

Ppp5c 和 TTC16 基因的 TPR 结构域与 Hsp70、Hsp90 蛋白的相互作用及对细胞周期的影响 *

刘德康 李 蕾 陈 霞 唐 超 李建民[△]

(南京医科大学基础医学院 江苏 南京 210029)

摘要 目的:研究 Ppp5c 及 TTC16 基因的 TPR (tetratricopeptide repeat)结构域短片和 Hsp70 及 Hsp90 家族蛋白的相互做用,及其过表达对细胞周期的影响。方法:通过生物信息学的分析及 PCR 的方法,克隆 Ppp5c 及 TTC16 基因的 TPR 结构域以及 HSPA1A、HSP90AA1 的全长基因,并连入酵母双杂交载体,通过 ClonTech 的酵母双杂交实验体系研究蛋白和蛋白之间的相互作用。把 Ppp5c 及 TTC16 基因的 TPR 结构域克隆入真核表达载体,构架稳定表达 Ppp5c 及 TTC16 基因的 TPR 结构域的 MCF-7 细胞系,并通过流式细胞实验观察细胞周期。结果:Ppp5c 及 TTC16 基因的 TPR 结构域能与 HSPA1A 或 HSP90AA1 发生相互作用。Ppp5c 及 TTC16 基因的 TPR 结构域在 MCF-7 中的过表达能严重影响细胞周期,引起细胞凋亡和 S 期阻滞。结论:本实验初步揭示了不同蛋白的 TPR 结构域在与 Hsp70 及 Hsp90 蛋白的相互作用性质的异同点以及其过表达对细胞周期的影响,为全面理解 TPR 结构域的功能、Ppp5c 以及 TTC16 蛋白在细胞内的功能奠定了前期实验基础。

关键词 Ppp5c ;TTC16 ;蛋白相互作用 ;细胞周期

中图分类号:Q28 Q75 Q78 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)11-2005-05

The Interactions of TPR Domains of Ppp5c/TTC16 with Hsp70/90 and Their Influence on the Cell Cycle*

LIU De-kang, LI Lei, CHEN Xia, TANG Chao, LI Jian-min[△]

(School of Basic Medical Science, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, P.R.China)

ABSTRACT Objective: To investigate the interactions between the TPR (tetratricopeptide repeat) domains of Ppp5c/TTC16 and protein of Hsp70/Hsp90, to study the effect of the overexpression of TPR domains of Ppp5c/TTC16 on cell cycle in MCF-7 cell lines. **Methods:** After being analyzed by online informatics tools, the TPR domains of Ppp5c/TTC16 and full-length of HSPA1A/HSP90AA1 genes were respectively sub-cloned into two separate vectors of the yeast two-hybrid system provided by ClonTech to confirm the protein-protein interactions. The TPR domains of Ppp5c/TTC16 were sub-cloned into eukaryotic expression vectors which were stably transfected into MCF-7 cell-lines, whose cell cycle was then examined by flow cytometry. **Results:** The TPR domains of Ppp5c/TTC16 interacted with proteins of HSPA1A/HSP90AA1. A large amount of apoptosis was detected when the TPR domains of Ppp5c over-expressed in MCF-7 cell line, and the cell cycle was blocked at the S phase when the TPR domains of TTC16 over-expressed in MCF-7 cell line. **Conclusion:** This research revealed the discrepancy in the capacity of the combination of dissimilar TPR domains with Hsp70/Hsp90 proteins, as well as the effect of overexpression of TPR domains on the cell-cycle of MCF-7 cell line, which may help draw the panoramic picture of the functions of TPR domains and deep the understanding of intra-cellular functions of Ppp5c and TTC16 proteins.

