

细胞动力学研究进展与展望

姚雪彪

(中国科技大学生命科学学院,安徽合肥 230027)

摘要:细胞是生命活动的最小单元,其功能可塑性及动力学特征是维系生命个体健康及物种繁衍的重要保证.在分子水平,细胞可塑性与动力学特征受遗传学及表观遗传学的调控.随着基因组计划的顺利完成及我们对细胞增殖重要蛋白质作用网络生物化学特征研究的成功实施,揭示细胞重要生命活动过程中功能分子的动力学特征及其调控机制显得日益重要.组建中国科学技术大学细胞动力学实验室旨在纳米尺度揭示细胞重要生命活动全过程的详尽全息分子调控机制.在过去的几年中,已取得了动点蛋白质网络研究的阶段性进展,在动点蛋白复合物组分剖析、功能评估、蛋白质作用动力学及可塑性研究等方面均取得了具有特色的成绩.目前,拟在纳米尺度评估动点组装的时空动力学调控机制.相信在未来的日子里,细胞动力学实验室的创新性成果能够综合集成,并为人口与健康领域的重大命题提供相关的解答方案与技术平台.

关键词:基因组;基因组稳定性;细胞动力学;细胞分裂;细胞可塑性;动点;蛋白质作用网络

中图分类号:Q291 **文献标识码:**A

Progress and perspective of cellular dynamics studies

YAO Xue-biao

(School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

Abstract: The cell is a fundamental building block of life. Cellular dynamics and plasticity are essential for animal development, growth and reproduction. At the molecular level, cellular plasticity and dynamics are governed by genetic and epigenetic regulations. With the completion of animal genomes and elucidation biochemical characterization of macromolecule interactions, it is becoming increasingly important to delineate the spatiotemporal dynamics and regulation of key regulators underlying cellular dynamics such as cell division, which was the chief objective to build the Laboratory of Cellular Dynamics in the University of Science and Technology of China at the beginning of this Millennium. Using kinetochore assembly in mitosis as a model system, the Laboratory of Cellular Dynamics has successfully carried out molecular dissection of mammalian kinetochore composition, elucidated several important kinetochore interacting networks and illustrated the key regulator dynamics. Toward the completion of molecular delineation of

收稿日期:2008-06-28; **修回日期:**2008-07-28

基金项目:国家重点基础研究发展(973)计划(2002CB713700),国家自然科学基金(39925018)和中国科学院知识创新工程(KSCX2-2-01)资助.

作者简介:姚雪彪,男,博士/教授.国家杰出青年科学基金获得者,教育部首批长江特聘教授,中国科学院“百人计划”入选者.1995年毕业于美国加利福尼亚大学伯克莱分校并获细胞分子生物学博士学位,其后在美国加州大学圣地亚哥分校从事细胞分裂调控博士后研究.1997年被聘为美国威斯康星州大学医学院助理教授,现任中国科学技术大学教授.2002年被聘为国家重点基础研究发展(973)计划项目“调控细胞增殖重要蛋白质作用网络的研究”首席科学家.主要从事细胞周期分子调控网络机制及蛋白质动力学方面的研究,已在 Nat Cell Biol, Nature Protocol, J Cell Biol, Mol Cell Proteomics, Oncogene 和 J Biol Chem 等国际学术期刊发表学术论文,并撰写 Annual Review in Physiology 综述. E-mail: yaosxb@ustc.edu.cn

mammalian kinetochore interactome and signaling cascades, the Lab aims to illuminate the molecular dynamics underlying kinetochore assembly at nano-scale. Successful accomplishment of their long-term objectives will enable us to consolidate dynamic protein-protein interactome into nano-scale physiology, which will provide a launch-pad for solving complex biological questions such as stem cell plasticity and for designing better anti-cancer drugs.

Key words: genome; genomic stability; cellular dynamics; cell division; cellular plasticity; kinetochore; protein interactome

0 引言

细胞是生命活动的最小单元. 其功能可塑性及动力学特征是维系个体健康发育及物种繁衍的重要保证. 在分子水平上, 细胞可塑性及动力学特征受遗传学及表观遗传学的调控. 随着基因组计划在上世纪 90 年代末的蓬勃发展及中国科学技术大学生命科学学院的成立, 生命科学学院从生命科学研究与教育的长远发展及引领未来生命科学的前沿出发, 提出建立现代细胞生物学研究平台及模式体系. 在 1998 年 2 月 23 日生命科学学院成立之后, 立即着手细胞生物学研究平台的建立及领军人才引进的筹备工作.

