

蛋白磷酸酶PP2A主要通过B'家族调节亚基介导 Dishevelled2蛋白的去磷酸化

张妙君 谢建磊 王娟娟 吴畏*

(清华大学生命科学学院, 北京 100084)

摘要 Dishevelled2(Dvl2)是Wnt信号通路中的关键蛋白因子且受到剧烈的磷酸化调控。蛋白磷酸酶2A(PP2A)是Dvl2的一种磷酸酶,参与Dvl2的去磷酸化调控。PP2A有多达16种调节亚基,决定着PP2A的底物特异性,但参与调节Dvl2去磷酸化的PP2A调节亚基尚未有全面研究。该文在一种细胞系中,通过siRNA逐一敲低PP2A调节亚基基因表达,分析了所有调节亚基在Dvl2磷酸化调控中的参与程度。结果显示,多种PP2A调节亚基参与Dvl2去磷酸化,其中B'家族全部成员均有参与,起到主要调控作用。细胞共定位和蛋白互作实验结果同样印证PP2A调节亚基B'家族成员参与Dvl2蛋白的磷酸化调控。该研究明确了对Dvl2蛋白去磷酸化起调控作用的PP2A调节亚基,有助于了解PP2A调节亚基的细胞生物学功能以及与底物的关系。

关键词 Dvl2; 磷酸化; PP2A; 调节亚基

Dishevelled2 De-phosphorylation by PP2A is Largely Mediated by B' family Regulatory Subunits

ZHANG Miaojun, XIE Jianlei, WANG Juanjuan, WU Wei*

(School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Dishevelled2 (Dvl2) is a key protein factor in Wnt signaling and is intensely regulated by phosphorylation. Protein phosphatase 2A (PP2A), a phosphatase of Dvl2, participates in the regulation of Dvl2 via de-phosphorylation. There are 16 regulatory subunits in PP2A in total, which determine the substrate specificity of PP2A. However, no comprehensive study has been conducted on these regulatory subunits to clearly decipher those involved in de-phosphorylation of Dvl2. Through siRNA-based knocking down of each PP2A regulatory subunit gene in one cell line, we analyzed all regulatory subunits' roles in regulating the de-phosphorylation of Dvl2. It turned out that multiple PP2A regulatory subunits were involved in the regulation of de-phosphorylation of Dvl2, especially for members of B' family regulatory subunits. All members in B' family were involved, contributing as the predominant regulatory subunits. Cell co-localization and co-immunoprecipitation experiments also confirmed the regulatory roles in Dvl2 de-phosphorylation played by PP2A B' regulatory subunits. In summary, this study clarifies the specific PP2A regulatory subunits participating in the regulation of Dvl2 de-phosphorylation and facilitates the understanding of the cellular functions of PP2A regulatory subunits and their relationships with substrates.

Keywords Dvl2; phosphorylation; PP2A; regulatory subunits

收稿日期: 2019-04-24 接受日期: 2019-06-17

国家自然科学基金(批准号: 31471314)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-62797127, E-mail: wwu@mail.tsinghua.edu.cn

Received: April 24, 2019 Accepted: June 17, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31471314)

*Corresponding author. Tel: +86-10-62797127, E-mail: wwu@mail.tsinghua.edu.cn

网络出版时间: 2019-09-30 10:17:24

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190930.1017.002.html>

Dishevelled是Wnt信号通路中的一个关键因子,对经典Wnt信号和非经典Wnt信号都是必需的。Dvl蛋白包含保守的DIX、PDZ和DEP结构域,通过PDZ结构域与Frizzled受体的胞质端直接互动,在Frizzled下游介导信号转导的发生^[1]。Dvl蛋白自身受到磷酸化、泛素化和甲基化等翻译后修饰的调控。其中,磷酸化对Dvl蛋白的稳定性、聚合状态、细胞定位等发挥重要调控作用。质谱分析显示,Dvl蛋白上可能有50多个丝氨酸/苏氨酸磷酸化位点,大多数磷酸位点在Dvl蛋白的不同亚型间较为保守^[2]。现已有很多关于参与Dvl磷酸化修饰激酶的研究,如CK1(casein kinase 1)、CK2(casein kinase 2)、PAR1(Prader-Willi/Angelman region-1)、RIPK4(receptor-interacting protein kinase 4)和NEK2(NIMA-related kinase 2)等激酶,都被发现与Dvl蛋白有互作关系,并可磷酸化Dvl蛋白^[3-6]。每一种激酶磷酸化Dvl蛋白的位点及其功能非常复杂,目前只得到部分阐释。比如,由CK1 δ/ϵ 参与的Dvl2 S143和T224位点的磷酸化,促进了Dvl2与Plk1(polo-like kinase 1)的相互作用,进而调控Wnt5a-CK1 ϵ -Dvl2依赖的初级纤毛解聚^[7]。又如,Wnt配体的刺激会促进CK1 ϵ 对Dvl2 C-端由S594、T595、S597和T604四个磷酸化位点构成的10B5表位的磷酸化。由于这四个位点磷酸化水平的上升导致一种Dvl2抗体(10B5)识别的减弱,故这些位点被合称为10B5表位。将这些位点突变为丙氨酸会导致Dvl2蛋白在细胞质中颗粒状定位形式的增加以及对经典Wnt信号通路激活功能的增强^[8]。

与激酶相比,人们对去磷酸化Dvl蛋白磷酸酶的了解相对有限^[1,9]。蛋白磷酸酶PP2A(protein phosphatase 2A)被认为是主要的Dvl蛋白磷酸酶^[10]。近期我们实验室^[11]发现,PPP5C(phosphoprotein phosphatase 5C)是另一种Dvl2的磷酸酶。与PPP5C利用其蛋白N-端的调节结构域来进行底物的识别和活性调控不同,PP2A与其他丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶(phosphoprotein phosphatase)一样,拥有多种调节亚基来帮助其识别底物。PP2A是由结构亚基(PP2Aa/PR65)、催化亚基(PP2Ac)以及调节亚基一起构成的异源三聚体丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶。结构亚基作为支架蛋白,连接催化亚基和调节亚基共同形成PP2A全酶;催化亚基具有磷酸酶活性;而调节亚基则起到调控作用,决定PP2A全酶对底物的识别以及亚细胞定位。另外,调节亚基基因表现出特定的组

