

领域前沿·中国



鄢秀敏, 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所副研究员。2002年获中国科学院上海生命科学研究院细胞生物学专业博士学位, 随后在德国马普生物化学研究所从事博士后研究。2007年回国后, 在国家海洋局第三海洋研究所开展对虾抗病和对虾病毒的分子与细胞生物学方面的研究。2009年起在生物化学与细胞生物学研究所从事纤毛发生和中心粒复制相关机理方面的研究。作为共同通讯作者, 发现了第一个影响初级纤毛发生的miRNA (Cao *et al.* Nat Cell Biol, 2012); 揭示了多纤毛细胞中心粒复制的分子机理(Zhao *et al.* Nat Cell Biol, 2013)。获得过2012年赛诺菲·安万特-中国科学院上海生命科学研究院优秀青年人才奖和2003年中国细胞生物学学会-CST青年优秀论文奖一等奖。

多纤毛细胞中心粒扩增的分子机制

赵惠杰 鄢秀敏*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 细胞生物学国家重点实验室, 上海 200031)

中心粒是由九组三联体微管组成的圆筒状细胞器, 主要存在于动物细胞中^[1]。中心粒在细胞中主要行使两大功能: 一方面, 中心粒是中心体的核心, 而中心体是哺乳动物细胞的微管组织中心, 在有丝分裂间期参与细胞迁移、胞内运输和形态维持等, 而在有丝分裂期则作为纺锤体的极点参与纺锤体的形成, 参与细胞分裂和遗传物质的分配; 另一方面, 细胞进入G₀/G₁期后, 中心粒可迁移并锚定到细胞质膜上, 作为基体支持纤毛发生^[2-4]。纤毛是一种突出于细胞表面、主要由微管组成的毛状结构。根据纤毛的功能, 可以将其划分为两大类, 运动纤毛(motile cilia)和静纤毛(immotile cilium, primary cilium)。运动纤毛大多在多种终末分化的上皮细胞表面成束存在, 例如气管上皮、室管膜上皮及输卵管上皮细胞等^[5-7]。但也存在一些特殊的运动性纤毛, 其在细胞表面单根存在, 如小鼠胚胎发育过程中出现的胚节(embryonic node)区域细胞表面的纤毛^[8]。运动性纤毛的摆动可以在细胞表面形成液体流、排除异物或黏液以及为细胞运动提供动力。静纤毛通常不具备

运动能力, 大多为单根突出于细胞表面, 主要行使信号转导和感知功能, 在动物体内各种细胞类型中广泛分布。纤毛功能异常会导致多种遗传疾病, 统称为纤毛病(ciliopathies), 症状包括不育、多囊肾、多指、肥胖、慢性气管炎、内脏倒位等^[9-12]。

在增殖细胞中, 为了保证遗传物质能稳定遗传到子代细胞, 中心粒的复制和数目受到严格调控, 即在每个细胞周期中一个“母”中心粒会并且只会产生一个“子”中心粒^[3,13-14]。中心粒数目异常会造成染色体分离错误或失败, 从而导致细胞死亡或癌症的发生^[10]。而与此同时, 在动物体内又存在大量的表面有上百根纤毛的多纤毛细胞, 在纤毛发生过程中需要在短时间内产生大量的中心粒, 这类细胞的功能异常也会导致疾病的发生。那么, 生物体是如何同时满足不同类型的细胞对中心粒数目的不同需求的呢?

目前, 关于增殖细胞中心粒的复制过程已经有较为详细的研究报道, 其中心粒的复制主要以母中心粒依赖的方式(mother centriole dependent, MCD)进行, 主要由少量的几个关键蛋白质来调控, 包括Cep63、Cep152、Plk4和Sas-6等。一般认为, Cep63和Cep152在母中心粒的基部形成环状结构^[15], 招

*通讯作者。Tel: 021-54921404, E-mail: yanx@sibcb.ac.cn

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921404, E-mail: yanx@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2014-01-26 14:25

