

DOI号: 10.3724/SP.J.0000.2009.61095

蛋白磷酸酶-2Ac在不同倍性鱼 6种组织中的分化表达模式

刘文彬¹ 王道¹ 周洁¹ 肖亚梅¹ 刘少军¹ 刘筠¹ 李万程^{1,2}

(1 湖南师范大学生命科学学院, 蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室, 长沙 410081; 2 Departments of Biochemistry and Molecular Biology
Ophthalmology and Visual Sciences University of Nebraska Medical Center Omaha, Nebraska 68198-5870 USA)

摘要: 蛋白磷酸酶-2A 是最重要的丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶之一, 对于调控多细胞的生命活动起着非常重要的作用。以异源四倍体鲫鲤及其二倍体父/母本(湘江野鲤/红鲫)和子代三倍体湘云鲫等为实验材料, 运用 Western blot技术及荧光免疫组织化学技术等实验手段, 得到了 Protein Phosphatase-2A (PP2A)的催化亚基在上述不同倍性鱼体内 6种不同组织的表达模式: Protein Phosphatase-2A c (PP2A c) 在异源四倍体鲫鲤及其二倍体父/母本及子代三倍体湘云鲫不同组织中蛋白水平均有表达, 而且出现了明显的种属特异性和组织特异性, 如在大脑、肌肉、肝脏三组织中, 三倍体湘云鲫中 PP2A c 的表达相对最高。而在肾脏组织中, PP2A c 在异源四倍体鲫鲤中的表达水平最高, 父本与三倍体湘云鲫中的表达比较相近, 且最低; 而在性腺组织中则是父本精巢中的表达最高; 在心脏组织中, PP2A c 在母本红鲫中的表达相对较高。这种明显的种属之间组织特异性可能说明了子代与父母本之间的变异性。荧光免疫组化实验结果显示, 从整体水平来看, 4种不同鱼的同一组织中, PP2A c 的相对定位是非常相似的, 这可能说明了异源四倍体鲫鲤与其二倍体父/母本及子代三倍体湘云鲫之间的遗传相似性。研究结果为进一步探索 PP2A c 在脊椎动物不同组织中的功能提供了实验依据。

关键词: 蛋白磷酸酶-2A c; 去磷酸化; 基因表达; 不同倍性鱼

中图分类号: Q344⁺.13 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)06-1095-10

蛋白丝氨酸/苏氨酸位点的磷酸化和去磷酸化作用, 是调控主要细胞生命活动过程的重要生物化学事件。Protein Phosphatase-2A (PP2A)是哺乳动物中含量最丰富的丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白磷酸酶之一, 大约占细胞总蛋白量的 0.3%。PP2A 在许多生命活动过程中扮演了重要的角色, 如参与细胞的生长、分化、衰老和凋亡及有机体的形态发生及器官形成的调控^[1]。通过对蛋白激酶的修饰作用, PP2A 参与信号通路的调控, 从而对基因的表达及上述的各种生命过程起着重要的作用^[2-4]。

有关 PP2A 的功能研究已有一些报道, 但大多数的研究是以细胞为材料。对于 PP2A 在脊椎动物体内的功能, 尤其是低等的脊椎动物如鱼类的功能有待进一步探讨。为此我们以本实验室特有的异源四倍体鲫鲤^[5,6]、湘江野鲤^[7,8]和红鲫^[9] (异源四倍

体鲫鲤的父母本)及三倍体湘云鲫^[10]为研究对象, 探索了丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白磷酸酶 PP2A 催化亚基在 6种组织中的表达水平及其细胞定位, 其结果为研究蛋白磷酸酶 PP2A 在低等脊椎动物体内的功能机制提供了有价值的试验数据, 同时为研究异源四倍体鲫鲤及其二倍体父/母本和子代之间的遗传和变异关系提供了相关的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 异源四倍体鲫鲤、湘江野鲤和红鲫(即异源四倍体鲫鲤的父/母本)及三倍体湘云鲫(即异源四倍体鲫鲤与湘江野鲤或红鲫的杂交后代)均取自于湖南师范大学国家四倍体鱼种质资源保护基地, 其中异源四倍体鲫鲤为湘江野鲤和红鲫的杂交 F14。选取相同育龄(一龄)的实验鱼提取蛋白质。

收稿日期: 2008-08-04 修订日期: 2008-11-08

基金项目: 教育厅优秀青年资助项目(08B048); 教育部长江学者及创新团队计划基金(IRT0445); 湖南省“芙蓉学者”特聘教授基金(24030604)资助

作者简介: 刘文彬(1972—), 女, 汉族, 湖南新化人; 博士, 副教授; 研究方向为鱼类生殖生理和发育生物学及细胞凋亡机制的研究。E-mail liuwenbin@163.com

通讯作者: 李万程, 男, 汉族, 湖南衡山人; 博士, “芙蓉”学者特聘教授, 博士生导师; 研究方向为发育生物学和分子细胞生物学。E-mail dwl1688@hotmail.com

1.2 方法

1.2.1 Western blot技术定量检测 Protein Phosphatase-2A c (PP2Ac)在不同倍性鱼 6种组织中蛋白水平的表达模式 取异源四倍体鲫鲤、湘江野鲤和红鲫及三倍体湘云鲫各数条, 剪鳃放血 10m in 迅速解剖后取大脑、心脏、肌肉、肾脏、肝脏和性腺, 用液氮研磨至粉末状以后加入 0.3 mL至 1 mL蛋白质抽提缓冲溶液(每 100 mL蛋白抽提液含: NP-40 1 mL、10% SDS 1 mL、0.5 mol/L Na₂HPO₄ 1.82 mL、0.5 mol/L NaH₂PO₄ 588 μL、5 mol/L NaCl 3 mL、10 mmol/L PMSF 10 mL、5 mg/mL Leupeptin 100 μL、Na-dexycholate 5 mL), 4°C下 12000 r/m in 离心 20m in, 取上清液。采用文献 [11, 12]进行总蛋白浓度测定和 Western blot分析。

