文章编号:1000-5404(2006)02-0133-03

论著

Tec激酶区作用蛋白RAI16的筛选和结构功能分析

邓 婧[1],王 阁[1],杨 进[1],郑继军[1],王红中[1],胡 庆[1],王 东[1,2],李增鹏[2] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]肿瘤中心,[2]病理科,重庆 400042)

提 要:目的 筛选与Tec激酶结构域相互作用的蛋白分子,并获得其蛋白质结构及功能信息。**方法** 通过酵母双杂交技术筛选作用蛋白,利用相应的计算机软件及数据库,对筛库所得蛋白进行生物信息学分析。**结果** 筛选得到1种Tec激酶区作用蛋白RAI16,其cDNA序列由2 863个核苷酸组成,编码759 aa蛋白质,具有多个功能基序,其中包括3个酪氨酸磷酸化位点。**结论** 推测RAI16蛋白与细胞分化有关,很可能在肝癌细胞的诱导分化信号转导转录中与Tec协同发挥重要作用。

关键词: Tec蛋白;酵母双杂交;视黄酸诱导蛋白16;功能基序;酪氨酸磷酸化位点
中图法分类号: Q503;Q516;Q555.7 **文献标识码:** A

Analysis of RAI16 protein structure and function

DENG Jing[1], WANG Ge[1], YANG Jin[1], ZHENG Ji-jun[1], WANG Hong-zhong[1], HU Qing[1], WANG Dong[1,2], LI Zeng-peng[2] ([1]Cancer Center, [2]Department of Pathology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the partner of Tec kinase domain and obtain the protein structure and function. Methods The yeast two-hybrid system was used to explore the partner of Tec and the novel protein was analyzed bioinformatically. Results One of the positive clones, sequenced and analyzed in the BLAST, was confirmed to be the gene fragment of RAI16. RAI16 cDNA sequence consists of 2 863 nucleotides encoding a 759 aa protein, including some function motifs, especially three Tyr phosphorylation sites. Conclusion On the basis of the present results, we presume RAI16 may involve in transcriptional gene regulation and mediate the differentiation of hepatoma carcinoma cell by interacting with Tec protein.

Key words: Tec protein; yeast two-hybrid technology; homo sapiens retinoic acid induced 16; function motif; Tyr phosphorylation site

Tec(tryosine kinase express in heparocelluar carcinoma)是一种存在于胞质内重要的非受体型蛋白酪氨酸激酶,参与多种细胞因子的信号传递过程,是多种细胞因子、辅助分子及受体型PTK信号转导过程中1个关键的靶分子[1-4]。

细胞内信号转导的过程是通过细胞内一系列蛋白质和功能的变化来实现的,蛋白质的磷酸化和去磷酸化构成了不同胞外信号所启动的信号过程的共同通路,是细胞代谢、生长、发育、凋亡和癌变的调控中心,酪氨酸激酶磷酸化是细胞信号传导中蛋白质磷酸化调控的重要方式,直接影响蛋白-蛋白之间的相互作用、蛋白分子的亚细胞定位和激酶的活性发挥,也是了解胞内蛋白质功能的重要方面。本研究主要通过酵母双杂交技术在人胎肝cDNA文库中筛选得到一种Tec激酶区相互作用蛋白,一种与Tec激酶磷酸化密切相关的作用蛋白即视黄酸诱导蛋白16(RAI16),由于RAI16是1种新发现蛋白,目前研究对RAI16的结构和功能尚不确立,因此我们利用相应的计算机软件及一些有关的生物信息学站点,对RAI16进行生物信息学分析,从中获得其编码蛋白质结构方面的重要信息,从Tec相互作用的角度,进行结构分析其未知的新功能分析。

1 材料与方法

1.1 pGAL4bd-TecKD诱饵载体的构建

提取含有Tec激酶结构域的质粒,将所得Tec激酶结构域基因克隆入pGBT9载体,该载体含有编码DNA结合结构域(GAL4蛋白)的基因序列,可与插入片断进行融合表达。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370341),全国优秀博士专项基金资助项目(200261)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30370341) and the Academic Fundation for Authors of National Excellent Doctoral Dissertation of china(200261)

