

NIRF对 P53 蛋白泛素化作用的研究*

段昌柱¹⁾ 蒲淑萍¹⁾ TSUTOMU MORI²⁾ HIDEO KOCHI²⁾ 邱宗荫^{3)**}

¹⁾重庆医科大学细胞生物学与遗传学教研室, 重庆 400016;

²⁾The 1st Department of Biochemistry, Fukushima Medical University, Japan;

³⁾重庆医科大学医学检验系, 重庆 400016)

摘要 HEK293 和 HeLa 细胞分别被 Np95/ICBP90-like RING finger protein (NIRF) 和 P53 转染后, 细胞上清和免疫沉淀产物用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳免疫印迹法分析; 细菌合成 GST-P53 后, 用 GST pull-down 技术检测 NIRF 与 P53 相互作用; 在 GST-P53、E1、E2 和 NIRF 体外泛素化反应系统中, 检测 NIRF 对 P53 的体外泛素化。结果表明: NIRF 能与 P53 相互作用, NIRF 不仅能与 P53 特异性结合, 而且还会将 P53 泛素化, 这种相互作用在细胞内和细胞外均能发生。推测 NIRF 可能是 P53 的一个新的负调节蛋白。

关键词 NIRF, P53, GST pull-down, 泛素化

学科分类号 R735, Q26

Np95/ICBP90-like RING finger protein (NIRF)是新发现的一种核蛋白, 基因定位于 9p24.1^[1~3]。全长 NIRF 含有 802 个氨基酸残基, 其蛋白质内部含有 UBL (ubiquitin-like domain)、PHD、YDG/SRA 和 RING finger 结构域, 同时还有一个 Rb 结合位点。其分子结构与鼠 NP95 和人 ICBP90 蛋白结构相似。目前已经探明该蛋白质在细胞内能与 Cdk2-cyclin E2 结合, 并抑制细胞进入 S 期。最近研究表明, NIRF 还具有 E3(ubiquitin/UBL-protein ligase, 泛素/类泛素连接酶)的功能, 即以泛素化连接酶(ubiquitin ligase)的角色参与 PCNP(PEST-containing nuclear protein)的泛素化。有趣的是, NIRF 也能将自己泛素化^[4]。

P53 是一个半衰期很短的核蛋白, 当细胞面临环境压力时胞内的 P53 浓度即可升高。P53 在细胞内的含量主要由 Mdm2 泛素化蛋白酶系统来调节^[4,5]。已有研究表明, P53 是细胞内重要的肿瘤抑制基因, 在人类 50%以上的肿瘤组织中, 有 P53 基因突变的报道。正常的 P53 蛋白在体内有拮抗因环境压力下造成的 DNA 损伤、维持基因组稳定、阻滞细胞进入细胞增殖周期、促进细胞凋亡以及抑制肿瘤血管生成等功能^[6,7]。本文旨在研究 NIRF 与 P53 的相互作用, 并观察 NIRF 在细胞内外对 P53 的泛素化过程。

1 材料

1.1 细胞与质粒

HeLa 细胞和 HEK293 细胞购自 Sigma 公司。具有 FLAG- 和 GST- 标签的全长 NIRF 和 P53 质粒均为重庆医科大学细胞生物学与遗传学教研室自制。

1.2 试剂

培养基、血清、anti-FLAG M2 affinity gel、FLAG 肽、protease inhibitor cocktail(蛋白酶抑制复合物)、MG-132、IPTG、兔 E1 和 E2 (UbcH5a) 购自 Sigma 公司; 抗体购自 Santa Cruz 和 TOYOBO 公司; BCIP/NBT Color Development Substrate 购自 Promega 公司; Glutathione Sepharose 4B gel、GST 洗脱液、CDP-STAR 购自 Amersham 公司; 细胞转染试剂购自 Qiagen 公司。

2 方法

2.1 细胞培养和转染

用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液将 HeLa 细胞或 HEK293 细胞在 10 cm 的培养皿内于 5%的

