构上来看, Smurf1 是由 N 端的 1 个 C2 结构域, 中间的 2 个 WW 结构域和 Linker 区域以及 C 端的 HECT 结构域所组成。其中 C2 结构域和它的质膜定位有关, WW 结构域参与它跟底物的结合, 而 HECT 结构域则是催化合成泛素链的区域。另

* 国家自然科学基金(30960093, 31160183, 31470827)和国家杰出青年科学基金(31125010)资助项目。

** 通讯联系人。

顾永清. Tel: 18210295366, E-mail: yqgu96@163.com

张令强. Tel: 18611681275, E-mail: zhanglq@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2015-01-30, 接受日期: 2015-04-21

外, Smurf1 还包括两种不同长度的亚型, 即 Smurf1 L 和 Smurf1 S, 其中前者比后者在 WW 结构域之间的 Linker 区域中多 26 个氨基酸残基。然而, 除了上述结构方面区别之外, 目前关于 Smurf1 L 和 Smurf1 S 在其他方面究竟还有何不同之处仍不十分清楚。为了能够更深入地认识上述两种亚型的差别, 本研究主要从组织表达、亚细胞定位以及对底物的降解这三个方面揭示了它们的区别并对其生物学意义进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

Flag-Smurf1-S WT、Flag-Smurf1-S CA、Flag-Smurf1-L WT、Flag-Smurf1-L CA 和 Myc-Smad1 等质粒均为本实验室提供。大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 购自天根公司。

1.2 酶与主要生化试剂

Flag 和 Myc 单克隆抗体分别购自 Sigma 和 MBL 公司; DL-2000 DNA 分子质量标准(marker)、DL-5000 DNA marker、dNTP、Pyrobest DNA Polymerase 酶、限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司; 反转录试剂盒购自 Toyobo 公司; Lipofectamine2000、DAPI 核染色试剂、TRIZOL 试剂和 Sytox 均购自 Invitrogen 公司; FITC 标记的羊抗鼠和 PE 标记羊抗兔荧光二抗购自中杉金桥公司; Western blotting 显色试剂盒购自 Pierce 公司; 胎牛血清、DMEM 及胰酶购自 Hyclone 公司。

1.3 主要细胞类型及引物

HEK293T 人胚肾 T 细胞、MCF7 人乳腺癌细胞、H1299 肺小细胞癌细胞以及 HeLa 人宫颈癌细胞等均为军事医学科学院二所十室保存。cDNA 文库扩增引物: Smurf1 上游引物为 5' GAACAAAG-AACAACAGTCCA 3', Smurf1 下游引物为 5' TT-GTAGATCATAATAACCGA 3'。

1.4 RT-PCR 检测

先取出培养好的细胞, 然后用 Trizol 试剂提取总 RNA, 最后依据反转录试剂盒说明书进行 RT-PCR 检测。主要步骤如下: 先在 65 $^{\circ}\text{C}$, 5 min 的条件下将 RNA 热变性后立即置于冰上; 接着进行逆转录反应: 42 $^{\circ}\text{C}$, 20 min; 99 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 min。然后进行 PCR 扩增: 94 $^{\circ}\text{C}$, 2min; (98 $^{\circ}\text{C}$, 10 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 2 s; 74 $^{\circ}\text{C}$, 30 s) $\times$ 30 循环; 72 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 最后将产物经 1%琼脂糖凝胶电泳

后, 于紫外灯下观察并拍照记录。

1.5 间接免疫荧光检测

从细胞培养箱中取出培养板, 吸弃培养液, 用预冷 PBS 洗涤细胞 3 次。依次采用 2%和 4%多聚甲醛分别室温固定 5min, 用 PBST 洗涤 3 次后加入 0.1%~0.3%Triton-PBS 室温渗透 10 min。再用 PBST 洗涤 3 次, 加入 PBST-BSA 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 45 min。移除封闭液, 加入一抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。再用 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 静置即可。避光操作加入 FITC 或 PE 标记二抗, 室温孵育 40 min, 避光操作 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。最后 DAPI 染核, 室温下 10 min 即可观察结果。