恰逢国家教育部与长江实业集团主席李嘉诚先生构思吸引海外华人学者的“长江计划”. 通过该引智计划, 中国科学技术大学生命科学学院通过综合评估, 最终聘请时任美国威斯康星州立大学助理教授的姚雪彪博士来组建细胞生物学实验室及进行技术平台的搭建. 中国科学技术大学利用“985”计划、211 工程及中国科学院知识创新工程等项目经费的支持, 逐步搭建细胞分子生物学技术平台, 其中包括双光子激发荧光显微镜及质谱仪等.

姚雪彪教授在 2000 年 3 月到位开始组建细胞生物学实验室. 姚雪彪认为细胞生物学的主要物质基础是蛋白质-蛋白质的相互作用的可塑性及动态性. 为此, 他把计划组建的细胞生物学实验室命名为“细胞动力学实验室 (Laboratory of Cellular Dynamics)”. 当时实验室的科研目标定位在“描述重要细胞生命活动中重要调控蛋白质的时空作用规律”. 事实上, 美国及日本在过去的三年中相继建立了“细胞动力学”研究中心(所), 旨在揭示细胞重要生命活动全过程的详尽全息分子调控机制. 中国科学技术大学细胞动力学实验室的构思与组建显示了“科大人”的前瞻性思维. 本文着重介绍中国科学技术大学细胞动力学实验室近年来所开展的研究

工作.

1 研究进展

鉴于人类基因组测序时近尾声, 新世纪生命科学进入功能时代. 细胞动力学实验室的科研目标是阐明哺乳动物细胞基因组稳定性与可塑性的分子机制. 众所周知, 在细胞复制过程中, 包含在染色体中的父代遗传信息在经历诸多复杂的运动后均匀地、准确无误地传递给两个子细胞. 整个细胞分裂过程是通过纺锤体丝 (spindle microtubule) 与染色体着丝点 (centromere) 的协同作用来完成的, 因此正确的染色体与纺锤体丝相互作用的可塑性及动力学特征是细胞基因组稳定性的保证, 染色体与纺锤体丝连接异常会导致染色体丢失、易位等, 从而使细胞生长失控, 如癌症的产生与发展. 为此, 细胞动力学实验室选用细胞有丝分裂动点的组装及细胞极性的形成与维系作为模式研究体系, 旨在阐明细胞动力学及可塑性的调控规律. 事实上, 这对细胞有丝分裂分子机制的阐明不仅具有重要的生物学意义, 而且将为校正染色体不稳定性乃至肿瘤防治奠定理论基础^[1].

动点 (kinetochore) 是位于着丝点上的多组动态蛋白质超级结构, 它直接维持着纺锤体丝与染色体的衔接, 调控染色体运动分离的时空序列性及保真性. 利用质谱学 (mass spectrometry) 技术的进展与人类基因组基因 (蛋白质) 序列的可用性, 我们着手分离人类细胞动点 (复合物) 并通过质谱仪测定胰酶消化后的肽段质量从而鉴定出 150 多种动点蛋白. 利用酵母遗传学及体外重组生化实验, 我们系统阐述了 NEK2A 蛋白激酶在有丝分裂纺锤体检验点中的作用及信号传导通路^[2~5], 我们的研究工作揭示 NEK2A 激酶通过磷酸化其底物 Sgo1 及 Hec1 来维系染色体与纺锤体的正确结合. 目前, 我们正利用自制的 NEK2A 活性报告光学探针, 详尽研究 NEK2A 激酶在实时有丝分裂期的时空分布的活性

