

Chk1 C 末端调控结构域对其在 DNA 损伤后的核定位及修复合活性的影响

宁丽峰^{①②}, 王慧萍^②, 散丹^①, 桑建利^{①*}

① 北京师范大学生命科学院细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室, 北京 100875;

② 国家人口和计划生育委员会科学技术研究所生殖免疫研究室, 北京 100081

* 联系人, E-mail: jlsang@bnu.edu.cn

2010-12-27 收稿, 2011-04-19 接受

国家重大科学研究计划(CB914401)和国家高技术研究发展计划(2006AA02Z4A6)资助

摘要 DNA 损伤效应激酶 Chk1 是一种在进化过程中高度保守的蛋白激酶, 它是联系 DNA 完整监控器和细胞周期引擎的关键介导蛋白. 通过对一系列 GFP 标记的 Chk1 调控结构域缺失突变体细胞核定位变化分析, 发现 Chk1 C 末端调控结构域中的 34 个氨基酸残基(334~368)参与了调控损伤诱导的 Chk1 核积累. 同时通过构建 Chk1 及不同 Chk1 调控结构域缺失突变体的 pXJ41 重组质粒, 并与报告质粒 pEGFP-N2 共转染 HeLa 细胞, 研究不同 Chk1 调控结构域缺失突变体的 DNA 损伤修复能力, 同时检测了不同 Chk1 调控结构域缺失突变体对细胞周期的影响, 并通过 Western blot 检测 Chk1 下游靶标 Cdc25C 的磷酸化情况进行了 Chk1 缺失突变体激酶活性分析. 结果显示, C 末端缺失 108 个氨基酸残基(368~476)的 CA368 活性高于全长 Chk1, 并且其过表达可诱导细胞 G1/S 期阻滞, 延迟细胞周期进程. C 末端缺失 142 个氨基酸残基(334~476)的 CA334 活性与全长 Chk1 相当, C 末端缺失 188 个氨基酸残基(288~476)的 CA288 几乎没有酶活性, 说明调控结构域包括抑制和激活元件. 通过本研究对 Chk1 的功能有了新的更为深入的认识.

关键词

Chk1
核积累
结构域
DNA 损伤
修复
细胞周期

为了将遗传信息准确传递, 生物体面临着巨大的挑战. 为了维持基因组的完整, 细胞在进化中建立和发展了检验点机制, 即探测基因组紊乱, 通过感受蛋白、传感蛋白、中介蛋白和效应蛋白组成的复杂网络信号传导通路启动应答反应^[1]. 感受蛋白探测 DNA 损伤或异常 DNA 结构并启动信号应答, 传感蛋白将信号放大并将信号传递给效应蛋白, 效应蛋白进行一系列细胞活动如停滞细胞周期、修复损伤 DNA 或诱导细胞凋亡.

检验点可以探测 DNA 损伤并使细胞周期停滞, 从而为细胞提供充足的时间进行修复. 检验点在染色体 DNA 受到损伤或某些其他重要事件, 如 S 期 DNA 复制、M 期染色体联会未正常完成时被激活. 细

胞对 DNA 损伤和复制干扰的应答, 包括检验点信号传导通路的激活能够确保高保真地完成 DNA 复制和染色体分离. 在高等生物中, 检验点应答缺陷会导致基因组不稳定、细胞死亡和易患癌体质.

细胞周期检验点激酶 1(checkpoint kinase1, Chk1)首先是在裂殖酵母中鉴定的, 随后陆续在哺乳动物、苍蝇、出芽酵母、蠕虫、青蛙和鸡中确定了 Chk1 的同源物, 并且发现在这些生物体中 Chk1 同源物的检验点功能高度保守^[2]. Chk1 在 DNA 损伤引起的细胞周期检验点调节中有着非常重要的作用^[3,4]. 在酵母和高等真核生物中, Chk1 在 Atm 样蛋白的下游起作用, 是联系细胞周期和 DNA 修复的关键介导蛋白^[5], 它可以有效地调节细胞周期进程, 实时监控细胞基因

组 DNA 的完整性, 及时启动 DNA 修复系统修复受损伤的基因组 DNA. Chk1 高表达有利于细胞的自我修复, 若存在 Chk1 基因功能的缺失或表达减少, 会导致细胞不能及时停滞于 G2/M 期, 不利于自我修复, 细胞发生凋亡^[6-8].

研究认为, 细胞周期检验点途径主要由毛细血管扩张性共济失调有关基因 (ATM Rad3 related, ATR)、毛细血管扩张性共济失调突变基因 (ataxia telangiectasia mutated, ATM)、Chk1/2 和细胞分裂周期蛋白 (Cdc25A/B/C) 等组成^[9]. ATR 和 ATM 通过磷酸化激活 Chk1. Chk1 应答 DNA 损伤或复制阻滞需要 ATR/ATM 磷酸化 Chk1 的位点. Chk1 通过信号转导和放大, 调节下游靶蛋白表达, 使细胞周期出现阻滞^[10]. 基于 Chk1 是 ATM 和 ATR 的下游靶点, DNA 损伤后通过 2 条细胞周期检验点信号通路引起细胞周期阻滞, 灭活 *Chk1* 基因可能进一步阻断细胞周期检验点信号通路^[11].

有丝分裂的起始所需要的关键事件是 cyclinB-Cdk1 激酶的激活^[12], 通过 Wee1 和 Myt1 激酶介导的抑制性磷酸化使 cyclinB-Cdk1 失活, 但是 Cdc25C 磷酸酶能够激活 cyclinB-Cdk1^[13], Chk1 是 G2/M DNA 损伤校验的核心, 在存在 DNA 损伤时检验点激酶 Chk1 通过磷酸化 Cdc25C 来阻止 Cdc25C 激活 cyclinB-Cdk1, 从而阻止细胞通过 G2/M 检验点^[14], 使细胞有足够的时间启动 DNA 修复机制. 磷酸化抑制了 Cdc25C 的活性, 阻断了有丝分裂, 若能对受损的 DNA 进行有效修复, 则能继续进入细胞周期^[15].

Chk1 由 2 个不同的部分组成, 即 N 端编码激酶结构域和 C 端编码调控结构域. 调控结构域中含有 SQ/TQ 域 (317~383), 其中 ATM 的靶蛋白一般都含有 SQ/TQ 序列, 其特征是谷氨酸盐紧随丝/苏氨酸残基, DNA 损伤后, ATM 磷酸化 Chk1 的第 317 位和第 345 位丝氨酸, Chk1 含有核定位序列 (NLS) (260~271) (图 1)^[16-21]. 在酵母和哺乳动物细胞中, DNA 损伤前, Chk1 定位在核和胞质中, DNA 损伤后, Chk1 在核内积累, 使 Chk1 的亚细胞定位发生了明显的变化^[22]. Ng 等人^[5]的实验结果显示, 在培养的细胞中表达的重组 Chk1 仅具有低的基本活性, 与全长蛋白不同, C 末端缺失的 Chk1 显示自磷酸化和磷酸化 Cdc25C 的第 216 位丝氨酸. 但迄今为止, 关于 C 末端调控结构域对 DNA 损伤后 Chk1 核定位和修复活性的研究并不深入.

