

HCV NS5A反式调节蛋白13研究进展

高学松¹, 成军² (1. 首都医科大学附属北京地坛医院 综合科, 北京 100015; 2. 首都医科大学附属北京地坛医院 传染病学研究所, 北京 100015)

HCV NS5A反式调节蛋白13 (HCV NS5A trans-regulated protein 13, NS5ATP13) 又称核螺旋体磷酸化蛋白1 (nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1, NOLC 1) 或核仁磷酸化蛋白140 (nucleolar phosphoprotein 140, Nopp140), 是Meier等在大鼠肝细胞核中发现并鉴定的一种核定位信号 (nuclear localization signal, NLS) 结合蛋白^[1], 作为蛋白伴侣具有细胞核与细胞质中穿梭的功能^[2]。本实验室在利用抑制性消减杂交的方法筛选HCV NS5A反式作用蛋白时, 发现HCV NS5A可以上调该基因的表达^[3]。下面就NS5ATP13近年来的研究进展作一综述。

1 NS5ATP13的研究概况

真核细胞的细胞核是核糖体RNA (ribosomal RNA, rRNA) 合成以及前核糖体颗粒装配的场所。在分裂间期, 可以观察到3种不同的细胞核仁的成分: 纤维中心 (fibril center, FC)、致密纤维成分 (dense fibrillar component, DFC) 和颗粒组分 (granular component, GC)。有丝分裂期, 在前期细胞中核仁组分分解, 中期细胞中核仁结构消失。在末期细胞中核仁的原料开始聚集, 将在细胞周期的G1期装配称为成熟的细胞核^[4-6]。NS5ATP13最早作为NLS结合蛋白被发现, 当时研究认为在大鼠的肝脏细胞中具有辅助核仁装配的功能。之后, 相继鉴定了人、非洲爪蟾、果蝇和蠕虫中NS5ATP13的同源蛋白^[7-10]。人NS5ATP13在分裂间期定位于DFC。有研究发现NS5ATP13的表达在高分裂细胞内的分裂间期和有丝分裂期

有明显变化。在细胞的有丝分裂期, NS5ATP13的表达水平下降, 在细胞分裂的前期和后期, NS5ATP13水平降低至检测不到。目前已经研究证实, NS5ATP13可以与多种核仁蛋白或者与核仁生物合成相关的蛋白相互作用, 包括RNA聚合酶 I (RNA polymerase I, Pol I)、转录因子C/EBP β 、酪蛋白激酶 II (casein kinase II, CK2)、p80 环形体蛋白 (p80 coilin)、螺旋小体p82 (p82 in the coiled-body) 和核仁小核糖核蛋白 (small nucleolar ribonucleoproteins, snoRNPs)。在rRNA的合成及核仁的生物发生上起重要作用^[11]。

NS5ATP13的序列较为独特, 氨基酸的长度不一但结构相似。其有一个保守的N-末端、一个保守的C-末端和独特的包括多个酸性和碱性氨基酸簇重复 (10~25次) 的中央区。其带电荷的氨基酸含量非常高, 带正电荷和负电荷的区域交替出现。酸性氨基酸区主要包括天门冬氨酸、谷氨酸和丝氨酸。散在的碱性区主要富含赖氨酸、丙氨酸和脯氨酸, 见图1。其本身有82个潜在被CK2磷酸化的位点, 而去磷酸化导致其由140 kDa减少至95 kDa。与绝大多数核仁蛋白不同, NS5ATP13无RNA结合域。有趣的是, 在细胞周期中, NS5ATP13的磷酸化程度也会发生改变。在有丝分

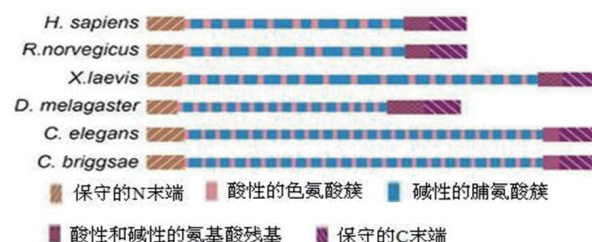


图 1 NS5ATP13结构域示意图

裂的细胞中, 尽管NS5ATP13的表达水平下降, 但其磷酸化水平是升高的。

2 NS5ATP13作为蛋白伴侣的穿梭作用

螺旋小体是指富含核RNA的不连续的核细胞器, 一般认为与核仁有关, 其标志物为p80 coilin, 螺旋小体包含许多RNA转录与处理元件, 包括全部5种剪接体的小核糖体蛋白质颗粒 (small nuclear ribonucleoprotein particles, snRNPs)、U3 snRNA、U7 snRNA、核仁纤维蛋白和NS5ATP13等^[12,13]。1992年, NS5ATP13已经被证明在培养的组织细胞中具有穿梭功能。Isaac等^[14]使用突变分析, 瞬时转染和酵母双杂交的方法证明NS5ATP13具有在核仁和螺旋小体之间穿梭的分子链接功能。研究人员采用了N-末端加HA标签的NS5ATP13, 瞬时转染COS-1细胞。间接免疫荧光观察发现, 若表达全长的HA-NA5ATP13携带SV40早期启动子, 则转染6~12小时后NS5ATP13在核仁蓄积, 外源性与内源性的NS5ATP13无法区分。观察螺旋系统标志蛋白p80 coilin, 发现12小时后HA-NA5ATP13在螺旋小体内才出现。NIH 3T3和Hela细胞中的结果相似, 说明螺旋小体的滞后蓄积与细胞类型无关。如果表达的全长HA-NA5ATP13携带SV40晚期启动子, 则NS5ATP13转染24小时后核仁蓄积, 48小时后螺旋小体蓄积。结果提示, 在核仁和螺旋小体这两种细胞器中存在一个通路。接下来研究人员采用HA-NS5ATP13的3种突变体: N-末端、C-末端和中央重复序列突变体分别转染细胞, 证明中央重复序列对于NS5ATP13在核仁和螺旋小体的蓄积是必不可少的。N-末端的细胞核输出信号确实具有功能。通过追踪表达NS5ATP13的C-末端突变体显示其对于内生的NS5ATP13显性负效应, 影响NAP57及核仁纤维蛋白的定位还可以使细胞质内出现新的结构, 引起螺旋小体的扩散。笔者分析, p80 coilin、NAP57或核仁纤维蛋白对于维持螺旋小体的完整性有非常重要的意义。表达NS5ATP13的C-末端突变体影响p80 coilin等的定位, p80 coilin不断出入螺旋小体, 反映螺旋小体的定位是一种动

