

双亮氨酸模体对NOK/STYK1蛋白的表达及细胞内分布特征的影响

胡 丹^{1, 2#} 姜清波^{2#} 颜廷越² 张淑平^{2*}

(¹新疆农业大学动物科学学院, 乌鲁木齐 830052;

²生物膜与膜生物国家重点实验室, 清华大学生命科学学院, 北京 100084)

摘要 NOK(novel oncogene with kinase domain)蛋白是一种新的在结构上比较独特的受体酪氨酸蛋白激酶家族(protein tyrosine kinases, PTKs)成员, 具有较强的促肿瘤形成及转移的能力, 并参与细胞的内存过程。基因结构序列分析结果表明, 在NOK氨基酸序列中存在多处双亮氨酸模体(di-leucine motif)。有研究表明, 双亮氨酸模体在细胞的内存、膜泡运输以及细胞信号分拣等过程中具有重要作用。为此, 该研究构建了一系列NOK蛋白双亮氨酸模体突变体, 并在HeLa细胞中分析了其蛋白质表达水平及细胞内分布特征。结果表明, NOK蛋白的不同双亮氨酸模体的突变可导致NOK蛋白在细胞中表达量的改变。与对照相比, NOKL220P表达量明显提高, 而NOKL237P表达量降低。从NOK蛋白在细胞内的分布特征来看, 不同双亮氨酸模体的突变同样会引起NOK蛋白在细胞内分布的改变, 包括NOK蛋白形成聚集体的细胞比例、在细胞中的分布位置以及聚集体的大小和数量的不同。特别是NOKL203P、NOK237P以及L299P三个位置的突变可以显著地降低NOK蛋白在细胞中的聚集。不仅如此, 过量表达NOKL41P还表现出了更为明显的核膜定位特征, 而L220P则表现出了更为明显的质膜定位特征。由此说明, NOK的不同双亮氨酸模体对其蛋白质表达水平以及在细胞内的定位分布具有重要的调节作用, 该研究为阐明NOK蛋白促肿瘤形成及转移的分子机理提供了新的见解。

关键词 NOK/STYK1; 双亮氨酸模体; 突变体; 细胞内蛋白质分布形式

Di-leucine Motifs of NOK/STYK1 Affects Its Protein Expression and Distribution in HeLa Cells

Hu Dan^{1, 2#}, Jiang Qingbo^{2#}, Yan Tingyue², Zhang Shuping^{2*}

(¹College of Animal Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; ²State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract NOK/STYK1 is a structurally unique member in receptor tyrosine kinase family (RTKs), which has strong ability to facilitate tumorigenesis and metastasis. It is also involved in cellular endocytosis. Analysis of NOK protein sequence revealed that there were several di-leucine motifs. Di-leucine motifs have been reported to play important roles in cellular endocytosis, vesicle trafficking, signaling sorting and so on. In the present study,

收稿日期: 2015-04-13 接受日期: 2015-08-24

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81171063、81072167)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 010-62773628, E-mail: shpzhang@biomed.tsinghua.edu.cn

Received: April 13, 2015 Accepted: August 24, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81171063, 81072167)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-10-62773628, E-mail: shpzhang@biomed.tsinghua.edu.cn

网络出版时间: 2015-10-22 15:41:23

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151022.1541.004.html>

a series of mutants of NOK di-leucine motifs were established and their protein expression and cellular distribution pattern were analyzed in HeLa cells. The results indicated that mutation in different NOK di-leucine motifs caused different change of NOK protein expression level. The protein expression level of NOKL220P mutant was higher than wild type NOK whereas NOKL237P was lower than wild type. As to the cellular distribution, some mutants altered the cellular distribution pattern of NOK protein, including the proportion of dot pattern (DP)-containing cells to aggregation pattern (AP)-containing cells as well as the localization, the size and the number of NOK aggregates. The mutants of NOKL203P, NOK237P and L299P significantly reduced the formation of NOK aggregates in cells. In addition to the above, overexpression of NOKL41 had more distinctive localization on nuclear envelop whereas overexpression of L220P had more distinctive localization on cytoplasmic membrane. Taken together, di-leucine motifs of NOK mediate its protein expression level and cellular distribution. Therefore, this study provides some new insights into understanding the molecular mechanism underlying NOK's facilitation to tumorigenesis and metastasis.