Key words: Ppp5c; TTC16; Protein interaction; Cell cycle

Chinese Library Classification(CLC): Q28 Q75 Q78 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)11-2005-05

前言

TPR (tetratricopeptide repeat) 是由 34 个氨基酸组成的简单重复序列,于 1990 年被发现^[1,2]。TPR 结构域通常形成螺旋-转角-螺旋结构,并在其内部形成空隙^[3,4]。在形成 TPR 结构的氨基酸残基中,少量残基是保守的,比如形成转角的残基,而其他氨基酸残基具有很高的可取代性。TPR 的这种特殊的结构导致其可以与许多种不同的配体之间产生相互作用^[5]。含有 TPR

结构域的蛋白中的 TPR 通常有 3-16 个,并且通常呈现串联排列^[6]。对一系列的含有 TPR 结构域的蛋白分析表明 TPR 结构在转录控制、线粒体及过氧化物酶体蛋白转运、蛋白激酶抑制、NADPH 氧化酶活性、蛋白折叠、免疫和病毒复制方面具有重要功能^[7-11]。然而,许多 TPR 蛋白的功能仍然需要大量的研究来揭示。

PP5(Protein phosphatase 5)是丝氨酸/苏氨酸蛋白酶家族的一员,其他成员还包括 PP1、PP2A、PP2B、PP4、PP6 和 PP7^[12,13]。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30971092)

作者简介:刘德康(1985-)男,硕士,主要研究方向:生殖与发育。E-mail: liunightelf@yahoo.cn

[△]通讯作者:李建民 电话:025-86862102 E-mail: jianminlilab@njmu.edu.cn

(收稿日期:2012-01-07 接受日期:2012-01-31)

与其他蛋白酶不同的是, PP5 的调节亚基, 即决定底物特异性的亚基 和催化亚基在处于同一条多肽链上。PP5 在真核细胞中广泛分布, 并且在胞质和细胞核中都存在^[14]。据报道, PP5 在调节细胞生长、细胞凋亡、DNA 修复、调节生物钟、糖皮质激素受体的成熟、溶血抑制因子 eIF2a 激酶的合成等方面发挥重要作用^[15-18]。同时, Ppp5c(protein phosphatase 5, catalytic subunit)在其蛋白的靠近 N 端有一个三联 TPR 结构域, 提示可能与多种蛋白有相互作用。TTC16(tetratricopeptide repeat domain 16)蛋白的功能现在还不是很清楚, 其含有多个 TPR 结构域, 提示可能与其他蛋白相互作用发挥功能。

HSP(heat shock protein), 即热激蛋白, 是细胞中具有重要作用的蛋白家族, 在热休克调节、促进蛋白折叠、蛋白转运、细胞生长分化等许多方面发挥着重要的功能。Hsp70 和 Hsp90 家族的 C 末端含有的 EEVD 结构域可能与 TPR 结构域相互作用。本研究通过克隆人源的 Ppp5c 及 TTC16 的 TPR 结构域, 通过酵母双杂交实验研究与人源 HSPA1A (heat shock 70kDa protein 1A)蛋白及 HSP90AA1(heat shock protein 90kDa alpha, class A member 1provided)蛋白的体外相互作用, 并研究这两种不同的 TPR 结构域在细胞中的表达对细胞生长的影响。

1 材料与方法

1.1 材料和设备

pLJM1-EGFP、pEGFP-Hsp70、pEGFP-Hsp90 质粒 (ad-gene); pGBKT7 (BD 载体) (ClonTech) pACT2 (AD 载体) (ClonTech) ;X-gal (南京生兴生物); 大肠杆菌细胞株 XL-blue (南京医科大学细胞生物学系保种); 酵母细胞株 Y-190 (clon-Tech) ;质粒小量抽提试剂盒(天根生物) ;Taq DNA 聚合酶体系 (Promega) ; 脂质体 LipofectamineTM2000(Invitrogen) ;胎牛血清、DMEM 高糖培养基 (Hyclone) ;胰酶(Amersco) ;DMSO(Sigma) ;HEPES(Gibico) ;双抗(Gibico) ;PCR 仪(Bio-Rad 公司) ;离心机(Thermo) ;DNA 电泳槽(南京大学) ;DYY-6B 稳流稳压电泳仪) ;凝胶成像装置(Panasonic ,WV-BP330/G) ;空气摇床(上海福玛) ;细胞培养箱(Thermo Forma Series II) ;超净工作台(苏州净化 SW-CJ-1F) ;倒置荧光显微镜(Olympus)。

