

癌蛋白 D52家族*

李素萍^{1,2} 周建光² 王鸣刚¹ 陈亮^{1**}

(1 厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 厦门 361005)

(2 军事医学科学院生物工程研究所 北京 100850)

摘要 癌蛋白 D52家族近年来引起人们的研究兴趣。D52最早是从人乳腺癌中发现的。该家族成员分子中都含有一个叫做 Coil-coil基序的高度保守结构域,这个结构域在从低等生物到哺乳动物或者同种生物的不同成员间是高度保守的。已有研究表明,该家族成员可以通过选择性剪接的方式产生功能不同的拼接体。D52家族基因在多种癌症中广泛扩增,蛋白表达水平升高。目前认为,他们的基因功能可能与包括癌症在内的人类疾病相关,然而,关于该家族成员发挥作用的分子机制还有待深入研究。

关键词 癌蛋白 D52家族 Coil-coil基序 选择性剪接

中图分类号 Q503

基因家族广泛存在于高等生物中,是真核生物基因组的一个重要特点,多基因家族的存在可能在进化中有着重要的意义。对人类基因组的大规模测序发现人类基因组所含有的基因数目远少于原来的预测,也远少于细胞中蛋白质的数目,这表明基因表达的复杂性要远超过人们的想象。推测 40% ~ 50% 以上的基因通过选择性剪接得到不同的拼接体分子,目前这些拼接体的生理和病理学意义及其机制正引起广泛的关注。癌蛋白 D52家族正是这样一个基因/蛋白家族。

1 癌蛋白 D52家族

癌蛋白 D52家族成员均包含一个高度保守的 Coil-coil结构域^[1]。第一个人 D52成员最早是 Byme等^[2] 1995年在研究人乳腺癌上调表达基因中发现的。1996年 Byme等^[1]又发现了人 D53蛋白,通过序列比对发现,D53与人 D52和鼠 D52分别具有 86%、52%的同源性,因而将这些高度同源的基因/蛋白定义为一个新的家族。第三个家族成员发现时就被命名为 hD54^[3]。1999年和 2002年,梁瑞霞等^[4]分别克隆了前列腺组织特异表达的人 PC-1/PLZ(Genbank: AF202897)和鼠 mPC-1基因(Genbank: AY048852),它们也是 D52家族

的新成员。2004年, Wang等^[5]报道 PC-1/PLZ能在前列腺组织特异性表达并与前列腺癌的进展有关。最近, Cao等^[6]报道能在睾丸组织特异性表达的 NYD-SP25,即 hD55。另外,在黑腹果蝇和秀丽线虫中也发现了 D52L的定向同源物^[1,7-9]。在人类中发现的这些家族成员,大体分为 D52、D53、D54、D55 四类(表 1)。由于是不同的实验室在不同的研究背景下发现的,故成员之间的命名显得有些混乱。相信随着对该蛋白家族研究的不断深入,可能会有一个新的命名规则诞生。

D52家族基因均编码一个长约 180 ~ 200氨基酸残基的小亲水多肽序列,包含一个大约 50个氨基酸残基的典型 Coil-coil基序结构,N端和 C端各有一个可能参与调节蛋白稳定性的 PEST序列^[1]。Coil-coil基序是 D52家族蛋白与同源或异源性的其他蛋白发生相互作用的重要结构域^[7,10,11]。D52家族序列最保守的区域是包含有 Coil-coil结构的中间序列。在已经发现的四类家族成员都具有这样的特征,即 C端序列具有特异性,N端具有同源性,最保守的区域是包括 Coil-coil结构的中间序列。D52家族的蛋白 PEST结构域可能与蛋白水解的调节机制有关。有趣的是,D52和 D53位于 N端的 PEST结构域覆盖了 Coil-coil结构,这可能是当蛋白的 Coil-coil结构发生相互作用的时候,PEST失去活性的原因,这与 Rechsteiner等 1988年提出的在一

收稿日期: 2006-10-31 修回日期: 2007-03-14

* 国家自然科学基金资助项目(30070296)

** 通讯作者,电子邮箱: chenlg@xmu.edu.cn

定条件下 PEST能够作为蛋白水解复合体信号的假说是一致的。

表 1 已经发现的 D52家族成员

Table 1 Published D52-like members

	D52	D53	D54	D55
人	hD52, TPD52*, N8, N8L, P/LZ, PC-1	hD53, TPD52L1, hD53L1	hD54, TPD52L2	NYD-SP25
鼠兔	mD52, mPC-1, CRHSP-28, CSPP	mD53		
其他高等生物	R10			
低等生物	Bmo 857, CG5174, Dm 7079, F13E6.1, XL294, Cel 23059			

