

p53 相关蛋白激酶结合蛋白 CGI-121

谭爱武 张耀洲*

(浙江理工大学生命科学学院, 生物化学研究所, 杭州 310018)

摘要 利用酵母双杂交技术从人的睾丸 cDNA 文库中鉴定得到 p53 相关蛋白激酶(PRPK)结合蛋白 CGI-121, 体外实验表明, 重组 CGI-121 能抑制 PRPK 磷酸化 p53 第 15 位的 Ser, 未磷酸化 p53 进入泛素蛋白酶体途径, 导致细胞增殖或肿瘤发生; 然而, 体内过表达 CGI-121 并没有显著的抑制 PRPK 磷酸化 p53。Michael Downey 等在研究 *cdc13* 基因缺陷型酿酒酵母中筛选得到 *cdc13-1* 突变体的抑制基因 *CGI-121*, CGI-121 是真核生物一个新的保守复合物——KEOPS 复合物组成之一, KEOPS 复合物具有促进端粒延伸和使端粒拆开的功能。CGI-121 突变体在热敏感 *cdc13-1* 酵母突变株中可以减少 ssDNA 的积累和缩短端粒; 同时, 在端粒功能异常芽殖酵母中 CGI-121 和 piD261/Bud32 促进端粒的拆开。然而, 基因调控自身表达的机制以及在 PRPK 信号途径和 KEOPS 复合物中的扮演的角色有待于进一步研究。

关键词 CGI-121; p53 相关蛋白激酶; KEOPS; 端粒

p53 相关蛋白激酶(p53-related protein kinase, PRPK)属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 piD261 家族的成员^[1], PRPK 基因首次从人白细胞介素-2-介导的细胞毒性 T 细胞中克隆得到^[2], 随后在爪蟾、鼠、黑猩猩、猕猴和豹纹斑马鱼等物种中也证实该基因的存在。RT-PCR 分析表明睾丸、多种癌细胞株如 AsPC-1、PANC-1 和 MIA PaCa-2 及活化的 mLT- 阳性细胞毒性 T 细胞检测到 PRPK 高表达^[2], 而在心脏、肾及脾脏中低表达。酿酒酵母 piD261/Bud32 是 piD261 家族的另一成员, 与人 PRPK 具有 64% 相似性^[3]。piD261 家族属于嗜酸性丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, piD261/Bud32 和 PRPK 结构上不同于典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。典型的蛋白激酶的催化结构域由 300~350 个氨基酸残基组成, 分成 12 个模体, 专一性地识别碱性和脯氨酰氨基酸残基^[4,5], piD261/Bud32 和 PRPK 由于模体 GXGXXG、AMK、RDLXXXN 和 APE 发生突变以及第 XI 个模体发生缺失造成蛋白酶的部分功能丢失^[2]。体外实验表明, piD261/Bud32 可以磷酸化酪蛋白, 但不能识别组蛋白等碱性蛋白^[6]。过表达 PRPK 可以部分互补 piD261/Bud32 基因缺失造成酿酒酵母细胞分裂速率减少以及稳定性低等表型变化^[3], 由此可知, piD261/Bud32 和 PRPK 具有功能上的保守性。

最新研究表明, 重组 PRPK 和 piD261/Bud32 可结合肿瘤抑制蛋白 p53 并磷酸化其第 15 位的 Ser^[2]。PRPK 含有核定位信号肽, 内源性 PRPK 定位于细胞

质中, 而 PRPK 过表达时其定位于细胞核中^[7]。定位的差异暗示 PRPK 在磷酸化 p53 过程中可能存在其他蛋白来调控这一过程, 研究与 PRPK 相互作用蛋白将有助于丰富对 p53 抑癌基因的信号转导途径的认识。到目前为止, 已经鉴定了 CGI-121^[8]和 Rab1c(又称 Ray 或 Rab35)^[7]两种与 PRPK 相互作用的蛋白质。下面对与 PRPK 结合蛋白 CGI-121 近年的研究进展进行综述。