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.02.9001.html>

募Plk4, 确定子中心粒复制的位点, 然后招募Sas-6起始子中心粒的复制^[16-19]。而对于多纤毛细胞中心粒复制, 在上世纪六十年代, Sorokin和Anderson两个研究组运用电子显微成像技术发现, 在多纤毛发生过程中母中心粒打破了“一胎制”, 即一个母中心粒可以同时产生多个子中心粒(一般为5~6个)。此外, 他们还发现95%左右的中心粒主要是由被称作deuterosome(暂译“摇篮体”)的环状结构产生的, 这种不依赖于母中心粒的方式即为“从无到有”(de novo)的扩增方式, 也被称为摇篮体依赖(deuterosome dependent, DD)的中心粒扩增方式^[15,20]。虽然多纤毛细胞中心粒扩增的方式已经发现了半个世纪, 但是人们对于其中的分子机制以及摇篮体的分子组成几乎还是一无所知。

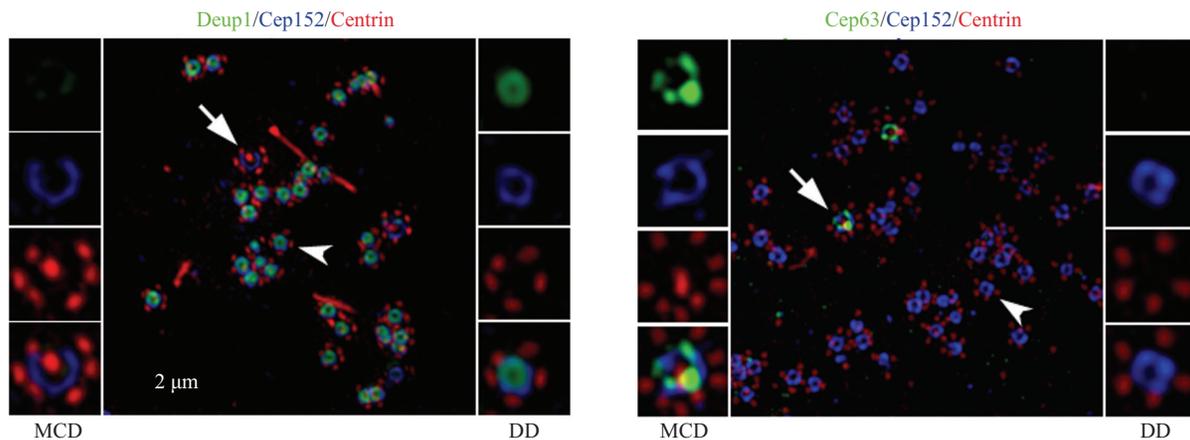
虽然多纤毛细胞中心粒复制的神秘面纱没有被揭开, 但是增殖细胞中心粒复制相关的研究为揭示该问题提供了一定的线索。Habadanck等^[21]发现, 在增殖细胞中外源过表达Plk4、Sas-6等关键基因可以打破母中心粒复制的“一胎制”, 使得一个母中心粒可以同时产生多个子中心粒, 这一现象与电镜观察到的多纤毛细胞MCD的复制方式类似。因此, 在多纤毛细胞中的MCD的复制方式极有可能是通过提高多个关键基因的表达量实现的。那么, DD的中心粒扩增方式的分子机制又是怎样的呢? Khodjakov等^[22]的研究发现, 在增殖细胞中使用激光束人为去除中心粒后, 细胞也可采取de novo的方式产生子中心粒, 说明中心粒的两种复制方式可能共享了一些基因及其相关机制。另外, 在MCD的中心粒复制过程中, 由Cep63和Cep152形成的环状结构^[15,19]与电镜观察到的摇篮体有一定的结构类似性, 提示两者可能是结构类似物, 并有可能由两个同源基因分别介导形成的。根据以上的推测, 关于多纤毛细胞中心粒扩增的分子机理, 我们提出了以下几个假设: (1)MCD和DD的中心粒复制方式共享了部分分子机制和关键基因; (2)这些共享的基因在多纤毛细胞分化过程中高表达; (3)某个或某几个中心粒复制相关的关键调控基因存在旁系同源基因(paralog), 不同的同源基因分别介导了MCD和DD的中心粒扩增。

