

核纤层研究进展

陈彬 翟中和

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

核纤层是高等动物细胞中普遍存在的核结构。它由一至多种核纤层蛋白构成^[1]。根据蛋白质序列与生化性质分析,核纤层蛋白分为两

类: A类和B类。这两类蛋白由不同的基因编码,它们具有共同的一级结构^[2];

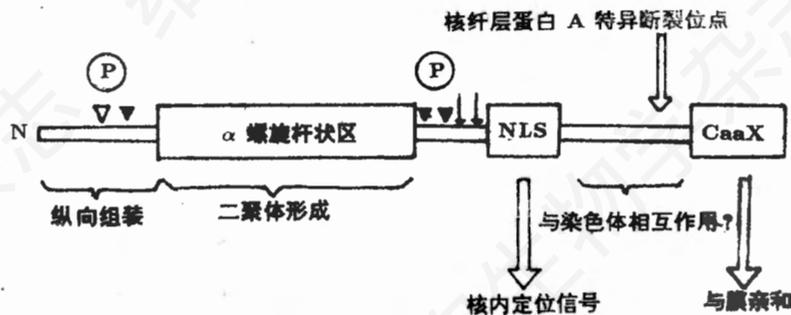


图 核纤层蛋白一级结构示意图

NLS = Nuclear localization signal 序列, CaaX 中 C 为 Cysteine 缩写, a 为脂族氨基酸, X 为任一氨基酸。

核纤层蛋白的翻译后加工、运输、装配、调节核纤层结构周期性解聚与重新形成的机制,以及核纤层的功能一直是细胞生物学家们的研究热点之一。近年核纤层的研究进展体现在四个方面:(1) 确定了使新合成的核纤层蛋白正确定位到核膜下的信号;(2) 利用细菌表达高等动物的核纤层蛋白,通过研究这些蛋白的体外组装,获得了一些关于核纤层蛋白组装的信息;(3) 找到了一个调节有丝分裂开始时核纤层解聚现象的机制;(4) 发现越来越多的证据表明核纤层蛋白与染色质包装、基因表达密切相关,逐步阐明核纤层的功能。

一、核纤层蛋白的翻译后加工与定位信息

有丝分裂间期,随着核膜面积的扩增,核纤层结构必需相应增长。A型和B型核纤层蛋白

在细胞内合成后,都必需进行后加工,才能装配到核纤层结构中。后加工包括 CaaX 的异戊二烯化(Prenylation), C 末端氨基酸残基的酶解,与半胱氨酸残基的羧甲基化(Carboxymethylation)。对于 B 型核纤层蛋白, CaaX 序列的半胱氨酸残基被异戊二烯化,其他 3 个氨基酸残基被切除,然后异戊二烯化的半胱氨酸残基被羧甲基化。异戊二烯化是 B 型核纤层蛋白加工的第一个步骤,是其他步骤的前提。CaaX 序列的后加工对于核纤层蛋白在核膜下的定位是必需的,去掉细胞内的异戊二烯,可以使细胞停留在 G₁/S 期,可能反映了这一时期细胞必需合成新的核纤层蛋白装配到核纤层结构中。A 型核纤层蛋白的后加工更复杂些。新合成的 A 型核纤层蛋白在细胞核内被法呢酰基化(Farnesylation),产生一个中间体,然后 C 末端 18 氨基酸,包括法呢酰基化的 CaaX 序列被切除,因而装配到核纤层的成熟的 A 型

核纤层蛋白分子不被异戊二烯化。A型核纤层蛋白前体的C末端好象对于核纤层蛋白装配不是必需的,人们推测异戊二烯化的A型核纤层蛋白加工时产生的脂肽有它自主的功能^[3]。