1.2 质粒构建

人源的 Ppp5c 及 TTC16 的 TPR 的短片段均以质粒 pCMV-sport6-ppp5c 及 pCMV-sport6-ttc16 为模板, PCR 获得(引物末端含有 SfiI 的酶切位点)片段, 再进行 SfiI 酶切后连入酵母双杂交质粒 pGBKT7。细胞实验的质粒用通用引物 pLJM-F2 及 Link-CGF-R2 从前一步构得的载体上通过 PCR 的方法扩得片段(引物末端分别含有 NheI 及 AgeI 的酶切位点), 片段再进行 NheI、AgeI 双酶切, 连入 pLJM1-EGFP 载体。另外, Hsp70 及 Hsp90 全长蛋白用包含 SfiI 酶切位点的引物从质粒 pEGFP-Hsp70、pEGFP-Hsp90 质粒上扩得, 酶切后连入 pACT2 载体。

1.3 酵母双杂交实验

酵母双杂交实验用来测定 Ppp5c 及 TTC16 的 TPR 结构域与 HSP70/90 的相互作用, 采用的是 Clontech 酵母双杂交系统。首先, 200 ng 含有外源片段的 pGBKT7 及 pACT2 质粒与 carrier 质粒共同转化进预先用化学法 (LiAC) 制备好的 Y190 酵母感受态细胞中, 并加入 500 μ l 的 1 $\times$ TE/LiAC/PEG, 轻柔混

匀, 30 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟, 之后每管加入 15 μ l DMSO, 轻轻混匀。42 $^{\circ}$ C 热激 15 分钟。立即冰上 5 分钟, 4 000 rpm 5 分钟, 弃上清, 100 μ l 0.9% NaCl 重悬菌体, 涂布于 SD/-Trp 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 72 小时左右可得转化子。挑取转化子于滤纸上, 液氮 2 分钟裂解菌体, X-gal 显色液浸润滤纸, 置 37 $^{\circ}$ C 培养。20 分钟后开始观察菌落是否变蓝, 以 4 小时内变蓝为较强的相互作用。4-12 小时为弱相互作用。实验中用含有 p53 及 LT 抗原的两种质粒作为阳性控制。

1.4 HEK293T 及 MCF-7 细胞培养

细胞培养于含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 DMEM 高糖培养液里, 置于 37 $^{\circ}$ C、95%的空气、5%的 CO₂ 培养箱中常规培养, 细胞呈贴壁生长, 每 2-3 天更换培养液, 细胞覆盖培养瓶瓶底约 70-80%时传代。

1.5 细胞转染及感染实验

转染前一天, 胰酶消化 HEK293T 细胞, 细胞计数, 以 180 万所左右的细胞数铺至 60 mm 的培养皿里, 并加入 4 ml 含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基进行培养。第二天细胞汇合度达到 90%以上时开始做转染实验。OptiMEM 培养液 500 μ l 和 20 μ l Lipofectamine2000 混匀, 室温静置 5 min 制成混合液 1。OptiMEM 培养液 500 μ l、目的质粒 4 μ g、两种病毒包装质粒(pVSVG、 Δ 8.91)各 4 μ g 配成混合液 2。两种混合液混匀, 室温放置 20 分钟后轻柔加入 HEK293T 细胞培养液中, 6 小时后换完全培养液。转染 48 小时和 72 小时分别收 2 次病毒上清, 在病毒液中加入 polybrene (终浓度为 1 μ l/ml)及 HEPES (终浓度 10 μ l/ml), 混匀后用 0.22 μ m 滤膜过滤, 加入 MCF-7 细胞中, 8 小时后换 DMEM 完全培养液。48 小时后观察感染效率。

1.6 细胞周期实验

感染后的细胞每隔两天换新鲜的含嘌呤霉素(0.6 μ g/ml)的完全 DMEM 培养基进行阳性克隆筛选 2 周后, 消化细胞并计数, 以 100 个细胞 / 孔铺至六孔板, DMEM 完全培养液培养 6 小时后, 换仅含 0.5%胎牛血清的养基进行血清饥饿培养 24 小时, 再换 DMEM 完全培养液培养汇合度至 90%以上, 收集细胞, 上流式细胞仪。