1.6 细胞转染

细胞传代至培养板中, 使细胞密度达到约 80%。在无菌 Ep 管中先加入适量目的质粒, 再加入 80 μl 无血清培养基, 充分混匀。在另一无菌 EP 管中加入适量的 Lipofectamine2000 试剂和 80 μl 无血清培养基, 混匀并孵育 5 min。再将上述两种溶液混合, 吹打混匀, 孵育 15 min。最后将混匀后的溶液加入细胞培养板中, 放入含 5% CO_2 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 48 h 即可。

1.7 Western blot 检测

从细胞培养箱中取出培养板收集并裂解细胞, 5 000 r/min 离心 5 min 后制备蛋白样品。将样品经 12% SDS-PAGE 分离后转印到 NC 膜上, 用 5%脱脂牛奶封闭 30 min, 孵育加一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜(或常温下 3 h)后用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 室温下孵育加二抗 40 min, 再用 TBST 洗涤 3 次。最后用 ECL 化学发光检测试剂盒检测蛋白质条带并分析结果。

2 结 果

2.1 抗体的制备与检验

选取 Smurf1 L 比 Smurf1 S 多出的 26 个氨基酸(图 1a)中的 17 个氨基酸(SPSGTIPGGDAAFLY-EF)作为抗原合成多肽, 通过纯化与抗原免疫等步骤, 得到了仅识别 Smurf1 L 但不识别 Smurf1 S 的多克隆抗体。为了检测定制的抗体是否可以特异性识别 Smurf1 L, 我们在细胞中分别转染了带 Flag 标签的 Smurf1 L 和 Smurf1 S, 再用制备的 Smurf1 L 抗体和可识别 Smurf1 两种亚型的抗体分别进行检测(图 1b)。实验结果证明我们制备的多克隆抗体能够特异性识别 Smurf1 L。

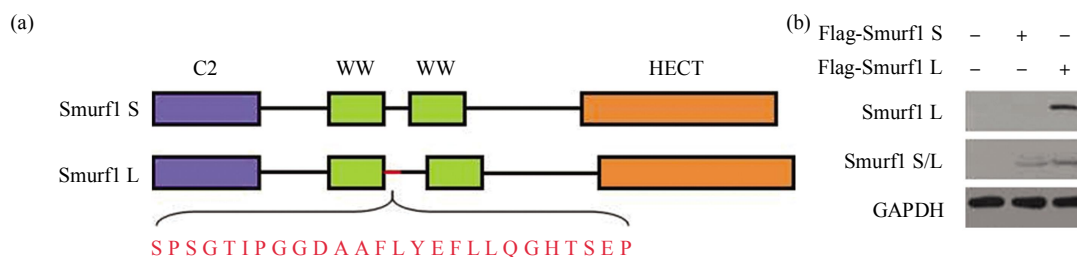


Fig. 1 Antibody preparation of Smurf1 L

(a) The structure of Smurf1 S and Smurf1 L. (b) HEK293T cells were transfected with a constant amount of Flag-Smurf1 S and Flag-Smurf1 L. After 24 h, Aliquots of total lysates were immunoblotted by anti-Smurf1 L antibody and anti-Smurf1 antibody.

2.2 Smurf1 L 和 Smurf1 S 在不同组织和细胞中的表达

首先, 我们设计了可以扩增出包含 Smurf1 L 中 26 个氨基酸(图 1a)的上下游引物. 当组织中含有 Smurf1 S 时, 可扩增出 122 bp 大小的产物, 而含有 Smurf1 L 时, 则可扩增出 200 bp 大小的产物, 经测序确认扩增出的 2 个片段分别为 Smurf1 S 和 Smurf1 L 的目的片段. 然后利用商品化的 cDNA 文库检测了 2 种不同 Smurf1 在人体不同组织的表达. 结果表明: 在成人组织中, 一方面, Smurf1 L 在心, 脾, 脑, 肝和肠中的表达量极少,

而 Smurf1 S 在上述器官中却呈现高表达, 另一方面, 在肾组织中, Smurf1 L 的表达量明显高于 Smurf1 S 的表达量. 但两者在其他器官中的表达量无显著性差异(图 2a). 在人胚组织中, Smurf1 L 在肾、脑、肝、肠和卵巢中的表达量极少, 而 Smurf1 S 在上述器官中亦呈高表达, 但在其他器官中两者的表达量也无明显差异(图 2b). 另外, 我们还在 H1299、HEK293T 和 MCF7 等多种细胞系中检测了 Smurf1 两种亚型的表达情况, 发现 Smurf1 L 的表达量均显著高于 Smurf1 S(图 2c).

