

蛋白激酶 TTK 与 CENP-E 相互作用 并共定位于人细胞的动粒

张洁 符传孩 缪勇 窦震 姚雪彪*

(中国科学技术大学生命科学学院细胞动力学研究室, 合肥 230027. * 联系人, E-mail: yaoxb@ustc.edu.cn)

摘要 纺锤体检验点(spindle checkpoint)是一个重要的细胞分裂生化调节通路, 监督染色体正确分离和传代, 其信号传导主要通过两个蛋白激酶 Mps1 和 Bub1/BubR1 来调控. 近期的研究发现动粒马达蛋白 CENP-E 与 BubR1 相互作用并参与纺锤体调控点的作用. 为阐明纺锤体检验点分子调控机理, 利用动粒蛋白质组学技术剖析人细胞动粒的蛋白质组成时发现了 TTK 蛋白——人细胞 Mps1. 揭示了 TTK 蛋白激酶定位于动粒, 并与 CENP-E 相互作用, 可能参与监控人细胞分裂过程中的染色体分离.

关键词 纺锤体检验点 TTK 激酶 CENP-E 动粒

细胞分裂是一个高度有序、严格控制的过程, 细胞将复制后的染色体均匀、准确地传递给两个子细胞; 细胞的纺锤体检验点(spindle checkpoint)机制在染色体的分离及传代中起着重要的监控作用^[1,2], 只有当染色体全部正确地与纺锤体结合时, 细胞分裂才能进入后期. 纺锤体检验点甚至可以检测到单条错误排列的染色体而延迟细胞分裂, 但是目前纺锤体检验点激活的分子机制还不是很清楚. 近年的研究表明: 纺锤体检验点可以感知动粒(kinetochore)张力的变化. 昆虫精母细胞的显微操作实验提示, 当染色体没有与微管结合, 或者仅单向与微管结合时, 动粒缺乏张力, 动粒上的某些蛋白发生磷酸化, 细胞分裂被抑制, 这些磷酸化蛋白可被一种称为 3F3/2 的单克隆抗体识别; 当动粒一旦与纺锤体双向结合, 动粒获得张力时, 磷酸化的动粒蛋白去磷酸化, 细胞分裂进入后期^[3,4]; 但是动粒蛋白磷酸化与去磷酸化的分子机理至今仍是一个谜.

早期芽殖酵母的遗传学研究表明, 一组定位于动粒的蛋白及蛋白激酶参与染色体分离的时空调节, 这些蛋白包括 Mad1-3, Bub1-3 和 Mps1 激酶等^[5~7]. Mad1 是一种磷酸化蛋白, 能够与 Mad2 结合形成 Mad1/Mad2 复合物^[8], 在纺锤体受到破坏时, Mad1 被高度磷酸化; Bub1 是一种丝氨酸蛋白激酶, 能够结合并磷酸化 Mad1 和 Bub3^[9], 并且作用于 Mad1 的上游. Mps1 激酶在细胞周期中具有两种功能, 即中心体复制以及纺锤体检验点调控. Mps1 的突变导致单极纺锤体的产生; Mps1 过量表达时, 即使微管未被破坏, 也可以导致细胞周期被阻断, 并且高度磷酸化

Mad1^[10~12].

有研究表明, 纺锤体检验点蛋白家族在进化过程中是保守的, 酵母 Mad1, Mad2, Bub1 和 Bub3 等蛋白的同源物已经在脊椎动物中被分离, 它们都是与动粒结合的蛋白, 在有丝分裂中起重要调控作用; Mps1 蛋白已经在不同生物体中被发现, 包括鼠的 Esk 激酶、非洲爪蟾的 XMps1 激酶以及人的 TTK 激酶等^[13~17]. 在鼠和爪蟾中已经证实 Mps1 激酶在纺锤体检验中起着重要作用, 近期研究报道, 人的 TTK 激酶在纺锤体检验激活中起重要作用, 但并不是中心体复制所必需的^[18]. 我们在进行动粒蛋白质组学研究过程中, 发现了 TTK 蛋白激酶, 通过观察 TTK 激酶在细胞中的定位, 以及纺锤体检验点激活后, TTK 激酶与驱动蛋白 CENP-E 的作用关系, 我们认为 TTK 在有丝分裂进程中具有参加纺锤体检验点的作用.