2 结果

2.1 Ppp5c 及 TTC16 蛋白的功能结构域分析

从 ncbi 数据库得知, 人源的 Ppp5c 基因在染色体上的位置为 19q13.3, 一共有两种异形体, isoform 1 成熟的 mRNA 由 13 个外显子拼接而成, isoform 2 成熟的 mRNA 则比 isoform 1 多包含一个外显子, 所以由 isoform 1 得到的蛋白质要比 isoform 2 的要长一些。在线 smart 分析(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)Ppp5c 的蛋白结构域发现, 靠近 N 末端有一个三联 TPR 结构域, C 末端则是 Ppp5c 的催化结构域(图 1A)。人源的 TTC16 基因在染色体上的位置为 9q34.11, 成熟的 mRNA 由 14 个外显子拼接而成, smart 分析 TTC16 的结构域, 发现其蛋白主要由一些散在的 TPR 原件构成(图 1B)。这就促使我们进一步分析这两种蛋白不同的 TPR 结构域与公认的含有 EEVD 结构的 Hsp70 及 Hsp90 蛋白相互作用的情况。

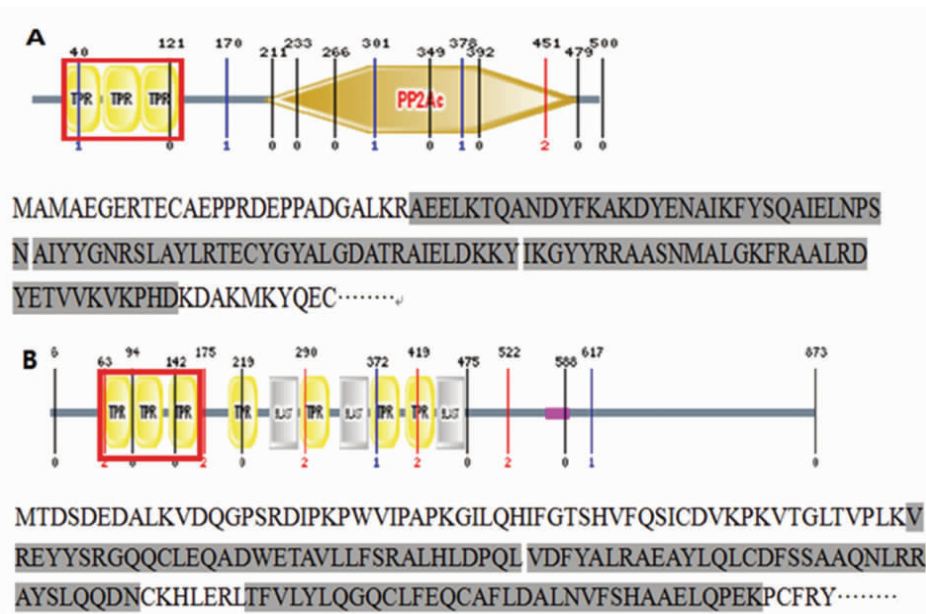


图 1 Ppp5c(A 图)及 TTC16(B 图)的结构域。(所克隆的 TPR 区域用红框标注,对应图下面的用灰色标注的 TPR 蛋白序列)

Fig.1 Conserved domains of Ppp5c (Figure A) and TTC16 (Figure B). (the TPR domains we cloned in this research were labeled with red boxes, corresponding to the protein sequences labeled with grey color below)

