

微丝相关新基因 *hHBrk1* 的克隆及功能鉴定

徐勤枝, 丁新民, 段瑞峰, 周平坤, 项晓琼, 张开泰*, 吴德昌*

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 微丝相关新基因 *hHBrk1* 被克隆. *hHBrk1* 基因位于 3p25.3-24.1 区, 由 3 个外显子和 2 个内含子组成. Northern 印迹杂交结果表明 *hHBrk1* 基因有 2 个转录本, 在人体 12 种组织中均有表达, 尤以心肌和骨骼肌为著. *hHBKR1* 蛋白含 75 个氨基酸, 分子量约 9 kD, 与动植物界相关蛋白的同源性达 98%~35%. *hHBKR1* 蛋白定位于细胞浆, 在细胞运动的最前沿富集; 在有丝分裂期, *hHBKR1* 蛋白定位于细胞膜皮质区和缢缩环. 实验结果提示, *hHBKR1* 蛋白可能通过调控 F-肌动蛋白的聚合而参与调控细胞运动、分化等基础生命活动.

关键词 微丝, *Brk1*, 细胞运动

中图分类号 Q78

Cloning and Identification of a Novel Gene *hHBrk1*, Encoding a F-actin Associated Protein Highly Conserved in Animals and Plants

XU Qin-zhi, DING Xin-min, DUAN Rui-feng, ZHOU Ping-kun, XIANG Xiao-qiong, ZHANG Kai-tai*, WU De-chang*

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract Reorganization of cortical actin filaments plays a critical role in cell movement and pattern formation. It has been identified that the *hHBrk1* (human homology of *Brick1*) gene was localized on chromosome 3p and spanned over 11 kb comprising three exons and two introns. Northern blot analysis demonstrated two transcripts of *hHBrk1* gene in most of the human tissues and relatively higher level of expression was observed in adult heart and skeletal muscle tissues. *hHBrk1* encodes a small novel protein of 75 amino acids residues. Database searches showed that *hHBKR1*-related proteins was highly conserved from mammals to plants. Ectopically expressed GFP-*hHBKR1* fusion protein colocalized with F-actin in mitotic cells. It was suggested that *hHBKR1* was a F-actin related protein. *hHBKR1* might be involved in actin cytoskeletal organization by polymerizing F-actin.

Key words actin, *Brk1*, cell movement

肿瘤细胞的浸润、转移与微丝及其相关蛋白有关, 微丝的异常聚合可增强肿瘤细胞的运动能力^[1]. *Brick1* (*Brk1*) 是新近在玉米表皮细胞中发现的微丝相关基因, *Brk1* 基因隐性突变后, 玉米表皮细胞呈现去分化现象, 此病变系微丝蛋白 (F-肌动蛋白, F-actin) 聚合减少所致. Northern 印迹杂交显示, *Brk1* 在分裂活跃的玉米组织高表达^[2]. 无独有偶, 本实验室应用抑制性消减杂交技术, 从人支气管上皮恶性转化细胞系 BERP35 中筛选到人 *Brk1* 同源基因的表达序列标签, 命名为 *hHBrk1* (human homology of *Brick1*). 利用基因芯片技术发现, *hHBrk1* 基因在肺癌组织中的表达丰度高于配对的正常肺组织^[3]. 为探讨 *hHBrk1* 基因的功能, 应用快速扩增

cDNA 末端 (rapid amplification cDNA end, RACE) 的方法克隆了 *hHBrk1* 基因的全长 cDNA, 应用激光共聚焦技术对 *hHBKR1* 蛋白进行了细胞亚定位分析. 结果提示, *hHBKR1* 蛋白为微丝相关蛋白, 可能参与微

收稿日期: 2003-11-24, 接受日期: 2004-02-11

国家重点基础研究计划“973”基金资助 (No. G199851207)