1.2.2 荧光免疫组织化学技术确定 PP2Ac在不同倍性鱼 6种组织中的定位分布 取异源四倍体鲫鲤、湘江野鲤和红鲫及三倍体湘云鲫各数条, 剪鳃放血 10m in 迅速解剖后取大脑、心脏、肌肉、肾脏、肝脏和性腺, 剪适当大小的组织块固定于波恩氏液中, 24h后更换成 70% 的酒精。本实验采用异硫氰酸荧光素染色 (FITC) 法。免疫组化试剂购自广州中山生物有限公司, 一抗购自美国 Santa Cruz公司, 带有荧光素的二抗购自美国 Vector公司。预先做好常规的石蜡包埋和切片, 然后把干燥无水气的载玻片浸入纯二甲苯中脱蜡, 待载玻片上的蜡条完全脱落, 将载玻片置入纯酒精中, 用纯酒精置换出组织中的二甲苯。经酒精逐级复水后, 放入 10 mmol/L 柠檬酸钠 (pH= 6.0) 中煮沸 10m in 使抗原充分暴露, 冷却至室温, 蒸馏水洗涤 3次后, 用 10% 的过氧化氢于室温下反应 10 m in 以消除内源性过氧化物酶的作用。PBS 洗涤后, 用 5% 山羊血清封闭液室温下作用 1h, 吸干多余液体, 滴加 300 μL一抗溶液 (1% 山羊血清配制), 平放在湿盒中, 于 4°C过夜。PBS 洗涤, 避光环境下滴加 300 μL二抗溶液 (1% 山羊血清配置), 室温下反应 2h, PBS 避光洗涤, 去除多余的二抗。NIKON E600 荧光显微镜下观察拍照。以 1% 山羊血清代替一抗作为阴性对照。

2 结 果

2.1 PP2Ac 在不同倍性鱼 6种组织中 Western blot结果

为了确定 PP2Ac在同倍性鱼 6种组织中蛋白水平相对表达, 我们利用 Western blot技术对其进行了测定, 结果如图 1与图 3为了更具体和直观的观察两蛋白磷

酸酶的表达含量, 我们又利用 Geopro32 SigmaPlot软件对图 1与图 3进行了半定量分析, 结果如图 2与图 4

图 1显示, 在心脏和肌肉两组织中, 磷酸化 (上带) 和非磷酸化 (下带) 的 PP2Ac两条带都很清晰, 说明 PP2Ac以非活性和活性两种状态存在, 而大脑组织中却有明显的表达差异, 磷酸化状态表达明显, 而非磷酸化状态的表达则几乎检测不到。图 1和图 2结果表明 PP2Ac在异源四倍体鲫鲤及其二倍体父/母本和子代三倍体湘云鲫的心脏组织中的表达水平相对较高, 在大脑与肌肉组织中表达水平相对比心脏组织中的弱, 但三倍体湘云鲫肌肉组织除外, PP2Ac在其肌肉组织中的表达反而很强烈。从这 4 种不同鱼的同一组织中来看, PP2Ac在不同鱼中的表达存在较明显的差异。在大脑组织中, 异源四倍体鲫鲤的 PP2Ac表达水平最低, 母本中的表达水平稍高, 父本中的相对表达含量又有所上升, 其子代三倍体湘云鲫中的表达最高。PP2Ac在这 4 种不同鱼的心脏组织中的表达也有较大的差异, 其中 PP2Ac在母本红鲫中的表达最高, 父本湘江野鲤中的表达次之, 而子代三倍体湘云鲫中 PP2Ac的表达相对最低。PP2Ac在异源四倍体鲫鲤及父本/母本肌肉组织中的表达水平非常接近, 但子代三倍体湘云鲫中的表达显著高于前三者, 是异源四倍体鲫鲤父本/母本中的表达水平的 3倍左右。

而图 3结果显示, 磷酸化状态在这 4种鱼的 3 种组织中都有较强烈的表达, 但非磷酸化状态主要出现在母本红鲫和父本湘江野鲤中, 异源四倍体鲫鲤中非磷酸化状态的 PP2Ac几乎检测不到, 三倍体湘云鲫中有较弱的表达 PP2Ac。图 4表明在此 4 种不同倍性鱼性腺组织中表达水平相对高于肾脏与肝脏两组织。在同一肾脏组织中 PP2Ac在异源四倍体鲫鲤中的表达水平最高, 母本红鲫中的表达相对低于异源四倍体鲫鲤, 父本与三倍体湘云鲫中的表达比较相近, 且最低。在肝脏组织中 PP2Ac的表达水平整体都低于肾脏与性腺两组织。结果表明 PP2Ac在湘江野鲤中表达最低, 异源四倍体鲫鲤与三倍体湘云鲫中的表达相对最高, 是父本湘江野鲤中的 6.5倍左右, 母本红鲫中的表达次之。PP2Ac在这 4 种不同鱼的性腺组织中的表达差异也相对较大, 其中 PP2Ac在异源四倍体鲫鲤 (精巢) 中的表达最低, 父本精巢中的表达最高, 是异源四倍体鲫鲤中的表达水平的 11倍左右, 母本 (卵巢) 与子代三倍体湘云鲫 (卵巢型性腺) 中的表达水平居于异源四倍体鲫鲤与父本之间, 且两者的表达水平非常接近。

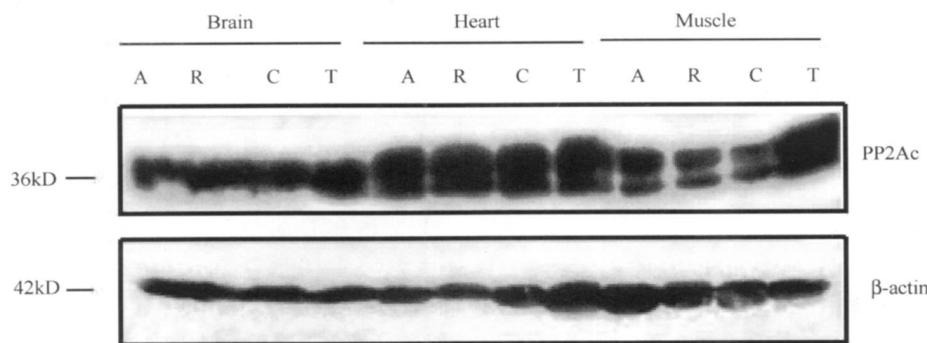


图1 PP2Ac在4种不同倍性鱼的大脑、心脏和肌肉组织中的表达

Fig. 1 Protein expression levels of PP2Ac in brain, heart and muscle of 4 different ploid fish

