

· 医学与免疫生物技术 ·

## PPP2R2A 在乳腺癌细胞中结合 GFPT2 并导致其去磷酸化

李笑荣, 张进, 马端

复旦大学 基础医学院, 上海 200012

李笑荣, 张进, 马端. PPP2R2A 在乳腺癌细胞中结合 GFPT2 并导致其去磷酸化. 生物工程学报, 2018, 34(6): 956-963.

Li XR, Zhang J, Ma D. PPP2R2A binds and dephosphorylates GFPT2 in breast cancer cells. Chin J Biotech, 2018, 34(6): 956-963.

**摘要:** PPP2R2A 是 PP2A 磷酸酶的调控亚基之一, 以往的研究报道显示, PPP2R2A 可促进肿瘤细胞生存和生长。本研究通过串联亲和纯化联合 HPLC-Chip-ESI/MS/MS 筛选 PPP2R2A 的相互作用蛋白质, 分析结果显示, L-谷氨酰胺-D-果糖-6-磷酸转氨酶 1 (Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1, GFPT1) 和 L-谷氨酰胺-D-果糖-6-磷酸转氨酶 2 (Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2, GFPT2) 是 PPP2R2A 可能的结合蛋白。通过免疫荧光共定位、GST Pull-down 和免疫共沉淀等方法, 进一步确认了 PPP2R2A 和 GFPT1 及 GFPT2 的相互结合。通过 shRNA 下调 PPP2R2A 后, GFPT2 的磷酸化水平显著增加, 但 GFPT1 的磷酸化水平改变不明显。GFPT2 是 O-GlcNAC 糖基化修饰通路中的一个限速酶, 在乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中下调 PPP2R2A 后, 蛋白质 O-GlcNAC 糖基化修饰水平增加。这些结果表明, PPP2R2A 可直接结合 GFPT2, 并导致其去磷酸化, 进而影响细胞内 O-GlcNAC 糖基化修饰。

**关键词:** PPP2R2A, L-谷氨酰胺-D-果糖-6-磷酸转氨酶 1, L-谷氨酰胺-D-果糖-6-磷酸转氨酶 2, O-GlcNAC 糖基化

## PPP2R2A binds and dephosphorylates GFPT2 in breast cancer cells

Xiaorong Li, Jin Zhang, and Duan Ma

School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200012, China

**Abstract:** PPP2R2A is one of the regulatory subunits of the PP2A phosphatase complexes, and previous studies showed that its upregulation promotes cancer cell survival and growth. In this research, we used the tandem affinity purification and the HPLC-Chip-ESI/MS/MS mass spectrometry to screen the PPP2R2A-binding proteins and the results indicated that the GFPT-1/-2 were the potential partners of PPP2R2A. We further validated the interaction between PPP2R2A and GFPT-1/-2

**Received:** November 29, 2017; **Accepted:** March 19, 2018

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFC1000503).

**Corresponding author:** Duan Ma. Tel: +86-21-54237441; E-mail: duanma@fudan.edu.cn

国家重点研发计划项目 (No. 2016YFC1000503) 资助。

网络出版时间: 2018-05-16

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180511.1418.001.html>

through GST Pull-down, co-immunoprecipitation and immunofluorescence assays. And we found that knockdown of PPP2R2A by lentivirus-mediated shRNA enhanced the phosphorylation of GFPT2, whereas the phosphorylation of GFPT1 had no significant change. GFPT2 is a rate-limiting enzyme in the hexosamine pathway. Our results showed that the knockdown of PPP2R2A promoted the total cellular O-GlcNAcylation in MDA-MB-231 breast cancer cells. These results suggest that PPP2R2A interacts with GFPT1/2, and leads to the phosphorylation of GFPT2, which can regulate the cellular O-GlcNAcylation.

**Keywords:** PPP2R2A, GFPT1, GFPT2, O-GlcNAcylation

PP2A 是一种重要的丝氨酸/苏氨酸磷酸酶,是由调节亚基 (B)、支架亚基 (A) 和催化亚基 (C) 组成的异三聚体,其中调节亚基 B 决定 PP2A 磷酸酶复合物的底物特异性和亚细胞定位<sup>[1-2]</sup>。目前在人类细胞中共发现有 12 种 PP2A 调节亚基,PPP2R2A 是 PP2A 中调节亚基之一<sup>[3]</sup>。以往的研究表明,PPP2R2A 参与肿瘤的发生发展,促肿瘤细胞生长<sup>[4-7]</sup>。例如,胰腺癌细胞中 PPP2R2A 的表达显著增加,可激活多条促肿瘤发生的信号通路 (AKT-, ERK-, Wnt-)<sup>[8]</sup>; 肿瘤细胞中的 PPP2R2A/PP2A 可催化将 c-Jun 的 T239 位点去磷酸化,促进其与 DNA 结合从而促进细胞的增殖和迁移<sup>[4]</sup>; 此外,肿瘤组织谷氨酰胺的缺乏可诱导 PPP2R2A 表达的上调,并抑制 P53 通路,从而促进肿瘤细胞生存<sup>[9]</sup>。

