

细胞核内蛋白质动态变化研究进展

王爱侠 陈 杰 刘红林*

(南京农业大学动物科技学院, 南京 210095)

摘要 漂白后荧光恢复和漂白荧光丢失技术是蛋白质动态变化研究中常用的两项技术。近年来, 利用这两项技术对细胞核内蛋白质动态变化的研究表明: 一些蛋白质在细胞核内是运动的, 能和各自所在的区域快速结合和解离; 并且这种运动主要以被动扩散的方式进行, 不消耗代谢的能量; 另外蛋白质的共价修饰可对某些蛋白质的运动产生影响。细胞核内蛋白质的动态变化对细胞核的结构组成和基因表达的调控都具有重要的意义, 但详细的机制还有待于进一步的研究。

关键词 蛋白质动态变化, 漂白后荧光恢复/漂白荧光丢失, 细胞核区域, 共价修饰, 基因调控

学科分类号 Q291

在细胞分裂间期, 多数真核生物细胞核的大部分体积被染色质和核仁占据, 由于核仁外部和染色质之间的区域缺乏基因的存在, 近几年越来越受到研究者的关注。有人认为, 这一区域为细胞核中大分子物质(如蛋白质、RNA)提供了一个理想的运动平台^[1]。后来 Phair 等^[2]的试验证明了这一点, 他们利用漂白后荧光恢复(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)和漂白荧光丢失(fluorescence loss in photobleaching, FLIP)技术对细胞核中三种蛋白质进行监测, 结果发现: 这几种蛋白质在细胞核中确实是运动的, 并且它们以被动扩散的方式进行。此后, 研究核蛋白质运动的报道越来越多, 但迄今为止, 还没有人计算出任何一个核蛋白运动的参数, 而参数对于了解其运动性质无疑是非常重要的。研究还发现, 核内蛋白质的运动速度受到多种因素的影响, 例如: 组蛋白的乙酰化、磷酸化和细胞核中其他分子的运动, 另外蛋白质在异染色质和常染色质上的运动也不尽相同。探明蛋白质在细胞核中的运动性质并不是研究者的最终目的, 重要的是通过研究蛋白质的运动来揭示其对染色质的重塑和基因表达的作用, 而这些方面仍待进一步的研究。本文就近年来核内蛋白质动态变化研究的进展作一综述。

1 FRAP 和 FLIP 技术

FRAP 和 FLIP 技术是研究蛋白质在活细胞中运动的两种最重要的、最基本的技术, 在这两种技术中绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)因其具有独特的优点而被作为标签, 指示蛋

白质在细胞核中的运动情况。

1.1 绿色荧光蛋白标签

用绿色荧光蛋白标记蛋白质不会显著影响标记蛋白质的性质, 也不会影响异源细胞的生理过程, 正是由于 GFP 具有这些独特的优点, 所以常被用作蛋白质标签。在蛋白质动态变化研究中, 常用 GFP 与目的蛋白融合或者是构建 GFP 嵌合基因使其在细胞中表达, 形成嵌合体蛋白, 利用 FRAP 和 FLIP 技术的同时借助荧光显微镜可对核内蛋白质的运动进行观察。

1.2 FRAP 和 FLIP 技术

FRAP 可直接在活体细胞中观察到被 GFP 标记的核内蛋白质的运动。在细胞核中选择一个合适的区域用足够强的激光进行光漂白, 这种光化学反应可以破坏 GFP 的生色基团, 使该点荧光不可逆消失, 由于核内蛋白质的运动, 用定时显微镜观察该区荧光恢复情况, 若有荧光重现, 则说明其他区没有漂白的荧光分子移动到了该区, 根据恢复时间和恢复率可了解蛋白质在细胞核中的运动情况^[3]。而 FLIP 试验则是 FRAP 的一个逆过程, 在 FLIP 中选择一个合适的点, 每隔一定时间进行激光漂白, 如果蛋白质是运动的, 那么就会不断有其他区域的同种蛋白质运动到该点而被漂白, 该点附近的荧光随着漂白的持续进行而逐渐减弱。这两种技术都可以用来观察核内蛋白质的运动。目前, FRAP 和 FLIP 已成为研究蛋白质运动必不可少的方法, 基

* 通讯联系人。

Tel: 025-84395278, E-mail: liuhonglin@263.net

收稿日期: 2003-09-24, 接受日期: 2003-12-29

于这两种方法, 研究者们不仅观察到一些核内蛋白质的动态变化情况, 还研究了和蛋白质运动密切相关的细胞核内区域系统.