态平衡, p80 coilin自身不断出入核仁, 这也许与NS5ATP13的介导有关, 且通过酵母双杂交和免疫共沉淀技术也证实了NS5ATP13与p80 coilin的N-末端结合。但Bellini等^[15]研究非洲爪蟾核泡时发现, 当NS5ATP13返回核泡时, 同时回到螺旋小体和核仁, 与Isaac等的研究结果不同。笔者认为新合成的NS5ATP13与在穿梭过程中的NS5ATP13不同, 因此导致回到螺旋小体或核仁的结果也不尽相同。另外也可能与两种蛋白的磷酸化程度不同。总之, 环形体蛋白和NS5ATP13也许与核仁纤维蛋白和NO38蛋白相关, 是包括细胞浆、核仁和螺旋小体在内的运输系统的一部分。

脊椎动物的rRNA生物起源包括约200个核苷酸(酵母是100个左右)发生假尿苷酸化和2'-O的甲基化。这些修饰大都发生在核糖体的重要功能域, 提示这种修饰在翻译中起一定的作用^[16]。这些发生修饰的核苷酸是一些位点特异性的碱基对与数量相似的H/ACA和C/D的小核仁RNA (small nucleolar RNAs, snoRNAs) 分别发生假尿苷酸化和2'-O的甲基化^[17,18]。四个核心蛋白NAP57、GAR1、NHP2和NOP10与相关的H/ACA snoRNA形成单独的snoRNPs, 另外4个核心蛋白核仁纤维蛋白、NHP2L1、NAP65和NOP56与C/D snoRNA形成C/D snoRNPs。Meier等已报道了NS5ATP13与NAP57 (Nopp140-associated protein of 57 kD) 共定位于DFC和螺旋小体上^[19]。而对NAP57的认识主要来源于其酵母同源物Cbf5p, 目前认为rRNA假尿苷合成酶在rRNA的合成与前rRNA的加工过程中发挥作用。核仁纤维蛋白是甲基化酶, 催化修饰的发生。目前snoRNPs成熟的机制不是十分清楚, 已知其集中于核仁和Cajal螺旋小体。Cajal螺旋小体富含小核仁RNA也许与snoRNPs的成熟有关^[20]。尽管不是snoRNPs中的完整组分, NS5ATP13是目前已知的惟一与两类snoRNPs有关的蛋白, NS5ATP13与H/ACA snoRNPs的结合较与C/D snoRNPs的结合更紧密。与snoRNPs相同, NS5ATP13也集中在核仁和Cajal小体。体内外实验都表明NS5ATP13可以与H/ACA、C/D snoRNPs结

合。Yang等^[21]还认为NS5ATP13与snoRNPs的结合是暂时和可逆的,这种结合具有什么功能?笔者分析有3种可能:①NS5ATP13Z在核仁、螺旋小体与细胞质间穿梭,可能为核浆snoRNPs的转运提供便利。因为前期已经报道了具有显性失活作用的NS5ATP13的C-末端突变体的表达可以缺失核仁内snoRNPs;②NS5ATP13可能辅助snoRNPs的生物起源,与SMN和SIP蛋白在剪接体snRNPs的装配中的功能类似;③NS5ATP13直接参与snoRNPs的功能,修饰和加工rRNA。

Wang等^[22]在研究NS5ATP13与snoRNP的相互作用时,也得到了类似的结论。他们使用了一种snoRNP介导的真核细胞rRNA假尿苷酸化的分析方法。研究显示,NS5ATP13与完整的snoRNP的解离是一种盐依赖的方式,在生理条件下,NS5ATP13与snoRNP结合,说明两者之间存在静电作用,同时显示H/ACA snoRNP与磷酸化的NS5ATP13结合,与非磷酸化的NS5ATP13不结合,尽管这种结合是静电作用,但结合的作用还是很强的,在核仁盐浓度稀释至0.1 mmol/L时,NS5ATP13是惟一与snoRNP结合的蛋白,这种结合也是多种蛋白之间的相互作用,磷酸化的NS5ATP13与NAP57的C-末端结合,富含赖氨酸的重复序列与snoRNP结合。磷酸化在蛋白结合中具有重要作用,因此去磷酸化可导致蛋白结合解离。另外,NS5ATP13与snoRNP的结合并不干扰假尿苷化酶,提示NS5ATP13与snoRNP结合以及rRNA与snoRNP的杂交均可同时进行。不管与NS5ATP13结合与否,H/ACA snoRNP在假尿苷化过程中都非常活跃。因此,NS5ATP13可以与前rRNA一起辅助snoRNPs的形成,起到类似修饰酶的作用。尽管现在还很难用化学计量方法来测算NS5ATP13-snoRNP的结合,但在NS5ATP13结构中10个重复的碱性磷酸化序列可以结合多个snoRNPs,作为snoRNPs的支架,故笔者认为NS5ATP13是snoRNPs的伴侣。