核纤层蛋白是在细胞质内合成的。核纤层蛋白具有体外组装成10 nm纤维的能力,这个组装过程不需要其他细胞内成份参与^[4]。核纤层蛋白在细胞内的正确装配依赖于分子的3个结构域:NLS(nuclear localization signal)序列,C末端CaaX结构域和 α 螺旋区^[5]。在翻译的同时或刚刚翻译完,核纤层蛋白依靠 α 螺旋形成超螺旋从而形成二聚体^[4,6]。在翻译后的10分钟内,这些二聚体在NLS序列引导下被运输到细胞核内,并装配到核纤层结构中。NLS序列突变导致核纤层纤维在细胞质内与细胞质膜相结合^[6]。NLS序列和CaaX序列同时缺失导致核纤层纤维在细胞质内分布,而且不与任何膜成分结合^[7]。除NLS序列外,蛋白质的氨基酸组成也在一定程度上影响到蛋白质向核内的定向运输,研究发现,NLS序列的一个关键氨基酸改变后,突变的核纤层蛋白仍然定位到核内^[8]。

核纤层蛋白被运输到细胞核内后,C末端的CaaX序列保证了核纤层蛋白只在核膜下装配而不是散布于整个细胞核。CaaX序列对于核纤层蛋白的正确组装不可缺少,该序列突变阻止了核纤层蛋白在核膜下的装配^[9]。点突变实验表明,NLS序列突变导致核纤层蛋白可与细胞内的任一膜系统结合;CaaX序列突变造成核纤层蛋白大量在核质内堆积,在某些情况下,核纤层蛋白在核质内组装^[5]。 α 螺旋末端对组装很重要的一个区域的一个氨基酸突变,就可影响核纤层蛋白在核膜下的组装。这个结果说明,虽然CaaX序列对于核纤层蛋白与核膜的结合是必需的,但它的作用还很微弱,需要高一级的核纤层蛋白分子装配参与,才能使核纤层与核膜产生稳定的结合^[10]。

在新合成的核纤层蛋白从细胞质向细胞核运输的过程中,蛋白激酶C与其他激酶可能

有一定的调节作用。蛋白激酶C被TPA激活后,使NLS序列附近的相邻两个丝氨酸残基磷酸化,抑制了核纤层蛋白向细胞核内的运输^[11]。

二、核纤层蛋白组装研究进展

一个系统研究核纤层蛋白组装的有效方法是用细菌表达野生型或突变的核纤层蛋白,结合电子显微镜技术,在体外研究这些纯化的核纤层蛋白的组装过程。通过这些研究,观察到了一些中间过程^[12-13]:肌球蛋白状二聚体的形成;二聚体首尾相接形成极性多聚体;极性多聚体横向联合,形成核纤层纤维;最后形成具有周期性结构的核纤层纤维准晶格。二聚体首尾相接纵向排列可能暗示了一种新的核内类似中间纤维蛋白组装机制,以前关于胞质中间纤维蛋白组装的研究强调在组装成纤维之前这些二聚体横向作用形成四聚体或八聚体^[14]。

三、有丝分裂过程中 调节核纤层解聚的机制

核纤层蛋白的磷酸化被认为是调节有丝分裂过程中核纤层解聚的机制,以下几个实验支持了这个机理:(1)有丝分裂时核纤层蛋白被磷酸化,有丝分裂时的两个磷酸化位点已经找到,它们是 α 螺旋杆状区两端的两个丝氨酸残基^[15-17];(2)这两个磷酸化位点突变后,有丝分裂时核纤层解聚与核膜崩解受到抑制^[18];(3)体外实验中,cdc 2激酶使核纤层蛋白在分裂期磷酸化位点发生磷酸化,从而造成核纤层纤维的解聚^[16,17,19];(4)在酵母细胞中表达鸡的核纤层蛋白B2,该蛋白是酵母细胞cdc 2激酶的底物^[20]。这些实验不排除其他激酶使核纤层蛋白在分裂期被磷酸化的可能性。

