

研究论文

PIP5KIC在自噬体形成过程中的重要作用

刘梅¹ 陈丽莲² 张绍进³ 荣岳光^{1*}¹清华大学生命学院, 北京 100084; ²中国农业大学生物学院, 北京 100083;³华中农业大学动物科学与技术学院, 武汉 430070)

摘要 自噬(autophagy)是一种在真核生物中十分保守的溶酶体依赖性降解途径, 它通过形成双层膜结构包裹胞内堆积的蛋白质和受损细胞器并将其运送到溶酶体中进行降解。在实验中发现, 一型磷脂酰肌醇4-磷酸5-激酶C亚型(type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoform C, PIP5KIC)会参与到自噬过程中。在哺乳动物细胞中, 敲低一型磷脂酰肌醇4-磷酸5-激酶C亚型会造成欧米茄体(omegasome)的形状异常, 进而造成自噬水平的降低。同样, 在酵母中敲掉其同源物磷脂酰肌醇5-激酶Mss4后也会导致类似的现象。因此, 推测一型磷脂酰肌醇4-磷酸5-激酶C亚型在自噬体的生成中起着很重要的作用。

关键词 自噬; 欧米茄体; 一型磷脂酰肌醇4-磷酸5-激酶C亚型

自噬(autophagy)是在进化中非常保守的胞内降解途径, 主要通过溶酶体将一些生物大分子以及受损了的细胞器降解成小分子以完成物质的回收再利用^[1]。自噬参与了很多重要的生理过程, 例如外源微生物的清除、细胞程序性死亡、抵抗衰老、抗原呈递等^[2]。一般而言, 自噬分为欧米茄体(omegasome)形成、自噬体形成、与溶酶体融合、底物降解与小分子再利用、自噬性溶酶体再生五个步骤^[3-4]。

在哺乳动物细胞内, 一型磷脂酰肌醇4-磷酸5-激酶(type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase, PIP5KI)家族负责将磷脂酰肌醇4-磷酸(phosphatidylinositol 4-phosphate, PI4P)转化成磷脂酰肌醇4,5-二磷酸(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PI(4,5)P₂)。由于PI4P在胞内的丰度相对较高, 是生成PIP₂的重要来源, PIP5KI作为这个过程的催化激酶在保持PIP₂浓度的过程中起着重要作用^[5]。

PIP5KI家族有三个成员, 有研究发现其中第三个成员PIP5KIC在253位的一个单位点突变是造成三型致死性先天关节痉挛综合征(lethal congenital contractural syndrome type 3)的病因。另外, 该突变使得PIP5KIC的酶活性缺失, 从而引起PIP₂的合成受到影响, 最终导致了致死性的膀胱缺陷^[6]。PIP5KIC主要定位在细胞膜上, 但在胞内也存在一部分定位, 之前的研究证明它在钙离子调控的细胞分泌、短微丝形成等过程中有重要作用^[7-8]。另外, Brown等^[9]在2001年的报道揭示了PIP5KIA的酶活性以及PIP₂的

生成在细胞膜和内体之间的膜转运过程中起着重要作用。细胞自噬的实质也是膜转运过程, 但PIP5KIC是否在细胞自噬的过程中起作用至今仍不清楚。

为了探究PIP5KIC在细胞自噬中是否起作用, 我们在哺乳动物细胞中敲低了PIP5KIC, 发现敲低了PIP5KIC的细胞在饥饿处理后欧米茄体的形成出现异常, 自噬水平降低。细胞自噬在酵母和哺乳动物中是保守的, 在酵母实验中我们也得到了类似的结果。在酵母中, 磷脂酰肌醇5-激酶Mss4是PIP5KI的同源物。我们发现Mss4的温度敏感型突变菌株在饥饿处理后自噬水平也明显降低。以上结果表明, PIP5KIC在自噬体的形成中起着重要作用。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞株和质粒

