

研究论文

核糖体蛋白rpS6在核仁中的定位与其磷酸化无关

张 朵^{1,2} 高丽华¹ 邵 勇¹ 郝永义¹ 胥照平¹ 陈惠鹏¹ 胡显文^{1*}¹军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071; ²南京军区福州总医院实验科, 福州 350025)

摘要 核糖体蛋白S6(rpS6)是核糖体小亚基40S的一个组成成分。在该研究中, 利用免疫荧光和邻位连接技术证明rpS6不仅是核糖体小亚基的组成成分, 而且还可与核仁中的U3核蛋白复合体的标志性蛋白Mpp10共定位并且存在相互作用。rpS6蛋白的C端有5个丝氨酸磷酸化位点, 为了研究rpS6蛋白在核仁中的分布是否与其磷酸化有关, 构建了rpS6蛋白的两个突变体rpS6A和rpS6D分别与EGFP和HA的融合蛋白。rpS6A是将C端的5个丝氨酸位点全部突变为丙氨酸; rpS6D是将C端的5个丝氨酸位点全部突变为天冬氨酸。研究表明: rpS6、rpS6A和rpS6D与EGFP和HA的融合蛋白均可分布在核仁中, 与内源性rpS6蛋白的分布情况一致, 说明rpS6蛋白在核仁中的定位与其磷酸化无关, 为探索rpS6蛋白在核仁中的功能奠定了良好的基础。

关键词 核糖体蛋白S6; 邻位连接技术; U3核蛋白复合体

核糖体蛋白S6(rpS6)由两个位于不同染色体上的等位基因*RPS6A*和*RPS6B*编码^[1]。C端有5个高度保守的丝氨酸磷酸化位点Ser235、Ser236、Ser240、Ser244和Ser247^[2-4]。在mTOR-S6K-rpS6信号通路中, rpS6蛋白C端的丝氨酸磷酸化位点可被其上游激酶S6K磷酸化。磷酸化rpS6蛋白的功能可能与细胞大小、糖代谢、蛋白质翻译等有关。一直以来, 研究结果均表明: rpS6蛋白是核糖体40S小亚基的组成成分, 位于小亚基的头部。2002年, Dragon等^[5]通过质谱分析的方法提出 rpS6蛋白可能是酵母细胞中U3核蛋白复合体的组成成分。2004年, Bernstein等^[6]则通过免疫组化的方法证明了在酵母细胞中rpS6蛋白可与Mpp10蛋白共定位, 提出: rpS6蛋白是U3核蛋白复合体的组成成分。在真核细胞中, U3核蛋白复合体位于核仁中, 是18S rRNA加工成熟的场所^[7-8]。rpS6蛋白在U3核蛋白复合体中的功能是否与18S rRNA加工成熟有关以及rpS6蛋白的入核是否与其磷酸化有关等均有待研究证实。

本研究的主要目的是为了观察rpS6蛋白是否是高等真核细胞HEK293中U3核蛋白复合体的组成成分以及rpS6在核仁中的定位是否与其磷酸化有关。为此, 我们除了利用邻位连接技术(P-LISA)检测了rpS6蛋白是否与Mpp10蛋白在核仁中共定位并且存在相互作用外, 还构建了rpS6蛋白及两个突变体rpS6A和rpS6D。rpS6A是将rpS6蛋白C端的5个丝

氨酸位点全部突变为丙氨酸, 该蛋白在体内不能被磷酸化; rpS6D是将rpS6蛋白C端的5个丝氨酸位点全部突变为天冬氨酸, 该蛋白在体内虽然不能被磷酸化, 但可行使磷酸化蛋白的功能。将rpS6、rpS6A和rpS6D分别与EGFP和HA构建融合蛋白, 转入高等真核细胞HEK293中, 利用激光共聚焦和免疫荧光实验观察rpS6、rpS6A和rpS6D与EGFP和HA的融合蛋白在核仁中的分布情况。我们推测: rpS6蛋白很可能是高等真核细胞U3核蛋白复合体的组成成分, 但是其在核仁中的定位与其磷酸化的关系还有待进一步研究证实。