Srp40p是NS5ATP13在酵母中的同源蛋白,是超过100种小核仁核蛋白微粒的伴侣,Srp40p与C/

D snoRNAs集中于核仁亚结构——核仁体^[23]。缺失SRP40导致核仁体遗失,与Cajal小体消散类似。这些相似之处有利于研究NS5ATP13在核糖体和snoRNP生物起源中的作用。Yang等^[24]发现SRP40、丝氨酸羟甲基转移酶(serine hydroxymethyltransferase, SHM2)与一碳四氢叶酸酯合成(one-carbon tetrahydrofolate synthase, ADE3)之间三元的合成致死关系。SHM2和ADE3对于一碳家族的代谢具有重要作用。通过突变分析显示,SHM2和ADE3是一种非代谢的间接相互作用,使其通过SRP40调节核糖体的合成。在缺失SRP40的合成致死株中,导入大鼠NS5ATP13可以恢复酵母细胞的生长和H/ACA snoRNAs的稳定性,从实验中证实了Srp40p与NS5ATP13的功能同源性。

3 NS5ATP13在核糖体合成中的作用

在细胞周期的M期,NS5ATP13从裂变的细胞核中进入细胞质,在分裂末期重新出现在新的细胞核中。与核仁磷蛋白B23、核仁素蛋白C23和核仁纤维蛋白不同,NS5ATP13在前核仁体中不存在。故认为NS5ATP13与其他非核糖体核仁蛋白相比,在核仁的重塑中有其独特的方式。Baran等^[25]观察了小鼠胚胎第1次卵裂期NS5ATP13定位的动态变化,从而研究核仁发生过程中NS5ATP13的作用。免疫组化显示rDNA转录激活前NS5ATP13处于核仁前体(nucleolus precursor body, NPB)边缘部分;当转录过程被放线菌素D抑制后,NS5ATP13在NPB边缘仍然存在。免疫荧光染色确认NS5ATP13定位于螺旋小体。在单细胞阶段的早期,NS5ATP13与核仁纤维蛋白共定位于NPB边缘,呈不连续分布;在晚期在细胞质中呈松散的排列分布。因此笔者分析NS5ATP13、环形体蛋白和核仁纤维蛋白是前种植胚胎细胞中一种特殊转运系统的蛋白成分。在受精卵核仁活化前NS5ATP13仍定位于NPB边缘,包含核仁纤维蛋白,但不包含B23。B23重新出现于NPB似乎与rDNA转录活性的重新活化有关。在双细胞阶段,NS5ATP13与B23共定位于重新活化的NPB皮层。采用Pol I和UBF的抗体免疫标记提示NS5ATP13

活跃的参与rDNA的转录。rDNA合成和转录后加工过程分子组成的不同提示周期体细胞和前种植受精卵细胞可能选择性的转运转录和(或)加工复合物到核仁组织区。NS5ATP13在rDNA的转录中不可或缺,但过量表达危害更大。在Hela和COS7细胞中过表达NS5ATP13或NS5ATP13的N-末端(1至382位氨基酸)突变体均可以抑制rDNA的转录^[26]。Tsai等^[27]以Pol I作为有丝分裂细胞核仁组织区(nucleolus organizer regions, NORs)的标志物,发现后期弥散的NS5ATP13未回到NORs,但是末期可以移动到包含Pol I的染色体。整个分裂间期,可以发现NS5ATP13与Pol I共定位在核仁点样结构。NS5ATP13的N-末端和C-末端分别可以与染色体近端着丝粒 α -卫星序列(α -satellite arrays)和rDNA簇结合。表达NS5ATP13的N-末端或C-末端的突变体对于rDNA重复序列、 α -卫星序列、Pol I和UBF的核内合成都有很强的干扰作用,可以使核仁分离,影响rDNA的转录。笔者构建缺失NS5ATP13的中央重复区的突变体转染Hela细胞,发现该突变体可以介导核仁破裂和整个染色体凝聚。而RNAi干扰NS5ATP13的表达后,出现rDNA消散,近端着丝粒的 α -卫星序列远离核仁,同时rDNA转录停滞。笔者分析NS5ATP13在核糖体生成中的作用主要是通过NS5ATP13-染色体-UBF复合物的形式发挥作用,该复合物可以募集Pol I的转录因子和前rRNA加工修饰的装置在早期核糖体生成时发挥作用。rRNA中间产物从包含NS5ATP13的小岛上(FC与DFC)被转运至周围的GC以进一步成熟。

Chen等^[26]采用免疫共沉淀的方法使用NS5ATP13单抗分离和质谱分析Hela细胞的裂解物,确定RNA聚合酶I最大亚基RPA194可以与NS5ATP13结合,结合区域为204至382位的氨基酸。RPA194是Pol I核心酶的完整组分,定位于核仁。而NS5ATP13也是一种核仁蛋白,因此两者的结合可能具有生理意义。激光共聚焦也验证了Pol I和NS5ATP13的相互作用在体内确实存在。但对于NS5ATP13在rDNA转录过程中的具体作用

还存在争议。Thiry等^[28]重新对其在Hela、ELT和HEp-2等细胞中细胞不同周期中的定位进行了研究。在有丝分裂期与前rRNA加工相关的蛋白相似,聚集于核仁衍生的集中点(nucleolus-derived foci, NDFs),但整个有丝分裂期NS5ATP13与NORs无关,提示NS5ATP13并非Pol I转录结构的组分,即使转录时其位于rDNA位点附近。提示NS5ATP13属于rDNA转录激活区的前rRNA加工相关组分。

