

DOI:10.3969/j.issn.1672-5565.201705010

Mg²⁺ 依赖性蛋白磷酸酶 1δ 的生物信息学分析

刘畅^{1*}, 刘安²

(1.长治医学院 中心实验室,山西 长治 046000;2.长治医学院附属和济医院 医务科,山西 长治 046000)

摘要: Mg²⁺ 依赖性蛋白磷酸酶 1δ (protein phosphatase magnesium-dependent 1δ, PPM1D) 作为肝癌潜在的预后标志物和治疗靶点,其致癌机制和预后价值仍未完全阐明。为了全面认识 PPM1D,使用生物信息学方法,对 PPM1D 蛋白的序列同源性、组织表达、亚细胞定位、理化性质、空间结构及蛋白质相互作用网络进行分析。结果表明:人 PPM1D 基因编码 605 个氨基酸组成的多肽,与物种进化程度一致,属于 PP2C 蛋白超家族,是碱性不稳定的亲水蛋白,无信号肽和跨膜区域;PPM1D 蛋白主要定位于细胞核内,其主要二级结构为随机卷曲,存在磷酸化、乙酰化、甲基化和泛素化位点,与 PPM1D 相互作用的蛋白主要是细胞周期检查点蛋白和细胞损伤修复相关蛋白。根据分析结果阐述了 PPM1D 蛋白与癌症的相关性以及 PPM1D 蛋白作为癌症标志物的理论基础,为进一步研究该蛋白及其参与的信号通路提供一定的借鉴和参考。

关键词: Mg²⁺ 依赖性蛋白磷酸酶 1δ; 生物信息学; 肝癌; 预后标志物; 功能

中图分类号: Q71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-5565(2017)04-249-06

Bioinformatics analysis of protein phosphatase magnesium-dependent 1δ

LIU Chang^{1*}, LIU An²

(1. Central Laboratory, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi, China;

2. Medical Department, Heji Hospital Affiliated to Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi, China)

Abstract: Protein phosphatase magnesium-dependent 1δ (PPM1D) is a potential prognostic marker and therapeutic target for hepatocellular carcinoma. But its carcinogenic mechanism and prognostic value have not been fully elucidated. To gain insightful information of PPM1D protein, bioinformatics methods are applied to analyze the hereditary conservation, tissue expression, subcellular localization, chemical properties, space structure and protein interaction networks of PPM1D protein. The PPM1D protein is comprised of 605 amino acid residues which belong to the PP2C super family. It is a hydrophilic unstable protein without signal peptide and trans-membrane region. It is mainly located in the nucleus and the main secondary structure elements are random coil. It contains several phosphorylation, acetylation, methylation and ubiquitination sites. Interactive proteins with PPM1D are mainly cell cycle checkpoint proteins and cell damage and repair-related proteins. We analyze the relationship between PPM1D protein and cancer and the theoretical basis of PPM1D as the cancer marker, which provide some references for further study of the protein and its participation in signal pathways.

Keywords: PPM1D; Bioinformatics; Hepatocellular carcinoma; Prognostic marker; Function

肝癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界第 3 大致死癌症,也是中国乃至亚洲最广泛的一种癌症。目前对于肝癌细胞癌变机制的研究尚无系统工作。临床上通常采用肝移植、手术切除、肝动脉化疗栓塞等方法治疗肝癌,但术后复发率和转移率偏高。有研究人员^[1]发现,PPM1D 的 mRNA 表达水平与

肝癌患者的肿瘤体积、肿瘤分级和总体生存时间密切相关。

Mg²⁺ 依赖性蛋白磷酸酶 1δ (PPM1D),亦被称为野生型 p53 诱导的蛋白磷酸酶 1 (Wip1, wild-type p53-induced phosphatase 1)。在乳腺肿瘤、卵巢透明细胞癌、胰腺癌、神经母细胞瘤和髓母细胞瘤等

收稿日期:2017-05-26;修回日期:2017-06-16.

