

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.13.001

HDAC2 磷酸化区域突变体的构建及其对小鼠成纤维细胞增殖的影响*

肖 勇, 黄 宏, 郭 韡, 邢 伟, 李向云, 袁培淞, 徐 祥[△]

(第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所/创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室第一研究室, 重庆 400042)

[摘要] **目的** 应用片段缺失突变技术鉴定 HDAC2 自身磷酸化对其 Sumo-E3 连接酶活性及蛋白质翻译的影响。**方法** 以前期获得的鼠源性 HDAC2 Sumo-E3 连接酶结构域基因片段为模板, 设计片段缺失突变引物, 经长片段重叠延伸 PCR 技术扩增获得片段缺失突变基因片段, 后于 Top10 大肠杆菌中自然连接扩增获得 pcDNA3.1/HDAC2-Sumo-E3 连接酶磷酸化结构域缺失突变的真核表达载体。然后将载体转染于 L929 成纤维细胞瞬时过表达突变基因, 再经翻译反应性荧光素酶报告基因实验和 Western-blot 鉴定 HDAC2 自身磷酸化修饰对 Sumo-E3 连接酶介导的报告基因和靶蛋白质表达的影响。最后通过 MTT 实验检测 HDAC2 自身磷酸化修饰对其 Sumo-E3 连接酶介导的 L929 细胞增殖的影响。**结果** 成功构建获得磷酸化修饰完全缺失的 HDAC2 片段缺失突变体 pcDNA3.1/HDAC2-Sumo-E3(DEL 394-424AA)。LUC 报告基因检测结果显示, DEL 394-424AA 片段缺失突变体促进 LUC 翻译是对照组的 4.24 倍, 且能显著促进靶蛋白 ODC 和 c-Myc 的表达, 以及 L929 小鼠成纤维细胞的增殖效应。**结论** HDAC2 自身磷酸化修饰对 HDAC2 Sumo-E3 连接酶活性及其调节的蛋白质翻译和细胞增殖作用起负性调节作用。

[关键词] HDAC2; Sumo-E3 连接酶; 磷酸化修饰; 突变体构建; 成纤维细胞**[中图分类号]** Q71; Q78**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)13-1729-03**Construction of phosphorylation site mutant of HDAC2 and its impact on proliferation of mouse fibroblasts***Xiao Yong, Huang Hong, Guo Wei, Xing Wei, Li Xiangyun, Yuan Peisong, Xu Xiang[△]

(First Research Room, State Key Laboratory of Trauma, Burns, and Combined Injury/Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

[Abstract] **Objective** To determine the effect of autophosphorylation of HDAC2 on the Sumo-E3 ligase activity and cap-dependent protein translation by the segment-deletion mutation technique. **Methods** By using the pcDNA3.1/HDAC2-Sumo-E3 vector expressing ligase domain of mouse HDAC2 as template, primers were designed to construct the segment-deletion mutation by SOE PCR (gene splicing by overlap extension PCR), then the segment was ligated and amplified in Top10 strain of E. coli to get the pcDNA3.1/HDAC2-Sumo-E3(DEL394-424AA) vector that expressing the ligase domain of mouse HDAC2 with 394-424AA deletion. The pcDNA3.1/HDAC2-Sumo-E3(DEL394-424AA) vector was then transiently over-expressed in L929 fibroblast, followed by assessment of cap-dependent translation by luciferase reporter gene and target protein expression by Western blot. At last, the effect of HDAC2 phosphorylation on Sumo-E3 ligase activity-induced proliferation of L929 cell line was determined by MTT assay. **Results** the pcDNA3.1/HDAC2-Sumo-E3(DEL394-424AA) vector that completely abolished phosphorylation of this segment of HDAC2 was successfully constructed. And when transiently over-expressed in L929 mouse fibroblast, the luciferase activity was increased to 4.24 fold that of control, and expression of the target gene ODC and c-Myc were significantly elevated, and cell proliferation was significantly accelerated. **Conclusion** Autophosphorylation of HDAC has the negative regulation effect on the Sumo-E3 activity of HDAC2 and downstream cap-dependent protein translation and cell proliferation.