*日元贷款培训项目资助。

** 通讯联系人。Tel/Fax: 023-68485118, E-mail: zongyin@sohu.com

收稿日期: 2005-08-30, 接受日期: 2005-10-20

CO₂ 条件下培养 48 h, 细胞经过冷的 PBS 洗涤后, 加入 9 ml 37℃ 预热的培养基. 用按照细胞转染试剂说明书的方法向每个培养皿内转染 2 μg 质粒, 24 h 后换一次培养液, 细胞继续培养 24 h 后即可收获. 需要用 MG-132 处理的细胞在收获前 12 h 加入, 终浓度为 5 mmol/L.

2.2 细胞裂解

经过 2 次冷的 PBS 洗涤后, 用胶铲将细胞从培养皿中刮下, 用 1 ml 的细胞裂解液(150 mmol/L NaCl, 0.5% NP-40, 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 5 mmol/L EDTA, 1% protease inhibitor cocktail)在 4℃ 下处理 30 min, 让细胞充分裂解. 细胞裂解后经过 2 次 12 000 × *g* 的离心, 上清液 (whole cell extracts, WCE)一部分备用, 另一部分经 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后, 进行蛋白质免疫印迹分析.

2.3 免疫沉淀 (immunoprecipitation, IP)

用 BCA 试剂测量 WCE 中的蛋白质含量后, 用细胞裂解液来调节标本之间的蛋白质浓度, 使各标本之间的蛋白质浓度一致. 取 700 μl WCE, 加入 150 μl 抗 FLAG M2 亲和胶(anti-FLAG M2 affinity gel), 在 4℃ 下保持混匀 2 h, 让细胞表达的含有 FLAG- 标签的蛋白质能充分地结合在 FLAG M2 亲和胶上. 用 IP 洗涤缓冲液 (150 mmol/L NaCl, 0.1% NP-40, 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 5 mmol/L EDTA, 1% protease inhibitor cocktail)充分地洗涤. 最后胶上结合的蛋白质用浓度为 100 mg/L 的 FLAG 肽溶液洗脱 2 次. IP 产物 (immunoprecipitates)经 SDS-PAGE 后, 进行蛋白质印迹分析, 根据蛋白质浓度不同分别用 BCIP/NBT 试剂或 CDP-Star 检测试剂显色.

2.4 GST pull-down

2.4.1 GST-P53 蛋白的制备. 将含有 pGEX-4T-1-P53 质粒的 BL21 用 5 ml 2×YTA 培养基 37℃ 振荡培养过夜. 次日用经预热的 500 ml 2×YTA 培养中扩大培养 2~3 h, 当 A₆₀₀ 到达 2.8 时, 即加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 继续培养 1 h. 细菌经 4℃ 冷却后超声波破碎, 立即加入复性剂(1% Protease inhibitor cocktail、1 mmol/L EDTA 和 1% Triton X-100). 在 4℃ 冷室内轻轻混匀 30 min. 细菌裂解液经 2 次 10 000 *g* 离心 10 min 后, 弃沉淀, 上清用 Glutathione Sepharose 4B 胶亲和层析后, 取 20 μl 胶进行 SDS-PAGE, 分别用考马斯亮蓝和蛋白质印

迹鉴定. 剩余的胶备用.

2.4.2 FLAG-NIRF 蛋白的制备. 将转染了 FLAG-NIRF 质粒的 HEK293 细胞用前述的方法培养后, 用 1 ml 细胞裂解液裂解细胞, 细胞裂解液 2 次离心后的上清液用 5 μl Glutathione Sepharose 4B 胶在 4℃ 下预清洁 30 min. 离心, 上清液备用.

2.4.3 GST pull-down. 取 400 μl 含有 FLAG-NIRF 细胞上清液, 与 2.4.1 中备用的胶 100 μl 混合, 在 4℃ 下充分混匀 2 h, 用含有 1% Triton X-100 和 1 mmol/L EDTA 的 PBS 充分洗涤 3 次, 离心后向沉淀中加入 60 μl 上样缓冲液, SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 蛋白质印迹分析.

