

Ctk1蛋白在自噬过程中的作用

乐 雁¹ 周兰姜² 易 聪^{1*}

(¹清华大学生命科学学院, 北京 100084; ²江西省宜春学院化学与生物工程学院, 宜春 336000)

摘要 细胞自噬是一种在真核生物中十分保守的溶酶体依赖性胞内降解途径, 通过形成双层膜结构包裹细胞质内的生物大分子或者细胞器运送到溶酶体进行降解。在实验中发现, Ctk1蛋白对自噬过程有重要调节作用。Ctk1的缺失或者失活都会导致自噬过程不能正常发生, 同时也会影响酵母CVT途径。自噬相关蛋白Atg3与Atg8的结合受到Ctk1的调控影响。因此, Ctk1在自噬过程中自噬体的形成中发挥了重要作用, 揭示了Ctk1的新的功能作用。

关键词 细胞自噬; Ctk1; CVT途径; Atg3; Atg8

Function of Ctk1 in Autophagy Process

Le Yan¹, Zhou Lanjiang², Yi Cong^{1*}

(¹School of Life Science, Tsinghua University, Beijing 100084, China; ²School of Chemistry and Biology Engineering, Yichun University, Yichun 336000, China)

Abstract Autophagy is a lysosome dependent intracellular degradation process, which engulfs molecules or organelles in a double membrane structure to lysosome and then degrade. It was investigated that Ctk1 played an important role in autophagy. In Ctk1 loss yeast or Ctk1 activity deficiency yeast cell, autophagy was impaired and the CVT pathway was also inhibited. We then found that the interaction between Atg3 and Atg8 was regulated by Ctk1. Therefore, Ctk1 contributed to the formation of autophagosome. Our work provided new information about the regulation of autophagy and the function of Ctk1.

Key words autophagy; Ctk1; CVT pathway; Atg3; Atg8

细胞自噬是真核生物进化过程中一个十分保守的胞内降解过程, 对维持生命体的代谢和健康有着重要作用^[1]。区别于蛋白酶体降解途径, 细胞自噬是通过在细胞内形成双层膜结构囊泡, 包裹细胞质及受损的细胞器等形成完整的双层膜小泡即自噬小体。随后同溶酶体(酵母中为液泡)融合并进行物质的降解和再利用。自噬参与了很多重要的生理过程, 例如外源微生物的清除、细胞程序性死亡、抵抗衰老、抗原呈递等, 在生物体生长发育、免疫防御、细胞程序性死亡、肿瘤抑制、神经性病变抑制等方面发挥非常重要的作用^[2]。

细胞自噬最早在哺乳动物细胞中发现, 随后二十世纪90年代, Ohsumi等^[3]在酵母中发现了自噬现象, 并开始以酵母为模式生物展开相关研究。自此, 细胞自噬的研究才真正开始发展。经过二十多年的研究累积, 越来越多的细胞自噬相关基因被发现, 酵母也已成为细胞自噬分子机制研究中最成熟的模式生物。

Ctk1是蛋白复合体CTDK-1(C-terminal domain kinase I)的催化亚基^[4]。CTDK-1复合体在转录和翻译这两个重要的生命过程中都有重要的调控作用。它能够通过磷酸化来调控RNA聚合酶II、Rpo21等重要

收稿日期: 2014-02-03 接受日期: 2014-04-01

国家自然科学基金项目(批准号: 31125018、30971484)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-62794552, E-mail: yicong2008202@yahoo.com.cn

Received: February 3, 2014 Accepted: April 1, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31125018, 30971484)

*Corresponding author. Tel: +86-10-62794552, E-mail: yicong2008202@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2014-07-01 17:09 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0034.html>

蛋白的功能,在转录、染色质重组、mRNA修饰和出核等过程的调控中有重要作用^[5]。本实验中,我们发现Ctk1蛋白在细胞自噬中也扮演了重要角色,Ctk1的缺失将影响自噬过程的进行。进一步研究发现,Ctk1蛋白的激酶活性在其中起到了重要作用,Atg3和Atg8的结合受到Ctk1蛋白的调控从而影响自噬过程。本实验揭示了Ctk1蛋白在自噬过程中的调控作用,为自噬的分子机制研究提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