织和细胞差异表达模式^[12]。

PP2A调节亚基具有显著的多样性。目前人类基因组中发现至少16个基因编码PP2A调节亚基,这些基因能够产生26种以上不同的转录本,是PP2A全酶结构与功能多样性的重要来源^[12]。PP2A调节亚基可以分为四个家族,分别是B、B'、B''和B'''家族^[12](表1)。除了与结构亚基N-端HEAT结构域相互作用的区域有部分保守的氨基酸序列外,各家族之间不存在序列上的显著相似性^[13-14]。B家族包括4个基因,其中PR55 β 和PR55 γ 主要表达于大脑组织中,而PR55 α 和PR55 δ 则在各种组织中广泛表达,并且各成员的表达水平与发育阶段相关^[12,15]。B'家族由5个基因组成,表达具有组织特异性,家族成员的特征是均能被磷酸化,且大部分具有 α 螺旋结构。该家族各成员在蛋白中间部分有80%的序列相似性,但N-端和C-端序列不同^[15]。B''家族成员主要由3个不同基因编码,该家族各成员均含有EFX结构域,依赖Ca²⁺水平调节与核心酶的结合和后续的磷酸酶活性^[16-18]。B'''家族主要是一类隆文菌素蛋白(striatin),以及最初因能与结构亚基相互作用而纳入调节亚基的成员PTPA(PTPase activator)。Striatin属于WD-repeat家族的成员之一,在钙离子存在的条件下能够与钙调素蛋白结合。PTPA的显著特性是在体外较短时间内能够去磷酸化催化亚基和核心酶,且该成员均需要ATP和Mg²⁺激活自身活性^[12,15]。

作为一种广泛表达、功能多样的磷酸酶,PP2A能够去磷酸化Wnt信号通路包括Dvl在内的多个关键蛋白,进而对Wnt信号通路发挥着复杂的调控作用^[10]。然而,对于PP2A调控Dvl2磷酸化状态的细节我们依然所知甚少。考虑到调节亚基在PP2A功能中发挥的重要作用,我们拟通过对参与Dvl2磷酸化状态调控的PP2A调节亚基进行系统的鉴定和功能分析,来进一步揭示PP2A调控Dvl2磷酸化状态与功能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞系 用Gibco公司的DMEM培养基培养HEK293T细胞和HeLa细胞。用中科迈辰(北京)科技有限公司的McCoy's 5A培养基培养HCT116细胞。所有完全培养基均加入青霉素、链霉素和10%的胎牛血清。

表1 PP2A调节亚基的分类

Table 1 Classification of PP2A regulatory subunits

PP2A调节亚基 PP2A regulatory subunits	别名 Alternate name	基因名 Gene name	本文中的简写 Abbreviation
B/B55/PR55 family	PR55 α	<i>PPP2R2A</i>	2A
	PR55 β	<i>PPP2R2B</i>	2B
	PR55 γ	<i>PPP2R2C</i>	2C
	PR55 δ	<i>PPP2R2D</i>	2D
B'/B56/PR61 family	PR61 α	<i>PPP2R5A</i>	5A
	PR61 β	<i>PPP2R5B</i>	5B
	PR61 γ	<i>PPP2R5C</i>	5C
	PR61 δ	<i>PPP2R5D</i>	5D
	PR61 ϵ	<i>PPP2R5E</i>	5E
B'' family	PR72/130	<i>PPP2R3A</i>	3A
	PR48/70	<i>PPP2R3B</i>	3B
	G5PR	<i>PPP2R3C</i>	3C
B''' family	Striatin	<i>STRN</i>	RN
	SG2NA	<i>STRN3</i>	RN3
	PR110	<i>STRN4</i>	RN4
	PTPA	<i>PPP2R4</i>	R4

1.1.2 实验试剂与器材 EZ-10 DNAaway RNA小量提取试剂盒购自BBI生命科学公司; 反转录试剂盒购自ThermoFisher Scientific公司; 无内毒素质粒中提试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司; 凝胶DNA回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; DNA片段纯化试剂盒购自TaKaRa公司; 转染试剂VigoFect购自威格拉斯生物技术公司; Lipofectamine 2000和Lipofectamine 3000购自Invitrogen公司; 兔源Dvl2和兔源FLAG抗体购自Cell Signaling Technology公司; 鼠源Dvl2(10B5)和鼠源Myc抗体购自Santa Cruz Technology公司; 兔源Dvl2(S143)抗体购自Abcam公司; 鼠源 β -actin购自三箭生物技术有限公司; FLAG M2抗体偶联凝胶珠购自Sigma-Aldrich公司; 质粒构建相关酶和缓冲液购自TaKaRa公司。

1.2 实验方法

1.2.1 siRNA转染 siRNA由广州锐博生物科技有限公司根据15个PP2A调节亚基基因序列设计并合成, 每个基因分别设计3条独立的siRNA。按该公司推荐方法在HCT116细胞中进行siRNA瞬时转染, 48 h后收集样品, 利用RNA提取试剂盒提取总RNA, 然后将1.5 μ g RNA根据反转试剂盒的方法反转录为cDNA后, 通过实时定量荧光PCR(RT-qPCR)检测其mRNA表达水平, 以确认各siRNA对特定基因表达

的敲低效率。在确认siRNA的有效性(mRNA水平相对于对照组降低到30%以下)后, 同样按锐博公司推荐方法在HCT116细胞中瞬时转染有效的siRNA, 48 h后对细胞进行相应的处理。之后通过Western blot检测总Dvl2蛋白, 以及Dvl2 S143位点和10B5表位的磷酸化水平。

1.2.2 PP2A全酶调节亚基基因克隆 设计16个调节亚基基因相应的引物, 以HEK293T细胞cDNA为模板, 扩增对应的基因, 将其克隆到含N-端FLAG的pCS2+质粒中。其中部分基因的cDNA由韩家准实验室(<http://hanlab.xmu.edu.cn/cdna/>)惠赠, STRN4的cDNA购自Origene。构建完成的质粒均经测序比对确认其序列正确, 并通过Western blot确认其蛋白表达。