2.2 Ppp5c 及 TTC16 的 TPR 结构域与 Hsp70 与 Hsp90 的相互作用

为了研究人源的 Ppp5c 蛋白和 TTC16 蛋白 TPR 结构域与人源 Hsp70 与 Hsp90 蛋白的相互作用,以 pCMV-sport6-Ppp5c 和 pCMV-sport6-TTC16 含有两个基因 cDNA 克隆的质粒为模板,分别以引物 Ppp5cs-F-SfiI: 5'CATGGCCAATCCGGCC-GCAGAGGAGCTCAAGACTC A Ppp5cs-R-SfiI: 5'CGTGGCC-TCTAAGGCCGTCATGGGGCTTCACCTTGA 和引物 TTC16s-F-SfiI 5'CATGGCCAATCCGGCCGTCAGGAATACTACTC-CAG;TTC16s-R-SfiI:5'CGTGGCCTCTAAGGCCTTTCTCAGG-CTGGAGCTCAG 扩增出两种蛋白的基因中的 TPR 结构域区段,并连入酵母双杂交载体 pGBKT7,获得质粒 pGBKT7-Ppp5cs 和 pGBKT7-TTC16s。同时,以 pEGFP-Hsp70 和 pEGFP-Hsp90 为模板,分别以引物 Hsp70-F-SfiI: 5'CATGGCCAATC-CGGCCATGGCCAAAGCCGCGGCGATCGGC;Hsp70-R-SfiI:5'CGTGGCCTCTAAGGCCCTAATCTACCTCCTCAATGGTGG 和引物 Hsp90-F-SfiI:5'GGGAGGCCAATCCGGCCATGCCTG-AGGAAACCCAGACC; Hsp90-R-SfiI:GGGAGGCCTCTAAGG-CCGTCTACTTCTTCCATGCGTGATG 扩增出 Hsp70 家族蛋

白成员 HSPA1A 和 Hsp90 家族蛋白成员 HSP90AA1 的蛋白全长序列, 并克隆入酵母双杂交载体 pACT2, 得到质粒 pACT2-Hsp70 及 pACT2-Hsp90。酵母双杂交实验显示 Ppp5c 的三联 TPR 结构域能与 HSPA1A 与 HSP90AA1 发生强烈的相互作用, 而我们所选取的 TTC16 中的 TPR 结构域只能与 HSP90AA1 发生作用。

2.3 稳定表达 Ppp5c 及 TTC16 的 TPR 结构域细胞系的建立

为了进一步研究 Ppp5c 及 TTC16 TPR 结构域的表达对细胞生长状态的影响,用通用引物 pLJM-F2:5'AATAATGCTAGCGCCACCATGGAATTCAAGGCCAATCC;link-cgf-r2:5'AATAATACCGGTGACGTCCGTCGACGGCCTCTAAGG 从构建好的酵母双杂交载体 pGBKT7-Ppp5cs 和 pGBKT7-TTC16s 扩增出片段并连入真核表达载体 pLJM1-EGFP 中,得到表达质粒 pLJM1-Ppp5cs 及质粒 pLJM1-TTC16s。表达质粒及对照空质粒 pLJM1-EGFP 先按前述方法转染进入 293T 细胞,取得的病毒感染人乳腺癌细胞系 MCF-7,感染后的 MCF-7 细胞按前述方法进行药物筛选一周,并在荧光显微镜下观察绿色荧光(图 2)。



图2 稳定转染 Ppp5c 及 TTC16 TPR 短片段药物筛选后的 MCF-7 细胞绿色荧光图片

Fig.2 Green fluorescence of MCF-7 cells which have been transfected with TPR domain of Ppp5c and TTC16 after drug screening

2.4 Ppp5c 及 TTC16 的 TPR 结构域的过表达对细胞周期的影响

酵母双杂交实验已经表明 Ppp5c 和 TTC16 的 TPR 结构域短片段能与真核细胞的 Hsp90 及 Hsp70 蛋白发生相互作用,为了研究 Ppp5c 和 TTC16 的 TPR 结构域如果在真核细胞内过表达是否会对细胞生长造成影响,我们进行了流式细胞实验,

处理方法如前所述。结果显示,与空对照(转入 pLJM1-EGFP 的稳定表达细胞系)相比,过表达 Ppp5c TPR 结构域的细胞有大量凋亡细胞的存在,而过表达 TTC16 TPR 结构域的细胞被完全阻滞在了 S 期,这说明过表达 Ppp5c 或 TTC16 TPR 结构域对细胞周期都产生了严重的影响(图 3)。