我们将现已知的中心粒复制起始相关基因, 包括Cep63、Cep152和Plk4, 进行了生物信息学分析, 结果发现, 仅Cep63存在一个旁系同源基因Ccdc67(我们后续的研究发现其为deuterosome结构

蛋白, 因此将其命名为Deup1, 即deuterosome protein 1)。我们首先在U2OS细胞中观察过表达Deup1是否与中心粒的复制相关, 发现在U2OS细胞中过表达GFP融合的Deup1会造成中心粒的过度复制。更有意思的是, 借助3D-SIM超高分辨率显微镜, 我们发现GFP-Deup1在细胞中形成类似于摇篮体的、大小较为均一的环状结构, 该结构还能招募Cep152和Plk4, 并能在其周围产生新的中心粒, 这一现象高度模拟了多纤毛细胞中的DD的中心粒扩增。免疫共沉淀实验证实, Deup1与Cep63一样可以与Cep152结合, 而且Deup1和Cep63与Cep152的相互作用具有排他性, 即两者不能同时结合同一个Cep152分子。此外, 组织表达谱分析也发现, 不同于Cep63比较广谱的表达, Deup1只特异性表达在多纤毛细胞和组织中, 如气管、输卵管等。这些结果提示, Deup1极有可能就是我们寻找的摇篮体的结构组分。

为了深入研究多纤毛细胞中心粒复制的分子机理, 我们在研究中采用了小鼠气管上皮细胞(MTECs)体外分化系统。在MTECs分化过程中, 细胞首先进行中心粒的扩增, 产生大约200个中心粒, 然后以此为基础长出200根左右的动纤毛^[23], 因此该系统是研究多纤毛细胞中心粒扩增的理想平台。和我们预想的相同, Deup1、Cep63以及多个与中心粒复制相关的基因, 如Plk4、Cep152和Sas-6等, 在MTECs分化过程中无论是mRNA还是蛋白质水平都有较大的提高。随后, 我们利用超高分辨率显微镜对Cep63、Deup1、Cep152、Plk4和Sas-6在分化的MTECs中进行了精细的亚细胞定位。我们发现, Deup1在母中心粒有微弱定位, 主要染色信号呈现明显的环状结构, 并且该结构环绕有Cep152和3~6个子中心粒。该结构与早期电镜观察到的摇篮体极其相似(图1), 我们推断Deup1可能特异性地标记了摇篮体。免疫电镜观察进一步证实了Deup1确实定位在摇篮体上。而与Deup1相反, Cep63只定位在母中心粒的周围(图1)。与Deup1和Cep63不同, Cep152(图1)、Plk4和Sas-6在摇篮体和母中心粒周围都有定位。这些结果进一步说明Deup1和Cep63极有可能就是我们寻找的在多纤毛细胞中分别介导DD和MCD的扩增方式的一对旁系同源基因, 而这两条扩增途径的确共享了部分重要蛋白质。

为了进一步研究Deup1和Cep63的功能, 我们利用慢病毒介导的shRNA感染MTECs来敲低Deup1或



Deup1特异性标记摇篮体, Cep63定位在母中心粒周围, 而Cep152在摇篮体和母中心粒周围都有定位。箭头和箭头头分别指示母中心粒和摇篮体。Deup1 specifically localizes at the deuterosome, while Cep63 is only located around the mother centriole. Cep152 associates with both the deuterosome and the mother centriole. The arrows and arrowheads indicate the mother centrioles and the deuterosomes, respectively.