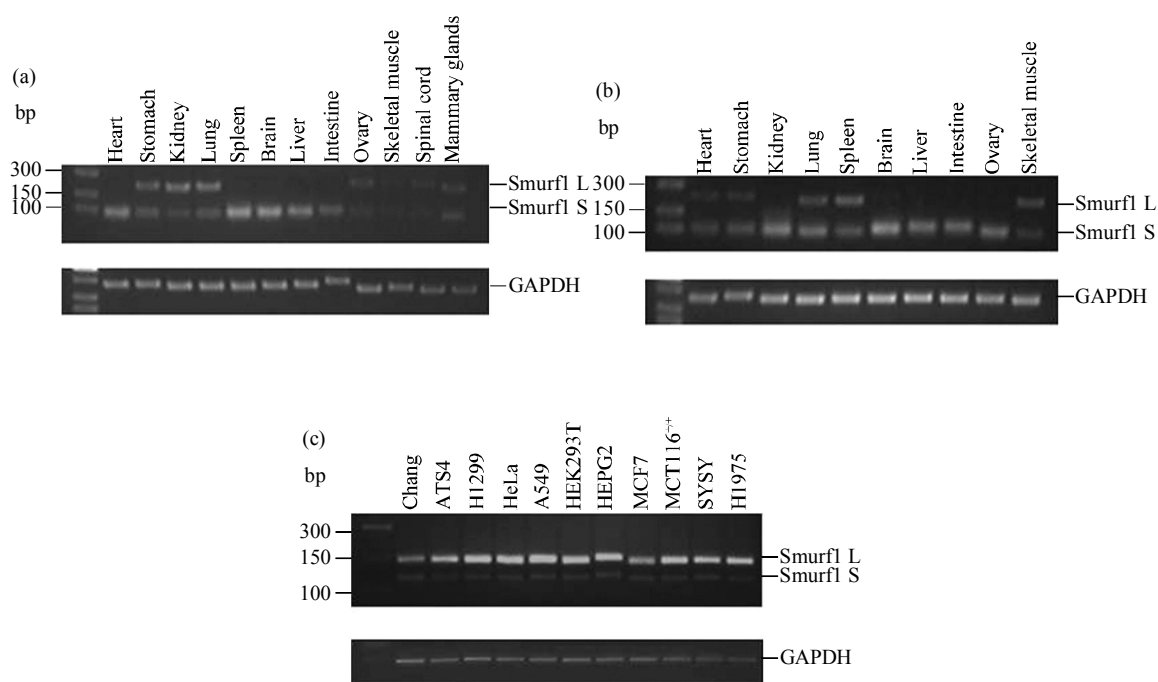


Fig. 2 The expression of Smurf1 L and Smurf1 S have obvious difference

(a) Smurf1 is detected by PCR from 12 human adult tissues cDNA libraries, the objective gene fragment contains Smurf1 L and Smurf1 S. (b) Smurf1 is detected by PCR from 9 human fetal tissues cDNA libraries, and the objective gene fragment contains Smurf1 L and Smurf1 S. (c) Smurf1 L and Smurf1 S are detected by RT-PCR from 11 cell lines. All of the above data were confirmed in triplicate.

2.3 Smurf1 L 在有丝分裂期及不同细胞中的定位

在前期工作中, 我们发现 Smurf1 L 在细胞分裂期时明显高表达, 故利用免疫荧光检测了 Smurf1 L 和 Smurf1 S/L 在 H1299 细胞有丝分裂时的亚细胞定位. 实验结果显示: 在有丝分裂的前、中、后和末期, Smurf1-L 分别主要分布于细胞核、纺锤丝、中体和中心粒上, 提示 Smurf1 L 在有丝分裂期主要定位于纺锤体. 另外, Smurf1 S/L 在有

丝分裂的各个时期均广泛分布于胞浆中 (图 3a). 此外, 我们还在不同细胞系的细胞间期同时检测了 Smurf1 S/L 和 Smurf1 L 的分布情况, 免疫荧光显示出 Smurf1 S/L 在这几种细胞的胞质和胞核中普遍分布, 但胞核中稍多; 而 Smurf1 L 在 HCT116^{+/+} 和 SY5Y 细胞中主要分布于胞质, 但在 H1299 细胞的胞质与胞核中均匀分布 (图 3b).