1.2.3 细胞免疫荧光 将HeLa细胞培养于盖玻片上, 进行相应的质粒转染。24 h后用PBS洗涤细胞, 之后用4%多聚甲醛固定15 min。接着用0.2% Triton X-100通透10 min后, 用2% BSA封闭30 min。然后添加一抗并于4 $^{\circ}$ C孵育过夜。第二天用PBS浸洗3次后, 室温孵育二抗1 h。用DAPI对细胞核进行染色。之后在载玻片上滴加防淬灭剂, 将盖玻片带细胞的一面铺在防淬灭剂上, 放置15 min后, 在盖玻片周围涂上透明指甲油封片。最后, 在共聚焦显微镜中观

察Dvl2和调节亚基因的亚细胞定位情况。

1.2.4 免疫共沉淀 在HEK293T细胞中进行相应的质粒转染, 30 h后收集细胞, 用裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH7.5、150 mmol/L NaCl、2 mmol/L EDTA、1% NP-40、磷酸酶和蛋白酶抑制剂)于4 °C裂解30 min, 12 000 r/min高速离心15 min。取30 μ L上清液, 加入30 μ L 4 \times SDS上样缓冲液, 95 °C处理5 min, 用于Western blot分析。其余上清与预处理过的FLAG M2 beads于4 °C孵育过夜。之后于4 °C低速离心2 min, 小心吸去上清。接着用800 μ L裂解缓冲液(加入0.1% SDS, NaCl浓度提高到300 mmol/L)于4 °C洗5~6次, 最后加入60 μ L的2 \times SDS上样缓冲液, 95 °C处理5 min, 用于Western blot分析。

2 结果

2.1 PP2A调节亚基B'家族是PP2A去磷酸化Dvl2的主要调节亚基

在Wnt配体的刺激下, Dvl蛋白被磷酸化并激活, 进而介导下游的信号传递。p-S143抗体特异识别S143位点磷酸化的Dvl2蛋白, 而10B5抗体特异识别10B5表位(S594-T595-S597-T604, 合称10B5表位)非磷酸化的Dvl2蛋白, 都可以在Western blot实验中显示Dvl2蛋白的磷酸化状态^[7-8]。另外, 磷酸化会导致Dvl2蛋白在蛋白胶中迁移变慢, 也常用于Dvl2蛋白磷酸化状态的监测。

为了鉴定哪些PP2A调节亚基参与了对Dvl2磷酸化状态的调控, 我们首先利用RT-qPCR技术, 在结肠癌细胞系HCT116中检测了16种调节亚基基因的表达水平, 结果显示, 除PPP2R2B(2B)外, 其余15个调节亚基基因在该细胞系中均有一定程度的表达(结果没有显示)。然后, 我们利用siRNA逐一敲低这15种调节亚基基因的mRNA水平, 检测对内源Dvl2磷酸化状态的影响。在初筛中, 每个基因选取一条siRNA, RT-qPCR结果显示相对应的mRNA都获得了显著的敲低效果(结果没有显示)。已有研究显示, Wnt3a处理可以增强PP2A与Dvl2的相互作用^[10], 因此, 我们在每一种调节亚基基因敲低的细胞中, 用Wnt3a条件培养基处理2 h, 之后检测内源Dvl2蛋白的磷酸化状态, 包括p-S143信号, 10B5信号以及Dvl2蛋白在电泳胶中的迁移。

与对照相比, Wnt3a处理能够促进Dvl2蛋白在S143和10B5表位的磷酸化(10B5表位磷酸化的增强

表现为10B5抗体识别信号的减弱), 并导致Dvl2总蛋白迁移速率的降低(图1, 箭头显示因磷酸化而延缓的条带)。敲低不同的PP2A调节亚基基因表达对Dvl2在S143位点和10B5表位磷酸化状态的影响存在较大的差异。

B家族(2A、2C和2D)中, 2A的敲低减弱了10B5信号, 导致Dvl2蛋白较慢迁移带增加, 但对p-S143没有显著影响; 2C的敲低导致p-S143信号稍有增强, Dvl2蛋白较慢迁移带也略有增加, 但对10B5信号没有显著影响; 2D的敲低导致p-S143信号稍有增强, Dvl2蛋白较慢迁移带略有增加, 但对10B5信号没有显著影响(图1A)。

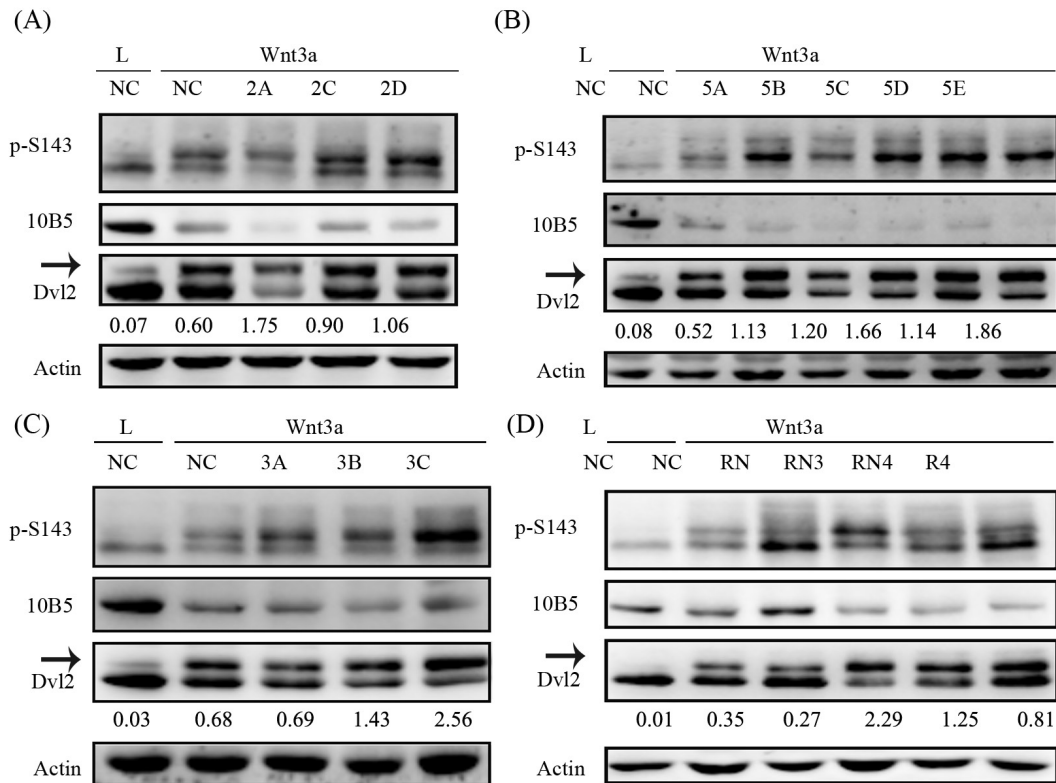
B'家族(5A-5E)的敲低均导致p-S143信号明显的增强和10B5信号的减弱, 以及Dvl2较慢迁移带的增加, 显示B'家族均参与了Dvl2磷酸化水平的调节(图1B)。

