DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.14.017
第25卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 14
1262 2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)14-1262-04

丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 hFIST/HIPK2 的表达纯化磷酸化

李 欣,刘 宏,赵育新,何俊彦,张新华,杜光祖 (广州军区武汉总医院肿瘤血液科,武汉 430070)

提 要:目的 观察一个新近克隆的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 hFIST/HIPK2(Human Fas interacting signal transducer/homeo-domain interacting protein kinase)的表达、纯化、磷酸化。方法 用瞬时转染技术、Western blotting 检测 hFIST/HIPK2 野生型及其变异型蛋白(点突变型 hFIST/HIPK2 K221A,C-端缺失型 hFIST/HIPK2 △C、N-端缺失型 hFIST/HIPK2 △N)在 293T 细胞中的表达、磷酸化,及从 *E. coli* 中纯化 GST-hFIST/HIPK2 △C 融合蛋白。结果 hFIST/HIPK2 全长序列 cDNA 长 4 kb,编码分子质量为 130× 10^3 的 hFIST/HIPK2 蛋白;hFIST/HIPK2 K221A 的分子质量略小于 hFIST/HIPK2 野生型,hFIST/HIPK2 △C、hFIST/HIPK2 △N 的分子质量分别为 59× 10^3、69× 10^3。hFIST/HIPK2 野生型及其变异型蛋白的丝氨酸残基可自我磷酸化,其苏氨酸、酪氨酸残基不被磷酸化;hFIST/HIPK2 蛋白可自我降解,尤以 hFIST/HIPK2 K221A 蛋白最为明显;从 *E. coli* 中纯化了一个分子质量为 84× 10^3 的 GST-hFIST/HIPK2 △C 融合蛋白。hFIST/HIPK2 与小鼠 HIPK2、仓鼠 PKM 具有高度的同源性,分别为 96.1%、96.5%。结论 hFIST/HIPK2 为一新的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是 DYRK 激酶分支家族中的一员,也是新近发现的核蛋白激酶 HIPKs(Homeodomain interacting protein kinases)家族中的一员,在发育、凋亡、内环境稳定中发挥重要作用。

关键词:hFIST/HIPK2;丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶;信号转导
中图法分类号:R345.5+7;R394.3 文献标识码:A

Expression, purification and phosphorylation of serine/threonine protein kinase hFIST/HIPK2

LI Xin, LIU Hong, ZHAO Yu-xin, HE Jun-yan, ZHANG Xin-hua, DU Guang-zu (Department of Oncology and Hematology, Wuhan General Hospital, Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China)

Abstract: Objective To investigate the expression, purification and phosphorylation of a newly-cloned full-length cDNA of hFIST/HIPK2 (human Fas-interacting signal transducer/homeodomain-interacting protein kinase). Methods Expression and phosphorylation of hFIST/HIPK2 wild type and its mutant type proteins (point mutation type hFIST/HIPK2 K221A, C-terminal deletion type hFIST/HIPK2 △C and N-terminal deletion type hFIST/HIPK2 △N) in human kidney embryonic cell line 293T were analyzed using transient transfection and Western Blotting. GST-hFIST/HIPK2 △C fusion protein was purified from *E. coli*. Results The full length cDNA of hFIST/HIPK2 of about 4 kb contained a long open reading frame encoding a human FIST/HIPK2 protein with molecular mass of about 130 kDa, a polypeptide of 1191 amino-acid residues. Molecular mass of hFIST/HIPK2 K221A was less slightly than that of hFIST/HIPK2 WT. Molecular masses of hFIST/HIPK2 △C and hFIST/HIPK2 △N were 59× 10^3, 69× 10^3, respectively. Serine, neither threonine nor tyrosine, residues of hFIST/HIPK2 proteins may be autophosphorylated. Self-degradation occurred in hFIST/HIPK2 proteins, especially in hFIST/HIPK2 K221A. hFIST/HIPK2 showed very high sequence identities (96.1%, 96.5%) to two newly-identified protein kinases: mouse HIPK2 and hamster PKM (protein kinase interacting with Mx proteins), respectively. Conclusion hFIST/HIPK2 is a novel serine/threonine protein kinase, belonging to both the DYRK kinase subfamily and the homeodomain-interacting protein kinase family, which plays an important role in the normal development, tissue homeostasis and apoptosis.