1 材料与方法

1.1 材料

兔抗人rpS6单克隆抗体购自Cell Signaling公司; 鼠抗人Mpp10单克隆抗体购自Abcam公司; Duolink[®]II试剂盒购自瑞典Olink Bioscience实验室; 依据NCBI(NM_001010.2)公布的rpS6序列优化合成HA-rpS6基因, 由金思特科技(南京)有限公司合成; 脂质体Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司; anti-HA tag和anti-EGFP tag购自MBL公司; CF[™]555驴抗兔IgG(H+L)为Biotium公司产品; 激光共聚焦显微镜为Carl Zeiss LSM 510 Meta产品。

收稿日期: 2011-09-05

接受日期: 2011-11-08

*通讯作者。Tel: 010-66948820, E-mail: huxianwen2002@yahoo.cn

1.2 免疫荧光双标检测rpS6蛋白和Mpp10蛋白在HEK293中的分布

HEK293细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM/F12(1:1)培养基中,实验前将其接种于无菌Nunc Lab-Tek™腔室盖玻片中培养。待其生长至对数生长期时,取出,加入预冷的70%乙醇,冰上固定1 h,0.2% Triton X-100(PBS配制)通透5 min, PBS清洗3次,每次3 min, Duolink试剂盒即用型封闭液,37 °C封闭30 min,同时加入1:100稀释的兔抗人rpS6单克隆抗体和鼠抗人Mpp10单克隆抗体(Duolink试剂盒中的抗体稀释液稀释)100 μL,4 °C湿盒内孵育过夜。之后PBS清洗3次,每次10 min,同时加入1:400稀释的CF™555 驴抗兔IgG(H+L)和CF™488驴抗鼠IgG(H+L)37 °C避光条件下反应60 min, PBS洗3次,每次10 min。0.5 μg/mL DAPI室温反应5 min, PBS冲洗3次,每次3 min,封片后在激光共聚焦显微镜下观察。

1.3 P-LISA技术检测rpS6蛋白与Mpp10蛋白的相互作用

操作按照Duolink试剂盒说明书进行:预冷的70%乙醇冰上固定细胞后,0.2% Triton X-100通透5 min, Duolink试剂盒即用型封闭液,37 °C封闭30 min,同时加入1:100稀释的兔抗人rpS6单克隆抗体和鼠抗人Mpp10单克隆抗体(Duolink试剂盒中的抗体稀释液稀释)100 μL,4 °C湿盒内孵育过夜。Wash buffer A清洗3次,每次2 min,加入1:5稀释的PLA MINUS和PLA PLUS探针(Duolink试剂盒中的抗体稀释液稀释),预热的湿盒内37 °C孵育1 h。Wash buffer A清洗3次,每次5 min,加入含连接酶的连接缓冲液,37 °C连接反应30 min, Wash buffer A温和地清洗2次,每次2 min,最后吸干净Wash buffer A,加入含聚合酶的扩增缓冲液,37 °C PCR反应扩增100 min。Wash buffer B清洗2次,每次10 min,0.1×Wash buffer B稍浸润,取出,0.5 μg/mL DAPI室温反应5 min, PBS冲洗3次,每次3 min,封片后在激光共聚焦显微镜下观察。

1.4 rpS6蛋白与Mpp10蛋白免疫共沉淀

按照protein A/G凝胶产品说明书操作,简言之:预冷的裂解液(50 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、1% NP-40、0.5% sodium deoxycholate、0.1% SDS和protease inhibitor cocktail)4 °C缓慢摇动裂解30 min;12 000×g、4 °C离心20 min。取200 μL上清加2 μL兔抗rpS6单克隆抗体4 °C孵育过夜,加100 μL protein A/G凝胶,4 °C缓慢摇动5 h,离心,取沉淀,裂

解液清洗3次后,进行Western blot分析。

电泳结束后,以90 V、80 min的条件将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉37 °C封闭1 h,加1:500稀释的鼠抗Mpp10单克隆抗体4 °C孵育过夜。0.5% TBST清洗3次,加1:15 000稀释的山羊抗鼠IgG/HRP 37 °C反应1 h。TBST清洗3次,Enlight™化学发光试剂显色。