1 CGI-121 的名称由来

Miyoshi 等^[8]研究 PRPK 信号途径时使用酵母双杂交技术以 PRPK 作为诱饵蛋白筛选人睾丸 cDNA 文库, 经鉴定得到一条与 PRPK 相互作用的蛋白质, 其表达序列标签编号为 CGI-121。人、小鼠、爪蟾、恒河猴和赤拟谷盗等物种克隆得到该条基因, 同时在家蚕马氏管(BY916054)、丝腺(CN211798)、卵巢(BP180274)和胚胎(BY941374)等组织以及蛹期(DN237389)等也报道了该基因。蛋白质多序列比对从绿藻到人的 CGI-121 表明, 该蛋白质具有保守性(如图 1A 所示)。该蛋白质含有一个保守结构域 CGI-121, 然而其生物学功能目前不清楚, 因此, 该蛋白质命名

收稿日期: 2007-07-18 接受日期: 2007-10-13

国家重点基础研究发展规划(973 计划)(No.2005CB121006)、国家科技支撑计划项目(No.2006BAI01B04)、国家自然科学基金(No.30670095)和浙江省自然科学基金重点项目(No.Z204267)资助

* 通讯作者。Tel/Fax: 0571-86843198, E-mail: yaozhou@chinagene.com

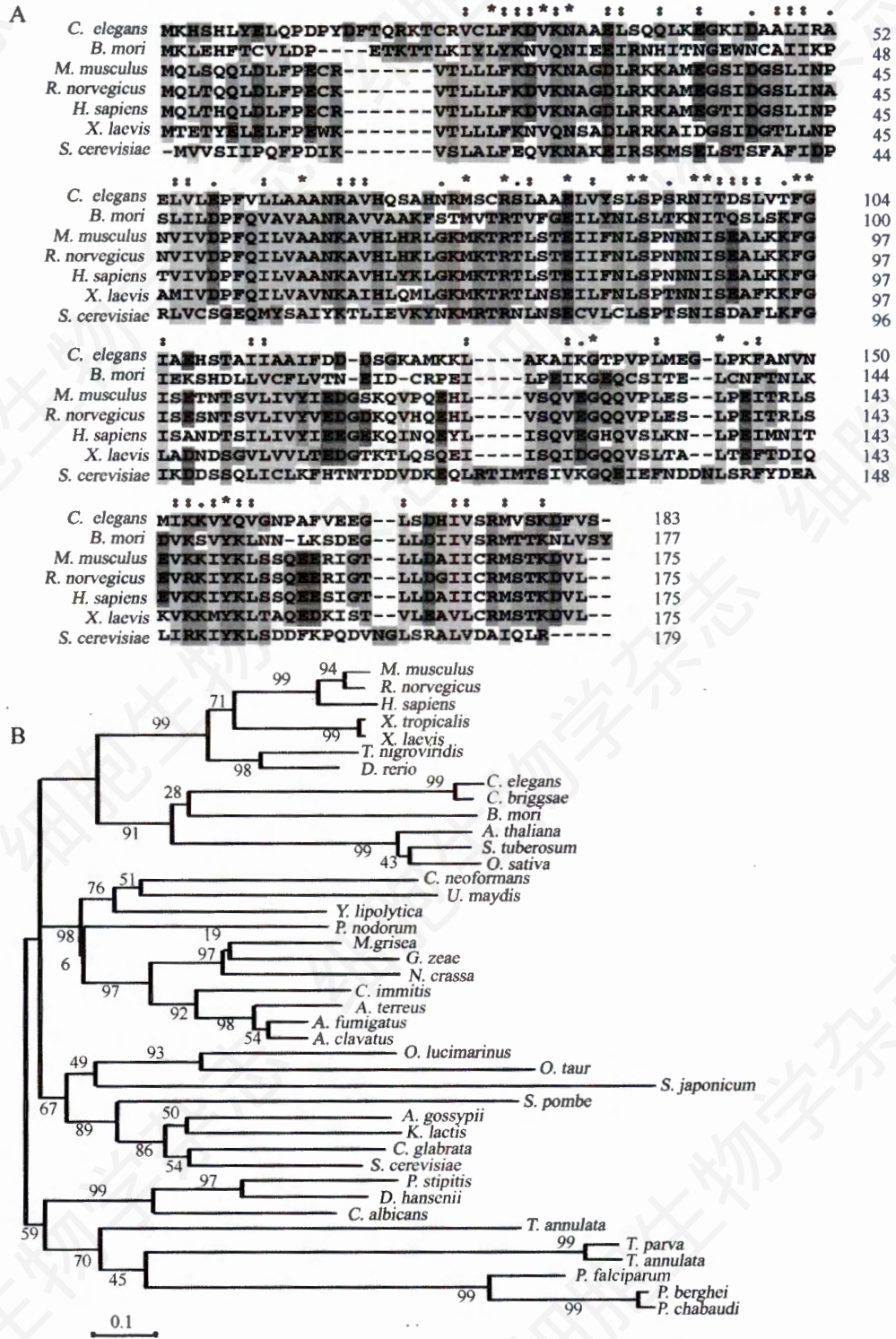


图1 Clustalx1.83对不同物种13个CGI-121进行蛋白质多序列比对(A)和用MEGA3.1构建的41个不同物种CGI-121构建的无根进化树(B)

构建蛋白质多序列比对和进化树的蛋白质登陆号。A.clavatus: XP_001272860; A.gossypii: NP_983150; A.fumigatus: XP_749456; A. terreus: Q0C9R3; A.thaliana: NP_680763; B.mori: ABD36337; C.albicans: XP_716826; C.briggsae: CAE72829; C.elegans: NP_500735; C. immitis: XP_001245105; C.neoformans: XP_569923; D.hansenii: XP_459976; D.rerio: NP_001007374; G.zeae: XP_385063; H.sapiens: NP_057142; K.lactis: XP_452867; M.grisea: XP_361749; M.musculus: NP_789812; C.glabrata: XP_445872; N.crassa: XP_965617; O. lucimarinus: XP_001419719; O.satva: EAY72485; O.taur: CAL55254; P.berghei: XP_677530; P.chabaudi: XP_744176; P.falciparum: XP_001351674; P.nodorum: Q0UEM3; P.stipitis: XP_001386322; R.norvegicus: NP_001013948; S.cerevisiae: Q03705; S.japonicum: AAW25221; S.pombe: NP_588015; S.tuberosum: ABA81864; T.annulata: XP_954454; T.nigroviridis: CAG01171; T.parva: XP_765799; T.vaginalis: XP_001329122; U.maydis: XP_762316; X.laevis: NP_001086678; X.tropicalis: NP_989325; Y.lipolytica: XP_503433.

为 CGI-121。人 CGI-121 可与 PRPK 相互作用, 因此, CGI-121 又称为 p53 相关蛋白激酶结合蛋白 (p53-related protein kinase binding protein, PRPKbp)^[8]。同时 CGI-121 在 KEOPS 复合物中发挥着重要的作用^[9,10]。从 pfam 数据库搜索含 CGI-121 保守结构域的蛋白质, 用 MEGA3.0 软件对其中的 41 条蛋白质构建进化树来分析该蛋白质的在不同物种的同源关系, 如图 1B 所示, 人与鼠、家蚕与线虫的亲缘关系近, 但是不同酵母 CGI-121 同源性差, 但都处于同一进化支, 该进化图可反应出 CGI-121 在各物种间进化关系, 家蚕 CGI-121 (ABD36337) 与高等植物水稻、拟南芥等亲缘关系近, 其次与处于同一进化支的人和鼠等哺乳动物具有一定的亲缘关系, 但是与酵母等真菌类 CGI-121 亲缘关系远。