本文通过对一系列 GFP 标记的 Chk1 调控结构域

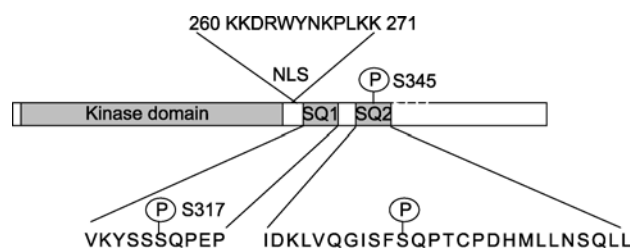


图 1 Chk1 蛋白结构域示意图

Chk1 由 N 端编码激酶结构域和 C 端编码调控结构域组成, 调控结构域中含有 SQ/TQ 域 (317~383) 和 SQ/TQ 序列. P 表示磷酸化位点, DNA 损伤后, ATM 磷酸化 Chk1 的第 317 位和第 345 位丝氨酸. Chk1 含有核定位序列 (NLS) (260~271)

缺失突变体细胞定位研究, 发现 Chk1 C 末端调控结构域中的 34 个氨基酸残基 (334~368) 参与了调控损伤诱导的 Chk1 核积累. 构建 Chk1 及不同 Chk1 缺失突变体的 pXJ41 重组质粒, 通过与报告质粒 pEGFP-N2 共转染细胞, 研究不同 Chk1 调控结构域缺失突变体的损伤修复能力, 同时研究不同 Chk1 调控结构域缺失突变体对细胞周期的影响, 并通过 Western blot 检测 Chk1 下游靶标 Cdc25C 的磷酸化情况, 进行了 Chk1 缺失突变体激酶活性分析.

1 材料与方 法

(i) 材料. 人宫颈癌细胞 HeLa, pXJ41-neo 和 pEGFP-C1 均为本研究室保存. 真核转染试剂 VigoFect 购自 VIGOROUS 公司. 限制性内切酶购自 Promega 公司. Oligo(dT)₅ 和 TriZol RNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司. DMEM 培养基购自 GIBCO 公司. Phospho-cdc25C(Ser216)(63F9) 兔单抗、cdc25C(5H9) 兔单抗购自 Cell Signaling 公司. 羊抗兔 IRDye800 标记的荧光二抗购自 Rockland Immunochemicals 公司. Nucleoid occlusion protein (NOC), hydroxyurea (HU) 和 propidium iodide (PI) 购自 Sigma.

(ii) 重组质粒的构建. 提取 HeLa 细胞总 RNA, RT-PCR 法获得人 *Chk1* 基因全长, 将纯化的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上. 以 pMD18-T-Chk1 为模板, 用表达载体 pXJ41 和 pEGFP-C1 构建 *Chk1* 基因及缺失突变体亚克隆, 通过 PCR 方法扩增 *Chk1* 基因全长及不同的 *Chk1* 基因缺失片段, 经 *EcoR* I, *Xho* I (Promega) 双酶切后插入 pXJ41 和 pEGFP-C1 质粒. 所有的 PCR 引物都在赛百盛公司合成. 所有的重组子插入片段都用 DNA 测序软件核对.

(iii) 细胞培养及转染. HeLa 细胞培养在含

10%胎牛血清的 DMEM 培养基(GIBCO BRL)中, 37 °C, 5% CO₂ 的 CO₂ 培养箱中培养. 将处于对数生长期的 HeLa 细胞以 32 × 10⁴ 个/孔接种在放置有盖玻片的 6 孔板中. 于转染前培养 24 h, 转染前 1 h 更换新鲜培养基(0.5 mL 培养基/孔). 10 μg 质粒 DNA 及 2 μL VIGOROUS High efficient Transfection (Vigorous) 分别用 100 μL 无血清培养基稀释, 充分混匀, 室温下放置 5 min. 混合 2 种溶液, 充分混匀, 于室温下放置 15 min. 将转染混合物加入细胞培养液中, 混匀, 37 °C 培养 12 h.

(iv) DNA 损伤后 Chk1 缺失突变体核积累状况分析. 用 pEGFP-C1-Chk1 转染 HeLa 细胞, 40 h 后选择不同的处理时间(0, 5, 10, 15 min)用 UV 处理转染细胞, 在荧光显微镜下观察转染细胞的定位状况. 选择研究 Chk1 的调控结构域对损伤后 Chk1 细胞定位调控的最佳处理时间.

用 pEGFP-C1-Chk1, pEGFP-C1-CA288, pEGFP-C1-CA334, pEGFP-C1-CA368 转染 HeLa 细胞, 40 h 后, UV (90 J/m²) 处理, 将培养基从 6 孔板中吸出, 每孔加 1~2 mL 甲醇-20 °C 固定 10 min. PBS 洗 3 次, 5 min/次, 蒸馏水洗 1 次, 1~2 min. 封片(封片剂: 防淬灭甘油与 PBS 以 9:1 混合), 在荧光显微镜(Olympus Fluoview 300)下观察转染细胞的核定位状况, 其中绿色荧光细胞为转染的阳性细胞. 为了从数量上评价定位变化, 根据核信号和胞质信号的差别将细胞分成 2 类: (1) N=C 的细胞, 核信号和胞质信号几乎没差别; (2) N>C 的细胞, 核信号和胞质信号有差别. 统计每种转染细胞在显微镜 20 倍镜下不同视野内 2 种类型细胞的数目及发出荧光的细胞总数, 通过比较损伤前后 2 种类型细胞的相对比值来分析 Chk1 的核定位变化, 每个实验至少检测 4 个视野, 求平均数.

(v) 不同 Chk1 缺失突变体的损伤修复能力检测. UV (90 J/m²) 处理 pEGFP-N2 不同时间(0, 10, 20, 30, 40, 50 min), 转染 HeLa 细胞, 在荧光显微镜(Olympus Fluoview 300)下观察转染细胞内绿色荧光蛋白表达情况, 选择研究不同缺失突变体修复能力的报告质粒的最佳处理时间.

用未处理重组质粒和 UV 处理过的质粒 DNA 共转染 HeLa 细胞, 将转染细胞固定后在荧光显微镜蓝光激发下观察, 其中绿色荧光细胞为转染的阳性细胞. 统计每种细胞在显微镜下不同视野中的荧光强度和细胞总数, 获得单个细胞的平均荧光强度来进

行 DNA 损伤修复能力评估. 荧光蛋白表达强度采用 Image Pro Plus 软件进行分析. 在统计分析中, 每种细胞至少选取 4 个视野进行统计.