对于NS5ATP13参与rDNA的转录与核糖体的发生目前已经无异议,但其确切的机制仍然不是十分清楚。rDNA的转录与前rRNA加工在时间和空间上紧密相连,而t-UTP在进化过程中非常保守,在连接转录与加工中起到了重要的作用。t-UTPs是在酵母中鉴定发现的,包括UTP4、UTP5、UTP8、UTP9、UTP10、UTP15和UTP17。Prieto等^[29]采用免疫荧光染色显示NS5ATP13、TCOF1与假NORs(pseudo-NORs)结合,而核仁纤维蛋白与NAP57无法与假NORs结合。随后证明NS5ATP13与TCOF1、t-UTPs与核糖体基因染色体的结合是不依赖于snoRNPs和转录的,TCOF1是通过与UBF的直接相互作用而结合,而NS5ATP13则通过与Pol I相互作用而结合。中期多数Pol I从有丝分裂期的NORs上解离,与NS5ATP13相似。相反,UBF和TCOF1在有丝分裂期仍然与NORs结合。以上提示NS5ATP13与TCOF1、t-UTPs参与连接转录和前rRNA的加工和修饰。

4 NS5ATP13维持细胞核的形态

核仁起源于染色体上包含rDNA重复序列的部分。细胞有丝分裂期结束后NOR结合的UBF(upstream binding factor)和Pol I可以作为核仁再形成的锚定位点。且rDNA与UBF特异性结合可以募集Pol I转录和前rRNA的加工结构,有助于早期核糖体的合成。NORs和Pol I都不足以维持核仁的形态,在rDNA重复序列的空间结构中一定会结合其他成分,在核仁发生时利用核仁融合发挥作用。Chen等^[26]在Hela和COS7细胞中过

表达NS5ATP13,发现核仁呈球样结构,Pol I和核仁纤维蛋白的分布也发生改变,充满了整个核仁区,而核仁素被驱散入核浆,远离球形核仁。过表达NS5ATP13的N-末端(1至382位氨基酸)可以使核仁发生新月形改变。Tsai等^[27]分别构建了不同的NS5ATP13突变体转染Hela细胞,与表达全长的NS5ATP13不同,删除了中央重复区突变体均匀的分布在核仁,并不影响核仁的外形。证实NS5ATP13结构中的氨基酸重复序列具有一种微弱的自我相互作用的能力。在生理条件下,NS5ATP13的锚定域和中央重复区对于构建核仁的圆形结构是必不可少的。多个NS5ATP13分子的锚定域与染色体rDNA和近端着丝粒 α -卫星序列结合,其中央重复区能够相互作用,形成一个高度有序的结构,看起来类似多个相连的小岛,逐渐扩大并且融合成为一个大的球形。以上结果充分说明NS5ATP13在维持核的完整性中发挥重要作用。

5 NS5ATP13磷酸化的研究

Jin等^[30]在使用一种抗癌的化疗药物多柔比星在人cDNA的噬菌体文库中筛选时发现,NS5ATP13的C-末端可以与多柔比星结合,并通过荧光光谱法证实。进一步研究发现,多柔比星结合未发生磷酸化的NS5ATP13。众所周知,多柔比星可以使细胞周期停滞于G₂/M期,而NS5ATP13不仅在有丝分裂期表达量降低,且进一步磷酸化,提示多柔比星可能通过与未磷酸化的NS5ATP13结合而影响NS5ATP13的功能。在后续研究中发现,NS5ATP13与多柔比星的结合的确受到了磷酸化状态的影响,在5 mmol/L ATP存在的条件下,NS5ATP13与多柔比星结合的亲和力增加10倍。当多柔比星浓度增加时,CK2磷酸化NS5ATP13的水平显著下降。不同浓度的多柔比星对cdc2激酶或PKA磷酸化NS5ATP13的水平无影响,提示cdc2激酶或PKA依赖的NS5ATP13磷酸化不受多柔比星抑制。当选择 α -酪蛋白作为CK2的底物时,其磷酸化的水平并未受到多柔比星的影响,故这种下降并非多柔比星抑制CK2的催化活性造成,而是直接与NS5ATP13相互作用造成的。NS5ATP13与

多柔比星结合的区域包含一些CK2的作用位点,NS5ATP13与多柔比星的结合诱导NS5ATP13蛋白的构象改变,使NS5ATP13与CK2不易结合,但这种结合并未显著改变NS5ATP13的空间折叠状态^[31]。还有研究人员表达和纯化NS5ATP13的原核蛋白,且在实验中发现CK2可以使NS5ATP13广泛磷酸化,此时检测蛋白大小在130~140 kDa,与细胞裂解后的NS5ATP13大小相当,且其移动能力下降^[32]。除CK2外,cdc激酶2及细胞表面蛋白激酶亦可以使NS5ATP13发生磷酸化,但具体情况也不尽相同。在有丝分裂的细胞中,cdc激酶2可使NS5ATP13高度磷酸化,而不改变其移动能力^[7]。细胞表面蛋白激酶仅使细胞表面的NS5ATP13磷酸化^[33]。NS5ATP13的溶解性与磷酸化阶段有关。只有磷酸化的NS5ATP13可以与Mg²⁺、F⁻、Cu²⁺或Zn²⁺等离子发生反应,并在此类离子存在的条件下发生凝集。

