

分类号 R318  
UDC 616-066

学校代码 10590  
密 级 公开

# 深圳大学硕士学位论文

## MERIT40-Tankyrase1 相互作用对 纺锤体组装影响的研究

学位申请人姓名 谢旺清

专 业 名 称 生物医学工程

学院（系、所） 深圳大学医学院

指导教师姓名 姜文奇、郑多 教授

学位论文封面及内封之注解：

注 1：分类号：分类采用《中国图书资料分类法》。

注 2：UDC：《国际十进分类法 UDC》的类号。

注 3：需保密的论文要注明密级及保密年限。

# 深圳大学学位论文原创性声明和使用授权说明

## 原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文 MERIT40- Tankyrase1 相互作用对纺锤体组装影响的研究 是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写的作品或成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律后果由本人承担。

论文作者签名：谢旺清

日期：2017年05月10日

## 学位论文使用授权说明

(必须装订在印刷本首页)

本学位论文作者完全了解深圳大学关于收集、保存、使用学位论文的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位属深圳大学。学校有权保留学位论文并向国家主管部门或其他机构送交论文的电子版和纸质版，允许论文被查阅和借阅。本人授权深圳大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(涉密学位论文在解密后适用本授权书)

论文作者签名：谢旺清

导师签名：[Signature]

日期：2017年05月10日

日期：2017年05月10日

# 摘要

高等真核细胞通过有丝分裂复制后的两条染色体通过染色体分离的方式精确分配到两个子代细胞中,对维持基因组稳定性起着常重要的作用。有丝分裂依赖于微管为基础的双极纺锤体的组装和功能。细胞内多种蛋白翻译后修饰参与了这个过程的严密调控,包括磷酸化、泛素化和 ADP 核糖基化等。其中,泛素化是最为重要的一种蛋白质翻译后修饰,可调控蛋白质分子的定位、转运和相互作用,参与包括有丝分裂在内的诸多生物学过程。

与其它翻译后修饰一样,泛素化是一个动态可逆的过程,泛素分子或泛素链可以被去泛素化酶水解,从而调控蛋白分子的泛素化水平和功能。BRISC 是一个 K63 连接特异的去泛素化酶,由 MERIT40、BRCC36、BRCC45 和 ABRO1 组成,参与细胞内多个生物过程,如抗病毒免疫调控、炎症反应和纺锤体组装等。但它在纺锤体组装中的作用和机制还不是十分清楚。

我们通过免疫荧光、免疫共沉淀、Pull Down、western blot 等实验研究发现:(1) Tankyrase 1 与 MERIT40、BRCC36 相互作用并定位于纺锤极;(2)RXXPEG 是 MERIT40 纺锤极定位、MERIT40 与 Tankyrase 1 相互作用必需的;(3)Tankyrase 1 的亚结构域 ARC V 在 Tankyrase 1 与 MERIT40-BRCC36 相互作用中起主要作用;(4)MERIT40 的 RXXPEG 突变体 R28A 呈现有丝分裂表型缺陷(5)Tankyrase 1 在有丝分裂期可以被 K63 连接泛素化修饰,其修饰水平受 MERIT40 去泛素化酶复合物负性调控。RXXPEG 突变削弱或破坏 MERIT40 与 Tankyrase 1 的相互作用,引起 Tankyrase 1 的 K63 连接泛素化水平显著增高,这可能进一步导致其 PAR 修饰酶活性失调,最终影响细胞纺锤体组装功能。

**关键词:** 纺锤体组装、泛素化、MERIT40、BRCC36、Tankyrase1

# Abstract

Accurate segregation of the replicated chromosome to daughter cells during cell division in higher eukaryotes cells through mitosis that tightly related to assembly and function of bipolar spindle is critical for genome stability. It is regulated by various post-translational modifications, including phosphorylation, ubiquitination, ADP-ribosylation and so forth. Ubiquitination is an important post-translational modification that tightly regulates proteins location, translocation, interaction and participate in many biological processes, including mitosis.

Similar to the other post-translational modifications, ubiquitination is a dynamic and reversible process in cell. Ubiquitin or ubiquitin chain can be hydrolyed under the catalysis of deubiquitinase (DUBs), thereby regulates the ubiquitination level of target proteins. BRISC is a K63 specific deubiquitinase containing MERIT40, ABRO1, BRCC45 and BRCC36, and is involved in multiple biological cellular processes, such as IFNs mediated antiviral immune regulation, inflammatory reaction, and spindle assembly. However, little is known about the role and mechanism of BRISC in the regulation of spindle assembly.

Through immunofluorescence, immunoprecipitation, Pull Down, as well as western blot, we found that (i) Tankyrase1, MERIT40, BRCC36 colocalize to spindle pole; (ii) RXXPEG motif is required for MERIT40 localization in spindle pole and it's interaction with Tankyrase1; (iii) the ARC V subdomain of Tankyrase1 is required for interacting with MERIT40 and BRCC36; (iv) the RXXPEG motif mutant R28A of MERIT40 displays defects in mitosis; (v) during mitosis, Tankyrase1 can be modified by K63-linked ubiquitin chain, the level of which is negatively regulated by MERIT40 complex. Mutation of the RXXPEG motif mitigates or even abolishes the interaction between MERIT40 and Tankyrase1, leading to significant K63-linked ubiquitination of affect the catalytic activity of Tankyrase1 and ultimately lead to dysfunction in spindle assembly.

**Key word** : spindle assembly 、ubiquitination 、MERIT40 、BRCC36 、Tankyrase1

# 目录

摘 要 .....	I
Abstract .....	II
引言 .....	1
第 1 章 实验材料与方法.....	1 2
1.1 实验材料.....	1 2
1.1.1 溶液配制: .....	1 2
1.1.2 主要仪器设备.....	2 1
1.1.3 细胞株和细胞培养相关试剂.....	2 2
1.1.4 质粒、转化菌株和蛋白纯化相关试剂.....	2 3
1.1.5 Western Blot、免疫共沉淀、免疫荧光试剂 .....	2 4
1.1.6 抗体 .....	2 5
1.2 实验方法 .....	2 6
1.2.1 免疫荧光 .....	2 6
1.2.2 制备感受态细胞.....	2 7
1.2.3 免疫共沉淀.....	2 7
1.2.4 原核表达系统及 GST 蛋白纯化.....	2 9
1.2.5 稳定细胞系筛选.....	2 9
1.2.6 细胞收集和总蛋白提取、定量.....	3 0
1.2.7 Western Blotting 分析 .....	3 0
1.2.8 GST Pull Down Assay.....	3 1
1.2.9 细胞周期同步化.....	3 2
1.2.10 lipofetamine2000 转染 .....	3 2
1.2.11 lipofetamine RNAiMAX 转染.....	3 2
1.2.12 质粒构建 .....	3 2
第 2 章 实验结果 .....	3 6
1. Tankyrase1 与 MERIT40 相互作用并在纺锤极共定位.....	3 6

2. MERIT40 保守基序 RXXPEG 介导 MERIT40-Tankyrase1 相互作用和纺锤极形成 .....	3 8
3. Tankyrase1 的亚结构域 ARC V 介导 Tankyrase1 与 MERIT40、BRCC36 相互作用 .....	4 0
4. RXXPEG 介导 MERIT40 纺锤极定位和维持完整纺锤体结构...	4 1
5. MERIT40 复合物调控 Tankyrase1 K63 连接泛素化修饰.....	4 2
第 3 章 讨论 .....	4 5
第 4 章 综述 .....	4 8
DUBS 在有丝分裂中的作用 .....	4 8
4. 1 泛素化修饰 .....	4 8
4. 2 DUBs 逆转非蛋白水解泛素化信号 .....	4 9
4. 3 DUBs 逆转蛋白泛素化水解信号 .....	5 8
4. 4 UBPs 在有丝分裂中的作用 .....	5 9
4. 5 UBPs 靶向底物经蛋白酶体降解 .....	6 0
4. 6 UBPs 调节底物定位 .....	6 3
4. 7 结束语和展望 .....	6 4
参考文献 .....	6 6
致 谢 .....	8 3

## 引言

### 1 有丝分裂与纺锤体组装

细胞分裂是细胞增殖和生命延续的基本活动，高等真核细胞通过有丝分裂的方式将带有完全相同遗传物质的两条染色体分配到两个子代细胞中，这个过程依赖于以微管为基础的双极纺锤体的组装和功能。染色体分离或细胞分裂异常将导致非整倍体和基因组不稳定性的发生，从而促进肿瘤的发生。

有丝分裂包括纺锤极形成、纺锤体组装、染色体排列和分离等，是一个在时空上受到精细调控的过程<sup>[1-3]</sup>。根据有丝分裂过程中细胞形态学的特征，通常将有丝分裂划分为6个时期：前期、前中期、中期、后期、末期和胞质分裂期。其中前期主要的特征是已复制的染色质凝集、核仁消失，有丝分裂纺锤体开始核外组装；在有丝分裂前中期，核膜断裂，形成小囊泡，核周围的纺锤体定位到细胞中心区域，一部分纺锤体微管正端结合到染色体动粒上，形成动粒微管，染色体剧烈活动，在两极之间来回翻滚和振荡，极性微管相互推挤使中心体分开；在有丝分裂中期，通过牵引与外推的作用力将染色体排列在纺锤体赤道板上；在有丝分裂后期，有丝分裂检查点复合物（Mitotic Checkpoint Complex, MCC）对后期促进复合物或细胞周期体（Anaphase Promoting Complex or Cyclosome, APC/C）的阻断作用终止，活化的APC/C促进securin和cyclin B1的泛素化降解。securin降解后释放分离酶（separase）依次切割结合环的结构Scc1 Kleisin亚单位打开指环结构，动粒受到不断降解缩短的动粒微管的牵引使染色单体分开向纺锤体对立两极运动；在有丝分裂末期，染色体周围的核被膜囊泡结合到染色单体表面并相互融合，最后结合细胞质分裂形成两个子细胞<sup>[3-7]</sup>。