* 联系人. Tel: (010) 66932292, Fax: (010) 68183899

E-mail: xuqz@nic.bmi.ac.cn

Received: November 24, 2003; Accepted: February 11, 2004

Supported by a State Key Program of Basic Research of China (No. G199851207)

* Corresponding authors. Tel: (010) 66932292, Fax: (010) 68183899

E-mail: zhangkt@nic.bmi.ac.cn

丝的聚合,从而在肿瘤的浸润、转移过程中发挥作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人永生化支气管上皮细胞 BEP2D 由美国 C. C. Harris 教授惠赠,BERP20、BERP35 细胞为 BEP2D 细胞经 1.5 Gy 粒子照射后连续培养的第 20 和 35 代细胞。35 代细胞接种裸鼠成瘤,病理类型为高分化鳞癌。LHC-8 无血清培养液 (Biofluids Inc. USA), 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养。具有高转移潜能的大细胞肺癌细胞株 95D 购自解放军总医院病理科,常规细胞培养。

1.2 试剂与载体

Prime-a-gene 随机标记试剂盒购自 Promega 公司; [³²P] dCTP 购自北京亚辉生物医学工程公司; Human Fetal Brain Marathon-Ready™ cDNA、Human adult MTN™ Blot 和 pEGFP-C1 载体购自 CLONTECH 公司; TaKaLa LA Taq with GC buffer 和 EX Tag 酶购自宝生物公司; pGEM-T easy vector kit 购自 Promega 公司; TRIzol、Lipofectin 购自 Invitrogen 公司; PCR 纯化试剂盒、T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; TRITC 标记的鬼笔环肽购自 Sigma 公司,限制性内切酶购自 BioLabs 公司。引物合成及序列测定由上海博亚生物技术公司完成。

1.3 序列数据获取及分析

本研究采用的序列数据均取自 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>); 多序列比对采用 Clustal W (ver. 1.82) 程序; 序列同源比对采用 GenBank 中的 Blast 程序; 序列格式转换采用 DNASTAR 公司的 EdiSeq 软件。

1.4 Northern 印迹杂交

收获永生化 BEP2D 细胞、BERP20 和恶转 BERP35 细胞,异硫氰胍一步法提取细胞总 RNA,取 15 μg 总 RNA,1% 甲醛变性胶电泳后转膜,与 [³²P] dCTP 标记的 *hHBrk1* 基因探针杂交, X 线胶片于 -70 °C 放射自显影 2~3 d,经显影、定影后分析杂交信号,以看家基因 GAPDH 探针的杂交信号为对照。

1.5 RACE

引物设计原则、PCR 体系及循环参数参阅 CLONTECH 的用户手册。初级 PCR 产物 1:50 稀释后用做巢式 PCR 的模板。PCR 仪为 PE GENEamp systems 2400。PCR 结果用 1.5% 琼脂糖凝胶鉴定。PCR 产物克隆至 pGEM-T 载体后测序,序列测定由

上海博亚生物技术公司完成。5' RACE 引物: GSP-a, 5' > agc ctt cag ctc ctt cct ttc tcc < 3'; NGSP-a, 5' > agc agc acg gca ctg ttc tag gt < 3'。3' RACE 引物: GSP-s, 5' > taa cgt cgt ttc caa cgg ttc ctc < 3'; NGSP-1, 5' > tca cag cca aaa gcc tgg gac tc < 3'; NGSP-2, 5' > gac tgt gat tat ggt ggg gag a < 3'。PCR 循环参数: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s; 94.0 °C 5 s, 68.0 °C 2 min, 25 个循环。