作者简介: 邓 婧(1981-),女,山东省聊城市人,硕士研究生,医师,主要从事肝细胞肝癌的分子机制方面的研究。电话:(023)68757759,E-mail: renguerj@163.com
通讯作者: 王 阁,电话:(023)68757759

收稿日期: 2005-07-21;**修回日期:** 2005-11-04

1.2 酵母双杂交系统

1.2.1 酵母转化 以含有报告基因(p80p-lacZ)的酵母菌EGY48作为转化宿主菌制备感受态细胞,用重组pGAL4bd-TecKD诱饵载体进行转化。转化法见CLONTECH操作指南。转化菌液涂布SD/-His/-Ura固体选择培养板,30 ℃倒置培养3~5 d。筛选文库之前首先用液相法和平板法检测诱饵载体的自激活作用及对酵母细胞的毒性作用。

1.2.2 文库筛选 用融合转录激活结构域(AD)的文库质粒转入含有诱饵载体的酵母感受态细胞,转化菌液30 ℃培养3~5 d,进行选择及扩增,将菌落刮下铺诱导培养板,诱导报告基因表达。挑取显蓝色的单个克隆重新划诱导培养板,选择阳性克隆。提取阳性克隆中的质粒,转化大肠杆菌感受态细胞,铺培养板选择文库质粒,用*Eco*R Ⅰ和*Xho* Ⅰ进行酶切鉴定。以含报告基因(p80p-lacZ)的酵母菌EGY48作为转化宿主菌制备感受态细胞,分别用pGAL4bd-TecKD质粒、pGBT9空载体质粒与阳性文库质粒进行共转化及诱导筛选,取所得阳性克隆经酶切鉴定后,将其连接重组于pMD18-T质粒。

1.3 RAI16cDNA测序及其核酸序列比较分析

用重组pMD18-T质粒转化DH5α大肠杆菌,提取重组质粒DNA,送去上海博亚生物技术公司测序。对已测出全长的cDNA阳性克隆序列,通过生物信息学网站(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/),在GenBank数据库中查询比较所测序列的同源性,初步确认cDNA序列的性质及其相关信息。

1.4 RAI16蛋白质序列的同源性分析及比较

分析RAI16蛋白质的开放阅读框架(ORF)并推译其cDNA编码的氨基酸序列。通过BLAST方式,查询比较RAI16蛋白质序列的同源性。

1.5 蛋白质结构及功能的初步预测

基因的功能主要是通过其所翻译的蛋白质来体现,在进化过程中,蛋白质的顺序和结构在种间和种内的变化比相应核酸的变化要小。因此通过分析RAI16基因所编码蛋白质的结构可以初步预测其相应功能。

2 结果

2.1 RAI16cDNA序列及其分析

测序发现插入片段全长2 863 bp,它含有48 bp的5′端非翻译区、2 232 bp组成的开放阅读框架及583 bp组成的3′非翻译区。序列比对发现,插入基因片段与人视黄酸诱导蛋白16(RAI16)cDNA的同源性最高,为99%,从而证实筛选得到的这一基因为RAI16(GenBank收录号为BC052237)。

2.2 RAI16蛋白质序列的同源性分析及比较

利用http://www.expasy.ch/网站,把RAI16开放读码框(ORF)中的DNA顺序翻译成相应的氨基酸顺序,再利用http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST的蛋白质数据库进行比较,结果未见有意义的同源蛋白。

2.3 蛋白质功能基序分析

通过生物信息学网站(http://au.expasy.org/prosite/)分析提示[5-7],RAI16蛋白含有6个蛋白质激酶C(PKC)磷酸化位点(164~166:TEK、271~273:SKK、336~338:SWR、435~437:TDR、468~470:TLR、590~592:SSR),9个酪蛋白激酶Ⅱ(CK2)磷酸化位点(56~59:STDE、162~165:SVTE、164~167:TEKE、214~217:SHGD、507~510:SYED、523~526:SFLD、541~544:TSYD、573~576:TGYD、603~606:TPLD),3个酪氨酸激酶(Tyr)磷酸化位点(73~81:KQMLDILVY、490~497:RNLEGRPY、629~635:RILDQPY)见图1。6个N-豆蔻酰化位点(156~161:GGTASG、157~162:GTASGS、255~260:GTTESN、267~272:GLCQSK、482~487:GIIHSL、708~713:GQAPGE),2个酰胺化位点(191~194:EGKK、196~199:VGRK),3个酪氨酸硫酸化位点(501~515:gspepesYedtldle、512~526:ldleedpYftdsfld、568~582:afleetgYdtyvhda)以及1个ATP-GTP结合位点(540~547:AtsydGKT),见图2。