1 材料和方法

(i) 抗体与质粒. CENP-E 抗体的制备见文献[19]; GFP 抗体为 Sigma 产品; GFP-TTK(野生型)质粒由 Gordon Mill 博士赠送.

(ii) 细胞培养与细胞转染. HeLa 细胞(American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA)培养于含 10%胎牛血清(Hyclone, UT)的 DMEM (Invitrogene, CA)培养液中, 青霉素浓度为 100 U/mL, 链霉素浓度为 100 μ g/mL(Invitrogene, CA); 培养条件为 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C. HeLa 细胞接种在 60 mmol/L 培养皿中, 内置经过酸处理的、无菌的 18 mmol/L 盖玻片, 培养 24 h 后, 使用 Lipofectamine 2000 与质粒 DNA(按照试剂盒说明)转染 HeLa 细胞; 细胞转染 72 h 后, 加入

G418(200 $\mu\text{g/mL}$)筛选, 建立稳定表达细胞系.

(iii) 免疫荧光法. HeLa 细胞转染 GFP-TTK 24 h 后, 取出盖玻片, PHEM 缓冲液(100 mmol/L PIPES, 20 mmol/L HEPES, pH 6.9, 5 mmol/L EGTA, 2 mmol/L MgCl_2 , 4 mol/L glycerol)冲洗 1 min, 然后用含 0.1%的 Triton X-100 PHEM 抽提 1 min, 立即在 4% 甲醛中固定 10 min, PBS 洗 3 遍后, 用含 1%BSA (Sigma Chemical Co, St Louis, MO)的 TPBS(含 0.05% Tween 的 PBS)封闭 20 min. 细胞在湿盒中与 GFP 抗体及 CREST 抗体(ACA)各孵育 1 h 后, TPBS 洗 3 遍, 加入标记有 FITC 的羊抗鼠的二抗, 以显示 TTK 在细胞中定位; 加入标记有 Rhodamine 驴抗人的二抗, 以显示动粒的位置, DNA 用 DAPI(Sigma)染色 10 min.

为了观察 TTK 与 CENP-E 是否共定位, 一抗使用 GFP 抗体和 CENP-E 抗体; 二抗分别使用 Rhodamine 标记的羊抗兔 IgG 和 FITC 标记的羊抗鼠 IgG(Jackson Lab), 按照上述步骤进行. Zeiss 荧光显微镜(Axiovert-200)下观察并拍照.

(iv) 质谱(MALDI-TOF)样品制备. CENP-E 蛋白复合体的亲和分离方法见文献[20]. 复合体蛋白质电泳后, 将待检测条带从胶上切下, 同时从凝胶空白处切一条带作为对照; 把条带切成小块, 用脱色液(50% Acn-25 mmol/L NH_4HCO_3)脱色, 加入胰蛋白酶(Promega, WI)于 37 $^\circ\text{C}$ 酶切 15 h; 消化后的肽段用 TFA/ACN 溶液抽提, 真空浓缩样品至 5 μL , 最后用填充有 C-18 的 Zip-Tip 抽提后进行质谱鉴定(BIFLEX III, BRUKER Analytical Systems)^[21].