1.6 构建 pEGFP-hHBrk1 真核表达载体

参照 *hHBrk1* 基因 cDNA 序列设计引物,分别引入 *Bgl* 和 *Sal* 酶切位点,具体序列为 P1: 5' > aga tct atg gcg gga cag gag gat < 3', P2: 5' > gtc gac tta ggt gag tgt ctc acc < 3'。以人胎脑 cDNA 文库为模板,PCR 测序为: 94 °C 变性 5 min 后,进入 30 个循环 (94 °C 5 s; 60 °C 30 s; 72 °C 30 s), 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。PCR 产物纯化后,与 pGEMT Easy 载体连接成重组子,命名为 pGEM-hHBrk1。测序确证序列无误后,用 *Bgl* 和 *Sal* 双酶切 pEGFP-C1 和 pGEM-hHBrk1,将从后者切下的 230 bp 片段割胶回收后与 pEGFP-C1 连接,16 h 连接过夜后转化 *E. coli* DH5 感受态,菌落 PCR 鉴定有片段插入后,测序鉴定目的基因同框插入,质粒命名为 pEGFP-hHBrk1。

1.7 真核表达载体纯化及细胞转染

pEGFP-hHBrk1 和 pEGFP-C1 的纯化按说明书进行。pEGFP-hHBrk1 和 pEGFP-C1 载体的转染方法,参阅 Lipofectin 说明。转染 48 h 后倒置荧光显微镜下观察 *hHBrk1* 蛋白在 95D 细胞中亚定位。鬼笔环肽标记 95D 细胞微丝的方法参阅文献[4]。采用激光共聚焦技术检测 GFP-hHBKR1 融合蛋白与微丝的共定位。共聚焦激光扫描显微镜为 Radiance 2100 型 (Bio Rad 公司), 激发波长分别为 488 nm 和 543 nm。

2 结果

2.1 hHBrk1 基因的 Northern 印迹杂交

杂交结果显示, *hHBrk1* 基因有 2 个转录本,分别为 1.4 kb 和 1.1 kb。 *hHBrk1* 基因在 12 种成人组织均有表达,成人心脏、骨骼肌组织的表达丰度高于其余组织 (Fig. 1 A)。 *hHBrk1* 基因在 BEP2D 细胞、BERP20 及 BERP35 三个细胞系中的表达丰度逐次上升。经 GAPDH 基因校正后, *hHBrk1* 基因在恶转细胞 BERP35 中的表达丰度为 BEP2D 细胞的 1.9 倍 (Fig. 1B)。

2.2 hHBrk1 基因 RACE 测定

5' RACE 和 3' RACE 初级 PCR 产物为 500~2 kb 的弥散条带; 巢式 PCR 产物凝胶电泳显示, 5' RACE

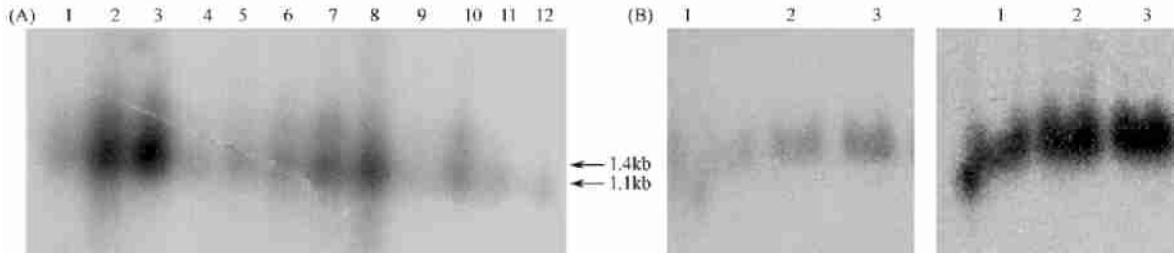


Fig. 1 Expression of *hHBrk1* in normal human tissues and cell lines
 (A) Adult tissues. Lanes 1—12: brain, heart, skeletal muscle, colon, thymus, spleen, kidney, liver, small intestine, placenta, lung, peripheral blood leukocyte; (B) Cell lines (Left: *hHBrk1*, Right: GAPDH). Lanes 1—3: BEP2D, BERP20, BERP35