[Key words] histone deacetylases; Sumo-E3 ligase; phosphorylation; mutation construction; fibroblasts

组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)是一类锌离子依赖性金属蛋白酶,是参与表观遗传乙酰化修饰调控的关键蛋白酶,特别是对组蛋白乙酰基团的去除在染色体重塑调控中起重要作用^[1]。HDAC2是由488个氨基酸构成的肽链,正常表达于多种器官与组织,特别表达于如愈合创面的肉芽组织和增殖性肠腺细胞等增殖度相对活跃的组织 and 细胞中,在维持正常组织器官细胞增殖和存活及抑制分化方面起重要作用^[2]。已证实,HDAC2去乙酰化结构域位于其N端的第100~323个氨基酸内。同时,研究还发现,在其羧基端还含有一个独立的不依赖于其去乙酰化酶活性的 Sumo-E3 连接酶功能结构域^[3]。然而关于 HDAC2 的 Sumo-E3 连接酶活性的功

能、结构和生物学意义等仍不清楚。另外,分析发现 HDAC2 的磷酸化修饰区域正好位于其 Sumo-E3 连接酶的结构域内^[4],且磷酸化修饰和 Sumo 修饰之间存在密切的联系^[5-6]。为此,推测 HDAC2 的自身磷酸化在其 Sumo-E3 连接酶功能的发挥中起重要的调节作用,但有待证实。为证实这一推测,本研究在前期获得的 HDAC2 Sumo-E3 连接酶功能结构域的基础上^[7],进一步运用片段缺失突变技术获得 HDAC2 Sumo-E3 连接酶磷酸化区域缺失的突变体,鉴定 HDAC2 自身磷酸化对其 Sumo-E3 连接酶的调节作用。

1 材料与方法**1.1 主要材料** pcDNA3.1/HDAC2(DEL100-322AA)质粒

和 L929 细胞由本实验室保存。5 × Phusion High-Fidelity DNA Polymerase 购自 Thermo 公司, 10 MM dNTPs 购自申能博彩生物科技有限公司。DpnI 等酶购自宝生物工程(大连)有限公司, Annealing Buffer 购自 Beyotime 公司, 胎牛血清 DMEM 高糖培养基购自 Gibco 公司, Lipofectamine 2000 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司, LUC 报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司。ODC 和 C-MYC 抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 引物设计 设计引物(Ft Rs 或 Rt Fs), 每对引物完成突变体 DNA 一条单链的扩增。FT: 5'-CCA GAG GAT GCT GTT CAT GAA GAC GAG GAT GAA GGT GAA GGA GGT-3'; RS: 5'-GTC TTC ATG AAC AGC ATC CTA-3'; FS: 5'-GAG GAT GAA GGT GAA GGA GGT-3'; RT: 5'-ACC TCC TTC ACC TTC ATC CTC GTC TTC ATG AAC AGC ATC CTA-3'。

1.3 突变体的构建 取两管 0.12 μL pcDNA3.1/HDAC2 (DEL100-322AA) 为模板, 分别于其中一管中加入对应的 FT 1 μL 和 RS 1 μL, 另一管中加入对应的 FS 1 μL 和 RT 1 μL, 然后各管分别加入 10 MM dNTPs 0.4 μL, 5 × Phusion High-Fidelity Buffer 4 μL, DMSO 0.6 μL, Phusion DNA Polymerase 0.2 μL, 最后加入双蒸水 12.68 μL 补足 20 μL 体系。放入 PCR 仪中设置 98 °C 预变性 30 s; 98 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 6 min, 共 35 个循环; 72 °C 终循环 10 min。扩增后的每管中目的片段是一条单链。将对应的两管各取 10 μL, 加入 5 × Annealing Buffer for DNA oligos 10 μL, 最后加入 20 μL ddH₂O 补足反应体系至 50 μL。体系加好后在沸水中煮 5 min, 然后待其自然冷却过夜退火。最后用甲基化切割酶 DpnI 去除带有甲基化修饰的模板, 在退火产物中加入 DpnI 酶 1 μL, 10 × T buffer 6 μL, 用 3 μL ddH₂O 补足体系至 60 μL。体系加好后放入 37 °C 水浴锅中酶切 5 h。将构建好的载体进行乙醇沉淀纯化后, 转入 TOP10 感受态菌中铺苜苣板筛选。挑取单克隆扩增菌液 40 mL, 然后用质粒抽提试剂盒(购自北京百泰克生物技术有限公司)进行质粒抽提, 并进行浓度的测定, BamH I 和 Xho I 双酶切初步鉴定后, 测序确定。