Key words: hFIST/HIPK2; serine/threonine protein kinase; signal transduction

Fas(CD95/Apo-1)是一种跨膜受体蛋白质,属于肿瘤坏死因子受体家族(TNFR),在人 T、B 淋巴细胞、自然杀伤细胞(NK)、吞噬细胞,以及在结肠癌、肝细胞癌、肺癌、黑色素瘤、星形细胞瘤细胞的细胞膜上均可检测到 Fas 及 Fas 配基(FasL)的表达[1],Fas/FasL 信号转导途径是调控这些细胞凋亡的最重要途径之一。为深入探讨 Fas/FasL 信号转导途径调控机制,我们观察了一个新近克隆的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 hFIST/

作者简介:李 欣(1963-),男,河南省内黄县人,博士,副主任医师,主要从事肿瘤、白血病化疗的基础研究和临床应用方面的研究发表论文 20 余篇。电话:(027)87879797-78461 或 78467

收稿日期:2002-12-25;修回日期:2003-04-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

HIPK2 (Human Fas interacting signal transducer/homeodomain interacting protein kinase)的表达、纯化、磷酸化。

1　材料与方法

1.1　细胞系和细胞培养

人肾胚胎细胞系 293T 细胞培养于 DMEM 完全培养基中, 2～3 d 传代一次。

1.2　细胞裂解液

20 mmol/L HEPEs (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100, 10% 甘油, 20 ml/L Protease inhibitor cocktail (Sigma)。

1.3　质粒

全长序列 FLAG-hFIST/HIPK2 cDNA (登录号: AF 208291)、全长序列 FLAG-hFIST/HIPK2 cDNA 的 C-端缺失型 FLAG-hFIST/HIPK2 △C、N-端缺失型 FLAG-hFIST/HIPK2 △N、点突变型 FLAG-hFIST/HIPK2 K221A(即 Alanine → Lysine 221) cDNAs 由 Dr. Hug Hubert (Children's hospital, Ulm University, Germany) 提供, 以上所有 cDNA 克隆均经 ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit 及 373A 自动测序仪(PE Applied Biosystems)测序证实。

1.4　抗 hFIST/HIPK2 多肽多克隆抗体的制备

将 hFIST/HIPK2 多肽 H2N-SSPQRSKRVKENTPPRC-CONH2 (氨基酸位点为－819～－835)免疫家兔, 制备多克隆抗体, 制备方法见文献[2,3]。

1.5　抗体及试剂

用于 Western Blotting (WB、IB) 的抗体: 鼠抗人 FLAG-M2 单抗(Stratagene)、鼠抗 GST 单克隆抗体 (GST McAb, Santa Cruz)、鼠抗磷酸化丝氨酸 McAb、抗磷酸化苏氨酸 McAb (Calbiochem Novabiochem Co.) 及抗磷酸化酪氨酸 McAb (RBI, Sigma-Aldrich)、兔抗 hFIST/HIPK2-SS 多克隆抗体。用于检测特异性蛋白带的化学发光剂 ECL 试剂盒(Amersham-Pharmacia Biotech)。

1.6　GST-hFIST/HIPK2 △C 融合蛋白的表达、纯化、剪切

hFIST/HIPK2 △C cDNA 被克隆入载体 pET 41a(Novagen)的 *Eco RI*、*Xhol* 位点, 接种于含有卡那霉素的培养基中, 行小量质粒制备、DNA 酶切鉴定阳性克隆, 继之转化大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 株 (Invitrogen), 接种于含有卡那霉素/氯霉素的培养基中, 将生长出的克隆接种于有卡那霉素/氯霉素的小量培养基(4 ml)中, 以 1 mmol/L IPTG, 30 ℃下培养 2～3 h 诱导目的融合蛋白表达, 用 BugBuster Protein Extract Reagent (Novagen) 从细菌提取物的可溶性部分中制备目的融合蛋白, 行 SDS-PAGE 电泳及 Western blotting 分析表达目的融合蛋白的阳性克隆; 再将阳性克隆接种于有卡那霉素/氯霉素的大量培养基(1 000 ml)中, 以 1 mmol/L IPTG, 30 ℃下培养 2～3 h 诱导目的融合蛋白表达, 用 Protein Refolding Kit (Novagen) 从细菌包涵体中制备目的融合蛋白, 经过纯化、溶解、再折叠、透析, 应用 GST-Bind Buffer Kit 中的 1× GST Elute Buffer, 将 GST-hFIST/HIPK2 △C 融合蛋白从层析柱洗脱下来, 用凝血酶切割融合蛋白(0.1 g/L)(Thrombin Cleavage Kit, Novagen), 行 SDS-PAGE 电泳及 Western blotting 分析。