1.5 HA-rpS6及其两个突变体HA-rpS6A和HA-rpS6D真核表达载体的构建

以合成的HA-rpS6基因为模板,通过PCR的方法获得HA-rpS6、HA-rpS6A和HA-rpS6D基因,BamH I和Xho I双酶切后克隆入pIRES2-EGFP质粒中,具体操作按文献^[9]进行。其中HA-rpS6基因的扩增使用引物HA-S6up和HA-S6down;HA-rpS6A基因的扩增使用引物HA-S6up和HA-S6Adown;HA-rpS6D基因的扩增使用引物HA-S6up和HA-S6Ddown。引物序列如下所示:HA-S6up:5'-GCG CTC GAG ACC ATG TAC CCC TAT GAC GTG CC-3';HA-S6down:5'-GCG GGA TCC TCA TTT CTG ACT AGA CTC GGA C-3';HA-S6Adown:5'-GCG GGA TCC TCA TTT CTG AGC AGA CTC GGC CTT GCT GGT TGC GGC TCT CAG GGC AGC-3';HA-S6Ddown:5'-GCG GGA TCC TCA TTT CTG ATC AGA CTC GTC CTT GCT GGT GTC GGC TCT CAG ATC GTC-3'。

1.6 rpS6-EGFP及其突变体rpS6A-EGFP和rpS6D-EGFP真核表达载体的构建

rpS6的扩增以HA-rpS6-pIRES2-EGFP为模板,S6-EGFPup和S6-EGFPdown为引物;rpS6A的扩增以HA-rpS6A-pIRES2-EGFP为模板,S6-EGFPup和S6A-EGFPdown为引物;rpS6D的扩增以HA-rpS6D-pIRES2-EGFP为模板,S6-EGFPup和S6D-EGFPdown为引物。BamH I和Hind III双酶切后克隆入pcDNA3.1-EGFP质粒中,按照常规分子克隆技术操作。引物序列如下所示:S6-EGFPup:5'-GCG AAG CTT CCA CCA TGA AGC TGA ACA TCT CCT TCC CTG-3';S6-EGFPdown:5'-GCG GGA TCC TTT CTG ACT AGA CTC GGA CTT G-3';S6A-EGFPdown:5'-GCG GGA TCC TTT CTG AGC AGA CTC GGC CTT G-3';S6D-EGFPdown:5'-GCG GGA TCC TTT CTG ATC AGA CTC GTC CTT G-3'。

1.7 稳定表达EGFP融合蛋白的细胞系的获得及鉴定

使用Lipofectamine 2000转染HEK293细胞,具体

操作按说明书进行: 使用50 μL opti-MEM低血清培养基稀释2 μL Lipofectamine 2000, 室温放置5 min后, 与50 μL opti-MEM低血清培养基稀释的0.8 μg 重组质粒(分别为rpS6-EGFP-pcDNA3.1、rpS6A-EGFP-pcDNA3.1和rpS6D-EGFP-pcDNA3.1)混合, 室温放置20 min后, 加入到细胞中。48 h后传代。0.38 g/L G418加压筛选, 待无G418抗性的细胞被杀死后, 以有限稀释法进行单克隆。

激光共聚焦观察rpS6、rpS6A和rpS6D与EGFP的融合蛋白在细胞内的分布。

Western blot鉴定EGFP融合蛋白的表达: 1 mL裂解液裂解稳定表达rpS6-EGFP、rpS6A-EGFP和rpS6D-EGFP蛋白的细胞, 上样30 μL 进行15% SDS-PAGE电泳, 电泳结束后, 以90 V、60 min条件将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 5%脱脂奶粉37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭1 h, 加1:1 000稀释的兔抗EGFP-tag, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应2 h。TBST清洗3次, 加1:15 000稀释的山羊抗兔IgG/HRP 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应1 h。TBST清洗3次, EnlightTM化学发光试剂显色。

1.8 稳定表达HA融合蛋白的细胞系的获得及鉴定

按上述方法将HA-rpS6-pIRES2-EGFP、HA-rpS6A-pIRES2-EGFP和HA-rpS6D-pIRES2-EGFP质粒转染入HEK293细胞中, 筛选获得稳定表达HA融合蛋白的细胞系。Western blot鉴定HA融合蛋白的表达, 一抗使用1:500稀释的兔抗anti-HA tag, 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒内反应过夜, TBST清洗3次, 加1:15 000稀释的山羊抗兔IgG/HRP 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应1 h。TBST清洗3次, EnlightTM化学发光试剂显色。

免疫荧光技术检测HA融合蛋白在细胞内的定

位: 将稳定表达HA-rpS6、HA-rpS6A和HA-rpS6D融合蛋白的细胞接种于多聚赖氨酸处理的玻片上, 待细胞生长至70%~80%融合时, 甲醇室温固定10 min, PBS冲洗3次, 每次3 min。0.2% Triton X-100通透5 min。6% BSA 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭60 min, 加入1:200稀释的兔抗anti-HA tag, 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒内过夜。PBS洗3次, 每次10 min, 1:400稀释的CFTM555 驴抗兔IgG(H+L) 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下反应60 min, PBS洗3次, 每次10 min。0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI 室温反应5 min, PBS冲洗3次, 每次3 min, 封片后在激光共聚焦显微镜下观察。