1.4 荧光素酶报告基因检测磷酸化区域突变体对蛋白质翻译的影响 分别将荧光素酶报告基因同空载体、野生型和构建好的片段突变体进行共转染入 L929 细胞, 转染方法见 Invitrogen 公司的 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒说明书, 48 h 后裂解细胞, 加入荧光素酶底物(购自 Promega 公司), 测定化学发光值, 作为评价荧光素酶翻译水平的指标。

1.5 Western blot 检测 L929 细胞中 HDAC2 Sumo-E3 连接酶介导的靶蛋白的表达 采用以上相同的转染方法将空载体、野生型和构建好的片段突变体转染入 L929 细胞以后, 培养 48 h, 使用细胞裂解液提取各组细胞总蛋白, 用考马斯亮蓝染色法测定蛋白含量, 取 50 μg 蛋白在 10% SDS-PAGE 胶上电泳, 后转移至 PVDF 膜上, 用 TBST 配置 5% 脱脂奶分别加入一抗 c-Myc, ODC 抗体(1:500) 4 °C 孵育过夜, 二抗(1:10 000) 常温孵育 4 h, 胶片曝光显影, 以 β-actin 为内参照进行免疫印迹检测。

1.6 MTT 检测突变体对细胞的影响 将 L929 细胞培养后按照每孔 0.4 × 10⁴ 个细胞铺板, 将空载体、野生型和构建好的片段突变体转染入细胞, 待培养细胞密度至 70% ~ 80% 以后, 加入 50 μL MTT(5 mg/mL) 继续培养 4 h, 然后终止培养, 小

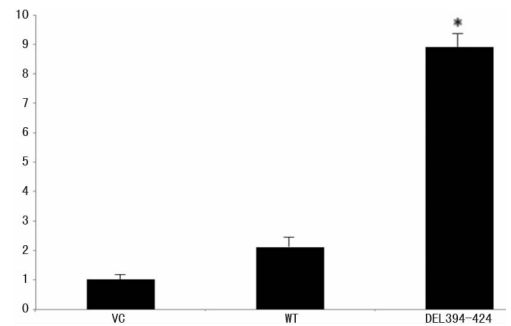
心吸弃上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 置于摇床上低速摇 10 min, 使结晶物充分溶解。采用比色分析法, 应用自动酶联免疫检测仪测定波长 490 nm 处的各孔吸光值。

1.7 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件处理数据, 各分组所得计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较用 *t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 磷酸化区域缺失突变体的构建与鉴定 用 BamH I 和 Xho I 对 pcDNA 3.1/HDAC2 (DEL100-322AA) 和 pcDNA 3.1/HDAC2(DEL-PSD)(DEL 394-424) 进行双酶切后, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析所得到的酶切片段分别是 5.5 kb pcDNA 3.1 载体片段、800 bp 的模板片段及 700 bp 的片段缺失突变体片段, 同预期的片段大小一致。

2.2 荧光素酶报告基因检测磷酸化区域突变体 E3 连接酶功能活性 根据野生型、突变体组与空载体组发光值比值计算出活化倍数, 反应突变体对 HDAC2 Sumo-E3 连接酶功能活性的影响。LUC 报告基因检测片段突变体对 Sumo-E3 连接酶功能活性较野生型提高了 4.24 倍。由此表明磷酸化可能抑制 HDAC2 Sumo-E3 连接酶的活性, 从而影响蛋白质的翻译, 见图 1。