①:Tyr位点1;②:Tyr位点2;③:Tyr位点3

图1 RAI16蛋白ORF和3个Tyr磷酸化位点



图2 RAI16蛋白质各功能基序分布

3 讨论

本课题组通过酵母双杂交技术在胎肝cDNA文库中筛选Tec激酶区相互作用蛋白,得到一阳性克隆,测序并经BLAST比对分析后,确定为人源性RAI16基因,已被GenBank收录,编号为BC052237,组织来源为脑Ⅳ型胶质细胞瘤。

RAI16cDNA全长2 863 bp,含有48 bp的5′端非

翻译区、2 232 bp 组成的开放阅读框架及 583 bp 组成的 3′非翻译区,在 3′非编码区含有一个腺苷酸化位点(AATAAA)和长度为 18 个腺苷酸的 poly(A)。编码框全长 759 aa,编码蛋白质分子量为 83.8×10^3。PSORT 结果提示,该蛋白有很长的酪氨酸尾部,并有一段 9 aa 长的过氧化物酶前导信号 2(SKL2)(KLLLVRKQL at 698)。蛋白质同源性分析未见有意义的同源蛋白。

RAI 命名最初来源于有研究者采用全反式视黄酸(ATRA)诱导人肺腺癌 GLC-82 细胞分化,经 cDNA 文库消减杂交构建的 cDNA 消减文库,得到一在 ATRA 诱导 GLC-82 细胞分化过程中激活表达的基因(retinoic acid induced RAI)。RAI 在多种胚胎组织(胎儿皮肤、肝、心脏、食管、胃、脑、胰腺和肺)中均有表达,提示它是一个进化上相对保守的基因,在细胞基本生命活动中发挥重要作用。随后在 RA 作用研究中发现 RAI 系列基因,表明这些基因可能是转录上调的主要靶向点[8-12]。由此推测 RAI 系列蛋白可能是一种"新型"的胞内参与信号转导转录调控的蛋白质家族。

RAI16 蛋白含有 6 个可能的 PKC 磷酸化位点,9 个可能的 CK2 位点,3 个 Tyr 磷酸化位点,5 个 N-豆蔻酰化位点,2 个酰胺化位点,3 个酪氨酸硫酸化位点以及 1 个 ATP-GTP 结合位点。研究表明,CK2 是真核细胞保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,是细胞生存所必需;酰胺化参与生物活性肽重要的翻译后加工过程;PKC 是一类 Ca^{2+}、磷脂依赖性的蛋白激酶,在跨膜信号传递过程中起着重要作用,PKC 通过催化多种蛋白质上 Ser/Thr 磷酸化,调节多种细胞的代谢、生长、增殖和分化;酪氨酸磷酸化位点在细胞生长,分化和转化的调节中起重要作用;N-豆蔻酰化位点是蛋白质与 C14 饱和脂肪酸结合的位点,真核蛋白的这类修饰使其具有潜在的锚定于膜上的功能;酪氨酸硫酸化是蛋白质重要的翻译后修饰过程,能够加强和稳定切应力诱导的构象变化,发生环境往往包含酸性较高的残基。而 RAI16 蛋白中这些磷酸化位点的存在提示 RAI16 的生物学活性有可能在细胞信号传导通路中接受多种信号的调控。