B''家族(3A-3C)中, 3C的敲低导致p-S143信号的显著增强, 以及Dvl2蛋白较慢迁移带的显著增加; 3A的敲低导致p-S143信号稍有增强, 但对10B5信号和Dvl2蛋白迁移没有显著影响; 3B的敲低导致p-S143信号以及Dvl2蛋白较慢迁移带都有一定增加, 但整体影响较弱(图1C)。

B'''家族(R4、RN、RN3和RN4)中, RN的敲低对Dvl2蛋白迁移没有影响, p-S143信号有一定增强, 但10B5信号也有所增强(显示该位点磷酸化减少, 原因未知); RN3的敲低导致显著的Dvl2蛋白较慢迁移带增加和p-S143信号增强, 以及10B5信号轻微的减弱; RN4的敲低导致Dvl2蛋白较慢迁移带增加, 10B5信号稍有减弱, 但p-S143信号变化不明显; R4的敲低导致p-S143信号和Dvl2蛋白较慢迁移带稍有, 但总体变化不太显著(图1D)。

以上结果在三次独立实验室中基本一致。为了进一步确认上述结果并排除siRNA可能的脱靶效应, 我们对上述有显著影响的所有基因都用另外两条siRNA做了验证, 获得了类似的结果(结果没有显示)。

综上, 我们利用siRNA逐个敲低HCT116细胞中PP2A调节亚基各家族基因的表达, 检测了它们对Dvl2蛋白磷酸化水平的影响。结果显示, PP2A的16个调节亚基中, B'家族所有成员、PPP2R3C(3C)、PPP2RN3(RN3)显著地参与了PP2A在HCT116细胞中对Dvl2蛋白的去磷酸化调控。



A: B家族调节亚基因敲低后对Dvl2磷酸化的影响; B: B'家族调节亚基因敲低后对Dvl2磷酸化的影响; C: B''家族调节亚基因敲低后对Dvl2磷酸化的影响; D: B'''家族调节亚基因敲低后对Dvl2磷酸化的影响。HCT-116细胞中分别转染100 nmol/L针对各PP2A调节亚基的siRNA或对照siRNA, 48 h后, 分别用对照条件培养基(L)或Wnt3a培养基(Wnt3a)处理细胞2 h, 然后裂解细胞, 用Western blot检测相关蛋白。Dvl2抗体识别两条带, 箭头显示因强烈磷酸化而迁移滞后的条带, 数字是较慢条带(上)信号与较快条带(下)信号的比值。10B5抗体识别非磷酸化的10B5表位(S594、T595、S597和T604), 信号减弱意味着磷酸化增加。p-S143抗体识别磷酸化的S143位点。n=3。

A: Dvl2 phosphorylation after knockdown of B family regulatory subunits; B: Dvl2 phosphorylation after knockdown of B' family regulatory subunits; C: Dvl2 phosphorylation after knockdown of B'' family regulatory subunits; D: Dvl2 phosphorylation after knockdown of B''' family regulatory subunits. HCT-116 cells were transfected by PP2A regulatory subunits siRNA or control siRNA, 100 nmol/L. After 48 h, cells were treated with L conditional medium (L) or Wnt3a conditional medium (Wnt3a) for 2 h. Then cell lysates were prepared and analyzed by Western blot. Dvl2 antibody detected two bands, and the arrow indicates the band that migrated slowly as a result of heavy phosphorylation. The number represented the ratio of the upper band against the lower band. 10B5 antibody detected non-phosphorylated 10B5 sites (S594, T595, S597 and T604), and therefore abated signal meant elevated phosphorylation. p-S143 antibody detected phosphorylated S143 site. n=3.

图1 参与Dvl2磷酸化调控的PP2A调节亚基的初步筛选

Fig.1 Screening of PP2A regulatory subunits involved in the regulation of de-phosphorylation of Dvl2

2.2 PP2A部分调节亚基和Dvl2存在细胞共定位

PP2A对底物的识别主要是通过多样化的调节亚基来实现的, 且调节亚基具有不同的亚细胞定位^[12,15]。因此, 我们检测了这16种调节亚基的亚细胞定位以及它们与Dvl2蛋白是否有共定位现象。