* 通信作者:刘畅,女,讲师,研究方向:肿瘤的发生机制;E-mail:xiaophailch@163.com.

固体肿瘤中,发现 PPM1D 常过量表达,且与癌症患者生存状况不佳呈正相关^[2]。研究人员^[1,3]发现,对于中分化或低分化肝癌患者,肿瘤抑制基因 p53 通常发生突变或表达受到抑制。PPM1D 能够抑制 p53 信号途径和 p38 MAPK 信号通路,推测其为致癌基因^[4-5]。但 PPM1D 的致癌机制和预后价值仍未完全阐明,针对该分子的基因治疗手段也尚未见报道。

越来越多的证据表明,在多种固体肿瘤中,PPM1D 是一个潜在的肿瘤相关分子,也是一个有价值的预后标志物。PPM1D 在接近 59% 的肝癌患者体内过量表达,且高表达 PPM1D 的患者特点是:AFP 水平偏高、肿瘤体积偏大、TNM 分期偏高、肿瘤复发率偏高、存在肝癌家族史,总体存活时间偏短^[1]。文献^[2]使用 siRNA 下调 PPM1D 表达,发现能够抑制肿瘤异种移植小鼠模型体内肝癌细胞的增殖和迁移能力,降低其致癌性。因此,PPM1D 作为肝癌的一个潜在预后标志物和治疗靶点,它的功能及其参与的信号通路值得深入研究。本文使用生物信息学分析方法,研究 PPM1D 蛋白的理化性质、结构与功能,可为进一步研究 PPM1D 的作用机制及其作为肝癌治疗靶点提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以“PPM1D+物种名”为关键词,在美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)的 GenBank 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),搜索获得人 PPM1D 基因转录本序列和 PPM1D 蛋白的氨基酸序列信息。

1.2 方法

使用 Clustal2.1 (<http://www.clustal.org/download/current/>)进行 PPM1D 同源蛋白间的多重序列比对。使用 MEGA6 软件,Neighbor-joining 方法,Boot-strap 分析重复数设置为 1 000,构建系统进化树,并计算进化距离^[6]。使用 NCBI 的 UniGene 数据库中 EST 结果分析 PPM1D 的组织表达特异性,PSORTII(<https://psort.hgc.jp/>)进行亚细胞定位预测。使用 ExPASy 数据库中的 ProtParam 在线工具(<http://web.expasy.org/protparam/>)对 PPM1D 进行理化性质分析。使用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和 TMHMM 2.0 工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测 PPM1D 的信号肽和跨膜区域。使用 NetPhosK3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)和

PhosphoSitePlus 工具(<http://www.phosphosite.org/homeAction.action>)分析 PPM1D 的翻译后修饰情况。使用 SOPMA 工具(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)分析 PPM1D 的二级结构,NCBI 的 Conserved Domain 数据库分析结构域,SWISS-MODEL 建模服务器(<https://swissmodel.expasy.org/>)预测三维结构。使用 STRING 数据库(<http://string-db.org/>),构建与 PPM1D 相互作用的蛋白网络。

2 结果与分析

2.1 PPM1D 蛋白多序列比对和进化关系分析

在 NCBI 数据库中搜索到人 PPM1D 蛋白在哺乳动物、两栖类和鱼类中的同源序列。人 PPM1D 蛋白的氨基酸序列与黑猩猩、猕猴、野猪、小鼠、大鼠、鸡、非洲爪蟾、黄鳝和斑马鱼的相似性分别为 99.34%、98.51%、94.05%、89.13%、78.45%、73.38%、61.02%、54.75%和 50.94%。图 1 表明,人 PPM1D 蛋白与其他几种哺乳动物序列相似性较大,组成一支,而与两栖类和鱼类几种动物的序列相似性较小。人与黑猩猩的同源性最高,进化距离为 0.004,与野猪、小鼠和鸡的同源蛋白进化距离分别为 0.027、0.044、0.111,进化距离最远的是斑马鱼和黄鳝,分别为 0.323、0.305。由此推测,PPM1D 蛋白的同源性与其物种间亲缘关系呈正相关,亲缘关系越近,蛋白的同源性越高,提示该蛋白在物种进化过程中扮演一定角色。