PCR 产物为 300 bp 的特异条带, 3 RACE 的 PCR 产物为 450 bp, 其后隐约可见一 650 bp 的条带. 根据 GenBank 中的 EST (GenBank Accession No: BM669309) 序列, 重新设计 3 RACE 引物 NGSP-2, 循环数增加至 45 个循环, 可见特异性的 300 bp 左右的电泳条带. PCR 产物纯化后克隆至 T 载体, DNA 测序分别得到 *hHBrk1* 基因的 5' cDNA 和 3' cDNA 序列, 序列拼接后证实 *hHBrk1* 基因的 cDNA 全长 1197 bp. 测序结果证实, *hHBrk1* 基因 3' 端存在剪切, 在 *hHBrk1* 基因的 cDNA 的 930 bp 处插入 20 个 polyA, 致使出现一个 1.1 kb 的小转录本 (Fig. 2A). 该序列已递交至 GenBank, 序列号为 AY148219 和 AY148220.

2.3 hHBrk1 基因及其编码蛋白的生物信息学分析

hHBrk1 基因位于染色体 3p25.3-24.1 区, 含 3 个外显子和 2 个内含子. 外显子与内含子交界处的剪接序列符合“AG”及“GT”的规律 (见 Fig. 2B). *hHBrk1* 基因编码 75 个氨基酸蛋白, 分子量约 8.7 kD. hHBRK1 蛋白家族 (注: 除 hHBRK1 和 BRK1 外, 其余种属氨基酸序列均为根据 cDNA、EST 或基因组序列推导得到) 在动植物中的同源性达 98% ~ 35%, 是小分子蛋白质, 在动、植物界高度保守 (Fig. 3). hHBRK1 与家鼠的同源蛋白只有一个氨基酸的差异, 同源性达 98%; 与 BRK1 蛋白有 35% 的同源性. hHBRK1 蛋白与 HSPC300 蛋白 (GenBank 序列号: AAF28978) 的 5~79 个氨基酸残基同源性为 100%. HSPC300 蛋白为一功能未明确的人造血干/祖细胞蛋白, 克隆自 CD34+ 造血干细胞, 分子量约为 12 kD. 与 *hHBrk1* 基因相比, *HSPC300* 基因的 5' 端非翻译区的多个碱基突变导致翻译起始点上移了 12 个碱基. *HSPC300* 基因在终止密码子“TGA”之前缺失了一个“C”, 致终止密码子被破坏, 而继续编码了 31 个氨基酸, 其中第 5~79 位的氨基酸序列与 hHBRK1 蛋白完全相同. hHBRK1 蛋白家族保守性很强, 其功能域尚未明确.

(A)

```

gagggcctg
9 tagggctggggcgctgagcagctgctcttctcagggggggcc
54 atggcgggacaggaggatccgggtgcagcgggagattaccaggac
M A G Q E D P V Q R E I H Q D
99 tgggctaaccgggagtagatcaatcaccagcagcatcaag
W A N R E Y I E I I T S S I K
144 aaaatgcagactttctcaactgcttcgatatgtcttctgctca
K I A D F L N S F D M S C R S
189 agacttgcacaactaaacgagaattgcagacccttgaacggaga
R L A T L N E K L T A L E R R
234 atagagtagacttgaagctcgggtgacaaaagggtgagacactacc
I E Y I E A R V T K G E T I T
279 tagaacagtgcgctgctgctgctgggaagttgctttacacaacac
324 aggccacatgggaaaggcccccagcagccttcagctctctcttctc
369 tcctraaagagacaacagggttattctgtttttcttttttcaaaa
414 agtgggcttgggctcctggcctcctggggtggtgggtggatgt
459 ggggaagaagtgcagaggaaccgttggaaacagcatttagcatttt
504 acctttcagtaacatlltatacactcacttggcaatglatlltga
549 gacattcacagccaaaagcctgggactctlltggaaaggtcctcol
594 cacctctatcttctttctctctctctcaaaccttctctaaagtt
639 ctcattgctcttgcactgctctctgtaacagctcttctctctctc
684 ccacctllgggtgggaagtgccgggagctcctgggtcaagacactca
729 tgccttgccaatgltggtgccagagaatgltgltgcaaacccacc
774 agttcttgtgtgatttggagaggtcaagccaggcccccacttgg
819 ctgaaaggacatttccagactttctctctctgtaacttggagttg
854 ctatgcctcctcaatllccctaaataaacctcctcaactllt*latcl
909 gactgctgtglatllatgggtgggagaggagctagagatgggttcac
954 ttattgcaagagaatgtaatacatggcgattattcttaacataa
999 aactttcagatgtagctgtttgattcaaaagcctaggtggcttacc
1044 agcccaaglcceccatglttggactllcagctgactagctcactcl
1089 gggaaatcatttggcactcagacatlltaaccaagatlltaactag
1134 taggcatgttaaacctcaataaaacatacagcattgaaatcagaaa
1179 aaaaaaaaaaaaaaaaaa
  