(v) 免疫沉淀和蛋白印迹. nocodazole(0.1 $\mu\text{g/mL}$)作用 HeLa 细胞 18 h 后, 收集分裂期细胞, 用预冷的 TBS 洗 3 遍, 加入裂解液(50 mmol/L HEPES, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl_2 , 0.5% Triton X-100, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟, 10 $\mu\text{g/mL}$ 亮抑酶肽, 10 $\mu\text{g/mL}$ 抑胃酶肽 A)冰浴裂解 20 min, 于 4 $^\circ\text{C}$ 离心 15 min(14000 r/min), 收集上清液. 细胞上清液与结合有 CENP-E 抗体的 protein A/G(Pierce)共同孵育 3 h, 免疫沉淀物用洗脱缓冲液(0.1% Triton X-100, 50 mmol/L Tris, 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EGTA)洗 5 遍; 加入 4 $\times$ 上样缓冲液于 95 $^\circ\text{C}$ 煮 5 min; 8% SDS-PAGE 电泳后, 蛋白转移到硝酸纤维素膜上. 5%的脱脂牛奶封闭 1 h 后, 分别与 TTK 抗血清及 CENP-E 抗体孵育 1 h, 然后分别与连接有辣根过氧化物酶的羊抗兔二抗(HP Goat anti Rabbit IgG)孵育 45 min; 化学发光底物 ECL(PIERCE)显色并拍照.

2 结果

2.1 TTK 与马达蛋白 CENP-E 形成复合物

为了阐明动粒的分子组成及其在染色体分离过程中的分子作用机理, 我们开展了动粒蛋白质组学研究. 早期研究表明 CENP-E 与纺锤体检验点蛋白 BubR1 结合^[20,22]. 为了鉴定马达蛋白 CENP-E 的未知结合蛋白, 我们从分裂的 HeLa 细胞中分离得到 CENP-E “动粒复合物”, 这些复合物经 SDS-PAGE 电泳分离, 分离的蛋白质条带经胰酶消化后由质谱鉴定出肽谱的质量, 其中一条分子量约为 97 kD 的条带被鉴定为 TTK, 人的 Mps1 激酶(图 1, 表 1). Mps1 激酶家族在结构上非常保守, C 端为激酶区. TTK 激酶区与酵母的 Mps1 激酶区有 41%的同源性.

为了进一步证实 TTK 与 CENP-E 是否形成复合物, 我们用 CENP-E 抗体从分裂的 HeLa 细胞裂解液中免疫沉降可溶性的 CENP-E. 免疫沉降物经 SDS-PAGE 电泳, 转移到硝酸纤维素膜上, 分别用 CENP-E 及 TTK 抗血清杂交. 用 CENP-E 抗体杂交时, 在分子量约 300 kD 处得到一蛋白条带, 证实是 CENP-E(图 2); 用 TTK 抗血清杂交后, 证实分子量 97 kD 的条带为 TTK; 在单独使用 protein A/G, 不加抗体的对照实验中, 没有检测到 CENP-E 和 TTK; 从间期细胞裂解液免疫沉降 CENP-E, 结果表明 CENP-E 在间期时含量较低, 且不存在于动粒, 这时检测不到 TTK; 从而证实 TTK 与 CENP-E 复合物形成的特异性.

同时, 按照上述方法, 用 GFP 抗体从 GFP-TTK 转染的 HeLa 细胞中沉降了 GFP-TTK. 经电泳, 转膜后用 CENP-E 抗体杂交, 也检测到了 CENP-E(图片未提供).

以上结果充分说明, TTK 与 CENP-E 在有丝分裂时形成复合物.

2.2 TTK 是动粒蛋白, 与 CENP-E 共定位于动粒

为寻找 TTK 的亚细胞定位, GFP-TTK 临时转染到 HeLa 细胞中, 用 CREST 抗体标记动粒的位置(图 3(a), 箭头所示), GFP 抗体染色后发现, 在分裂的细胞中 TTK 位于凝集的染色体的动粒上, 呈对点状分布(图 3(c), 箭头所示); 从 ACA 染色和 TTK 染色叠加后的彩图(图 3(d), 箭头所示, 彩色未显示)可以看出, 二者并不完全重合——TTK 往往定位在 ACA 的外缘. GFP 单独转染细胞时, GFP 绿色荧光(未显示)弥散的分布在细胞质中, 未发现有明显的核定位, 表明