Keywords NOK/STYK1; di-leucine motif; mutant; protein distribution pattern in cell

酪氨酸蛋白激酶(protein tyrosine kinases, PTKs)是一类具有酪氨酸激酶活性的蛋白质,对细胞的生长、发育与功能的调控均起着重要的作用。酪氨酸蛋白激酶通过催化ATP上的 γ 磷酸基团转移到许多重要蛋白质的酪氨酸残基上的反应,使其发生磷酸化。根据是否具有跨膜结构域,这些PTKs可以分为两大类,即受体型酪氨酸蛋白激酶(RTKs)和非受体型酪氨酸蛋白激酶(NRTKs)^[1]。RTKs在细胞生长过程包括细胞迁移、细胞增殖及抑制细胞凋亡等方面发挥着重要的调节作用^[2-3]。

NOK(novel oncogene with kinase domain)基因作为一个新的RTKs亚家族,具有原癌基因的特性,位于人类第十二号染色体的短臂上,大小约55 Kb,由11个外显子编码422个氨基酸^[4]。NOK基因的高表达可以使裸鼠成瘤,这提示NOK基因是一个原癌基因^[5]。先前的研究也证实,NOK基因在乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌以及肺癌中高表达^[6-8]。Chen等^[9]通过蛋白质序列比对的方式找到了NOK的两个保守的酪氨酸残基位点327和356,并构建了NOKY327F和NOKY356F两个突变体,通过相关研究发现,虽然这两个位点不影响NOK的激酶活性,但可以完全抑制NOK诱导肿瘤的生成。NOK羧基末端的第417位氨基酸残基是一个自主抑制调节位点,该位点的突变能激活NOK介导的多条下游信号通路^[10-11]。Ding等^[12]已证实,NOK在HeLa细胞中的亚细胞分布具有两种不同的表达模式:点状分布(dot pattern, DP)和聚集分布(aggregation pattern, AP)。NOK定位在细胞的早期内吞体上,并且有可能促进表皮生长因子受体从早期内吞体到晚期内吞体以及溶酶体的转运过程。

内含体和溶酶体的跨膜蛋白的分拣是由蛋白质的胞质结构域内存在的信号所介导的。大多数信号由一些短的线性序列或者氨基酸残基组成。一些信号涉及到基于酪氨酸的分拣信号,并符合NPXY或YXX Φ 模体形式。其他一些信号被称为双亮氨酸基信号,它们符合XXXL或DXXLL模体形式^[13]。所谓亮氨酸模体的要求是两个连续的亮氨酸或一个亮氨酸异亮氨酸对的存在,双亮氨酸模体侧链上游的4个酸性氨基酸残基对模体是有益的,但这一点对于模体的活性不是必需的^[14]。信号和识别蛋白复杂的排列方式,保证了内含体-溶酶体系统的不同区室的跨膜蛋白的动态而准确地分布^[13]。对WC1(bovine workshop cluster 1)蛋白的双亮氨酸模体的突变,影响了它的内吞作用,说明双亮氨酸模体与细胞的内吞作用相关^[15-16]。对双亮氨酸模体的结构改变,可能导致目标蛋白在内吞体的亚细胞定位的改变以及蛋白稳定性的改变^[17]。通过对NOK基因的氨基酸比对发现,其中存在多处双亮氨酸模体。然而对于NOK基因中双亮氨酸的突变是否影响NOK蛋白的表达及其在细胞内的分布特征,目前相关的研究较少。本实验在NOK基因的4处双亮氨酸模体(di-leucine motif)位点将亮氨酸L突变为脯氨酸P,旨在研究它们对NOK蛋白的表达及细胞内分布的影响,从而进一步研究NOK基因的不同氨基酸位点对其功能的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料

本研究相关NOK表达载体、细胞系以及细菌

菌株均为清华大学功能基因组实验室保存。

1.2 主要试剂

PCR mix购自北京华佰泰生物科技有限公司; DNA Marker购自美国Thermo公司; 限制性核酸内切酶购自日本TaKaRa公司; T4 DNA连接酶购自美国NEB公司; 质粒小量提取试剂盒和琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒购自北京博迈德基因技术有限公司; DMEM、0.25% Trypsin-EDTA、Lipofectamine 2000、opti-MEM购自美国Invitrogen公司; FBS购自上海依科赛生物制品有限公司; 双抗(青霉素和链霉素)购自德国AppliChem公司; HA单克隆抗体购自北京康为世纪生物科技有限公司; GAPDH抗体购自美国Proteintech Group公司; 山羊抗鼠辣根过氧化物酶标记二抗和TRITC标记山羊抗鼠IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 多聚甲醛购自亚太恒信生物科技(北京)有限公司; Hoechst 33342、Triton X-100和BSA购自美国Sigma-aldrich公司。

1.3 双亮氨酸模体突变位点的构建

根据人源NOK基因的氨基酸序列中双亮氨酸模体的位置, 在pcDNA3.0-NOK-HA和pcDNA3.0-NOKL203P-HA质粒载体的基础上, 选择四处双亮氨酸模体作为突变位置, 构建其双亮氨酸模体点突变载体, 四个突变位置的氨基酸序列号分别为41、220、237、299, 预构建突变载体分别为pcDNA3.0-NOKL41P-HA、pcDNA3.0-NOKL220P-HA、pcDNA3.0-NOKL237P-HA、pcDNA3.0-NOKL299P-HA。采用overlap的方法构建点突变载体。