本实验中使用的菌株为稳定表达了GFP-Atg8的野生型BY4741和mss4^Δ。野生型和突变型菌株购自Invitrogen公司, GFP-Atg8质粒由Yoshinori Ohsumi实验室所赠。本研究所用哺乳动物细胞为稳定敲低PIP5KIC的NRK(normal rat kidney)细胞, NRK细胞购自美国模式培养物保藏所(American Type Culture Condition, ATCC), 在稳定转化shRNA后挑取单克隆形成稳定敲低细胞系。构建PIP5KIC稳定敲低细

收稿日期: 2012-08-03

接受日期: 2012-08-28

国家重点基础研究发展计划(973)项目(No.2010CB833704)资助项目

*通讯作者。Tel: 010-62794552, E-mail: ryg08@mails.tsinghua.edu.cn

胞系所用shRNA购自上海吉玛制药技术有限公司, 转录序列为5'-GAG ATG CAC CTC AAG TTC GAT TCA AGA GAT CGA ACT TGA GGT GCA TCT TT-3'。GFP-DFCP1质粒由Ktistakis实验室所赠。

1.2 培养基

哺乳动物细胞培养所用培养基为添加了10%胎牛血清(FBS)的DMEM, 培养环境为5% CO₂、37 °C恒温培养箱。饥饿处理为撤除培养基中的血清和谷胺酰胺。

酵母SD-N饥饿培养基: 1 L dd H₂O、1.7 g酵母氨基、20 g葡萄糖。

1.3 免疫荧光染色

将细胞铺在圆形玻璃片上培养, PBS洗后用4%多聚甲醛固定10 min, 用含10%血清的PBS封闭30 min, 然后用10 μg/mL的抗体孵育1 h, PBS洗3次后再用荧光标记的二抗孵育1 h, PBS洗3遍, 用封片剂封片后显微镜下观察。

1.4 抗体

PIP5K1C抗体购自美国CST公司(Cell Signaling Technology, Inc, lot#3296), Lamp1抗体购自Enzo Life

Science公司(lot#05031003), LC3(PM036)和p62(PM045)抗体购自MBL公司(Medical & Biological Laboratories CO.)。

1.5 仪器设备

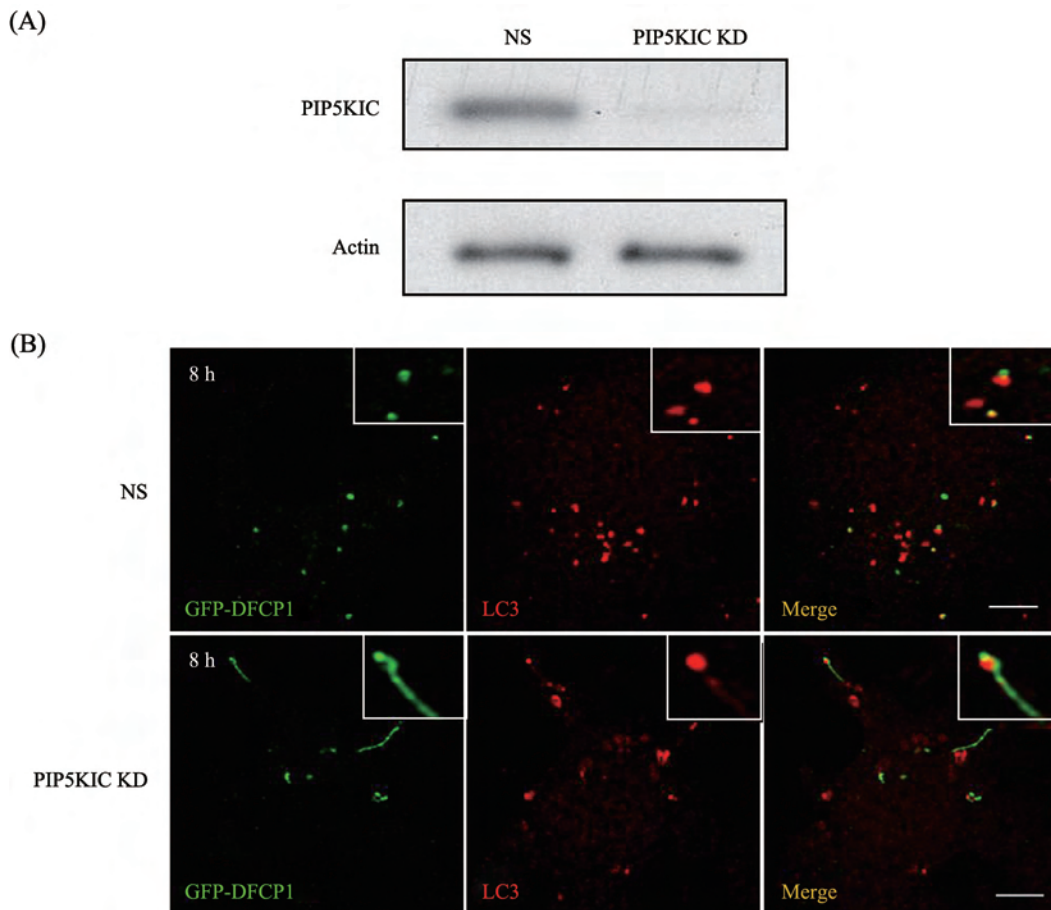
本实验中图像采集使用的是OLYMPUS FV1000激光共聚焦显微镜。所有图像采取均选取沿轴向接近半径最大处, 进行单层扫描。