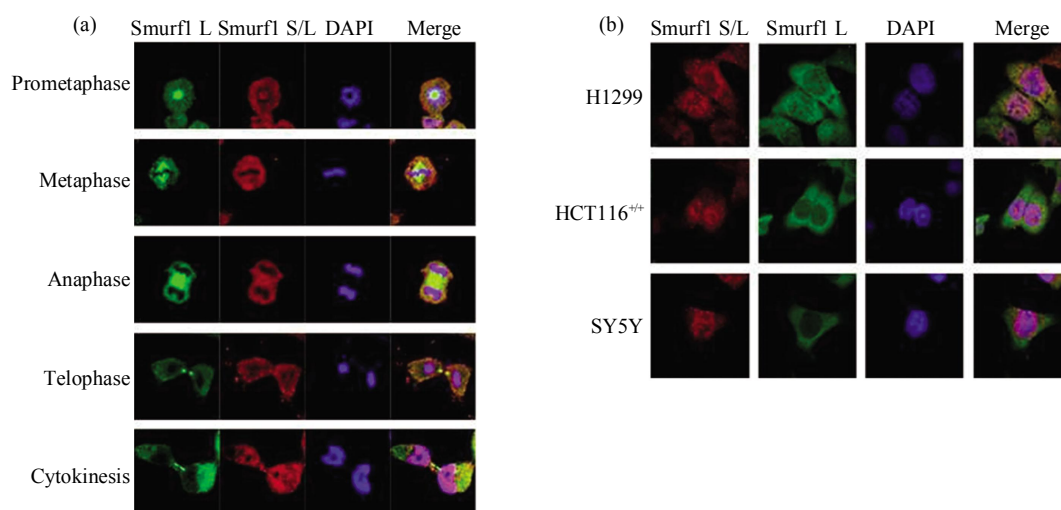


Fig. 3 Smurf1 L located at spindles and is closely related with cell cycle

(a) The subcellular localization of Smurf1 L and Smurf1 S/L by IIF, which were expressed in H1299 cells. Cell were in the mitotic phase. Green is Smurf1 L and red is Smurf1 S/L. (b) Using IIF to analysis the subcellular localization of Smurf1 S/L and Smurf1 L, which were expressed in H1299, HCT116 and SY5Y. Green is Smurf1 L and red is Smurf1 S/L.

2.4 Smurf1 S 与 Smurf1 L 在降解底物方面的差异

为了研究 Smurf1 S 与 Smurf1 L 对底物的降解能力, 我们先选择了 Smurf1 的经典底物 Smad1, 并在 H1299 和 HEK293T 两种细胞中分别检测了相关蛋白表达量的变化. 实验结果表明: 随着 Smurf1 S 表达量的梯度升高, Smad1 的蛋白质水平逐渐下调, 但随着 Smurf1 L 表达量的升高, Smad1 的蛋白质水平却呈现出先下降后上升的表现 (图 4a, b). 此外, 由于 Smurf1 存在自身泛素化降解的现象, 因此我们还利用相关的突变体在 HEK293T 细胞中对 Smurf1 L 和 Smurf1 S 的自身降解能力进行了检测. 结果表明: Smurf1 S 对上述两种亚型的突变体均有降解作用, 且呈剂量依赖性; 但 Smurf1 L 却对上述突变体均无降解作用 (图 4c, d).

3 讨 论

泛素化介导的蛋白质降解在生命活动中具有重要作用, 参与调控绝大部分细胞内的生物学过程. 泛素连接酶 Smurf1 是 Nedd4 家族的成员之一. 由于它的两种亚型 Smurf1 L 和 Smurf1 S 只相差 26 个氨基酸, 因此两者并无明显的分子质量差别. 然而在 Smurf1 研究中使用的抗体一般对它们都可识别, 且在研究时使用的外源质粒大都是 Smurf1 S, 故而对 Smurf1 L 的研究甚少. 随着人们对 Smurf1 的认识越来越深入, 我们认为深入研究 Smurf1 不同亚型的差别也是十分重要的.