引物序列的设计根据NCBI数据库中人源STYK1(NOK)基因的基因序列, 采用Primer Premier软件设计引物。N-up: 5'-GCC CAA GCT TGC ACC ATG GGC ATG ACA CGG AT-3'; N-down: 5'-CGC GTC GAC AAG CAT GCT ATA GTT GTA GAA GA-3'; L41P-S: 5'-CAT CCT TCC TGG GGT CAT CCT GTG G-3'; L41P-AS: 5'-ACC CCA GGA AGG ATG AGG AAG ATA GT-3'; L220P-S: 5'-TGG TCT TCC TTA TGA TCT CAC AGA A-3'; L220P-AS: 5'-TCA TAA GGA AGA CCA TCC ATA GTC AT-3'; L237P-S: 5'-TCC TTC CTG CGC TGG AAT TCC TGC A-3'; L237P-AS: 5'-CAG CGC AGG AAG GAC CTG CTT TCC G-3'; L299P-S: 5'-ACG GCT TCC TCT GAG ACC TGC TAG CA-3'; L299P-AS: 5'-TCA GAG GAA GCC GTT CTG GGG CAA G-3'。引物由上海

生工生物工程有限公司合成。

以L41P为例。(1)以pcDNA3.0-NOK203L-HA为模板, 分别以N-up和41P-AS、N-down和41P-S为引物, 进行PCR反应。PCR反应体系: 2×PCR mix 25 μ L, 上游引物和下游引物各1 μ L, 模板质粒0.1 μ L, 加ddH₂O补足至50 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 1 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58.5 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 80 s, 30个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; (2)以上述两种PCR产物为模板, 以N-up和N-down为引物, 进行PCR反应。PCR反应体系: 2×PCR mix 25 μ L, 上游引物和下游引物各0.5 μ L, 上述两部分PCR产物各取1 μ L并稀释100倍后各取1 μ L, 加ddH₂O补足至50 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 1 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 80 s, 20个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.4 细胞的培养

HeLa细胞培养于10%胎牛血清的DMEM培养基中(含100 U/mL青霉素和链霉素), 放置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养, 细胞密度达到80%时传代, 平均2 d传代1次, 取对数生长期的细胞进行各项实验。

1.5 细胞的转染

HeLa细胞接种于6孔板中, 每孔细胞数为 3×10^5 , 24 h后用Lipofectamine 2000转染试剂将对照质粒和目的质粒转染到HeLa细胞中, 于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养。6 h更换新鲜的完全培养液, 转染完成。36 h后观察或收取细胞。

1.6 点突变载体蛋白质水平检测(Western blot)

收取6孔板中的细胞, 用200 μ L SDS在冰上裂解细胞20 min, 加100 $^{\circ}$ C沸水煮8 min, 于4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心5 min, 取上清液进行SDS-PAGE电泳, 转硝酸纤维素膜, 5%脱脂牛奶封闭2 h。一抗孵育, 4 $^{\circ}$ C过夜, TBST洗4次, 每次7 min, 辣根过氧化物酶标记的二抗于室温孵育2 h, 然后用TBST洗4次, 每次7 min, 最后曝光显影。

1.7 点突变载体细胞定位的检测

将细胞铺于放有盖玻片的6孔板中, 接种细胞数为 3×10^5 , 接种细胞后24 h按照前述方法转染, 36 h后用PBS洗2次, 固定液(4%多聚甲醛)室温固定20 min, 之后PBS洗2次, 每次5 min, 穿透液(0.2% Triton X-100的PBS)室温穿透10 min, 然后用PBS洗2次, 每次5 min, 封闭液(含1% BSA的PBS)37 $^{\circ}$ C封闭1 h。加0.2% BSA-PBS稀释的一抗, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, PBS洗2次, 每次5 min, 加0.2% BSA-PBS稀释的二抗, 室温避光孵育2 h。加1 mL PBS稀释的Hoechst 33342, 室温避光

孵育15 min。最后PBS洗4次, 每次5 min, 用50%甘油-PBS将盖玻片固定到载玻片上, 指甲油封边, 激光共聚焦显微镜观察并拍照。

1.8 统计学处理

数据采用GraphPad Prism 5统计软件进行处理, 以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 点突变载体的构建结果验证

将构建的表达质粒pcDNA3.0-NOKL41P-HA、pcDNA3.0-NOKL220P-HA、pcDNA3.0-NOKL237P-HA和pcDNA3.0-NOKL299P-HA经Hind III和BamH I双酶切后经琼脂糖凝胶电泳, 结果如图2所示。将获得质粒送北京博迈德基因技术有限公司测序, 测序结果显示各突变位置测序正确。