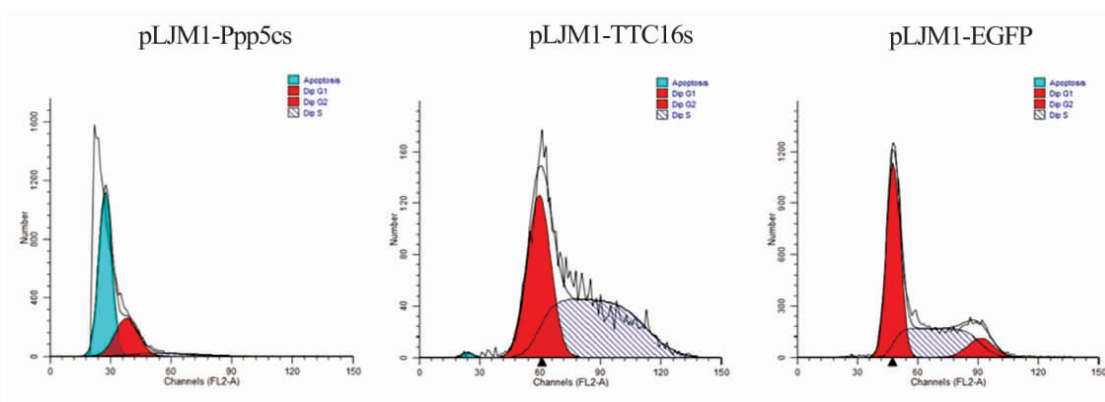


图 3 过表达 Ppp5c 及 TTC16 的 TPR 结构域短片段的 MCF-7 细胞周期实验

Fig.3 The flow cytometry assay of MCF-7 cells expressing the TPR domain of Ppp5c and TTC16

表 1 细胞周期实验中各细胞系各阶段细胞的比例

Table 1 The proportion of every cell stage of different cell lines in the flow cytometry assay

Cell number (%)	pLJM1-Ppp5cs	pLJM1-TTC16s	pLJM1-EGFP
G1	16.16	42.82	51.43
S	17.14	56.52	38.91
G2	0	0	9.66
Apoptosis	66.70	0.66	0.15

3 讨论

TPR(tetratricopeptide repeat)结构域是许多蛋白所包含的具有重要功能的结构域,其通常形成的螺旋-转角-螺旋被认为介导了蛋白与蛋白的相互作用,这种相互作用对于蛋白的定位和发挥功能具有重要的作用^[3,4]。TPR 结构域中的氨基酸残基在不同的蛋白中具有很高的可变性(只有关键位置的几个残基很保守),这造成了含有 TPR 结构域的蛋白具有不同的亲和性,本研究选取了两种含有 TPR 结构的蛋白 Ppp5c 和 TTC16,旨在说明不同蛋白的 TPR 结构域的具有不同性质。

Ppp5c 是细胞内重要的丝氨酸/苏氨酸蛋白酶,在细胞生长和凋亡等方面发挥着重要功能,其蛋白的 N 端有一个比较典型的三联 TPR 结构域。而 TTC16 的功能目前还不是很清楚,结构域分析显示,其蛋白上广泛的分布着二联或者单独的 TPR 结构域。Hsp70 和 Hsp90 家族蛋白也是细胞内广泛分布的管家蛋白,在蛋白质成熟、细胞周期等方面发挥重要功能,其 C 端保守的 EEVD 结构域被认为可能与 TPR 结构域相互作用。本研究把 Ppp5c 及 TTC16 中的 TPR 结构域片段进行单独克隆,通过酵母双杂交实验发现 Ppp5c 的 TPR 结构域能与 HSPA1A 和 HSP90AA1 作用,而选取的 TTC16 的 TPR 结构域只能与 HSP90AA1 发生作用,这个结果有力的说明了 Ppp5c 和 TTC16 蛋白确实是通过其 TPR 结构域或者至少通过其 TPR 结构域与 Hsp70 或 Hsp90 蛋白发生作用,也说明了这两

种 TPR 蛋白在作用性质上确实存在着差异,提示了不同的 TPR 结构域性质上的不同。后续研究细胞周期的实验在人的乳腺癌细胞系 MCF-7 中过表达 Ppp5c 和 TTC16 蛋白的 TPR 结构域,而不是全长蛋白,发现转入 Ppp5c TPR 结构域的细胞出现了严重的凋亡,而转入了 TTC16 TPR 结构域的细胞则被完全阻滞在 S 期,这说明了仅仅是蛋白的两种蛋白的 TPR 结构域单独就能严重影响细胞周期,这对于更好的说明两种蛋白的功能具有很大的帮助。