```

(B)

Sequence around exon-intron boundaries	
Exon 1 (171 bp)	5'-UTRCGITCG gtcgpc
Exon 2 (84 bp)	tctcag GATATG.....GGGTGA gtagt
Exon 3 (922 bp)	tcacag GTGACA3' UTR

Fig. 2 Characterization of *hHBrk1* gene
 (A) DNA sequence of human *hHBrk1* gene and its corresponding predicted protein sequence, the standard one letter amino acid code is used. The start codon, stop codon and “aataa” are marked in boldface type. The alternative splicing site of *hHBrk1* gene is indicated by *;
 (B) Exon-intron boundaries of the *hHBrk1* gene. Exon sequences are shown by large caps, while intron sequences by small caps

现类似微丝蛋白 F-actin 的周期性变化,定位于细胞皮质区及缢缩环.应用鬼笔环肽标记微丝显示,95D 细胞的微丝排列紊乱,应力纤维缺如,主要分布在细胞的皮质区,并在细胞运动的前沿富集.利用激光共聚焦显微镜发现,在细胞运动的最前沿,hHBRK1 蛋白与微丝蛋白共定位,呈现桔黄色.结果提示,hHBRK1 为一相关蛋白,可能参与细胞的运动等生理或病理过程.

3 讨论

hHBRK1 基因是本实验室通过抑制性消减杂交手段从人支气管上皮细胞恶性转化株 BERP35 中克隆到的差异表达基因^[3].*hHBRK1* 基因在人体的多种组织均有表达,且 hHBRK1 相关蛋白在动、植物界高度保守,提示 hHBRK1 蛋白家族参与细胞的基础生命活动.hHBRK1 的玉米同源蛋白 BRK1 已于 2002 年鉴定, Frank^[2,5] 等的研究结果显示 BRK1 蛋白突变后,与野生型相比,玉米的表皮细胞出现特异性去分化改变:如表皮细胞的叶突消失,特化结构如表皮毛变短、顶端变钝,气孔的副卫细胞的极性化分裂现象消失.深入研究表明玉米表皮细胞的上述改变与细胞皮质区的微丝蛋白 F-肌动蛋白的聚合减少有关,表明 BRK1 参与 F-肌动蛋白的聚合过程.本研究结果与 Frank 等的报道一致.利用 GFP 荧光报告载体,首次发现 GFP-hHBRK1 融合蛋白在细胞间期定位于细胞胞浆,而在分裂期 GFP-hHBRK1 融合蛋白在缢环和细胞皮质区富集. Pelhan 和 Chang 的研究发现,在真核生物酵母的有丝分裂期,缢环是肌动蛋白聚合的活跃区^[6],提示 hHBRK1 蛋白为 F-肌动蛋白相关蛋白,可能参与肌动蛋白的聚合作用,调控细胞迁移.