(vi) 不同 Chk1 缺失突变体对细胞周期影响的分析. 用重组质粒转染 HeLa 细胞 24 h, NOC (0.1 μg/mL) (Sigma) 处理细胞 16 h, 收集细胞, 一半细胞用来提细胞总 RNA, 通过 RT-PCR 扩增 *neo* 基因(*neo* 基因是 pXJ41 载体上所携带的基因)来检测转染效率; 另一半细胞用来分析对细胞周期的影响: 收集细胞, PBS 洗 2 遍, 固定在 75% 的乙醇中, RNase 37 °C 消化 30 min, PI (Sigma) 染色, FACS 分析(Becton Dickinson, San Jose, CA), 每个样品需要 10000 个细胞.

(vii) 不同 Chk1 缺失突变体激酶活性分析. 用重组质粒转染 HeLa 细胞 48 h, 5 mmol/L HU (Sigma) 处理细胞 18 h, 收集细胞, 提细胞总蛋白, 采用 BCA 方法进行蛋白质定量. 通过 Western blot 方法检测 Cdc25C 第 216 位丝氨酸磷酸化情况. 用 Odyssey 红外成像系统对膜进行扫描成像, 读取灰度值. 以 Cdc25C 作为内参, 对目标蛋白的灰度值进行校正; 再以未经 HU 处理的细胞中磷酸化的 Cdc25C 所占百分比作为 1, 对其余各组进行校正. 统计分析采用 Prism 4.0 版软件进行, 一批样本只有在 3 次的重复实验中结果稳定, 才可将其均值纳入统计学分析. 以 P<0.05 作为在统计学差异的界限.

2 结果

2.1 Chk1 及调控结构域缺失突变体的 pEGFP-C1 重组质粒和 pXJ41 重组质粒的构建与鉴定

Chk1 调控结构域缺失突变体分别是: (i) CA288, C 末端缺少 188 个氨基酸残基(288~476); (ii) CA344, C 末端缺少 142 个氨基酸残基(334~476); (iii) CA368, C 末端缺少 108 个氨基酸残基(368~476)(图 2).



图 2 Chk1 调控结构域缺失片段的结构示意图

重组质粒 pXJ41-Chk1, pXJ41-CA288, pXJ41-CA334 和 pXJ41-CA368, pEGFP-C1-Chk1, pEGFP-C1-CA288, pEGFP-C1-CA334 和 pEGFP-C1-CA368, 双酶切法和 PCR 扩增法鉴定出阳性克隆并测序, 测序结果证实重组体构建成功.

2.2 DNA 损伤后 Chk1 缺失突变体核积累状况分析

用 pEGFP-C1-Chk1 转染 HeLa 细胞, 40 h 后选择不同的处理时间用 UV 处理转染细胞, 在荧光显微镜下观察转染细胞的定位状况. 如图 3 和 4 所示, 在 0~10 min 内, 随着 UV 处理时间的增加, 融合蛋白 GFP-Chk1 核定位信号增强, 而且具有明显 GFP-Chk1 核定位的细胞数量增多, 当 UV 处理 10 min 时核定位信号最为明显, 但在 UV 处理 15 min 时细胞损伤严重, 细胞数目减少, 且荧光强度减弱. 因此, 选择 10 min 作为研究 Chk1 的调控结构域对损伤后 Chk1 细胞定位的调控的最佳处理时间.

用 pEGFP-C1-Chk1, pEGFP-C1-CA288, pEGFP-C1-CA334, pEGFP-C1-CA368 转染 HeLa 细胞, 40 h 后用 UV 处理转染细胞 10 min, 在荧光显微镜下观察转染细胞的核定位状况. 如图 5 和 6 所示, UV 处理后, 融合蛋白 GFP-Chk1 和 GFP-CA368 的核定位发生了明显变化, 而且在 pEGFP-C1-Chk1 和 pEGFP-C1-CA368 转染细胞中, 具有明显核定位的细胞数目增多; UV 处理后的 GFP-CA288 和 GFP-CA334 的核定位状况没有发生太大变化, 说明 C 末端调控结构域中

的 34 个氨基酸残基(334~368)参与了调控损伤诱导的 Chk1 核积累.

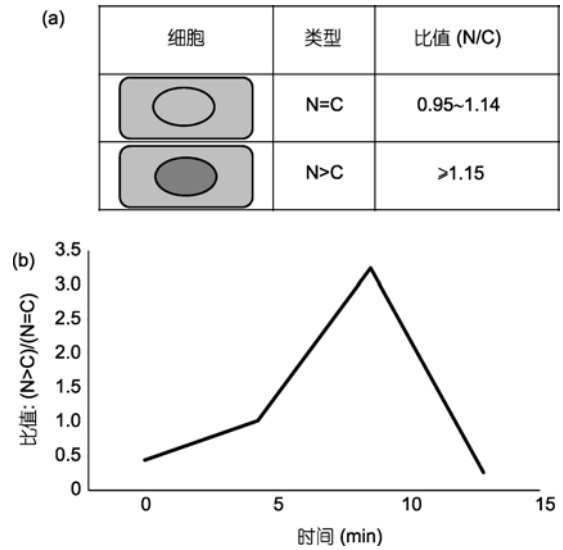


图 4 不同程度损伤(UV 处理 0, 5, 10, 15min)后 Chk1 核定位状况分析

(a) 根据核信号和胞质信号的差别将细胞分成 2 类: (i) N=C 的细胞, 核信号和胞质信号几乎没差别; (ii) N>C 的细胞, 核信号和胞质信号有差别. (b) 统计每种转染细胞在显微镜 20 倍镜下不同视野内 2 种类型细胞的数目及发出荧光的细胞总数, 通过比较 2 种类型细胞的相对比值来分析 Chk1 的核定位变化, 每个实验至少检测 4 个视野, 求平均数

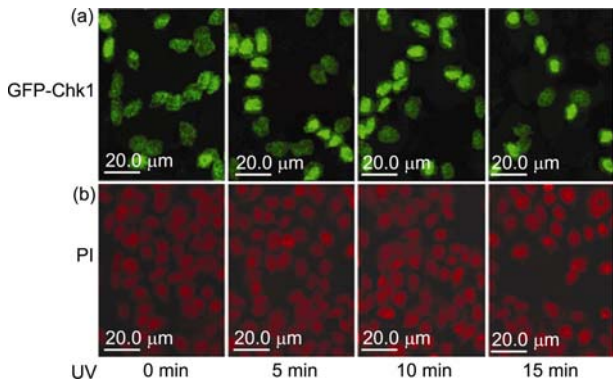


图 3 不同程度损伤(UV 处理 0, 5, 10, 15 min)后 Chk1 核定位状况

从左到右分别是用 UV (90 J/m^2)处理转染细胞 0, 5, 10, 15 min 后在荧光显微镜下所观察到的 Chk1 的核定位状况. (a) GFP 绿色荧光显示 Chk1 定位; (b) PI 染色红色荧光显示细胞核