A:异源四倍体鲫鲤; R:红鲤; C:湘江野鲤; T:三倍体湘云鲤; PP2A、β-actin一抗稀释比例均为1:1000;所有二抗稀释比例均为1:1000;

Brain:大脑;Heart:心脏;Muscle:肌肉

A:Allotetraploid fish;R:Red crucian carp;C:Common carp T:Triploid crucian carp; Dilution of Anti-PP2Ac, and β-actin antibodies;1:1000; Dilution of all the secondary antibodies;1:1000

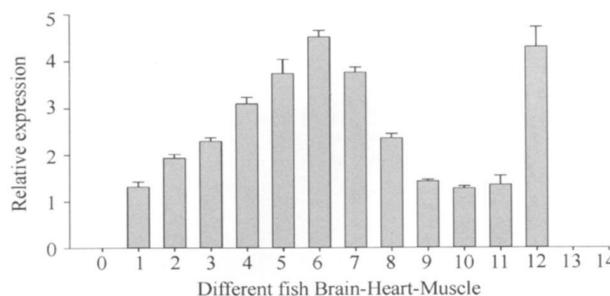


图2 PP2Ac在4种不同倍性鱼大脑、心脏和肌肉组织中的半定量分析

Fig. 2 Semi-quantitation of protein expression levels of PP2Ac in brain, heart and muscle of 4 different ploid fish

1,5,9:异源四倍体鲫鲤;2,6,10:红鲤;3,7,11:湘江野鲤;4,8,12:三倍体湘云鲤;1—4代表大脑;5—8代表心脏;9—12代表肌肉

1,5,9:Allotetraploid fish;2,4,6:Red crucian carp;3,7,11:Common carp;4,8,12:Triploid crucian carp. 1—4:heart; 5—8:brain; 9—12:muscle

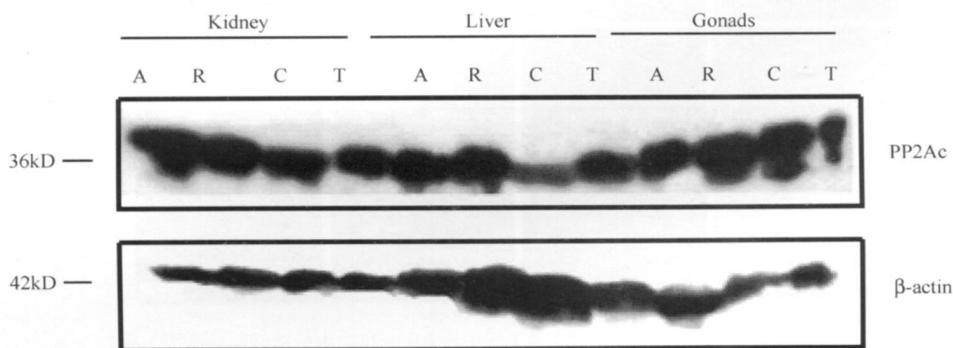


图3 PP2Ac在不同倍性鱼肾脏、肝脏和性腺组织中的表达

Fig. 3 Protein expression levels of PP2Ac in kidney, liver and gonads of 4 different ploid fish

A:异源四倍体鲫鲤; R:红鲤; C:湘江野鲤; T:三倍体湘云鲤; PP1、PP2A、β-actin一抗稀释比例均为1:1000;所有二抗稀释比例均为1:1000; Kidney:肾脏;Liver:肝脏;Gonads:性腺

A:Allotetraploid fish;R:Red crucian carp;C:Common carp;T:Triploid crucian carp; Dilution of Anti-PP2Ac and β-actin antibodies;1:1000; Dilution of all the secondary antibodies;1:1000

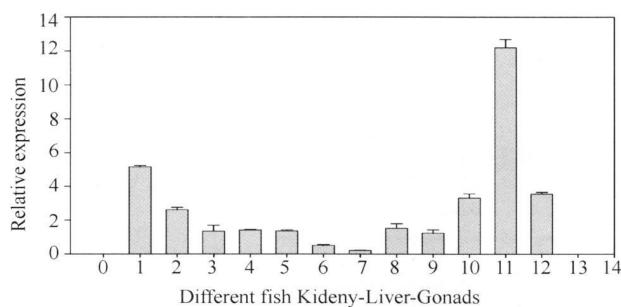


图 4 PP2A c 在 4 种不同倍性鱼的肾脏、肝脏和性腺组织中的半定量分析
Fig. 4 Semiquantitation of protein expression levels of PP2A c in kidney, liver and gonads of 4 different ploid fish

1—5 9 异源四倍体鲫鲤; 2—10 红鲫; 3—7 11: 湘江野鲤; 4, 8, 12 三倍体湘云鲫; 1—4 代表肾脏; 5—8 代表肝脏; 9—12 代表性腺
1—5, 9 A lb tetraploid fish 2, 4—6 Red crucian carp 3—7, 11: Common carp 4—8, 12: Triploid crucian carp 1—4: kidney; 5—8: liver
9—12: gonads