实验中使用的酵母菌株和质粒如表1和表2所列。其中,野生型BY4741菌株购自Invitrogen公司,为实验室库存。菌株 $ctk1\Delta$ 、WTape1-R和 $ctk1\Delta$ Ape1-R由PCR片段同源重组构建,使用EUROSCARF公司的“PCR-TOOLBOX”完成^[6]。GFP-Atg8和Atg13-8SA质粒由Yoshinori Ohsumi实验室所赠。质粒YcPlac111[*CTK1-FLAG*]、pRS316[*HA-ATG8*]中*CTK1*和*ATG8*基因由酵母基因组PCR扩增获得,再连接到相应的载体上,通过PCR反应将蛋白标签FLAG、HA添加到相应质粒上。其余CTK1的突变

质粒为YcPlac111[*CTK1-FLAG*]进行PCR点突变反应得到。本实验中所有构建得到的菌株和质粒都经由PCR或是Western blot验证。

1.2 培养基

SD培养基: 1 L ddH₂O、1.7 g酵母氮基、20 g葡萄糖、5 g硫酸铵、酵母氨基酸混合物。

SD(-N)饥饿培养基: 1 L ddH₂O、1.7 g酵母氮基、20 g葡萄糖。

1.3 抗体和试剂

本实验所用Ape1抗体和Atg3抗体为日本东京工业大学Yoshinori Ohsumi实验室所赠,GFP抗体购自Roche公司,FLAG抗体和FM4-64染料购自SIGMA-ALDRICH公司,HA抗体购自Abmart公司,PGK1抗体购自Nordic Immunology公司。

1.4 仪器设备和实验方法

图像采集使用OLYMPUS FV1000激光共聚焦显微镜。所有图像采取均选取沿轴向接近半径最大处,进行单层扫描。

本实验中采用的实验技术方法如自噬水平显微图像检测、酵母转化、蛋白质印迹(WB)、免疫沉淀(IP)等参照参考文献[7]。

表1 本研究中使用的酵母菌株
Table 1 Yeast strains used in this study

名称 Name	基因型 Genotype	来源 Reference
BY4741	<i>MATahis3Δ1 leu2Δ met15Δ ura3Δ</i>	This study
$ctk1\Delta$	BY4741 <i>ctk1Δ::HIS3</i>	This study
WTape1-R	BY4741 <i>APE1-RFP::KAN</i>	This study
$ctk1\Delta$ Ape1-R	BY4741 <i>ctk1Δ::HIS3 APE1-RFP::KAN</i>	This study

表2 本研究中使用的质粒
Table 2 Plasmids used in this study

名称 Name	描述 Description	来源 Reference
pRS316[<i>GFP-ATG8</i>]	pRS316 GFP-ATG8	[5]
YcPlac111[<i>CTK1-FLAG</i>]	YcPlac111 CTK1-FLAG	This study
YcPlac111[<i>CTK1-D324N-FLAG</i>]	YcPlac111 CTK1-FLAG D324N	This study
YcPlac111[<i>CTK1-T338A-FLAG</i>]	YcPlac111 CTK1-FLAG T338A	This study
YE352[<i>ATG13-8SA</i>]	YE352 ATG13 S348A S437A S438A S496A S535A S541A S646A S649A	[6]
pRS316[<i>HA-ATG8</i>]	pRS316 HA-ATG8	This study