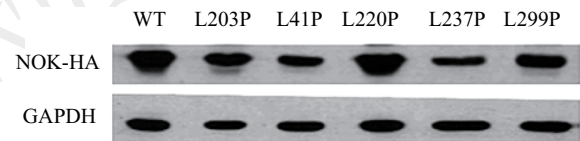
2.2 不同双亮氨酸模体对NOK蛋白表达水平的影响

将HeLa细胞分别转染pcDNA3.0-HA、pcDNA3.0-NOK-HA、pcDNA3.0-NOKL41P-HA、pcDNA3.0-NOKL220P-HA、pcDNA3.0-NOKL237P-HA、pcDNA3.0-NOKL299P-HA及pcDNA3.0-NOKL203P-HA质粒, 通过Western blot检测目的蛋白质的水平(图2)。用Image J对NOK-HA/GAPDH蛋白定量, 并用GraphPad Prism作图(图3)。NOK基因及其双亮氨酸基序点突变的蛋白质表达量是对该基因及其突变载体从DNA开始, 经转录和翻译, 并最终表达为蛋白质的全过程的最终诠释。结果发现, NOK基因及

其突变体的蛋白质表达存在明显差异, 说明对NOK基因不同位点的点突变, 可能对其在从DNA到蛋白质的某个过程产生了一定的影响, 并最终反应为蛋白质表达量的改变。与WT相比, NOKL220P蛋白质表达量明显增多($P=0.008$), NOKL237P蛋白质表达量明显减少($P=0.040$)。这说明NOK基因的220位点所处的双亮氨酸模体的点突变使NOK蛋白质表达量增加, 推测220位的突变可能改变了NOK蛋白质的内吞作用, 并降低了NOK蛋白质的降解。而237位所处的双亮氨酸模体的点突变使NOK蛋白质表达量降低, 这提示我们, 这三处位点的突变可能改变了NOK蛋白质的内吞作用与运输功能。

2.3 不同双亮氨酸基序对NOK蛋白在细胞内分布特征的影响

将HeLa细胞分别转染pcDNA3.0-HA、pcDNA3.0-NOK-HA、pcDNA3.0-NOKL41P-HA、pcDNA3.0-

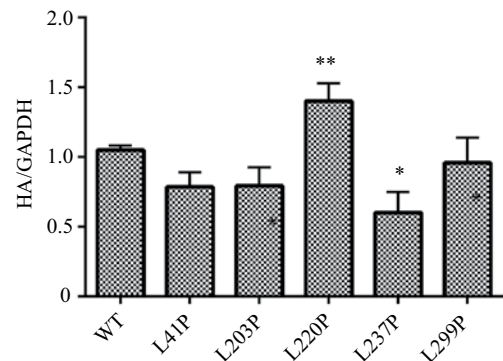


WT: 野生型NOK载体; L203P: 203位点突变载体; L41P: 41位点突变载体; L220P: 220位点突变载体; L237P: 237位点突变载体; L299P: 299位点突变载体。

WT: pcDNA3.0-NOK-HA; L203P: pcDNA3.0-NOKL203P-HA; L41P: pcDNA3.0-NOKL41P-HA; L220P: pcDNA3.0-NOKL220P-HA; L237P: pcDNA3.0-NOKL237P-HA; L299P: pcDNA3.0-NOKL299P-HA.

图2 不同点突变载体的蛋白表达

Fig.2 The protein expression of WT and the different mutations

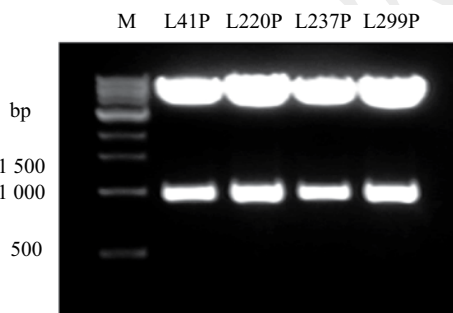


WT: 野生型NOK载体; L41P: 41位点突变载体; L203P: 203位点突变载体; L220P: 220位点突变载体; L237P: 237位点突变载体; L299P: 299位点突变载体。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与WT组比较。

WT: pcDNA3.0-NOK-HA; L41P: pcDNA3.0-NOKL41P-HA; L203P: pcDNA3.0-NOKL203P-HA; L220P: pcDNA3.0-NOKL220P-HA; L237P: pcDNA3.0-NOKL237P-HA; L299P: pcDNA3.0-NOKL299P-HA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WT group.

图3 蛋白表达结果的定量分析

Fig.3 The quantitative analysis of protein expression results



M: marker; L41P: 41位点突变载体; L220P: 220位点突变载体; L237P: 237位点突变载体; L299P: 299位点突变载体。

M: marker; L41P: pcDNA3.0-NOKL41P-HA; L220P: pcDNA3.0-NOKL220P-HA; L237P: pcDNA3.0-NOKL237P-HA; L299P: pcDNA3.0-NOKL299P-HA.