2 结果

2.1 哺乳动物细胞中PIP5K1C敲低后欧米茄体的形成发生异常

在现有的哺乳动物细胞自噬模型中, 饥饿处理后细胞会在内质网上形成一个自噬体的前体——欧米茄体, 之后自噬体从欧米茄体中长出。欧米茄体结构可以用GFP-DFCP1来标记^[10], 因而在对照组和已经稳定敲低PIP5K1C的实验组(图1A)中表达了GFP-DFCP1质粒来观察其欧米茄体的形成。

正常情况下, 饥饿处理1 h后欧米茄体开始大量形成, 为了便于观察我们选择了8 h这个时间点以使差异可以在时间上达到一定的累积效应。图1B的结



A: 在NRK细胞中分别转入nonspecific-shRNA和*PIP5K1C*-shRNA, 构建出NS和*PIP5K1C* knock-down(KD)的稳定细胞系, 用*PIP5K1C*抗体在Western blot中检测敲除效果; B: 在A图所述的*PIP5K1C* KD细胞系和阴性对照组NS中表达欧米茄体的标记蛋白GFP-DFCP1, 不含血清的DMEM培养基饥饿处理8 h后用GFP(绿色)和LC3(红色)的抗体进行免疫荧光染色(标尺=5 μ m)。

A: NRK cells were transfected with nonspecific(NS)-shRNA and *PIP5K1C*-shRNA to generate NS and *PIP5K1C* knock-down(KD) stable cell lines. The knockdown efficiency of *PIP5K1C* KD stable cell line was verified by Western blot using antibody against *PIP5K1C*; B: NS and *PIP5K1C* KD stable cell lines were transfected with omegasome marker GFP-DFCP1 and were starved for 8 h with serum-free DMEM medium. DFCP1 and LC3 were immunostained with antibodies against GFP(green) and LC3(red), respectively(scale bar=5 μ m).

