

N-terminal Flag Tag Stabilizes P21^{Cip1/WAF1} Protein

N-端加 flag 标签 增加 P21^{Cip1/WAF1} 蛋白质稳定性

LU Feng-min, LI Ya-juan, ZHUANG Hui *
(Department of Microbiology, Peking University
Health Science Center, Beijing 100083, China)

鲁凤民/李雅娟/庄 辉 *
(北京大学医学部病原生物学系, 北京 100083)

【摘要】背景与目的: 已知细胞分裂周期抑制因子 P21 通过蛋白酶体通路降解, 其氨基端的泛素化可能参与了这一过程。Flag 为一蛋白标签, 常用于标记重组蛋白质, 以便对靶蛋白进行生物学功能分析。本文旨在研究 N-端加 flag 对 P21 蛋白质稳定性的影响。材料与方 法: 建立稳定表达外源 flag-p21 蛋白质的 NIH3T3 细胞株, 应用蛋白印迹法 (WB) 检测 NIH3T3 细胞表达的 flag-p21, 并比较其与内源 P21 蛋白质半衰期的差异; 确定阻断蛋白酶体水解通路对其降解过程的影响。结果: NIH3T3 细胞表达的内源 P21 蛋白质半衰期约 30 min, 而同一细胞表达的 flag-p21 融合蛋白半衰期则明显延长; 用抑制剂 MG-132 阻断蛋白酶体水解通路后, P21 蛋白质的量明显增加, 但同一细胞内表达的 flag-p21 量却无明显改变。结论: N-端加 flag 标签可增加 P21 蛋白质的稳定性。在对 P21 蛋白质的生物学功能进行研究时, 应考虑 N-端加 flag 对 P21 泛素化-蛋白酶体依赖的降解过程的影响。

【关键词】 P21^{Cip1/WAF1}; Flag 标签; 蛋白酶体; 降解

中图分类号: R73

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2006)02-0119-03

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: N-terminal ubiquitination may play a role in p21^{Cip1/WAF1} degradation via proteasome-dependent proteolytic pathway. We studied the influence of adding a N-terminal flag tag on the stability of p21 protein. MATERIAL AND METHODS: NIH3T3 cell stably expressing flag-p21 was set up by retrovirus pWB3flag-p21 infection followed by Blasticidin selection. Half-life of p21 protein was tested by western blot with rabbit polyclonal anti-p21 antibody, and proteasome inhibitor MG-132 was employed to test the role of proteasome pathway on the degradation of p21 protein. RESULTS: Half-life of endogenous p21 in NIH3T3 cells was about 30 minutes, while the half-life of exogenous flag-p21 fusion protein expressed in the same tested cells was obviously increased. Although MG-132 significantly increased the amount of endogenous p21 protein, there was no detectable change of flag-p21 expression under the same condition. CONCLUSION: N-terminal ubiquitination is necessary for effective p21 proteasome-dependent degradation. That adding flag tag at the amino acid termini may stabilize p21 protein should be considered.

【KEY WORDS】 P21^{Cip1/WAF1}; flag tag; proteasome; degradation

P21^{Cip1/WAF1} (简称 P21) 最早是通过免疫共沉淀发现的, 可与 CDK2 结合并抑制 CDK2 激酶的蛋白质 (CDK inhibited protein, Cip1) [1]。P21 还是野生型 P53 的下游作用因子 (wild-type P53 active factor, WAF1) [2]。已知的 P21 蛋白质的功能包括调控细胞分化、衰老和抑制

细胞凋亡等 [3]。作为细胞周期分裂的重要调控蛋白, P21 可抑制细胞周期素依赖激酶 CDK 的活性, 并可直接结合 PCNA 而抑制细胞 DNA 合成, 阻止细胞周期分裂。此外, 还能促使细胞周期素 D1 与 CDK4 结合成有活性的复合体, 促使 D1 蛋白质进入细胞核, 使细胞由