2 结果

2.1 Ctk1的缺失抑制自噬发生

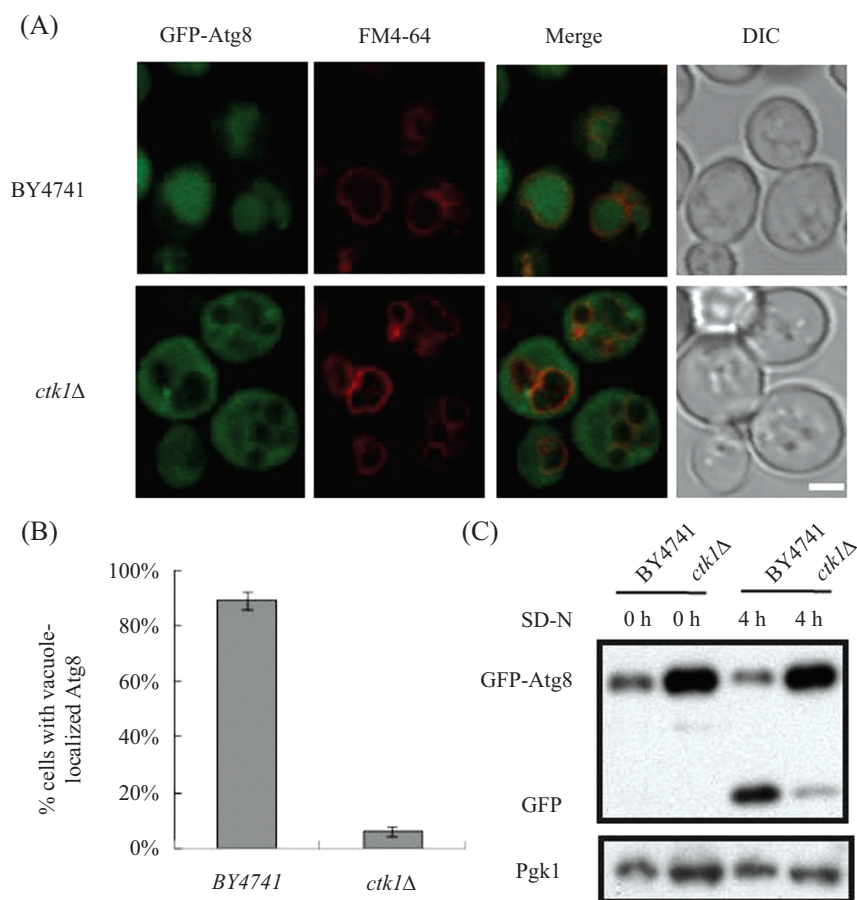
在酵母细胞中自噬可大致分为以下几个过程: 自噬体形成、自噬体与液泡的融合、物质降解。在本实验中使用FM4-64来标记液泡^[8], 用GFP-Atg8来标记自噬体^[9], 通过观察GFP-Atg8是否进入液泡分析自噬过程。

如图1A所示, 当氮源饥饿4 h后, 野生型酵母菌株BY4741中大部分的GFP-Atg8已经进入液泡, 表示自噬正常发生。而Ctk1缺失的菌株中绝大多数的细胞没有发生融合现象, 自噬过程不能正常进行。而免疫印记实验(WB)结果也显示, 饥饿处理4 h后Ctk1缺失的菌株中GFP-Atg8的GFP剪切条带明显较野生型中浅, 自噬发生水平较低(图1C)。以上结果表明,

Ctk1蛋白在自噬的过程中发挥着重要作用, Ctk1的缺失会导致自噬体与液泡不能正常融合, 自噬过程受到抑制。

2.2 Ctk1影响CVT途径

Ape1是酵母细胞选择性自噬CVT(cytosol to vacuole targeting)途径的底物, 在正常情况下, Ape1前体会经由CVT通路转运到液泡中进行剪切^[10]。我们在菌株中过表达标记蛋白Ape1-RFP后发现, 在野生型菌株中, CVT途径仍能正常进行, 大部分Ape1-RFP能够进入液泡, 而在Ctk1缺失的菌株中大部分细胞中的Ape1-RFP无法进入液泡, CVT途径不能正常进行(图2A)。同时, 从图2C中我们也可以看到, 野生型菌株BY4741中Ape1的剪切成熟可以正常发生, 而突变菌株*ctk1Δ*中大部分Ape1前体的剪切不能正