在真核细胞有丝分裂过程中，一个完整并且功能正常的纺锤体是保证染色体精确分配到两个子代细胞中所必需的。纺锤体是一个随有丝分裂进程而动态变化的高分子“机器”，主要由染色体、中心体、微管结构以及纺锤体相关的动力蛋白（motor protein）和其它调节蛋白组成，与染色体分离直接相关。纺锤体微管分为以下三大类微管（Microtubules, MTs）：动粒MTs（Kinetochore Microtubules, K-MTs）、星体MTs（Astral Microtubules, A-MTs）和非动粒MTs（non-Kinetochore Microtubules, nK-MTs）（如图1）

[8]。星体微管从对立两极中心体向外呈辐射状发出，与细胞皮层相互作用调节纺锤体定位；非动粒 MTs 是由纺锤体极向外发出的微管，一端与中心体相连，为微管的负端，游离的另一端为微管的正端。通常从两极发出的非动粒 MTs 的正端在赤道板处交错对插排列，通过动力蛋白发生相互作用；动粒 MTs (K-fiber) 负极端与中心体相连，而远离中心体的正端与染色体上的动粒结合，介导染色体的移动。

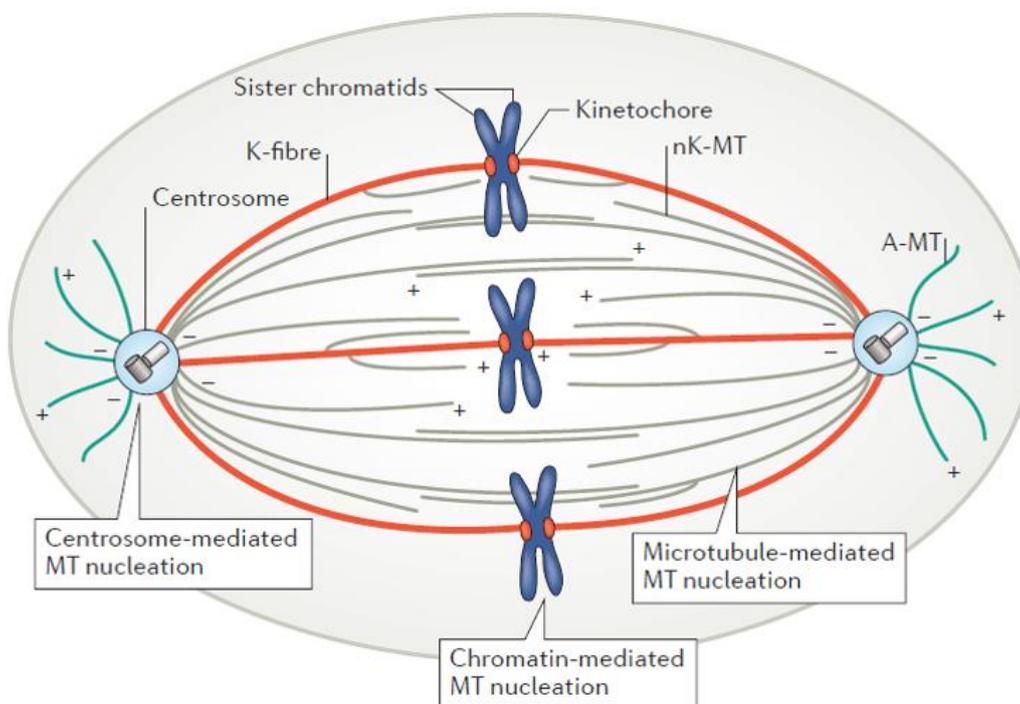


图 1. 有丝分裂纺锤体结构示意图。(引自 Prosser and Pelletier, 2017)

#### 图 1. 有丝分裂纺锤体概述:

纺锤体是微管组装形成的双极阵列。微管的负端集中在中心体所在的纺锤极，中心体在纺锤极组织并使微管成核形成纺锤体微管；微管的正端向细胞赤道板发射，来自对立两极的微管在此交汇形成反向平行阵列。染色体通过由多蛋白组装在每条染色单体中间的动粒结合到微管，三种驱动微管成核形成有丝分裂纺锤体的途径：a. 中心体介导的微管成核；b. 染色体介导的微管成核；c. 微管介导的微管成核。纺锤体包含三种不同的微管：a. 动粒微管 (K-MTs)：把染色体结合到纺锤极使染色体分离；b. 非动粒微管 (nK-MTs)：由对立两极纺锤体产生，有助于纺锤极的稳定和染色体分离；c. 星体微管 (A-MTs)：从纺锤体发射出并与细胞皮层相互作用，有助于纺锤体定位。一旦 20-30 条 K-MTs 结合到动粒，它们就形成动力纤维 (K-fibres)。许多蛋白与微管相互作用调节微管的组装、动态和定位。这些蛋白包括动力蛋白，动力蛋白组装微管阵列之外还负责产生使染色体移动的力量。纺锤体在不同的生物体之间会有所不同，但是所有的纺锤体都是两极并且染色体是两极取向，以保证整套染色体精确分配的两个子代细胞中。

在纺锤体组装过程中，纺锤体组装相关蛋白的翻译后修饰发挥重要作用。其中，蛋白质的泛素化 (ubiquitination) 和 PAR (Poly-ADP ribosylation) 修饰是其中两种重要的调控方式。

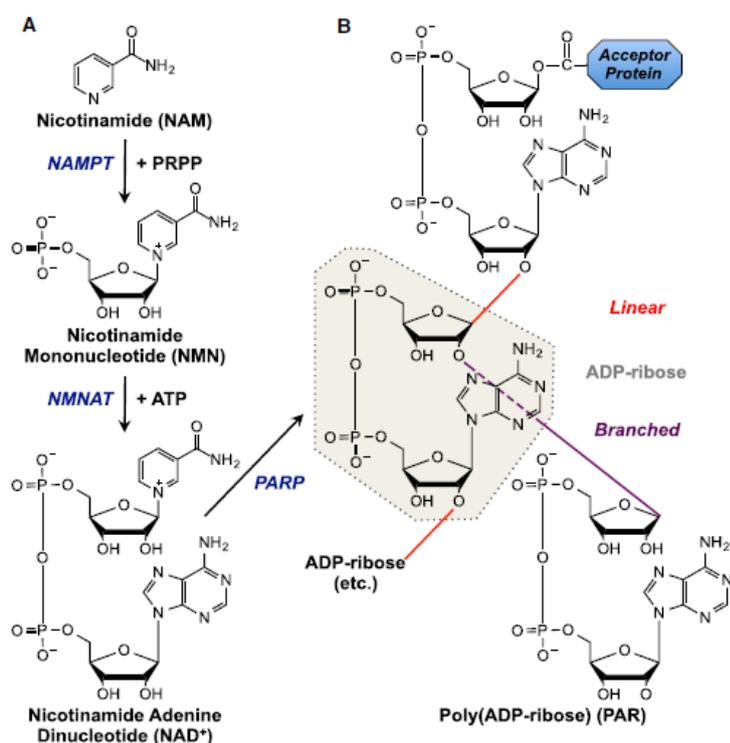
## 2 PAR 修饰与 Tankyrase

PAR 修饰是 NAD<sup>+</sup>在 PARPs 酶的作用下被切割成 ADP 核糖 (ADP-ribose) 和烟酰胺 (NAM) [9], 当 ADP 核糖基团共价连接到目的蛋白上时, NAM 就得以释放出来。接着更多的 NAD<sup>+</sup>被切割产生 ADP-核糖单位并连接到已经存在的 ADP 核糖中, 经过连续的反应循环, 将单-ADP-核糖转化成寡聚-ADP-核糖并最终形成多聚-ADP-核糖, 从而形成了 PAR 链<sup>[10]</sup>对底物进行的一种翻译后修饰。参与了一系列的生物过程, 包括转录调节、DNA 损伤修复、细胞周期调控、炎症、缺氧反应、纺锤极功能、致癌相关信号和细胞死亡的调节<sup>[11-13]</sup>。到目前为止, 研究人员已经发现至少 18 种与 PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) 相关的酶, 它们全都具备 PARP 结构<sup>[11, 14, 15]</sup>, 又命名为白喉毒素样 ADP-核糖转移酶 (ARTD) <sup>[14, 16]</sup>。

在稳定状态下的哺乳动物细胞内, PAR 的合成受到严格的控制并保持相对较低的水平。一定的条件如基因毒性应激或转录活性可以激活 PARP 酶, 导致 PAR 水平的迅速上升<sup>[10]</sup>。PAR 的半衰期很短, 在聚 (ADP 核糖) 水解酶 (Poly(ADP-ribose) glycohydrolase, PARG)、ADP-核糖基受体水解酶-3 (ADP-ribose receptor hydrolase -3, ARH3)、ADP-核糖基酶或含大结构域蛋白的作用下快速降解成 ADPR<sup>[17-19]</sup>。

在已发现的这些 PARP 蛋白家族成员中, 仅 PARP-1、PARP-2 及 Tankyrase-1 (Tankyrase1) 和 Tankyrase-2 (Tankyrase2) 有充分的证据证实其 PAR 修饰活性, 在它们的催化下合成支链的 PAR 聚合物<sup>[14-16]</sup>。一些 PARP 家族成员 (比如 PARP1 和 PARP2) 利用 NAD<sup>+</sup>产生 ADP-核糖单位催化目的蛋白 PAR 的合成。但其它的单 ADP-核糖转移酶 (比如 PARP-3 和 PARP-16) 占了整个 PARP 家族的大部分, 它们催化 NAD<sup>+</sup>将 MAR (mono(ADP-ribose)) 共价结合到目的蛋白<sup>[10, 14-16, 20]</sup>。最后三个 PARP 家族成员 (比如说 PARP-13) 则没有明显的催化活性<sup>[14]</sup>。事实上, 细胞内激发或基底的 PAR 水平主要由 PARP-1 (85%–90%) 和 PARP-2(10%–15%) 催化产生<sup>[21]</sup>。

PAR 可以在许多不同的条件下合成, 最为突出的就是细胞应激, 尤其是胁迫应激可以造成 PAR 水平快速而明显的上升。因此 PAR 修饰在 DNA 损伤信号及修复中研究的最多<sup>[22]</sup>。与其它领域研究酶蛋白活性一样, PARP 和 ADP-核糖基化经历了从生物化学、结构生物学和分子生物学到蛋白质组学和生理学的发展过程。早期大多数 PARP 和 ADP-核糖基化的研究主要在 PARP 家族成员中最普遍和丰富的 PARP-1 中进行<sup>[23]</sup>。PARP-1 是一个依赖 DNA 的细胞核 PARP, 它的催化活性主要是由损伤的 DNA 激发<sup>[23]</sup>。在过去 50 年的时间里, 我们从研究 PARP-1 在 DNA 损伤和检测中的分子及生物功能<sup>[24]</sup>