1.7　瞬时转染和 Western blotting 检测

用磷酸钙沉淀法将全长序列 FLAG-hFIST/HIPK2 cDNAs 转染入 293T 细胞中, 培养 16～20 h 后收集细胞、加入 0.5 ml 细胞裂解液, 行 SDS-PAGE 电泳, 再行 Western blotting。一抗为用于 Western blotting (WB、IB) 的抗体, 二抗为偶联 HRP 的鼠抗 IgG McAb、兔抗 IgG McAb(Santa Cruz), ECL 试剂盒检测特异蛋白带。

2　结果

2.1　hFIST/HIPK2 WT 及其变异型蛋白的表达

用鼠抗人 FLAG-M2 单抗可检测到 hFIST/HIPK2 WT、K221A、△N 及 △C 蛋白的表达, 如图 1A, hFIST/HIPK2 全长序列 cDNA 长 4 kb, 编码分子质量为 130×10^3 的 hFIST/HIPK2 蛋白; hFIST/HIPK2 K221A 的分子质量略小于 hFIST/HIPK2 野生型, hFIST/HIPK2△C、hFIST/HIPK2△N 的分子质量分别为 59×10^3、69×10^3。用兔抗 hFIST/HIPK2-SS 多克隆抗体可检测到 hFIST/HIPK2 WT、K221A 及△N 蛋白的表达, 未检测到 hFIST/HIPK2 △C 蛋白; 我们同时发现 hFIST/HIPK2 WT、K221A、△N 蛋白有不同程度的降解, 尤以 hFIST/HIPK2 K221A 蛋白最为明显, 见如图 1B。

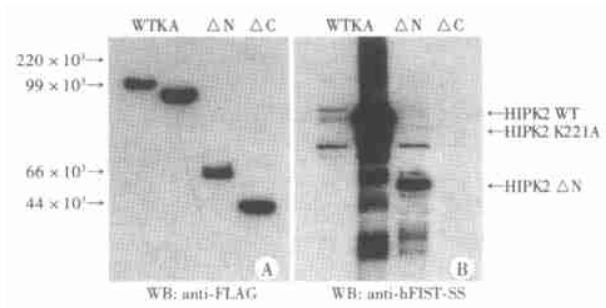
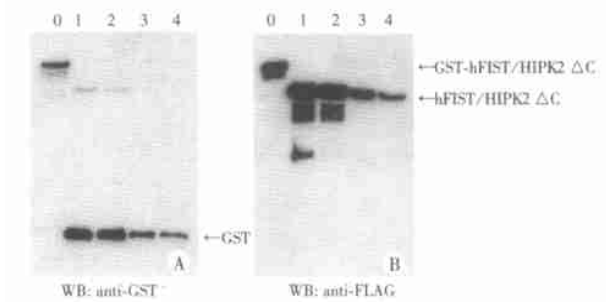


图 1　**hFIST/HIPK2** 野生型及其变异型蛋白在 **293T** 细胞中的表达

Fig 1　Expressions of full length hFIST/HIPK2 wild type and mutant types in 293T cells

2.2　GST-hFIST/HIPK2 △C 融合蛋白的表达及切割

GST-hFIST/HIPK2 △C 融合蛋白经凝血酶切割后, 用鼠抗人 GST McAb 可检测到未经凝血酶切割、分子质量约为 84×10^3 的 GST-hFIST/HIPK2 △C 融合蛋白, 分子质量约为 24.52×10^3 的 GST-tag 蛋白, 见图 2A。用鼠抗 FLAG-M2 McAb 可检测到 GST-hFIST/HIPK2 △C 融合蛋白及分子质量为 59×10^3 的 hFIST/HIPK2 △C 蛋白; 我们同时发现 hFIST/HIPK2 △C 蛋白也有降解, 见图 2B。