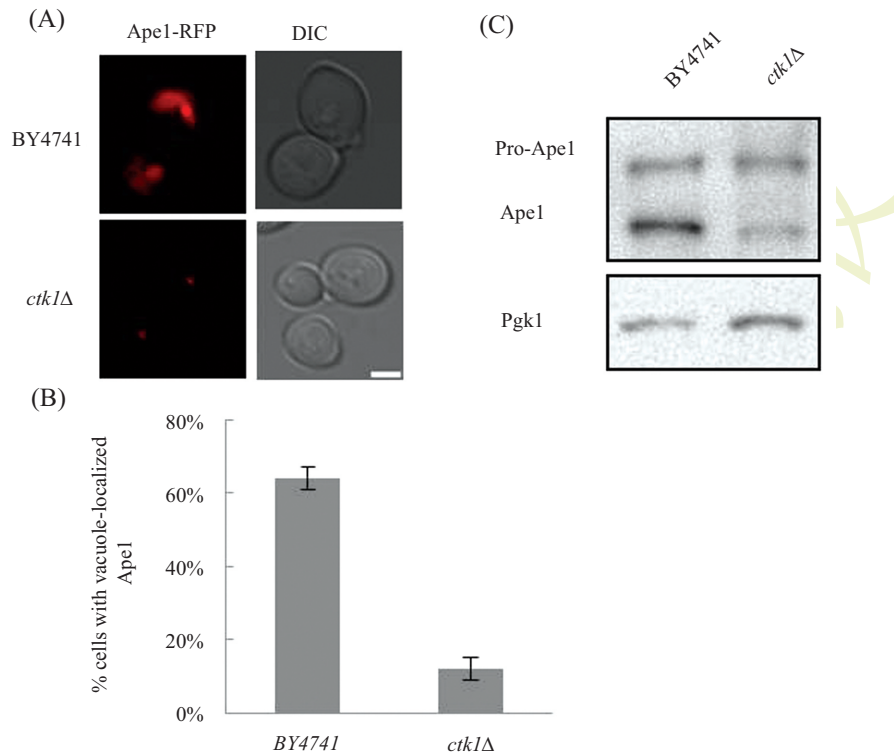


A: 在野生型酵母菌株BY4741和突变菌株*ctk1Δ*中表达自噬体标记蛋白GFP-Atg8(绿色), 用FM4-64染料标记液泡(红色), 用SD(-N)培养基饥饿处理4 h, 共聚焦显微镜活细胞成像(标尺=2 μm); B: 统计A图中GFP-Atg8能够进入液泡的细胞比例, 每组数据分三次独立重复实验, 每次统计100个细胞; C: Western blot检测A图中细胞的GFP-Atg8剪切比例, Pgk1为内参。

A: autophagosome marker GFP-Atg8 (green) was expressed both in strain BY4741 and *ctk1Δ*. Vacuole was stained with FM4-64 (red). The cells were starved for 4 h with SD (-N) medium, then sampled for live cell imaging (scale bar=2 μm); B: one hundred cells from A were quantified for GFP-Atg8 vacuoles translocation as above; C: cells from A were analyzed by Western blot for GFP-Atg8 cleavage. Pgk1 was internal control.

图1 Ctk1影响自噬过程的发生

Fig.1 Ctk1 regulated autophagy



A: 野生型酿酒酵母BY4741和突变菌株 $ctk1\Delta$ 中过表达标记蛋白Ape1-RFP(红色), 用SD培养基培养到0.8 D, 用共聚焦显微镜活细胞成像(标尺=2 μ m); B: 统计A图中Ape1-RFP进入液泡的细胞比例, 每组三次独立重复实验, 每次统计100个细胞; C: Western blot检测菌株BY4741和 $ctk1\Delta$ 中细胞Ape1的剪切比例。

A: Ape1-RFP was overexpressed in yeast strain BY4741 and $ctk1\Delta$. The strains were cultured to 0.8 D in SD medium for live cell imaging (scale bar = 2 μ m); B: one hundred cells from A were quantified for Ape1-RFP vacuoles translocation as above; C: strain BY4741 and $ctk1\Delta$ were analyzed by Western blot for Ape1 cleavage.