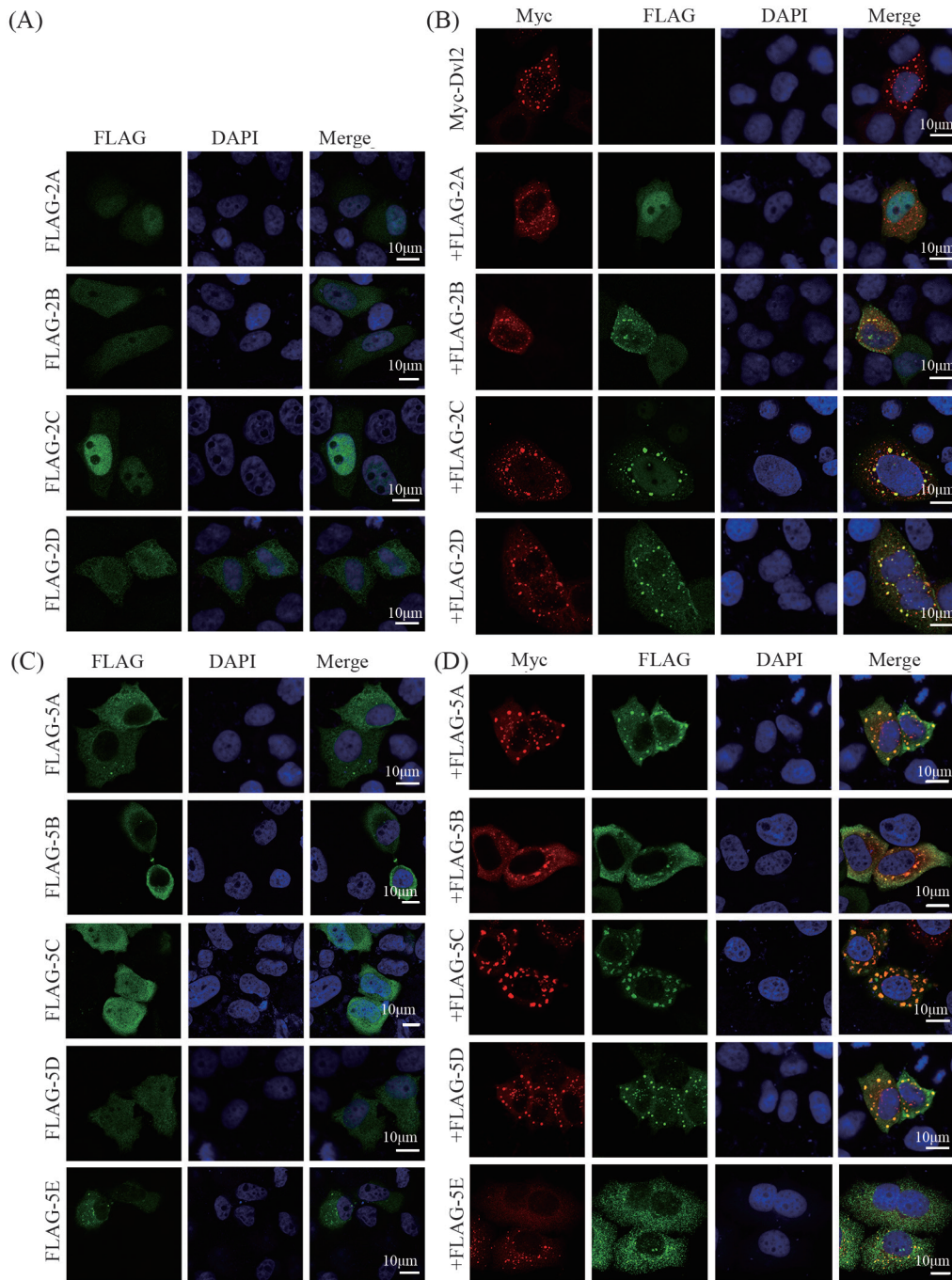
在HeLa细胞中, 瞬时表达的myc-Dvl2主要定位于细胞质中, 以弥散状和颗粒状两种状态存在, 比例约为1:1。PP2A调节亚基B家族成员均呈弥散状分布于细胞质和细胞核。与Dvl2共表达时, 2C和2D与Dvl2在细胞质存在颗粒状的共定位, 其余成员与Dvl2无明显颗粒聚集定位(图2A和图2B)。

B'家族中5A、5B和5E偏向于细胞质定位, 5C和

5D均匀分布于细胞质和细胞核, 呈弥散状。与Dvl2共表达时, 5A、5C和5D与Dvl2蛋白在细胞质中呈现显著的颗粒状共定位, 并且5C和5D的细胞核定位明显减弱。5B和5E也呈现一定的与Dvl2蛋白的颗粒状共定位, 虽然与其他3个亚基相比较弱一些(图2C和图2D)。

B''家族中3A定位于细胞质, 3B和3C定位于细胞质与细胞核, 均呈弥散状分布。与Dvl2共表达不改变其定位和分布状态, 该家族与Dvl2均不存在明显的共定位(图3A和图3B)。

B'''家族中RN和RN3主要弥散状定位于细胞质, RN4和R4在细胞质和细胞核中弥散状分布。与



A: PP2A调节亚基B家族亚细胞定位; B: B家族与Dvl2共定位情况; C: PP2A调节亚基B'家族亚细胞定位; D: B'家族与Dvl2共定位情况。在HeLa细胞中转染相应质粒, 24 h后固定细胞, 用免疫荧光实验检测Myc-Dvl2(红色)与带有FLAG标签的B家族和B'家族调节亚基(绿色)的亚细胞定位, 用DAPI标记细胞核(蓝色)。n=2。

A: cell localization of B family regulatory subunits; B: co-localization of B family regulatory subunits and Dvl2; C: cell localization of B' family regulatory subunits; D: co-localization of B' family regulatory subunits and Dvl2. In HeLa cells, plasmids were transfected, and 24 h later, cells were fixed. Then Myc-Dvl2 (Red), B and B' family regulatory subunits with Flag tag (Green) were detected by IF, and cell nuclei were stained by DAPI (Blue). n=2.