收稿日期: 2005-10-12; 修订日期: 2005-12-01

作者简介: 鲁凤民 (1963-), 男, 河南省平顶山市人, 副教授, 博士, 研究方向: 肿瘤细胞生物学, 病毒学。

* Correspondence to: ZHUANG Hui Tel: 86-10-82802221, E-mail: zhuangbmu@126.com

G₁ 期进入 S 期^[4-7]。P21 对细胞分裂周期的这种双重作用取决于细胞 P21 蛋白质的丰度。P21 蛋白质水平高低将决定其对细胞周期分裂的正调节或抑制功能。P21 基因表达调控主要在转录水平,包括 mRNA 稳定性的调控。近年来,翻译后蛋白质水平的调控对 P21 蛋白质水平的影响也越来越受到重视。目前人们普遍认为, P21 蛋白质降解是一个蛋白酶体依赖的蛋白水解过程,但是否有泛素化的参与则存在很大的争议。Sheaff 等^[8]的实验结果显示,去除所有赖氨酸的突变 P21 蛋白质,仍可有效地通过蛋白酶体依赖的蛋白水解通路降解,似乎表明 P21 蛋白质降解与泛素化过程无关。但另一些研究提示,P21 氨基端泛素化过程确实参与了 P21 蛋白的蛋白酶体依赖的降解过程,并表明 P21 游离氨基端对其稳定性有影响^[9, 10]。Flag 是一个由十几个氨基酸组成的蛋白标签,常标记于重组蛋白质的氨基端,以分析靶蛋白的生物学功能。我们对氨基端加 flag 标签是否影响 P21 蛋白质的稳定性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒 DNA pcDNA3-p21, 带有 flag 标签的质粒 pFlex 及逆转录病毒载体 pWB3 均由 Diehl 教授惠赠。NIH3T3 细胞由本室保存。

1.1.2 抗体 M2 抗体购自 SIGMA 公司(美国); 兔抗 -P21 多克隆抗体 (C-19)、鼠辣根过氧化物酶标 IgG 抗鼠和抗兔第二抗体均购自美国 Santa Clause 公司。

1.1.3 试剂 限制性内切酶购自 Biolab 公司; 脂质体法转染细胞所用的试剂购自 GIBCOBRL 公司; Cycloheximid 和细胞培养基 DMEM 等购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 pWB3/flag-p21 表达质粒的构建 EcoRI 酶切含人 p21 cDNA 的质粒 pcDNA3-p21, 将之正向插入 pFlex 质粒载体, 然后用 BamH I 将 flag-p21 重组片段切下, 并正向插入另一逆转录病毒真核表达载体 pWB3。转染包装细胞制备病毒用于感染 NIH3T3 细胞^[11]。

1.2.2 NIH3T3/ pWB3 flag-p21 细胞系的建立 将 5×10^5 NIH3T3 细胞接种于 10 cm 平皿中, 第 2 d 将 2 μ g pWB3/ flag-p21 病毒感染细胞。24 h 后加入灭菌素 (Blasticidin) 筛选, 1 周内可见抗性细胞集落形成。扩大培养, 收集细胞制备裂解液^[11]。应用蛋白酶印迹法 (WB) 检测 flag-p21 融合蛋白质表达。

1.2.3 P21 蛋白质半衰期测定 将 1×10^6

NIH3T3/pWB3 flag-p21 细胞接种于 10 cm 平皿中, 24 h 后加入细胞蛋白质合成抑制剂 cycloheximid 至终浓度为 20 μ g/ml, 在加药后 0、30、60、90、150 min 收获细胞, 制备细胞裂解液, 测定蛋白质浓度, 10% SDS-PAGE 分离蛋白质, 电转移至硝酸纤维素膜。Panson 染色以确定上样量一致。在检测 flag-p21 对蛋白酶体抑制剂的敏感性时, MG-132 的用量为终浓度 25 μ mol/L, 作用过夜。

1.2.4 蛋白印迹法 用含 1% 脱脂奶粉的 TBST 溶液稀释抗体。检测 flag-p21 融合蛋白用 M2 抗体(工作浓度为 1:2 000); 兔抗 -p21 多克隆抗体 (C-19) (工作液浓度为 1:200) 用于同时检测 flag-p21 和内源 P21 蛋白质。室温温浴 2 h。TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。第二抗体工作浓度为 1:4 000, 室温温浴 30 min, TBST 洗膜 2 次, 每次 15 min。X 片显影。