图2 Ctk1蛋白影响CVT途径

Fig.2 Ctk1 regulated CVT pathway

常进行。以上结果表明, Ctk1在CVT途径中也发挥着重要作用。

2.3 Ctk1的激酶活性影响自噬发生

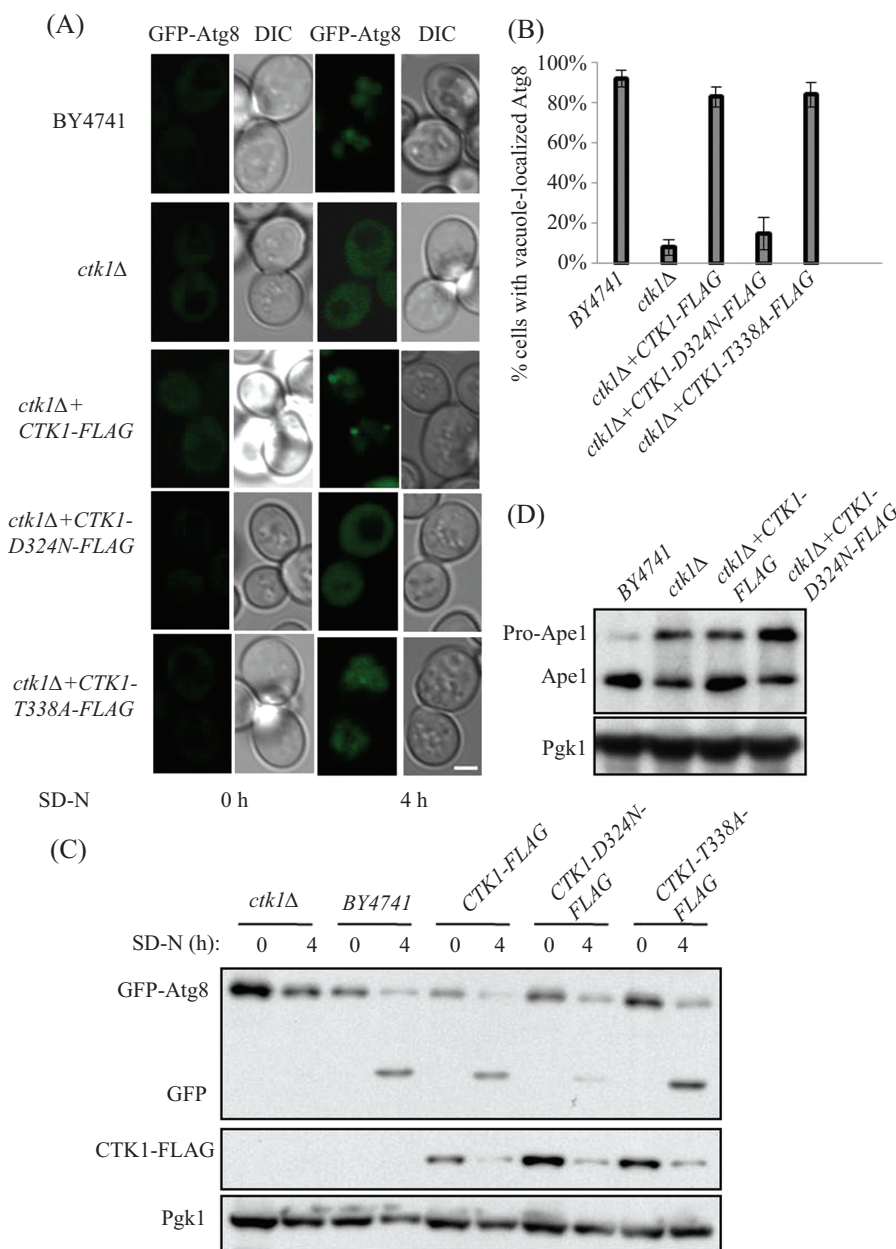
由于Ctk1本身具有激酶活性, 我们在实验中引入了两株突变菌株: $ctk1$ -D324N和 $ctk1$ -T338A。 $ctk1$ -D324N是Ctk1蛋白活性中心突变的菌株, 表现为体外实验激酶活性丧失, 菌株生长缓慢且低温敏感(cold-sensitive phenotype)。 $ctk1$ -T338A是Ctk1蛋白的T环上苏氨酸突变的菌株, 表现为激酶活性降低^[10]。在本实验中, 我们在突变菌株 $ctk1\Delta$ 中分别转入含有野生型 $ctk1$ 基因、 $ctk1$ -D324N突变基因和 $ctk1$ -T338A突变基因的表达质粒, 观察自噬过程的发生。从图3A中我们可以看到, $ctk1\Delta$ 菌株和Ctk1激酶活性缺失的 $ctk1\Delta$ +CTK1-D324N-FLAG突变菌株中, 自噬受到抑制, 大部分细胞中GFP-Atg8不能进入液泡。而在野生型菌株BY4741, 野生型Ctk1表达的 $ctk1\Delta$ +CTK1-FLAG菌株和Ctk1激酶活性降低的 $ctk1\Delta$ +CTK1-T338A-FLAG菌株中, 大部分的GFP-