图 3. NAD<sup>+</sup>和 PAR 的生物合成:

NAD<sup>+</sup> 和多聚-ADP-核糖 (PAR)生物合成路径。前体化学结构、反应以及产物如图所示:(A) NAD<sup>+</sup>生物合成: 首先选, 在烟酰胺磷酸核糖基转移酶 (NAMPT) 的催化下, 烟酰胺 (NAM) 与 5-磷酸核糖-1-焦磷酸盐 (酯) (PRPP) 反应生成烟酰胺单核氨酸 (NMN), 然后烟酰胺磷酸核糖基转移酶催化烟酰胺单核氨酸与 ATP 反应生成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD<sup>+</sup>)。NMNAT-1, -2,或 -3 可以催化 NAM 和 ATP 生物合成 NAD<sup>+</sup>。(B) PAR 的生物合成: 在 PARP 酶的作用下, NAD<sup>+</sup>连接到目的蛋白中, 随着 ADP-核糖单位以直链或支链的方式结合上去, PAR 链得以延长并形成。

图 2. NAD<sup>+</sup>和 PAR 的生物合成示意图。(引自 Kraus, 2015)

到对染色质结构及转录的调节<sup>[25, 26]</sup>再到现在对 PARP-1 在细胞应激反应和生理过程中的作用<sup>[27, 28]</sup>。取得了快速的研究进展和成果, 更为重要的是 PARP-1 酶活性已经成为 PARP 抑制剂治疗干预的重要靶点<sup>[29]</sup>。

大多数的 PARPs 都在纺锤体中定位: PARP1、PARP2 定位到中心体并与 CENPA, CENPB 和 Bub3 相互作用<sup>[30]</sup>; VPARP 定位到整个纺锤体<sup>[31]</sup>; PARP3 定位到中心体<sup>[32]</sup>; Tankyrase1 和 Tankyrase 2 在染色体和纺锤极定位<sup>[33]</sup>, 并在纺锤极 NuMA 相互作用<sup>[30]</sup>。

人源 Tankyrase 1 (telomeric repeat binding factor 1 (TRF1)-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase; Tankyrase1/ARTD5/PARP5a) 和 Tankyrase 2 (Tankyrase2/ARTD6/PARP5b) 分别是由 1327 和 1166 个氨基酸残基组成的多结构域蛋白。Tankyrase 1 和 Tankyrase 2 具有 82% 的同源性序列。Tankyrase 1 和 Tankyrase 2 在结构上拥有三个共同的结构域: C 端具有催化活性的 ARTD 结构域<sup>[34, 35]</sup>、N 端介导蛋白-蛋白相互作用的五个锚蛋白重复簇 (ankyrin repeat cluster, ARCs)<sup>[36]</sup>和介导 Tankyrase 寡聚化的 SAM (sterile alpha motif) 结构域。与 Tankyrase 2 不同的是, Tankyrase 1 在 N 端还具有丰富的 His、Pro 和 Ser (HPS) 区域。

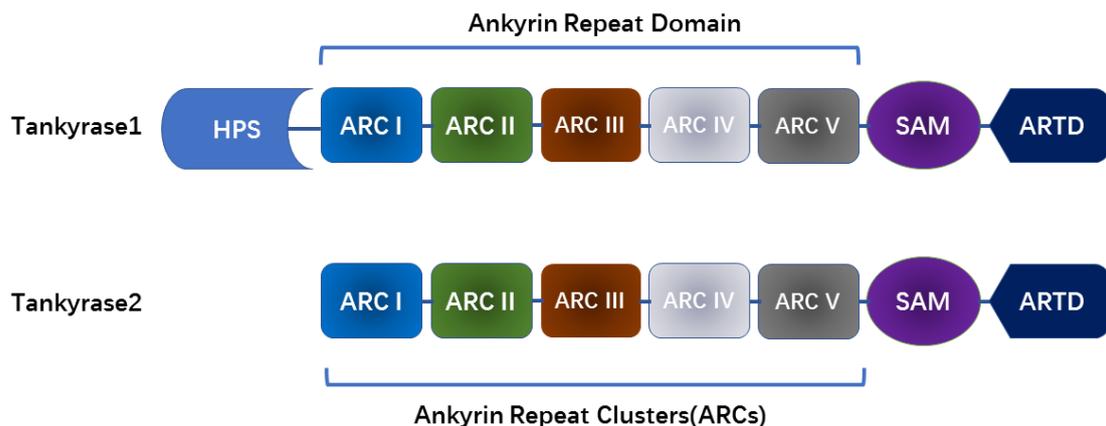


图 3. Tankyrase1 和 Tankyrase2 结构示意图

SAM 结构域位于催化结构域 PARP 的前面，是一个由大约 70 个氨基酸形成的  $\alpha$  螺旋结构域。通过 SAM 结构域寡聚化，Tankyrase 可以与自身或别的蛋白分别形成同源二聚体或异质二聚体。Tankyrase 1 的 SAM 结构域可以寡聚化形成大的复合物 (>30 个分子)<sup>[37]</sup>。在体内，全长的 Tankyrase 1 可以通过 SAM 结构域聚合且 Tankyrase 1 与 Tankyrase 2 聚合可以形成异质二聚体<sup>[30]</sup>。Tankyrase 寡聚物可以与 TRF1 相互作用并对 TRF1 修饰表明 SAM 结构域是 Tankyrase 发挥最优催化活性所需的<sup>[37]</sup>。Tankyrase 的这种聚合是可逆的，Tankyrase 自身 PAR 修饰后这种聚合就会发生解离<sup>[37]</sup>。

锚蛋白重复序列 (ankyrin repeats) 是蛋白-蛋白相互作用共同的模块。Tankyrase 的锚蛋白重复序列可以分为五个锚蛋白重复簇 (ARCs) 结构域，每个结构域含有 5 个堆积的锚蛋白重复序列<sup>[38]</sup>。ARC I、II、IV 和 V 与不同蛋白多肽以相似的方式结合。底物蛋白的 TBM(Tankyrase-binding motif)通常具有相同的序列 RXXPDG<sup>[30, 36, 39, 40]</sup>。

最近，Guettler 及其团队对这个基序的研究发现，第一位的精氨酸 (R) 和第六位的甘氨酸 (G) 对蛋白结合是非常重要的；第二、第三位的氨基酸可以是除苯丙氨酸 (F) 之外的所有氨基酸；第四位氨基酸偏向于小分子氨基酸或疏水氨基酸；第五位主要是天冬氨酸 (D)；第七位可以是除了脯氨酸 (P) 的氨基酸，并且在第八位优先是酸性氨基酸<sup>[38]</sup>。Tankyrase 的 ARC3 底物结合表面的保守性很差，并不结合 Tankyrase 底物肽<sup>[38, 40]</sup>。

虽然单个 ARCs 与底物多肽只有微摩尔亲和力，但是蛋白质中不止一个的 TBM 提高了 ARCs 活性<sup>[38, 41]</sup>。Tankyrase 对底物的 PAR 修饰依赖于底物蛋白与 ARCs 的结合，

但这并不是 PAR 修饰充分的条件, 因为某些底物的修饰并不通过蛋白-蛋白结合。与 Tankyrase 结合的蛋白通常都被 PAR 修饰, 但一些与 Tankyrase 1 结合的蛋白还可以抑制 Tankyrase 催化活性<sup>[42, 43]</sup>。

Tankyrase 催化底物 PAR 修饰的同时, 也可以对自身进行 PAR 修饰。目的蛋白被 Tankyrase PAR 修饰后通常经泛素蛋白酶体降解途径降解。

Tankyrase 的功能由通过 ankyrin (和 SAM) 形成的蛋白/蛋白复合物相互作用来介导, 通过 PAR 修饰分离蛋白复合物并走向蛋白降解途径。因此, 调控 Tankyrase 蛋白合成和转换的主要修饰就是 PAR 修饰自己本身。带负电荷的 PAR 链是识别 ADP-核糖基团的泛素 E3 连接酶 RNF146 的识别位点<sup>[44, 45]</sup>。RNF146 介导 Tankyrase 靶向蛋白的多聚泛素化修饰, 随后经 26S 蛋白酶体降解<sup>[44-46]</sup>。此外, Axin、RNF146 和 Tankyrase 也可以被 K48 连接类型的多聚泛素化修饰。HEK293T 细胞中过表达 RNF146 可以诱导 Tankyrase 2 被 K63 连接类型的多聚泛素化链修饰<sup>[44]</sup>。Tankyrase 1 的蛋白水平可以被 RNF146 介导的 K48 多聚泛素化修饰, 然后经蛋白酶体而被快速降解而实现其分子周转<sup>[44, 45]</sup>。在 S/G2 期末, RNF8 直接与 Tankyrase 1 结合介导 Tankyrase 1 K63 链的泛素化修饰<sup>[47]</sup>。在 G1 期, K63 特异性去泛素化酶 BRISC 介导 Tankyrase 1 的去泛素化修饰<sup>[47]</sup>。