2 结果

2.1 rpS6蛋白在HEK293细胞核仁中的分布

在本研究中, 我们利用免疫荧光双标实验观察到: 内源性的rpS6蛋白不仅分布在胞质中(核糖体), 而且还分布在细胞核中, 在细胞核中能够与核仁中的第三大核蛋白复合体U3核蛋白复合体的标志性蛋白Mpp10共定位(图1)。

2.2 P-LISA技术证明rpS6蛋白与Mpp10蛋白的相互作用

研究表明: rpS6蛋白在HEK293细胞中能够与Mpp10蛋白共定位, 提示rpS6蛋白可能是U3核蛋白复合体的组成成分。使用P-LISA技术研究rpS6蛋白在细胞内是否与Mpp10蛋白存在相互作用, 发现: rpS6蛋白与Mpp10蛋白在天然状态下存在相互作用, 代表发生相互作用的荧光斑点产生在核仁中, 分布情况与rpS6蛋白在核仁中的分布情况一致, 即仅有少数细胞的核仁中可检测到rpS6蛋白的存在(图2)。

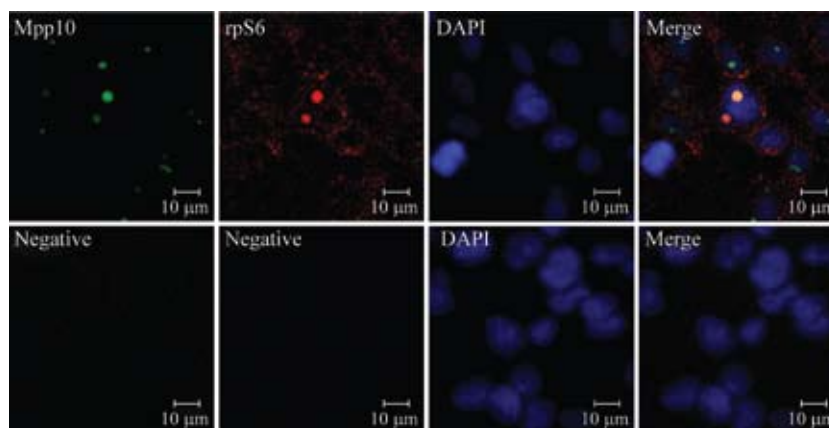


图1 免疫荧光双标实验检测rpS6蛋白在HEK293细胞内的分布

Fig.1 Colocalization of rpS6 and Mpp10 protein in HEK293 cells detected by double immunofluorescence

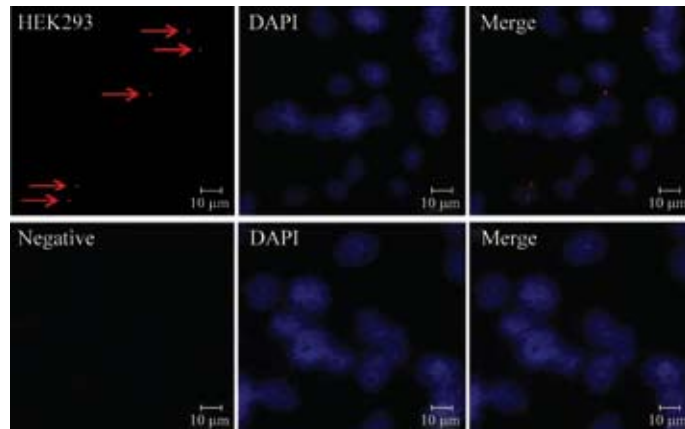


图2 P-LISA技术检测rpS6蛋白和Mpp10蛋白在细胞核仁内的相互作用

Fig.2 Interaction of rpS6 and Mpp10 in nucleolus detected by proximity ligation *in situ* assay(P-LISA)