本课题组前期研究也发现,在乳腺癌细胞中下调 PPP2R2A 后,细胞增殖和迁移的能力显著下降。由于 PPP2R2A 是磷酸酶复合物的调节亚基,决定了 PPP2R2A-PP2A 磷酸酶复合物的底物特异性,因此寻找 PPP2R2A 的相互作用蛋白质,有助于阐明 PPP2R2A 的作用机制。本研究通过 SBP-HIS8 串联纯化分离了 PPP2R2A 蛋白复合物,进而通过 HPLC-Chip-ESI/MS/MS 分析其蛋白组分。蛋白质质谱结果显示 PPP2R2A 与 GFPT1/GFPT2 结合。GFPT1/GFPT2 是己糖胺途径的限速酶,催化谷氨酰胺水解为谷氨酸,6-磷酸-果糖转化为 6-磷酸-葡萄糖胺。然后经一系列反应产生 UDP-GlcNAc,而 UDP-GlcNAc 是蛋白质 O-连接丝氨酸-苏氨酸的糖基化修饰以及糖原、糖脂修饰的糖基供体<sup>[10-11]</sup>。在本研究中,我们将进一步确

认 PPP2R2A 与 GFPT1/2 间的相互作用,以及对 GFPT1/2 磷酸化和下游蛋白糖基化的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人胚肾细胞株 HEK293T、HEK293 和人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 购自 ATCC; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本实验室扩增提供; 慢病毒包装用辅助质粒 (TAT/GAG/VSVG/REC) 购自 SBI 公司; Streptavidin-beads 购自 GE 公司; Protein A/G beads 购自 Roche 公司; GST beads 购自 Sigma 公司; 单克隆兔源抗 PPP2R2A 抗体和单克隆兔源抗 GAPDH 抗体购自 Bioworld 公司; 单克隆鼠源 FLAG 抗体购自 Abmart; 单克隆鼠源 GST 抗体和单克隆兔源 HA 抗体购自 Sigma 公司; 兔源 PKA substrate 购自 CST 公司; Dylight 488 以及 Dylight 594 购于 Jackson Immuno Research。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 重组质粒构建

构建 PCDH-FLAG3-HIS8-SBP-Puro 重组质粒,首先设计 SBP 引物,并添加连续编码 8 个 HIS 氨基酸序列标,PCR 扩增得到目的片段,纯化后酶切,与酶切处理的 PCDH-FLAG3-Puro 质粒进行连接,质粒经转化,然后菌落经 PCR 鉴定扩大培养阳性克隆。最后重组质粒测序鉴定。重组质粒 PCDH-FLAG3-hyg-GFPT1/PCDH-FLAG3-hyg-GFPT2/PCDH-FLAG3-HIS8-SBP-PPP2R2A-Puro/mGST-HIS-GFPT1/mGST-HIS-GFPT2/PCDH-FLAG3-hyg-PPP2R2A 以及 mGST-HIS-PPP2R2A 构建方法同上,其中引物如表 1 所示。

表 1 引物名称和序列

Table 1 Primer names and sequences

Primer name	Primer sequence (5'-3')
HIS8-SBP-F	GATCCCATCATCACCATCACCATCACCATGCCTCGAGCTCGC
HIS8-SBP-R	GGCCCGAGCTCGAGGCATGGTGATGGTGATGGTGATGATGG
PPP2R2A-F	GTGCTCGAGGGCAGGAGCTGGAGGAGGGAATGA
PPP2R2A-R	GGGGCGGCCGCGGCACACTGTCAAACACTGG
GFPT1-F	CTGCTCGAGGACCAACATCATGTGCGGTATATTTG
GFPT1-R	CACGCGGCCGAAAAGGCTTTTCAGGAGGCAATAG
GFPT2-F	CTGCTCGAGCATGTGCGGAATCTTTGCCTAC
GFPT2-R	CACGCGGCCGCATCTTGGCAGTTGGTTCAGG

### 1.2.2 细胞稳转株构建

以 HEK293T 为慢病毒包装细胞,按照说明,将 4 种辅助质粒按照和基因表达质粒等比例混合即 Rec:VsVg:GAG:TAT:目标质粒=1:1:1:1:4,脂质体 Lipofectamine 介导转染,24 h 后收集病毒上清,2 000 r/min 离心,上清中含有组装好的慢病毒加入细胞中,同时加入 2.5 ng/mL 聚凝胺 (Polybrene) 促进感染,同上分别收集 48 h 以及 72 h 的病毒并感染细胞。最后一次病毒感染 48 h 后,使用潮霉素加压筛选细胞稳转株。