我们研究发现 RAI16 与 Tec 蛋白之间存在相互作用,而 RAI16 突出与已发现的 RAI 不同的是有 3 个 Tyr 磷酸化结合位点,因此推论 RAI16 中 3 个 Tyr 磷酸化结合位点很可能存在 Tec 结合位点,而 Tec 与肝细胞分化有关,在肝癌细胞中具有高表达和特异性,是肝干细胞和肝细胞增殖、分化、凋亡信号转导路径中关键的蛋白激酶连接分子,结合我们对 RAI16 蛋白的功能预测,可以认为 RAI16 蛋白与细胞分化有关,很可能在肝癌细胞的诱导分化信号转导转录中发挥重要作用,同时,磷酸化结合位点的研究应该是今后 RAI16 蛋白功能研究的突破点。

综上所述,我们通过酵母双杂交技术成功地筛选克隆出 Tec 激酶区相互作用蛋白 RAI16,并对其核苷酸序列及其编码蛋白的结构和功能基序等进行了分析,在结构分析的基础上,我们推论 RAI16 可能在肿瘤细胞诱导分化过程中,作为 RA 诱导蛋白被信号蛋白分子募集至细胞质内,通过磷酸化、去磷酸化、豆蔻酰化、酰胺化等修饰,通过不同的活化形式和剪切方式以及细胞质与细胞核间的移位,完成其在细胞信号转导中的重要作用,而 Tec 恰恰是 RAI16 蛋白分化信号调控中一个关键的酪氨酸激酶。对 RAI16 结构和功能的深入研究,将有助于明确 RAI16 与 Tec 蛋白在细胞分化相关信号转导途径中的具体作用机制,同时对 Tec 的研究也是一个延伸。

参考文献:

[1] QIN Y, KUNG H J. Signaling network of the Btk family kinases[J]. Oncogene, 2000, 19(49): 5651-5661.

[2] SCHMIDT U, BOUCHERON N, UNGER B, *et al*. The role of Tec family kinases in myeloid cells[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2004, 134(1): 65-78.

[3] MILLER A T, BERG L J. New insights into the regulation and functions of Tec family tyrosine kinases in the immune system[J]. Curr Opin Immunol, 2002, 14(3): 331-340.

[4] ALTMAN A, KAMINSKI S, BUSUTTIL V, *et al*. Positive feedback regulation of PLCgamma1/Ca(2+) signaling by PKCtheta in restimulated T cells via a Tec kinase-dependent pathway[J]. Eur J Immunol, 2004, 34(7): 2001-2011.

[5] NEMERE I, SAFFORD S E, ROHE B, *et al*. Identification and characterization of 1, 25D3-membrane-associated rapid response, steroid (1, 25D3-MARRS) binding protein[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004, 89-90(1-5): 281-285.

[6] MONDAL S, JAISHANKAR S P, KAMAKUMOR S. Role of context in the relationship between form and function: structural plasticity of some PROSITE patterns[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 305(4): 1078-1084.

[7] GOLDSTEIN DJ, FONDRAT C, MURI F, *et al*. Short inverse complementary amino acid sequences generate protein complexity[J]. C R Biol, 2003, 326(3): 339-348.

[8] SERANSKI P, HOTF C, RADELOF U, *et al*. RAI1 is a novel polyglutamine encoding gene that is deleted in Smith-Magenis syndrome patients[J]. Gene, 2001, 270(1-2): 69-76.

[9] TOULOUSE A, ROCHEFORT D, ROUSSEL J, *et al*. Molecular cloning and characterization of human RAI1, a gene associated with schizophrenia[J]. Genomics, 2003, 82(2): 162-171.

[10] WALPOLE S M, HIRIYANA K T, NICOLAOU A, *et al*. Identification and characterization of the human homologue (RAI2) of a mouse retinoic acid-Iinduced gene in Xp22[J]. Genomics, 1999, 55(3): 275-283.

[11] HUANG K M, GEUNES-BOYER S, WU S, *et al*. Organization and annotation of the Xcat critical region: elimination of seven positional candidate genes. Genomics, 2004, 83(5): 893-901.

[12] TAO Q, CHENG Y, CLIFFORD J, *et al*. Characterization of the murine orphan G-protein-coupled receptor gene Rai3 and its regulation by retinoic acid[J]. Genomics, 2004, 83(2): 270-280.

(编辑　薛国文)