免疫共沉淀结果也表明Mpp10蛋白可与rpS6蛋白相互作用(图3)。

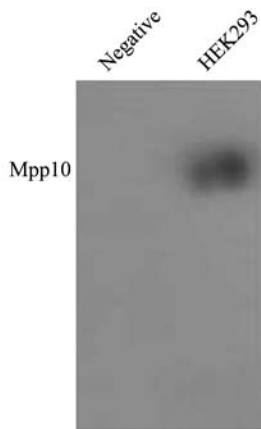


图3 免疫共沉淀技术检测rpS6蛋白和Mpp10蛋白在HEK293细胞裂解液中的相互作用。

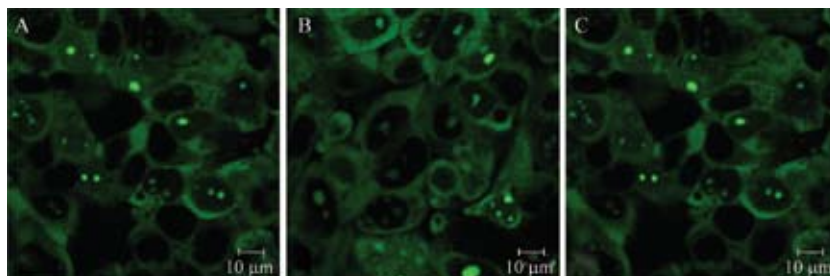
Fig.3 Coimmunoprecipitate of Mpp10 and rpS6 protein from native HEK293 cells supernatant

2.3 稳定表达EGFP融合蛋白的细胞系的获得及EGFP融合蛋白在细胞内的分布

采用分子克隆的方法成功构建了rpS6-EGFP-pcDNA3.1、rpS6A-EGFP-pcDNA3.1和rpS6D-EGFP-pcDNA3.1重组质粒,并将其转染入HEK293细胞中,获得了稳定表达rpS6-EGFP、rpS6A-EGFP以及rpS6D-EGFP蛋白的细胞系。激光共聚焦显微镜观察发现:绿色荧光蛋白均匀地分布在每个细胞的胞质中,同时在少数细胞的核仁中,也有很亮的绿色荧光蛋白存在,而核质中没有绿色荧光(图4)。Western blot分析结果表明:稳定表达EGFP融合蛋白的细胞系均可检测到EGFP-tag标签蛋白的存在(图5)。

2.4 稳定表达HA融合蛋白的细胞系的获得及HA融合蛋白在细胞内的分布

按上述方法成功构建了HA-rpS6-pIRES2-EGFP、HA-rpS6A-pIRES2-EGFP和HA-rpS6D-pIRES2-EGFP



A: 稳定表达rpS6-EGFP蛋白的HEK293细胞系; B: 稳定表达rpS6A-EGFP蛋白的HEK293细胞系; C: 稳定表达rpS6D-EGFP蛋白的HEK293细胞系。从图中可以看出, rpS6-EGFP、rpS6A-EGFP和rpS6D-EGFP蛋白均可进入细胞核中。

A: the stably transfected HEK293 cell line expressing fusion protein rpS6-EGFP; B: the stably transfected HEK293 cell line expressing fusion protein rpS6A-EGFP; C: the stably transfected HEK293 cell line expressing fusion protein rpS6D-EGFP. Noted the characteristic distribution pattern of rpS6-EGFP, rpS6A-EGFP and rpS6D-EGFP protein in nucleoli, all distributed in nucleoli and dispersed throughout the cytoplasm of each cell.

图4 稳定表达rpS6-EGFP、rpS6A-EGFP和rpS6D-EGFP蛋白的细胞系

Fig.4 Stably transfected cell lines expressing fusion protein rpS6-EGFP, rpS6A-EGFP and rpS6D-EGFP observed by high resolution confocal microscopy

重组质粒, 并将其转染入HEK293细胞中, 获得了稳定表达HA-rpS6、HA-rpS6A和HA-rpS6D蛋白的细胞系。Western blot检测表明: 稳定细胞系的裂解液中均可检测到HA-tag融合蛋白的表达(图6)。免疫荧光实验

分析表明: HA-rpS6、HA-rpS6A和HA-rpS6D蛋白也分布在细胞的核仁中, 分布情况与内源性的rpS6蛋白以及rpS6-EGFP、rpS6A-EGFP和rpS6D-EGFP蛋白一致(图7)。