### 1.2.3 串联亲和纯化联合 HPLC-Chip-ESI/MS/MS 分析

收集稳定表达 SBP-HIS-FLAG-PPP2R2A 的细胞稳转株 MDA-MB-231,加入 15 mL 细胞裂解液 (含 1% Triton X-100, 1 mol/L 巯基乙醇) 冰上裂解 20 min,离心收集全部细胞上清。第一次链霉亲和素 (Streptavidin) 纯化,蛋白上清加入 Streptavidin 磁珠,4 °C 过夜;弃上清,用细胞裂解液 (含 0.1% Triton X-100, 1 mol/L 巯基乙醇) 洗涤 5 遍,每次 3 min,最后保留 1 mL 左右含有沉淀复合物混悬液,加入 400  $\mu$ L 生物素洗脱液 (无 EDTA/EGTA, 含 2 mmol/L biotin, 20 mmol/L 咪唑),4 °C 旋转 4 h 后,收集上清。第二次 Ni 磁珠纯化,蛋白上清加入 40  $\mu$ L PBS 平衡后的 Ni 磁珠,4 °C 旋转 2 h;离心弃上清,加入 0.05 mmol/L 的  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 8.0),4 °C 静置 5 min,离心弃上清,重复 2 次;加入 10 mmol/L 的  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,用

2  $\mu$ g 胰酶酶切过夜,取出酶切产物,2 000 r/min 离心 1 min (4 °C),收集上清加入 2  $\mu$ g 胰酶继续上述酶切 4 h (37 °C),2 000 r/min 离心 1 min,收集上清。最后 HPLC-Chip-ESI/MS/MS 分析,上清样品经过色谱分离后,肽段先后进入一级质谱和二级质谱,从而进行分析和鉴定。

### 1.2.4 细胞免疫荧光

将高压灭菌的盖玻片蘸于 0.1% 明胶中后放至 12 孔板中;HA-PPP2R2A 和 PCDH-hyg-FLAG-GFPT1/2 重组质粒依据产品说明书进行脂质体 Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 瞬时转染,转染 6 h 后消化细胞,将其接种在明胶上生长,24 h 后用 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min, PBST (0.2% Triton X-100) 洗涤 3 次,5 min/次,3% BSA 封闭 1 h;取出玻片加入兔源抗 HA 一抗和鼠源抗 FLAG 一抗混合液 (1:100),湿盒中 4 °C 过夜;PBST (0.2% Triton X-100) 洗涤 3 次,5 min/次,再加入 Dylight 488 标记羊抗鼠 IgG 荧光二抗以及 Dylight 594 标记羊抗兔 IgG 荧光二抗的混合液 (1:10),室温孵育 1 h,需避光;PBST (0.2% Triton X-100) 洗涤 3 次,5 min/次,DAPI 染细胞核,避光静置 5 min;封片并荧光显微镜下观察。

### 1.2.5 GST Pull-down

PCDH-hyg-FLAG-GFPT1 和 mGST-HIS-PPP2R2A 重组质粒依据产品说明书进行脂质体 Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 瞬时转染,24 h 后收集细胞抽提蛋白;蛋白上清分成 2 份,一份取 50  $\mu$ L 用作 input,剩余的细

胞裂解液全部用于 GST Pull-down,按每个蛋白样品需要 20  $\mu\text{L}$  GST 磁珠,取适量的磁珠用细胞裂解液清洗 3 次,将 GST 磁珠加入待测样品中,4  $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育过夜;次日,小于 500 $\times g$  离心 2 min,弃上清,细胞裂解液清洗磁珠 3 次,磁珠沉淀加入 50  $\mu\text{L}$  的 SDS 上样缓冲液,95–100  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min,12 000 r/min 离心 5 min;Western blotting 检测目的蛋白。

### 1.2.6 免疫共沉淀 (Co-IP)

PCDH-hyg-FLAG-PPP2R2A 和 mGST-GFPT1/2 重组质粒依据产品说明书进行脂质体 Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 瞬时转染;24 h 后收集细胞抽提蛋白,一份取 50  $\mu\text{L}$  用作 input,剩余的全部用于免疫共沉淀;按每个样品 30  $\mu\text{L}\times 2$  磁珠,取适量的蛋白 A/G,用细胞裂解液清洗 3 次;蛋白样品与 30  $\mu\text{L}$  蛋白 A/G 混匀,4  $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育 1 h;小于 500 $\times g$  离心 2 min,弃沉淀,上清加入鼠源 FLAG (2  $\mu\text{g}$ ) 抗体,4  $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育 1 h,再加 30  $\mu\text{L}$  Protein A/G,4  $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育过夜。次日,小于 500 $\times g$  离心 2 min,弃上清。用细胞裂解液洗磁珠 3 次,磁珠沉淀加入 50  $\mu\text{L}$  的 SDS 上样缓冲液中,95–100  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min,12 000 r/min 离心 5 min;Western blotting 检测目的蛋白。