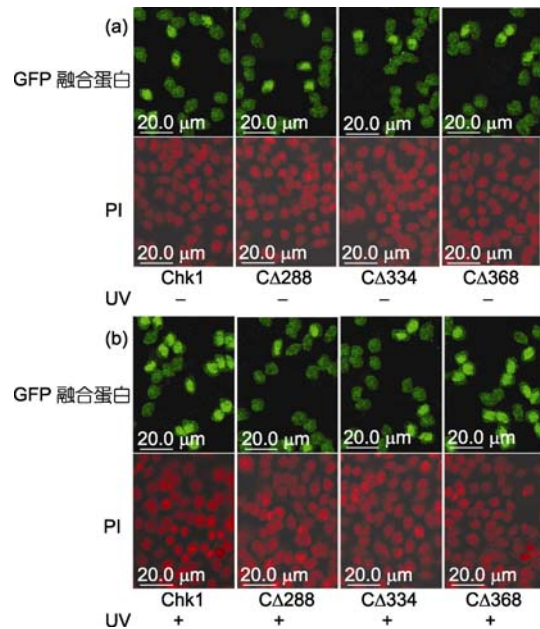


图 5 DNA 损伤后不同 Chk1 缺失突变体的核定位状况 (a) 未经 UV 处理; (b) 经过 UV 处理

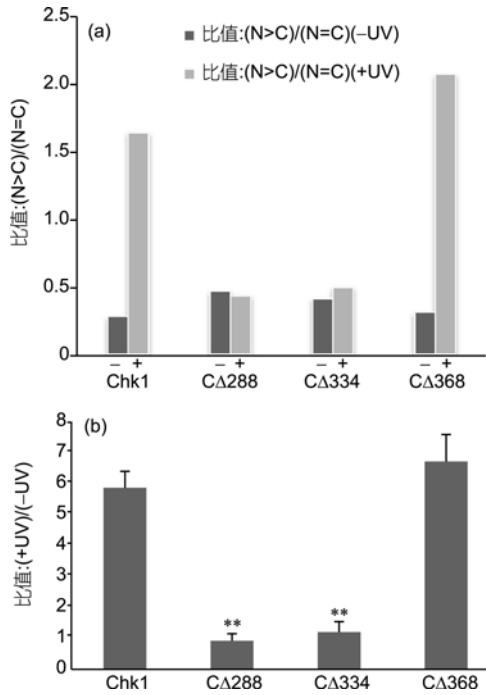


图6 DNA损伤后不同 Chk1 缺失突变体的核定位状况分析

“-”表示未经 UV 处理; “+”表示经过 UV 处理. (a) 统计每种转染细胞在显微镜 20 倍镜下不同视野内 2 种类型细胞的数目及发出荧光的细胞总数, 通过比较 2 种类型细胞的相对比值来分析 Chk1 的核定位变化, 每个实验至少检测 4 个视野, 求平均数. (b) 数据来源于(a)中各组损伤前后(+UV/-UV)比值, 将各缺失突变体组与 Chk1 组进行差异统计分析. **与 Chk1 相比, $P < 0.01$

2.3 不同 Chk1 调控域缺失突变体参与 DNA 损伤修复能力的检测

用 UV 处理报告质粒 pEGFP-N2 不同时间, 转染 HeLa 细胞, 48 h 后对报告基因产物 GFP 蛋白的荧光强度进行分析. 如图 7 和 8 所示, 随着 UV 处理时间的增加, 细胞内绿色荧光逐渐减弱, 且发出绿色荧光的细胞也越来越少; 当 UV 处理报告质粒的时间达到 40 和 50 min 时, 报告质粒 pEGFP-N2 损伤相当严重, 转染细胞内的 GFP 荧光强度非常弱, 发出绿色荧光的细胞也非常少, 说明 UV 处理达到 40 min 以上, 大部分报告质粒 pEGFP-N2 已经被损伤, 不能够表达出有活性的 GFP 蛋白, 在显微镜下观察不到细胞发出绿色荧光, 因此我们选择 40 min 作为研究不同缺失突变体修复能力的最佳处理时间.

用 UV 处理报告质粒 pEGFP-N2 40 min, 用未损伤报告质粒 pEGFP-N2 和 pXJ41 共转染 HeLa 细胞, 用损伤报告质粒 pEGFP-N2 分别与 pXJ41, pXJ41-Chk1,

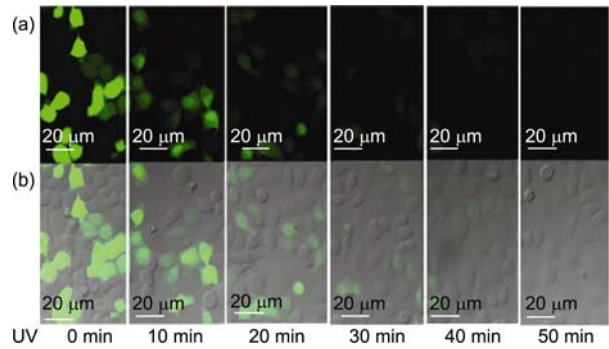


图7 不同程度损伤后 GFP 蛋白的荧光强度 (a) GFP 绿色荧光; (b) 由明场和绿色荧光叠加而成

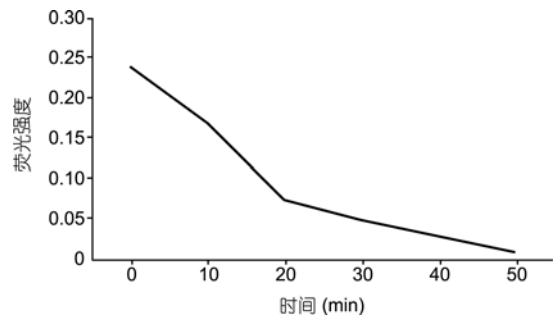


图8 不同程度损伤后 GFP 蛋白的荧光强度

pXJ41-CΔ288, pXJ41-CΔ334 和 pXJ41-CΔ368 共转染 HeLa 细胞, 48 h 后对报告基因产物 GFP 蛋白的荧光强度进行分析, 如图 9 和 10 所示, 以共转未损伤报告质粒 pEGFP-N2 和 pXJ41 的细胞作为对照 1, 以共转损伤报告质粒 pEGFP-N2 和 pXJ41 的细胞作为对照 2, 以共转损伤报告质粒 pEGFP-N2 和 pXJ41-Chk1 的细胞作为对照 3. 与对照 1 相比, 对照 2 的荧光强度明显减弱, 对照 3 的荧光强度强于对照 2. 共转损伤报