2.5 体外泛素化 (*in vitro* ubiquitination)

2.5.1 GST-NIRF 蛋白的合成. GST-NIRF 的合成方法与 2.4.1 相同.

2.5.2 泛素化反应体系. 反应体系内分别加入 1 μg GST-P53, 500 ng GST-NIRF, 10 μg 具有 FLAG 标记的泛素 (FLAG-tagged ubiquitin), 200 ng 兔 E1 和 200 ng E2 (UbcH5a), 然后用泛素化缓冲液 (25 mmol/L HEPES pH 7.4, 10 mmol/L NaCl, 3 mmol/L MgCl₂, 0.05% Triton X-100, 0.5 mmol/L DTT, 3 mmol/L Mg-ATP, 1% protease inhibitor cocktail) 补足到 50 μl. 于 37℃ 下反应 1 h, 产物经 SDS-PAGE 后进行蛋白质印迹分析.

3 结 果

3.1 NIRF 在真核细胞中的表达

HeLa 细胞经 pCMV-FLAG-NIRF 转染后细胞 WCE 和 IP 产物分别用蛋白质免疫印迹法分析, 结果见图 1. 表明 NIRF 在 HeLa 细胞内能稳定和高效地表达, 这与预期结果相符. 值得注意的是, 我们在 NIRF 质粒中构建的 FLAG 标签 (FLAG-tag), 该标签能非常有效地被抗 FLAG 的亲和胶 (anti-FLAG M2 affinity gel) 结合, 从而能较好地分离和纯化细胞内表达的 NIRF, 同时在使用蛋白质印迹分析时只需要用抗 FLAG 抗体即能检测 NIRF 的存在, 正因为如此, FLAG-tag 已经被广泛用于免疫印迹分析. 结果中还可以看出, NIRF 蛋白在体内是不稳定的, 这与它在体内的自身泛素化有关 (图 1).

3.2 NIRF 在细胞内 (*in vivo*) 能与 P53 相互结合

在 HeLa 细胞内共转染了 FLAG-NIRF 和 Myc-P53 后, 其抗 FLAG 免疫沉淀产物中不仅有 NIRF 的存在, 我们还检测到了外源 P53 的存在

(图 2), 说明 NIRF 蛋白在细胞内能与 P53 蛋白相互结合, 并和 NIRF 一起在免疫沉时被分离出来. 在这里我们选择的质粒是含有 Myc-tag 的 P53, 在免疫印迹中我们用抗 Myc 抗体进行检测, 以消除内源性 P53 对免疫印迹结果的影响. 在细胞内若有超量表达(over expression)蛋白质存在时, 超量表达的蛋白质会因为浓度很高, 常发生非特异性的结合, 为了消除因转染到细胞内的 P53 蛋白在细胞中高表达而引起它与 NIRF 的非特异性结合的假象, 我们在 HEK293 细胞中, 只转染 FALG-NIRF, 而

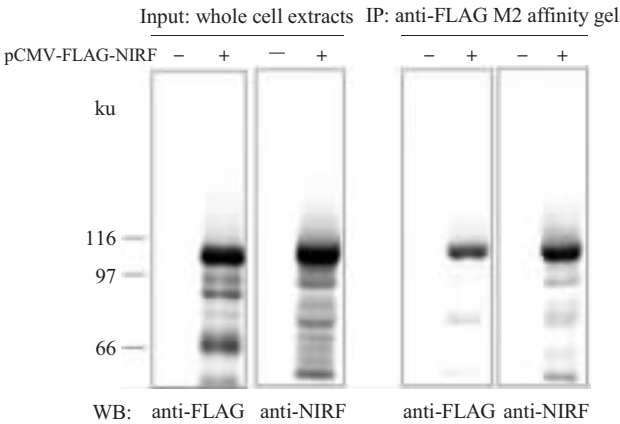


Fig. 1 Full length NIRF can be expressed steadily in HeLa cells

HeLa cells were transfected with pCMV-FLAG-NIRF or an empty vector for 48 h. The whole cell extracts (left) and products immunoprecipitated by FLAG M2 affinity gel (right) were separated by SDS-PAGE followed by Western blotting (WB) with anti-FLAG or anti-NIRF antibody.