核纤层蛋白分子磷酸化不影响已经形成的核纤层蛋白二聚体的解聚,也不影响核纤层蛋白单体组装为二聚体^[13,15]。鸡核纤层蛋白B2

杆状区磷酸化后,影响二聚体组装成多聚体的过程^[18,15]。由于体外无法模拟有丝分裂中可能引起核纤层解聚的各方面因素,可能还有其他的蛋白激酶和磷酸酶参与了核纤层解聚过程的调节。最近研究表明,除cdc 2激酶外,核纤层蛋白还是蛋白激酶C的底物,蛋白激酶C的磷酸化位点与它对核纤层蛋白的调节机制正被逐渐阐明^[21-23]。Eggert等^[22]发现,无论是体内还是体外,核纤层蛋白都是这两类激酶的底物,但是只有cdc 2激酶可诱导细胞的核纤层解聚,中期特异的磷酸化位点是cdc 2激酶的作用位点,而间期特异的磷酸化位点受蛋白激酶C修饰。这个结果提示,细胞内一些活性依赖于细胞周期因子的蛋白激酶可以使核纤层蛋白磷酸化,它们与cdc 2激酶一起调节核纤层蛋白分子间的相互作用以及核纤层的组装。

核膜崩解后,A型和B型核纤层蛋白的命运不同。B型核纤层蛋白与核膜残余小泡结合,而A型核纤层蛋白则弥散在胞质中。这可能与这两类蛋白翻译后进行不同的加工过程有关。合成后,这两类蛋白很快被异戊二烯化和羧甲基化。B型核纤层蛋白一直保持CaaX序列被修饰的状态,而A型核纤层蛋白异戊二烯化的羧基端很快被蛋白酶水解掉。A型核纤层蛋白疏水性的CaaX末端丢失可能是分裂期这些蛋白以溶解的形式弥散到胞质内的原因^[8]。此外,核纤层蛋白直接或间接地与核膜内的一些蛋白相互作用。这些蛋白在细胞周期中被周期性的磷酸化,从而导致它们与核纤层蛋白亲合力的变化,这种亲合力的变化可能也与分裂期中三种核纤层蛋白的不同命运有关^[8]。

四、核纤层蛋白与染色质的相互作用及功能

核纤层是间期染色质的核周锚定位点,与染色质的包装有关。利用非洲爪蟾卵母细胞核

重构体系的研究发现核纤层在DNA复制过程中起重要作用。没有核纤层的细胞核虽然可以把复制过程所需要的蛋白运输到核内,却不能进行DNA的复制^[24]。体外研究证实A型核纤层蛋白比B型核纤层蛋白具有更强的与染色体结合的能力,而且这种结合与核纤层蛋白分子的C末端有关^[25]。人们研究了与核纤层蛋白结合的序列,发现MAR序列与核纤层蛋白B1有特异性的亲合力^[26]。

分化的不同阶段,细胞内表达核纤层蛋白的种类不同。所有哺乳动物的体细胞内均有B型核纤层蛋白的表达,但是除最近在造血干细胞中发现的A型核纤层蛋白外,在早期发育阶段,A型核纤层蛋白不表达,后来在大多数分化的细胞内才有表达。研究发现,无A型核纤层蛋白表达时细胞具有分化的多潜能性,A型核纤层蛋白表达后,细胞出现分化的现象。Collard等^[27]的实验直观显示了核纤层蛋白与染色质的三维结构及功能的联系。细胞没有分化时,核纤层结构中核纤层蛋白A集中在核的一端,形成帽子结构,细胞分化早期,核纤层蛋白A重新分布,细胞定型后,核纤层蛋白A均匀地分布在核周。定型的细胞去分化后,核纤层蛋白A重新在细胞核的一端形成帽子结构。分化早期A型核纤层蛋白重新分布,可以暴露出不同的染色质结合位点,有利于染色质改变空间结构,以促使分化中所需基因的表达。细胞完全分化后,染色质的空间组织需要稳定,这时A型核纤层蛋白在核周均匀分布,核纤层蛋白与染色质的相互作用把染色质锚定在细胞核的周围。人们发现^[28],用TPA诱导细胞分化时核纤层蛋白A的C末端构象暂时发生改变,从而把外界信息传递到染色质上,引起细胞分化。

B型核纤层蛋白可能也参与了发育过程中的基因调控。MAR序列结合在核纤层蛋白B1上^[26],为DNA与核纤层相互作用提供了一个依据。HL细胞被诱导分化后,癌基因表达受到调控,细胞出现分化现象,此时核纤层蛋白