2.2 PPM1D 的组织表达特异性、亚细胞定位、信号肽与跨膜结构域分析

根据 NCBI 的 UniGene 数据库中 EST 结果显示,PPM1D 在以下正常组织均有表达,拷贝数分别是:脑 34、睾丸 26、肺 10、肾 8、肠 8、子宫 8、胰腺 5、肝 1。由此推测,PPM1D 的组织表达特异性不强,在多数组织中均有表达。PSORTII 预测,PPM1D 定位于细胞核的可能性最大(60.9%),其次可能定位于细胞质(13.0%)、质膜(8.7%)、细胞骨架(8.7%)、分泌系统囊泡(4.3%)和高尔基体(4.3%)。由此推测,PPM1D 主要在细胞核中发挥生理功能,而在其他亚细胞结构中也可能动态存在。

SignalP 4.0 预测 PPM1D 蛋白不含切割位点,无信号肽序列如图 2 所示,说明该蛋白不是分泌蛋白。TMHMM 2.0 预测 PPM1D 无跨膜结构域如图 3 所示。图 3 中,红色细线、蓝色细线和粉色细线分别表示跨膜区域、膜内部分和膜外部分。图中 PPM1D 蛋白位于膜外的概率几乎为 100%,跨膜区域和位

于膜内的概率几乎为 0。蓝色细线与纵坐标为 0 的基线重叠。粉色粗线用来标识多肽链中跨膜区域所

在位置,因 PPM1D 蛋白没有跨膜区域,所以在粗线上没有相应标记。

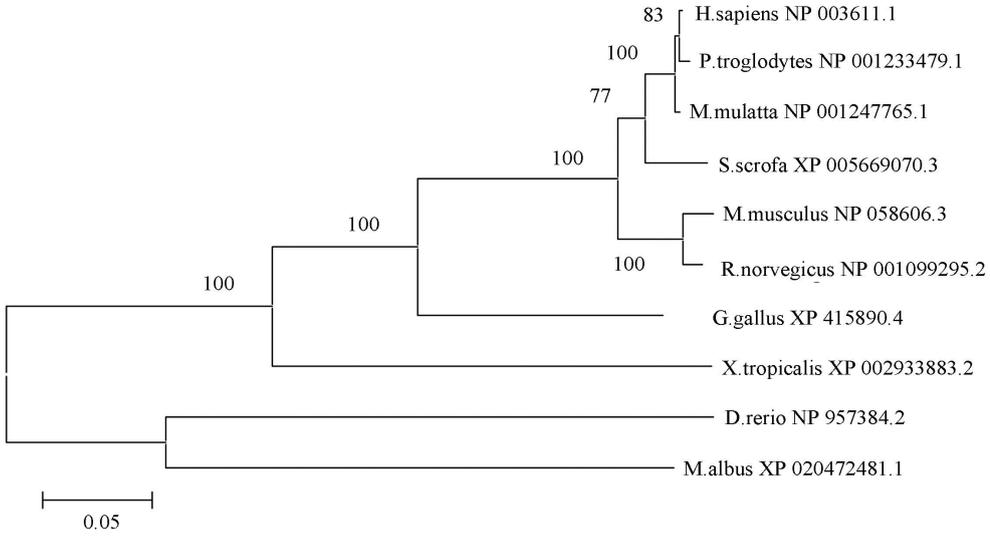