2 癌基因拷贝数的增加

癌基因拷贝数增加是一种常见的肿瘤细胞遗传机制紊乱的现象,目前已经成为癌基因分子生物学研究的重要内容之一。通过比较基因组杂交法(CGH)以及其它传统研究癌症的方法,均发现癌变细胞中存在着多个染色体扩增区域,人 6[#], 8[#], 20[#]染色体的长臂都是常见的染色体扩增区域^[12]。而 TPD52 位于染色体 8q21 位点^[1], hD53 位于 6q22-23^[11], PC-1/P/LZ 位于 8q21.1 位点^[5], hD54 位于 20[#]染色体上^[12],这些位点都是重要的染色体扩增区。人们在多种癌症中观察到的染色体扩增,最常见的是在乳腺癌中染色体 8q21 位点扩增。不同的染色体扩增可能与不同的癌症相关,据 1996 年 Afify 等报道,人 8[#]染色体及其长臂在腺管癌包含前列腺癌中的异常要比其他类型的癌症高,这个结果与 Isola 等报道临床检测中将节点阴性乳腺癌复发和 8q 位点拷贝数增加的基因组异常相联系是一致的。

染色体扩增基因拷贝数增加可能导致基因表达量上调。TPD52 家族基因可能通过增加拷贝数来提高表达量,调节细胞行为,从而导致了病变,甚至癌变。因而将这些染色体扩增区作为治疗靶标可能具有临床意义。D52 家族基因普遍定位在染色体扩增区,对这些染色体扩增机制的深入研究将有助于阐明 TPD52 家族基因功能及其发挥功能的机制。

3 蛋白的磷酸化

Byrne 等^[11]报道 hD52 和 mD52 中分别存在 9 个和 8 个磷酸化位点, hD53 有 4~14 个潜在的磷酸化位点。N8 蛋白是一种磷酸化的胞质蛋白,而且磷酸化通常发生在丝氨酸位点^[13]。mPC-1 蛋白序列中包含着 6 个酪氨酸磷酸化位点,1 个 cAMP 和 cGMP 依赖的蛋

白激酶磷酸化位点和 2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点^[4]。兔胃壁细胞和主细胞中的 CSPP28 都能随着胆碱能的刺激快速地被磷酸化^[9]。另外,人们在不同生物的多种组织和永生化的细胞系中均检测到一种对钙离子敏感的磷酸化蛋白,与 CSPP28 具有相似的分子量。例如, Nourse 等^[3]报道在鼠胰腺腺泡细胞中存在一种与 CSPP28 具有非常相似性质的磷蛋白。人 CRHSP-28 等电聚焦的电泳结果显示有两种异构体,都能够在 ser 位点发生修饰,该蛋白的两个不同 ser 残基能够在药物促胰酶素 CCK 的处理下发生磷酸化。人 CRHSP-28 蛋白包含 17 个 ser 残基,与酪氨酸激酶 II,糖原合成激酶的 ser 磷酸化具有一致性。有趣的是,人 CRHSP-28 在 CCK 刺激下的磷酸化作用与小鼠腺泡中的钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II 的激活反应相似^[3]。

蛋白磷酸化是一种重要的蛋白修饰方式,调控蛋白发挥功能,而很多参与调节生命活动的蛋白在一定条件下可发生磷酸化。D52 家族蛋白广泛存在着磷酸化的调节方式,例如丝氨酸磷酸化是调节 D52 家族蛋白与 14-3-3 蛋白结合的一个重要机制。然而,有关 TPD52 家族蛋白磷酸化的作用机制及其生理学意义还远未阐明。

4 选择性拼接

选择性剪接是 D52 家族转录产物的一个重要标志,不同的 D52 家族基因能够产生数目众多的剪接体形式(图 1)。1999 年 Groblewski 等研究者通过 cDNA 克隆化结合 EST 数据库分析第一次发现 D52 家族存在不同的拼接形式,并且命名了两个序列插入物 insert2 和 insert3。现在已经明确它是选择性拼接的两个外显子^[14]。