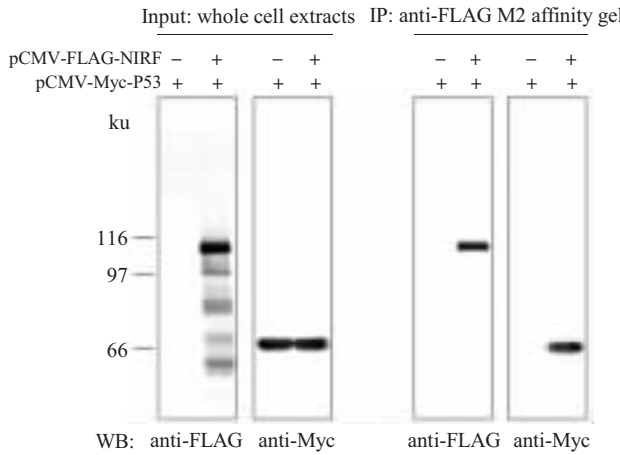


Fig. 2 NIRF can combine with exogenous P53 in vivo

HeLa cells were co-transfected with pCMV-FLAG-NIRF(or an empty vector) and pCMV-Myc-P53 for 48 h. The whole cell extracts (left) and products immunoprecipitated by FLAG M2 affinity gel (right) were separated by SDS-PAGE followed by Western blotting (WB) with anti-FLAG or anti-Myc antibody.

不再转染 P53, 再进行检测, 结果发现, 在免疫沉淀产物中仍然检测到了 P53 蛋白(图 3), 这些被检测到的 P53 蛋白即为 HEK293 细胞内源性的野生型蛋白. 这说明 NIRF 在细胞内与 P53 的结合是具有特异性的.

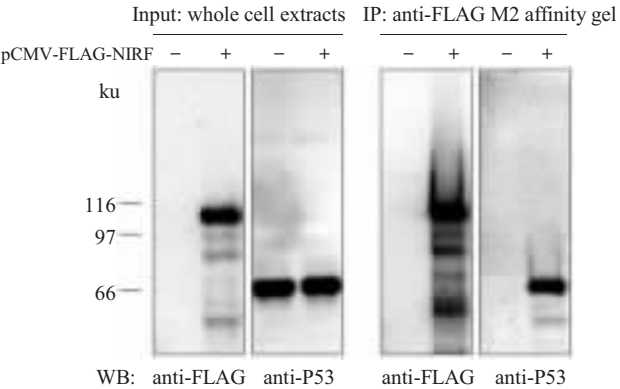


Fig. 3 NIRF can combine with endogenous P53 in vivo

HEK293 cells were transfected with pCMV-FLAG-NIRF or an empty vector for 48 h. The whole cell extracts (left) and products immunoprecipitated by FLAG M2 affinity gel (right) were separated by SDS-PAGE followed by Western blotting (WB) with anti-FLAG or anti-P53 antibody.