图1 *PIP5K1C*敲低导致欧米茄体形状异常

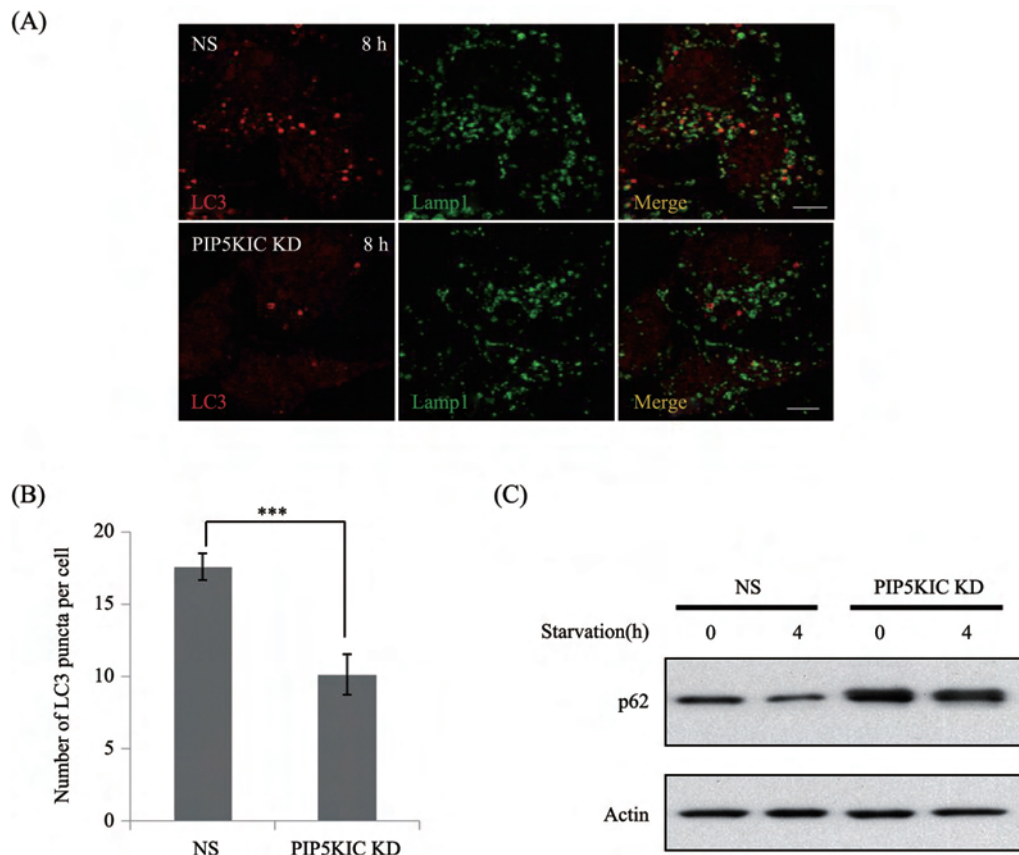
Fig.1 *PIP5K1C* knockdown leads to abnormal morphology of omegasomes

果显示, 在对照组中, GFP-DFCP1呈点状, 为正常的欧米茄体, 并且与LC3所标记的自噬体有部分共定位, 这与文献中报道的现象一致^[10]。但在*PIP5K1C*稳定敲低的细胞中, 出现了大量的线状GFP-DFCP1, 欧米茄体的形成发生异常。以上结果表明, *PIP5K1C*

能够调节欧米茄体的形成, 这暗示着*PIP5K1C*可能在自噬体的形成中起着非常重要的作用。

2.2 哺乳动物细胞中敲低*PIP5K1C*引起自噬水平下降

在上面的实验中我们发现, *PIP5K1C*的敲低影响



A: Nonspecific(NS)和*PIP5K1C* KD细胞系在不含血清的DMEM培养基中饥饿处理8 h后, 用LC3(红色)和Lamp1(绿色)抗体进行免疫荧光染色(标尺=5 μ m); B: 统计图表示A图每个细胞中LC3点状结构的平均数量。每组数据中统计100个细胞, 误差线表示3次独立实验的标准差, *** P <0.001; C: Nonspecific(NS)和*PIP5K1C* KD细胞系用DPBS饥饿处理4 h后收取蛋白样品, 用Western blot检测p62的降解情况。Actin为内参。

A: Nonspecific(NS) and *PIP5K1C* KD stable cell lines were starved for 8 h with serum-free DMEM medium, and then endogenous LC3(red) and Lamp1(green) were detected by immunostaining(scale bar=5 μ m); B: average number of LC3 puncta in each cell in figure A was quantified. One hundred cells were counted. Error bars represent s.d. from three independent experiments, *** P <0.001; C: Nonspecific(NS) and *PIP5K1C* KD stable cell lines were starved for 4 h with DPBS. The degradation of p62 was detected by Western blot using antibody against p62. Actin was used as the internal control.