图 1 人 PPM1D 蛋白与其同源序列比对的系统进化树

Fig.1 The sequence alignment of human PPM1D protein and its homologous sequences

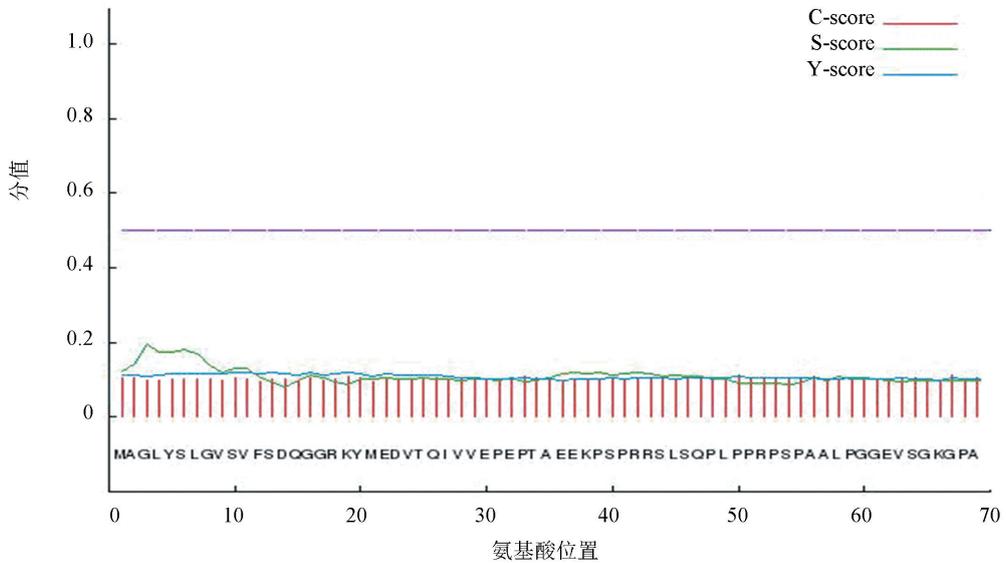


图 2 PPM1D 蛋白的信号肽分析结果

Fig.2 The analysis result of PPM1D signal peptide

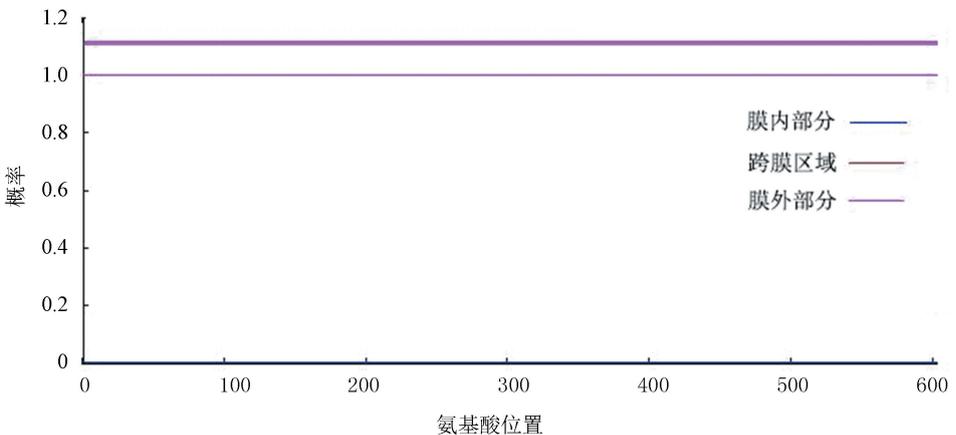


图 3 PPM1D 蛋白跨膜结构分析

Fig.3 Trans-membrane domain analysis of PPM1D

2.3 PPM1D 蛋白质的理化性质

人 PPM1D 基因(NM003620.3)位于 17 号染色体上(17q23.2),编码产物 NP_003611.1 为该基因的蛋白质共识编码序列。PPM1D 蛋白含有 605 个氨基酸,分子式为 $C_{2905}H_{4669}N_{857}O_{880}S_{31}$,分子量为 66 675.1 Da,理论等电点预测为 9.14,属于碱性蛋白质。在哺乳动物网织红细胞内半衰期为 30 h,不