Atg8进入液泡, 自噬能正常发生。而图3C中GFP-Atg8的剪切、Ctk1蛋白缺失和Ctk1蛋白酶活性缺失的菌株, 细胞自噬受到影响, 而Ctk1蛋白酶活性降低的菌株, 细胞自噬仍能正常进行。此外, 通过Ape1的剪切实验同样发现, Ctk1蛋白激酶活性缺失的菌株中CVT途径受到影响, Ape1剪切成熟较野生型明显减少(图3D)。

突变菌株 $ctk1$ -T338A与活性中心突变 $ctk1$ -D324N菌株相比较, 自噬能够正常发生。在突变菌株 $ctk1$ -T338A中, Ctk1蛋白的激酶活性降低但是不影响自噬发生, 只有Ctk1蛋白激酶活性完全丧失时, 自噬过程才受到明显抑制。以上结果可知, 自噬过程起重要作用的可能是Ctk1的激酶活性而并非是Ctk1蛋白自身直接参与到自噬小体的组装过程中。

2.4 Ctk1蛋白调控了Atg3和Atg8的结合

为了进一步研究Ctk1对自噬的影响, 我们在突变菌株 $ctk1\Delta$ 中转入了过表达Atg13-8SA的质粒。在



A: 在野生型酵母菌株和突变菌株中分别表达标记蛋白GFP-Atg8(绿色), 用SD(-N)培养基饥饿处理0, 4 h, 共聚焦显微镜活细胞成像(标尺=2 μ m); B: 统计A图中GFP-Atg8进入液泡的细胞比例, 每组3次独立重复实验, 每次统计100个细胞。C: Western blot检测A图中细胞的GFP-Atg8剪切比例; D: 将野生型和突变菌株用SD培养基培养到0.8 D, Western blot检测细胞中Ape1的剪切水平。

A: autophagosome marker GFP-Atg8 (green) was overexpressed in yeast strains. The strains were starved for 0, 4 h with SD (-N) medium for live cell imaging (scale bar=2 μ m); B: one hundred cells from A were quantified for GFP-Atg8 vacuoles translocation as above; C: cells from A were analyzed by Western blot for GFP-Atg8 cleavage; D: cells were analyzed by Western blot for Ape1 cleavage. The cells were cultured to 0.8 D.