Tankyrase 自身的蛋白修饰可以提高其与目的蛋白的结合和催化活性。在有丝分裂时, Plk1 对 Tankyrase1 磷酸化修饰对 Tankyrase1 起到稳定作用, 从而提高 Tankyrase 1 的催化活性。相反, 抑制 Plk1 介导的 Tankyrase 1 磷酸化修饰则减弱了 Tankyrase 1 在纺锤体和端粒的功能<sup>[48]</sup>。目前确定的 Tankyrase 磷酸化位点位于 ARC V 亚结构域, 但 Tankyrase 1 Thr1128 位于催化结构域受体位点附近。Tankyrase Ser978、 Thr982、 Ser987 和 Ser991 的有丝分裂磷酸化与糖原合成激酶 3- $\beta$  (GS3K $\beta$ ) 相关。与 Tankyrase 相似, GS3K $\beta$  定位于纺锤极及当它被抑制时有丝分裂会被阻滞<sup>[49]</sup>。E3 泛素连接酶 RNF146 在介导 Tankyrase1 靶向蛋白泛素化修饰的同时, 还可以介导 Tankyrase 1 多聚泛素化修饰使 Tankyrase 1 经 26S 蛋白酶体降解。尽管目前还没有确定 Tankyrase 1 PAR 修饰作用的氨基酸残基, Citarelli 和他的同事研究指出, 泛素化修饰和 PAR 修饰可能会竞争靶蛋白的 Lys 残基<sup>[37]</sup>。S/G2 期末, RNF8 直接与 Tankyrase 1 结合, 介导 Tankyrase 1 K63 连接类型的泛素化修饰, 抑制 Tankyrase 1 的蛋白酶体降解从而提高 Tankyrase 1 的稳定性<sup>[47]</sup>。

此外, Tankyrases 还可以被丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK)、蛋白激酶 B (Protein Kinase B, Akt) 磷酸化<sup>[50, 51]</sup>。在 Tankyrase 2 锚蛋白重复序列中, FIH (Factor-inhibiting hypoxia-inducible factor) 可以对一些 Asn 和 His 进行羟

基化修饰<sup>[52, 53]</sup>。

Tankyrase 分布于细胞内许多位置。在人类细胞中, Tankyrase 存在于端粒<sup>[54, 55]</sup>、细胞核<sup>[56]</sup>、高尔基复合体<sup>[50, 51, 57]</sup>、细胞浆<sup>[38]</sup>、细胞膜<sup>[58]</sup>以及纺锤极<sup>[48, 57, 59-62]</sup>。Tankyrase 的翻译后修饰及亚细胞动态定位影响着蛋白-蛋白相互作用, 从而发挥不同的细胞功能。在有丝分裂中期, 当 Tankyrase 重新定位到纺锤体和中心体时, Tankyrase 与 Axin 定位和相互作用的改变需要 Tankyrase 介导纺锤体成分 PAR 修饰<sup>[49]</sup>。Axin2 同样也定位于纺锤体。在有丝分裂时期与 Axin 密切联系的 GS3K  $\beta$  募集到纺锤体并磷酸化 Tankyrase 1<sup>[49]</sup>。虽然目前仍不清楚 GS3K  $\beta$  介导的磷酸化是如何影响 Tankyrase1 的活性及结合特性, 但可以推测 GS3K  $\beta$  介导的磷酸化可能影响了 Tankyrase1 与 NuMA 的相互作用<sup>[49]</sup>。ARTD3 同样也与 NuMA 相互作用, 但它们在有丝分裂中不同的作用还没有确定<sup>[63-65]</sup>。然而在 COS-1 细胞中, Tankyrase1 和 ARTD3 都是有丝分裂进展需要并且可以与 NuMA 共沉淀下来<sup>[54, 63]</sup>。在功能性 ARTD3 存在时, Tankyrase1 对 NuMA 的 PAR 修饰显著上升<sup>[63]</sup>。Plk1 对 Tankyrase1 的磷酸化提高了 Tankyrase1 稳定性和 PAR 修饰催化活性, 从而调控 Tankyrase1 对 NuMA 的 PAR 修饰<sup>[48]</sup>, 而 NuMA 对中心体簇集的调节在细胞有丝分裂进展中起着非常重要的作用<sup>[66]</sup>。

### 3 泛素化修饰与 MERIT40

泛素 (ubiquitin) 是一个含有 76 个氨基酸的、高度保守的氨基酸多肽<sup>[67]</sup>, 同时泛素本身也有许多可能的翻译后修饰位点。泛素最主要的特征就是含有七个可以被进一步泛素化修饰赖氨酸 (Lys) 位点。此外, 它还存在第八种链型, 即当泛素分子被连接到第二个泛素分子的 N 端时产生的 Met1 相关或线性的链。蛋白质组学研究表明, 所有可能的连接类型都共存于细胞内<sup>[68-72]</sup>。Lys48 相关链接是细胞内主要的泛素连接方式 (通常大于所有连接的 50%), 其主要作用是使其靶向的蛋白进入蛋白酶体降解的途径<sup>[73]</sup>。而细胞内通过 Lys63 相关的链接类型则发挥许多非蛋白酶体降解的作用<sup>[74]</sup>, 比如内吞作用、囊泡转运、NF  $\kappa$  B-介导的转录及 DNA 损伤等。

泛素化 (ubiquitination) 是将泛素分子共价连接到目的蛋白 Lys 位点的一种翻译后修饰。泛素化修饰的过程需要三种不同的酶依次参与, 分别为泛素活化酶 E1、泛素结合酶 E2 和泛素连接酶 E3。泛素在 ATP 的作用下被泛素活化酶 E1 活化, 然后活化的泛素与泛素结合酶 E2 共价结合, 随后在泛素连接酶 E3 的作用下将泛素分子连接到目的蛋白对目的蛋白进行泛素化修饰<sup>[75-77]</sup>。在 HECT 结构域的 E3 酶 (HECT-domain E3s) 的情况下, 活化的泛素转移到泛素连接酶 E3 先形成共价中间体, 并最终将泛素结合到

底物蛋白；而具有 RING 结构域的 E3 酶（RING-domain E3s）本身没有活性，泛素连接酶 E3 促进泛素通过泛素结合酶 E2 直接结合到底物。也就是说泛素 E3 连接酶通过将目的蛋白招募到泛素结合酶 E2 赋予底物特异性，因为泛素结合酶 E2 本身不能识别（或至少很少识别）指定的蛋白。

泛素化修饰是一个动态可逆的过程，即在去泛素化酶（Deubiquitinating Enzymes, DUBs）的作用下将靶蛋白上的泛素链水解，从而参与蛋白质泛素化水平的动态调节。所以 DUBs 在泛素化调控中扮演着与泛素连接酶 E3 同等重要的作用。

人类细胞中含有两种 E1 酶、约 50 种 E2 酶、600 种 E3 酶和 100 种 DUB 酶。根据它们的同源性，DUBs 酶可以分为 5 大类：泛素羧基末端水解酶家族（ubiquitin C-terminal hydrolases,UCHs）、卵巢肿瘤结构域蛋白酶（ovarian tumor domain proteases,OTUs）、泛素特异性蛋白酶家族（ubiquitin-specific proteases,USPs）和 JAMM/MPN<sup>+</sup>蛋白酶家族。

BRCC36(BRCA1/BRCA2-containing complex,subunit 3)是 JAMM/MPN<sup>+</sup>蛋白酶家族成员之一，是依赖 Zn<sup>2+</sup>的、K63 链接特异的去泛素化酶。BRCC36 与 MPN<sup>-</sup>DUB 伪蛋白 ABRO1/KIAA0157 和 ABRAXAS 分别在细胞质和细胞核形成两个不同的大分子复合物(图 4)<sup>[78-80]</sup>。

ABRAXAS 是 FAM175 家族的一个成员，该家族蛋白包括 FAM175A（ABRA1/ABRAXAS）和 FAM175B（KIAA0157）。KIAA0157 是 ABRAXAS 的兄弟蛋白，所以又称为 ABRO1(ABRAXAS Brother 1)。ABRAXAS 和 ABRO1 分别主要定位在细胞核和细胞质<sup>[81]</sup>。它们在 N-端有 39%同源序列，该同源序列中含有与 BRCA1-A 复合物和 BRISC 共同亚单位 BRCC45/BRE、MERIT40/NBA1 和 BRCC36 相互作用结构域(图 5.A)<sup>[78, 81, 82]</sup>。该同源序列中的 MPN<sup>-</sup>（Mpr1/Pad1 N-terminal region lacking catalytic activity）功能域缺少酶切割活性所需的与 Zn<sup>2+</sup>结合的保守残基。因此，ABRO1 不具备 MPN<sup>+</sup>/JAMM 结构域的去泛素化酶催化活性。与 ABRA1/ABRAXAS 不同的是，ABRO1 的 C 端缺乏介导 BRCA1 的相互作用的 RxRxxS/T 结构域<sup>[83]</sup>。因此，ABRO1 不能与 BRCA1 发生相互作用介导 BRCA1 在 DNA 损伤部位的募集。

ABRAXAS 通过 N 端与 MERIT40、BRCC36、BRCC45 和 K63 连接泛素结合蛋白 RAP80 结合，并通过 C 端 pS-X-X-F 基序结合 BRCA1-A 形成稳定的 BRCA1-A 复合物<sup>[80, 83-88]</sup>，参与 DNA 损伤和乳腺癌抑制；ABRO1 (Abraxas brother 1) 不能结合 RAP80 而且 C 端缺少 pS-X-X-F 基序也不能与 BRCA1 结合，但可以通过 N 端与 BRCC36、MERIT40 和 BRCC45 结合形成 BRISC（BRCC36 Isopeptidase Complex）<sup>[78, 81, 82, 89]</sup>，通过去泛素

化稳定 IFNAR，提高依赖干扰素的反应。研究证明，在蛋白-蛋白相互作用中，BRISC 和 BRCA1-A 复合物 DUB 伪底物或靶向于 SHMT2 或 RAP80 蛋白严格调控 DUB 活性。SHMT2 或 RAP80 分别靶向 BRISC 和 BRCA1-A 复合物到细胞因子受体活化或 DSBs 引起的局部合成的 K63 泛素链<sup>[80, 85, 88, 90]</sup>。BRISC 同时还是微管相关蛋白，定位在动力纤维（K-fibers）、纺锤极并直接与微管结合，BRISC 对 NuMA 的去泛素化调节有助于纺锤体的组装<sup>[91]</sup>。ABRO1 可以通过稳定 p53 抑制肿瘤发生和调节 DNA 损伤反应，但这个过程依赖于 USP7 而不依赖于 BRISC 的去泛素化酶活性<sup>[92]</sup>。