梯度并佐以小分子抑制剂剖析 NEK2A 激酶在细胞周期循环过程中的系统功能及所涉及的下流效应分子。

细胞有丝分裂是通过 Cdc2 等一系列蛋白激酶调控的蛋白质作用网络,动点蛋白质复合物的动态组装是通过有丝分裂蛋白激酶介导的可逆性蛋白质共价修饰来实施的^[6]。细胞动力学实验室系统地展开了对人类细胞有丝分裂蛋白激酶组(mitotic kinome)及其调控生化通路及网络(mitotic regulatory pathways and interactome)的剖析。为此,我们建立了一个高通量蛋白激酶底物筛选方法,鉴定出一系列有丝分裂蛋白激酶(如 NEK2A 激酶、aurora B 激酶等)的新底物并解析了相关的生化调控通路^[4,5,7]。利用分子生物学方法,小分子化合物调控剂与实时活细胞成像相结合,正逐步描绘有丝分裂蛋白激酶调控网络。为了能尽快地系统了解有丝分裂蛋白激酶调控网络的正常生理功能及在病理状态功能变异的机制,建立了基于生物信息学的蛋白质磷酸化及激酶-底物相关性的预测方法^[8,9],该方法的建立将使得我们能够整合有丝分裂过程中蛋白激酶对动点蛋白质动态组装调控分子机制的研究。阐明动点蛋白质复合物的动态组装机制不仅对进一步了解细胞分裂的分子调控机理有重要的作用,同时解析其分子机制也有利于我们评估其他重要蛋白质复合物的动力学特征及可塑性^[10]。

利用生物化学鉴定同高分辨率电子显微镜技术,我们的工作首次揭示了 TTK 蛋白激酶与 CENP-E 的相互作用及纳米尺度 TTK 蛋白激酶的分子动力学特征^[11~13]。但由于电子显微镜无法提供实时全息分子时空特征追踪,我们正在构建 TTK 蛋白激酶光学探针,力争在纳米尺度描述 TTK 蛋白激酶在有丝分裂过程中结构与功能效应的关系,同时 TTK 蛋白激酶与其分子定位在不同亚细胞器上的相关性。

微管驱动蛋白 Kinesin 家族是一类把化学能转换成机械能的分子马达。姚雪彪博士的早期研究揭示微管驱动蛋白 CENP-E 是维系纺锤体微管与染色体正常运动的重要分子马达^[14,15]。为了阐明 CENP-E 的分子功能及其调控,我们一方面剖析 CENP-E 与其结合分子的作用网络,另一方面综合中国科学技术大学的学科交叉优势研究 CENP-E 分子马达的物理、化学特征及其构-效相关性。CENP-E 是有丝分裂过程中调控染色体运动及姐妹

染色质分离时空序列性及保真性的重要微管马达驱动蛋白^[14,15]。在过去的几年里,我校细胞动力学实验室在揭示 CENP-E 作用网络方法取得了一些原创性成果,其中包括 CENP-E 向动点稳定运输的“安全带”机制-septin 7^[16]; CENP-E 在动点的“锚定”机制-Nuf2^[17],以及 CENP-E 如何通过结合蛋白 CENP-V 参与纺锤体检验点的信号传导等。我们在 CENP-E 小分子抑制剂方面的突破性进展使得我们能够详尽评估 CENP-E 在有丝分裂各期的分子功能。

在人动点蛋白质作用网络及其动力学研究方面,目前在国际上还没有系统报道。我们利用功能蛋白质组学技术与生化重组等手段相结合描绘出有丝分裂动点蛋白质作用的草图,同时我们的一些原创性研究成果发表在国际重要的生物化学及细胞生物学杂志上。例如:我们对 Zwint-1 的研究首次揭示了 Zwint-1 是 ZW10 复合体在动点定位的必要因子,并阐明了 Zwint-1 蛋白质生化通路对细胞染色体分离稳定性的作用机理^[18]。鉴于此通路以及 CENP-V/CENP-E 通路均不存在于线虫及酵母细胞的特点,我们首次提出“后生动物细胞纺锤体检验点进化学说”——即后生动物细胞含有更多纺锤体检验点蛋白及通路用于精确监控并保证染色体分离稳定性。

在过去的几年中,我们已取得了动点蛋白质网络研究的阶段性进展,在动点蛋白复合物组剖析、功能评估、蛋白质作用动力学及可塑性研究等方面均取得了具有特色的成绩^[2~13]。我们利用功能蛋白质组学研究方案系统剖析了动点组装分子机制,并寻找出了一些动点组装重要调控蛋白质。目前,我们正在评估动点组装的时空动力学调控机制。相信在未来的日子里,细胞动力学实验室的创新型成果能够综合集成,并为人口与健康领域的重大命题提供解答方案与技术平台。