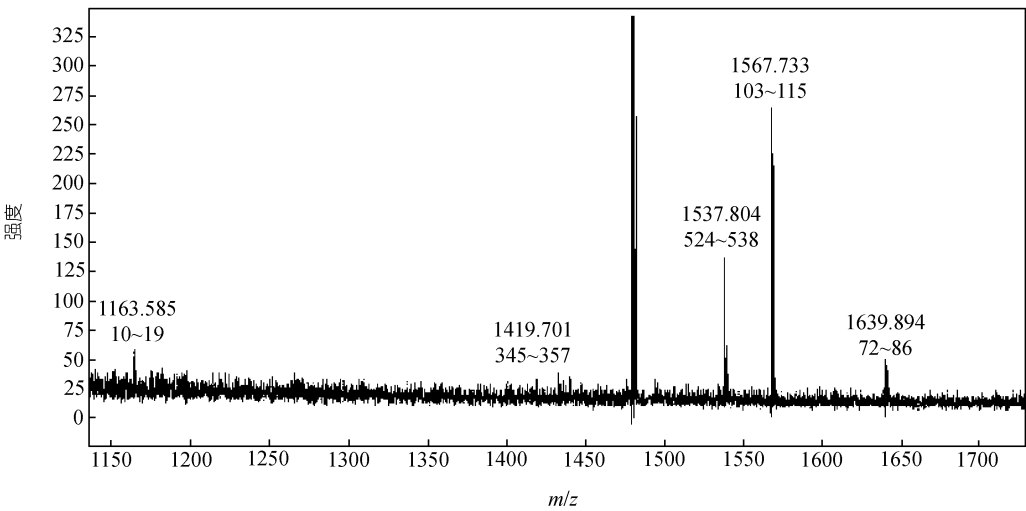


图 1 TTK 肽指纹谱(CENP-E 复合物)以及胰酶峰

表 1 各肽段分子量大小^{a)}

gi: 12653697, TTK 蛋白激酶(Homo sapiens, BC000633), 分子量: 97980, 搜索得分: 46							
观察值	分子量(实验值)	分子量(计算值)	差值	起始	终止	丢失	肽段
1163.59	1162.58	1162.59	-0.01	10	19	0	ELTIDSIMNK
1419.70	1418.69	1418.79	-0.09	345	357	0	SSELIITDSITLK
1537.80	1536.80	1536.85	-0.05	524	538	1	IYSILKQIGSGGSSK
1567.73	1566.73	1566.79	-0.06	103	115	1	YGQNESFARIQVR
1639.89	1638.89	1639.91	-1.03	72	86	1	LEKNSVPLSDALLNK

a) 搜索参数: 搜索类型为肽指纹谱, 固定修饰为巯基酰胺甲基化, 蛋白分子量为无限制, 肽段所带电荷为 +1, 检索峰数目为 5, 酶为胰蛋白酶, 分子量值为单峰, 肽段质量误差为 ± 0.08 %, 最多可遗漏的酶切位点数目为 1

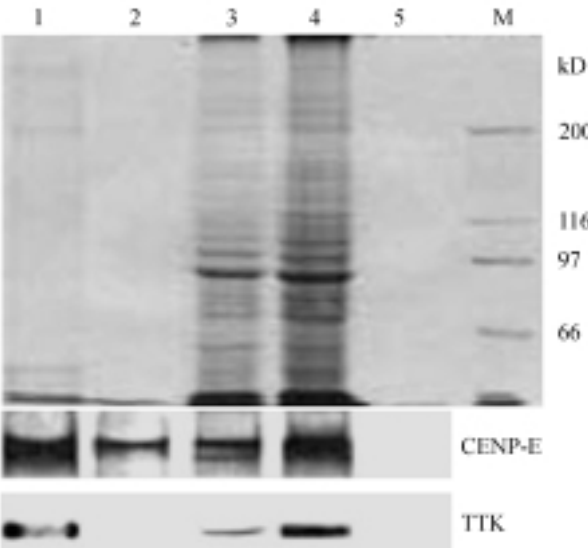


图 2 TTK 与 CENP-E 复合物的鉴定
1 示 CENP-E 免疫沉淀 M 期细胞裂解液, 2 示 CENP-E 免疫沉淀间期细胞裂解液, 3 示间期细胞裂解液, 4 示 M 期细胞裂解液, 5 示 proteinA/G(不含抗体)对照。上排为考马斯亮蓝染色, 下排为蛋白印迹 (CENP-E 和 TTK 抗血清)