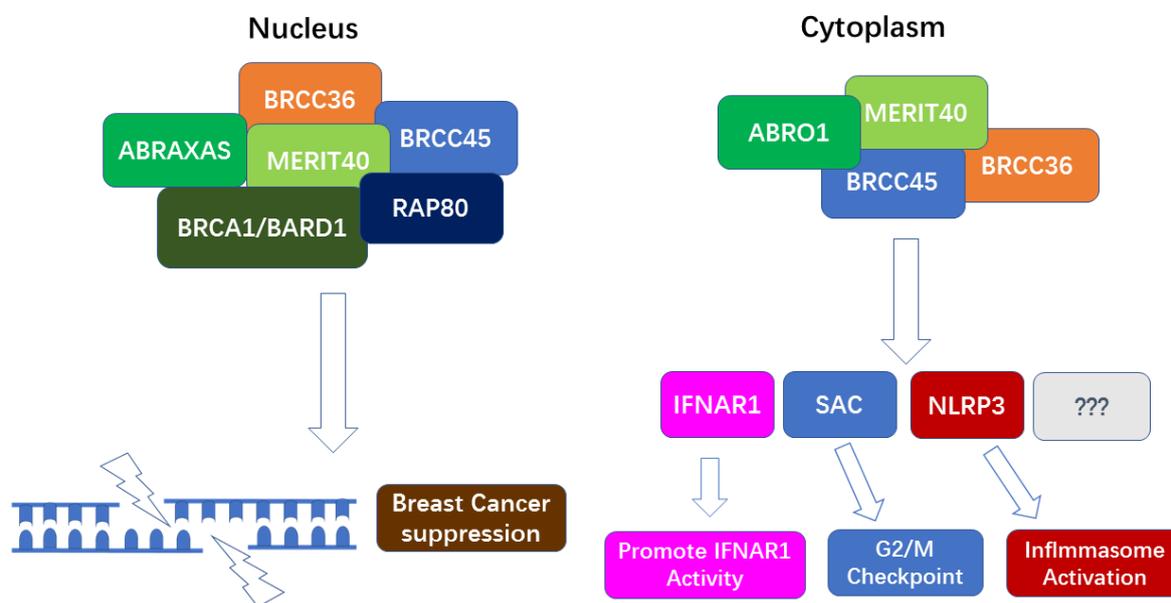


图 4. BRCC36 在细胞质、细胞核分别形成 BRISC 和 BRCA1 复合物及其功能

MERIT40 (MEdiator of RAP80 Interaction and Targeting 40KD)是一个分子量大约为 40KD 的支架蛋白，又叫 NBA1、C19orf62 或 HSPC142。它的 N 端有两个 Tankyrase 结合基序 (RxxG/PxG) 和一个 Akt 基序 (RxRxxS/T) (图 5.B)<sup>[38, 93]</sup>。在抗有丝分裂和细胞毒性药物多柔比星 (Doxorubicin) 处理后，MERIT40 通过 Akt 基序与 Akt 激酶相互作用并被 Akt 磷酸化修饰，磷酸化的 MERIT40 (p-MERIT40) 促进 BRCA1-A 复合物组装参与 DNA 损伤修复<sup>[93]</sup>。Guettler 和他同事的研究发现，Tankyrase (Tankyrase1 和 Tankyrase2) 能与 MEIRT40 相互作用并且对 Tankyrase2 有微弱的 PAR 修饰<sup>[38]</sup>。但他没有证明 Tankyrase1 是否会对 MERIT40 PAR 修饰以及 MERIT40 PAR 修饰之的细胞功能或 MERIT40 复合物会否对 Tankyrase1 去泛素化修饰。

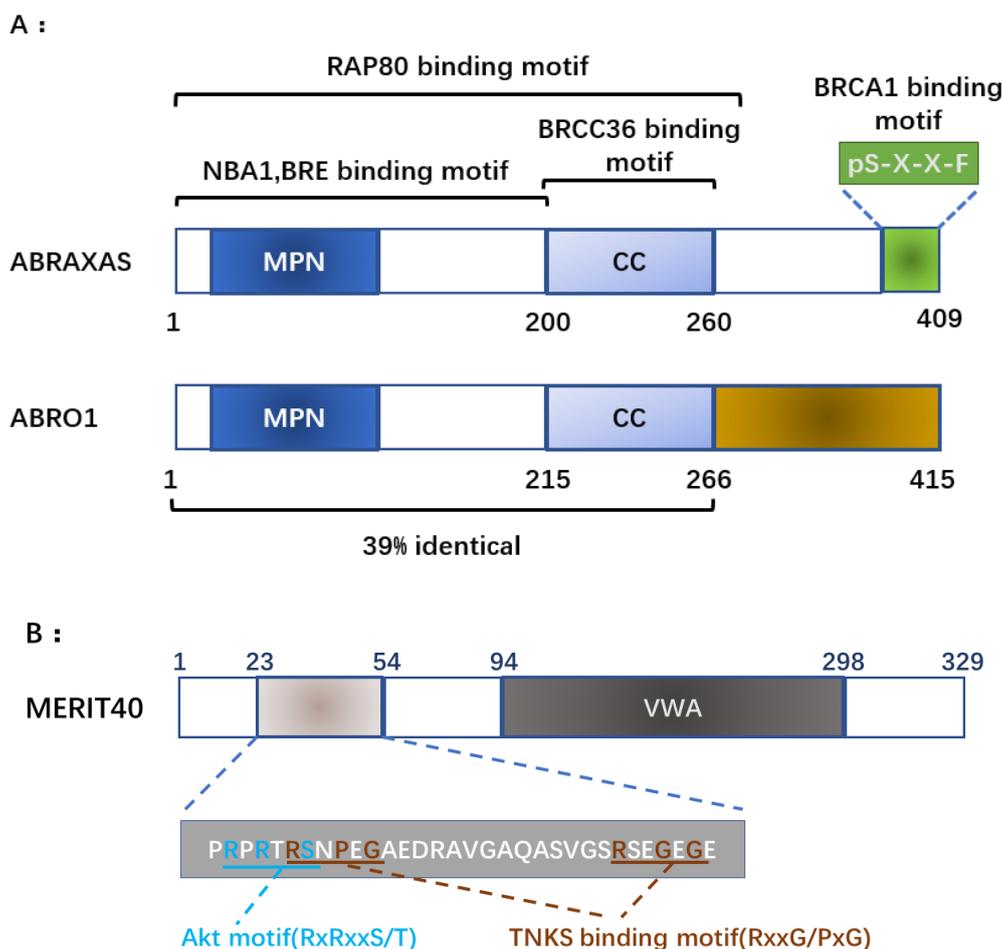


图 5. ABRAXAS、ABRO1 和 MERIT40 的结构示意图

MERIT40 在细胞核中与 ABRAXAS 相互作用，是细胞核 BRCA1-A 复合物的组成成分。MERIT40 能稳定 BRCA1-A 复合物并募集到 DNA 双链断裂部位，参与 DNA 损伤修复过程<sup>[87, 94, 95]</sup>。在细胞质中，MERIT40 与 ABRO1 相互作用，是 K63 连接特异的去泛素化酶 BRISC 的组成成分<sup>[78, 81, 82, 89]</sup>。BRISC 与 SHMT(serine hydroxymethyl transferase)一起调节 IFNAR1(type 1 interferon(IFN) receptor chain 1)的 K63 连接泛素化水平，限制 K63-Ub 介导的 IFNAR1 的内化和降解，参与 IFNs 介导的抗病毒免疫调控<sup>[90]</sup>。此外，BRISC 能对 NLRP3 去泛素化修饰，促进炎性体的活化严格调控炎症反应<sup>[96]</sup>，caspase-8 和 BRCC36 的激活可使 NLRP3/NLRP6 炎性体活性失衡<sup>[97]</sup>。我们实验室发现，BRISC 对纺锤体组装 NuMA 的去泛素化修饰在双极纺锤体组装中发挥非常重要的作用，BRISC 的敲除导致大量的多极纺锤体、染色体滞后、双核和多核以及胞质分裂失败<sup>[91]</sup>。

本文主要对 MERIT40 复合物与 Tankyrase1 在细胞有丝分裂纺锤体组装中的作用及

机制进行了系统的探索与研究。研究显示, Tankyrase 通过 ARC I、II、IV 和 V 与底物 TBM (Tankyrase-binding motif) 中 6 个氨基酸序列 RXXPDG 结合<sup>[30, 36, 39, 40]</sup>。对 MERIT40 的氨基酸序列分析发现, MERIT40 在 N 端含有两 RXXG/PxG 氨基酸序列负责与 Tankyrase 的结合。同时 Tankyrase2 对 MERIT40 有微弱的 PAR 修饰<sup>[38]</sup>。既然 Tankyrase1 与 MERIT40 存在相互作用, 那么 Tankyrase1 是否对 MERIT40 存在 PAR 修饰呢? 或 MERIT40 是否会对 Tankyrase1 的功能进行调控? 以及它们之间相互作用在纺锤体组装进中有哪些作用?