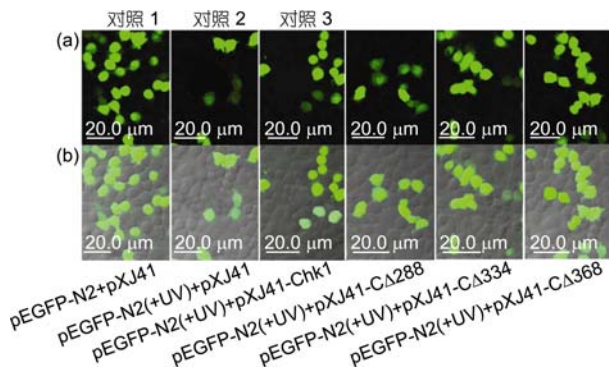


图9 不同 Chk1 缺失突变体修复损伤报告质粒 pEGFP-N2 的能力

(a) GFP 绿色荧光; (b) 由明场和绿色荧光叠加而成

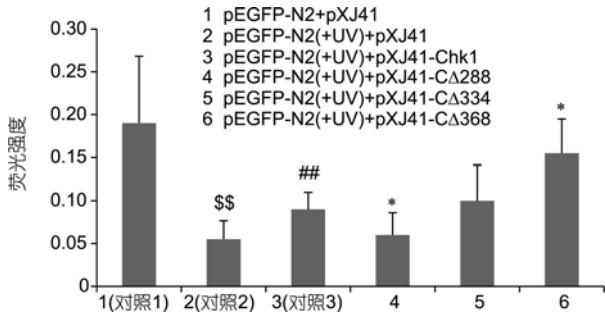


图 10 不同 Chk1 缺失突变体修复损伤报告质粒 pEGFP-N2 的能力

统计每种细胞在显微镜下不同视野中的荧光强度和细胞总数, 获得单个细胞的平均荧光强度来进行 DNA 损伤修复能力评估. 荧光蛋白表达强度采用 Image Pro Plus 软件进行分析. \$\$, 与对照 1 相比, $P < 0.01$; ##, 与对照 2 相比, $P < 0.01$; *, 与对照 3 相比, $P < 0.05$

告质粒 pEGFP-N2 和 pXJ41-CΔ368 细胞的荧光强度强于对照 3, 共转损伤报告质粒 pEGFP-N2 和 pXJ41-CΔ334 细胞的荧光强度与对照 3 相当, 共转损伤报告质粒 pEGFP-N2 和 pXJ41-CΔ288 细胞的荧光强度明显弱于对照 3. 结果显示 CΔ368 对细胞中损伤报告质粒 pEGFP-N2 修复能力强于全长 Chk1, CΔ334 与全长相当, 而 CΔ288 对细胞中损伤报告质粒 pEGFP-N2 几乎无修复能力, 表明缺失部分调控结构域, Chk1 激酶活性增强, 当缺失调控结构域中的整个 SQ/TQ 域时, Chk1 激酶活性降低.

2.4 不同 Chk1 缺失突变体对细胞周期的影响

为研究不同 Chk1 缺失突变体对细胞周期的影响, 用 pXJ41, pXJ41-Chk1, pXJ41-CΔ288, pXJ41-CΔ334 和 pXJ41-CΔ368 转染 HeLa 细胞, 24 h 后, 加入 NOC 阻断, 孵育 16 h, 一部分细胞用来提取总 RNA, 通过扩增 *neo* 基因来反映不同细胞克隆的转染效率. 结果表明, 转染效率与所转染的质粒种类无关, 不同质粒的转染效率基本相同(图 11). 另一部分细胞刚进行细胞周期分析. 如图 12 所示, 以正常细胞作为对照 1, 以转染 pXJ41 的细胞作为对照 2, 以 NOC 处理的转染 pXJ41 的细胞作为对照 3. 与对照 1 相比, 对照 2 的细胞周期分布没有明显变化, 而对照 3 的细胞滞留在 G2/M 期. 与对照 3 相比, NOC 处理的转染 pXJ41-Chk1, pXJ41-CΔ288, pXJ41-CΔ334 的细胞也在 G2/M

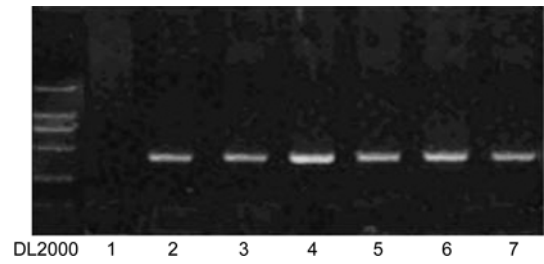


图 11 转染细胞 *neo* 基因检测

1, 正常; 2, pXJ41; 3, pXJ41; 4, pXJ41-Chk1; 5, pXJ41-CΔ288; 6, pXJ41-CΔ334; 7, pXJ41-CΔ368

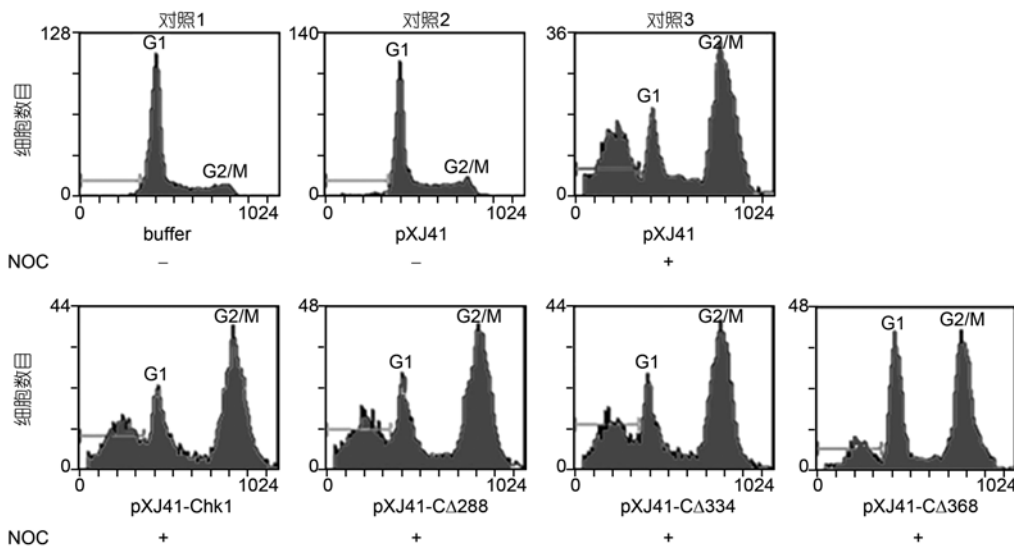


图 12 不同 Chk1 缺失突变体对细胞周期的影响

“+”表示经过 NOC 处理, “-”表示未经 NOC 处理

期滞留, 而 NOC 处理的转染 pXJ41-CA368 的细胞因为细胞周期延迟而没有在 G2/M 期滞留, 表明过表达有活性的 CA368 使 G1 或 S 期延迟. 上述结果显示, 不同 Chk1 调控结构域缺失突变体的活性不同, 因此推测 Chk1 的调控结构域存在空间位阻, 缺失 108 个氨基酸的 CA368 破坏了这个结构, 暴露出活性位点, 表现出最强的活性, 说明 Chk1 调控结构域的空间结构对于 Chk1 修复活性的调控至关重要.