NS5ATP13可以特异性的与CK2催化亚基相互作用,明显抑制CK2的活性。NS5ATP13与CK2的相互作用受CK亚基的性质和NS5ATP13磷酸化的状态调节。未发生磷酸化的NS5ATP13只能与CK2的CK2 β 亚基结合,而磷酸化后的NS5ATP13与CK2 α 结合显示出很高的亲和力。Kim等用 α -酪蛋白作为底物,检测NS5ATP13对CK2催化活性的影响,结果发现当未磷酸化的NS5ATP13浓度增加时,磷酸化的 α -酪蛋白含量显著减少,在等摩尔比的情况下,CK2催化活性下降达40%。NS5ATP13同样作为CK2的底物,还除外了NS5ATP13作为竞争性抑制剂的可能。而这种抑制并非通过抑制CK2各亚基的装配来完成的,这可能是通过降低CK2活性中心与底物蛋白的亲合或者使构象发生改变从而使CK2的活化减少而实现的。而既往Li等研究证实小鼠NIH 3T3细胞中NS5ATP13主要是与CK2的调节亚基结合,而与CK2 α 相互作用是次要的^[34]。与其他学者的研究有所不同,笔者分析是由于NIH 3T3细胞内NS5ATP13的磷酸化水平较低造成的,另一种可能是人类和小鼠的CK2亚基的亲和力不同。另外NS5ATP13抑制CK2的程度还

与底物有关。NS5ATP13可以有效抑制PCTP样蛋白和 α -酪蛋白,而磷酸化的酸性肽段DSD(氨基酸序列为RRRDDSDDD)只能被NS5ATP13轻度抑制,可能和NS5ATP13与CK2结合限制了底物蛋白与CK2的活性中心结合有关。笔者还发现,在低InsP6浓度条件下,CK2与NS5ATP13形成复合物后,活性下降4到5倍,但即使如此,也可以催化一些蛋白的磷酸化。以上结果都提示NS5ATP13抑制CK2的活性与底物蛋白有关。Lee等采用酵母双杂交的方法确定了NS5ATP13的C-末端(氨基酸528~704)是与CK2 α 相互作用的区域。肌醇六磷酸盐(inositol hexakisphosphate, InsP6)可以阻止NS5ATP13与CK2之间的相互作用,InsP6可以通过抑制NS5ATP13而恢复CK2生物学活性。这就说明在InsP6和NS5ATP13的相互作用中存在调节CK2的动态机制。在细胞周期过程中InsP6的浓度可以变化至少3倍,提示InsP6对细胞周期有重要的影响。当细胞分化时InsP6水平升高,CK2与NS5ATP13解离,完全活化。有丝分裂期的细胞InsP6水平上升与CK2活性水平的提高说明在细胞增殖过程中InsP6和NS5ATP13协同作用调节CK2^[35]。Lee等还采用了分子筛析色谱的方法深入研究了InsP6介导的抑制NS5ATP13与CK2相互作用的机制,发现肌醇多磷酸的磷酸化程度与CK2的活性抑制呈正相关,而且确认了CK2 α 的K76附近正电荷区域就是InsP6的结合位点^[36]。

6 NS5ATP13转录因子样作用

在肝脏的急性期反应中, α 1-酸性糖蛋白基因(α 1-acid glycoprotein gene, AGP)的表达非常关键,涉及多种转录因子,NS5ATP13也参与其中。Miau等采用免疫亲和柱层析分离与C/EBP β 结合的蛋白后,以质谱分析鉴定了NS5ATP13。NS5ATP13真核表达载体可呈剂量依赖性激活AGP基因启动子。NS5ATP13真核表达载体还可以与C/EBP β 表达载体协同作用而激活AGP基因启动子,而与其他转录因子如ATF2、YY1和c-jun等则不能实现协同作用,以上结果提示NS5ATP13的转录因子样作用,也说明NS5ATP13与C/EBP β 协

同作用的特异性。通过对AGP基因启动子的缺失突变和凝胶电泳阻滞分析,确认了NS5ATP13与C/EBP β 复合物对于AGP基因活化的作用,该作用主要通过AGP基因启动子上的C/EBP β 结合位点发挥作用。进一步分析其他转录因子还发现,NS5ATP13与TFIIB之间可以相互作用,相对于NS5ATP13的N-末端为与C/EBP β 相互作用的重要区域,NS5ATP13的C-末端是为与TFIIB作用的主要区域^[37]。蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)依赖的NS5ATP13的磷酸化与C/EBP β 协同作用,诱导AGP基因的表达,且AGP基因启动子也能够特异性被PKA信号通路激活。在福司柯林存在的条件下,NS5ATP13可以激活AGP基因启动子。而当NS5ATP13与CK2共转染时,却未激活AGP基因启动子,提示CK2并不参与NS5ATP13介导的AGP基因启动子活化的过程。当使用PKA缺陷的F9细胞重复同样的实验时,亦无法激活AGP,说明NS5ATP13与PKA的协同作用还依赖于特定基因的启动子,且笔者采用质谱鉴定了NS5ATP13至少存在3个PKA特异性的作用位点。在293T细胞中过表达NS5ATP13对PKA刺激的CREB磷酸化无太大影响,而NS5ATP13的PKA磷酸化位点的变异尤其是627位的丝氨酸(Ser627)影响了AGP的活化,说明NS5ATP13的磷酸化对AGP基因的活化起着非常重要的作用。且PKA磷酸化的NS5ATP13要实现AGP基因最大程度的活化,必须依赖CREB(cAMP-response element-binding protein)和C/EBP β 的协同作用^[38]。