TTK 的动粒定位是特异性的(图片未提供)。
TTK 与 ACA 的共染色表明 TTK 定位于动粒, 但位于不同的区域。为确认 TTK 的亚细胞定位, 我们用 GFP 和 CENP-E 抗体同时标记 TTK 与 CENP-E 蛋白, 经 FITC 与 Rhodamine 标记的二抗显色表明, TTK 和 CENP-E 的位置相互重叠, 提示两者共同定位在染色体的动粒上(图 4(a), (c), 箭头所示)。CENP-E 与 TTK 二者叠加后的彩色图像(图 4(d))完全重叠, 说明 TTK 可能与 CENP-E 共定位在染色体的动粒最外层。

3 讨论

我们已经初步证实 TTK 是一个与动粒结合的蛋白质激酶, 在细胞有丝分裂中可能参与纺锤体检验点过程。纺锤体检验点信号传导主要通过两个蛋白激酶 Bub1/BubR1 和 Mps1 来调控^[23]。我们前期的研究发现, BubR1 与动粒马达蛋白 CENP-E 结合以参与纺锤体调控过程。目前, 我们利用动粒蛋白质组学技

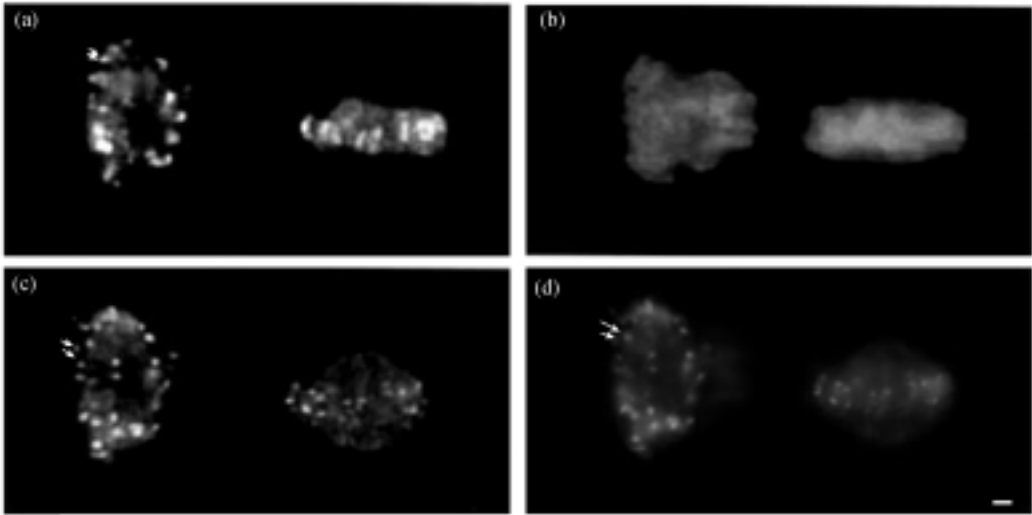


图 3 TTK 定位在 HeLa 细胞染色体的动粒上

(a) ACA, (b) DAPI, (c) TTK 在前中期 HeLa 细胞(左侧)和中期 HeLa 细胞(右侧)中的免疫荧光染色, (d) 叠加后图像. 标尺为 10 μm