2 核内蛋白质运动的研究进展

2.1 核内蛋白质是运动的

Phair 等^[2]利用 FRAP 和 FLIP 方法研究了活细胞内三种蛋白质, 它们分别是核小体结合蛋白 (HMG-17)、前体 mRNA 剪切因子 (SF2/ASF) 和 rRNA 加工蛋白原纤维, 这三种蛋白质涉及到细胞核的三大功能, 分别是: 转录、前体 mRNA 的剪切和 rRNA 加工, 并且它们代表了被观察到的几种蛋白质的最主要运动形式. 试验发现, 这三种蛋白质在活的细胞核内是运动的. 由于它们的 GFP 融合蛋白的运动, 荧光漂白后可在 32 s 内彻底恢复, 它们的恢复速度远远大于组蛋白 GFP-H2B 的速度, 且荧光恢复率高, 几乎可以完全恢复. 据初步计算, 一个 GFP-HMG-17 分子在 28 s 内走大约 5 μm 的距离, 这个距离基本上是从核心到核膜的距离. 相应的 GFP-SF2/ASF 和 GFP-原纤维蛋白从核心到核膜分别是 52 s 和 24 s. 因此, 这几种蛋白质在细胞核内是快速运动的, 几乎不存在不运动的区域.

异染色质蛋白 1 (heterochromatin protein 1, HP1 β) 是浓缩 DNA 的一个主要成分, 定位于异染色质着丝粒簇, 在常染色质上也有分布, 涉及到基因沉默和着丝粒聚合. 它在激活的 T 细胞里快速运动, 但在异染色质和常染色质上的运动情况有几点不同^[4], 这可从 GFP-HP1 β 的荧光恢复情况得出: 首先, 荧光漂白后, 异染色质在 150 ~ 200 s 内可恢复 70% 的荧光, 而在常染色质上 90 ~ 100 s 内大部分荧光都可恢复. 其次, 荧光半数恢复时间不同, 异染色质大约需 50 s, 而常染色质只需 10 s. 最后, 荧光的恢复率不同, 异染色质上有 30% 的荧光不可恢复, 而常染色质上只有 10%. 这说明了 HP1 β 在异染色质上的结合强度比常染色质上的大.

组蛋白 H1 也有类似的运动情况. Misteli 等^[5]和 Lever 等^[6]研究 H1 在细胞核内的运动时发现, H1 在整个细胞周期中都与染色质结合, 它可以在异染色质区和常染色质区间交换而不需要染色质纤维和纤维之间的相互作用, 但是 FRAP 试验中, H1 在异染色质上的量要比常染色质上的多, 这说明: H1 与异染色质的结合比与常染色质的结合牢固. GFP-H1 在活体染色质上的停留时间为 220 s

左右^[5], 10 min 内 H1. 1-GFP 在整个细胞核中重新分布^[6], 与之相对比, GFP-H2B 在 30 min 内几乎没有什么变化. H1 首先在核质中分布然后与染色质重新结合, 这种结合机理可以通过 “stop-and-go” 学说^[5]来解释: H1-GFP 在染色质上停留大约 220 s 左右, 然后这个分子从染色质上解离, 在核质中漫游, 直到碰到下一个合适的位点并与之结合. 与之类似的是 20 世纪 90 年代初提出的 “hit-and-run” 转录因子动态变化模式. McNally 等^[7]应用这种模式描述了糖皮质激素受体在染色质和核质区域间快速交换的过程.

此外, 1999 年, Houtsmuller 等^[8]利用 GFP 标记核酸内切酶 ERCC1/XPF 复合物. 研究发现: 这个复合物在 DNA 损伤前后都是快速运动的, 但是当紫外线照射细胞引起 DNA 损伤时, 该复合物则表现了短暂的停留, 可能是这个复合物与 DNA 损伤位点结合的缘故. 2000 年, Moir 等^[9]观察到了核纤层蛋白 A (laminA) 和 laminB1 在细胞有丝分裂中期和 G1 期的动态变化情况. 不仅如此, 雌激素受体^[10]、蛋白酶体^[11]和其他几个核仁蛋白在活细胞内的运动情况也曾被报道.

总之, 一些核蛋白质在细胞核中是运动的, 并且在常染色质和异染色质上有所不同. 虽然这种运动相对是快速的但是与 GFP 蛋白相比却慢得多, 可能是因为这些蛋白质和染色质的结合阻碍了它们的自由运动.

2.2 细胞核内区域与蛋白质的运动

研究某种核蛋白的运动, 首先要知道这种蛋白质在核中的定位, 细胞核内区域则是这些蛋白质聚集的所在地. 在早期研究中, 这些区域在显微镜下呈小斑点状 (speckle)^[12], 并且发现这些斑点具有高度的动态变化, 对其附近基因的激活产生特异性的应答, 而且一些小的微粒能和它不断地结合和解离, 但是小斑点本身是稳定的, 在观察过程中几乎没有移动位置.