基于以上问题, 我们利用免疫荧光、免疫共沉淀、Western blotting, Pulldown 等分子生物学技术对 MERIT40 与 Tankyrase1 之间的相互作用及对纺锤体组装的影响进行研究。

目前尚未有关于 MERIT40 复合物对 Tankyrase 进行调控的研究以及在纺锤体组装中的作用的报道。因此, 本研究探索 MERIT40 复合物对 Tankyrase 进行调控的调控机制及其在纺锤体组装中的作用具有一定的创新性, 这将为揭示 MERIT40 复合物在纺锤体组装中的作用及调控机制提供理论依据。

## 第 1 章 实验材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 溶液配制:

##### 1. 30%丙烯酰胺溶液(w/v):

成分	用量
丙烯酰胺(Acr)	290g
甲叉双丙烯酰胺(Bic)	10g
dd H <sub>2</sub> O	800ml

取所需体积的 dd H<sub>2</sub>O 于水浴锅或沸水中预热（水温不低于 37℃）。称取所需的丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺，加入预热后的 dd H<sub>2</sub>O 并玻璃棒搅拌使其完全溶解，用预热的 dd H<sub>2</sub>O 定容至 1000ml，将上述溶液用定性滤纸过滤，滤后用棕色瓶子分装，4℃保存。

##### 2. 10XPBS buffer 贮液:

成分	用量
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O (MW 358.14)	35.8g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (MW 136.09)	2.4g
NaCl	8.0g
KCl	2.0g
dd H <sub>2</sub> O	800ml

先用 800ml dd H<sub>2</sub>O 充分溶解，用盐酸将溶液 pH 调节至 7.2-7.4，定容至 1000ml，高压灭菌后室温贮存，使用时稀释 10 倍。

##### 3. 10x TBS 储存液:

成分	用量
Tris-base	24.23g
NaCl	80.06g
dd H <sub>2</sub> O	800ml

加入 800ml dd H<sub>2</sub>O 混匀，用纯 HCl 调整 pH 到 7.6，加水定容到 1000ml。

## 4. TBST:

成分	用量
10xTBS	100ml
dd H <sub>2</sub> O	900ml
Tween20	1ml

## 5. Harsh stripping buffer:

成分	用量
10%SDS	20ml
0.5M Tris-HCl pH 6.8	12.5ml
dd H <sub>2</sub> O	67.5ml
$\beta$ -mercaptoethanol	0.8ml

在通风橱中加 0.8ml  $\beta$ -mercaptoethanol。

## 6. 1M Tris-HCl (pH6.8):

成分	用量
Tris-base	121g
dd H <sub>2</sub> O	800ml

先用 800ml dd H<sub>2</sub>O 充分溶解，冷却至室温，用浓盐酸将 pH 调节至 6.8，dd H<sub>2</sub>O 定容至 1000ml，高压灭菌，于 4℃ 贮存。

## 7. 1M Tris-HCl (pH8.0):

成分	用量
Tris-base	60.5g
dd H <sub>2</sub> O	400ml

先用 400ml dd H<sub>2</sub>O 充分溶解，冷却至室温，用浓盐酸将 pH 调节至 8.0，定容

至 500ml, 高压灭菌后 4℃ 贮存。

#### 8. 1.5M Tris-HCl(PH 8.8) (1000ml):

成分	用量
Tris-base	181.7g
dd H <sub>2</sub> O	800ml

先用 800ml dd H<sub>2</sub>O 充分溶解, 冷却至室温, 用浓盐酸将 pH 调节至 8.8, ddH<sub>2</sub>O 定容至 1000ml, 高压灭菌, 于 4℃ 贮存。

#### 9. 10%过硫酸铵 (AP) :

成分	用量
过硫酸铵	0.1g
dd H <sub>2</sub> O	1ml

溶解后, 4℃ 保存, 保存时间为 1 周。

#### 10. 10%SDS:

成分	用量
SDS	10.0g
dd H <sub>2</sub> O	80ml

50℃ 水浴下溶解, 浓盐酸调节 pH 至 7.2, 加入 dd H<sub>2</sub>O 定容至 100ml, 室温保存。

#### 11. 10mmol/L PMSF:

成分	用量
PMSF	0.174g
异丙醇	100ml

溶解后, 用 1.5ml 离心管分装, 每管 1ml, -20℃ 保存。

## 12. 5Xloading buffer (50ml) :

成分	用量
0.5 mol/L Tris·HCl (pH6.8)	25ml
DTT	3.9g
SDS	5.0g
溴酚蓝	0.25g
甘油	25ml

## 13. 10X 丽春红染液:

成分	用量
丽春红 S	2.0g
三氯乙酸	30.0g
磺基水杨酸	30.0g
蒸馏水	100ml

用 80ml 蒸馏水充分溶解后，蒸馏水定容至 100ml，稀释 10 倍使用。

## 14. 5×电泳缓冲液 (1000ml) :

成分	用量
Tris	15.12g
甘氨酸	94g
SDS	5g
蒸馏水	1000ml

用 800ml 蒸馏水充分溶解，定容至 1000ml，室温贮存。

## 15. 10×转膜缓冲液 (1000ml) :

成分	用量
Tris	30.3g
甘氨酸	144g
蒸馏水	1000ml

用 800ml 蒸馏水充分溶解，用蒸馏水定容至 1000ml，室温贮存。

16. 10% NaN<sub>3</sub>:

成分	用量
NaN <sub>3</sub>	10.0g
dd H <sub>2</sub> O	80ml

先用 80ml dd H<sub>2</sub>O 充分溶解后， dd H<sub>2</sub>O 定容至 100ml，于棕色玻璃瓶中 4℃ 贮存。

## 17. 0.5M EDTA (500ml) :

成分	用量
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	93.05 g
dd H <sub>2</sub> O	400ml

用 NaOH 调节 pH 值至 8.0 (约 20 g NaOH)， dd H<sub>2</sub>O 定容至 1000ml。

## 18. 5M NaCl(500ml):

成分	用量
NaCl	146.1 g
dd H <sub>2</sub> O	400ml

先用 400ml dd H<sub>2</sub>O 充分溶解， dd H<sub>2</sub>O 定容至 500ml， 4℃ 贮存。

## 19. NETENG-0 (1000ml) :

成分	用量
1M Tris HCl pH8.0	20ml
0.5M EDTA	2ml
NP-40	5ml

用 dd H<sub>2</sub>O 定容至 1000ml， 4℃ 贮存。

## 20. NETENG-150 (1000ml) :

成分	用量
1M Tris HCl pH8.0	20ml
0.5M EDTA	2ml
5M NaCl	30ml
NP-40	5ml

用 dd H<sub>2</sub>O 定容至 1000ml， 4℃ 贮存。

## 21. NETENG-400 (1000ml) :

成分	用量
1M Tris HCl pH8.0	20ml
0.5M EDTA	2ml
5M NaCl	80ml
NP-40	5ml

用 dd H<sub>2</sub>O 定容至 1000ml, 4°C 贮存。

## 22. LB 培养基(200ml)

成分	用量
胰蛋白胨	2.0g
酵母提取物	1g
NaCl	2.0g

加 200ml 去离子水溶解, 高压灭菌, 冷却到室温使用或 4°C 贮存待用。

## 23. LA 培养基 (100ml) :

成分	用量
胰蛋白胨	1.0g
酵母提取物	0.5g
NaCl	1.0g
琼脂粉	1.5g

加 200ml 去离子水溶解, 高压灭菌, 冷却到室温使用或 4°C 贮存待用。

## 24. 1000X Ampicillin :

成分	用量
ampicillin	1.0g
dd H <sub>2</sub> O	定容至 10ml

0.22um 过滤器过滤, 分装于 1.5ml 离心管, 每管 1ml, -20°C 贮存, 使用时稀释 1000 倍。

## 25. 1000X Kanamycin :

成分	用量
Kanamycin	0.5g
dd H <sub>2</sub> O	定容至 10ml

0.22um 过滤器过滤，分装于 1.5ml 离心管，每管 1ml，-20℃贮存，使用时稀释 1000 倍。

## 26. 100x thymidine:

成分	用量
Thymidine	100mg
dd H <sub>2</sub> O	定容至 20ml

0.22um 过滤器过滤，分装于 1.5ml 离心管，每管 1ml，-20℃贮存，使用时稀释 100 倍。

## 27. 100mg/ml G418

成分	用量
G418	1.4g
dd H <sub>2</sub> O	定容至 10ml

用 0.22um 过滤器过滤，分装于 1.5ml 离心管，每管 1ml，-20℃贮存。

## 28. 10mM/L MG132:

成分	用量
MG132(MW:475.62)	10.0mg
DMSO	2.1ml

溶解后，用 0.22um 过滤器过滤，分装于 1.5ml 离心管，每管 0.5ml，-20℃贮存。

## 29. 100ug/ml Nocodazole

成分	用量
Nocodazole	1.0mg
DMSO	10ml

溶解后，用 0.22um 过滤器过滤，分装于 1.5ml 离心管，每管 1ml，-20℃贮存。

## 30. 1mg/ml 多聚赖氨酸:

成分	用量
poly-lysine (MW: 150,000~300,000)	100.0mg
dd H <sub>2</sub> O	定容至 100ml

称取 100.0mg 多聚赖氨酸于 80ml dd H<sub>2</sub>O 充分溶解，定容至 100ml，在细胞操作台中用 0.22um 过滤器过滤除菌。1ml 每管分装，-20℃贮存，使用时稀释 10 倍。

## 31. 0.5mol/L PIPES:

成分	用量
PIPES	15.1g
dd H <sub>2</sub> O	定容至 100ml

称取 15.1g PIPES，加 80ml dd H<sub>2</sub>O 溶解，用 5mol/L KOH 调节 Ph6.7，然后用 dd H<sub>2</sub>O 定容至 10ml，0.22um 过滤器过滤除菌，分装成小份，-20℃贮存。

## 32. Inoue 转化缓冲溶液 (100ml) :

成分	用量
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.09g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.22g
KCl	0.19g
0.5M PIPES pH6.7	2ml
dd H <sub>2</sub> O	定容至 100ml

0.22um 过滤器过滤除菌，分装成小份，-20℃贮存。

## 33. 考马斯亮蓝 R-250 染色液(1000ml);

成分	用量
考马斯亮蓝 R-250	1g
异丙醇	250ml
冰醋酸	100ml
去离子水	800ml

加入 800ml 去离子充分溶解，定容至 100ml。用滤纸除去颗粒物后，室温保存。

## 34. 考马斯亮蓝 R-250 染色液（850 ml）：

成分	用量
醋酸	100ml
乙醇	50ml
dH <sub>2</sub> O	850ml

充分混匀后使用。

## 35. 谷胱甘肽洗脱液

成分	用量
Tris-HCl pH8.0	50mM
还原性谷胱甘肽	10mM

## 36. IPTG 溶液:

成分	用量
IPTG (mw238.3)	2mg
dH <sub>2</sub> O	定容至 10ml

0.22um 过滤器过滤，每管分装 1ml，贮存于-20℃。

## 37. 4%多聚甲醛:

成分	用量
多聚甲醛	4.0g
PBS	100ml

4.0g 多聚甲醛, 50~80ml PBS, 加热至 60℃, 持续搅拌使其充分溶解(滴加少许 1M NaOH 促进多聚甲醛溶解), pH 7.2~7.4, 定容至 100ml, 4℃保存。