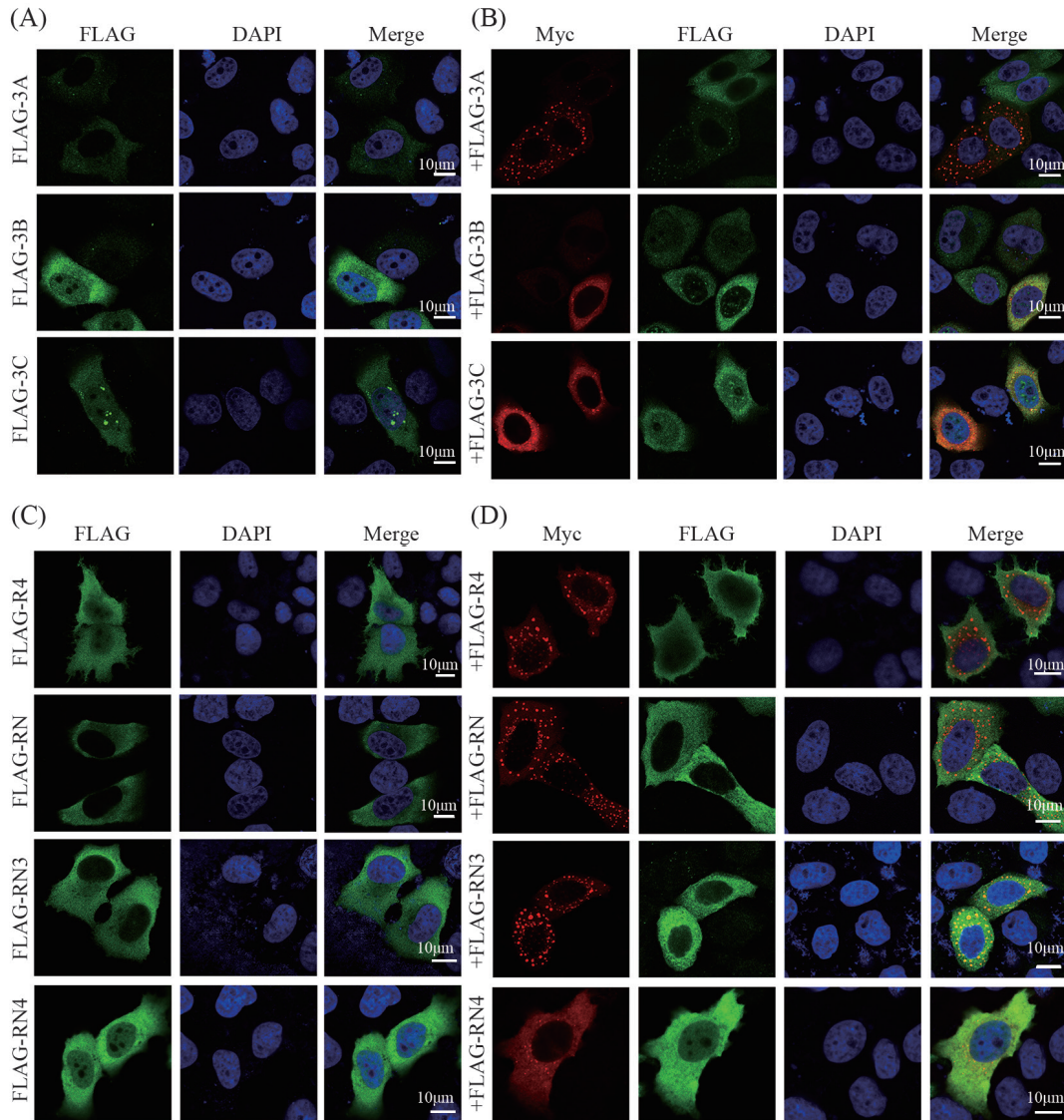
图2 PP2A调节亚基B和B'家族亚细胞定位及其与Dvl2的共定位

Fig.2 Localization of PP2A B and B' regulatory subunits and their co-localization with Dvl2

Dvl2共表达后, 定位和分布均不变, 也没有明显的颗粒状共定位(图3C和图3D)。

综上, PP2A调节亚基中, PPP2R2C(2C)、PPP2R2D(2D)、

PPP2R5A(5A)、PPP2R5C(5C)和PPP2R5D(5D)与Dvl2存在明显的颗粒状共定位, 5B和5E也与Dvl2蛋白有较弱的颗粒状共定位, 表明这些亚基与Dvl2蛋白可能有相



A: PP2A调节亚基B''家族亚细胞定位; B: B''家族与Dvl2共定位情况; C: PP2A调节亚基B'''家族亚细胞定位; D: B'''家族与Dvl2共定位情况。在HeLa细胞中转染相应质粒, 24 h后固定细胞, 用免疫荧光实验检测Myc-Dvl2(红色)与带有FLAG标签的B''家族和B'''家族调节亚基(绿色)的亚细胞定位, 用DAPI标记细胞核(蓝色)。n=2。

A: cell localization of B'' family regulatory subunits; B: co-localization of B'' family regulatory subunits and Dvl2; C: cell localization of B''' family regulatory subunits; D: co-localization of B''' family regulatory subunits and Dvl2. In HeLa cells, plasmids were transfected, and 24 h later cells were fixed. Then Myc-Dvl2 (Red), B'' and B''' family regulatory subunits with Flag tag (Green) were detected by IF, and cell nuclei were stained by DAPI (Blue). n=2.

图3 PP2A调节亚基B''和B'''家族亚细胞定位及其与Dvl2的共定位

Fig.3 Localization of PP2A B'' and B''' regulatory subunits and their co-localization with Dvl2