3.3 NIRF 在细胞外 (in vitro) 能与 P53 相互结合

为了更充分地证明 NIRF 能与 P53 相互结合, 我们利用 GST pull-down 技术进行了分析(图 4). 细菌表达的 GST-P53 蛋白分离纯化后结合在

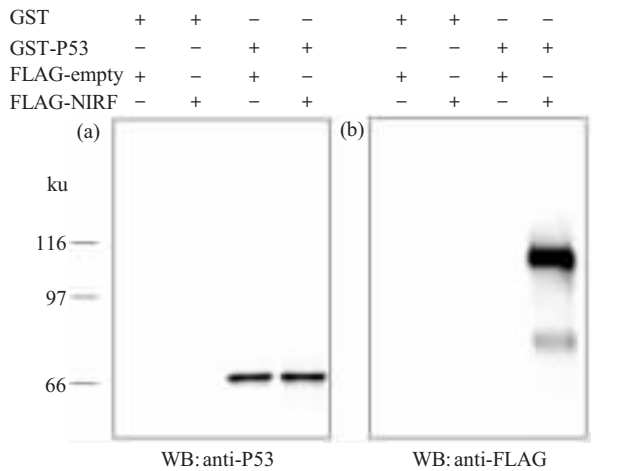


Fig. 4 GST pull-down confirms that NIRF can interact with P53 in vitro

Cell lysates of HEK293 cells were precleaned with Glutathione Sepharose 4B beads and then incubated with purified GST or GST-P53. After being washed twice, proteins on the beads were subjected to SDS-PAGE and analyzed by Western blotting (WB) with anti-P53 antibody (a) or anti-FALG antibody (b).

Glutathione Sepharose 4B 胶上, 当结合有 GST-P53 的 Glutathione Sepharose 4B 胶与含有 FALG-NIRF 的细胞上清(cell lysate)一起孵育后, 将 Glutathione Sepharose 4B 胶进行充分洗涤, 以除去非特异性结合的蛋白质. 如果在体外 NIRF 不能与 P53 结合, 那么经充分洗涤后的 Glutathione Sepharose 4B 胶上仅能检测到 GST-P53 蛋白的存在, 不应该有 FALG-NIRF 的存在. 我们的结果恰好相反, GST pull-down 检测表明, Glutathione Sepharose 4B 胶上不仅检测到了 P53 (图 4a), 而且也检测到了 FALG-NIRF (图 4b). 这说明 NIRF 在细胞外能与 P53 结合.

3.4 在细胞内 NIRF 能将 P53 泛素化 (*in vivo* ubiquitination)

既然 NIRF 在体内和体外均能与 P53 特异性结合, 那么这种结合就应该有某种目的. 我们前期研究结果表明, NIRF 具有 E3 的功能, 它能够将 PCNP 和自己泛素化, 是因为 NIRF 蛋白结构域中具有一个 RING finger 结构. 我们推测 NIRF 在细胞内与 P53 结合, 最终可能参与了 P53 的泛素化. 为了证明我们的推测, 我们在 HEK293 细胞内进行了 NIRF 对 P53 的泛素化实验. 结果证实了我们的推测 (图 5). 并且随着细胞内转染的 NIRF 量的增加, P53 被泛素化的量也增加.