2.2 PP2A c 在不同倍性鱼 6 种组织中的定位

实验结果显示: 在 4 种鱼的脑组织中, 神经细胞

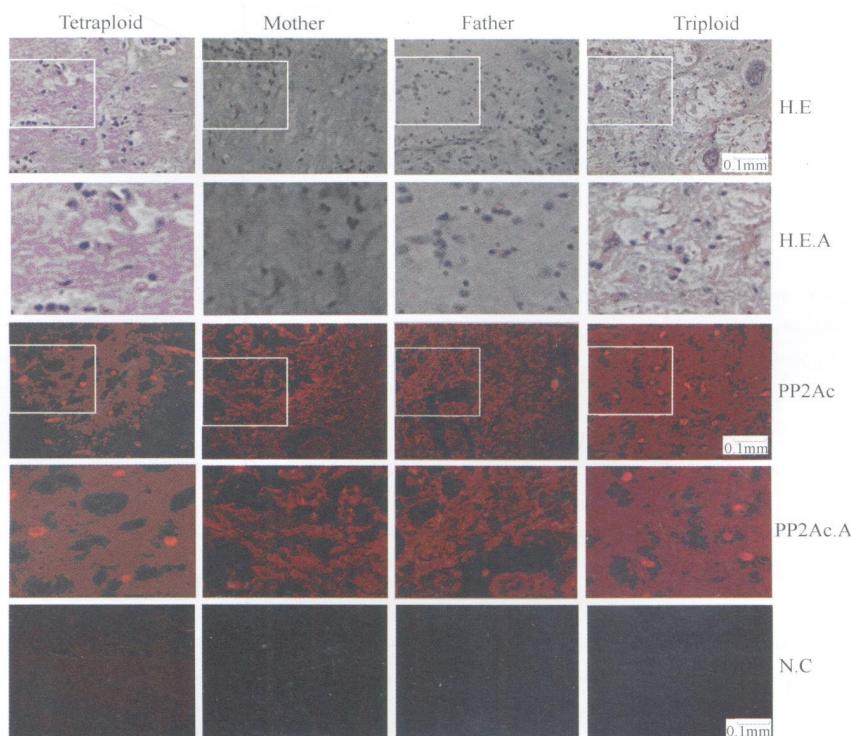


图 5 PP2A c 在 4 种不同倍性鱼大脑组织中的定位

Fig. 5 The localization of PP2A c in the brain of 4 different ploid fish

Tetraploid 异源四倍体鲫鲤; Mother 红鲫; Father 湘江野鲤; Triploid 三倍体湘云鲫; PP2A c—抗稀释比例为 1:300 二抗稀释比例均为 1:500; 图片 H.E., PP2A c, N.C 放大倍数均为 Bar= 0.1mm; 图片 H.E.A. 与 PP2Ac.A 分别为 H.E., PP2Ac 中描边部位的放大, 放大倍数均为 4X, N.C 为阴性对照; 下同

Four different ploidy level fish used Tetraploid, Mother (Red crucian carp), Father (Common carp), and Triploid. Dilution of anti-PP2Ac c antibody: 1:300. Dilution of the secondary antibody: 1:500. The magnification for figures in row H.E., PP2Ac, and N.C. Bar= 0.1mm. The figures in row H.E.A. and PP2Ac.A are amplified from the bordered region of the corresponding figures in row H.E. and PP2Ac.N.C: negative control. The same as follows.

和神经胶质细胞胞质有较强的荧光染色。PP2A c 在这些细胞的细胞核中的表达相对较低(图 5)。此外, 在异源四倍体鲫鲤和三倍体湘云鲫的脑组织中有部分的神经细胞胞核染色特别强烈, 这表明 PP2A c 的活性很强。对于心脏组织, PP2A c 主要表达在心肌纤维中, 而心肌细胞核中的表达则比胞质中稍微强烈(图 6)。在肌肉组织中, 可以观察到肌纤维中荧光着色较强, 因此 PP2A c 主要在肌纤维中表达(图 7)。在肾脏组织中, PP2A c 主要分布在肾小管管壁立方状上皮细胞的胞质中, 而在其核中的荧光染色则相对较暗, 表明 PP2A c 活性较低(图 8)。在肝脏组织中, 表达荧光信号的细胞排列成索状, PP2A c 主要表达在肝细胞质中, 而肝细胞核中则表达较弱。此外, 肝索之间的微细血管和微细胆管有较强的荧光信号(图 9)。