## 2 结果与分析

### 2.1 串联亲和法联合 HPLC-Chip-ESI/MS/MS 分析筛选出 PPP2R2A 结合蛋白 GFPT1/2

通过慢病毒感染建立 SBP-HIS-FLAG-PPP2R2A 稳定表达的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞,Western blotting 检测 PPP2R2A 表达结果显示,除了内源性的 PPP2R2A 条带外,在稳转细胞内还有因加入纯化标签而变大的 SBP-HIS-FLAG-PPP2R2A 条带,与内源性 PPP2R2A 表达水平相当 (图 1)。先通过 SBP-HIS8 串联纯化分离 PPP2R2A 蛋白复合物,进而通过 HPLC-Chip-ESI/MS/MS 鉴定与 PPP2R2A 相互作用的蛋白。蛋白质质谱鉴定结果

显示,除了 PPP2R2A 蛋白外,还有 PP2A 复合物蛋白 PPP2R1A 和 PPP2CA,这表明了该方法的可靠性。在被鉴定的蛋白中,GFPT1 和 GFPT2 同属于 L-谷氨酰胺-D-果糖-6-磷酸转氨酶,并且均有多个肽段被鉴定 (表 2),因此我们将进一步分析 PPP2R2A 与 GFPT1/2 间的相互作用。

### 2.2 PPP2R2A 蛋白与 GFPT1/2 蛋白相互作用的确认

在 HEK293T 细胞中,重组质粒共瞬时转染 PCDH-hyg-FLAG-GFPT1/2 和 mGST-HIS-PPP2R2A,设置瞬转 PCDH-hyg-FLAG 空载和 mGST-HIS 空载作为阴性对照。GST Pull-down 结果显示 PPP2R2A 可沉淀细胞中的 FLAG-GFPT1 和 FLAG-GFPT2 (图 2A、B);反向,使用 FLAG 抗体通过 Co-IP 分别沉淀 FLAG-GFPT1 和 FLAG-GFPT2 融合蛋白,结果同样表明二者均可沉淀细胞中的 PPP2R2A 蛋白。进一步说明 PPP2R2A 与 GFPT1/2 存在相互作用。

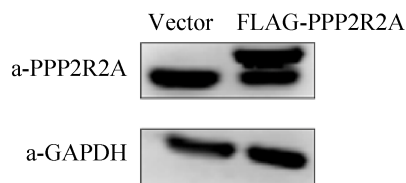


图 1 Western blotting 检测 SBP-HIS-FLAG-PPP2R2A 稳定细胞株的 PPP2R2A 表达水平

Fig. 1 Detection of the expression of PPP2R2A in the stable MDA-MB-231 cells of SBP-HIS-FLAG-PPP2R2A by using Western blotting.

表 2 串联亲和法联合 HPLC-Chip-ESI/MS/MS 结果显示 GFPT1/2 是 PPP2R2A 潜在的结合蛋白

Table 2 The results of tandem affinity and HPLC-Chip-ESI/MS/MS identified the GFPT1/2 as the potential partner of PPP2R2A

Number	Gene name	Peptide hit number
1	PPP2R2A	333
2	PPP2R1A	214
3	PPP2CA	157
4	GFPT1	7
5	GFPT2	10