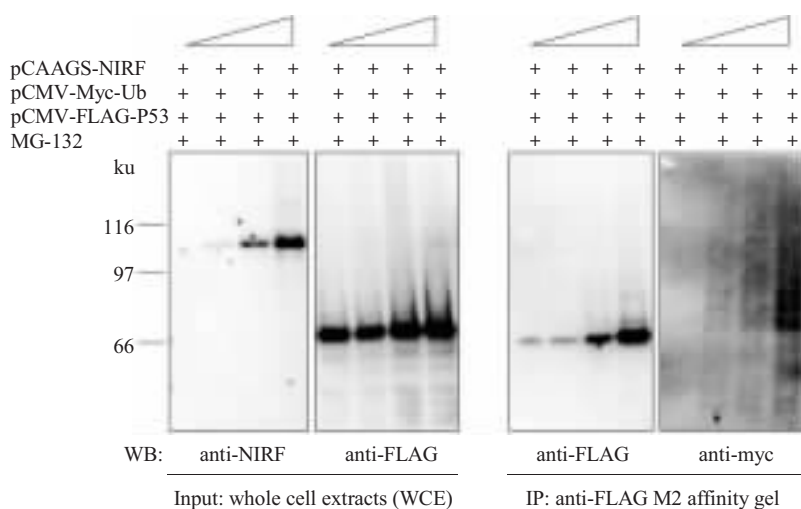


Fig. 5 Regulation of P53 *in vivo* ubiquitination by NIRF

HEK293 cells were transfected with pCMV-Myc-Ub, pCMV-FLAG-P53 and different dosage of pCAAGS-NIRF. Medium was changed once at 24 h after transfection, and cells were further cultured for 24 h with MG-132. Whole cell extracts(WCE) were prepared and subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-FLAG M2 affinity gel, followed by Western blot analysis (WB). The blots were probed with anti-NIRF antibody, anti-FLAG antibody, or anti-Myc antibody.

3.5 NIRF 对 P53 的细胞外泛素化 (*in vitro* ubiquitination)

为了更进一步证明 NIRF 参与了 P53 的泛素化过程, 我们利用体外泛素化反应技术进行检测. 分别在细菌中合成 GST-NIRF、GST-P53, 在该反应体系中加入泛素活化酶 E1、泛素活化酶 E2、GST-NIRF(E3)和 FLAG-Ub, 在适当的条件下进行反应. 结果表明: 当有 E1、E2 存在时, NIRF 能充当 E3 的角色, 能将单个的泛素分子(FLAG-Ub)催

化连接到 P53 上去, 使 P53 的分子质量增加, 从而在蛋白质免疫印迹结果中出现很长的“拖尾”(图 6).

可见, 不论在细胞内还是在细胞外, NIRF 均能与 P53 特异性地结合并将 P53 分子泛素化. 虽然泛素化分子是以什么样的模式连接到 P53 上的还不清楚, 但 NIRF 作为 P53 泛素化连接酶已经很清晰地显示出来.

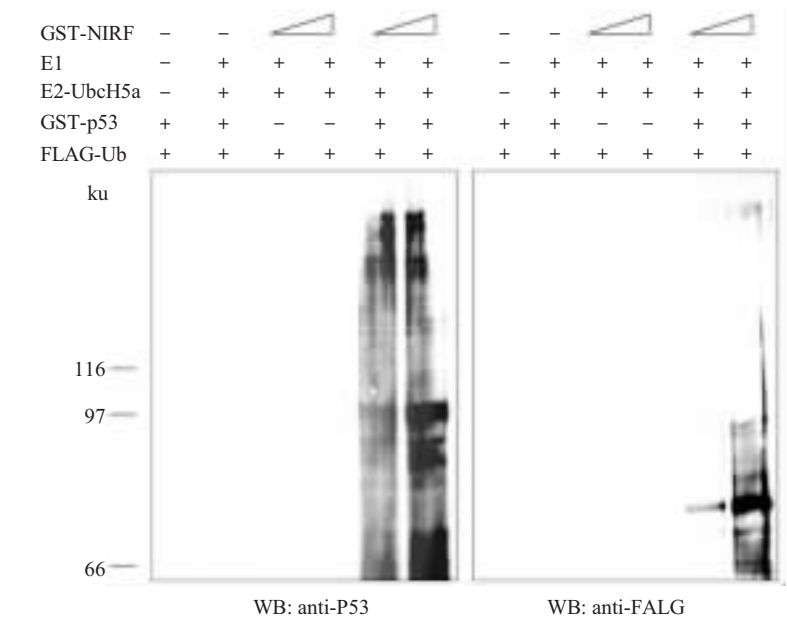


Fig. 6 *In vitro* ubiquitination of P53 by NIRF
The *in vitro* ubiquitination reaction was performed as described in Section 2.5 with the indicated combinations of GST-P53, E1 and E2-UbcH5a, FLAG-Ub, GST-NIRF. After completion of the ubiquitination reaction, the products were subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting (WB) analysis. The blots were probed with anti-P53 antibody or anti-FLAG antibody.