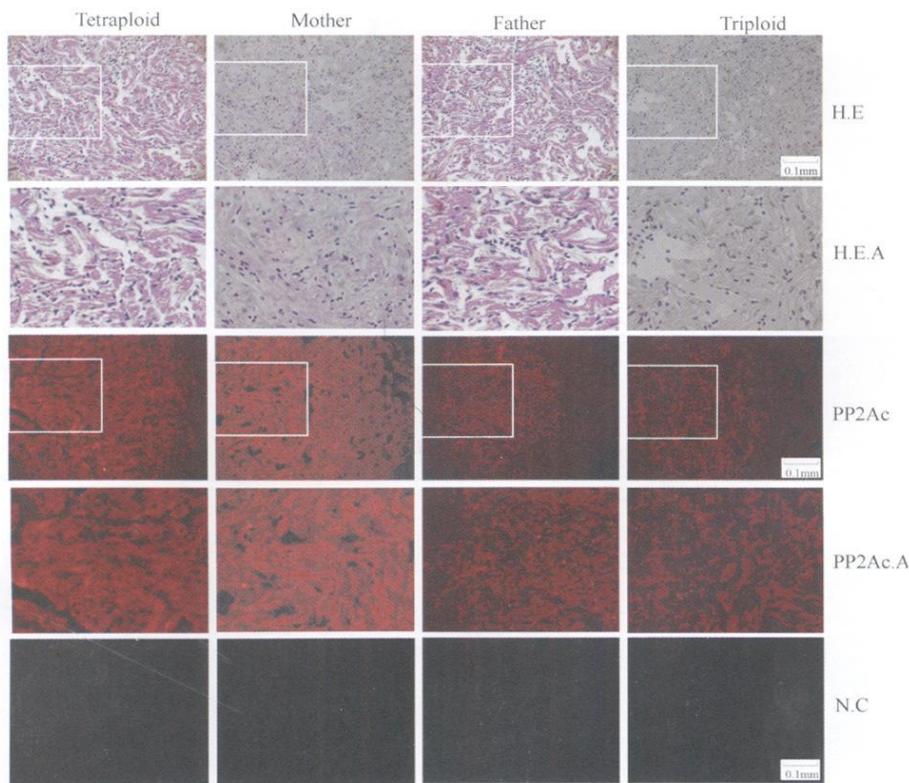


图 6 PP2Ac 在 4 种不同倍性鱼心脏组织中的定位

Fig. 6 The localization of PP2Ac in the heart of 4 different ploid fish

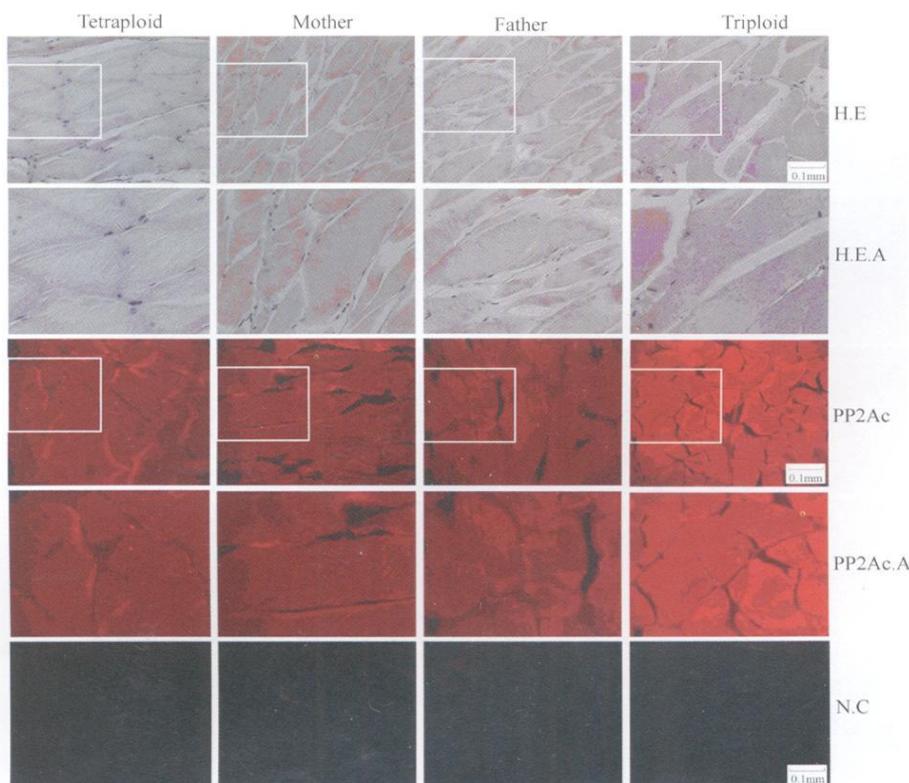


图 7 PP2Ac 在 4 种不同倍性鱼肌肉组织中的定位

Fig. 7 The localization of PP2Ac in the muscle of 4 different ploid fish

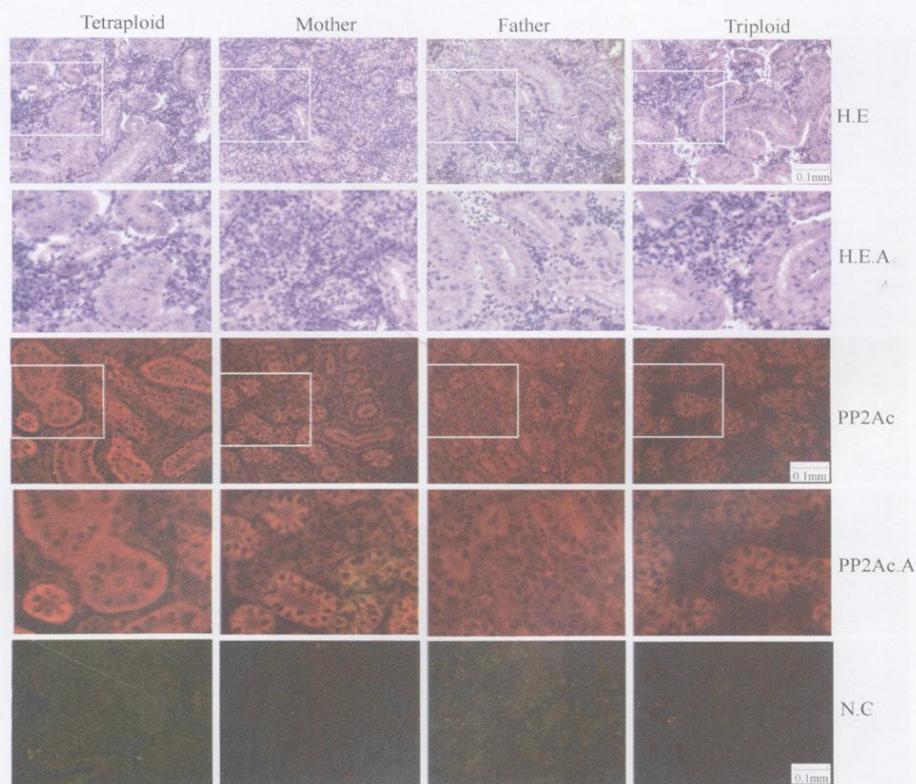


图 8 PP2Ac 在 4 种不同倍性鱼肾脏组织中的定位

Fig. 8 The localization of PP2Ac in the kidney of 4 different ploid fish

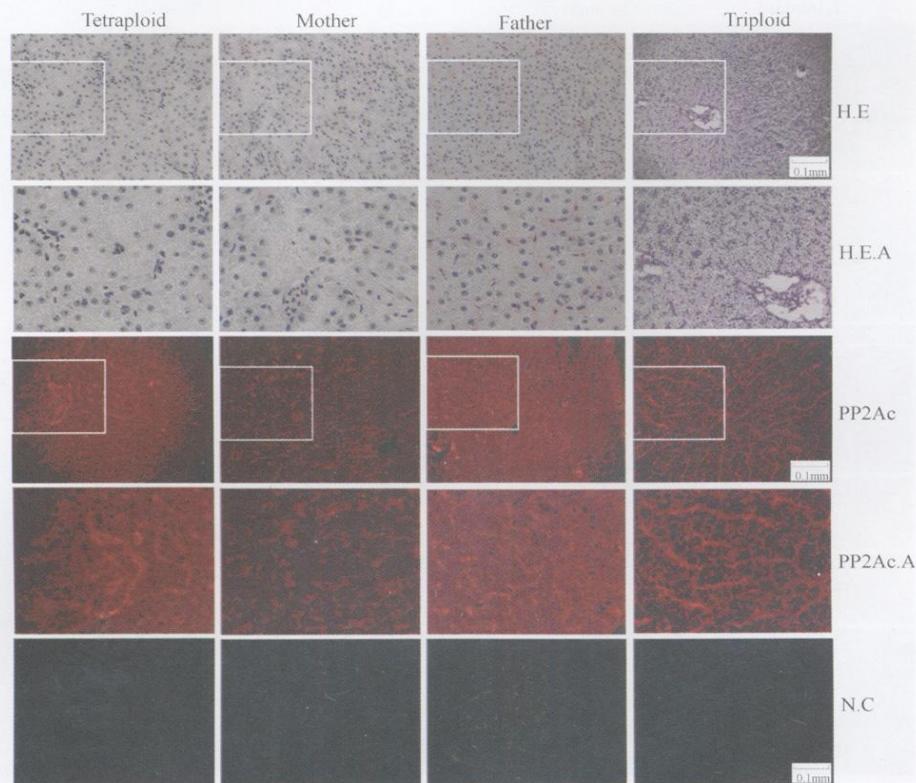


图 9 PP2Ac 在 4 种不同倍性鱼肝脏组织中的定位

Fig. 9 The localization of PP2Ac in the liver of 4 different ploid fish

从图 10 中的 HE 染色图片可以看出,母本红鲫的卵巢发育正常,卵巢中主要存在Ⅰ时相和Ⅳ时相的细胞。对于Ⅰ和Ⅳ时相细胞,PP2Ac 主要表达在卵细胞膜及卵细胞核中。而在滤泡细胞中,PP2Ac 则表达在细胞膜上。用于本实验的子代三倍体湘云鲫性腺为卵巢型,且发育并不完全,在相同的放大倍数的视野中,只有一个Ⅰ时相的卵母细胞,PP2Ac 的表达主要集中在卵细胞膜上。同时可以观察到,父本湘江野鲤的精巢发育良好,精细小管中有许多生

精细胞和成熟的精子。荧光染色图片显示在曲精小管之间的管壁、曲精小管之间的结缔组织、间质细胞和部分的精原细胞中荧光染色较强,但成熟的精子荧光染色则相对较暗(图 10)。

因此从整体水平来看,4 种不同鱼的同一组织 PP2Ac 的表达模式是非常相似的。但同一组织的不同细胞的具体表达部位是有差异的,具有明显的细胞特异性。