稳定系数为 56.41,属于不稳定蛋白质。脂肪系数为 72.99,总的平均亲水性为 -0.517 。ExPASy 数据库中的 ProtScale 在线工具预测,PPM1D 亲水性最强的位点是第 585 位的精氨酸,分值为 -2.878 ;疏水性最强的位点是第 372 位的缬氨酸,分值为 2.189。由图 4 可知,PPM1D 蛋白的亲水区域多于疏水区域,属于亲水蛋白质。

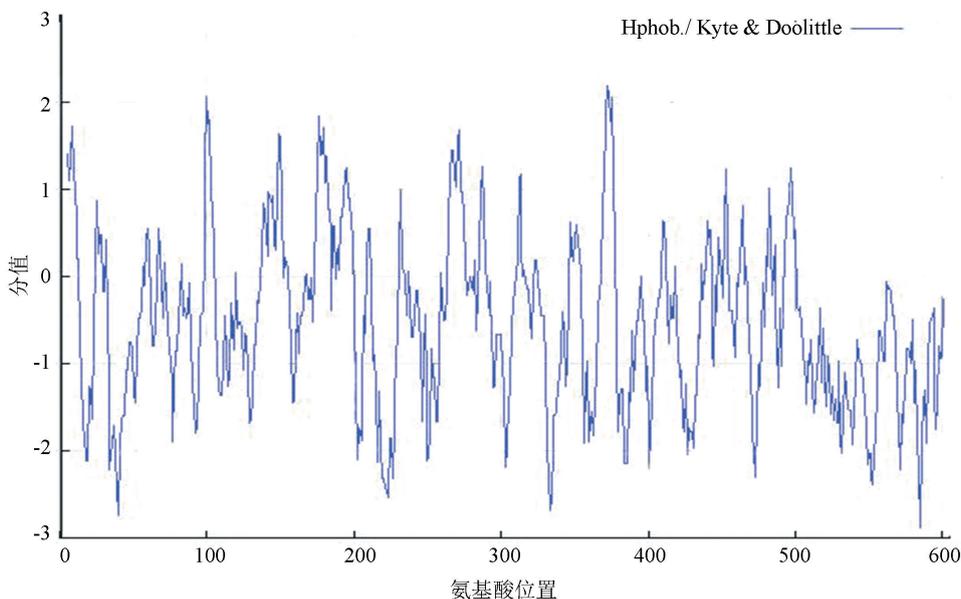


图 4 ProtScale 分析 PPM1D 蛋白的亲疏水性

Fig.4 Hydrophobicity profile of the PPM1D protein analyzed by ProtScale

2.4 PPM1D 蛋白质二级结构、三维结构预测及翻译后修饰分析

由图 5 知,在 PPM1D 蛋白质的二级结构中,随机卷曲(图中橘色)占 47.6%, α -螺旋(图中蓝色)占 23.8%,延伸链(图中红色)占 21.16%, β -转角(图中绿色)占 7.44%。NCBI 的 Conserved Domain 数据库预测 PPM1D 蛋白属于蛋白磷酸酶 2C (Protein phosphatase 2C, PP2C) 超家族的一员(如图 6 所示),PP2C 是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶。PPM1D 含有一个 PP2Cc (Complementary DNA encoding the isoform of protein phosphatase 2C) 结构域,PP2Cc 是约 42 kDa 的单体酶,含有约 390 个氨基酸,与 PP2C1 异构体相似性达 76%,其底物特异性

不强,活性依赖于二价阳离子(主要是锰和镁),确切的生理作用尚不清楚^[7]。使用 SWISS-MODEL 建模服务器预测 PPM1D 蛋白三维结构(如图 7 所示),序列与模板相似度为 30.09%,三维结构预测表明其符合 PP2C 结构域模型特点。