2.5 不同 Chk1 缺失突变体激酶活性分析

为分析不同 Chk1 缺失突变体激酶活性, 分别用 pXJ41, pXJ41-Chk1, pXJ41-CA288, pXJ41-CA334 和 pXJ41-CA368 转染 HeLa 细胞, 48 h 后, 加入 HU (5 mmol/L), 孵育 18 h, 收集细胞, 提细胞总蛋白, 通过 Western blot 方法检测 Cdc25C 第 216 位丝氨酸磷酸化情况. 如图 13 和 14 所示, 以未用 HU 处理的转染 pXJ41 的细胞作为对照 1, 以 HU 处理的转染 pXJ41 的细胞作为对照 2, 以 HU 处理的转染 pXJ41-Chk1 的细胞作为对照 3. 与对照 1 相比, 对照 2 的细胞中 Cdc25C 磷酸化明显, 这是内源性 Chk1 发挥激酶活性. 对照 3 的细胞中 Cdc25C 磷酸化程度强于对照 2, 这是内源性 Chk1 和外源性 Chk1 共同发挥激酶活性. HU 处理的转染 pXJ41-CA368 细胞的磷酸化程度强于对照 3, HU 处理的转染 pXJ41-CA334 细胞的磷酸化程度与对照 3 相当, HU 处理的转染 pXJ41-CA288 细胞的磷酸化程度与对照 2 相当, 发现 CA368 磷酸化 Cdc25C 的能力强于全长 Chk1, CA334 与全长相当, 而 CA288 几乎没有磷酸化 Cdc25C 能力. 上述结果显示, 不同 Chk1 调控结构域缺失突变体的活性不同, 进一步说明缺失部分调控结构域, Chk1 激酶活性增强, 当缺失调控结构域中的整个 SQ/TQ 域时, Chk1

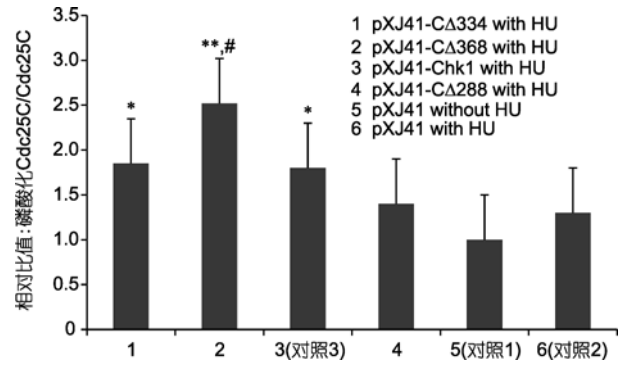


图 14 不同 Chk1 缺失突变体激酶活性分析

以 Cdc25C 作为内参, 对目标蛋白的灰度值进行校正; 再以未经 HU 处理的细胞中磷酸化的 Cdc25C 所占百分比作为 1, 对其余各组进行校正. 统计分析采用 Prism 4.0 版软件进行, 一批样本只有在 3 次的重复实验中结果稳定, 才可将其均值纳入统计学分析. 与对照 2 相比, *示 $P < 0.05$, **示 $P < 0.01$; #, 与对照 3 相比, $P < 0.05$

激酶活性降低.

3 讨论

用 DNA 损伤剂 CPT 处理裂殖酵母后, Chk1 的亚细胞定位发生了明显的变化, Chk1 积累在核内; 用 EYFP-Chk1 融合蛋白构建载体转染 HeLa 细胞^[22], 用 DNA 损伤剂 HU 或 MMS^[23]处理转染细胞后, 发现融合蛋白 EYFP-Chk1 积累在核内^[21]. 这些实验结果都表明, DNA 损伤前, Chk1 定位在核和胞质中, 经过 DNA 损伤剂处理后, Chk1 在核内积累从而应答 DNA 损伤, 因此研究参与调控损伤诱导的 Chk1 核积累的序列十分必要. DNA 损伤后, 缺少 C 末端 115 个氨基酸残基(361~476)的 Chk1 缺失突变体的亚细胞定位没有发生变化^[21], 推测参与调控损伤诱导的 Chk1 核积累的序列存在于前 460 个氨基酸残基中, Chk1 的 C 末端调控结构域中的 SQ/TQ 域(317~383)中包含 ATM/ATR 磷酸化位点, 为了应答复制压力或其他类型的 DNA 损伤, 以依赖 ATM/ATR 的方式磷酸化 Chk1 的 Ser317 和 Ser345^[16-20]. 本研究构建了不同的 Chk1 调控结构域缺失突变体与 GFP 的融合蛋白表达载体, 转染细胞, UV 处理, 观察不同的 Chk1 调控结构域缺失突变体在 DNA 损伤后核定位状况, 以确定决定 DNA 损伤诱导的 Chk1 核积累的序列. 荧光显微镜观察结果显示 UV 处理后, C 末端缺少 108 个氨基酸残基(368~476)的 Chk1 缺失突变体 CA368 在核内积累, 而 C 末端缺少 142 个氨基酸残基(334~476)的 Chk1 缺失突变体 CA334 和 C 末端缺少 188 个氨基酸