B 与一些组蛋白被磷酸化^[20], 暗示核纤层蛋白 B 磷酸化可能与基因表达调控有关。用小鼠精原细胞特有的核纤层蛋白 B 3 cDNA 转化体细胞, 体细胞由圆形变为镰刀状, 说明在减数分裂时, 核纤层蛋白 B 3 可能参与了细胞核与染色质结构的重新组织^[30]。

在核纤层蛋白与染色体关系上另一个人们感兴趣的问题是, 有丝分裂末期核纤层蛋白与染色体的相互作用对于子细胞核形成是否是必需的, 这是一个有争议的问题。早期研究表明核膜形成与染色质去浓缩过程中必需有核纤层蛋白参与, 但是后来的非细胞体系核重构实验对这个观点提出了挑战。在这些实验中, 去除核重构体系中的有功能的核纤层蛋白后, 可以观察到核膜小泡与染色质相互作用并在染色质周围形成新的核膜^[24, 61]。也许这是由于体系中仍有尚未监测到的没有被除去的有功能的核纤层蛋白造成的。事实的确如此, 最近 Krohne 与我们实验室发现爪蟾卵母细胞中除了核纤层蛋白 L III 外, 还存在核纤层蛋白 L II, 核纤层蛋白 L II 可能参与了核膜围绕染色质的组装^[82, 83]。另一方面, 不排除核膜组装有多条途径的可能性。总之, 不能排除体内子细胞核形成时核纤层蛋白起了作用, 核纤层蛋白与染色质表面相互作用可能代表了一种细胞特异的染色体包装机制。

结 语

核纤层是高等动物细胞内一种具有重要功能的核结构, 人们对它的基因结构、蛋白质合成加工、细胞内定位与组装进行了深入的研究, 有丝分裂时核纤层解聚的机理与分裂过程中核纤层的作用正被逐步阐明。但是核纤层蛋白与染色质的作用机制, 以及这种相互作用与分化时基因表达、复制和有丝分裂后期细胞核形成的关系有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 蔡树涛、翟中和, 1991, 细胞生物学进展

(第二卷): p 74—88.

- [2] Stick, R., 1991, *Chromosoma*, 101: 566—574.
- [3] Schafer, W. R., Rine, J., 1992, *Annu. Rev. Genet.*, 26: 209—237.
- [4] Aebi, U., J. Cohn and L. Gerace, 1986, *Nature*, 323: 560—564.
- [5] McKeon, F., 1991, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 3: 82—86.
- [6] Loewinger, L., McKeon, F., 1988, *EMBO J.*, 7: 2301—2309.
- [7] Holtz, D., Tanara, R. A., Hartwig, J., McKeon, F. D., 1989, *Cell*, 59: 969—977.
- [8] Frengioni, J., Neel, B. G., 1993, *J. Cell Sci.*, 105(2): 481—488.
- [9] Krohne, G., Waizenegger I., Hoger T. H., *J. Cell Biol.*, 109: 2003—2011.
- [10] Hancock, J. F., Magee, A. I., Childs, J. E., Marshall, C. J., 1989, *Cell*, 57: 1167—1177.
- [11] Hennekes, H., Peter, M., Weber, K., Nigg, E. A., *J. Cell Biol.*, 120 (6): 1293—1304.
- [12] Heitlinger, E., Peter, M., Haner, M., Lustig, A., Aebi, U., Nigg, E. A., 1991 *J. Cell Biol.*, Vol. 113, 3: 485—495.
- [13] Heitlinger, E., Peter, M., Lustig, A., Villiger, W., Nigg, E. A., Aebi, U., 1992, *J. Struc. Biol.*, 108 (1): 74—91.
- [14] Stewart, M., 1990, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2: 91—100.
- [15] Peter, M., Hefflinger, E., Haner, M., Aebi, U., 1991, *EMBO J.* 10: 1535—1544.
- [16] Ward, G. E., Kirschner, M. W., 1990, *Cell*, 61: 561—577.
- [17] Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J. C., Nigg, E. A., 1990, *Cell*, 61: 591—602.
- [18] Heald, R., McKeon, F., 1990, *Cell*, 61: 579—589.
- [19] Dessev, G., Iovdheva, D. C., Bischoff, J. R., Beach, D., Goldman, R., 1991, *J. Cell Biol.*, 112: 523—533.
- [20] Lamb, N. J. C., Cavadore, J. C., Labbe, J. C., Maurer, R. A., 1991, *EMBO J.*, 10: 1523—1533.
- [21] Eggert, M., Radomski, N., Tripier, D., Traub, P., Jost, E., 1991, *FEBS LETT.* 292 (1/2): 205—209.
- [22] Eggert, M., Radomski, N., Linder, D.,