*: $P < 0.05$, 与野生型比较。

图 1 HDAC2 磷酸化片段缺失突变体对 LUC 的影响

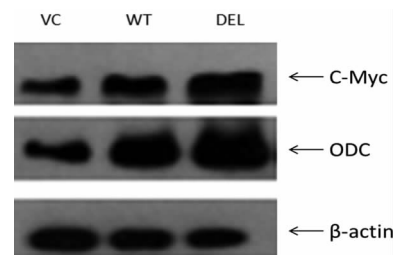
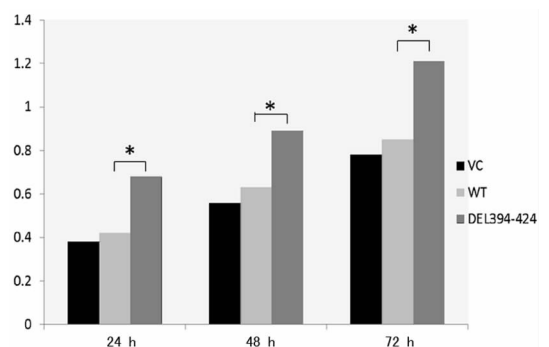


图 2 Western blot 检测 ODC 和 c-Myc 蛋白的表达



*: $P < 0.05$, 与野生型比较。

图 3 MTT 检测磷酸化突变体对细胞增殖影响

2.3 Western blot 检测磷酸化突变体对 L929 细胞中 HDAC2 Sumo-E3 连接酶介导的靶蛋白的表达 Western blot 检测结果显示,与野生型组相比,突变体组明显促进了 ODC 和 c-Myc 蛋白的表达,见图 2。

2.4 MTT 检测磷酸化突变体对成纤维细胞增殖的影响 MTT 检测结果显示,与野生型相比,突变体组明显促进了细胞的增殖,并且两组吸光度值差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

3 讨 论

在真核细胞中,有 95% 的蛋白合成都是通过帽依赖性蛋白 mRNA 的翻译。其翻译起始的关键步骤是真核翻译起始因子 eIF4F 复合物 (eIF4E、eIF4A 和 eIF4G) 的形成^[8-9]。而 eIF4E 的 Sumo 化可以促进 eIF4F 复合物的形成。Sumo 化是一种可以逆转的共价结合在其底物的蛋白修饰分子。人类基因组编码了 4 种 Sumo 分子,分别是 Sumo1、Sumo2、Sumo3 和 Sumo4^[10]。蛋白质的 Sumo 化受到激活 (E1), 结合 (E2) 和连接 (E3) 酶的影响^[11]。Ubc9 是唯一的 Sumo-E2 结合酶,然而 Sumo-E3 连接酶已经鉴定有数种^[12]。只有 HDAC4 和 HDAC7 被报道有 E3 连接酶活性。本课题组前期研究发现,HDAC2 的羧基末端还具有不依赖其去乙酰化酶功能的 Sumo-E3 连接酶功能结构域^[3,13]。通过此功能介导,其可在翻译水平上调如 ODC、c-Myc、Survivin 和 Bcl-2 等与细胞生长、增殖和抗凋亡相关基因的表达,而去除羧基末端的片段缺失突变体则丧失此能力。同时本课题组证实其主要机制是:通过上调翻译起始因子 eIF4E 的 Sumo 化修饰,而促进翻译起始因子 eIF4E、eIF4G 和 eIF4A 间的相互作用,促进蛋白质翻译起始复合物 eIF4F 的形成,最终在翻译水平上调与细胞增殖、生长和抗凋亡相关基因的表达,促进细胞快速生长。但此新功能的调控机制未知,且磷酸化修饰和 Sumo 修饰之间存在密切联系^[5-6]。