图2 哺乳动物细胞中*PIP5K1C*敲低降低自噬水平

Fig.2 *PIP5K1C* knockdown reduces autophagy level

了欧米茄体的形成,为了检测 $PIP5K1C$ 敲低是否降低了自噬水平,我们检测了自噬的强度。 $LC3$ 是 $Atg8$ 在哺乳动物中的同源蛋白,被用来标记自噬体^[11], $Lamp1$ 是溶酶体的标记蛋白^[12]。

如图2A结果所示,饥饿处理8 h后,在对照组中,有大量 $LC3$ 的点状结构出现;但在稳定敲低 $PIP5K1C$ 的细胞中, $LC3$ 点状结构的数量明显减少,并且其点状结构增大。统计结果显示(图2B),在对照组中,每个细胞中自噬体平均数量为17.57个;而在 $PIP5K1C$ 敲低的实验组中,每个细胞的自噬体平均数量仅为10.09个。

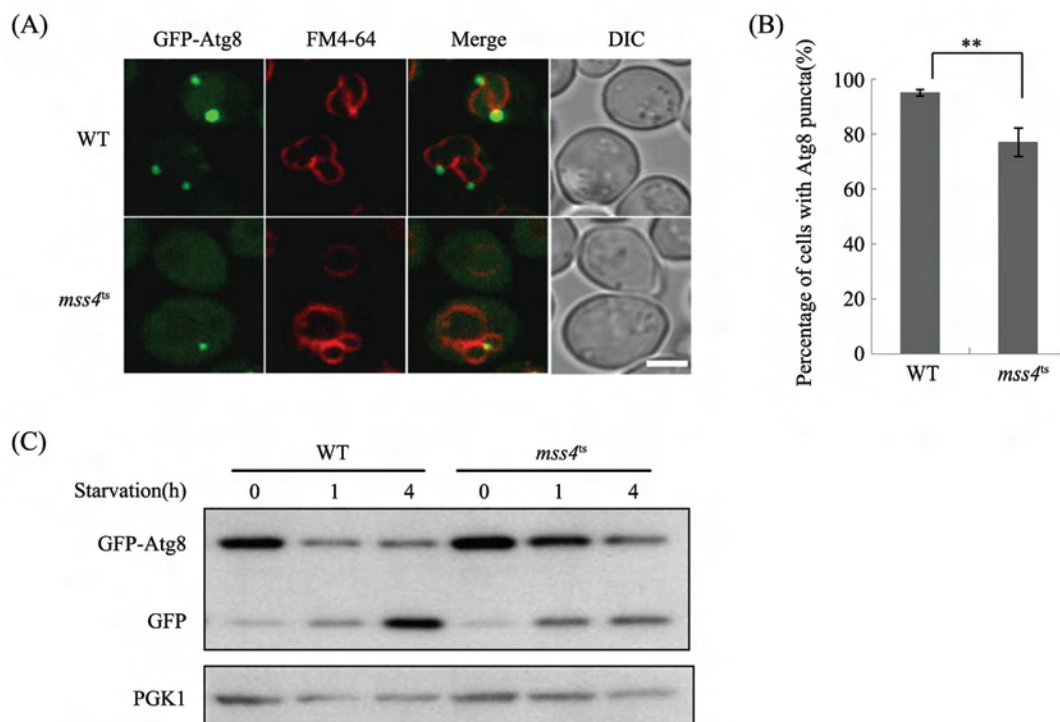
为了进一步确定自噬水平,我们也使用了生化手段来检测。 $p62$ 作为自噬的特异性降解底物随着自噬体的形成被包裹并运送到溶酶体中进行降解^[13]。如图2C所示,在用DPBS饥饿处理4 h后,对照组的 $p62$ 蛋白水平已经明显下降,但 $PIP5K1C$ 敲低的实验