2 CGI-121 与 PRPK 信号途径

PRPK 磷酸化 p53 第 15 位的 Ser^[2], 磷酸化的 p53 启动 *p21^{Waf1/Cip1}* 基因转录, 促使 p21 表达, 后者使 Cdk 失活, 导致细胞不能从 G₁ 期进入 S 期, 从而抑制 DNA 受损细胞的生长和分裂并诱导突变细胞发生凋亡^[11]。酵母双杂交和免疫共沉淀等体外实验表明 CGI-121 和 PRPK 存在相互作用^[2], p53 pull-down 表明, CGI-121 可以和 p53 竞争性结合 PRPK, 过量 GST-CGI-121 与 PRPK 结合后, 使后者在体外磷酸化 p53 的效率明显降低; 然而, PRPK 并不能将 CGI-121 磷酸化, 因此, CGI-121 和 p53 竞争性结合 PRPK 并不是通过竞争 PRPK 的催化位点, 而可能是通过与 PRPK 结合改变 PRPK 的空间构象, 从而抑制 p53 与 PRPK 的相互作用, 使 p53 的未被磷酸化, 未磷酸化的 p53 进入泛素蛋白酶体途径, 启动细胞进入增殖或向肿瘤转化^[12,13]。但是, 体内过表达 CGI-121 并没有显著的抑制 PRPK 磷酸化 p53 第 15 位的 Ser, 表明 p53 磷酸化由多种调控机制完成, 其可能包括 PRPK 途径和其他的蛋白激酶和磷酸化酶共同作用完成。然而, *CGI-121* 基因表达的调控机制目前尚不清楚, 因为 EGF、TGF- α 、TGF- β 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、PMA、视黄酸、维生素 D3、蛋白酶 / 蛋白酶体抑制剂和 UV 照射等处理 293T 或 HL-60 细胞后, *CGI-121* 基因的表达量没有发生显著的变化; 同时, 在 p53 缺失和 / 或突变的几种细胞株中, *CGI-121* 基因的表达量恒定^[8]。此外, p53 作用于细胞核, CGI-121 缺乏核定位信号, 其转入核的机制目前也尚不清楚。因此, CGI-121 介导的 PRPK 信号途径可能如图 2 所示; 在需细胞大量增殖

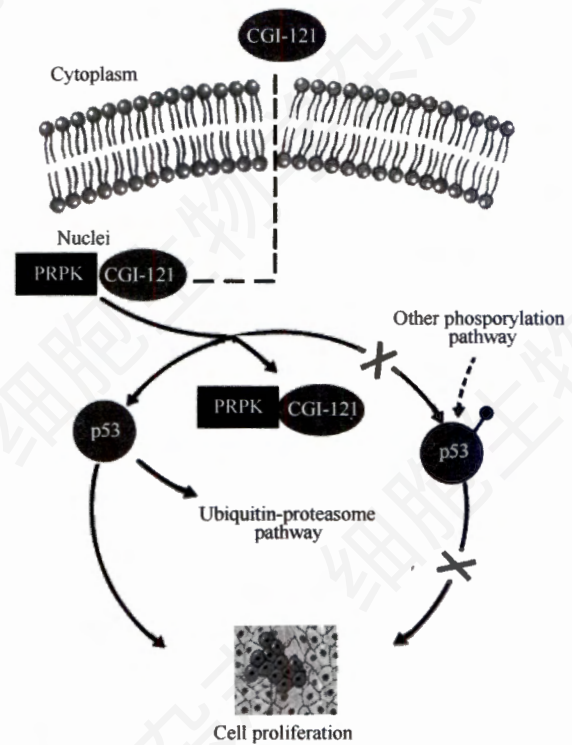


图 2 CGI-121 在 PRPK 信号途径中可能的作用机制^[8]

的组织如睾丸中, *CGI-121* 基因以一种目前不明机制调控其表达, 随后 CGI-121 通过某种方式进入细胞核与 p53 竞争性结合 PRPK, 从而抑制 p53 的磷酸化, 未磷酸化的 p53 进入泛素蛋白酶体途径, 从而使细胞增殖, 同时, 细胞通过其它的蛋白激酶和磷酸化酶途径磷酸化 p53, 调控细胞增殖。

3 CGI-121 与 KEOPS 复合物

KEOPS 复合物由 Downey 等^[10]在研究热敏感 *cdc13-1* 酵母突变株时, 涉及参与 *cdc13* 缺陷型的端粒调控的抑制基因时提出。其全称为激酶、内肽酶和其他小分子蛋白 (kinase, putative endopeptidase, and other proteins of small size), 由 Bud32、CGI-121、Kae1 和 Gon7 等组成, 其中 Bud32、CGI-121 和 Kae1 在真核生物中相当保守, 表明该复合物具有进化上的保守性。分别缺失 *CGI-121*、*BUD32*、*GON7* 均导致端粒缩短, 然而 *CGI-121*、*BUD32*、*GON7* 双突变株并没有使其端粒进一步缩短, 表明, KEOPS 复合物作为整体促进端粒延伸和使端粒拆开的功能。其维持染色体端粒的长度是通过维持端粒酶介导的途径来完成, 而不是通过 YKU 或 TEL1 依赖型途径来完成^[9,10]。