在细胞可塑性研究方面,我们选用胃壁细胞为模式体系,揭示了 ezrin 在顶膜的功能可塑性及蛋白质磷酸化对 ezrin 可塑性的调控规律^[19~21]。利用原子力显微镜,我们在纳米尺度显示了磷酸化如何通过改变 ezrin 分子的可塑性来调节细胞的极性^[22]。值得一提的是,我们最近发现幽门螺杆菌利用 VacA 毒素在壁细胞顶膜穿孔导致的胞外钙离子内流激活 calpain 并破坏 ezrin 分子的完整性,从而导致胃酸分泌缺少^[23]。我们的这一发现为根治幽门螺

杆菌导致的胃溃疡及其他疾病奠定了基础. 利用功能蛋白质组学、SiRNA 干扰及生物化学重组, 我们发现了一个潜在的顶膜信号复合体 (apical signaling complex), 其中含有 Pals1、ezrin、ACAP4、Calpain 及 Arf6 等^[24]. 此复合体的主要功能是调节细胞质膜与微丝细胞骨架的动力学特征.

2 结语与研究展望

中国科学技术大学细胞动力学实验室的科研思想是: 细胞生物学的主要物质基础是蛋白质-蛋白质的相互作用的可塑性及动态性, 同一蛋白在不同的时间与空间行使不同的功能. 为此, 我们的下一阶段的工作目标是在获得了详尽的生化鉴定信息之后, 从纳米尺度 (~10 nm) 评估蛋白质在实时细胞活动过程中的重要调控分子的构-效关系及多个蛋白如何构成功能蛋白复合体. 近年来, 蛋白质结构生物学的蓬勃发展为我们了解一些重要调节蛋白质结构与功能的相关性提供了大量的信息. 由于蛋白功能在细胞生命活动中的动态性及多样性, 阐明蛋白质在活细胞中结构与功能的效应关系不仅是结构生物学未来增长点, 而且是现代细胞生物学的重要内涵. 因此, 蛋白质可塑性与动力学规律研究是功能基因组时代的核心问题, 也是细胞分子生物科学领域研究的国际前沿课题. 研究蛋白质动态相互作用的新的技术和方法不断涌现出来, 例如: 利用荧光共振能量转移 (FRET) 研究蛋白质相互作用动态变化的过程, 利用全内反射荧光显微术 (total internal reflection fluorescence microscopy, TIRF) 评估单个功能分子的动态行为. 令人振奋的是, 光学显微镜成像分辨率在过去的两年里取得了里程碑性的飞跃, 单分子在活细胞中的成像技术和方法近年来也有了长足的进步, 其分辨率已达到 5~20 nm. 这些技术和方法的代表为光敏定位显微镜 (photo-activated localization microscopy, PALM)^[25] 和随机光学重组显微镜 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)^[26,27].

随着光敏定位显微镜及随机光学重组显微镜在未来一段时间内的技术优化, 将为直接观察到纳米尺度的全息动点组装分子动力学过程和分子间的相互作用动态机制提供有力的技术平台. 通过这个高分辨显微操作系统, 可以把我们早期关于蛋白质作用网络的原创性工作积累以全息影像的动态形式呈现出来, 以便最终全面阐述细胞有丝分裂的分子动

力学规律.

“创新之路漫漫, 求索之志诚成”. 中国科学技术大学的细胞动力学研究将在多学科交叉的融合中, 勇往直前, 综合集成, 做出具有特色的创新成果, 造就一支在纳米尺度研究细胞动力学规律的创新团队, 使我国的细胞动力学研究跻身于国际先进行列.

参考文献 (References)