进一步的研究发现, 这些斑点实际上是同种蛋白质的集合, 类似于细胞质中的膜被系统. 1998 年, Lamond 等^[13]在其所著文章中曾用 “compartment” 这个词来描述细胞核中被隔开的一类特殊区域. 众所周知, 在细胞质内存在一些膜被区室系统, 如内质网、线粒体和高尔基体等, 这些膜被区域对蛋白质的分选具有重要的作用. 细胞核中的区域与膜被区室所不同的只是它没有膜的包被, 仅是一些生物大分子物质的聚集, 这些同一区

域内的分子具有一致的动态变化性质, 因此认为这些分子是同质的, 即具有类似的运动性质和作用^[14]. 例如: 在细胞核中有几个不同的区域(原纤维中心, 前体 rRNA 剪切因子区域等) 已经被鉴别. 这些区域本身是一个稳定的结构, 在设定的细胞核位置持续较长的时间, 而不移动位置. 但是蛋白质可以和各自的区域迅速地结合和解离, 使区域处于持续的动态平衡状态, 由此, 细胞核内区域系统和蛋白质的运动是密切相关的.

研究者利用 FRAP 监测 GFP 荧光恢复情况, 试验得到 GFP-SF2/ASF 和 GFP-原纤维蛋白分别与剪切因子区域和核仁结合, 这些直接说明了这些蛋白质以高速率和他们各自的区域结合. 而 GFP-SF2/ASF 在剪切因子区域漂白后 30 s 内恢复, 在这个区域中不移动的部分少于 10%, 表明该区域中整个 SF2/ASF 库几乎被重新置换. 类似地, 当整个核仁被漂白后, GFP-原纤维蛋白快速地从核质中运动到核仁. FLIP 试验也得到原纤维的核质库可以和核仁库快速交换^[2].

所有这些研究证实了: 在活细胞核内, 核蛋白可以持续、快速地和各自的区域结合或者解离, 并且蛋白质的运动可以从核质到核仁, 不局限于一个特定的细胞核区域.

2.3 核内蛋白质的运动方式

大分子物质在细胞内转运有两个极端, 一个是通过载体运输, 这种运输要消耗能量, 另一种是被动扩散, 这种运输不需要 ATP, 即不依赖于代谢的能量而进行运动. 当降低温度时, 细胞核的几种蛋白质的运动几乎没有什么变化^[2,11], 因此可以认为: 核蛋白质的运动是不依赖于以 ATP 形式存在的代谢能量而进行的, 类似的现象也出现于 GFP-HGM-14、Pre-mRNA、SC35、核仁素等核蛋白. Lever 等^[6]也发现 H1 的快速运动是个不需要能量的过程, 它可能以一种被动扩散的方式进行, 不需要载体和消耗能量. 但是, 这并不能排除一些蛋白质或蛋白质的一部分是通过直接转运、主动运输的机理而进行运动的. 例如: 体外试验时, 糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 在染色质重塑因子 hBRG1 存在时, 从浓缩的染色质上脱落下来则是一个需要能量的过程^[15, 16]. 虽然是这样, 主动运输对蛋白质的运动来说并不是必需的, 因为被动扩散是一个非常有效的转运模式. 例如: 一个单基因蛋白质在几秒钟之内可以转遍整个细胞核, 甚至大分子复合物在几分钟内也很容易地从细胞核

心到核膜^[2]. 这种高速运动可以使蛋白质在核质中漫游, 直到碰到它们的靶位点并与之结合, 这种“浏览”的方式不需要特定的靶信号和信号识别机制, 完全是一种随机的运动, 此外, 这种被动扩散的运动方式同时也节约了能量^[17].

2.4 共价修饰对核内蛋白质运动的影响

影响蛋白质在核内运动的因素很多, 例如蛋白质之间的相互作用, 蛋白质和核内其他组分的相互作用, 蛋白质和染色质的相互作用, 以及染色质的结构、蛋白质的共价修饰. 其中共价修饰对蛋白质的影响是研究得比较清楚的.