互作用, 参与PP2A对Dvl2的识别, 进而调节Dvl2的去磷酸化。

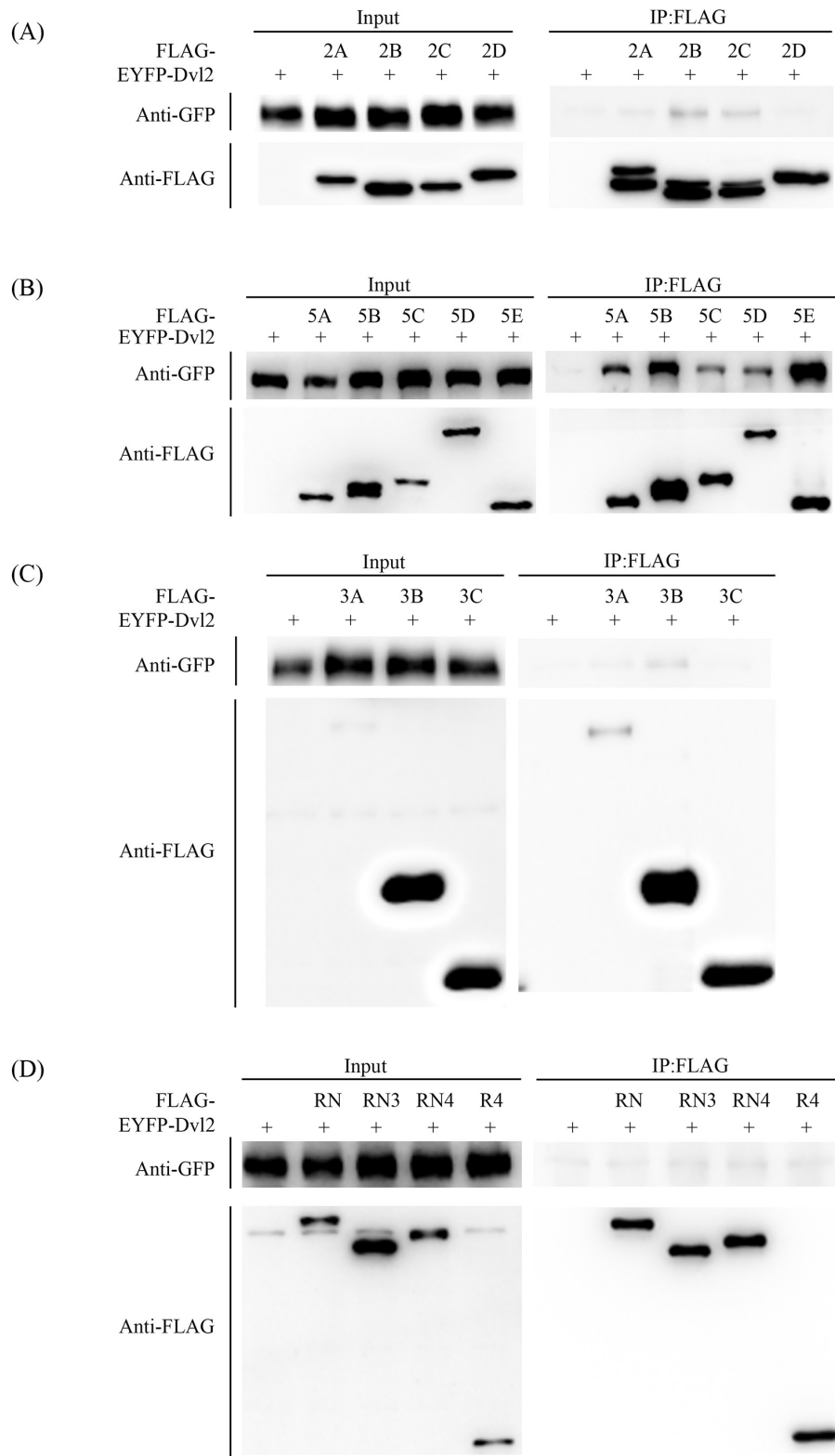
2.3 PP2A调节亚基B''家族与Dvl2存在相互作用

为了更直观地检测PP2A调节亚基对底物Dvl2的识别作用, 我们利用免疫共沉淀(Co-IP)技术在HEK293T细胞中检测了瞬转表达的PP2A调节亚基与Dvl2的蛋白互作关系。

结果如图4所示, 所有PP2A的调节亚基中, 只

有B''家族所有成员与Dvl2蛋白有明显的互作关系(图4B), 其余调节亚基与Dvl2蛋白都没有互作或者只有非常微弱的互作(图4A、图4C和图4D)。其中, 2B、2C和3B显示非常弱的互作, 很可能是间接的互作关系。

综上, PP2A的16种调节亚基中, 只有B''家族成员能够与Dvl2蛋白发生较强的相互作用, 敲低时导致内源Dvl2的磷酸化增强, 且共表达时与Dvl2蛋白



A: PP2A调节亚基B家族与Dvl2的相互作用情况; B: PP2A调节亚基B'家族与Dvl2的相互作用情况; C: PP2A调节亚基B''家族与Dvl2的相互作用情况; D: PP2A调节亚基B'''家族与Dvl2的相互作用情况。在HEK293T细胞中同时转染相应的带N-端FLAG的PP2A调节亚基和EYFP-Dvl2质粒, 30 h后裂解细胞, 用免疫共沉淀实验检测PP2A调节亚基和Dvl2的相互作用。n=2。

A: interaction between B family regulatory subunits and Dvl2; B: interaction between B' family regulatory subunits and Dvl2; C: interaction between B'' family regulatory subunits and Dvl2; D: interaction between B''' family regulatory subunits and Dvl2. In HEK293T cells, N-terminal Flag-tag PP2A regulatory subunits and EYFP-Dvl2 plasmids were transfected. Cell lysates were prepared 30 h later, and Co-IP experiments were performed. n=2.

图4 PP2A调节亚基和Dvl2的相互作用

Fig.4 Interaction between PP2A regulatory subunits and Dvl2

存在显著的亚细胞共定位。这些结果清晰地显示, 蛋白磷酸酶PP2A主要通过B'家族调节亚基识别并结合Dvl2蛋白, 介导Dvl2的去磷酸化。

3 讨论

PP2A是Dvl2蛋白的一种磷酸酶, 在Wnt信号中起到重要的去磷酸化调控作用^[10]。PP2A全酶由结构亚基, 催化亚基和调节亚基构成, 其中调节亚基至少由16种基因编码。为了确定参与Dvl2去磷酸化调控的PP2A调节亚基, 我们完成了如下系统性的研究: (1)在HCT116细胞中对PP2A调节亚基各家族成员基因进行逐一敲低, 然后检测了内源Dvl2蛋白在S143位点和10B5表位的磷酸化状态, 以及Dvl2蛋白的总体磷酸化情况(表现为在聚丙烯酰胺胶中迁移状况)的变化; (2)在HeLa细胞中把调节亚基成员逐一与Dvl2蛋白共表达, 分析它们的细胞定位及其相互影响; (3)在HEK293T细胞中用免疫共沉淀技术检测Dvl2蛋白与每一个调节亚基的蛋白互作关系。