2 结果

将 flag-p21 蛋白质的表达质粒 pWB3 flag-p21 转染 NIH3T3 细胞, 经筛选后建立可稳定表达 flag-p21 蛋白质的细胞系 3T3/flag-p21, 制备细胞裂解液, 应用 M2 抗体做 WB 检测, 结果表明, 该细胞系可表达较高水平的 flag-p21 融合蛋白 (结果未显示)。

通过向细胞培养基内加入蛋白质合成抑制剂 Cycloheximid 阻断新蛋白质的合成, 在不同时间点收集细胞制备裂解液, SDS-聚丙烯凝胶 (10%) 电泳和转膜, 然后应用兔抗 -p21 抗体做 WB 检测, 以比较 flag-p21 与 NIH3T3 细胞内源 P21 蛋白质稳定性的差异。结果表明, 与同一细胞内表达的内源 P21 蛋白质相比, flag-p21 蛋白质的稳定性明显增加 (图 1)。NIH3T3 细胞内源 P21 蛋白质的半衰期仅约 30 min, 而 flag-p21 蛋白质的半衰期则明显增加 (图 2)。研究 P21 N-端加 flag 后增加稳定性的可能机制表明, 在加入蛋白酶体抑制剂 MG-132 后, NIH3T3 细胞内源 P21 蛋白质的量明显增加, 而同一细胞内表达的 flag-p21 融合蛋白质的量无明显改变 (图 3)。提示抑制蛋白酶体通路不能明显增加 flag-p21 融合蛋白质的稳定性。

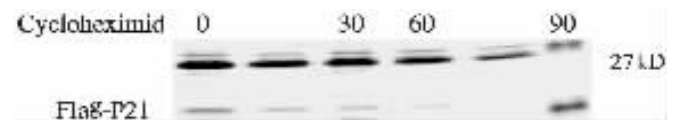


图 1 Western blot 检测 flag-P21 和 NIH3T3 细胞内源 P21 蛋白质的稳定性

Figure 1 Western blot test the turn over of endogenous P21 and exogenous flag-P21 protein after the block of newly protein synthesis by adding cycloheximid

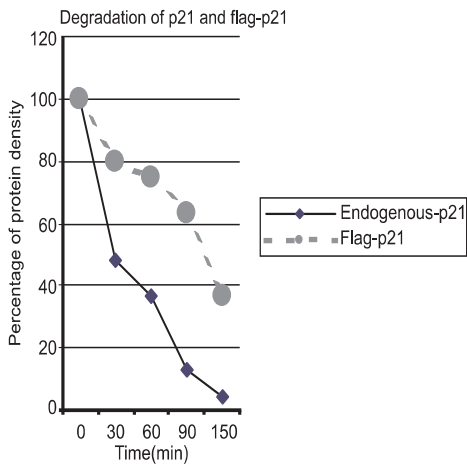


图 2 P21 与外源 flag-P21 蛋白质半衰期测定 (图中数据为 2 次试验平均值)

Figure 2 Measuring the half life of endogenous P21 and exogenous flag-P21 protein (Data from two separate experiments)

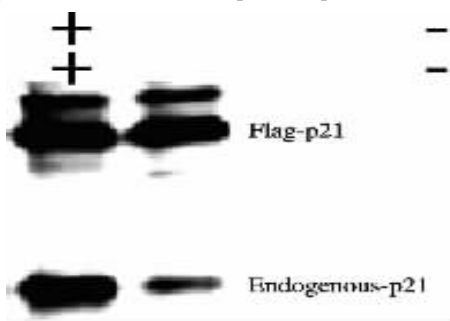


图 3 蛋白酶体抑制剂 MG-132 可明显增加内源 P21 的稳定性, 但对 flag-P21 蛋白质表达量无明显影响

Figure 3 Robust increase of endogenous P21 after MG132 block proteasome pathway. No distinguishable increase of flag-P21 suggested abundance and stability of flag-P21 was insensitive to proteasome dependent protein degradation)