## 38. 0.5%通透液 (V/V) :

成分	用量
TritonX-100	0.5ml
PBS	100ml

4°C保存。

## 1.1.2 主要仪器设备

仪器	公司
CO2 细胞培养箱	Thermo
Olympus 倒置显微镜	日本 Olympus
超净台	北京亚泰科隆仪器技术有限公司
微量移液器	Gilson
普通荧光显微镜	Leica
低速离心机	Eppendorf
高速离心机	Eppendorf
超高速冷冻离心机	Beckman
纯水仪 D-56233	PALL
TS-1T 脱色摇床	厦门为正生物科技有限公司
立式高压蒸汽灭菌锅	上海博迅实业有限公司
PH 计 FE20-five easy	METTLER TOLEDO
超声波细胞粉碎机 JY92-IIN	Scientz
自动酶标仪	TECAN
紫外分光光度计 6405 型	Jenway
电转仪	BIO-RAD
电泳槽、电泳仪	BIO-RAD
PCR 扩增仪 2720 型	AppliedBiosystem

## 1.1.3 细胞株和细胞培养相关试剂

## 1.1.3.1 细胞株

细胞	来源
HEK293T	ATCC
HeLa	ATCC
EYFP-C19-WT- HeLa stable cellline	本人构建
EYFP-C19-R28A- HeLa stable cellline	本人构建

## 1.1.3.2 细胞培养试剂

试剂	公司
Lipofectmine2000	Invitrogen
Lipofectmine RNAiMAX	Invitrogen
MG132	Selleck
Protease Inhibitor Cocktail	Calbiochem
Polybrene	Sigma
PMSF	Sigma
Thymidine	Sigma
G418	Calbiochem
双抗（青霉素 100U/ml；链霉素 100g/ml）	北京博迈德生物技术责任有限公司
Plasma inhibitor	InvivoGen
胎牛血清	PAN Biotech
高糖 DMEM 培养基	北京博迈德生物技术责任有限公司

## 1.1.3.3 RNA interference

RNAi	合成单位
siMerit40-4 (3'UTR)	
5' CCAUCCUGUACAUCUGCACCUUCU 3'	GenePharma
siMerit40-5(3'UTR)	
5' CCUUGGCCUAAAGCCUUGGUUCUCA 3'	

## 1.1.4 质粒、转化菌株和蛋白纯化相关试剂

## 1.1.4.1 质粒、转化菌株

质粒/转化菌株	来源
pOZ-C-MERIT40	Kind gift from Roger Greenberg
pEYFP-C1-MERIT40	Kind gift from Roger Greenberg
GST-MERIT40	本实验室严考文构建
pcDNA3.1-HA-MERIT40 <sup>WT</sup>	本实验室严考文构建
pcDNA3.1-HA-MERIT40 <sup>R28A/R28P</sup>	本实验室严考文构建
GEX-6P-3-MERIT40	本实验室严考文构建
BL21 感受态细胞	北京博迈德生物技术责任有限公司
Rosseta 感受态细胞	本实验室卢广制备
DH5 $\alpha$ 感受态细胞	本人制备

## 1.1.4.2 蛋白纯化试剂

试剂	公司
IPTG	Sigma
谷胱甘肽- Sepharose-beads	Sigma
Anti-HA-Magnetic Beads	Thermo Scientific
Anti-flag-M2-argarose	Sigma
Anti-HA-Magnetic Beads	Thermo Scientific
Anti-flag-M2-argarose	Sigma
还原性谷胱甘肽	北京博奥龙免疫技术有限公司
Flag-Peptide	Sigma
Flag-Peptide	Sigma

### 1.1.5 Western Blot、免疫共沉淀、免疫荧光试剂

#### 1.1.5.1 Western Blot 试剂

试剂	公司
丙烯酰胺	Amersco
甲叉双丙烯酰胺	Amersco
SDS	Amersco
过流酰胺 (AP)	北京鼎国昌盛生物技术有限公司
TEMED	Sigma
Tris base	Amersco
Glycine	Amersco
$\beta$ -巯基乙醇	Sigma
二硫苏糖醇 (DTT)	Sigma
EDTA	Amersco
Tween-20	Amersco
Protein marker	Thermo
硝酸纤维素膜	Whatman
ECL 发光液	Pierce
甲醇	北京化工厂

#### 1.1.5.2 免疫共沉淀试剂

试剂	公司
ProteinA/G-Sepharose	北京博奥龙免疫技术有限公司
Anti-HA-Magnetic Beads	Thermo Scientific
Anti-flag-M2-argarose	sigma

## 1.1.5.3 免疫荧光试剂

试剂/抗体	公司
山羊血清	北京鼎国昌盛生物技术有限公司
BSA	北京盛旭百川生物技术有限公司
多聚甲醛	北京鼎国昌盛生物技术有限公司
DAPI	Roche
载玻片	北京鼎国昌盛生物技术有限公司
Microscope cover glass	Fisherbrand
TritonX-100	北京鼎国昌盛生物技术有限公司

## 1.1.6 抗体

## 1.1.6.1 试验抗体

抗体名称	货号	品牌
Anti-K63-Ub	#5621	CST
Anti-MERIT40	NBP-43622	Novus
Anti-Tankyrase1	Sc-8337	Santa Cruz
Anti- $\alpha$ -tubulin	DM1A	CST
Anti-HA	MMS-101P	Covance
Anti-flag	A2220	sigma
Anti-MERIT40	-----	(Shao et al.,2009a;
Anti-BRCC36	-----	Shao et al.,2009b)
Anti-GFP	Ab290	Abcam
Anti-PAR	#4335-MC-100	Trevigen
anti-NuMA	ab36999	abcam

抗体名称	货号	品牌
Anti-NuMA	NBP-100-74636	Novus
FITC-conjugated 羊抗鼠 IgG		American Jackson
FITC-conjugated 羊抗兔 IgG		American Jackson
Rhodamine Red conjugated 羊抗兔 IgG		American Jackson
Rhodamine Red conjugated 羊抗鼠 IgG		American VECTR
山羊抗小鼠-辣根过氧化物酶	-----	北京鼎国昌盛生
山羊抗兔-辣根过氧化物酶	-----	物技术有限公司

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 免疫荧光

- 1) 取 1ml 浓度为 1mg/ml 的多聚赖氨酸储备液，加 9ml 无菌 ddH<sub>2</sub>O 稀释为 100ug/ml 的工作液。
- 2) 将高压过后的盖玻片放入 24 孔板中，每孔加入 300ul 的多聚赖氨酸工作液，室温包被约 30min。
- 3) 吸掉 24 孔板中的多聚赖氨酸工作液，每孔加入 500ul 无菌去离子水并轻轻晃动清洗，清洗步骤重复 3 次，每次 5min。
- 4) 加入细胞专用 PBS 溶液平衡 10min，吸走 PBS，玻片于超净台内风干。
- 5) 取 35mm 细胞培养皿，每皿放入 3 片 coverslip。
- 6) 常规消化细胞，细胞计数，每个培养皿铺约  $1.1 \times 10^5$  细胞爬片，密度约为 30~40%。
- 7) 第二天，细胞作相应处理（如过表达、敲低、IR 等）。
- 8) 固定：将 coverslip 转移至 24 孔板并做好标记，PBS 振荡洗涤，5min×3 次；每孔加入 200ul 4% 多聚甲醛固定液，室温静置 15min；PBS 振荡洗涤，5min×3 次。
- 9) 通透化：0.5% Triton X-100 通透液覆盖细胞，室温静置 5min，PBS 振荡洗涤，5min×3 次。
- 10) 封闭：山羊血清 1:10 稀释，覆盖标本表面，37°C 孵育 1h。
- 11) 一抗孵育：一抗以合适比例稀释于 PBS（含 1%PBST），覆盖标本表面。4°C

孵育过夜，第二天取出，37°C 复温 1h。PBS 振荡洗涤，5min×3 次。

- 12) 二抗孵育：荧光标记二抗以合适比例稀释于 PBS，覆盖标本表面。37°C 避光孵育 <60min。PBS 振荡洗涤，5min×3 次（避光操作）。
- 13) 染核：8ul DAPI 将片子反扣；防止气泡，压干。
- 14) 封片：用指甲油封片。
- 15) 镜检：-20°C 避光保存。

### 1.2.2 制备感受态细胞

- 1) 准备 Inoue 转化缓冲液。
- 2) 挑取一个经 37°C 培养约 18h 的单菌落（2~3mm 直径），接种至 100ml 锥形瓶中的 25ml LB 培养基中，37°C 摇床（250r/min）培养 6~8h。
- 3) 晚上约 6 点钟，将上述初始培养菌液接种至 250ml SOB 培养液中，第一个瓶加 8ml、第二个瓶加 4ml、第三个瓶加 2ml，18~20°C 中摇床过夜。
- 4) 次日早晨，分别测量三瓶培养液的 OD<sub>600</sub> 值，每 45min 测定一次。
- 5) 当有一瓶培养液的 OD<sub>600</sub>=0.55 时，将培养瓶至于冰上静置 10min，弃去另两瓶培养的菌液。
- 6) 于 4°C 以 2500g 离心 10min 收集菌体。
- 7) 倒去培养液，将离心管倒扣在吸水纸上约 3min 吸干剩余液体，用真空泵将吸附在管壁上的培养基吸干。
- 8) 吸取 100ml 预冷的 Inoue 转化缓冲液重悬细菌沉淀。轻轻旋转，不要用振荡器或吹吸混匀。
- 9) 于 4°C 以 2500g 离心 10min 收集菌体。
- 10) 倒去培养液，将离心管倒扣在吸水纸上约 3min 吸干剩余液体，用真空泵将吸附在管壁上的培养基吸干。
- 11) 吸取 20ml 预冷的转化缓冲液，轻轻重悬沉淀。
- 12) 加入 1.5ml DMSO。轻轻晃动混匀细菌悬液，冰上静置 10min。
- 13) 迅速将重悬液分装到冷却的 1.5ml 无菌离心管中，封紧管口，做好标记后液氮速冻感受态细胞，于 -80°C 贮存备用。