使用 NetPhosK 3.1 和 PhosphoSitePlus 分析 PPM1D 翻译后修饰情况,发现丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸位点能够被磷酸化。根据 PPM1D 能够使其相互作用蛋白发生去磷酸化,探索其磷酸化程度及动态变化能够加深对该蛋白功能的理解。此外,赖氨酸会发生乙酰化、甲基化和泛素化修饰,针对该蛋白如何发生泛素化及降解,可以进一步探索。

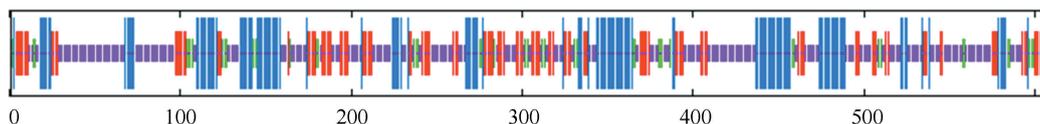


图 5 SOPMA 预测 PPM1D 蛋白二级结构

Fig.5 Predicted secondary structure of PPM1D protein by SOPMA

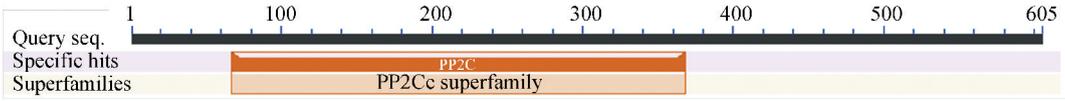


图 6 PPM1D 蛋白保守结构域

Fig.6 Conserved domain of PPM1D protein

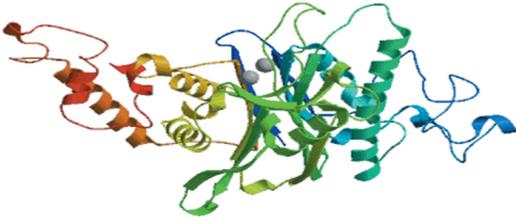


图 7 PPM1D 三维结构预测

Fig.7 Three dimensional structure prediction of PPM1D

2.5 PPM1D 蛋白质相互作用分析

利用 STRING 数据库搜索与 PPM1D 相互作用的蛋白质信息,设置为高置信度 0.7,数量限制在 10 个以内,构建 PPM1D 蛋白相互作用网络如图 8 所示。与 PPM1D 相互作用的蛋白主要有 TP53、ATM (ataxia telangiectasia mutated)、MDM2 (murine double minute 2)、CHEK1 (checkpoint kinase 1)、CHEK2 (checkpoint kinase 1)、RIPK4 (receptor interacting protein kinase 4) 和 APPBP2 (Amyloid beta precursor protein (cytoplasmic tail) binding protein 2)。值得关注的是,互作蛋白中包括 MDM2、RIPK4 和 APPBP2。

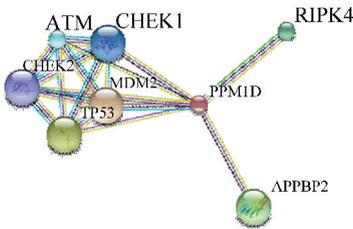


图 8 STRING 预测 PPM1D 蛋白相互作用网络

Fig.8 Protein-protein interaction network for PPM1D predicted by STRING

3 讨论

对于肿瘤患者,肿瘤抑制基因 p53 通常发生突变或表达受到抑制,研究者曾一度尝试通过逆转 p53 的肿瘤抑制活性进行癌症治疗。PPM1D 能够由 p53 激活表达,其产物作为一种丝氨酸/苏氨酸磷酸酶,是细胞生长和应激反应的重要调控分子,能够使关键的细胞周期检查点蛋白和细胞损伤修复相关蛋白(如:p53、ATM、p38MAPK 等)去磷酸化,从而