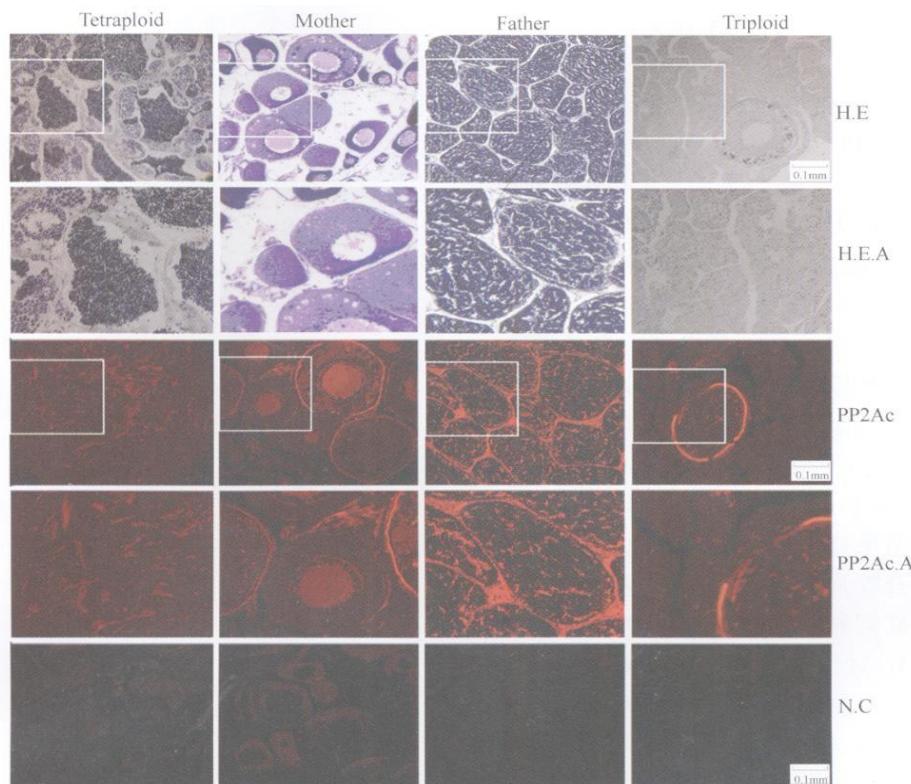


图 10 PP2Ac 在 4 种不同倍性鱼性腺组织中的定位

Fig 10 The localization of PP2Ac in the gonads of 4 different ploid fish

3 讨 论

3.1 PP2A 催化亚基的磷酸化状态与组织分布的关系

磷酸化与非磷酸化是一项非常重要的蛋白质修饰过程,它可以使蛋白质构象发生改变,产生新的识别序列,便于与其他蛋白质发生相互作用。磷酸化同样能调控蛋白质的稳定性以及酶的活性。它涉及了细胞信号传导、神经活动、肌肉收缩以及细胞的增殖、生长和分化等生理过程。PP2A 是一个主要的丝氨酸/苏氨酸型蛋白磷酸酶,在真核细胞中,从酵母到脊椎动物都广泛的表达^[1-4]。它由三个亚基构

成:一个 36 kD 的催化亚基 C,一个 65kD 的支架亚基 A 和一个调节亚基 B^[4,13-15]。PP2A 的 ABC 三聚体全酶由亚基之间的相互作用而结合在一起,PP2A 磷酸酶的支架亚基 A 和催化亚基 C 各自存在着两种异构体,即 α 和 β。而它的调节亚基至少有 16 个成员,可分为四亚类,分别为: B (PR55), B' (B56 或者 PR61), B'' (PR72) 和 B''' (PR93/PR110)^[1-4]。由于不同的调节亚基都能与 AC 结合,而 A 亚基和 C 亚基又都有各自的同源异构体,这使得 PP2A 磷酸酶全酶的结构变得异常复杂。结构的复杂性也导致了其功能的复杂性和多样性。PP2A 催化亚基以迁移率慢的磷酸化形式和迁移率

较快的非磷酸化形式出现。由于在 Thr304 和 Tyr307上的磷酸化阻碍了 PP2A 全酶的组合^[15], 所以磷酸化状态反应出其功能的变化。4种不同倍性鱼 6种组织 PP2A 催化亚基也出现磷酸化和非磷酸化两种状态, 而且这两种状态在不同倍性鱼的不同组织中具有表达差异。图 1显示, 在心脏和肌肉两组织中, 磷酸化和非磷酸化的 PP2Ac 两条带都很清晰, 而大脑组织中却有明显的表达差异, 磷酸化状态表达明显, 非磷酸化状态的表达几乎检测不到。这一结果表明, 在正常情况下 PP2A 在大脑中的功能是受到严格调节的。