- Tripier, D., Traub, P., Jost, E., 1993, *Eur. J. Biochem.*, 213(2): 659—671.
- [23] Hocevaux, B., Barbara, A., David, J. B., Alan, P. F., 1993, *J. Biol. Chem.*, 268: 7545—7522.
- [24] Meier, J., Cambell, K. H. S., Ford, C. C., Stick, R., Hutchison, C. J., 1991, *J. Cell Sci.*, 98: 271—279.
- [25] Hoger, T. H., Krohne, G., Kleinschmidt, J. A., 1991, *Exp. Cell Res.*, 197: 280—289.
- [26] Luderus, M. E. E., Graaf A. D., Mattia, E., Blaauwen, J. L. D., 1992, *Cell*, 70(6): 949—959.
- [27] Collard, J. F., Senecal, J. L., Raymond Y., 1992, *J. Cell Sci.*, 101: 657—670.
- [28] Collard, J. F., Raymond, Y., 1992, *Exp Cell Res.*, 201(1): 174—183.
- [29] Martell, R. E., Strahler, J. R., Simpson, R. U., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267(11): 7511—7519.
- [30] Furukawa, K., Hotta, Y., 1993, *EMBO J.*, 12(1): 97—106.
- [31] Newport, J. W., Wilson, K. L., Dunphy, W. G., 1990, *J. Cell Biol.*, 111: 2247—2259.
- [32] Lourim, D., Krohne, G., 1993, *J. Cell Biol.*, 123(3): 501—512.
- [33] 曲健、张传茂、翟中和, 1994, *Cell Research*, 4(2): 163—172.

转基因的整合与表达检测技术

陈兰英 田小利

(中国医学科学院心血管病研究所 北京 100037)

转基因动物是80年代初发展起来的生物高技术,具有广泛的应用前景^[1,2]。该技术难度大,这是由于:第一转基因效率低。第二转基因技术,从方法学角度考虑,可谓“系统工程”,包括动物实验技术、转基因技术和相应的实验条件和准备工作的配套以及常规的分子生物学方法;费用昂贵。第三检测困难。当整合拷贝数极低(甚至只有一个拷贝数)时,其难度比单拷贝基因还大。另外,转基因表达效率低,甚至不表达;这也增加了表达水平的检测难度。除此,当转基因与内源性基因同源性很高时,检测也较困难。若选用检测方法不当,一旦漏检失误,则前功尽弃,由此造成人力、物力上的巨大浪费。因此,慎重选用转基因的检测方法至关重要。随着分子生物学方法的迅速发展,一些新方法不断地应用到转基因检测中,使其日臻完善,但在实际工作中,有关这些方法的具体应用还值得进一步探讨。本文将结合我们工作中的体会,扼要介绍并比较转基因

动物技术中有关转基因整合与表达的检测方法,为经济、合理选择使用这些方法提供依据。

一、基因组DNA的制备

按常规方法^[3]可从动物组织及血液分离基因组DNA。由于小型动物(如小鼠、大鼠等)放血有限,所以除PCR法外,其他检测方法所需的DNA应从组织中提取。耳尖、尾尖是较好的取材部位(出血少,对动物伤害小),一般1—2mg组织可制备1—2μg的基因组DNA。制备的DNA样品应尽可能的减少杂质污染。我们的经验是将DNA制品分别用酚、酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),氯仿/异戊醇(24:1)各抽提一次,并以乙醇(或异丙醇)沉淀后,再反复悬浮、沉淀2—3次,即可免去样品透析的繁琐操作而得到较高纯度的DNA。用于Southern印迹杂交的样品最好新鲜制备,且应注意DNA长度的完整性。对尚未检测就已死