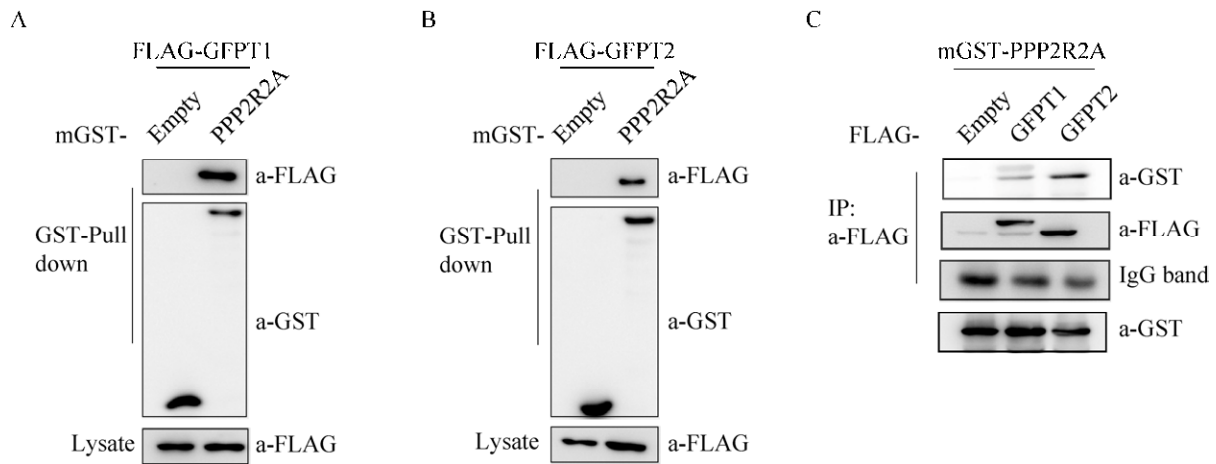


图 2 PPP2R2A 蛋白与 GFPT1/2 蛋白相互作用

Fig. 2 The interaction between PPP2R2A and GFPT1/2 was further validated. (A, B) GST Pull-down of PPP2R2A with Flag-GFPT1/2. HEK-293T cells were co-transfected with plasmids expressing GST-tagged PPP2R2A (or empty vector) and Flag-tagged GFPT1/-2. PPP2R2A was precipitated with GST Pull-down, and the pull-down products were analyzed by anti-Flag immunoblotting. (C) Co-immunoprecipitation (IP) of PPP2R2A with Flag-tagged GFPT1/2. PPP2R2A was immunoprecipitated with an anti-Flag antibody, and co-immunoprecipitated PPP2R2A was analyzed by anti-GST immunoblotting.

### 2.3 PPP2R2A 蛋白与 GFPT1/2 蛋白在细胞内共定位

在 HEK 293 细胞中,共同转染 HA-PPP2R2A 和 FLAG-GFPT1/2 表达质粒,用鼠源抗 FLAG 和兔源抗 HA 抗体做免疫荧光检测,结果如图 3A、B 显示,PPP2R2A 与 GFPT1/2 在细胞中共定位于细胞质中。

### 2.4 PPP2R2A 影响 GFPT2 的磷酸化水平

已有的报道显示 PKA 可导致 GFPT1/2 的磷酸化,为了检测 PPP2R2A 去磷酸酶对 GFPT1/2 磷酸化的影响,我们通过慢病毒感染并表达 shRNA,建立 PPP2R2A 稳定下调的 HEK 293T 细胞,Western blotting 结果显示该 shRNA 有效下调 PPP2R2A 表达。再在该稳定细胞株中转染 mGST-GFPT1/2 表达质粒,用 GST-pull down 将外源性表达的 GST-GFPT1/2 进行纯化, Anti-GST-WB 检测结果显示在 PPP2R2A 稳定下调细胞和对照细胞中, GST-GFPT1 和 GST-GFPT2 的表达量相同,同时用 PKA 底物

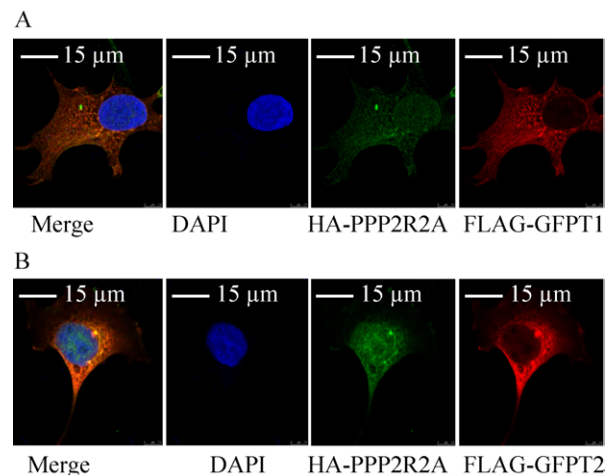


图 3 PPP2R2A 与 GFPT1/2 在细胞质中共定位的免疫荧光结果

Fig. 3 Colocalization of PPP2R2A and GFPT1/2 in cytoplasm. (A, B) GFPT1/2 was co-localized with PPP2R2A in the cytoplasm. The HEK293 cells were co-transfected with plasmids expressing FLAG-GFPT1/2 and HA-PPP2R2A, and after 24 h, cells were fixed and stained with anti-HA (green) and anti-FLAG (red) antibody. And the DAPI were used for nuclear staining.