实验中我们利用商品化的 cDNA 文库得到了 Smurf1 L/S 的组织表达谱, 结果表明, Smurf1 L/S

断 Smurf1 L 可能与细胞周期相关, 却并未做更进一步的研究。尽管有些许遗憾, 但我们的实验依然揭示了 Smurf1 S 和 Smurf1 L 在组织表达、亚细胞定位和底物降解等方面都有较为明显的区别。这对于以后更深入地研究 Smurf1 的功能奠定了良好的基础。

参 考 文 献

- [1] Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Exp Biol Med*, 2006, **231** (7): 1197-1211
- [2] Hershko A, Ciechanover A, Heller H, *et al.* Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77**(4): 1783-1786
- [3] Hershko A, Tomkins G M. Studies on the degradation of tyrosine aminotransferase in hepatoma cells in culture. Influence of the composition of the medium and adenosine triphosphate dependence. *J Biol Chem*, 1971, **246**(3):710-714
- [4] Ciechanover A, Hod Y, Hershko A. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1978, **81** (4): 1100-1105
- [5] Schulman B A, Harper J W. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, **10**(5): 319-331
- [6] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 1998, **67**: 425-479
- [7] Metzger M B, Hristova V A, Weissman A M. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci*, 2012, **125**(3): 531-537
- [8] Nie J, Liu L, Wu M, *et al.* HECT ubiquitin ligase Smurf1 targets the tumor suppressor ING2 for ubiquitination and degradation. *FEBS Lett*, 2010, **584**(14): 3005-3012
- [9] Osmundson E C, Dipankar R, Moore F E, *et al.* The HECT E3 ligase Smurf2 is required for Mad2-dependent spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol*, 2008, **183**(2): 267-277
- [10] Rotin D, Kumar S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, **10**(6): 398-409
- [11] Andrew C P, LIN Hong, Wrana, J L, *et al.* Coupling of tandem Smad ubiquitination regulatory factor (Smurf) WW domains modulates target specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(43): 18404-18409

The Function Research on Different Isoforms of Smurf1*

WANG Cheng¹⁾, HUANG Si-Si²⁾, LU Li³⁾, GU Yong-Qing^{1,4)**}, ZHANG Ling-Qiang^{4)**}

¹⁾ Medical College of Shihezi University, Shihezi 832000, China; ²⁾ School of Life Sciences, Central South University, Changsha 410083, China;

³⁾ College of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China;

⁴⁾ Institute of Radiation Medicines, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract Smad ubiquitination regulatory factor 1 (Smurf1) is an HECT type E3 ligase and regulating a lot of life activity, such as nervous development, cell polarization, bone remodeling and tumor formation, *etc.* At present, it is in-deep that our knowledge about Smurf1, but people did not particularly distinguish its isoform Smurf1 L and Smurf1 S (the former have 26 amino acid more than the latter) in previous study, and most of related work tend to Smurf1 S. So this article provided some information about the function of Smurf1 L and Smurf1 S. By means of RT-PCR, immunofluorescence assay and Western blot, we studied the difference of Smurf1 L and Smurf1 S in some aspects, including tissue expression, subcellular localization and substrate degradation. The result suggested that: on the one hand, not only the tissue distribution of Smurf1 S is more widespread than Smurf1 L, but also its expression level is higher than Smurf1 L; on the other hand, their subcellular localization have also obvious distinction. Smurf1 L exist at spindles in mitotic phase, but Smurf1 S perhaps exist in cytoplasm. In addition, the degradation ability to substrate of Smurf1 S is stronger than Smurf1 L, and have dose-dependent. In short, these achievement have important significance for more precise research to Smurf1.

Key words ubiquitin protein ligase, Smurf1 S, Smurf1 L, tissue expression, subcellular localization

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0035

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30960093, 31160183, 31470827), and The National Science Fund for Distinguished Young Scholars (31125010).

**Corresponding author.

GU Yong-Qing Tel: 18210295366, E-mail: yqgu96@163.com

ZHANG Ling-Qiang Tel: 18611681275, E-mail: zhanglq@nic.bmi.ac.cn

Received: January 30, 2015 Accepted: April 21, 2015