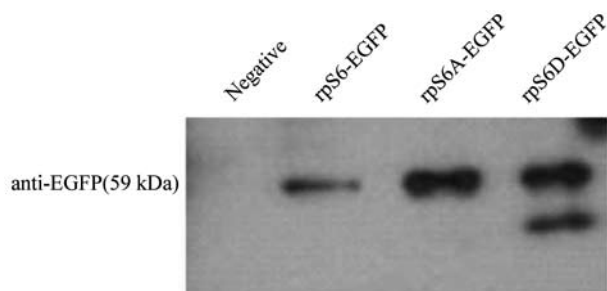


图5 Western blot检测稳定细胞系中EGFP-tag融合蛋白的表达
Fig.5 Expression of EGFP-tag protein in stably transfected cell lines detected by Western blot

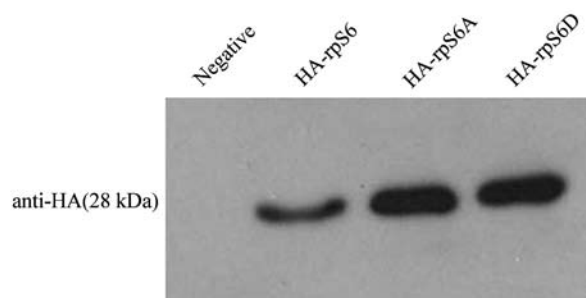


图6 Western blot检测稳定细胞系HA融合蛋白的表达
Fig.6 Western blot was used to detect the expression of HA-tag protein in stably transfected cell lines

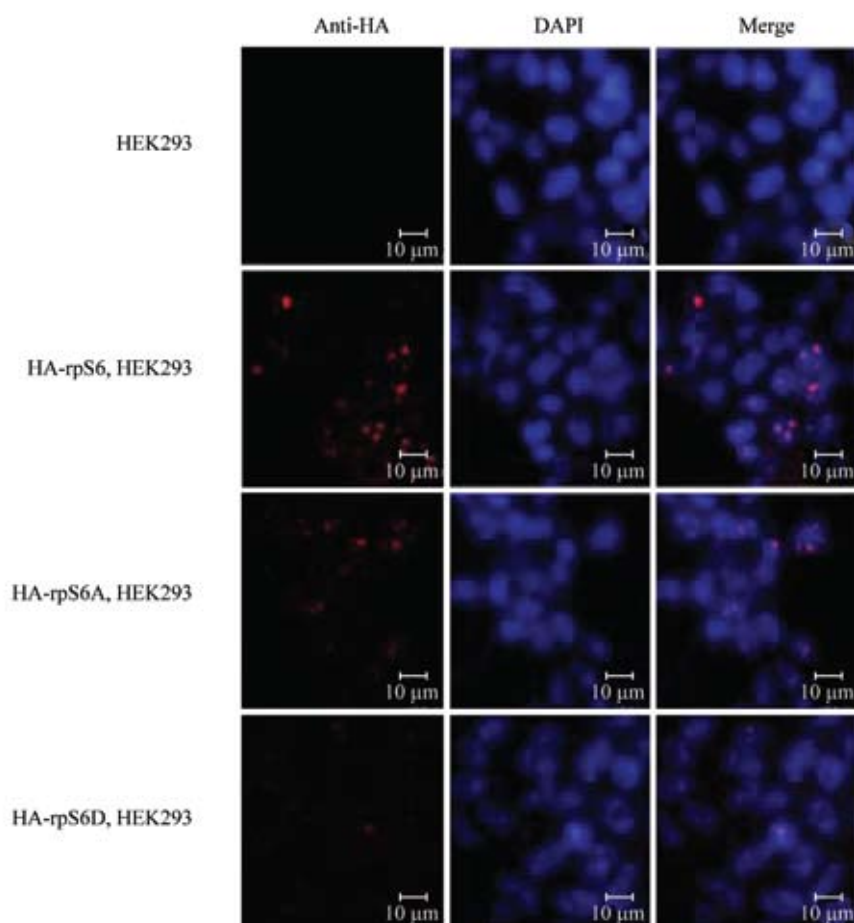


图7 免疫荧光实验检测稳定表达HA-rpS6、HA-rpS6A和HA-rpS6D蛋白的HEK293细胞中HA标签蛋白的分布
Fig.7 Distribution of HA-rpS6, HA-rpS6A and HA-rpS6D protein in stably transfected HEK293 cell lines detected by double immunofluorescence using rabbit anti-HA as primary antibodies