D. melanogaster CG5174 基因的转录产物具有多种选择性剪接产物,预测存在多种 N 端序列。其中最长的序列编码一个 150aa 的蛋白序列,这个序列与 D52 家族的蛋白序列没有保守性,而与植物中的一种叫做 R 蛋白的转录因子的蛋白具有一定的序列相似性^[15]。*D. melanogaster* 中的 CG 5174 与 14-3-3 蛋白相互作用最近已有报道,而且 EST 分析显示选择性拼接能够调节 CG 5174 [Dm. 7079] 转录产物的 14-3-3 蛋白结合位点^[16]。而这种依赖选择性拼接对 14-3-3 蛋白结合的调节机制具有高度的保守性。敲除 D53 转录产物中的编码与 14-3-3 蛋白相结合的蛋白结构域的外显子,便产生了一个 C 端截短的蛋白。这个截短的 D53 蛋白拼接

体的功能现在还不清楚,但是它能够通过提高 ASK1 激酶活性促进凋亡^[14]。

D52^[5,7]和 D53^[10]蛋白的 N 端选择性拼接序列已经被确认,而且 D52 的 N 端不同的选择性拼接体具有组织特异性^[5]。兔中的同源物 CSPP28 有 1.7kb、2.2kb、3.3kb 三种选择性拼接产物,这三种拼接体的 3' UTR 的长度不同,Parente 等^[9]的研究表明,3' UTR 的不同可能导致蛋白在不同细胞区间的靶向。周建光等发现 PC-1/PLZ 也存在着选择性拼接体 PC-1 MRPS28,不同的是这两种蛋白的 N 端序列相同,而 C 端序列不同,然而,这种拼接体的功能尚不清楚(未发表资料)。

选择性剪接的核心问题是外显子与内含子的相对性。大约超过 40%~50% 的人基因可在不同的组织或生理状态下,通过选择性剪接产生不同的蛋白质异构体,这是直接造成生物高度异质性的基础。真核基因表达调控在后基因组时代的研究中有十分重要的地位,它将有助于进一步阐明重要的生命现象,解释细胞行为和疾病的发生机理,从而在分子水平上为人类疾病的诊断、治疗和预防提供科学依据和实用技术。研究显示,基因表达的调控大多是在 mRNA 水平上进行的,因此 RNA 的剪接在真核基因表达调控中起着十分重要的作用,它决定了哪些序列可以表达、如何表达,因而对于细胞表型的多样化和蛋白质结构与功能十分关键。特别是对选择性剪接调控机理的研究会为多基因复杂疾病的研究提供新的线索。

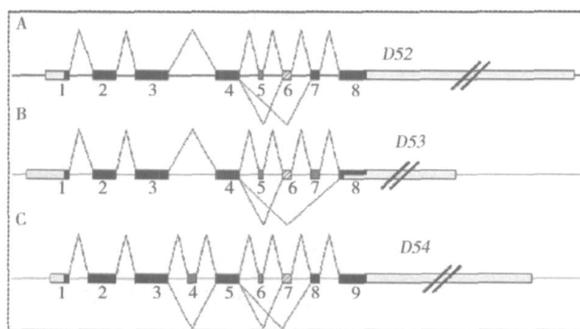


图 1 D52 家族基因的选择性拼接示意图

(黑色框示外显子;灰色和阴影框示选择性剪接的外显子;
灰色框加斜线表示蛋白结合结构域)

Fig. 1 Diagrammatic representations of D52-like genes structures and alternative splicing events

5 目前已知的功能

D52 家族蛋白在正常的生理状态下最重要的功能

是调节膜泡运输和胞外分泌。大鼠^[8]和家兔^[9]中两种不同的 D52 定向同源物,胃壁细胞胰腺腺泡细胞在应对分泌刺激时能够发生磷酸化。在大鼠胰腺腺泡细胞中表达重组 D52 蛋白能够刺激淀粉酶的分泌,粘膜细胞 T84 和大鼠胰腺腺泡细胞在促分泌素刺激下,D52 的定位发生变化,从细胞核转到细胞质^[16,17]。在大鼠胰腺腺泡细胞和 PC12 细胞中 D52 分别共定位在早期的内含体上^[11,16]。很多 D52/D53 的结合蛋白,特别是磷脂结合蛋白 annexin VI、SNARE 蛋白突触融合蛋白 syntaxin1 和 VAMP2,均与膜泡转运和脂筏运动相关^[11,16]。D53 能够增强 syntaxin1 和 VAMP2 体外相互作用,D52 家族蛋白可能通过结合膜整合蛋白、膜相关蛋白以及其他可溶性分泌蛋白发挥上述作用。