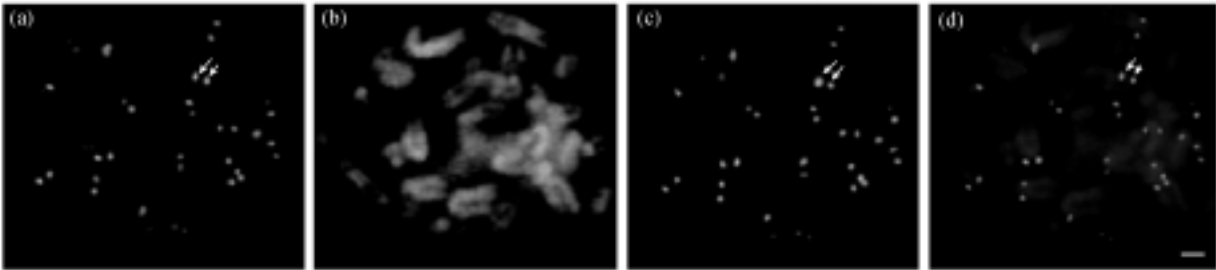


图 4 有丝分裂期 TTK 与 CENP-E 共定位于动粒

(a) CENP-E, (b) DNA, (c) TTK 在前中期 HeLa 细胞中的免疫荧光染色, (d) DNA, CENP-E 与 TTK 叠加后图像. 标尺为 10 μm

术分析人细胞动粒的蛋白质组成时发现了 TTK, 人细胞 Mps1, 尤其发现, 纺锤体检验点激活时, TTK 也能够与 CENP-E 形成复合物. 但是我们还不清楚 TTK 与 CENP-E 是如何形成复合物的. 近期有研究报道, 非洲爪蟾 Mps1 通过把 CENP-E 和 Mad1/Mad2 组装到动粒上从而发挥纺锤体检验点功能, 免疫去除 Mps1 后, CENP-E 不能定位到动粒, 从而纺锤体检验点功能失活; 但是并没有发现 Mps1 与 CENP-E 直接相互作用的证据. 我们还能确定 TTK 与 CENP-E 的定位是否有关. TTK 作为一种激酶, 在有丝分裂时能够发生自身磷酸化, 这提示了 TTK 可能会直接磷酸化 CENP-E, 以调控 CENP-E 与动粒上其他蛋白的相互作用¹⁾. 另外, TTK 也有可能通过某种“桥梁”蛋白与 CENP-E 相连, 它们在动粒上组成一个大的复合物, 以 CENP-E 为中心, 包括 TTK, Bub1 和 Mad

等纺锤体检验点蛋白, 以及某些尚未鉴定的蛋白. 我们正在通过亲和层析的方法从染色体中分离整个动粒复合物, 双向电泳分离后, 利用 MALDI-TOF 鉴定各个蛋白, 以期发现更多的动粒蛋白, 这将有利于我们揭示纺锤体检验点的装配及传导通路.

有丝分裂蛋白质激酶家族(mitotic kinase)在纺锤体检验点中的功能越来越得到重视^[24,25], 当动粒未与微管结合, 或者 nocodazole 使微管解聚后, 动粒上许多动粒蛋白被蛋白激酶磷酸化, 磷酸化蛋白的模式可能作为一种化学信号, 调控细胞分裂的进程. 目前许多蛋白质激酶已经被鉴定分离, 包括 Aurora 家族, NIMA 家族, Plk 激酶等, 它们通过磷酸化作用和去磷酸化作用, 在中心体的分离、纺锤体装配和染色体分离等事件中起着重要调控作用. 不同的蛋白激酶家族之间相互作用, 相互制约, 共同调控有丝分裂

1) 刘丹, 姚雪彪. 动粒马达蛋白的研究与展望. 科学通报(待发表)

的过程. 近期研究发现, 酵母 Aurora/Ipl1p 激酶家族主要参与染色体分离和胞质分裂过程, 同时也是 Mps1 激酶过量表达导致检验点激活时必不可少的蛋白, Ipl1p 失活后, Mps1 即使过量表达, 细胞分裂不能被阻滞.

因此, 纺锤体检验点是一个多分支、多通路的生化调控过程, 随着对 TTK 的结合蛋白以及底物蛋白的确定及分析, 对阐明它在纺锤体检验点通路中的功能具有重要的意义.

致谢 本工作为国家杰出青年基金资助项目(批准号: 39925018)和中国科学院重大项目(批准号: KSCX 2-2-01).