3 讨论

有许多证据表明, 泛素化确实参与了 P21 蛋白质通过蛋白酶体依赖的蛋白水解通路降解, 如蛋白酶体抑制剂可使 P21 稳定, 并可检测到泛素化的 P21, 及观察到 P21 与 SCF 复合体等^[12]。近年来有实验提示, P21 游离 N-端的泛素化参与了 P21 蛋白的降解过程。如在 P21 的 N 端加入大的蛋白标签可获得抗蛋白酶体降解特性^[9]。也有报道表明, 在人或鼠 P21 蛋白质 N-端加 HA-、myc- 等较小的多肽标签, 则不增加 P21 的稳定性^[8]。本研究结果显示, 加 flag 标签于 P21 蛋白质的氨基端可明显增加 P21 蛋白质的稳定性, 这一差异可能与所用标签 N-端氨基酸序列不同有关。

P21 蛋白质经蛋白酶体通路降解依赖于其是否位于细胞核内。Sheaff 等^[8]发现, 去除 P21 羧基端的入核信号 (nuclear location signal, NLS) 可阻止其进入细胞核内, 使其稳定性明显增加。因此, 应考虑 P21 蛋白质的稳定性增加, 是否与在 P21 氨基端加了一较长肽段而导致融合蛋白的生物学特性改变有关, 从而影响 P21 蛋白的入

核过程。对 D1b 的研究表明, 加 Flag 标签并不影响 D1 蛋白质核内运输^[11]。因此, 在 NIH3T3 细胞中 flag-p21 的稳定性增加, 可能不是由其在细胞内位置的改变所致。

由此可见, 氨基端的泛素化与 P21 蛋白质的蛋白酶体依赖的降解有密切关系。在研究 P21 稳定性时, 应考虑在其氨基端加 flag 标签增加融合蛋白质的稳定性。

参考文献:

- [1] Harper JW, Adami GR, Wei N, *et al.* The P21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G₁ cyclin-dependent kinases [J]. *Cell*, 1993, 75(4): 805 - 816.
- [2] El-Deiry W S, Tokino T, Velculescu VE, *et al.* WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression [J]. *Cell*, 1993, 75(4): 817 - 825.
- [3] Macleod KF, Sherry N, Hannon G, *et al.* p53-dependent and independent expression of P21 during cell growth, differentiation, and DNA damage [J]. *Genes De*, 1995, 9(8): 935 - 944.
- [4] Parry D, Mahony D, Wills K, *et al.* Cyclin D-CDK subunit arrangement is dependent on the availability of competing ink4 and p21 class inhibitors [J]. *Mol Cell Biol* 1999, 19(3): 1 775 - 1 783.
- [5] Alt JR, Gladden AB, Diehl JA. p21(Cip1) Promotes Cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(10): 8 517 - 8 523.
- [6] Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁-phase progression [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(2): 1 501 - 1 512.
- [7] Cheng M, Diehl JA, Fero M, *et al.* The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK inhibitors are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts[J]. *EMBO J*, 1999, 18(6): 1 571 - 1 583.
- [8] Sheaff RJ, Singer JD, Swanger J, *et al.* Proteasomal turnover of p21cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination [J]. *Molecular Cell*, 2000, 5(2): 403 - 410.
- [9] Coulombe P, Bonneil E, Thibault P, *et al.* N-terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(14): 6 140 - 6 150.
- [10] Bloom J, Amador V, Bartolini F, *et al.* Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitylation [J]. *Cell*, 2003, 115(1): 71 - 82.
- [11] Lu F, Gladden AB, Diehl JA. An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(21): 7 056 - 7 061.
- [12] Wang W, Nacusi L, Sheaf RJ, *et al.* Ubiquitination of p21^{Cip1/WAF1} by SCF^{Skp2}: substrate requirement and ubiquitination site selection[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(44): 14 553 - 14 564.