4 讨 论

NIRF是近年才发现的一个新的蛋白质，在细胞内能与 Cdk2-cyclin E2 和 PCNP 结合，并能对后者进行泛素化，因为其 RING finger 结构域具有泛素化活性^[1~3]。即 NIRF 能将活化后的泛素分子转移到底物蛋白上，从而促使泛素化的底物分子在泛素化降解系统的作用下被降解。为了证实 P53 能被 NIRF 泛素化，首先我们要证实的是 NIRF 能否与 P53 蛋白相互结合，这是 NIRF 对 P53 进行泛素化最根本的前提。我们分别应用 IP 技术和 GST pull-down 技术证实，NIRF 不论是在细胞内还是细胞外均能与 P53 蛋白结合(图 2，图 4)。我们也注意到，当外源性蛋白在细胞内表达量很高时，可能会造成过量表达的蛋白质之间出现非特异性结合^[9]。为了消除这种因素的影响，本文特别设计了 NIRF 与内源性 P53 蛋白 (endogenous P53) 之间的相互作用实验，结果表明，NIRF 也能与 HEK293 细胞的内源 P53 蛋白结合(图 3)。NIRF 能与 P53 特异性地结合的结论是我们探求 NIRF 能否对 P53 进行泛素化的最基本证据。

泛素化是胞内蛋白质降解的一个重要途径，它是在泛素活化酶 E1(ubiquitin activating enzymes)和泛素结合酶 E2 (ubiquitin conjugating enzymes) 的帮

助下，利用泛素化连接酶 E3 将泛素分子连接到底物上去，被连接了泛素的蛋白质就会被胞内的一种特有的泛素化蛋白酶 (proteasome) 识别并降解，这种降解一般在胞质中进行^[8~11]。由于细胞内蛋白泛素化降解系统的存在，使细胞能有效地调节相关蛋白质的水平。蛋白质被泛素化后能用蛋白质印迹法很方便地检测出来。因为当靶蛋白被加上了泛素分子后，靶蛋白的分子质量就有所增加，在免疫印迹结果中就表现出“拖尾”(图 5，图 6)。增加的泛素分子越多，靶蛋白的分子质量增加值就越大，“拖尾”就越长。被泛素化的靶蛋白在细胞内很容易被泛素蛋白酶识别，并将泛素化的靶蛋白降解，为了在免疫印迹结果中能很好地观察到带纹，研究者常常使用泛素化蛋白抑制剂，例如 MG-132 等，来抑制泛素化蛋白酶的活性^[12]。同时选用不同的细胞株来进行胞内泛素化研究也是一个有效的手段，例如 HEK293 细胞就是一个好的选择。HEK293 细胞内泛素化系统已经被得到有效地抑制，被泛素化的蛋白质能很好地被分离和检测。

从 NIRF 的结构上看，它含有一个 UBL 和 RING Finger 结构域^[9]，这两个结构具有与泛素化蛋白酶结合和泛素分子连接功能，这样的结构域是作为一个泛素连接酶的结构基础^[11,13]。事实上，NIRF 作为 E3 参与胞内蛋白泛素化已经由 Mori

等^[3]通过 NIRF 的自身泛素化和 NIRF 对 PCNP 的泛素化得到证实. 最近 Li 等^[1]报道了 NIRF 能与 Cdk2-cyclin E 结合而抑制 Cdk2-cyclin E 的活性, 同时 NIRF 与 Cdk2-cyclin E 结合时又会被 Cdk2-cyclin E 磷酸化. 流式细胞分析发现, 被转染了 NIRF 的 HEK293 细胞周期相发生改变, G1 期细胞明显增加, 提示 NIRF 最终是参与细胞周期负调节的蛋白质之一.