0.4: 1 μl; 1: 10 μl of purified GST-fusion protein (0.1 mg/ml); 3: 2.5 μl

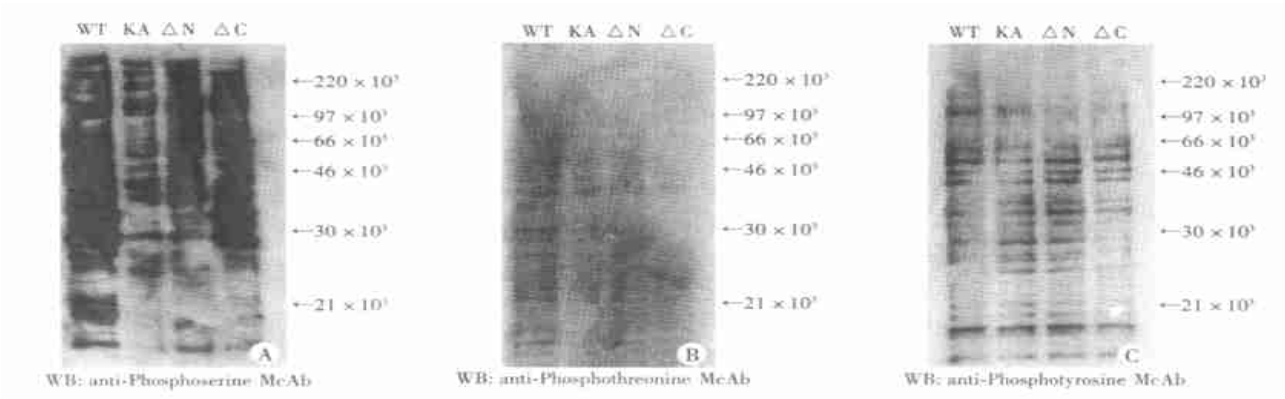
图 2　**GST-hFIST/HIPK2 △C** 的表达及切割

Fig 2　Expressions and cleavage of purified GST-hFIST/HIPK2 △C fusion protein

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.3 hFIST/HIPK2 WT 及其变异型蛋白丝氨酸残基的自我磷酸化

如图3所示，hFIST/HIPK2 WT 及其变异型蛋白的苏氨酸、酪氨酸残基未被磷酸化，其丝氨酸残基被广泛磷酸化，但 hFIST/HIPK2 K221A 蛋白的丝氨酸残基被磷酸化的程度远远不及其它3个蛋白。



Autophosphorylation of hFIST/HIPK2 WT, KA, △N, and △C proteins were detected by Western blotting with anti-phosphoserine McAb (1∶1 000) (A), anti-phosphothreonine McAb (1∶1 000) (B) and anti-phosphotyrosine McAb (1∶1 000) (C)

图3 hFIST/HIPK2 野生型及其变异型蛋白丝氨酸残基的自我磷酸化

Fig 3 Autophosphorylation of hFIST/HIPK2 proteins

3 讨论

hFIST/HIPK2是一个有1 191个氨基酸残基、换算分子质量为 130×10^3 的蛋白，在其N-端有一个激酶域、潜在的 PEST 序列位于－865～－894、－915～－934、公认的 Fas 结合位点位于－747～－892，hFIST/HIPK2 △C、△N cDNAs 分别编码一个有520、640个氨基酸残基的多肽，其换算分子质量分别为 59×10^3、69×10^3[3]。

hFIST/HIPK2的N-端激酶域序列与已知的丝氨酸/苏氨酸激酶有高度相似性，为一新的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族与凋亡密切相关[4]；hFIST/HIPK2 还是 DYRK 激酶分支家族中的一员[5]。hFIST/HIPK2的C-端序列为预期的 Fas 结合域，但与已知的凋亡相关域，如死亡域（Death domain，DD）、死亡效应域（Death effector domain，DED）、或 Caspase 招募域（Caspase-recruiting domain，CARD）无相似性[6]。hFIST/HIPK2 预期的功能是激活丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶介导的激酶信号转导途径及参与 Fas/FasL 介导的凋亡信号转导途径。