结果显示, 虽然16个PP2A调节亚基基因中的15个在HCT116中有表达, 但只有部分调节亚基参与了PP2A对Dvl2蛋白的去磷酸化过程。调节亚基基因被逐一敲低的实验显示, 调节亚基PPP2R3C(3C)、PPP2RN3(RN3)以及所有B'家族成员较为显著地参与了Dvl2蛋白的去磷酸化调控。

Dvl蛋白在细胞质中形成的颗粒状结构被认为与Dvl蛋白的动态寡聚化相关, 与Wnt/ β -catenin信号通路激活也存在一定的联系^[19-21]。我们发现PPP2R2C(2C)、PPP2R2D(2D)以及B'家族的PPP2R5A、PPP2R5C和PPP2R5D五个调节亚基能被Dvl2蛋白募集到颗粒状结构中, 有显著的亚细胞共定位。B'家族的另两个成员PPP2R5B和PPP2R5E也与Dvl2有较弱的颗粒状共定位。免疫共沉淀实验结果进一步证实, B'家族调节亚基成员与Dvl2均存在明显的相互作用。由此推断, B'家族成员对于PP2A全酶识别底物Dvl2具有重要贡献。

我们的研究显示, PP2A全酶对Dvl2的去磷酸化主要由PP2A调节亚基B'家族来介导。PPP2R2C、PPP2R2D、PPP2R3C以及PPP2RN3等调节亚基可能其他细胞或者其他情况下, 直接或者间接地参与Dvl2蛋白的去磷酸化调控。该研究进一步验证了调节亚基对PP2A全酶特异性识别不同底物过程的重要调控作用, 也直观地显示出调节亚基的亚细胞定

位在PP2A功能行使中发挥着重要作用。

参考文献 (References)

- Gao C, Chen YG. Dishevelled: the hub of Wnt signaling. *Cell Signal* 2010; 22(5): 717-27.
- Bernatik O, Sedova K, Schille C, Ganji RS, Cervenka I, Trantirek L, *et al.* Functional analysis of dishevelled-3 phosphorylation identifies distinct mechanisms driven by casein kinase 1 and frizzled5. *J Biol Chem* 2014; 289(34): 23520-33.
- Cervenka I, Valnohova J, Bernatik O, Harnos J, Radsetoual M, Sedova K, *et al.* Dishevelled is a NEK2 kinase substrate controlling dynamics of centrosomal linker proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113(33): 9304-9.
- Ossipova O, Dhawan S, Sokol S, Green JB. Distinct PAR-1 proteins function in different branches of Wnt signaling during vertebrate development. *Dev Cell* 2005; 8(6): 829-41.
- Peters JM, McKay RM, McKay JP, Graff JM. Casein kinase 1 transduces Wnt signals *Nature* 1999; 401(6751): 345-50.
- Sun TQ, Lu BW, Feng JJ, Reinhard C, Jan YN, Fantl WJ, *et al.* PAR-1 is a Dishevelled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signalling. *Nat Cell Biol* 2001; 3(7): 628-36.
- Lee KH, Johmura Y, Yu LR, Park JE, Gao Y, Bang JK, *et al.* Identification of a novel Wnt5a-CK1varepsilon-Dvl2-Plk1-mediated primary cilia disassembly pathway. *EMBO J* 2012; 31(14): 3104-17.
- Gonzalez-Sancho JM, Greer YE, Abrahams CL, Takigawa Y, Baljinnyam B, Lee KH, *et al.* Functional consequences of Wnt-induced dishevelled 2 phosphorylation in canonical and noncanonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 2013; 288(13): 9428-37.
- Mlodzik M. The dishevelled protein family: still rather a mystery after over 20 years of molecular studies. *Curr Top Dev Biol* 2016; doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.11.027.
- Yokoyama N, Malbon CC. Phosphoprotein phosphatase-2A docks to Dishevelled and counterregulates Wnt3a/beta-catenin signaling. *J Mol Signal* 2007; doi: 10.1186/1750-2187-2-12.
- Xie J, Han M, Zhang M, Deng H, Wu W. PP5 (PPP5C) is a phosphatase of Dvl2. *Sci Rep* 2018; 8(1): 2715-29.
- Eichhorn PJ, Creighton MP, Bernards R. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1795(1): 1-15.
- Shi YG. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* 2009; 139(3): 468-84.
- Li X, Virshup DM. Two conserved domains in regulatory B subunits mediate binding to the A subunit of protein phosphatase 2A. *FEBS Journal* 2002; 269(2): 546-52.
- Seshacharyulu P, Pandey P, Datta K, Batra SK. Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer Lett* 2013; 335(1): 9-18.
- Xing Y, Igarashi H, Wang X, Sakaguchi N. Protein phosphatase subunit G5PR is needed for inhibition of B cell receptor-induced apoptosis. *J Exp Med* 2005; 202(5): 707-19.
- Magenta A, Fasanaro P, Romani S, Stefano VD, Capogrossi MC, Martelli F. Protein phosphatase 2A subunit PR70 interacts with pRb and mediates its dephosphorylation. *Mol Cell Biol* 2008; 28(2): 873-82.

- 18 Janssens V, Jordens J, Stevens I, Van Hoof C, Martens E, De Smedt H, *et al.* Identification and functional analysis of two Ca²⁺-binding EF-hand motifs in the B''/PR72 subunit of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem.* 2003; 278(12): 10697-706.
- 19 Schwarzromond T, Metcalfe C, Bienz M. Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies. *J Cell Sci* 2007; 120(14): 2402-12.
- 20 Schwarzromond T, Merrifield C, Nichols BJ, Bienz M. The Wnt signalling effector Dishevelled forms dynamic protein assemblies rather than stable associations with cytoplasmic vesicles. *J Cell Sci* 2005; 118(22): 5269-77.
- 21 Schwarz-Romond T, Fiedler M, Shibata N, Butler P JG, Kikuchi A, Higuchi Y, *et al.* The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14(6): 484-92.