2.4.1 磷酸化对核内蛋白质的影响

核内蛋白质的运动是不依赖能量的过程, 但是当细胞和消耗 ATP 的试剂温育后, 组蛋白 H1 在核内的运动发生了变化. 变化的原因可能是组蛋白 H1 翻译后的修饰或者是一种或多种蛋白质调控了 H1 和染色质的结合. 为了研究这个问题, Lever 等^[6]用组蛋白 H1 磷酸化的抑制剂处理细胞, 使其不能正常磷酸化, FRAP 分析该处理细胞发现: GFP-H1.1 分子的半数恢复时间加倍, 从而表明蛋白质的磷酸化可能降低了 H1.1 与 DNA 的亲合力, 促使其从染色质上快速解离下来. 并且体外试验也发现: 组蛋白 H1.1 C 端的丢失明显增加了组蛋白 H1 的流动性, 并且导致 H1-GFP 在有丝分裂期不能和染色质结合. 可能的机理是: 组蛋白 H1 C 端的磷酸化干扰了这个结构域和 DNA 的相互作用, 从而改变了染色质的组织形式, 降低了 H1 与 DNA 的亲合力.

2.4.2 乙酰化对核蛋白运动的影响

核心组蛋白乙酰化后改变了染色质的结构, 从而使染色质结构松散, 使重塑因子接近 DNA. 但是核心组蛋白的乙酰化对组蛋白 H1 运动的影响还不清楚, Misteli 等^[5]曾用去乙酰化抑制剂 (TSA) 处理细胞, 使四种核心组蛋白的乙酰化水平增高, 结果表明: H1-GFP 的恢复速度明显快于没有处理的细胞, 这种速度的加快从另一个方面说明了在 TSA 处理细胞中 H1-GFP 在染色质上的停留时间缩短. 这种交换速度的增加不是细胞转录激活的增加, 因为当用 α -鹅膏蕈碱处理时对荧光恢复率没有任何影响. 因此核心组蛋白的高度乙酰化增加了组蛋白 H1 在染色质上的交换率, 可能是部分激活的染色质在清除了 H1 后, 加入了乙酰化的核心组蛋白, 因此在活细胞内, 这种结合的动态变化属性是连接组蛋白作为染色质重塑和染色质调节因子的

一个重要特征,也就是说组蛋白 H1 从染色质上丢失是染色质重塑中的一步。

除了这两种常见的共价修饰外,甲基化对蛋白质的运动也有一些影响,如:组蛋白 H3 尾部第九位的甲基化赖氨酸是 HP1 的结合位点。这个位点的赖氨酸甲基化与否直接决定了 HP1 是否能与组蛋白 H3 结合。组蛋白甲基化酶 SUV39、HP1 的染色质区和染色阴影区对 HP1 和染色质结合都是必需的,但是它们在 HP1 与常染色质和异染色质的结合上起着不同的作用。

3 核内蛋白质运动的意义

蛋白质在细胞核中的运动是以被动扩散的方式进行的,一个蛋白质分子遇到特定的区域或一个结合位点是一个随机的过程。蛋白质在细胞核中动态的性质符合基因表达的随机机理。基因的激活需要染色质的重构和随后的转录因子聚集,这两个过程被蛋白质之间的相互作用或预先聚集的组合元件之间的相互作用所驱动^[17]。然而形成中间聚集物的形式则被聚集复合物停留时间和每个元件在聚集位点的可能性所影响,这个聚集点又被蛋白质在细胞核内的运动情况所决定,例如,如果这个因子在介质中的驻留是不可能的,这个聚集过程将被终止。在染色质重构期间,转录激活子——重构复合物的招募者仅仅和染色质短暂地结合,如果染色质的修饰在激活子停留时间内激活,激活子将解离。一个典型的蛋白质是 HP1 β ,它和异染色质与常染色质的动态结合潜在地调节了一些因子进入染色质,这些因子包括核小体修饰转移因子和涉及 DNA 功能的代谢分子。HP1 β 的高速运动并不能彻底阻止这些因子进入组蛋白的尾部,而是间歇性地允许其他因子进入染色质以调控其重塑^[4]。

最近 Cheutin 等^[18]也研究了 HP1 和染色质的动态结合,这种结合可能对染色质结构的建立和转录抑制的维持起着重要作用。试验证明:异染色质结构稳定的维持涉及到 HP1 和染色质短暂的结合和动态的交换,HP1 的动态变化和染色质浓缩水平有关。

4 展望

随着生物技术的迅速发展,核内蛋白质的动态变化研究取得了很大进展。对于一个蛋白质来说研究它的运动形式不是最终目的,重要的是通过它的运动性质研究这种蛋白质对基因的作用。因为蛋白