PEST 域是位于细胞内、半衰期为不到2 h 的富含脯氨酸（P）、谷氨酸（E）、丝氨酸（S）及苏氨酸（T）的区域，与蛋白的快速降解有关[7]。定位于细胞核内的蛋白质都具有“核内定位顺序（Nuclear localization sequence，NLS）”，NLS 含有一小段碱性氨基酸，或者有两个碱性结构域中间间隔以大约10个氨基酸的间隔区，竞争相同的入核“通道”。

Homeobox 基因是一个调节基因家族[8]，编码充当转录因子的特异性核蛋白，即 homedproteins. Homeobox 基因含有一个共同的长183 bp 的核苷酸序列，编码一个有61个氨基酸残基的 homeodomain，负责识别序列特异性 DNA 基元序列、并与之结合，这种特异性使得 homeoproteins 激活或抑制下游靶基因的级联反应。泛素系统是一个主要的翻译后蛋白修饰系统，是许多真核细胞内“短寿命”蛋白选择性降解所必需的，调节许多重要的细胞功能，如细胞周期、细胞内吞作用、信号转导及转录[9,10]。HIPKs（Homeodomain interacting protein kinases）是新近发现的核蛋白激酶家族[11～13]，广泛存在于各种类型生物中，充当着 homeodomain 的转录辅助阻抑子，定位于核斑点（Nuclear speckles）上，这种定位作用与 HIPKs 被泛素样蛋白 SUMO-1（或 Sentrin）共价性修饰作用有关。仓鼠 PKM（Hamster protein kinases interacting with Mx1 protein）具有丝苏氨/苏氨酸蛋白激酶活性，使丝氨酸、苏氨酸及酪氨酸残基磷酸化，此其抗数种 RNA 病毒的作用机制。hFIST/HIPK2 与小鼠 HIPK2、仓鼠 PKM 具有高度的同源性，分别为96.1%、96.5%（mHIPK2、hPKM 的同源性为97.4%），这种同源性使得 hFIST/HIPK2 具有许多目前已经证实及尚有待证实的类似于 mHIPK2、haPKM 的功能。

如图1所示，兔抗 hFIST/HIPK2-SS 多克隆抗体可检测出 hFIST/HIPK2 WT、K221A、△N 蛋白的多个蛋白带，即降解带；抗 FLAG-M2 McAb 只能检测出完整的、全长序列 hFIST/HIPK2 蛋白，而 FLAG-tag 位于其N-端，提示蛋白降解发生于N-端。这种降解作用在大肠杆菌来源

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的 hFIST/HIPK2 △C 蛋白也可见到，见图 2B 所示。

hFIST/HIPK2 WT 及其变异型蛋白的苏氨酸、酪氨酸残基未被磷酸化，其丝氨酸残基被广泛磷酸化；hFIST/HIPK2 蛋白第 221 位上的 Lysine（K）被 Alanine（A）取代即为 hFIST K221A，但该蛋白丝氨酸残基的自我磷酸化程度远远不及其它 3 个蛋白，这类似于 haPKM K221W：haPKM 的 ATP 结合域中的第 221 位赖氨酸残基（lysine，K）被色氨酸残基（Tryptophan，W）取代后（即 K221W），PKM 的蛋白激酶活性即丧失。抗磷酸化丝氨酸抗体只能识别其后为 Lysine（赖氨酸），Proline（脯氨酸）的 Serine（丝氨酸）残基，即识别-ser-lys-，或-ser-pro-氨基酸残基序列。hFIST/HIPK2 的新功能、新特性正在进一步深入探讨中。