3.2 PP2Ac在不同组织中的功能

已有研究表明, PP2A 参与信号传导的调节过程。Blanquet 报道蛋白激酶 CK2 参与了神经营养因子诱导的信号级联放大系统, 而且对控制海马神经细胞的突触生长可能起一定作用, 而蛋白磷酸酶 PP2A 可激活 CK2从而调节大鼠海马神经细胞的基因转录来维持较长时间的突触反应^[16]。蛋白磷酸酶 PP2A 的磷酸化抑制了它的活性, 因此大脑组织中只表达了磷酸化状态的 PP2Ac, 说明它对脊椎动物神经系统信号转导的调控也是受到严格调节的。

对于肾脏、肝脏和性腺 3种组织也出现了表达差异现象。图 3结果显示, 磷酸化状态在这 4种鱼的 3种组织中都有较强烈的表达, 但非磷酸化状态主要出现在母本红鲫和父本湘江野鲤中, 说明非磷酸化状态的 PP2Ac 对正常二倍体卵巢的发育和精子的发生是必须的。而异源四倍体鲫鲤中非磷酸化状态的 PP2Ac 几乎检测不到, 三倍体湘云鲫中有较弱的表达, 这可能说明了磷酸化状态的 PP2Ac 对多倍体性腺的发育或功能起着更关键的作用。这些结果也表明, PP2Ac 在不同倍性鱼不同组织中的表达具有明显的差异性和多样性, 这种差异性和多样性是与其功能相关联的。

不仅 PP2Ac 在不同倍性鱼不同组织中的磷酸化和非磷酸化状态有差异, 而且其表达水平也有着显著的不同。图 2显示, 对于肌肉组织, 三倍体湘云鲫中的表达含量远远超出其他三种鱼的表达。我们知道, 三倍体湘云鲫相对异源四倍体鲫鲤和父母本等肉质更鲜美, 生长更快速, 抗病能力更强, PP2Ac 的这种显著表达可能与它的这些特性相关。在性腺组织中, 这种差异也很明显, PP2Ac 在父本湘江野鲤中表达特别高, 也进一步说明了 PP2Ac 对精巢的发育和精子发生起着重要的调节作用。

当然 PP2Ac 在脊椎动物的其他组织和器官中

也有着重要的作用, 研究表明 PP2A 对心脏功能有着重要的调节作用, 它可使肌钙蛋白 I、ATP 敏感的 K⁺通道去磷酸化而调节心脏功能^[17]。同时过表达 PP2A 的 A 亚单位的 Dominant negative mutant(负显性突变体) 或其活性代替物 PP2B, 可诱导心肌的肥大^[18~19]。在眼睛晶状体中, PP2A 也似乎发挥着重要的功能, Kan torow, et al. 研究发现在人的白内障晶体中, PP2A 的调节亚基被下调^[20]。Li, et al. 也检测了两个蛋白磷酸酶 PP1 和 PP2A 在鼠和牛晶体中的表达, 结果表明在牛和小鼠晶体上皮细胞中, 编码 PP2Ac 的基因在 mRNA 和蛋白水平的表达出现差异, 而且 PP2A 主要定位在晶体上皮细胞中^[21]。由此可见, PP2A 在心脏、眼睛等重要器官中行使着某些重要的功能。进一步探明 PP2A 对这些器官组织中的下游靶蛋白的调节将有助于了解 PP2A 的功能机制。

参考文献:

- [1] Liu W J, Shen Y, Ding J. Protein phosphatase 2A: its structure, function and activity regulation [J]. *Acta Biophysica Sinica*, 2003, **35**(2): 105~112 [刘卫军, 沈瑛, 丁健. 蛋白磷酸酶 2A 的结构、功能和活性调节. 生物化学与生物物理学报, 2003, 35(2): 105~112]
- [2] Ceulemans H, Bollen M. Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button [J]. *Physiol Rev.*, 2004, **84**: 1~39
- [3] Maria A K, Tommy A. Protein phosphatase 2A regulates apoptosis in neutrophils by dephosphorylating both p38 MAPK and its substrate caspase 3 [J]. *J Biol Chem.*, 2005, **280**: 6238~6244
- [4] Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatases [J]. *Annu Rev Biochem.*, 1989, **58**: 453~508
- [5] Liu S J, Liu Y, Zhou G J, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp × common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization [J]. *Aqua Culture*, 2001, **192**(3~4): 171~186
- [6] Li J Z, Liu S J, Zhang X J, et al. Random amplified polymorphic DNA analysis of genetic diversity of the alltetraploid crucian carp population [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(1): 97~100 [李建中, 刘少军, 张轩杰, 等. 异源四倍体鲫鲤群体遗传多样性的 RAPD 分析. 水生生物学报, 2005, 29(1): 97~100]
- [7] Li W C, Liu Y. Studies on the hemoglobins and sera of hybrid Yue-carp (*Cyprinus carpio* Var. *Wuyuanensis* ♀, *Cyprinus carpio* Var. *Xingjiangensis* ♂) and its parents [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1986, **10**(4): 365~371 [李万程, 刘筠. 岳鲤及其双亲(荷包红鲤♀ × 湘江野鲤♂)的血红蛋白和血清蛋白的研究. 水生生物学报, 1986, 10(4): 365~371]
- [8] Li W C. Study on LDH isoenzymes of hybrid Yue-carp and its parents [J]. *Acta Genetica Sinica*, 1988, **15**(1): 46~51 [李万