质只有通过运动与其靶位点结合,才能调控基因的转录、蛋白质的合成。因此,研究蛋白质的运动,对于了解细胞核内的组织形式和细胞核的功能从而研究基因在三维空间的表达调控具有非常重要的意义。运用计算机来分析从活细胞内获得的蛋白质的动力学资料,并对这些资料量化,从而获得计算模型,是现在和今后研究蛋白质性质及其功能的一个新途径^[19]。因为核内蛋白质是相互作用的,把蛋白质组作为研究对象,可能会开拓研究的新思路。

参 考 文 献

- 1 Pederson T. Protein mobility within the nucleus —What are the right moves?. *Cell*, 2001, **104** (5): 635 ~ 638
- 2 Phair R D, Misteli T. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*, 2000, **404** (6778): 604 ~ 609
- 3 Houtsmuller A B, Vermeulen W. Macromolecular dynamics in living cell nuclei revealed by fluorescence redistribution after photobleaching. *Histochemistry and Cell Biology*, 2001, **115** (1): 13 ~ 21
- 4 Festenstein R, Pagakis S N, Hiragami K, *et al.* Modulation of heterochromatin protein 1 dynamics in primary mammalian cells. *Science*, 2003, **299** (5607): 719 ~ 721
- 5 Misteli T, Gunjan A, Hock R, *et al.* Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature*, 2000, **408** (6814): 877 ~ 881
- 6 Lever M A, Th'ng J P, Sun X, *et al.* Rapid exchange of histone H1. 1 on chromatin in living human cells. *Nature*, 2000, **408** (6814): 873 ~ 876
- 7 McNally J G, Müller W G, Walker D, *et al.* The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science*, 2000, **287** (5456): 1262 ~ 1265
- 8 Houtsmuller A B, Rademakers S, Nigg A L, *et al.* Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells. *Science*, 1999, **284** (5416): 958 ~ 961
- 9 Moir R D, Yoon M, Khuon S, *et al.* Nuclear lamins A and B1: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells. *J Cell Biol*, 2000, **151** (6): 1155 ~ 1168
- 10 Stenoien D L, Nye A C, Mancini M G, *et al.* Ligand-mediated assembly and real-time cellular dynamics of estrogen receptor alpha-coactivator complexes in living cells. *Mol cell Biol*, 2001, **21** (13): 4404 ~ 4412
- 11 Reits E A, Benham A M, Plougastel B, *et al.* Dynamics of proteasome distribution in living cells. *EMBO J*, 1997, **16** (20): 6087 ~ 6084
- 12 Misteli T, Cáceres J F, Spector D L. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature*, 1997, **387** (6632): 523 ~ 526
- 13 Lamond A I, Earnshaw W C. Structure and function in the nucleus. *Science*, 1998, **280** (5363): 547 ~ 533
- 14 Carmo-Fonseca M. The contribution of nuclear compartmentalization to gene regulation. *Cell*, 2002, **108** (4): 513 ~ 521
- 15 Fletcher T M, Ryu B-M, Baumann C T, *et al.* Structure and dynamic properties of the glucocorticoid receptor-induced chromatin transition at the MMTV promoter. *Mol Cell Biol*, 2000, **20** (17): 6466 ~ 6475
- 16 Fletcher T M, Xiao N, Mautino G, *et al.* ATP-dependent mobilization of the glucocorticoid receptor during chromatin remodeling. *Mol Cell Biol*, 2002, **22** (10): 3255 ~ 3263

- 17 Misteli T. Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science*, 2001, **291** (5505): 843 ~ 847
- 18 Cheutin T, McNairn A J, Jenuwein T, *et al.* Maintenance of stable heterochromatin domains by Dynamic HP1 binding. *Science*, 2003, **299** (5607): 721 ~ 725
- 19 Roix J, Misteli T. Genomes, proteomes, and dynamic networks in the cell nucleus. *Histochem Cell Biol*, 2002, **118** (2): 105 ~ 116

Progress in Dynamic Studies of Nuclear Proteins

WANG Ai-Xia, CHEN Jie, LIU Hong-Lin *

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract FRAP and FLIP are two techniques that are usually applied to study the dynamics of protein in living cells. In recent years, studies of protein dynamics by these two techniques showed: some proteins are mobile, and they rapidly associate and dissociate with their respective compartments in the nucleus of living cells. Furthermore, protein movement is mainly independent of energy, which indicates that proteins may use a passive mechanism of movement. Additionally, covalent modifications have effect on the mobility of some proteins. Protein dynamics in the karyon is important to the nuclear architecture and gene regulation, however, the detail mechanism is still unknown and expected to further study.

Key words protein dynamics, FRAP/FLIP, nuclear compartment, covalent modification, gene regulation

* Corresponding author. Tel: 86-25-84395278, E-mail: liuhonglin@263.net

Received: September 24, 2003

Accepted: December 29, 2003