图1 pcDNA3.0-NOK-HA的点突变载体酶切产物电泳结果

Fig.1 The pcDNA3.0-NOK-HA and its mutations enzyme electrophoresis results of PCR products

NOKL203P-HA、pcDNA3.0-NOKL220P-HA、pcDNA3.0-NOKL237P-HA 和 pcDNA3.0-NOKL299P-HA 质粒, 转染后 36 h 进行免疫荧光染色, 用激光共聚焦显微镜观察并拍照, 使用 Photoshop 和 Image J 进行图像分析处理, 并统计每组图片的 DP 与 AP 的比例, 统计数据用 GraphPad Prism 作图, 结果如图 4 和图 5 所示。使用 Image J 进行总荧光强度的测定, 数据用 GraphPad Prism 作图, 如图 6 所示。

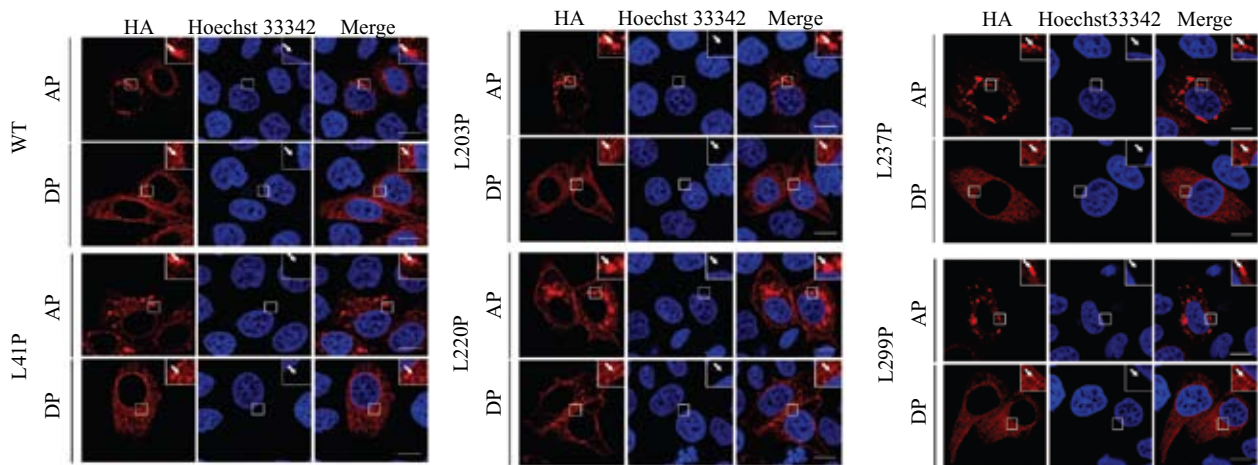
对 AP 与 DP 的分布, 本文定义如下: (1) 如果一个细胞中聚集点的直径大于或者等于 2 μm , 我们将这个细胞定义为 AP (聚集分布); (2) 如果一个细胞中的聚集点的直径大于 1 μm 但小于 2 μm , 但是可见明显的聚集分布, 且聚集的个数大于 3, 我们将这个细胞定义为 AP (聚集分布); (3) 如果一个细胞中的聚集点的直径小于 0.5 μm , 我们将这个细胞定义为 DP (点状分布)。

从 WT 的细胞定位发现, 其聚集分布 (AP) 与点状分布 (DP) 的比例大致相当, 在 50% 左右, 呈现出 NOK 蛋白的两种分布形式在细胞内的分布情况, 即点状分布与聚集分布的平衡, 其细胞的核膜定位不明显。对于 L41P 的 AP 与 DP 的比例与 WT 相比差异不明显, 而 AP 和 DP 的细胞核膜定位明显, 这是 L41P 与 WT 以及其他突变体相比最明显的特征, 特殊的核膜定位特征可能与 NOK 蛋白的跨膜运输的功能有关。而 L220P 的 AP 与 DP 的比例与 WT 相比差异不明显, 其 AP 和 DP 的细胞核膜定位以及细胞膜定位明

显, 这是 L220P 的典型特征, 并且 AP 比例较 DP 有所增加, 这都说明了 220 位点所处的双亮氨酸基序重要的生物学功能, 可能与细胞的膜泡运输和内存作用等功能相关, 并可能参与 NOK 蛋白的促进肿瘤形成的过程。L203P、L237P、L299P 的 AP 与 DP 的比例与 WT 相比存在明显的差异, AP 的比例明显减少, DP 的比例明显增多, 这说明这三个位点的突变对 NOK 蛋白在细胞的定位情况及 AP 与 DP 的比例产生了巨大的影响, 从而改变了 NOK 蛋白的内存作用, 可能增加了 NOK 蛋白的降解。

NOK 及其突变体所在细胞内的聚集分布的位置有所不同, 其中 WT、L203P、L220P、L2237P、L299P 的聚集分布更靠近细胞核, 而 L41P 的聚集分布远离细胞核, 即对 NOK 蛋白聚集方面, 对 41 位的点突变造成对 NOK 蛋白的聚集分布位置的改变。