参 考 文 献

1 Hoyt A. A new view of the spindle checkpoint. *J Cell Biol*, 2001, 154: 909~912

2 郑宇鹏, 姚健辉, 姚雪彪. 动点蛋白功能的研究进展. *细胞生物学杂志*, 2001, 2(1): 1~7

3 Nicklas R B. How cells get the right chomosomes. *Science*, 1997, 275: 632~637

4 Nicklas R B, Ward S C, Gorbsky G J. Kinetochore chemistry is sensitive to tension and may link mitotic forces to a cell cycle checkpoint. *J Cell Biol*, 1995, 130: 929~939

5 Clarke D J, Gimenez-Abian J F. Checkpoints controlling mitosis. *Bioessays*, 2000, 22: 351~363

6 Hoyt M A, Totis L, Roberts B T. *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell*, 1991, 66: 507~517

7 Li R, Murray A W. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell*, 1991, 66: 519~531

8 Hardwick K G, Murray A W. Mad1p, a phosphoprotein component of the spindle assembly checkpoint in budding yeast. *J Cell Biol*, 1995, 131: 709~720

9 Farr K A, Hoyt M A. Bub1p kinase activates the *Saccharomyces cerevisiae* spindle assembly checkpoint. *Mol Cell Biol*, 1998, 18: 2738~2747

10 Hardwick K G, Weiss E, Luca F C, et al. Activation of the budding yeast spindle assembly checkpoint without mitotic spindle disruption. *Science*, 1996, 273: 953~956

11 Weiss E, Winey M. The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene Mps1 is part of a mitotic checkpoint. *J Cell Biol*, 1996, 132: 111~123

12 Castillo A R, Meehl J B, Morgan G, et al. The yeast protein kinase

Mps1p is required for assembly of the integral spindle pole body component Spc42p. *J Cell Biol*, 2002, 156(3): 453~465

13 Douville E M, Afar D E H, Howell B W, et al. Multiple cDNAs encoding the esk kinase predict transmembrane and intracellular enzyme isoforms. *Mol Cell Biol*, 1992, 12: 2681~2689

14 Hogg D, Guidos C, Bailey D, et al. Cell cycle dependent regulation of the protein kinase TTK. *Oncogene*, 1994, 9: 89~96

15 Mills G B, Schmandt R, McGill M, et al. Expression of TTK, a novel human protein kinase, is associated with cell proliferation. *J Biol Chem*, 1992, 267: 16000~16006

16 AbrieO A, Magnaghi-Jaulin L, Kahana J, et al. Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell*, 2001, 106: 83~93

17 Fisk H A, Winey M. The mouse Mps1p-like kinase regulates centrosome duplication. *Cell*, 2001, 106: 95~104

18 Stucke V M, Sillji H H, Arnand L, et al. Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *EMBO J*, 2002, 21: 1723~1732

19 Brown K D, Wood K W, Cleveland D W. The kinesin-like protein CENP-E is kinetochore-associated throughout poleward chromosome segregation during anaphase A. *J Cell Sci*, 1996, 109: 961~969

20 Yao X B, Abrieu A, Zheng Y, et al. CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint. *Nature Cell Biology*, 2000, 2: 484~491

21 Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, et al. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, 1996, 68: 850~858

22 Yao X B, Anderson K L, Cleveland D W, et al. Centromere-associated protein E (CENP-E) is an integral componet of kinetochore corona fibers that link centromeres to spindle microtubules. *J Cell Biol*, 1997, 139: 435~447

23 姚健晖, 郑宇鹏, 姚雪彪. 纺锤体检验点的功能与染色体不稳定性. *科学通报*, 2002, 47(2): 81~88

24 Nigg E A. Mitotic kinase as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 2001, 2: 21~32

25 Biggins S, Murray A W. The budding yeast protein kinase Ip11/Aruora allow the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev*, 2001, 15(23): 3118~3129

(2002-04-16 收稿, 2002-07-22 收修改稿)