7 与疾病的关系

NS5ATP13作为一种核仁蛋白,与核糖体的发生有密切关系,而核糖体与肿瘤发生发展的作用逐渐受到关注^[39],因此NS5ATP13与肿瘤是否存在关系成为新的研究方向。Hwang等^[40]采用抑制性消减杂交和基因芯片的方法发现NS5ATP13在鼻咽癌细胞中明显上调,与鼻咽癌患者的病理组织标本中NS5ATP13表达增强一致。NS5ATP13的shRNA可以抑制鼻咽癌细胞的增殖,促进细胞的凋亡。动物实验表明,抑制NS5ATP13表达可以显

著抑制免疫缺陷小鼠鼻咽癌的发生。进一步研究其机制发现, NS5ATP13可以调节MDM2的表达, 体内和体外实验都显示抑制NS5ATP13可以下调MDM2的表达。TP53是MDM2表达的关键激活因子, 而TP53上调MDM2的表达需要NS5ATP13的协同作用, 确切机制为NS5ATP13与MDM2启动子内含子1上的结合位点相结合, 与TP53协同作用调节MDM2的转录。

颌面部骨发育不全综合征(Treacher Collins syndrome, TCS)是一种颅面发育障碍的常染色体显性疾病, 是由基因TCOF1变异导致的, 基因TCOF1的编码产物treacle主要包含一个中央重复区, 在结构上与NS5ATP13有关, 而且两种蛋白在功能上有相似之处, 可以被CK2磷酸化, 且共定位于DFC^[41]。双重免疫染色法显示分裂间期treacle、Pol I和NS5ATP13共定位于核仁, 提示他们之间可能存在相互作用。Treacle的C-末端(氨基酸1294~1488)是与NS5ATP13结合的区域, 但不与Pol I结合。而此区域也能与UBF结合, 提示treacle与Pol I的结合不依赖于NS5ATP13与UBF。敲除treacle可以使Pol I和UBF从核仁中弥散提示treacle是核仁中维持Pol I复合物的支架, 该复合物与rDNA的联系依赖于treacle自身或NS5ATP13, 而非UBF^[42]。

脊髓性肌萎缩(spinal muscular atrophy, SMA)是一种常见的常染色体隐性遗传的神经退行性疾病, 是由于活运动神经元(survival motor neuron, SMN)减少引起的。转配SMN的过程涉及snRNPs生物合成。SMA细胞的功能缺陷与Cajal小体中NS5ATP13减少有关, 而且与疾病的严重程度相关。Renvoise等干扰成纤维细胞中的NS5ATP13, 发现SMA需要Cajal小体中NS5ATP13的积聚。相反, 在SMA细胞中过表达SMN有助于恢复NS5ATP13的水平, 而SMA患者的SMN变异在促进Cajal小体中NS5ATP13的积聚时出现功能障碍。因此, 笔者认为Cajal小体中NS5ATP13减少可以作为SMA的表型标志物^[43]。

刘妍等^[3]利用抑制性消减杂交技术, 成功构建了HCV NS5A反式激活基因差异表达的cDNA

消减文库, 挑选克隆测序并与GenBank数据库进行同源性分析, 结果发现一个功能未知的新基因, 命名为NS5ATP13, 提交在GenBank, 登录号为D21262。随后对该基因进行了克隆化研究, 发现该基因的开放读码框架长度为2103个核苷酸, 编码700个氨基酸残基的产物。这是首次报道NS5ATP13与HCV之间存在联系。陈京龙等^[44]和刘志英等^[45]分别应用噬菌体表面展示技术, 以隐源性肝炎和肝癌患者血清作为固相筛选分子, 对噬菌体健康人肝细胞T7 cDNA文库进行生物筛选时发现NS5ATP13可以与隐源性肝炎和肝癌患者血清蛋白结合, 提示NS5ATP13与病毒性肝炎以及肝细胞癌的发生与致病机制存在相关性。张黎颖等^[46]和党晓燕等^[47]利用表达谱芯片技术研究NS5ATP13的反式调节基因及应用抑制性消减杂交技术筛选NS5ATP13蛋白的上调基因, 结果发现NS5ATP13还可上调Ran结合蛋白2(RanBP2)、凋亡蛋白1抑制因子(IAP-1, MIHC, cIAP2)、细胞分裂周期蛋白23(CDC23)等相关蛋白, 另外NS5ATP13通过上调PKA和钾离子电压门控通道KQT样亚家族成员3, 也可能是抑制凋亡发生的机制之一。NS5ATP13可上调 α 2巨球蛋白及纤维连接蛋白(fibronectin, Fn)的表达。 α 2巨球蛋白可抑制胶原酶的活性, 与肝纤维化的形成机制有关, Fn促进纤维连接蛋白的表达、成纤维细胞及肝细胞等与胶原基质的黏附, 抑制细胞凋亡。NS5ATP13下调多种诱导细胞凋亡的信号分子如有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶3(MAP4K3)和有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶2(MAP3K2), 可能在肝细胞癌的发生机制中起到一定的作用。以上研究结果都提示NS5ATP13与病毒性肝炎、肝硬化和肝癌的发生发展关系密切。

8 其他

Warskulat等^[48]采用差异显示PCR方法鉴定了H4IIE大鼠肝细胞瘤细胞中渗透压调节基因NS5ATP13。H4IIE细胞和原代大鼠肝细胞在低渗条件下NS5ATP13 mRNA水平下调, 而高渗则可上调H4IIE细胞中NS5ATP13 mRNA水平, 但原代肝细胞中NS5ATP13 mRNA水平无改变。为进一

步研究渗透压信号通路,抑制Erk-1和Erk-2信号通路中上游的p38MAPK或者MAPKK,可以抑制NS5ATP13 mRNA表达,但不改变其渗透压的敏感性。笔者认为NS5ATP13可能是渗透信号通路的下游部分,在细胞核内受转录激活调节。