抗体检测其磷酸化水平,结果显示 PPP2R2A 下调后,GFPT1 磷酸化水平改变不明显,GFPT2 磷酸化水平增加(图 4 A、B)。另外,在 FLAG-GFPT2 稳定表达的 MDA-MB-231 细胞株中使用 shRNA 下调 PPP2R2A 表达,通过 Anti-FLAG-IP 沉淀 FLAG-GFPT2 蛋白,Anti-PKA substrate WB 结果同样显示,PPP2R2A 的下调可促进 GFPT2 的磷酸化,与 HEK293T 中的结果一致(图 4 C)。

### 2.5 在 MDA-MB-231 中下调 PPP2R2A 促进 O-连接的蛋白质糖基化修饰

己糖胺途径是一系列的酶促生化反应,最终生成 UDP-GlcNAC,它是蛋白质的 O-连接的丝氨酸-苏氨酸的糖基化修饰以及糖原、糖脂修饰的底物,GFPT2 是己糖胺途径中的关键限速酶,于是我们又进一步检测 PPP2R2A 下调对细胞内总蛋白 S/T-O-GlcNAC 糖基化的影响,使用 O-GlcNAC 抗体(CTD110.6)进行 Western blotting 检测,结果(图 4)表明下调 PPP2R2A 后,乳腺癌细胞中蛋白质的 S/T-O-GlcNAC 糖基化修饰的水平显著增加。

## 3 讨论

PP2A 的活性和特异性是通过调节亚基调控的,PPP2R2A 作为 PP2A 复合物的调节亚基之一,通过底物特异性结合从而影响其磷酸化水平<sup>[12-13]</sup>。已有的研究表明,肿瘤细胞中谷氨酰胺的缺乏会促进 PPP2R2A 的表达,进而通过抑制 P53 通路提高肿瘤细胞在此环境中的生存<sup>[9]</sup>。为了更加深入地解释 PPP2R2A 的分子作用机制,我们进一步寻找新的与 PPP2R2A 结合的其他蛋白。

本研究通过慢病毒感染建立 FLAG-SBP-HIS-PPP2R2A 稳定表达 MDA-MB-231 细胞株,并首次使用 SBP-HIS 串联亲和纯化联合质谱的方式对 PPP2R2A 的结合蛋白进行了分析。与文献中常使用的其他串联标签纯化(Tandem Tag Purification, TAP)方法相比,该方式具有以下 3 个优点<sup>[14-16]</sup>: 1) 通过慢病毒感染建立稳定表达细胞,PPP2R2A 表达量与内源性 PPP2R2A 表达量大致相当,更好地模拟 PPP2R2A 内源性表达量; 2) SBP-tag 与 Streptavidin-beads 具有极高的亲和力,再经过

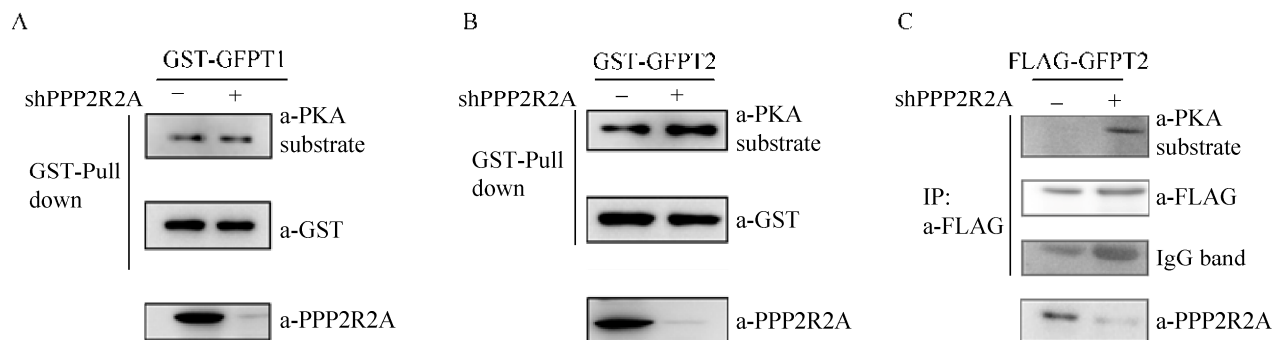
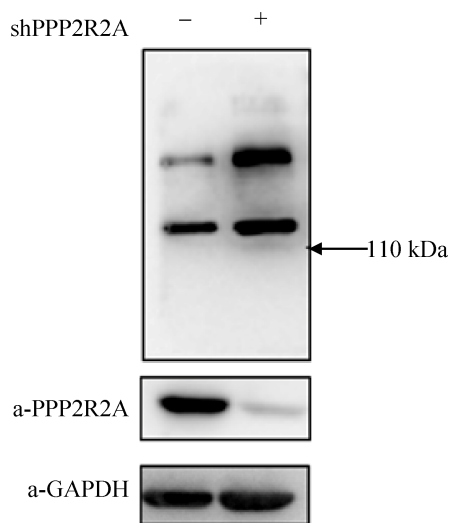