- 程. 岳鲤及其双亲(荷包红鲤♀、湘江野鲤♂)LDH同工酶的研究. 遗传学报, 1988, **15**(1): 46—51]
- [9] Liu Y, Zhou G J Cytological study on the gonadal development of F₁ hybrid produced by crossing *Carassius auratus* (♀) with *Cyprinus carpio* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1986, **10**(2): 101—107 [刘筠, 周工建. 红鲫(♀)×湘江野鲤(♂)杂交一代生殖腺的细胞学研究. 水生生物学报, 1986, **10**(2): 101—107]
- [10] Liu S J Hu F, Zhou G J et al. Gonadal structure of triploid crucian carp produced by crossing allotetraploid hybrids of *Carassius auratus* red var (♀) × *Cyprinus carpio* (♂) with Japanese crucian carp (*Carassius auratus* Cavaleri T. ET S) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, **24**(4): 301—306 [刘少军, 胡芳, 周工建, 等. 三倍体湘云鲫繁殖季节的性腺结构观察. 水生生物学报, 2000, **24**(4): 301—306]
- [11] Liu W B, Li Y, Zhang L, et al. Differential expression of the catalytic subunits for PP-1 and PP-2A and the regulatory subunits for PP-2A in mouse eye [J]. *Mol Vis.*, 2008, **14**: 762—773
- [12] Yan Q, Liu W B, Qin J et al. Protein phosphatase-1 modulates the function of Pax-6, a transcription factor controlling brain and eye development [J]. *J Biol Chem.*, 2007, **282**(19): 13954—13965
- [13] Arroyo JD, Hahn W C. Involvement of PP2A in viral and cellular transformation [J]. *Oncogene*, 2005, **24**(52): 7746—7755
- [14] Shenolikar S, Naim AC. Protein phosphatases: recent progress [J]. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, 1991, **23**: 1—121
- [15] Janssens V, Longin S, Goris J. PP2A heteromeric assembly in caudal venenum (the sting in the tail) [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2007, **33**(3): 113—121
- [16] Blanquet P R. Identification of two persistently activated neurotrophin-regulated pathways in rat hippocampus [J]. *Neuroscience*, 2000, **95**(3): 705—719
- [17] Zhou X B, Ruth P, Schlossmann J, et al. Protein phosphatase 2A is essential for the activation of Ca²⁺-activated K⁺ currents by cGMP-dependent protein kinase in tracheal smooth muscle and Chinese hamster ovary cells [J]. *J Biol Chem.*, 1996, **271**: 19760—19767
- [18] Brew N, Ohst K, Fields K, et al. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a mutant A subunit of protein phosphatase 2A [J]. *J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, **279**: 1307—1318
- [19] Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy [J]. *Cell*, 1998, **93**: 215—228
- [20] Kantorow M, Kays T, Howitz J, et al. Differential display detects altered gene expression between cataracts and normal human lenses [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998, **39**: 2344—2354
- [21] Li W C, Xiang H, Mao Y W, et al. Analysis of expression patterns of protein phosphatase-1 and phosphatase-2a in rat and bovine lenses [J]. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2001, **42**: 2605—2609

DIFFERENTIAL EXPRESSION PATTERNS OF THE PROTEIN PHOSPHATASE-2Ac IN SIX TISSUES OF DIFFERENT PLOIDY FISH

LIU Wen-Bin¹, WANG Dao¹, ZHOU Jie¹, XIAO Ya-Mei¹, LIU Shao-Jun¹, LIU Yun¹ and LIWAN-Cheng^{1,2}

(1.Key lab of Protein Chemistry and Development Biology of National Education Department, College of Life Science Hunan Normal University, Changsha 410081, China; 2.Departments of Biochemistry and Molecular Biology, Ophthalmology & Visual Sciences, College of Medicine, University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska 68198-5870)

Abstract Protein Phosphatase-2A (PP2A) is one of the most important protein serine/threonine phosphatases and plays distinct roles in regulating gene expression, signal transduction, cell proliferation, differentiation, senescence, apoptosis, autophagy, morphogenesis and organogenesis. Our previous studies have established the expression patterns of the catalytic subunits and the regulatory subunits for PP-2A in mouse eye^[1]. To explore the possible functions of PP-2A in various tissues of the lower vertebrates here, we have analyzed the differential expression pattern, functional status, and the cellular localization of the catalytic subunit for PP-2A using western blot and immunofluorescence cytochemistry on four different ploidy level fish. These include the allotetraploid hybrids and their diploid parents common carp (♂) and red crucian carp (♀) as well as the triploid crucian carp derived from crossover between the allotetraploids and common carp or between the allotetraploids and the red crucian carp. Our study demonstrated the following results: 1) In brain, muscle and liver from the four types of fish, the highest expression level of PP-2Ac was observed in the triploid crucian carp; 2) In the kidney of the four types of fish, however, the highest expression level was detected in the allotetraploids, and the lowest level was detected in the diploid common carp and the triploid crucian carp; 3) In the gonads of the four types of fish, the highest expression level of PP-2Ac was found in testis of the diploid common carp; 4) In the heart of the four kinds of

fish, the highest expression level of PP-2A c was observed in the diploid red crucian carp. 5) While both phosphorylated and non-phosphorylated PP-2A c were found in the heart and muscle tissues from all four types of fish, only phosphorylated PP-2A c was detected in the brain from these organisms. 6) In the kidney, liver and gonads, non-phosphorylated PP-2A c was only detected in the diploid common carp and red crucian carp. 7) PP-2A c was mainly localized in the cytoplasm of the neurons in the brain tissue, of the cardiomyocytes in the heart, and of the myocytes in the muscle of the four types of fish; certain nuclei from the neurons in both allotetraploid and triploid brain have strong immunofluorescence signal. 8) PP-2A c was found in the cytoplasm but not the nuclei of cuboidal cells of the renal collecting and filtration tubes of the kidney, and in the hepatocytes, sinusoids and the bile canaliculi of the liver of the four types of fish; and finally, PP-2A c was found in the cytoplasm membrane and nuclei of the growing oocytes from the diploid red crucian carp and triploid crucian carp in the basement membranes covering the seminiferous tubules and the interstitial tissues separating the seminiferous tubules, Sertoli cells and some spermatocytes of the diploid common carp. Together, these results lead to the following conclusions: 1) PP-2A c was differentially expressed in various tissues of the four different ploidy level fish; 2) PP-2A functions are highly regulated in different tissues; 3) Within the same tissue of the four types of fish, PP-2A was localized in the same types of cells; and 4) the presence of strong PP-2A c immunofluorescence signal in certain nuclei of neurons in both allotetraploid and triploid brains but not in those of the diploid parents indicates that the PP-2A c may be used as a biochemical marker to distinguish the different types of fish. Overall, our results provide important information for the further exploration of PP-2A functions in lower vertebrates.

Key words Protein Phosphatase-2A c(PP2A c); Dephosphorylation; Gene expression; The different ploidy level fish