- [1] 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[J]. 科学通报, 2002, 47(2): 81-87.
- [2] Lou Y, Yao J, Zereshki A, et al. NEK2A interacts with MAD1 and possibly functions as a novel integrator of the spindle checkpoint signaling [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279: 20 049-20 057.
- [3] Yao J, Fu C, Ding X, et al. Nek2A kinase regulates the localization of numatrin to centrosome in mitosis [J]. FEBS Letters, 2004, 575: 112-118.
- [4] Fu G, Ding X, Yuan K, et al. Phosphorylation of human Sgo1 by NEK2A is essential for chromosome congression in mitosis [J]. Cell Res, 2007, 17(7): 608-618.
- [5] Du J, Cai X, Yao J, et al. The mitotic checkpoint kinase NEK2A regulates kinetochore microtubule attachment stability [J]. Oncogene, 2008, 27: 4 107-4 114.
- [6] Ke Y, Dou Z, Zhang J, et al. Function and regulation of Aurora/Ipl1p kinase family in cell division [J]. Cell Res, 2003, 13: 69-81.
- [7] Yang Y, Wu F, Ward T, et al. Phosphorylation of HsMis13 by aurora B is essential for assembly of functional kinetochore [J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, doi:10.1074/jbc.M804207200.
- [8] Xue Y, Zhou F, Lu H, et al. GPS: a comprehensive www server for phosphorylation sites prediction [J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33: W184-187.
- [9] Zhou F, Xue Y, Yao X, et al. A general user interface for prediction servers of proteins' post-translational modification sites [J]. Nature Protocol, 2006, 1(3): 1 318-1 321.
- [10] Xue Y, Ren J, Gao X, et al. GPS 2.0: Prediction of kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy [J]. Mol Cell Proteomics, 2008, doi: 10.1074/mcp.M700574-MCP200/18463090.
- [11] Zhang J, Dou Z, Miao Y, et al. TTK is a kinetochore-associated spindle checkpoint kinase and co-localized with CENP-E [J]. Science Bulletin, 2002, 27: 213-219.
- [12] Dou Z, Sawagechi A, Zhang J, et al. Dynamic

- distribution of TTK in HeLa cells: insights from an ultrastructural study[J]. *Cell Research*, 2003,13: 443-449.
- [13] Dou Z, Ding X, Zereshki A, et al. TTK kinase is essential for the centrosomal localization of TACC2[J]. *FEBS Letters*, 2004,572:51-56.
- [14] Yao X, Zheng Y, Sullivan K F, et al. CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint[J]. *Nature Cell Biology*, 2000,2:484-491.
- [15] Yao X, Anderson K L, Cleveland D W. The microtubule-dependent motor centromere-associated protein E (CENP-E) an integral component of kinetochore corona fibers that link centromeres to spindle microtubules [J]. *J Cell Biol*, 1997, 139: 435-447.
- [16] Zhu M, Wang F, Yan F, et al. Septin 7 interacts with centromere-associated protein E and is required for its kinetochore localization [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008,283(27):18 916-18 925.
- [17] Liu D, Ding X, Du J, et al. Human NUF2 interacts with centromere-associated protein E and is essential for a stable spindle microtubule-kinetochore attachment [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007,282(29): 21 415-21 424.
- [18] Wang H, Hu X, Ding X, et al. Human Zwint-1 specifies localization of Zeste White 10 to kinetochores and is essential for mitotic checkpoint signaling[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279: 54 590-54 598.
- [19] Yao X, Forte J G. Cell biology of acid secretion by parietal cells[J]. *Ann Rev Physiol*, 2003,65:103-131.
- [20] Zhou R, Cao X, Watson C, et al. Characterization of protein kinase A-mediated phosphorylation of ezrin in gastric parietal cell activation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003,278: 35 651-35 659.
- [21] Cao X, Ding X, Guo Z, et al. PALS1 specifies the localization of ezrin to the apical membrane of gastric parietal cells [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005,280: 13 584-13 592.
- [22] Liu D, Ge L, Wang F, et al. Single-molecule detection of phosphorylation-induced plasticity changes during ezrin activation[J]. *FEBS Lett*, 2007,581(18):3 563-3 571.
- [23] Wang F, Xia P, Wu F, et al. *Helicobacter pylori* VacA disrupts apical membrane-cytoskeletal interactions in gastric parietal cells [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, doi: 10. 1074/jbc. M80057200.
- [24] Fang Z, Miao Y, Ding X, et al. Proteomic identification and functional characterization of a novel ARF6 GTPase-activating protein ACAP4[J]. *Mol & Cell Proteomics*, 2006,5:1 437-1 449.
- [25] Betzig E, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution[J]. *Science*, 2006, 313:1 642-1 645.
- [26] Huang B, Wang W, Bates M, et al. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy[J]. *Science*, 2008, 319:810-813.
- [27] Bates M, Wang B, Dumpsey G P T, et al. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes [J]. *Science*, 2007, 317: 1 749-1 753.