参考文献：

[1] O' Connell J, Bennett M W, O' Sullivan G C, *et al*. The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege[J]. Immunol Today, 1999, 20(1): 46-52.
[2] Li X, Wang Y, Debatin KM, *et al*. The serine/threonine kinase HIPK2 interacts with TRADD, but not with CD95 or TNF-R1 in 293T cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 277(2): 513-517.
[3] Hofmann T G, Moller A, Sirma H, *et al*. Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2[J]. Nat Cell Biol, 2002, 4(1): 1-10.
[4] Cross T G, Scheel-Tollner D, Henriquez N V, *et al*. Serine/threonine protein kinases and apoptosis[J]. Exp Cell Res, 2000, 256(1): 34-41.
[5] Hofmann T G, Mincheva A, Lichter P, *et al*. Human homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) is a member of the DYRK family of protein kinases and maps to chromosome 7q32-q34[J]. Biochimie, 2000, 82(12): 1123-1127.
[6] Ashkenazi A, Dixit V M. Death receptors: signaling and modulation[J]. Science, 1998, 281(5381): 1305-1308.
[7] Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. Amino acid sequence common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis[J]. Science, 1986, 234(4774): 364-368.
[8] Cillo C, Faiella A, Cantile M, *et al*. Homeobox genes and cancer[J]. Exp Cell Res, 1999, 248(1): 1-9.
[9] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system[J]. Annu Rev Biochem, 1998, 67: 425-479.
[10] Kornitzer D, Ciechanover A. Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation[J]. J Cell Physiol, 2000, 182(1): 1-11.
[11] Kim Y H, Choi C Y, Lee S J, *et al*. Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors[J]. J Biol Chem, 1998, 273(40): 25875-25879.
[12] Kim Y H, Choi C Y, Kim Y. Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(22), 12350-12355.
[13] Trost M, Kochs G, Haller O. Characterization of a novel serine/threonine kinase associated with nuclear bodies[J]. J Biol Chem, 2000, 275(10): 7373-7377.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2003)14-1265-01

个案与短篇

多发原始神经外胚瘤 1 例

A case report of primitive neuroectodermal tumor

吴盛荣[1]，黄晓龙[1]，高伯元[2]（[1] 解放军第 324 医院神经外科，重庆 400020；[2] 第三军医大学附属西南医院神经外科，重庆 400038）

原始神经外胚瘤（Primitive neuroectodermal tumors，PNETs）又称蓝色瘤（Blue tumors），是一组未分化的小细胞恶性肿瘤，1993 年版修订的 WHO 中枢神经系统肿瘤的组织学分类中将原始神经外胚叶肿瘤单独提出来，列入神经上皮源性胚胎性肿瘤内[1]。我院收治 1 例罕见老年性多发性的原始神经外胚瘤病人，现报告如下。

患者，男，70 岁，因头昏及行走不稳 2 个月，于 1999 年 5 月 23 日收住院，既往无头痛和家族性肿瘤病史，查体：酒醉步态，易右偏，双眼底正常，眼震（－），左下肢肌力 Ⅳ级，肌张力低，右侧指鼻试验（＋），跟膝胫试验不准，昂伯征（＋），其他神经系统查体正常。增强头颅 CT 扫描：右顶叶及右小脑半球类圆形低密度影伴周围脑水肿，考虑脑转移性肿瘤；头颅 MRI 扫描：右顶叶及右小脑半球各见长 T1 长 T2 不均匀信号灶，有较厚的等 T1，稍短 T2 壁，周围见不规则水肿带，增强扫描均有强化，考虑为：①脑转移瘤；②脑脓肿？胸片（－），术前诊断：颅内多发转移癌，脑脓肿待除外。于 1999 年 6 月 17 日行右顶叶立体定向病灶活检术，病检报告为右顶叶原始神经外胚瘤，于 1999 年 6 月 28 日行右小脑半球肿瘤切除术，术后病理诊断为：右小脑半球原始神经外胚瘤。术后予以口服化疗药甲环亚硝脲（MeCCNU）200 mg 口服抗肿瘤，每 8 周 1 次，共 4 次，辅以增强营养，升白细胞及对症支持等综合治疗，随访 1 年 8 个月，病人行走正常，生活质量良好。

讨论

原始神经外胚瘤的诊断主要靠病理，临床表现与其侵犯部

（下转 1268 页）

作者简介：吴盛荣（1963－），男，重庆市江津市人，主治医师，主要从事神经外科颅脑外伤方面的研究。电话：（023）68762065

收稿日期：2002-06-11；修回日期：2003-01-22

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net