单链 DNA (ssDNA) 常产生于染色体 DNA 3' TG

链上, Cdc13 以 OB 折叠结构域与 ssDNA 的 3' 端的突出片段专一性结合^[14], 与 ssDNA 结合的 Cdc13 募集端粒酶等参与端粒加帽的过程。Cdc13 的突变造成 ssDNA 的积累继而发生细胞周期停滞^[15]。Rad24 和 Exo1 与染色体末端产生 ssDNA 所必须的^[16], CGI-121 突变体和 Exo1 缺失在热敏感 *cdc13-1* 酵母突变株中都减少了 ssDNA 的积累。因此, CGI-121 与 ssDNA 的产生有关, 其突变体是产生 ssDNA 的抑制蛋白之一。如前所述, CGI-121 与 PRPK 存在相互作用^[2], Bud32 与 PRPK 具有相似性, 免疫共沉淀表明, CGI-121 和 piD261/ Bud32 也存在相互作用, 研究表明, CGI-121 和 piD261/ Bud32 在端粒功能异常芽殖酵母中促进端粒的拆开, 同时, 缺失 KEOPS 复合物表现出促进端粒缩短, 表明该复合物正调控端粒延伸。CGI-121 的突变体具有使缩短端粒的功能, 但是, 其抑制效应低于 Bud32 突变体^[10]。

Bianchi 等^[9]提出了两个可能的作用机制来解释 KEOPS 复合物在促进端粒延伸和端粒拆开的作用(图 3A、图 3B 所示): 模型一, 开放复合物(open complex)的状态; 在该状态下的 *cdc13-1* 细胞中, KEOPS 复合物允许端粒酶和其他蛋白质进入端粒 DNA 末端, 促进端粒末端的切除和 Cdc13/Rpa 的结合, 最后激活 Est1 使细胞通过细胞周期检测点进入 S 期。模型二, 端粒复制的开放状态; KEOPS 复合物在 S 期促进端粒末端切除和 TG 突出端的形成, 这个状态导致在野生细胞中募集 Cdc13- 和 Rpa1- 依赖型端粒酶和在 *cdc13-1* 细胞切除端粒末端以激活细胞周期检测点。然而, 从这个可能的模型并没有说明 CGI-121 等各个组成成分所起的作用。

4 展望

目前研究表明, CGI-121 在 PRPK 途径和 KEOPS 复合物中扮演着重要的作用。然而, CGI-121 如何调控自身表达以及通过何种机制运送入细胞核需要深入研究。体外实验结果表明, CGI-121 可以抑制 PRPK 磷酸化 p53, 但是体内表达 CGI-121 并没有预期的结果, 表明 CGI-121 在 PRPK 途径中功能的复杂性, 进一步阐述 CGI-121 在体内的作用机制对于了解其在细胞增殖中的作用有着重要的意义。KEOPS 复合物具有端粒拆开和端粒延伸的功能, 然而 KEOPS 复合物组成成分之一的 CGI-121 的具体生物学功能目前尚不清楚, 研究其在真核染色体 DNA 端粒形成中的功能对于更深入了解端粒调控功能具有重要的理论