总荧光强度的高低是蛋白表达量的一个标尺, 从细胞定位层面反映了 NOK 蛋白及其突变体的表达情况。根据 NOK 蛋白及其突变体的细胞定位以及总荧光强度分析, 其聚集分布的大小和数量有显著不同, 结合本文关于 AP 和 DP 的定义以及 AP 与 DP 的比例分布, 可以得出 220 位点突变的聚集分布的大小和荧光强度明显大于 WT 和其他突变体, 进一步证实了 220 位点的影响 NOK 蛋白表达方面的重要作用, 其很可能与肿瘤的形成有关。而 41 位突变由于其 AP 比例比 DP 高, 导致其总荧光强度比 WT 高, 结合其特殊的核膜定位分布, 可知 41 位点突变对 NOK 蛋

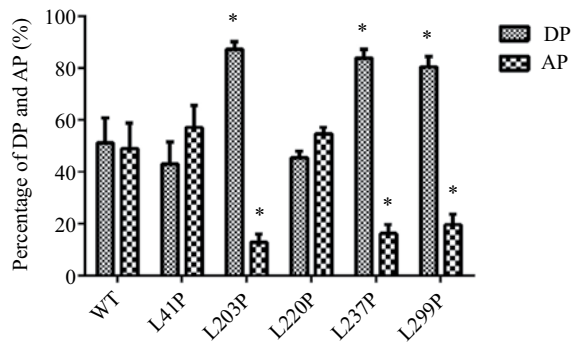


WT: 野生型 NOK 载体; L41P: 41 位点突变载体; L203P: 203 位点突变载体; L220P: 220 位点突变载体; L237P: 237 位点突变载体; L299P: 299 位点突变载体。标尺=10 μm 。

WT: pcDNA3.0-NOK-HA; L41P: pcDNA3.0-NOKL41P-HA; L220P: pcDNA3.0-NOKL220P-HA; L237P: pcDNA3.0-NOKL237P-HA; L299P: pcDNA3.0-NOKL299P-HA. Scale bars=10 μm .

图 4 不同双亮氨酸模体点突变对 NOK 蛋白在细胞内分布特征的影响

Fig.4 The distribution of the different di-leucine motif mutations on the NOK protein



WT: 野生型NOK载体; L41P: 41位点突变载体; L203P: 203位点突变载体; L220P: 220位点突变载体; L237P: 237位点突变载体; L299P: 299位点突变载体。* $P < 0.05$, 与WT组比较。

WT: pcDNA3.0-NOK-HA; L41P: pcDNA3.0-NOKL41P-HA; L220P: pcDNA3.0-NOKL220P-HA; L237P: pcDNA3.0-NOKL237P-HA; L299P: pcDNA3.0-NOKL299P-HA。* $P < 0.05$ vs WT group.

图5 DP、AP比例的统计分析

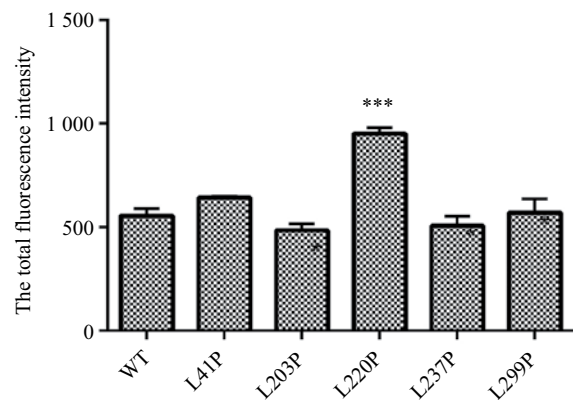
Fig.5 The statistical analysis of DP and AP proportion

自功能改变的特异性。L203P、L237P、L299P聚集分布的大小与WT相比没有明显差异, 但聚集分布的数量和比例显著减少, 由于其点状分布与WT相比更加均匀, 导致其总体荧光强度与WT相比并无明显差异, 这说明NOK蛋白的AP和DP的分布形式在细胞内受到了各突变位点的影响, AP与DP在细胞内维持着某种平衡, 这三个位点的突变并未打破这种平衡。

3 讨论

RTKs在生物功能的完成过程中具有重要的作用, 其功能的失调会导致生物体的一系列疾病^[18]。NOK基因作为新的RTKs亚家族, 它的生物活性与生物体的各项生命活动息息相关。NOK具有较强的促进肿瘤形成和转移的能力, 携带NOK基因的BaF3细胞能使裸鼠迅速成瘤、转移到多个器官并导致裸鼠短期死亡^[5], 所以对NOK蛋白不同的双亮氨酸基序位点的点突变可能在不同程度上影响到其促进肿瘤形成和转移的能力。

本研究成功地对NOK基因不同的双亮氨酸模体位点进行点突变, 研究结果指出不同的点突变导致NOK基因的蛋白质表达量存在差异, L220P蛋白质表达量比WT明显升高, 而L237P蛋白质表达量比WT降低, 这说明对NOK基因不同的双亮氨酸模体位点的点突变, 可能改变了NOK蛋白质的内吞作用以及蛋白质的稳定性, 并最终改变了蛋白质表达量。结合突变位置是双亮氨酸模体位点, 其生物学功能与细胞的内吞、膜泡运输以及细胞信号分拣等过程