组中 $p62$ 蛋白水平基本与0 h持平,表明该组中自噬水平明显降低。以上结果证明, $PIP5K1C$ 在自噬体的形成中起着非常重要的作用。

2.3 酵母中 $PIP5K1C$ 的同源物 $Mss4$ 失活后细胞自噬水平下降

细胞自噬是一种在酵母和哺乳动物细胞中非常保守的现象,酵母中自噬过程与哺乳动物细胞类似,大致可以分为三个阶段:自噬体组装位点(phagophore assembly site, PAS)及自噬体形成、与液泡的融合、物质降解。为了探究在酵母的自噬过程中 $PIP5K1C$ 的同源物 $Mss4$ 是否也有同样的作用,我们检测了 $mss4^{\Delta}$ 温度敏感突变株的自噬强度。本实验中使用 $FM4-64$ 来标记液泡^[14],用 $GFP-Atg8$ 来标记自噬体^[15]。

图3A结果显示,在饥饿处理1 h后,野生型酵母中已经出现大量点状自噬体,但在 $Mss4$ 失活的菌株中,



A: 在野生型酿酒酵母 $BY4741$ (WT)和温度敏感突变菌株 $mss4^{\Delta}$ 中过表达自噬体标记蛋白 $GFP-Atg8$ (绿色),并用 $FM4-64$ 标记液泡(红色),37 °C热击2 h后用SD(-N)培养基饥饿处理1 h(标尺=2 μ m); B: 统计图表示A图中能够形成自噬体的细胞比例,每组数据中统计40个细胞,误差线表示3次独立实验的标准差,** $P<0.01$; C: 用 GFP 抗体在Western blot中检测A图细胞中的 $GFP-Atg8$ 剪切比例。 $PGK1$ 为内参。

A: autophagosome marker $GFP-Atg8$ (green) was overexpressed in yeast strain $BY4741$ (WT) and $mss4^{\Delta}$. Vacuole was stained with $FM4-64$ (red). After heat shock for 2 h at 37 °C, the strains were starved for 1 h with SD(-N) medium for live cell imaging(scale bar=2 μ m); B: cells with $Atg8$ puncta in figure A were quantified. 40 cells were counted. Error bars represent s.d. from three independent experiments, ** $P<0.01$; C: $GFP-Atg8$ in cells from figure A was detected by Western blot using antibody against GFP . $PGK1$ was used as the internal control.

图3 酵母中 $Mss4$ 失活导致自噬水平下降
Fig.3 Autophagy level decreases in $mss4^{\Delta}$ cells

点状自噬体的形成明显减少。统计结果显示, 在野生型菌株中大约95%的细胞形成了点状自噬体, 但在Mss4失活的菌株中只有76.9%的细胞形成了自噬体。

GFP-Atg8的剪切也可以用来检测自噬水平。在自噬发生的过程中, GFP-Atg8随自噬体一起进入液泡中被降解, 一般情况下, GFP-Atg8被剪切的比例越高, 自噬发生得越剧烈^[16]。从图3C的结果中可以看出, 在饥饿处理4 h后, *mss4^Δ*组的GFP/GFP-Atg8的比例要明显低于野生型, 说明该组的自噬水平要低于野生型。以上结果表明, Mss4也在自噬的发生中起作用。

3 讨论

在哺乳动物细胞中, 我们发现在*PIP5K1C*敲低后欧米茄体的形成出现异常, 进而自噬体的形成减少, 自噬水平降低, 这样的结果在酵母中也得到了验证, 这表明*PIP5K1C*在自噬体的形成中起着重要的作用。值得一提的是, 在*PIP5K1C*敲低后欧米茄体呈现大量线状的异常结构, 但LC3的点状结构依然可以形成, 我们推测可能是*PIP5K1C*的敲低导致了欧米茄体和自噬体的分离过程受阻, 进而导致欧米茄体的扩展。因为欧米茄体是依附在内质网膜上的, 如果其与自噬体长期不能分离, 便很可能沿着内质网扩展而形成线状结构, 但这一假设还需要后续的研究来证明。