为了研究 HDAC2 的磷酸化区域对其 Sumo-E3 连接酶活性的影响,本研究以 pcDNA3.1/HDAC2(DEL100-322AA) 为模板构建 HDAC2 磷酸化区域缺失片段突变体 pcDNA3.1/HDAC2(DEL-PSD)(DEL 394-424AA)。通过双酶切和测序鉴定的结果提示,成功构建了 pcDNA3.1/HDAC2(DEL-PSD) 片段突变体。从帽依赖性 mRNA 翻译蛋白报告基因 LUC 检测的结果提示,HDAC2 的磷酸化区域被去除以后的目的片段使 LUC 的表达增加了 4.24 倍。反映了其磷酸化区域被去除以后明显促进了蛋白质的翻译。为了研究其促进哪一类蛋白质的翻译,进行 Western blot 检测了 HDAC2 Sumo-E3 连接酶介导的 eIF4E 相关的基因的表达,发现 ODC 和 c-Myc 表达增加,和本课题组前期研究一致^[5]。其机制可能是去除磷酸化位点的 HDAC2 片段能增加其 Sumo-E3 连接酶活性,从而增强 eIF4E 的 Sumo 化修饰,在翻译水平选择性激活 eIF4E 介导的细胞增殖、生长和抗凋亡相关基因的表达。最后本研究将构建好的突变体转入 L929 细胞中进行 MTT 检测发现,磷酸化区域被去除以后的目的片段可以明显促进 L929 细胞的增殖。因 L929 细胞在创伤愈合过程中发挥了重要作用,蛋白质翻译的增加也可促进创伤修复,加快愈合过程,所以本研究结果也提示其对创面愈合有促进作用。本实验过程中研究的是磷酸

化区域的片段突变体,所有已知的磷酸化位点都被去除掉。具体是哪个磷酸化位点起主要作用? 还是整体位点在其中起作用,尚待进一步的深入探讨。从而为进一步研究 HDAC2 Sumo-E3 连接酶活性的调控机制奠定基础,同时也为促进创面愈合提供新的药物靶点。

参考文献

- [1] Witt O, Deubzer HE, Milde T, et al. HDAC family: What are the cancer relevant targets? [J]. *Cancer Lett*, 2009, 277(1): 8-21.
- [2] Nakagawa M, Oda Y, Eguchi T, et al. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues [J]. *Oncol Rep*, 2007, 18(4): 769-774.
- [3] Xu X, J Vatsyayan, C Rao, et al. HDAC2 promotes eIF4E sumoylation and activates mRNA translation gene specifically [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(24): 18139-18143.
- [4] Karwow ka-Desaulniers P, Ketko A, Kamath N, et al. Histone deacetylase 1 phosphorylation at S421 and S423 is constitutive in vivo, but dispensable in vitro [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361(2): 349-355.
- [5] Segre CV, Chiocca S. Regulating the regulators: the post-translational code of class I HDAC1 and HDAC2 [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011: 837-848.
- [6] Deribe YL, Pawson T, Dikic I. Post-translational modifications in signal integration [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17(6): 666-672.
- [7] 郭犇, 熊渊, 黄宏, 等. 组蛋白去乙酰化酶 HDAC2 突变体构建及其 SUMO 修饰 E3 连接酶功能研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2013, 33(6): 1005-1008.
- [8] Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets [J]. *Cell*, 2009, 136(4): 731-745.
- [9] Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation [J]. *Annu Rev Biochem*, 1999 (68): 913-963.
- [10] Johnson E. Protein modification by SUMO [J]. *Annu Rev Biochem*, 2004(73): 355-382.
- [11] Di Bacco A, Gill G. SUMO-specific proteases and the cell cycle. An essential role for SENP5 in cell proliferation [J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(20): 2310-2313.
- [12] Geiss-Friedlander R, Melchior F. Concepts in sumoylation: a decade on [J]. *Nat Rev Mol Cell*, 2007, 8(12): 947-956.
- [13] Xu X, Vatsyayan J, Rao C, et al. Sumoylation of eIF4E activates mRNA translation [J]. *EMBO Rep*, 2010, 11(4): 299-304.