P53 是细胞周期调节的一个重要蛋白质, 细胞内主要由 Mdm2, E6/E6AP, P300, Pirh2, COP1 等蛋白质参与泛素化降解调节^[5,6], P53 虽然是核蛋白, 但其泛素化降解是在细胞质内进行的^[13]. 同时 P53 的泛素化降解也被 MdmX、RAF 和 HAUSP 等分子抑制. 本研究结果表明, NIRF 在细胞内也参与了 P53 的泛素化过程. 已有研究表明, 被泛素化的 P53 蛋白最终将在细胞质内通过蛋白泛素化系统进行降解, 从而达到对 P53 蛋白的负调节目的^[6,7,9,10]. 我们推测, 既然 NIRF 参与 P53 蛋白特异性地结合, 并且能将 P53 蛋白进行泛素化, 那么 NIRF 可能是一个新的 P53 负调节蛋白. 至于泛素分子是被加到 P53 的哪个氨基酸残基上, 细胞内哪些蛋白质能对此泛素化过程进行抑制等, 则有待于更进一步地探讨.

参 考 文 献

1 Li Y, Mori T, Hata H, *et al.* NIRF induces G1 arrest and associates

with Cdk2. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **319** (2): 464~468

2 Mori T, Li Y, Hata H, *et al.* NIRF, a novel RING finger protein, is involved in cell-cycle regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **296** (3): 530~536

3 Mori T, Li Y, Hata H, *et al.* NIRF is a ubiquitin ligase that is capable of ubiquitinating PCNP, a PEST-containing nuclear protein. *FEBS Lett*, 2004, **557** (1~3): 209~214

4 Moll U M, Petrenko O. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res*, 2003, **1** (14): 1001~1008

5 Shmueli A, Oren M. Regulation of p53 by Mdm2: fate is in the numbers. *Mol Cell*, 2004, **13** (1): 4~5

6 Vogelstein B, Lane D, Levine A J. Surfing the p53 network. *Nature*, 2000, **408** (6810): 307~310

7 Yang Y, Li C C, Weissman A M. Regulating the p53 system through ubiquitination. *Oncogene*, 2004, **23** (11): 2096~2106

8 Pickart C M, Eddins M J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1695** (1~3): 55~72

9 Smalle J, Vierstra R D. The ubiquitin 26 S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, **55**: 555~590

10 Roos-Mattjus P, Sistonen L. The ubiquitin-proteasome pathway. *Ann Med*, 2004, **36** (4): 285~295

11 Joazeiro C A, Weissman A M. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*, 2000, **102** (5): 549~552

12 Magae J, Illenye S, Tejima T, *et al.* Transcriptional squelching by ectopic expression of E2F-1 and p53 is alleviated by proteasome inhibitors MG-132 and lactacystin. *Oncogene*, 1997, **15** (7): 759~769

13 Robinson P A, Ardley H C. Ubiquitin-protein ligases. *J Cell Sci*, 2004, **117**: 5191~5194

Studies on The Interactions Between NIRF and P53*

DUAN Chang-Zhu¹⁾, PU Shu-Ping¹⁾, TSUTOMU MORI²⁾, HIDEO KOCHI²⁾, QIU Zong-Yin^{3)**}

¹⁾Department of Cell Biology and Heredity, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China;

²⁾The 1st Department of Biochemistry, Fukushima Medical University, Japan;

³⁾Department of Pharmacology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract HEK293 or HeLa cells were transfected by NIRF and, or P53, whole cell extracts and immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting. GST pull-down was carried out to identify the interactions between NIRF and P53. *In vitro* ubiquitination reaction was carried out to identify P53 ubiquitinate by NIRF. The results suggested that NIRF could interact with P53 *in vivo* and *in vitro*. The results also showed that NIRF could ubiquitinate P53 *in vivo* and *in vitro*. The results indicated that NIRF would be a new negative regulator of P53.

Key words NIRF, P53, GST pull-down, ubiquitination

*This work was supported by JBIC.

**Corresponding author. Tel/Fax: 86-23-68485118, E-mail: zongyin@shou.com

Received: August 30, 2005 Accepted: October 20, 2005