另外一个很有意思的问题是*PIP5K1C*究竟是如何影响欧米茄体的形成的? 作为一种磷脂酰肌醇5-激酶, *PIP5K1C*的重要作用是将PI4P转化成PIP₂, 而PIP₂是很多蛋白质在膜上的结合位点, 有可能在欧米茄体上存在着PIP₂, 而*PIP5K1C*的敲低影响了PIP₂的浓度从而影响到某些重要蛋白的招募, 并最终导致欧米茄体的异常和自噬体形成的减少, 但我们也不能排除*PIP5K1C*通过间接方式影响欧米茄体的形成。这个问题还有待于进一步的研究。

参考文献 (References)

- Tooze SA, Yoshimori T. The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* 2010; 12(9): 831-5.
- Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: Core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 2007; 9(10): 1102-9.
- Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, *et al.* Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* 2010; 465(7300): 942-6.
- Mizushima N. Autophagy: Process and function. *Genes & Dev* 2007; 21(22): 2861-73.
- Ishihara H, Shibasaki Y, Kizuki N, Wada T, Yazaki Y, Asano T, *et al.* Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases. Cloning of the third isoform and deletion/substitution analysis of members of this novel lipid kinase family. *J Biol Chem* 1998; 273(15): 8741-8.
- Narkis G, Ofir R, Landau D, Manor E, Volokita M, Hershkowitz R, *et al.* Lethal contractural syndrome type 3 (LCCS3) is caused by a mutation in PIP5K1C, which encodes PIPKI gamma of the phosphatidylinositol pathway. *Am J Hum Genet* 2007; 81(3): 530-9.
- Hay JC, Fiset PL, Jenkins GH, Fukami K, Takenawa T, Anderson RA, *et al.* ATP-dependent inositide phosphorylation required for Ca²⁺-activated secretion. *Nature* 1995; 374(6518): 173-7.
- Oude Weernink PA, Schmidt M, Jakobs KH. Regulation and cellular roles of phosphoinositide 5-kinases. *Eur J Pharmacol* 2004; 500(1/2/3): 87-99.
- Brown FD, Rozelle AL, Yin HL, Balla T, Donaldson JG. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Biol Chem* 2001; 276(5): 1007-17.
- Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, *et al.* Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Chem Biol* 2008; 182(4): 685-701.
- Sugawara K, Suzuki NN, Fujioka Y, Mizushima N, Ohsumi Y, Inagaki F. The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8. *Genes Cells* 2004; 9(7): 611-8.
- Rohrer J, Schweizer A, Russell D, Kornfeld S. The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *J Cell Biol* 1996; 132(4): 565-76.
- Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 2005; 171(4): 603-14.
- Vida TA, Emr SD. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* 1995; 128(5): 779-92.
- Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell* 2008; 19(8): 3290-8.
- Nair U, Thumm M, Klionsky DJ, Krick R. GFP-Atg8 protease protection as a tool to monitor autophagosome biogenesis. *Autophagy* 2011; 7(12): 1546-50.

Function of PIP5KIC in Autophagosome Formation

Liu Mei¹, Chen Lilian², Zhang Shaojin³, Rong Yueguang^{1*}

(¹*School of Life Science, Tsinghua University, Beijing 100084, China;* ²*School of Biology, China Agricultural University, Beijing 100083, China;* ³*College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*)

Abstract Autophagy is a conserved lysosome-dependent degradative pathway in eukaryotes. During autophagy, autophagosomes engulf and deliver the accumulated proteins and damaged organelles to lysosomes for degradation. In our study, we found that type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoform C (PIP5KIC) is involved in autophagosome formation. In mammalian cells, omegasome morphology is abnormal and autophagy level is decreased when PIP5KIC is knocked down. Similar phenotype was also found in yeast cells. The inactivation of Mss4, which is the homologue of type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in yeast, leads to the reduction in autophagy level. Based on these evidences, we concluded that PIP5KIC plays an important role in autophagosome formation.

Key words autophagy; omegasome; PIP5KIC

Received: August 3, 2012 Accepted: August 28, 2012

This work was supported by the State Key Development Program for Basic Research of China (No.2010CB833704)

*Corresponding author. Tel: 86-10-62794552, E-mail: ryg08@mails.tsinghua.edu.cn