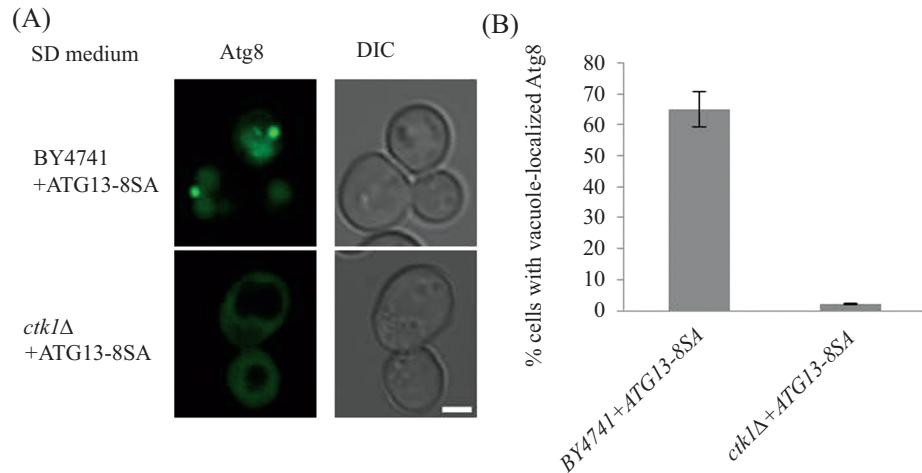
图3 Ctk1蛋白的激酶活性影响自噬

Fig.3 The kinase activity of Ctk1 regulated autophagy

SD培养基中, 过表达Atg13-8SA突变蛋白的酵母细胞, 在完全培养基条件下无需诱导即可自发发生自噬现象^[11]。从图4中可以看到, 在实验中野生型转入Atg13-8SA的菌株中大部分细胞的GFP-Atg8与液泡发生了融合; 而Ctk1缺失的菌株中只有很少的细胞能发生GFP-Atg8与液泡的融合, 自噬不能发生。这

说明Ctk1对自噬的调节作用在Atg13的下游。

因此, 我们观察了Atg13下游的若干自噬基因。如图5所示, 在饥饿诱导0, 1 h的野生型和突变型菌株中使用HA抗体对已标记的Atg8做免疫沉淀。结果显示, 与野生型相比, 在Ctk1缺失的菌株中, 氮源饥饿0, 1 h时, Atg3与Atg8的结合明显减少。

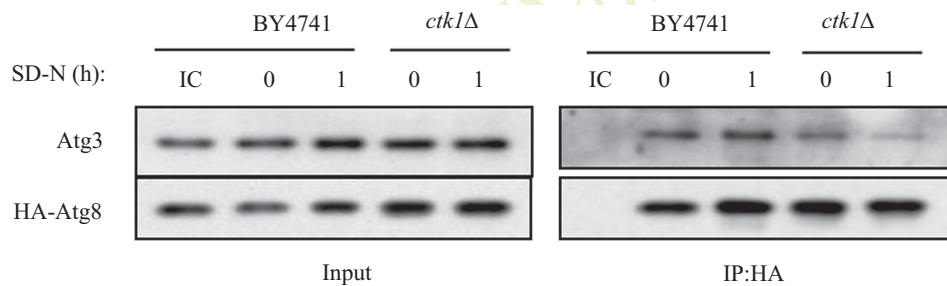


A: 在野生型酵母菌株BY4741和突变菌株*ctk1Δ*中分别过表达突变蛋白Atg13-8SA并转入标记蛋白GFP-Atg8(绿色), 用SD培养基培养到0.8 D, 共聚焦显微镜活细胞成像(标尺=2 μm); B: 统计A图GFP-Atg8进入液泡的细胞比例, 每组三次独立重复实验, 每次统计100个细胞。

A: protein Atg13-8SA was overexpressed in yeast strain BY4741 and *ctk1Δ*. The strains were cultured with SD medium to 0.8 D for live cell imaging (scale bar=2 μm); B: one hundred cells from A were quantified for GFP-Atg8 vacuoles translocation as above.

图4 Ctk1调控Atg13下游基因

Fig.4 Ctk1 regulated the downstream of Atg13



在野生型酵母菌株BY4741和突变菌株*ctk1Δ*中用HA标记Atg8蛋白。使用SD(-N)培养基饥饿处理1 h。收集蛋白样品, 做免疫沉淀。

Protein Atg8 was tagged with HA in yeast strain BY4741 and *ctk1Δ*. The strains were starved for 0, 4 h with SD (-N) medium for immunoprecipitation.