D52 在人的多种癌症中广泛扩增。人们在寻找能够提示乳腺癌发展变化中的新基因的过程中,第一次发现 D52 的差异表达。接着,在肺癌中发现 D52 即 N8 高表达。随着研究的深入,相继发现 D52 及其家族成员在前列腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肝癌中广泛高表达。D52 家族基因扩增与肿瘤增生和病毒转导细胞增生相关。用促分化介质处理白血病细胞 HL-60 和 K-562 后 D52 和 D53 转录水平下降^[11],逆转录病毒转导的 D52 能够促使鸡的神经胶质上皮细胞增生^[7],又证实了 D52 家族基因表达与细胞增生相关。雌激素^[11]和雄激素^[15]都能分别促进 D52 及其家族成员的表达。

Kaspar 等^[16]报道了 D53 是乳腺癌细胞系中受细胞周期调控的一种蛋白,在 G2/M 期转换点表达升高,在 M 期的前中期降解。与以前发现的在成纤维细胞中 D53 在 G2 期上调表达,以及在 HeLa 细胞中周期节律变化的结果是一致的^[18]。在 MDA-MB-231 细胞瞬时表达 pEGFP-D53 和 D52,在整个 M 期均不发生降解而且能够使细胞出现多核现象,在有丝分裂前中期降低 D52 家族蛋白表达,细胞分裂便不能正常进行^[15]。对 D52 家族蛋白靶标功能分析结果显示,该家族蛋白具有其它的功能。有报道 *D. melanogaster* 基因组编码蛋白之间相互作用的研究,D52 的同源物 CG 5174 在酵母双杂交系统中与多种蛋白发生相互作用,其中包括 rad50, ash1 以及 14-3-3 蛋白^[15]。鼠肝免疫染色显示 mD52 定位在染色质间颗粒^[19],Kaspar 等^[16]对人卵巢癌分析的结果显示,hD52 主要定位在细胞核内。这些结果表明 D52 蛋白家族可能在亚细胞器中发挥作用,而不仅仅只是在最初发现的细胞质中发挥作用。

近年来,本实验室对新发现的 D52 家族新成员 PC-

1/PtLZ基因功能做了较为系统的研究。实验表明 PC-1 基因具有癌基因的特点,在 NIH3T3 细胞中表达该基因能促使其癌变^[20],表达量与前列腺癌的生长、体内和体外成瘤性呈正相关。PC-1 与雄激素受体 AR 相互作用并抑制 AR 的活性。AR 信号通路在前列腺的发育和功能维持以及前列腺癌的发展中起重要的作用。PC-1 可能通过抑制 AR 的活性抑制前列腺癌的分化水平。对 Akt/PKB 信号通路分析发现,PC-1 可促进 Akt 的磷酸化水平。因此 PC-1 可能参与了 Akt 信号通路,从而对前列腺癌细胞凋亡和增生产生影响。通过酵母双杂交发现 PC-1 能够与细胞周期蛋白 CDC27、细胞骨架蛋白 filament A 相互作用(待发表)。PC-1 的这些特征有可能使其成为前列腺癌诊断和治疗的新靶标。

6 结 语

D52 家族蛋白的功能众多,影响多种细胞生理活动。而且,复杂的调控机制,如选择性剪接的方式使得这些基因编码的蛋白功能会越来越多。癌症中 D52 基因高表达具有重要意义。然而,该家族基因在癌症中高表达是基于该家族蛋白保守功能还是不同蛋白的特有的功能,是通过遗传的还是非遗传的方式起作用,目前还不清楚。深入阐述 D52 在癌症中的高表达的生物学意义以及在生理学上的重要调节作用,将有助于将 D52 作为特殊治疗靶标的研究。