本研究初步揭示了两种蛋白的 TPR 结构域在体外与 Hsp70 与 Hsp90 蛋白家族的相互作用,关于其在细胞内的定位或者与其他蛋白的作用还需要进一步研究。另外,两种 TPR 结构域影响细胞周期的机理也须要通过后续研究得到更加全面的阐释。

4 结论

本研究成功克隆了 Ppp5c 及 TTC16 基因的 TPR 结构域短片段,并通过酵母双杂交实验验证了与 Hsp70 和 Hsp90 蛋白的相互作用。而后通过细胞实验,发现 Ppp5c 及 TTC16 基因的 TPR 结构域短片段在 MCF-7 细胞系中的过表达对细胞周期有显著的影响。

参考文献(References)

- [1] Hirano T, Kinoshita N, Morikawa K. et al. Snap helix with knob and hole: essential repeats in *S. pombe* nuclear protein nuc2+ [J]. Cell,

- 1990, 60: 319-328
- [2] Sikorski RS, Boguski MS, Goehl M, et al. A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis [J]. *Cell*, 1990, 60: 307-317
- [3] Blatch GL, Lassle M. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions [J]. *Bioessays*, 1999, 21: 932-939
- [4] Lamb JR, Tugendreich S, Hieter P. Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR [J]. *Trends Biochem. Sci*, 1995, 20: 257-259
- [5] D'Andrea LD, Regan L. TPR proteins: the versatile helix [J]. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28: 655-662
- [6] Allan RK, Ratajczak T. Versatile TPR domains accommodate different modes of target protein recognition and function [J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2011, 16: 353-367
- [7] Goehl M, Yanagida M. The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription[J]. *Trends Biochem Sci*, 1991, 16: 173-177
- [8] Ponting CP. Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains [J]. *Protein Sci*, 1996, 5: 2353-2357
- [9] Callahan MA, Handley MA, Lee YH, et al. Functional interaction of human immunodeficiency virus type 1 Vpu and Gag with a novel member of the tetratricopeptide repeat protein family [J]. *J Virol*, 1998, 72: 5189-5197
- [10] Cziepluch C, Kordes E, Poirey R, et al. Identification of a novel cellular TPR-containing protein, SGT, that interacts with the nonstructural protein NS1 of parvovirus H-1[J]. *J Virol*, 1998, 72: 4149-4156
- [11] Mamane Y, Sharma S, Petropoulos L, et al. Posttranslational regulation of IRF-4 activity by the immunophilin FKBP52 [J]. *Immunity*, 2000, 12: 129-140
- [12] Huang X, Honkanen RE. Molecular cloning, expression, and characterization of a novel human serine/threonine protein phosphatase, PP7, that is homologous to Drosophila retinal degeneration C gene product RdcC[J]. *Biol. Chem*, 1998, 273: 1462-1468
- [13] Chen MX, McPartlin AE, Brown L, et al. A novel human protein serine/threonine phosphatase, which possesses four tetratricopeptide repeat motifs and localizes to the nucleus [J]. *EMBO J.*, 1994, 13: 4278-4290
- [14] Chinkers M. Protein phosphatase 5 in signal transduction [J]. *Trends Endocrinol. Metab*, 2001, 12: 28-32
- [15] Teresa G, Ileana VA, Beth R, et al. Elevated levels of Ser/Thr protein phosphatase 5 (PP5) in human breast cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1782(4): 259-270
- [16] Partch CL, Shields KF, Thompson CL, et al. Posttranslational regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome and protein phosphatase 5[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2006, 103: 10467-10472
- [17] Zuo Z, Urban G, Scammell JG, et al. Ser/Thr protein phosphatase type 5 (PP5) is a negative regulator of glucocorticoid receptor-mediated growth arrest[J]. *Biochemistry*, 1999, 38: 8849-8857
- [18] Shao J, Hartson SD, Matts RL. Evidence that protein phosphatase 5 functions to negatively modulate the maturation of the Hsp90-dependent heme-regulated eIF2a kinase [J]. *Biochemistry*, 2002, 42: 6770-6779