图5 Ctk1蛋白影响Atg3与Atg8的结合

Fig.5 Ctk1 regulated the Atg3-Atg8 interaction

由此可以得知, Ctk1蛋白对自噬过程中Atg3与Atg8的结合有重要调节作用。

3 讨论

上述结果显示, Ctk1蛋白对于自噬过程较下游Atg3与Atg8的结合有影响。Ctk1蛋白的缺失将导致自噬体不能正常组装形成。而Ctk1蛋白本身具体是如何参与调节自噬过程的还需要进一步研究。一方面, Ctk1本身在细胞转录和翻译的调控上有重要作用, 它可能通过影响某个自噬相关蛋白的蛋白水平或者活性, 进而调节自噬过程的发生; 另一方面, Ctk1蛋白对自噬的调控可能在于它本身的激酶活性。实验结果表明, 一部分激酶活性的损失并不会对自噬过程造成显著影响, 只有将活性中心突变,

激酶活性完全丧失时, 才会对自噬过程产生明显的影响。这从一方面也暗示了我们, Ctk1蛋白对自噬基因或蛋白的调节有可能是一种更为直接的作用。Ctk1蛋白可能直接作用于一个或者多个自噬相关蛋白。后续的研究可以从探究两个突变体*ctk1-D324N*与*ctk1-T338A*之间功能的差异性来寻找突破点。此外, 由图3C中可以看到, Ctk1的蛋白水平随着自噬的发生下降, 由此我们猜测Ctk1也可能直接参与到自噬小体的组装过程中, Ctk1可能会随着自噬小体进入液泡降解。目前的研究已经发现众多自噬相关蛋白, 受到磷酸化、乙酰化等修饰调节^[12]。我们推测, Ctk1蛋白很有可能通过对自噬相关蛋白的直接作用进行磷酸化修饰进而调节自噬过程。而具体的过程和分子机制, 还需要进一步实验研究。

参考文献 (References)

- 1 D J Klionsky. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(11): 931-7.
- 2 Mizushima N. Autophagy: Process and function. *Genes Dev* 2007; 21(22): 2861-73.
- 3 Ohsumi Y. Yoshinori Ohsumi: Autophagy from beginning to end. Interview by Caitlin Sedwick. *J Cell Biol* 2012; 197(2): 164-5.
- 4 Lee JM, Greenleaf AL. CTD kinase large subunit is encoded by CTK1, a gene required for normal growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene Expr* 1991; 5(2): 18.
- 5 Hampsey M, Kinzy TG. Synchronicity: Policing multiple aspects of gene expression by Ctk1. *Genes Dev* 2007; 21(11): 1288-91.
- 6 Janke C, Magiera MM, Rathfelder N, Taxis C, Reber S, Maekawa H, *et al.* A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 2004; 21(11): 947-62.
- 7 Yi C, Ma M, Ran L, Zheng J, Tong J, Zhu J, *et al.* Function and molecular mechanism of acetylation in autophagy regulation. *Science* 2012; 336(6080): 474-7.
- 8 Vida TA, Emr SD. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J. Cell Biol* 1995; 128(5): 779-92.
- 9 Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J* 2001; 20(21): 5971-81.
- 10 Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Studies of cargo delivery to the vacuole mediated by autophagosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev Cell* 2002; 3(6): 815-24.
- 11 Kamada Y, Yoshino K, Kondo C, Kawamata T, Oshiro N, Yonezawa K, *et al.* Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. *Mol Cell Biol* 2010; 30(4): 1049-58.
- 12 Jeong H, Then F, Melia TJ Jr, Mazzulli JR, Cui L, Savas JN, *et al.* Acetylation targets mutant huntingtin to autophagosomes for degradation. *Cell* 2009; 137(1): 60-72.