抑制相关蛋白表达,在肿瘤发生发展过程中发挥作用。PPM1D 能够以 p53 依赖的方式,在电离辐射和紫外线等胁迫环境下表达^[8]。通过使 p38 MAPK 第 180 位苏氨酸残基去磷酸化,PPM1D 能够调节 p38 MAPK 信号通路,抑制 p38 MAPK 的激酶活性和 p53 的肿瘤抑制活性^[9-10]。另外,PPM1D 能够抑制 p16INK4A 和 p19ARF 等肿瘤抑制因子的活性^[5],也能够与 RAS、MYC 和 ERBB2 等致癌基因协同作用^[11-12]。由此可知,PPM1D 能够负反馈调节 p53,PPM1D 受 p53 激活后,其产物又能使 p53 去磷酸化,发挥拮抗作用^[9]。在肿瘤组织中,PPM1D 通常过量表达。但是,若 PPM1D 的 3' 端编码区发生截短突变,其负调控活性会受到影响^[13-14]。

本文通过 STRING 预测知 PPM1D 与 MDM2 存在相互作用。除 PPM1D 以外,MDM2 也能由 p53 激活表达,作为一种负调控因子的 MDM2 是一种 E3 泛素连接酶,能够导致 p53 泛素化,蛋白酶体发生降解^[15-16]。在多种恶性肿瘤中都发现 MDM2 过量表达。Sriraman 等^[17]认为 MDM2 和 PPM1D 拥有不同的拮抗机制,单独靶向其一都不足以完全激活 p53。研究发现,同时使用这两种分子各自的靶向药物 (Nutlin-3a 和 GSK2830371) 处理肿瘤细胞,能够显著增强 p53 活性,抑制或阻滞肿瘤进程。目前,联合用药已成为肿瘤药物治疗的研究热点。若两种或药物协同作用,使用联合治疗法能够增强疗效,降低每种药物的副作用。针对 PPM1D 与 MDM2 联合用药的显著疗效,有望为下一步开发联合用药策略提供思路。

STRING 预测知 APPBP2 能够与 PPM1D 相互作用。Hirasawa 等^[18]发现 APPBP2 和 PPM1D 在卵巢透明细胞癌中都过量表达,可作为潜在靶点和预后标志物。因此,PPM1D 与相互作用蛋白之间的关系及参与的具体生理生化过程具有一定的研究价值,有助于阐明 PPM1D 的作用机制和生理功能。

4 结论

1) PPM1D 的理论分子量为 66.6751 kDa,理论等电点为 9.14,预测为碱性蛋白质。不稳定系数为 56.41,预测为不稳定蛋白质。脂肪系数为 72.99,总

平均亲水性为-0.517,预测为亲水蛋白质。

2) PPM1D 的二级结构主要为随机卷曲,属于 PP2C 超家族,含有一个 PP2Cc 结构域。无信号肽和跨膜结构域,含有磷酸化、乙酰化、甲基化和泛素化修饰位点。该蛋白表达的组织特异性不强,定位于细胞核的可能性较大。系统进化树显示,人 PPM1D 蛋白与哺乳动物(如:黑猩猩、猕猴)序列相似性较大,组成一支,而与两栖类和鱼类(如:非洲爪蟾、斑马鱼)的序列相似性较小,该蛋白的同源性与其物种间亲缘关系呈正相关。与 PPM1D 相互作用的蛋白主要是细胞周期检查点蛋白(如:CHEK1、CHEK2)和细胞损伤修复相关蛋白(如:p53、ATM、p38MAPK)。

3) 本文通过生物信息学方法,构建 PPM1D 的系统进化树,分析 PPM1D 蛋白的理化性质、组织特异性、亚细胞定位、结构域及相互作用蛋白质,为全面认识 PPM1D,研究其功能及参与的具体信号通路提供一定的参考。

参考文献 (References)