图 4 PPP2R2A 影响 GFPT2 的磷酸化水平

Fig. 4 Knockdown of PPP2R2A enhanced phosphorylation of GFPT2. (A, B) Knockdown of PPP2R2A by lentivirus-mediated shRNA enhanced the phosphorylation of GFPT2, while the phosphorylation of GFPT1 had no significant change in HEK 293T. The plasmid of GST-GFPT1 or GFPT2 was further transfected into the normal and PPP2R2A-knockdown cells. GST Pull-down was used to precipitate the GFPT1 or GFPT2, and the phosphorylation was detected by the anti-PKA substrate immunoblotting. (C) In MDA-MB-231, knockdown of PPP2R2A enhanced the phosphorylation of GFPT2. MDA-MB-231 cells stably expressing FLAG-GFPT2 were established by infection with lentiviral particles. FLAG-GFPT2 was immunoprecipitated with an anti-FLAG antibody, and phosphorylation of GFPT2 was analyzed by the anti-PKA substrate immunoblotting.



**图 5 PPP2R2A 下调促进 S/T-O-GlcNAc 糖基化修饰**  
 Fig. 5 Cellular O-GlcNAcylation was elevated when PPP2R2A was knocked down in MDA-MB-231 cells. The PPP2R2A were knocked down by using the lentivirus-mediated shRNA, and the cellular O-GlcNAcylation was analyzed by anti-CTD110.6 immunoblotting.

HIS8-tag 纯化的方法后,进一步增加了 PPP2R2A 复合物的纯度<sup>[17]</sup>; 3) 第二步 HIS-tag 的纯化不会引入其他过量的外源蛋白(例如使用抗体时的免疫球蛋白或 Streptavidin-beads 上的 Streptavidin),从而消除了过量纯化基质蛋白引入对质谱分析的影响。

通过该方法,我们鉴定出多个 PPP2R2A 已知结合蛋白及许多潜在的相互作用蛋白,其中包括 GFPT1 和 GFPT2。通过 GST Pull-down、Co-IP 以及免疫荧光,我们进一步确定了 PPP2R2A 的确能够与 GFPT1/2 结合。人源 GFPT1 和 GFPT2 有 76% 的同源性<sup>[18]</sup>,自身酶的活性受磷酸化水平的调控<sup>[19]</sup>。例如,PKA 可通过磷酸化 GFPT1 的 205S(丝氨酸)而抑制其活性,PKA 也可磷酸化 GFPT2 的 202S(丝氨酸)促进其活性<sup>[20-21]</sup>。我们的结果显示 PPP2R2A 下调可增加 GFPT2 的 PKA 磷酸化水平。

GFPT1 和 GFPT2 是己糖胺途径的限速酶,

催化谷氨酰胺水解为谷氨酸,使 6-磷酸-果糖转化为 6-磷酸-葡萄糖胺。然后经一系列反应产生 UDP-GlcNAc,它是蛋白质 O-连接的丝氨酸-苏氨酸的糖基化修饰以及糖原、糖脂修饰的底物。参与细胞内的多条信号通路的调控<sup>[22-24]</sup>。我们的结果表明 PPP2R2A 下调后促进 GFPT2 磷酸化水平的同时,也会促进细胞内总 O-GlcNAc 糖基化修饰的增加。

在本研究中,我们还通过慢病毒感染在 MDA-MB-231 细胞中上调了 PPP2R2A 的表达,但未检测到 GFPT2 和 O-GlcNAc 糖基化修饰的改变,推测这是由于细胞本身就有很高的内源性 PPP2R2A 蛋白表达。例如,在图 1 中内源性 PPP2R2A 蛋白与慢病毒感染表达的 FLAG-HIS-PPP2R2A 蛋白量很近似;在图 4C 中 PPP2R2A 未下调的 MDA-MB-231 细胞中基本检测不到 GFPT2 的磷酸化状态,这说明在细胞中具有高活性的 PPP2R2A;同时我们也注意到,最近发表的一篇关于 PPP2R2A 去磷酸化 EDD 并调控 P53 的报道中<sup>[9]</sup>,作者同样仅开展了 PPP2R2A 的下调研究,且在对照组中 EDD 磷酸化水平也是几乎检测不到。这些均说明在细胞中具有很高的 PPP2R2A 活性,也提示 PPP2R2A 具有作为治疗靶标的潜力。

另外,在细胞中大约有 80 多种蛋白发生 O-GlcNAc 糖基化修饰<sup>[25]</sup>,在接下来的研究中我们将进一步鉴定,哪种关键的下游蛋白 O-GlcNAc 糖基化修饰的改变介导了 PPP2R2A 下调引起的生物学效应。

## REFERENCES

- [1] Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*, 2001, 353(3): 417-439.
- [2] Eichhorn PJA, Creighton MP, BERNARDS R. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim*