3 讨论

一直以为, rpS6蛋白是核糖体40S小亚基的组成成分。近年来, Bernstein等^[6]的研究发现rpS6是酵母细胞中U3核蛋白复合体的一个组成成分, 而U3核蛋白复合体位于核仁中, 是核仁中的第三大核蛋白复合体。在本研究中, 我们利用P-LISA技术和免疫荧光双标等实验证明了, 在高等真核细胞中rpS6蛋白不仅分布在细胞核中, 而且可与U3核蛋白复合体的标志性蛋白Mpp10共定位并且存在相互作用。相比其它蛋白质相互作用检测技术而言, P-LISA技术将对蛋白质的检测转变为对DNA的检测, 不仅提高了灵敏度, 而且可在天然状态下对蛋白质间的相互作用进行原位检测, 减少了非特异性, 每一个蛋白质相互作用事件即可在原位生成一个荧光斑点, 结果观察更加直观方便^[10-11]。在高等真核细胞中, U3核蛋白复合体的功能主要是负责将18S rRNA的前体加工成为成熟的18S rRNA^[7-8]。作为核糖体40S小亚基的组成成分, 以前的研究结果认为: rpS6蛋白的功能主要与mRNA的起始翻译、糖代谢、细胞大小等有关。在本研究中, 我们发现rpS6蛋白能够进入高等细胞的细胞核中, 并且与U3核蛋白复合体的标志性蛋白Mpp10共定位及相互作用, 我们推测rpS6蛋白的功能可能也与18S前体rRNA的加工成熟有关。

在细胞中存在着以调节细胞生长为主的mTOR-S6K-rpS6信号通路, mTOR分子在氨基酸等生长因子的刺激下, 可使S6K激酶磷酸化, 而磷酸化的S6K激酶又可使rpS6蛋白磷酸化。因此, 在细胞中, rpS6蛋白是以磷酸化和非磷酸化两种形式存在的。定位于U3核蛋白复合体的rpS6蛋白是否是其磷酸化形式以及其在U3核蛋白复合体中的功能是否与其磷酸化有关等均有待证明。因此, 我们构建了rpS6蛋白的两个突变体rpS6A和rpS6D。rpS6A是将rpS6蛋白C端的5个丝氨酸磷酸化位点全部突变为丙氨酸, 该蛋白在细胞内将不能被磷酸化, rpS6D是将rpS6蛋白C端的5个丝氨酸磷酸化位点全部突变为天冬氨酸, 该蛋白在细胞内虽然不能被磷酸化, 但可模拟磷酸化rpS6蛋白的功能, 研究结果表明: rpS6A和rpS6D蛋白均可进入细胞核中, 说明rpS6蛋白进入细胞核, 并且定位于U3核蛋白复合体与其磷酸化无关。在真核细胞中, 能够进入细胞核的蛋白质一般具有核定位信号(nuclear localization signal or sequence, NLS), 经典的核定位信号包括两种: 一种是在SV40大T抗原中发现的PKK-

KRKV序列; 另一种则是KR[PAATKKAGQA]KKKK序列。这两种核定位信号都可被importin α 分子识别, importin α 自身又包含一个KR[PAATKKAGQA]KKKK序列, 可被importin β 识别。Importin β 位于核孔复合物的胞质面, 结合了底物的importin β 在GTPase Ran和p10的参与下将底物转运入细胞核。研究表明核糖体蛋白进入细胞核是通过其自身的核定位信号, 与importin β 家族成员的Kap123p或Pse1p结合, 然后在GTPase Ran分子的参与下将核糖体蛋白转运入细胞核^[12]。我们推测: rpS6蛋白很可能也是通过此通路进入细胞核, 进而定位于U3核蛋白复合体, 但是rpS6蛋白的磷酸化与核定位信号无关, 因为rpS6A-EGFP和HA-rpS6A分子也可以定位于U3核蛋白复合体。

为了便于检测, 在本研究中, 我们构建了rpS6、rpS6A和rpS6D蛋白分别与HA和EGFP融合的两种融合蛋白。EGFP融合蛋白可使用荧光显微镜方便直观地观察rpS6、rpS6A和rpS6D蛋白在细胞内的分布, 但是EGFP蛋白质分子的分子量较大, 其造成的空间位阻效应及成熟过程, 可能影响rpS6、rpS6A和rpS6D蛋白在细胞内的分布或功能发挥。因此, 我们又将rpS6、rpS6A和rpS6D蛋白与仅有9个氨基酸的HA标签蛋白融合, 免疫荧光实验检测HA融合蛋白在细胞内的分布。结果表明: EGFP蛋白分子(C端)并未影响rpS6、rpS6A和rpS6D蛋白在细胞内的分布。