参考文献

- [1] Byrne J A, Mattei M G, Basset P. Definition of the tumor protein D52 (TPD52) gene family through cloning of D52 homologues in human (hD52) and mouse (mD52). *Genomics*, 1996, 35: 523 ~ 532
- [2] Byrne J A, Tomasetto C, Basset P, et al. A screening method to identify genes commonly overexpressed in carcinomas and the identification of a novel complementary DNA sequence. *Cancer Res*, 1995, 55: 2896 ~ 2903
- [3] Nourse C R, Mattei M G, Byrne J A, et al. Cloning of a third member of the D52 gene family indicates alternative coding sequence usage in D52-like transcripts. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1443: 155 ~ 168
- [4] 梁瑞霞,周建光,黄翠芬,等. 鼠 mPC-1 基因的克隆与特性分析. *生物化学与生物物理进展*, 2004, 31 (9): 841 ~ 846
Liang R X, Zhou J G, Huang C F, et al. *J Progress in Biochem and Biophysics*, 2004, 31 (9): 841 ~ 846
- [5] Wang R, Xu J, Zhou J G, et al. PrtZ, a novel prostate-specific and androgen-responsive gene of the TPD52 family, amplified in chromosome 8q21.1 and overexpressed in human prostate cancer. *Cancer Res*, 2004, 64: 1589 ~ 1594
- [6] Cao Q H, Chen J, Li J M, et al. A testis-specific and testis developmentally regulated tumor protein D52 (TPD52)-like protein TPD52L3/hD55 interacts with TPD52 family proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344: 798 ~ 806
- [7] Proux V, Provot S, Marx M, et al. Characterization of a leucine zipper-containing protein identified by retroviral insertion in avian neuroretina cells. *Biol Chem*, 1996, 271: 30790 ~ 30797
- [8] Groblewski G E, Wishart M J, Williams J A, et al. Purification and identification of a 28-kDa calcium-regulated heat-stable protein. A novel secretagogue-regulated phosphoprotein in exocrine pancreas. *Biol Chem*, 1996, 271: 31502 ~ 31507
- [9] Parente J A, Goldenring J R, Chew C S, et al. Purification, cloning, and expression of a novel, endogenous, calcium-sensitive, 28-kDa phosphoprotein. *Biol Chem*, 1996, 271: 20096 ~ 20101
- [10] Byrne J A, Nourse C R, Gunning P, et al. Identification of homo- and heteromeric interactions between members of the breast carcinoma-associated D52 protein family using the yeast two-hybrid system. *Oncogene*, 1998, 16: 873 ~ 882
- [11] Proux G V, Galli T, Marx M, et al. D53 is a novel endosomal SNARE-binding protein that enhances interaction of syntaxin 1 with the synaptobrevin 2 complex *in vitro*. *Biochem*, 2003, 370: 213 ~ 221
- [12] Forozan F, Karhu R, Kallionieni O P, et al. Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet*, 1997, 13: 405 ~ 409
- [13] Chen S L, Zhang X K, Bhat N K, et al. Characterization of human N8 protein. *Oncogene*, 1997, 15: 2577 ~ 2588
- [14] Boutros R, Bailey A M, Byrne J A, et al. Alternative splicing as a mechanism for regulating 14-3-3 binding: interactions between hD53 (TPD52L1) and 14-3-3 proteins. *Mol Biol*, 2003, 332: 675 ~ 687
- [15] Boutros R, Fanayan S, Jennifer A, et al. The tumor protein D52 family: many pieces, many puzzles. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325: 1115 ~ 1121
- [16] Kaspar KM, Thomas D D, Groblewski G E, et al. CaM kinase II regulation of CRHSP-28 phosphorylation in cultured mucosal T84 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 285G: 1300 ~ 1309
- [17] Thomas D D, Weng N, Groblewski G E. Secretagogue-induced translocation of CRHSP-28 within an early apical endosomal compartment in acinar cells. *Am J Physiol, Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 287G: 253 ~ 263
- [18] Cho R J, Huang M, Lockhart D J, et al. Transcriptional

- regulation and function during the human cell cycle. *Nat Genet*, 2001, 27: 48 ~ 54
- [19] Saitoh N, Spahr C S, Spector, D L, et al. Proteomic analysis of interchromatin granule clusters. *Mol Biol Cell*, 2004, 15: 3876 ~ 3890
- [20] 常晓彤, 周建光, 黄翠芬, 等. PC-1 基因表达诱导 NIH3T3 细胞恶性转化. *中华病理学杂志*, 2005, 34-1: 42 ~ 46
- Chang X T, Zhou J G, Huang C F, et al. *Chin J Pathol*, 2005, 34-1: 42 ~ 46

Tumor Protein D52 Family

LI Su-ping^{1, 2} ZHOU Jian-guang² WANG Ming-gang¹ CHEN Liang¹

(1 The Key Lab of Ministry of Education for Cell Biol And Tumor Cell Eng, School of Life Sciences, Xiamen Univ, Xiamen 361005, China)

(2 Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract Recently tumor protein D52-like proteins have attracted research interests. D52, the founding member of the family, was first discovered in human breast carcinoma. All D52-like proteins bear small coil-coil motif which are conserved from lower organism to human being and among the same species. Alternative splicing producing numbers of isoforms which play different function roles, is a hallmark of D52-like genes. D52-like genes amplify in multiple carcinomas, with the protein expression increasing. The diverse functions of D52-like proteins may concern with human disease including cancer, but how they play in vital remain unknown so far. Further studies may highlight the molecular mechanism of this protein family.

Key words Tumor protein D52 family Small coil-coil motif Alternative splicing