- Biophys Acta (BBA)-Rev Cancer, 2009, 1795(1): 1–15.
- [3] Seshacharyulu P, Pandey P, Datta K, et al. Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer Lett*, 2013, 335(1): 9–18.
- [4] Gilan O, Diesch J, Amalia M, et al. PR55 $\alpha$ -containing protein phosphatase 2A complexes promote cancer cell migration and invasion through regulation of AP-1 transcriptional activity. *Oncogene*, 2015, 34(10): 1333–1339.
- [5] Mori N, Ishikawa C, Uchihara JN, et al. Protein phosphatase 2A as a potential target for treatment of adult T cell leukemia. *Curr Cancer Drug Targ*, 2013, 13(8): 829–842.
- [6] Beca F, Pereira M, Cameselle-Teijeiro JF, et al. Altered PPP2R2A and Cyclin D1 expression defines a subgroup of aggressive luminal-like breast cancer. *BMC Cancer*, 2015, 15(1): 285.
- [7] Suganuma M, Fujiki H. Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatase 1 and 2A. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 1998, 43(S8): 1102–1110.
- [8] Hein AL, Seshacharyulu P, Rachagani S, et al. PR55 $\alpha$  subunit of protein phosphatase 2A supports the tumorigenic and metastatic potential of pancreatic cancer cells by sustaining hyperactive oncogenic signaling. *Cancer Res*, 2016, 76(8): 2243–2253.
- [9] Reid MA, Wang WI, Rosales KR, et al. The B55 $\alpha$  subunit of PP2A drives a p53-dependent metabolic adaptation to glutamine deprivation. *Mol Cell*, 2013, 50(2): 200–211.
- [10] Wellen KE, Lu C, Mancuso A, et al. The hexosamine biosynthetic pathway couples growth factor-induced glutamine uptake to glucose metabolism. *Genes Dev*, 2010, 24(24): 2784–2799.
- [11] Ferrer CM, Sodi VL, Reginato MJ. O-GlcNAcylation in cancer biology: linking metabolism and signaling. *J Mol Biol*, 2016, 428(16): 3282–3294.
- [12] Ory S, Zhou M, Conrads TP, et al. Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. *Curr Biol*, 2003, 13(16): 1356–1364.
- [13] Ruvolo PP. The broken “off” switch in cancer signaling: PP2A as a regulator of tumorigenesis, drug resistance, and immune surveillance. *BBA Clin*, 2016, 6: 87–99.
- [14] Li Y. The tandem affinity purification technology: an overview. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(8): 1487–1499.
- [15] Kosobokova EN, Skrypnik KA, Kosorukov VS. Overview of fusion tags for recombinant proteins. *Biochemistry (Moscow)*, 2016, 81(3): 187–200.
- [16] Ma Z, Fung V, D’orso I. Tandem affinity purification of protein complexes from eukaryotic cells. *J Vis Exp*, 2017(119), doi: 10.3791/55236.
- [17] Loughran ST, Walls D. Tagging recombinant proteins to enhance solubility and aid purification//Walls D, Loughran S, Eds. *Protein Chromatography: Methods and Protocols*. New York: Humana Press, 2017, 1485:131–156.
- [18] Oki T, Yamazaki K, Kuromitsu J, et al. cDNA cloning and mapping of a novel subtype of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT2) in human and mouse. *Genomics*, 1999, 57(2): 227–234.
- [19] Yamazaki K. Glutamine–fructose-6-phosphate transaminase 1, 2 (GFPT1, 2)//Taniguchi N, Honke K, Fukuda M, et al. *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*. Tokyo: Springer, 2014: 1465–1479.
- [20] Hu Y, Riesland L, Paterson AJ, et al. Phosphorylation of mouse glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase 2 (GFAT2) by cAMP-dependent protein kinase increases the enzyme activity. *J Biol Chem*, 2004, 279(29): 29988–29993.
- [21] Chang Q, Su KH, Baker JR, et al. Phosphorylation of human glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase by cAMP-dependent protein kinase at serine 205 blocks the enzyme activity. *J Biol Chem*, 2000, 275(29): 21981–21987.
- [22] Ruan HB, Singh JP, Li MD, et al. Cracking the O-GlcNAc code in metabolism. *Trends Endocrinol Metabol*, 2013, 24(6): 301–309.
- [23] Slawson C, Hart GW. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate: the sweet side of protein regulation. *Curr Opin Struct Biol*, 2003, 13(5): 631–636.
- [24] Comer FI, Hart GW. O-GlcNAc and the control of gene expression. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Gen Subj*, 1999, 1473(1): 161–171.
- [25] Wells L, Whelan SA, Hart GW. O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 302(3): 435–441.

(本文责编 陈宏宇)