微丝的聚合过程分为 3 个阶段:即成核期、生长期以及平衡期,成核期是微丝聚合的限速过程. WASP/Scar/WAVE 蛋白家族是目前研究较为关注的微丝成核促进因子,功能定位于细胞片状伪足,参与细胞的运动^[7,8]. Eden^[9] 等应用亲和层析的方法,从牛脑中分离出 WAVE1 复合体,发现此复合体为一五聚体,分别与人 WAVE1、PIP121、Nap 125、HSPC300 和 Abi2 蛋白同源.细胞外信号传递至此复合体时,后者反式激活,释放 PIP121、Nap 125 及 Abi2, WAVE1 与 HSPC300 形成亚二聚体,以 Arp2/3 复合物依赖的方式参与微丝蛋白组装的成核期. Eden 等结果表明,牛 HSPC300 同源蛋白分子量为 ~9 kD,蛋白质谱分析显示 12 个肽段涵盖了人 HSPC300 序列的 45%. hHBRK1 蛋白的分子量为 8.7 kD, HSPC300 蛋

白的分子量为 12 kD,故而与牛 WAVE1 结合的蛋白实为 hHBRK1 的同源蛋白. Eden 等的实验结果证实了我们的推论:hHBRK1 蛋白可能通过参与 WAVE1 介导的微丝成核作用,调节细胞的运动.

Northern 杂交证实,*hHBRK1* 基因在 12 种正常成人组织中均有表达,在骨骼肌和心肌的表达丰度较高.在骨骼肌和心肌中的高表达,这与 WAVE 基因的表达谱存在冲突. WAVE 家族含 3 个成员: WAVE1、WAVE2 和 WAVE3,其中 WAVE1 和 WAVE3 仅在脑组织中表达, WAVE2 的表达谱相对较广,在除骨骼肌外的各个组织均有表达^[10]. 此冲突提示 hHBRK1 在骨骼肌中存在不依赖于 WAVE 1 的功能,这有待进一步研究. 本研究结果提示 hHBRK1 蛋白可能以调控 F-肌动蛋白成核作用的方式参与细胞运动,进一步的实验正在进行中.

参考文献 (References)

- Helfman D M, Pawlak G. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Opin Gen Devel*, 2001, **11**: 41 ~ 47
- Frank M J and Smith L G. A small, novel protein highly conserved in plants and animals promotes the polarized growth and division of maize leaf epidermal cells. *Curr Biol*, 2002, **12**: 849 ~ 853
- 范保星, 张开泰, 谢玲, 项晓琼, 吴德昌. 粒子诱发人支气管上皮细胞恶性转化不同时期差异表达基因 cDNA 文库的构建. 癌变、畸变、突变 (Fan Bao-xing, Zhang Kai-tai, Xie Ling, Xiang Xiao-qiong, Wu De-chang. Construction of differentially expressed cDNA libraries from disseminatory malignant transformation human bronchial epithelial cells induced by alpha-particle radiation. *Carcinogenesis Teratogenesis Mutagenesis*), 2002, **1**: 1 ~ 5
- Manelli-Oliveira R, Machado-Santelli G M. Cytoskeletal and nuclear alterations in human lung tumor cells: a confocal microscope study. *Histochem Cell Biol*, 2001, **115**: 403 ~ 411
- Frank M J, Cartwright H N, Smith L G. Three Brick genes have distinct functions in a common pathway promoting polarized cell division and cell morphogenesis in the maize leaf epidermis. *Development*, 2003, **130**: 753 ~ 762
- Pollard T D, Blanchoin L, Mullins R D. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2000, **29**: 545 ~ 576
- Takenawa T, Miki H. WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci*, 2001, **114**: 1801 ~ 1809
- Hahne P, Sechi A, Benesch S, Small J V. Scar/WAVW is localized at the tips of protruding lamellipodia in living cells. *FEBS Lett*, 2001, **492**: 215 ~ 220
- Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov A V, Mann M, Kirschner M W. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature*, 2002, **418**: 790 ~ 793
- Suetsugu S, Miki H, Takenawa T. Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulation molecules which associates with the Arp2/3 complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **260**: 296 ~ 302