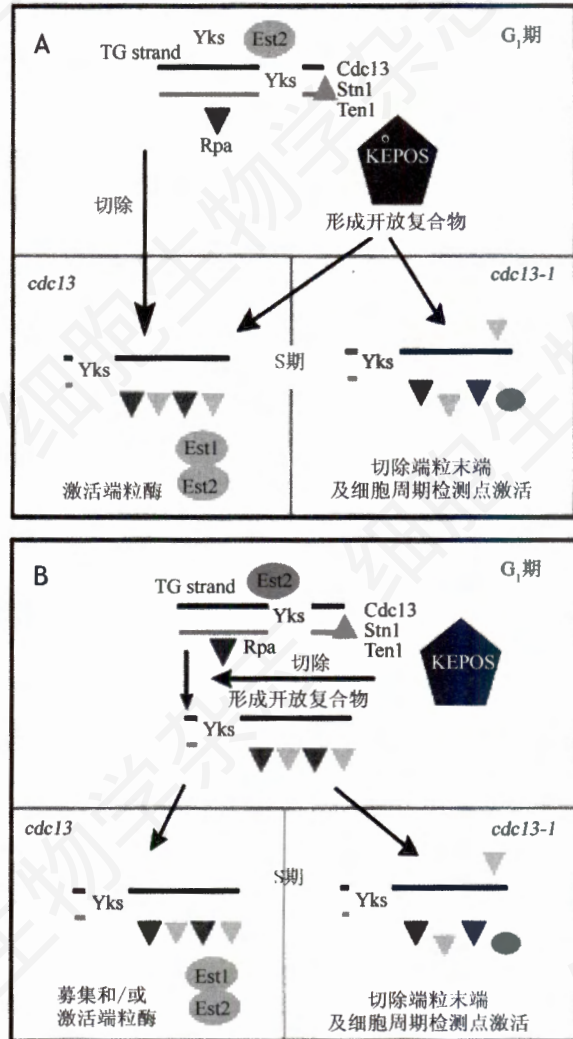


图3 KEOPS 复合物可能的作用机制^[9]

和实践意义。

参考文献 (References)

- [1] Lopreiato R *et al. Biochem J*, 2004, **377**: 395
- [2] Abe Y *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 44003
- [3] Facchin S *et al. FEBS Lett*, 2003, **549**: 63
- [4] Facchin S *et al. Biochem J*, 2002, **364**: 457
- [5] Pinna LA *et al. Biochim Biophys Acta*, 1996, **1314**: 191
- [6] Stocchetto S *et al. FEBS Lett*, 1997, **414**: 171
- [7] Abe Y *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **344**: 377
- [8] Miyoshi A *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **303**: 399
- [9] Bianchi A *et al. Cell*, 2006, **124**: 1125
- [10] Downey M *et al. Cell*, 2006, **124**: 1155
- [11] Pines J. *Nature*, 1994, **369**: 520
- [12] Braithwaite AW *et al. Carcinogenesis*, 2005, **26**: 1161
- [13] Gorgoulis VG *et al. Nature*, 2005, **434**: 907
- [14] Mitton-Fry RM *et al. J Mol Biol*, 2004, **338**: 241
- [15] Proctor CJ *et al. J R Soc Interface*, 2007, **4**: 73
- [16] Zubko MK *et al. Genetics*, 2004, **168**: 103

p53-related Protein Kinase-binding Protein CGI-121

Ai-Wu Tan, Yao-Zhou Zhang*

(Institute of Biochemistry, College of Life Science, Zhejiang Sci-Tec University, Hangzhou 310018, China)

Abstract A novel p53-related protein kinase (PRPK) binding protein CGI-121 was isolated from human testis cDNA library by the yeast two-hybrid screening using PRPK as the bait. The recombinant CGI-121 could suppress phosphorylation of p53 at Ser15 by PRPK *in vitro*; the unphosphorylated p53 was degraded by ubiquitin-proteasome pathway, which lead to cell proliferation or tumorigenesis; However, overexpression of recombinant CGI-121 *in vivo* had no remarkable impact on inhibition of p53 phosphorylation by PRPK. At the same time, the suppressor CGI-121 was screened from the *cdc13-1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* by Michael Downey *et al.*. CGI-121 was a component of the KEOPS complex, and KEOPS is a novel conserved complex in eukaryotes, which could promoting telomere uncapping and telomere elongation. The CGI-121 mutants could suppress ssDNA accumulation and shorten length of telomeres in the *cdc13-1* strain, and CGI-121 might promote telomere uncapping in budding yeast under the conditions of telomere dysfunction. However, the expression and regulation mechanism of CGI-121 and the roles acting in the PRPK pathway and the KEOPS complex are unclear up to now.

Key words CGI-121; p53-related protein kinase; KEOPS; telomere

Received: July 18, 2007 Accepted: October 13, 2007

This work was supported by the National Basic Research Program of China (973 Program) (No.2005CB121006), the National Key Technologies R&D Program (No.2006BAI01B04), the National Natural Science Foundation of China (No.30670095), and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Z204267)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-86843198, E-mail: yaozhou@chinagene.com