WT: 野生型NOK载体; L41P: 41位点突变载体; L203P: 203位点突变载体; L220P: 220位点突变载体; L237P: 237位点突变载体; L299P: 299位点突变载体。*** $P < 0.001$, 与WT组比较。

WT: pcDNA3.0-NOK-HA; L41P: pcDNA3.0-NOKL41P-HA; L220P: pcDNA3.0-NOKL220P-HA; L237P: pcDNA3.0-NOKL237P-HA; L299P: pcDNA3.0-NOKL299P-HA。*** $P < 0.001$ vs WT group.

图6 总荧光强度分析

Fig.6 The statistical analysis of the total fluorescence intensity

有关, 推测不同的双亮氨酸模体位点的突变可能在不同程度上改变了NOK蛋白特有的与内吞以及膜泡运输路径相关的结构域或信号通路, 从而改变了其跨膜物质运输的功能并影响了其蛋白质的表达。结合已有研究, NOK的过量表达能够促进肿瘤的形成, 由NOK的不同位点的点突变在蛋白质表达水平上发生了改变, 推测NOK的双亮氨酸模体点突变很可能在改变蛋白质内吞作用以及稳定性方面, 通过改变蛋白质的表达量, 参与了NOK蛋白的促进肿瘤形成的相关机制, 以上数据可以为研究NOK相关的肿瘤形成机理提供新的思路。关于不同亮氨酸突变体对NOK蛋白稳定性影响的分子机制将是我们今后重点研究的问题, 我们将在后续的实验中进一步结合多种实验方法以确定其作用机制。

过量表达NOKL41P的细胞定位呈现明显的核膜定位特征, 而L220P则表现出了更为明显的质膜定位特征。细胞核膜定位一直受到人们的广泛关注, 而细胞核膜相关定位的改变与基因的功能改变是息息相关的^[19]。L41P呈现明显的核膜定位, 推测41位氨基酸的点突变可能影响了其跨核膜的物质运输, 结合NOK基因具有典型的跨膜区, 提示我们41位亮氨酸所处的双亮氨酸模体可能影响到NOK基因的跨核膜运输的相关结构域, 从而改变了其核膜定位情况。同理, L220P的细胞定位呈现明显的质膜定位,

提示我们220位亮氨酸所处的双亮氨酸基序可能与NOK跨质膜运输相关的结构域有关。NOK蛋白为跨膜蛋白,对其41位、220位双亮氨酸基序位点进行点突变后,促进了它们在核膜和质膜上的定位,改变了NOK蛋白原有的与核膜与质膜相关的定位情况,可能对细胞的跨膜物质运输和细胞膜上的多种受体相关的信号通路有一定的影响。

在RTKs家族中已经发现有些受体是以聚集体的方式行使功能的。比如EGFR,当与EGF结合后,导致EGFR的聚集,使受体以聚集体的形式参与到细胞内结构域之间的相互作用和激酶活性的调节过程中^[20]。由此推测,NOK蛋白的聚集形式AP可能与NOK蛋白的激酶活性有关,并参与NOK激酶的受体活化与磷酸化过程。我们的前期研究结果证明,NOK蛋白形成的AP这种分布形式在体内和体外都是存在的,并在子宫颈癌和乳腺癌的癌症组织中发现了NOK在癌症组织中的表达量比癌旁组织高,而在癌症组织中高表达的NOK其分布形式也趋向于AP形式^[12]。本研究的结果显示,L220P的AP聚集程度比WT增加,结合L220P对应的总荧光强度显著高于WT,推测220位亮氨酸可能对NOK蛋白的激酶活性和促进肿瘤形成相关的机理方面发挥着重要的作用。L203P、L237P、L299P的细胞定位中DP呈现了均匀的散点分布,所占比例相对较高,而其AP比例明显较少,推测对这三处双亮氨酸模体的点突变很可能会起到抑制肿瘤形成的作用,我们将在后续的实验中继续验证它们对NOK蛋白激酶活性的影响及其参与肿瘤形成相关的作用机制。

本研究在pcDNA3.0-NOK203L-HA的基础上构建了NOK基因的四个双亮氨酸模体点突变载体,并验证了其在蛋白质水平和细胞水平的表达情况。其中,不同突变体的蛋白质水平表达与WT相比存在明显差异,L220P的蛋白表达量明显高于WT,而L237P的蛋白表达量低于WT。而在细胞内分布特征上,不同突变体也表现出了与WT不同的细胞定位,L41P明显的核膜定位,L220P明显的质膜定位以及它的AP聚集量增多,L237P均匀的散点分布,这些表型说明NOK基因的双亮氨酸模体位点可能影响了细胞的内存作用和运输功能,并改变了NOK蛋白与肿瘤形成方面相关的作用机制。我们也将在今后的实验中进一步深入地研究这些突变体与不同的细胞器标志物共定位情况,来进一步探究它们影响细