NS5ATP13一直以来作为核仁蛋白只在细胞内表达,但也有少数学者提出不同的观点。Kubler等^[33]在研究细胞表面蛋白激酶(cell-surface protein kinase, ecto-PK)底物细胞表面蛋白p120(ecto-p120)的过程中,使用质谱分析证明ecto-p120是ecto-NS5ATP13的同源蛋白,且采用NS5ATP13抗体在Hela、HMEC-1和NIH 3T3等多种细胞进行免疫染色均得到证实。研究人员通过快速抑制ecto-NS5ATP13的磷酸化导致细胞外游离 Ca^{2+} 水平的上升,而降低 Ca^{2+} 的浓度可使ecto-NS5ATP13的磷酸化水平恢复。 Ca^{2+} 依赖的ecto-NS5ATP13的磷酸化并不随其他ecto-PK底物磷酸化而改变。笔者认为,NS5ATP13是继核仁素之后,以往被认为仅在胞内表达,现被鉴定为细胞表面也能表达的磷酸化蛋白。

9 展望

综上所述,从NS5ATP13发现至今的20年中,在众多研究人员的共同努力下,目前对NS5ATP13的研究已取得了重要的成果。NS5ATP13作为重要的核仁磷酸化蛋白在rRNA合成以及核糖体发生中的作用已经比较清楚。但随着研究的不断深入,对NS5ATP13的功能亦有了新的认识,因此深入研究其在病毒性肝炎、肝硬化以及肝癌发生中的作用与分子机制成为当务之急,同时应进一步全面鉴定NS5ATP13的转录及其表达调控机制。相信随着NS5ATP13功能及其作用机制的逐渐阐明,必将对基础理论知识以及临床疾病的防治产生重要影响。

参考文献

- [1] Meier UT, Blobel G. A nuclear localization signal binding protein in the nucleolus[J]. *J Cell Biol*,1990,111:2235-2245.
- [2] Meier UT, Blobel G. Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm[J]. *Cell*,1992,70:127-138.
- [3] 刘妍,陆荫英,成军,等. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活基因的克隆化研究[J]. *解放军医学杂志*,2003,28:40-43.

- [4] Olson MO, Dundr M, Szebeni A. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities[J]. *Trends Cell Biol*,2000,10:189-196.
- [5] Huang S. Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus[J]? *J Cell Biol*,2002,157:739-741.
- [6] Melese T, Xue Z. The nucleolus: an organelle formed by the act of building ribosome[J]. *Curr Opin Cell Biol*,1995,7:319-324.
- [7] Pai CY, Chen HK, Sheu HL, et al. Cell-cycle-dependent alterations of a highly phosphorylated nucleolar protein p130 are associated with nucleologenesis[J]. *J Cell Sci*,1995,108:1911-1920.
- [8] Cairns C, McStay B. Identification and cDNA cloning of a *Xenopus* nucleolar phosphoprotein, xNopp180, that is the homolog of the rat nucleolar protein Nopp140[J]. *J Cell Sci*,1995,108:3339-3347.
- [9] Waggener JM, DiMario PJ. Two splice variants of Nopp140 in *Drosophila melanogaster*[J]. *Mol Biol Cell*,2002,13:362-381.
- [10] Kelly S, Singleton W, Wickstead B, et al. Characterization and differential nuclear localization of Nopp140 and a novel Nopp140-like protein in trypanosomes[J]. *Eukaryot Cell*,2006,5:876-879.
- [11] Lo SJ, Lee CC, Lai HJ. The nucleolus: reviewing oldies to have new understandings[J]. *Cell Res*,2006,16:530-538.
- [12] Lamond AI, Earnshaw WC. Structure and function in the nucleus[J]. *Science*,1998,280:547-553.
- [13] Matera AG. Of coiled bodies, gems, and salmon[J]. *J Cell Biochem*,1998,70:181-192.
- [14] Isaac C, Yang Y, Meier UT. Nopp140 functions as a molecular link between the nucleolus and the coiled bodies[J]. *J Cell Biol*,1998,142:319-329.
- [15] Bellini M, Gall JG. Coilin shuttles between the nucleus and cytoplasm in *Xenopus* oocytes[J]. *Mol Biol Cell*,1999,10:3425-3434.
- [16] Decatur WA, Fournier MJ. rRNA modifications and ribosome function[J]. *Trends Biochem Sci*,2002,27:344-351.
- [17] Kiss T. Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs[J]. *EMBO J*,2001,20:3617-3622.
- [18] Tollervey D, Kiss T. Function and synthesis of small nucleolar RNAs[J]. *Curr Opin Cell Biol*,1997,9:337-342.
- [19] Meier UT, Blobel G. NAP57, a mammalian nucleolar protein with a putative homolog in yeast and bacteria[J]. *J Cell Biol*,1994,127(6Pt1):1505-1514.
- [20] Ogg SC, Lamond AI. Cajal bodies and coilin--moving towards function[J]. *J Cell Biol*,2002,159:17-21.
- [21] Yang Y, Isaac C, Wang C, et al. Conserved composition of mammalian box H/ACA and box C/D small nucleolar ribonucleoprotein particles and their interaction with the common factor Nopp140[J]. *Mol Biol Cell*,2000,11:567-577.
- [22] Wang C, Query CC, Meier UT. Immunopurified small nucleolar ribonucleoprotein particles pseudouridylate rRNA independently of their association with phosphorylated Nopp140[J]. *Mol Cell Biol*,2002,22:8457-8466.
- [23] Verheggen C, Mouaikel J, Thiry M, et al. Box C/D small