- [1] LI Guangbing, ZHANG Xueli, YUAN Li, et al. Protein phosphatase magnesium-dependent 1d (PPM1D) mRNA expression is a prognosis marker for hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e60775. DOI: 10.1371/journal.pone.0060775.
- [2] XU Zhi, CAO Chunxiang, XIA Haiyan, et al. Protein phosphatase magnesium-dependent 1δ is a novel tumor marker and target in hepatocellular carcinoma [J]. *Frontiers of Medicine*, 2016, 10(1): 52-60. DOI: 10.1007/s11684-016-0433-3.
- [3] BIEGING K T, MELLO S S, ATTARDI L D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumor suppression[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2014, 14(5): 359-370. DOI: 10.1038/nrc3711.
- [4] KOOM W S, PARK S Y, KIM W, et al. Combination of radiotherapy and adenovirus-mediated p53 gene therapy for MDM2-overexpressing hepatocellular carcinoma [J]. *Journal of Radiation Research*, 2012, 53(2): 202-210. DOI: 10.1269/jrr.11110.
- [5] BULAVIN D V, PHILLIPS C, NANNENGA B, et al. Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16 (Ink4a)-p19 (Arf) pathway [J]. *Nature Genetics*, 2004, 36(4): 343-350. DOI: 10.1038/ng1317.
- [6] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599. DOI: 10.1093/molbev/msm092.
- [7] WENK J, TROMPETER H I, PETTRICH K G, et al. Molecular cloning and primary structure of a protein phosphatase 2C isoform [J]. *FEBS Letters*, 1992, 297(1/2): 135-138. DOI: 10.1016/0014-5793(92)80344-G.
- [8] FUKAMI S, RIEMENSCHNEIDER M J, KOHNO M, et al. Expression and gene doses changes of the p53-regulator PPM1D in meningiomas: a role in meningioma progression? [J]. *Brain Tumor Pathology*, 2016, 33(3): 191-199. DOI: 10.1007/s10014-016-0252-x.
- [9] TAKEKAWA M, ADACHI M, NAKAHATA A, et al. p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation [J]. *EMBO Journal*, 2000, 19(23): 6517-6526. DOI: 10.1093/emboj/19.23.6517.
- [10] BULAVIN D V, DEMIDOV O N, SAITO S, et al. Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity [J]. *Nature Genetics*, 2002, 31(2): 210-215. DOI: 10.1038/ng894.
- [11] DUDGEON C, SHREERAM S, TANOUE K, et al. Genetic variants and mutations of PPM1D control the response to DNA damage [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(16): 2656-2664. DOI: 10.4161/cc.25694.
- [12] MA Dan, ZHANG Chaojun, CHEN Zulin, et al. Prognostic value of PPM1D in 800 gastric cancer patients [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 10(1): 191-194. DOI: 10.3892/mmr.2014.2165.
- [13] KLEIBLOVA P, SHALTIEL I A, BENADA J, et al. Gain-of-function mutations of PPM1D/Wip1 impair the p53-dependent G1 checkpoint [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2013, 201(4): 511-521. DOI: 10.1083/jcb.201210031.
- [14] RUARK E, SNAPE K, HUMBURG P, et al. Mosaic PPM1D mutations are associated with predisposition to breast and ovarian cancer [J]. *Nature*, 2013, 493(7432): 406-410. DOI: 10.1038/nature11725.
- [15] WADE M, LI Yaocheng, WAHL G M. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2013, 13(2): 83-96. DOI: 10.1038/nrc3430.
- [16] KHOO K H, VERMA C S, LANE D P. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2014, 13(3): 217-236. DOI: 10.1038/nrd4236.
- [17] SRIRAMAN A, RADOVANOVIC M, WIENKEN M, et al. Cooperation of Nutlin-3a and a Wip1 inhibitor to induce p53 activity [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22): 31623-31638. DOI: 10.18632/oncotarget.9302.
- [18] HIRASAWA A, SAITO-OHAR F, INOUE J, et al. Association of 17q21-q24 gain in ovarian clear cell adenocarcinomas with poor prognosis and identification of PPM1D and APPBP2 as likely amplification targets [J]. *Clinical Cancer Research*, 2003, 9(6): 1995-2004.