胞内存作用及运输的机理。而NOK具有原癌基因的特性,也预示着可以在后续实验中进行不同突变体的裸鼠成瘤实验,从动物学水平检测不同突变位点对NOK基因的成瘤能力的影响,从而进一步探究它们影响NOK基因的原癌基因特性,希望能够从这个切入点指导肿瘤的治疗。

参考文献 (References)

- 1 Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 2000; 19(49): 5548-57.
- 2 Kondoh T, Kobayashi D, Tsuji N, Kuribayashi K, Watanabe N. Overexpression of serine threonine tyrosine kinase 1/novel oncogene with kinase domain mRNA in patients with acute leukemia. *Exp Hematol* 2009; 37(7): 824-30.
- 3 Sebastian S, Settleman J, Reshkin S, Azzariti A, Bellizzi A, Paradiso A. The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1766(1): 120-39.
- 4 Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002; 298(5600): 1912-34.
- 5 Liu L, Yu XZ, Li TS, Song LX, Chen PL, Suo TL, *et al.* A novel protein tyrosine kinase NOK that shares homology with platelet-derived growth factor/fibroblast growth factor receptors induces tumorigenesis and metastasis in nude mice. *Cancer Res* 2004; 64(10): 3491-9.
- 6 Jackson KA, Oprea G, Handy J, Kimbro KS. Aberrant STYK1 expression in ovarian cancer tissues and cell lines. *J Ovarian Res* 2009; 2(1): 15.
- 7 Amachika T, Kobayashi D, Moriai R, Tsuji N, Watanabe N. Diagnostic relevance of overexpressed mRNA of novel oncogene with kinase-domain (NOK) in lung cancers. *Lung Cancer* 2007; 56(3): 337-40.
- 8 Kimbro KS, Duschene K, Willard M, Moore JA, Freeman S. A novel gene STYK1/NOK is upregulated in estrogen receptor-alpha negative estrogen receptor-beta positive breast cancer cells following estrogen treatment. *Mol Biol Rep* 2008; 35(1): 23-7.
- 9 Chen Y, Li YH, Chen XP, Gong LM, Zhang SP, Chang ZJ, *et al.* Point mutation at single tyrosine residue of novel oncogene NOK abrogates tumorigenesis in nude mice. *Cancer Res* 2005; 65(23): 10838-46.
- 10 Li YH, Wang YY, Zhong S, Rong ZL, Ren YM, Li ZY, *et al.* Transmembrane helix of novel oncogene with kinase-domain (NOK) influences its oligomerization and limits the activation of RAS/MAPK signaling. *Mol Cells* 2009; 27(1): 39-45.
- 11 Li YH, Rong Y, Chang ZJ, Liu L. NOK activates STAT3 signaling by a JAK2-dependent mechanism. *Prog Biochem Biophys* 2008; 35(2): 143-50.
- 12 Ding X, Jiang QB, Li R, Chen S, Zhang S. NOK/STYK1 has a strong tendency towards forming aggregates and colocalises with epidermal growth factor receptor in endosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 421(3): 468-73.
- 13 Bonifacino JS, Traub LM. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 2003; 72: 395-447.

- 14 Marks MS, Woodruff L, Ohno H, Bonifacio JS. Protein targeting by tyrosine- and Di-leucine-based signals: Evidence for distinct saturable components. *J Cell Biol* 1996; 135(2): 341-54.
- 15 Hsu H, Baldwin CL, Telfer JC. The endocytosis and signaling of the $\gamma\delta$ T cell coreceptor WC1 are regulated by a dileucine motif. *J Immunol* 2015; 194(5): 2399-406.
- 16 Stross C, Kluge S, Weissenberger K, Winands E, Häussinger D, Kubitz R. A dileucine motif is involved in plasma membrane expression and endocytosis of rat sodium taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013; 305(10): G722-30.
- 17 John BA, Meister M, Banning A, Tikkanen R. Flotillins bind to the dileucine sorting motif of β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and influence its endosomal sorting. *FEBS J* 2014; 281(8): 2074-87.
- 18 Kohno M, Tanimura S, Ozaki KI. Targeting the extracellular signal-regulated kinase pathway in cancer therapy. *Biol Pharm Bull* 2011; 34(12): 1781-4.
- 19 Sui L, Yang Y. Distinct effects of nuclear membrane localization on gene transcription silencing in *Drosophila* S2 cells and germ cells. *J Genet Genomics* 2011; 38(2): 55-61.
- 20 Mohammadi M, Honegger A, Sorokin A, Ullrich A, Schlessinger J, Hurlwitz DR. Aggregation-induced activation of the epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase. *Biochemistry* 1993; 32(34): 8742-8.