图1 Deup1、Cep63和Cep152在多纤毛中心粒扩增过程中的亚细胞定位

Fig.1 The subcellular localization of Deup1, Cep63 and Cep152 during centriole biogenesis in MTECs

Cep63。与对照组相比, *Deup1*敲低后摇篮体无法形成, DD途径被显著抑制, 而MCD途径则大大地增强, 每个母中心粒复制的子中心粒数目加倍。连续切片电镜观察进一步证实了敲低*Deup1*后摇篮体不能形成。意想不到的是, 当我们在MTECs中敲低*Cep63*时, 无论是母中心粒依赖的还是摇篮体依赖的途径都没有明显的变化。我们猜测, *Deup1*作为*Cep63*旁系同源基因是否可能代偿了*Cep63*的功能? 免疫荧光染色发现, 确实, 在*Cep63*敲低的细胞中*Deup1*在母中心粒位置的染色明显增强。为了进一步了解这两个蛋白质的功能, 我们在MTEC中同时敲低*Deup1*和*Cep63*, 结果显示, 当两者同时被敲低后, 中心粒复制的MCD和DD两个途径均被显著抑制。因此, 这些结果说明*Deup1*是摇篮体的重要组成成分, 参与DD途径, 对摇篮体的形成至关重要, 而*Cep63*则在MCD途径中发挥作用。

在增殖细胞中心粒复制过程中发挥重要作用的Cep152和Plk4在多纤毛细胞中心粒扩增以及摇篮体的形成中又行使怎样的功能呢? 我们发现, 无论是敲低*Cep152*还是*Plk4*, MTECs中都能形成摇篮体, 但是不论MCD还是DD途径的中心粒扩增均无法进行, 说明*Plk4*和*Cep152*是MCD和DD途径共享的关键基因。此外, 我们发现敲低*Cep152*后, 虽然摇篮体可以形成, 但是数目明显减少。Western blot结果显示, 敲低*Cep152*后*Deup1*和*Cep63*的蛋白水平也明显下调, 暗示*Cep152*可能是通过影响*Deup1*的蛋白

质稳定性进而影响了摇篮体的数目。为了进一步确证*Deup1*单独就能形成摇篮体, 并不需要Cep152等额外的蛋白质, 我们在*E. coli*中表达His-*Deup1*, 发现His-*Deup1*可以形成类似摇篮体的环状结构。

综合上述结果, 我们认为在DD途径中, *Deup1*作为摇篮体的核心结构蛋白质, 形成摇篮体并依次招募Cep152和Plk4, 而Cep152和Plk4并不是摇篮体的结构成分, 但Cep152通过与*Deup1*形成复合物, 可以起到保护*Deup1*蛋白质稳定性同时招募Plk4和Sas-6, 起始子中心粒的扩增; 而在MCD途径中, 和增殖细胞中的一样, 首先是Cep63和Cep152在母中心粒形成环状结构, 然后招募Plk4和Sas-6起始子中心粒的扩增。

最后, 我们还对*Deup1*和*Cep63*这对旁系同源基因在进化中的关系进行了研究。通过分子进化树分析, 我们发现从低等的尾索动物海鞘(*Ciona intestinalis*)到高等哺乳动物中都存在*Cep63*, 而*Deup1*则是从硬骨鱼类腔棘鱼(*Latimeria chalumnae*)开始出现的, 而腔棘鱼被认为是陆生脊椎动物的祖先, 并且为了适应陆地生活在腔棘鱼体内已经进化出大量含致密多纤毛的细胞^[24-25]。因此, 进化树分析提示*Deup1*源于*Cep63*基因复制, 并且由于这一基因的出现促进了含致密多纤毛的细胞出现, 很可能因为增强了气管清除异物、脑脊液流动、配子在输卵管和附睾中的流动而促进了脊椎动物的陆地适应性。

我们的研究工作不但通过超高分辨率显微镜

图像清晰地展示了多纤毛细胞中心粒复制的完整过程, 而且还解析了其中的分子机制和生物体是如何同时满足增殖细胞和多纤毛细胞对于不同的中心粒数目需求的。在增殖细胞中, 生物体关闭*Deup1*的转录, 同时控制MCD途径相关蛋白质的表达量, 从而使得每个母中心粒只能产生一个子中心粒。而在多纤毛细胞中, 由于MCD和DD途径共享大部分的基因, 生物体只需启动*Deup1*的表达, 同时提高其他基因的表达, 就能通过MCD和DD途径产生大量的子中心粒, 满足纤毛发生的需求。这种机制的精美之处在于生物体可以通过简单地开启或关闭*Deup1*基因的表达, 较为容易地控制在多纤毛细胞中同时采用MCD和DD的方式, 而在其他类型细胞中采用可控性较强的MCD途径, 既满足不同细胞对不同中心粒数目的需求, 又可以有效地避免中心粒异常进而引起细胞功能的异常和疾病的发生。