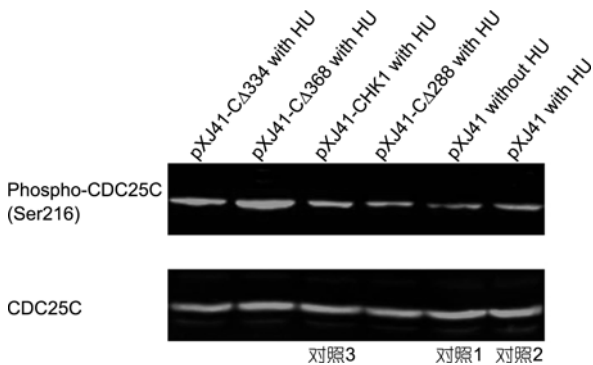


图 13 不同 Chk1 缺失突变体激酶活性分析

残基(288~476)的 Chk1 缺失突变体 C Δ 288 的亚细胞定位没有发生明显变化,说明 C 末端调控结构域中的 34 个氨基酸残基(334~368)参与了调控损伤诱导的 Chk1 核积累. 有文献报道在裂殖酵母中, Chk1 与 14-3-3 蛋白相互结合, DNA 损伤后 Chk1 与 14-3-3 蛋白结合增强了 10 倍,其中 14-3-3 蛋白优先与磷酸化的 Chk1 结合^[24],同时有研究指出人类 Chk1 也与 14-3-3 蛋白相互结合^[21]. 最近的研究结果显示, 14-3-3 蛋白调控特定结合蛋白的亚细胞定位^[25],如磷酸化 Cdc25, Chk1 磷酸化人类 Cdc25 的第 216 位丝氨酸^[26],磷酸化为 14-3-3 蛋白提供了结合位点^[27]. 考虑到 Chk1 与 14-3-3 蛋白相互结合及 14-3-3 蛋白的结合蛋白的亚细胞定位与 14-3-3 蛋白相关,同时 DNA 损伤后, Chk1 与 14-3-3 蛋白的结合增强,我们猜测 14-3-3 蛋白通过结合 Chk1 来调控 Chk1 的亚细胞定位, DNA 损伤后, 14-3-3 蛋白通过结合参与调控损伤诱导的 Chk1 核积累的序列使 Chk1 积累在核内,所以一旦缺失决定 DNA 损伤诱导的 Chk1 核积累的序列, DNA 损伤后 Chk1 的亚细胞定位就不会发生改变,从而无法对 DNA 损伤作出应答.

Ng 等人^[5]将全长 Chk1 和缺少 C 末端 86 个氨基酸残基(390~476)的 Chk1 缺失突变体 C Δ 390 同放射性 ATP 一起孵育,只有少量的全长 Chk1 被放射性同位素标记,但 C Δ 390 发生明显的自磷酸化;同时用包含 Chk1 的磷酸化位点(Ser216)的 GST-Cdc25C₁₉₅₋₂₅₉ 融合蛋白作为 Chk1 的底物,发现 C Δ 390 磷酸化 Cdc25C 的能力强于全长 Chk1,进一步删除 Chk1 的 C 末端,发现 C 末端缺失 167 个氨基酸残基(309~476)的 C Δ 309 仍然能显示一定的自磷酸化活性,而整个 SQ/TQ 域被删除的 C 末端缺失 192 个氨基酸残基(284~476)的 C Δ 284 几乎不发生自磷酸化,因此推测 C 末端调控结构域可能参与调控激酶结构域.

为了进一步证实调控结构域参与调控激酶结构域,我们首先检测不同 Chk1 调控结构域缺失突变体修复损伤 DNA 的能力. 研究人员曾采用 pEGFP-N2 作为报告质粒用于细胞修复能力的研究^[28]. 本文以 pEGFP-N2 作为报告质粒,与不同的 Chk1 调控结构域缺失突变体的重组质粒共转染细胞,通过荧光显微镜测定荧光强度,进而反映不同的 Chk1 缺失突变体的 DNA 损伤修复能力. 实验结果显示,缺失突变体 C Δ 368 的修复能力强于全长 Chk1, C Δ 334 与全长相当, C Δ 288 几乎无修复能力. 这说明调控结构域抑

制 Chk1 的活性,缺失部分调控结构域, Chk1 的激酶活性增强,缺失整个 SQ/TQ 域, Chk1 几乎没有激酶活性.

接下来通过观察不同的 Chk1 调控结构域缺失突变体对细胞周期的影响来研究调控结构域对激酶结构域的调控. 用不同的 Chk1 缺失突变体的重组质粒转染细胞, NOC 处理后,收集细胞进行周期分析. 实验结果显示过表达 Chk1, C Δ 334 和 C Δ 288 不能阻碍细胞周期进程,过表达有活性的 C Δ 368 使 G1 或 S 期延迟. 上述结果说明 Chk1 缺失突变体诱导的 G1/S 期延迟与缺失突变体的活性相关,其中 C Δ 368 的活性最强.

实验结果显示缺失突变体 C Δ 334,虽然缺失可能参与调控损伤诱导的 Chk1 核积累的 34 个氨基酸残基(334~368),不能有效地完成核积累,但仍能表现出与全长 Chk1 相当的修活性. 提示核积累并不是 Chk1 应答 DNA 损伤的唯一途径. C Δ 334 有可能通过其他途径磷酸化 Cdc25C 来阻止 Cdc25C 激活 cyclinB-Cdk1,从而阻止细胞通过 G2/M 检验点,使细胞有足够的时间启动 DNA 修复机制. C 末端缺失 108 个氨基酸残基(368~476)的 C Δ 368 活性高于全长 Chk1, C 末端缺失 142 个氨基酸残基(334~476)的 C Δ 334 活性与全长 Chk1 相当,我们认为 142 个氨基酸形成了一个特殊的空间结构,这个空间结构形成了一个屏障,阻断了 142 个氨基酸中包含的潜在的活性位点与外界的联系,形成了一个抑制元件,一旦破坏这个空间结构会暴露这些活性位点,所以 C Δ 368 活性高于全长; C Δ 334 缺少由 142 个氨基酸形成的完整空间结构,但具有激活元件,所以 C Δ 334 活性与全长 Chk1 相当, C 末端缺失 188 个氨基酸残基(288~476)的 C Δ 288 完全缺失激活元件,所以几乎没有酶活性. 为了验证上述构想,我们通过 Western blot 检测 Chk1 下游靶标 Cdc25C 的磷酸化情况进行了 Chk1 缺失突变体激酶活性分析. 结果显示 C Δ 368 磷酸化 Cdc25C 的能力强于全长 Chk1, C Δ 334 与全长相当,而 C Δ 288 几乎没有磷酸化 Cdc25C 能力. 上述结果提示,不同缺失突变体表现出的活性差异源于激酶活性的不同.

以上结果表明, Chk1 的调控结构域通过分子内相互作用来控制激酶结构域, Chk1 调控结构域的空间结构对于 Chk1 激酶活性的调控至关重要. 因此缺失部分调控结构域有可能破坏这些相互作用,导致激酶活性增强. 但是缺失整个 SQ/TQ 域时, Chk1 几乎没有激酶活性,说明调控结构域包括抑制和激活

元件, SQ/TQ 域刺激激酶结构域, 但必须克服 C 末端的抑制, C 末端可能直接作用激酶结构域或者抑制 SQ/TQ 域的激活, 其中调控结构域可以通过 Chk1 折叠抑制激酶结构域或通过原子空间位阻阻止激酶靠近 Mg^{2+} -ATP 或底物从而影响激酶结构域, 一旦有压力诱导, SQ/TQ 域的磷酸化可能消除 C 末端对激酶结构域的限制.

总之, C 末端调控结构域中的 34 个氨基酸残基 (334~368) 参与了调控损伤诱导的 Chk1 核积累, 缺失部分调控结构域, Chk1 的激酶活性增强, 而缺失整个 SQ/TQ 域, Chk1 几乎没有激酶活性. 调控结构域包括抑制和激活元件, 调控结构域参与调控激酶结构域, 但是调控结构域如何参与调控损伤诱导的 Chk1 核积累和激酶结构域的具体机制需要进一步的研究.