- nucleolar RNA trafficking involves small nucleolar RNP proteins, nucleolar factors and a novel nuclear domain[J]. *EMBO J*,2001,20:5480-5490.
- [24] Yang Y, Meier UT. Genetic interaction between a chaperone of small nucleolar ribonucleoprotein particles and cytosolic serine hydroxymethyltransferase[J]. *J Biol Chem*,2003,278:23553-23560.
- [25] Baran V, Brochard V, Renard JP, et al. Nopp 140 involvement in nucleogenesis of mouse preimplantation embryos[J]. *Mol Reprod Dev*,2001,59:277-284.
- [26] Chen HK, Pai CY, Huang JY, et al. Human Nopp140, which interacts with RNA polymerase I: implications for rRNA gene transcription and nucleolar structural organization[J]. *Mol Cell Biol*,1999,19:8536-8546.
- [27] Tsai YT, Lin CI, Chen HK, et al. Chromatin tethering effects of hNopp140 are involved in the spatial organization of nucleolus and the rRNA gene transcription[J]. *J Biomed Sci*,2008,15:471-486.
- [28] Thiry M, Cheutin T, Lamaye F, et al. Localization of Nopp140 within mammalian cells during interphase and mitosis[J]. *Histochem Cell Biol*,2009,132:129-140.
- [29] Prieto JL, McStay B. Recruitment of factors linking transcription and processing of pre-rRNA to NOR chromatin is UBF-dependent and occurs independent of transcription in human cells[J]. *Genes Dev*,2007,21:2041-2054.
- [30] Jin Y, Yu J, Yu YG. Identification of hNopp140 as a binding partner for doxorubicin with a phage display cloning method[J]. *Chem Biol*,2002,9:157-162.
- [31] Kim YK, Lee WK, Jin Y, et al. Doxorubicin binds to unphosphorylated form of hNopp140 and reduces protein kinase CK2-dependent phosphorylation of hNopp140[J]. *J Biochem Mol Biol*,2006,39:774-781.
- [32] Kim YK, Jin Y, Vukoti KM, et al. Purification and characterization of human nucleolar phosphoprotein 140 expressed in *Escherichia coli*[J]. *Protein Expr Purif*,2003,31:260-264.
- [33] Kübler D. Ecto-protein kinase substrate p120 revealed as the cell-surface-expressed nucleolar phosphoprotein Nopp140: a candidate protein for extracellular Ca^{2+} -sensing[J]. *Biochem J*,2001,360(Pt3):579-587.
- [34] Li D, Meier UT, Dobrowolska G, et al. Specific interaction between casein kinase 2 and the nucleolar protein Nopp140[J]. *J Biol Chem*,1997,272:3773-3779.
- [35] Kim YK, Lee KJ, Jeon H, et al. Protein kinase CK2 is inhibited by human nucleolar phosphoprotein p140 in an inositol hexakisphosphate-dependent manner[J]. *J Biol Chem*,2006,281:36752-36757.
- [36] Lee WK, Lee SY, Kim WI, et al. Characterization of the InsP6-dependent interaction between CK2 and Nopp140[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2008,376:439-444.
- [37] Miao LH, Chang CJ, Tsai WH, et al. Identification and characterization of a nucleolar phosphoprotein, Nopp140, as a transcription factor[J]. *Mol Cell Biol*,1997,17:230-239.
- [38] Chiu CM, Tsay YG, Chang CJ, et al. Nopp140 is a mediator of the protein kinase A signaling pathway that activates the acute phase response alpha1-acid glycoprotein gene[J]. *J Biol Chem*,2002,277:39102-39111.
- [39] Montanaro L, Treré D, Derenzini M. Nucleolus, ribosomes, and cancer[J]. *Am J Pathol*,2008,173:301-310.
- [40] Hwang YC, Lu TY, Huang DY, et al. NOLC1, an enhancer of nasopharyngeal carcinoma progression, is essential for TP53 to regulate MDM2 expression[J]. *Am J Pathol*,2009,175:342-354.
- [41] Isaac C, Marsh KL, Paznekas WA, et al. Characterization of the nucleolar gene product, treacle, in Treacher Collins syndrome[J]. *Mol Biol Cell*,2000,11:3061-3071.
- [42] Lin CI, Yeh NH. Treacle recruits RNA polymerase I complex to the nucleolus that is independent of UBF[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2009,386:396-401.
- [43] Renvoisé B, Colasse S, Burlet P, et al. The loss of the snoRNP chaperone Nopp140 from Cajal bodies of patient fibroblasts correlates with the severity of spinal muscular atrophy[J]. *Hum Mol Genet*,2009,18:1181-1189.
- [44] 陈京龙, 魏红山, 刘霞, 等. 噬菌体表面展示技术筛选隐性肝炎血清蛋白结合蛋白[J]. *世界华人消化杂志*,2006,14:3509-3512.
- [45] 刘志英, 魏红山, 张黎颖, 等. 应用噬菌体展示技术筛选原发性肝癌血清结合蛋白[J]. *世界华人消化杂志*,2007,15:2914-2917.
- [46] 张黎颖, 邓红, 成军, 等. 应用表达谱芯片技术研究 NS5ATP13 的反式调节基因[J]. *世界华人消化杂志*,2004,12:2757-2761.
- [47] 党晓燕, 成军, 刘妍, 等. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式启动基因NS5ATP13的克隆化研究[J]. *胃肠病学和肝病杂志*,2003,12:260-262.
- [48] Warskulat U, Hammermann R, Häussinger D. Anisoosmotic regulation of the Nopp140 mRNA in H4IIE rat hepatoma cells and primary hepatocytes[J]. *FEBS Lett*,1999,452:259-262.

收稿日期: 2011-04-21