参考文献 (References)

- Delattre M, Gönczy P. The arithmetic of centrosome biogenesis. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 9): 1619-30.
- Stearns T. The centrosome yields its secrets. *Nat Cell Biol* 2004; doi:10.1038/ncb0104-14.
- Bornens M. The centrosome in cells and organisms. *Science* 2012; 335(6067): 422-6.
- Nigg EA, Stearns T. The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nat Cell Biol* 2011; 13(10): 1154-60.
- Sorokin SP. Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *J Cell Sci* 1968; 3(2): 207-30.
- Dirksen ER. Centriole morphogenesis in developing ciliated epithelium of the mouse oviduct. *J Cell Biol* 1971; 51(1): 286-302.
- del Bigio MR. Ependymal cells: Biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; 119(1): 55-73.
- Hamada H, Meno C, Watanabe D, Saijoh Y. Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat Rev Genet* 2002; 3(2): 103-13.
- Beisson J, Wright M. Basal body/centriole assembly and continuity. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(1): 96-104.
- Nigg EA, Raff JW. Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell* 2009; 139(4): 663-78.
- Goetz SC, Anderson KV. The primary cilium: A signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet* 2010; 11(5): 331-44.
- Fliegauf M, Benzing T, Omran H. When cilia go bad: Cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(11): 880-93.
- Azimzadeh J, Marshall WF. Building the centriole. *Curr Biol* 2010; 20(18): R816-25.
- Hatch E, Stearns T. The life cycle of centrioles. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2011; 75: 425-31.
- Sir JH, Barr AR, Nicholas AK, Carvalho OP, Khurshid M, Sossick A, *et al.* A primary microcephaly protein complex forms a ring around parental centrioles. *Nat Genet* 2011; 43(11): 1147-53.
- Hatch EM, Kulukian A, Holland AJ, Cleveland DW, Stearns T. Cep152 interacts with Plk4 and is required for centriole duplication. *J Cell Biol* 2010; 191(4): 721-9.
- Cizmecioglu O, Arnold M, Bahtz R, Settele F, Ehret L, Haselmann-Weiss U, *et al.* Cep152 acts as a scaffold for recruitment of Plk4 and CPAP to the centrosome. *J Cell Biol* 2010; 191(4): 731-9.
- Dzhindzhev NS, Yu QD, Weiskopf K, Tzolovsky G, Cunha-Ferreira I, Riparbelli M, *et al.* Asterless is a scaffold for the onset of centriole assembly. *Nature* 2010; 467(7316): 714-8.
- Sonnen KF, Schermelleh L, Leonhardt H, Nigg EA. 3D-structured illumination microscopy provides novel insight into architecture of human centrosomes. *Biol Open* 2012; 1(10): 965-76.
- Anderson RG, Brenner RM. The formation of basal bodies (centrioles) in the Rhesus monkey oviduct. *J Cell Biol* 1971; 50(1): 10-34.
- Habedanck R, Stierhof YD, Wilkinson CJ, Nigg EA. The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nat Cell Biol* 2005; 7(11): 1140-6.
- Khodjakov A, Rieder CL, Sluder G, Cassels G, Sibon O, Wang CL. *De novo* formation of centrosomes in vertebrate cells arrested during S phase. *J Cell Biol* 2002; 158(7): 1171-81.
- Vladar EK, Stearns T. Molecular characterization of centriole assembly in ciliated epithelial cells. *J Cell Biol* 2007; 178(1): 31-42.
- Amemiya CT, Alföldi J, Lee AP, Fan S, Philippe H, Maccallum I, *et al.* The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution. *Nature* 2013; 496(7445): 311-6.
- Zardoya R, Meyer A. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of a "living fossil", the coelacanth (*Latimeria chalumnae*). *Genetics* 1997; 146(3): 995-1010.