参考文献

- 1 Zhou B B, Elledge S J. The DNA damage response: Putting checkpoints in perspective. *Nature*, 2000, 408: 433-439
- 2 Zachos G, Rainey M D, Gillespie D A. Chk1-deficient tumour cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defects. *EMBO J*, 2003, 22: 713-723
- 3 Merry C, Fu K, Wang J, et al. Targeting the checkpoint kinase Chk1 in cancer therapy. *Cell Cycle*, 2010, 9: 279-283
- 4 李小方, Ward T, 姚雪彪, 等. Chk1 防止 DNA 损伤的 S 期肿瘤细胞进行异常的有丝分裂. *科学通报*, 2009, 54: 2797-2805
- 5 Ng C P, Lee H C, Ho C W, et al. Differential mode of regulation of the checkpoint kinases CHK1 and CHK2 by their regulatory domains. *J Biol Chem*, 2004, 279: 8808-8819
- 6 Sweeney G. Leptin signalling. *Cell Signal*, 2002, 14: 655-663
- 7 Bolderson E, Richard D J, Zhou B B, et al. Recent advances in cancer therapy targeting proteins involved in DNA double-strand break repair. *Clin Cancer Res*, 2009, 15: 6314-6320
- 8 Carrassa L, Sanchez Y, Erba E, et al. U2OS cells lacking Chk1 undergo aberrant mitosis and fail to activate the spindle check-point. *J Cell Mol Med*, 2009, 13: 1565-1576
- 9 Karlsson-Rosenthal C, Millar J B. Cdc25: Mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol*, 2006, 16: 285-292
- 10 Pan Y, Ren K H, He H W, et al. Knockdown of Chk1 sensitizes human colon carcinoma HCT116 cells in a p53-dependent manner to lidamycin through abrogation of a G2/M checkpoint and induction of apoptosis. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8: 1559-1566
- 11 McNeely S, Conti C, Sheikh T, et al. Chk1 inhibition after replicative stress activates a double strand break response mediated by ATM and DNA-dependent protein kinase. *Cell Cycle*, 2010, 9: 995-1004
- 12 Xiao Z, Xue J, Gu W Z, et al. Cyclin B1 is an efficacy-predicting biomarker for Chk1 inhibitors. *Biomarkers*, 2008, 13: 579-596
- 13 Nigg E A. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2: 21-32
- 14 Ling H, Wen L, Ji X X, et al. Growth inhibitory effect and Chk1-dependent signaling involved in G2/M arrest on human gastric cancer cells induced by diallyl disulfide. *Braz J Med Biol Res*, 2010, 43: 271-278
- 15 Wilsker D, Petermann E, Helleday T, et al. Essential function of Chk1 can be uncoupled from DNA damage checkpoint and replication control. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 20752-20757
- 16 Liu Q, Guntuku S, Cui X S, et al. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev*, 2000, 14: 1448-1459
- 17 Zhao H, Watkins J L, Piwnicka-Worms H. Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 14795-14800
- 18 Lopez-Girona A, Tanaka K, Chen X B, et al. Serine-345 is required for Rad3-dependent phosphorylation and function of checkpoint kinase Chk1 in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 11289-11294
- 19 Guo Z, Kumagai A, Wang S X, et al. Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev*, 2000, 14: 2745-2756
- 20 Gatei M, Sloper K, Sorensen C, et al. Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem*, 2003, 278: 14806-14811
- 21 Jiang K, Pereira E, Maxfield M, et al. Regulation of Chk1 includes chromatin association and 14-3-3 binding following phosphorylation on Ser-345. *J Biol Chem*, 2003, 278: 25207-25217
- 22 Dunaway S, Liu H Y, Walworth N C. Interaction of 14-3-3 protein with Chk1 affects localization and checkpoint function. *J Cell Sci*, 2004, 118: 39-50

- 23 Kim E M, Burke D J. DNA damage activates the SAC in an ATM/ATR-dependent manner, independently of the kinetochore. *PLoS Genet*, 2008, 4: e1000015
- 24 Chen L, Liu T H, Walworth N C. Association of Chk1 with 14-3-3 proteins is stimulated by DNA damage. *Genes Dev*, 1999, 13: 675-685
- 25 Seimiya H, Sawada H, Muramatsu Y, et al. Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *EMBO J*, 2000, 19: 2652-2661
- 26 Muslin A J, Tanner J W, Allen P M, et al. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*, 1996, 84: 889-897
- 27 Zeng Y, Piwnica-Worms H. DNA damage and replication checkpoints in fission yeast require nuclear exclusion of the Cdc25 phosphatase via 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 7410-7419
- 28 Atanassov B S, Ninova P D, Anachkova B B, et al. Relationship between DNA repair capacity and resistance to genotoxins in four human cell lines. *Cancer Detect Prev*, 2003, 27: 24-29

· 动态 ·

个体化医疗离我们还有多远

近日,在“对话生命”——Life Technologies 新任大中华区总裁媒体见面会上,“个体化医疗”成为会议的热点话题。Life Technologies 大中华区总裁 Siddhartha Kadia 博士,中国医学科学院副院长、《科学通报》副主编詹启敏教授以及中国科学院北京基因组研究所副所长于军教授与近 40 家媒体探讨了中国生命科学发展的现状与未来。

詹启敏教授指出,现在是中国医学科技发展的最佳时期,我国目前重大疾病防治的迫切性和社会需求非常大。我国恶性肿瘤发病 260 万人,死亡 160 万人。重大疾病是造成我国人力资源丧失和经济损失的主要原因。癌症的早期诊断包括生物治疗、个体化治疗、细胞治疗等,基因组分析与分子诊断是肿瘤防治的关键。我国“八五”、“九五”以及“十五”计划主要研究的重点是基因组的研究,包括疫苗、抗体等生物信息,从“十一五”开始,研究重点转向临床医学的发展,例如个体化的治疗等,这是令人欣慰的。我国“十一五”计划对医学的支持是以前的 3 倍以上,而且政府

部门高度重视分子靶向治疗。发达国家的经验告诉我们,任何重大疾病的最终控制有赖于医学的突破。医学科学研究在提高人类在疾病防治水平和突发事件的反应能力方面起着关键性的作用,所以要开展医学科学研究,这需要 Life Technologies 和很多国内外企业给我们大力支持。

于军教授指出,从理论上讲,基因决定着人的生老病死,一切生命的存在与衰亡的形式都是由基因决定的,包括个体的面相、肤色、体型、寿命、对某些疾病的易感性等。基因分析是个体化医疗的前提,基因测序技术的发展在驱动着个体化医疗的进程。

Kadia 博士认为,展望未来 10~20 年,我们能够看到这个行业蓬勃的发展,越来越多基于生物技术的实用解决方案或应用将出现,这将影响到生活的各个方面,不仅仅是防治癌症和个体化医疗。

(王元火 高媛)