在本研究中我们观察到的另一个现象是rpS6蛋白及其融合蛋白在U3核蛋白复合体中的分布可从无到有, 含量可从少到多。在培养的稳定表达EGFP融合蛋白的细胞系中我们观察到, 在细胞群体中并不是每个细胞的细胞核中都有rpS6融合蛋白的分布, 同一个细胞中, rpS6融合蛋白的分布也随着细胞的生长发生变化。使用免疫荧光检测内源性rpS6蛋白以及HA融合蛋白分布情况也证明了这一特点, 推测这可能与U3核蛋白复合体的状态或正在发挥的功能有关。

参考文献 (References)

- 1 Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, *et al.* Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 2003; 425(6959): 671-2.
- 2 Krieg J, Hofsteenge J, Thomas G. Identification of the 40S ribosomal protein S6 phosphorylation sites induced by cycloheximide. *J Biol Chem* 1988; 263(23): 11473-7.
- 3 Ferrari S, Bandi HR, Hofsteenge J, Bussian BM, Thomas G.

- Mitogen-activated 70K S6 kinase. Identification of *in vitro* 40 S ribosomal S6 phosphorylation sites. *J Biol Chem* 1991; 266(33): 22770-5.
- 4 Fumagalli S, Thomas G. S6 phosphorylation and signal transduction. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000; 82: 695-717.
- 5 Dragon F, Gallagher JE, Compagnone-Post PA, Mitchell BM, Porwancher KA, Wehner KA, *et al.* A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* 2002; 417(6892): 967-70.
- 6 Bernstein KA, Gallagher JE, Mitchell BM, Granneman S, Baserga SJ. The small-subunit processome is a ribosome assembly intermediate. *Eukaryot Cell* 2004; 3(6): 1619-26.
- 7 Fournier MJ, Maxwell ES. The nucleolar snRNAs: Catching up with the spliceosomal snRNAs. *Trends Biochem Sci* 1993; 18(4): 131-5.
- 8 Venema J, Tollervey D. Processing of pre-ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1995; 11(16): 1629-50.
- 9 奥斯伯 FM, 布伦 R, 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998.
- 10 Fredriksson S, Gullberg M, Jarvius J, Olsson C, Pietras K, Gústafsdóttir SM, *et al.* Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat Biotechnol* 2002; 20(5): 473-7.
- 11 Rout MP, Blobel G, Aitchison JD. A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell* 1997; 89(5): 715-25.
- 12 Soderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstrale K, Leuchowius KJ, Javvius J, *et al.* Direct observation of individual endogenous protein complexes *in situ* by proximity ligation. *Nat Methods* 2006; 3(12): 995-1000.

Location of Ribosomal Protein S6 in Higher Eukaryocyte Nucleolus not Related to Its Phosphorylation

Zhang Duo^{1,2}, Gao Lihua¹, Shao Yong¹, Xi Yongyi¹, Xu Zhaoping¹, Chen Huipeng¹, Hu Xianwen^{1*}

(¹Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China; ²Clinical Genetic Research Center, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou 350025, China)

Abstract Ribosomal protein S6 (rpS6) was considered as a component of the cytosolic 40S ribosomal subunit. However, using the technique of proximity ligation *in situ* assay and immunofluorescence analysis, the studies presented here revealed that rpS6 was not only a component of the 40S ribosomal subunit, but also colocalized and interacted with Mpp10, an essential component of U3 snoRNP. The rpS6 protein had five phosphorylation sites at the C terminus. In order to identify the relationship of distribution in nucleolus with its phosphorylation, we constructed two mutations of rpS6. One was rpS6A whose five phosphorylatable serine residues sites were replaced by alanine residues, the other was rpS6D whose five phosphorylatable serine residues sites were replaced by aspartic acids. The rpS6, rpS6A and rpS6D protein were expressed as fusion with EGFP and HA tag, respectively. The results showed that not only rpS6 fusion protein but also rpS6A and rpS6D fusion protein could distribute in nucleolus, suggesting the phosphorylation could not affect rpS6 protein entering into nucleolus. This work made a way for the study of rpS6 function in nucleolus in future.

Key words ribosomal protein S6; proximity ligation *in situ* assay; U3 snoRNP

Received: September 5, 2011 Accepted: November 8, 2011

*Corresponding author. Tel: 86-10-66948820, E-mail: huxianwen2002@yahoo.cn