### 1.2.3 免疫共沉淀

- 1) 细胞裂解液准备：取一定体积 NETENG-400 细胞裂解液预冷，加入蛋白酶抑制剂、PMSF。

- 2) 细胞裂解: 根据细胞量加入适量的 NETENG-400 裂解液, 混匀。至于冰上 20min, 期间每隔 3~5min 晃动混匀, 使细胞充分裂解。
- 3) 将细胞裂解液于 4℃, 12,000rpm 离心 20min。
- 4) 弃沉淀, 收集上清液体并转移到新的离心管中。
- 5) 检测细胞裂解液蛋白浓度。
- 6) 标记离心管, 根据细胞裂解液蛋白浓度, 取等量蛋白液于标记好的离心管中, 加入 1.67 倍蛋白液体积的稀释液 NETENG-0。
- 7) 加入适量的平衡液 NETENG-150, 调节蛋白浓度约为 1~2ug/ul。
- 8) 将蛋白液于 4℃, 12,000rpm 离心 20min。
- 9) 在各个离心管中取出 100ul 蛋白液作为 input, 加入 25ul 5X loading buffer, 98℃ 加热 5min。
- 10) 向剩余的蛋白液分别加入免疫沉淀用的抗体或 normal IgG, 至于 4℃ 摇床结合 30min。
- 11) 准备适量的 proteinG/A beads (每个样品大约 20ul proteinG/A beads), 用 PBS 洗涤三次, 用平衡液 NETENG-150 洗涤两次。
- 12) 将洗涤好的 proteinG/A beads 加入 1%BSA, 至于 4℃ 摇床封闭 90min。
- 13) 取出封闭好的 proteinG/A beads, 4℃, 500G 离心 3min。用平衡液 NETENG-150 洗涤三次。
- 14) 标记离心管, 用 NETENG-150 重悬 proteinG/A beads, 等分至每个新的离心管中。
- 15) 将步骤 10 中的抗体/蛋白混合液转移到步骤 14 对应标记的离心管中。
- 16) 用封口膜将离心管封口, 4℃ 摇床 4~6h 或者 4℃ 摇床过夜。
- 17) 取出蛋白液、proteinG/A 混合液, 4℃、1000rpm 离心 3min, 收集 proteinG/A, 吸走上清液。
- 18) NETENG-150 重悬 proteinG/A 并转移到新的离心管中。用平衡液 NETENG-150 洗涤四次。
- 19) 第一次洗脱加入 30ul pH2.5 的 100mM glycine 洗脱 6min; 第二次加入 30ul pH2.5 的 100mM glycine 洗脱 6min。
- 20) 向各洗脱液中加入 6ul 的 1M Tris-HCl pH8.0 中和洗脱产物, 分别加入 16.5ul 5X loading buffer, 混匀后 98℃ 加热 5min。
- 21) 将煮好的 IP 洗脱液于 -20℃ 贮存, 于后续实验用。

## 1.2.4 原核表达系统及 GST 蛋白纯化

### 1.2.4.1 以 GST-MERIT40 为例：原核蛋白表达

- 1) 将构建的 GST-MERIT40 转化 Rosseta, 涂在含有 AMP 的 LB 平板, 37°C 温箱培养 12-16h, 直至出现单一菌落为止。
- 2) 挑取 5-6 个单克隆至 5ml LB(含 100ug/ml 氨苄青霉素)培养基中, 250rpm, 37°C 培养 12-16h。然后以 1:100 比例将上述菌液稀释, 250rpm, 37°C, 培养约 2h。
- 3) 当菌液 OD 值约 0.6-1 时, 加入 IPTG (终浓度 0.1mM) 250rpm, 28°C, 4h, 诱导蛋白表达。
- 4) 取少量菌液离心, 在沉淀中直接加入 1X SDS loading buffer 98°C 煮样品 5min, 然后 SDS-PAGE 电泳分离, 用考马斯亮蓝染色鉴定目的蛋白是否表达。

### 1.2.4.2 目的蛋白纯化

- 1) 将 100ml 诱导表达目的蛋白的细菌液 4°C, 3000rpm, 10min 离心, 收集菌体。
- 2) 取 10ml 预冷的裂解液重悬细菌沉淀, 加入 1mM PMSF, 100ul 50mg/ml 的溶菌酶, 放置在冰上于摇床晃动裂解大约 30min。
- 3) 当液体变稠状时, 进行超声裂解。
- 4) 超声裂解条件: 工作 5s, 间歇 5s, 工作 40 次。裂解完成后置冰上冷却, 重复两次。
- 5) 当液体变得透明不粘稠时, 说明超声裂解已经充分, 加入 TritonX-100 (终浓度 1%) 冰上放置 30min。
- 6) 12000rpm, 4°C 离心 30min, 弃沉淀, 收集上清液体 (含目的蛋白) 并用 0.45um 过滤器过滤。
- 7) 将洗好的 GST 珠子加入上述得到的上清液体中, 4°C, rotate 结合 4-6h。
- 8) 500G, 4°C 离心 4min。将珠子转移到 EP 管中并用 Elution Buffer(不含谷胱甘肽) 洗涤 3 次。
- 9) 加入 100ul Elution Buffer (含谷胱甘肽, 确保 pH=8.0), 室温洗脱。重复 3-4 次, 将洗脱的蛋白放入不同的 EP 管中。
- 10) 将洗脱得到的蛋白液冷冻干燥、透析到 PBS 中, -80°C 贮存待用。

## 1.2.5 稳定细胞系筛选

- 1) 调整 HeLa 细胞生长状态。
- 2) 在 35mm 培养皿中种  $3 \times 10^5$  个细胞。

- 3) 第二天当细胞的汇合度达到 80-90% 时, 转染 pEYFP-C1-C19-WT、pEYFP-C1-C19-R28A 质粒。
- 4) 转染 24h 后, 收集细胞, 按 1:60, 1:100 和 1:200 稀释接种到 100mm 培养皿。
- 5) 加入 800ug/ml 的 G418 筛选, 每 3-5 天换液。
- 6) 筛选 11 天后挑选 EYFP 阳性克隆, 种植到 24 孔板, G418 维持 800ug/ml 培养。
- 7) 待细胞密度长到一定时, 扩大到 6 孔板, G418 维持 800ug/ml 培养。
- 8) 收集一部分细胞, western blot 鉴定阳性克隆。

### 1.2.6 细胞收集和总蛋白提取、定量

#### 1.2.6.1 细胞收集和总蛋白提取:

- 1) 将待收集细胞的培养基放置在冰上, 真空泵吸走培养基, PBS 洗涤 3 次。向培养皿中加入适量的胰酶消化细胞, 3-5min 后加入含血清的培养基中和胰酶的作用。用移液枪将细胞轻轻吹打下来转移到 1.5ml 离心管中, 1000rpm 离心 5min。再用 PBS 重悬洗涤 3 次, 用真空泵尽量吸尽残留的 PBS。
- 2) 向上述细胞沉淀中加入适量预冷的细胞裂解液 (含 millipore protease inhibitor cocktail 和 sigma 的 PMSF), 用移液枪吹打混匀细胞沉淀, 然后置于冰上 20min (每 5min 振荡混匀), 使细胞充分裂解。
- 3) 12,000rpm, 4℃ 离心 10min。
- 4) 弃沉淀, 将蛋白上清转移到新的 EP 管中。
- 5) 取所提取的蛋白测浓度或液氮速冻后 -80℃ 保存。

#### 1.2.6.2 蛋白质定量

- 1) 取 500ul Bradford 与 500 去离子水到比色皿中混匀, 混匀 5min, 用紫外分光光度计 595nm 校零。
- 2) 每份蛋白样品需要 498ul 去离子水和 500ul Bradford, 取所需份数需要的量充分混匀。
- 3) 取 998ul Bradford 去离子水溶液于比色皿, 加入 2ul 蛋白样品, 反应 5min 后用紫外分光光度计测量蛋白质吸光度值即 OD<sub>595</sub>, 然后根据已知的标准曲线公式计算蛋白浓度, 单位为 ug/ul。
- 4) 取根据蛋白浓度计算出所需蛋白的体积, 用 1X loading 补齐后加入 5X loading 混匀, 98℃ 煮 5min, 离心后将蛋白保存于 -20℃。

### 1.2.7 Western Blotting 分析

- 1) 制胶：分离胶为 4-12%浓度的 SDS-PAGE 梯度胶，浓缩胶浓度为 5%。
- 2) 上样：将制备好的 SDS-PAGE 在电泳槽上安装好，加入电泳液，拔开梳子，用枪吹打每个胶孔，然后上蛋白样品。
- 3) 电泳：浓缩胶 60V，分离胶 100V 至溴酚蓝指示带刚好跑出凝胶。
- 4) 转膜：用硝酸纤维素（NC）膜 350mA 恒流转膜，转膜时间视蛋白大小及上样量而定。
- 5) 染色：1X 丽春红染色观察转膜效果并根据染色结果裁膜，TBST 洗去丽春红，5min X 3 次，。
- 6) 封闭：将膜放入含有 5%脱脂牛奶的 PBST 中，室温封闭 1h。
- 7) 洗膜：用 TBST 洗涤 3 次，每次 5min。
- 8) 一抗孵育：按抗体说明书推荐的稀释度将抗体稀释到含 2%BSA 的 TBST 中，一抗孵育 4℃过夜。
- 9) 洗膜：用 TBST 洗涤 3 次，每次 5min。
- 10) 二抗孵育：二抗 1:5000 稀释于含 5%脱脂牛奶的 PBST 中，将一抗孵育后的膜加入二抗稀释液，室温孵育 1h。
- 11) 洗膜：用 TBST 洗膜，洗涤 3 次，每次 5min。
- 12) 显影：按 ECL 发光液试剂盒说明书操作，用 X 光片曝光、显影和定影。

### 1.2.8 GST Pull Down Assay

- 1) GST-MERIT40 融合蛋白的表达纯化参照 1.2.4，纯化后的 GST-MERIT40 融合蛋白不洗脱，偶联在 GST 珠子上用于后续的 Pull Down 实验。
- 2) 裂解 G2/M 期的 HeLa 细胞，用真空泵吸尽培养基，用 PBS(室温)洗一次，加入适量细胞裂解液（PBS+1% Triton-100+ Cocktaier），于冰盒放置 30 分钟。
- 3) 吹打收集至 1.5ml 离心管，超声破碎。4℃、13,000rpm 离心 15 分钟，弃沉淀，留上清。
- 4) 取等量偶联 GST-MERIT40 融合蛋白的 GST 珠子和未偶联 GST-MERIT40 融合蛋白的 GST 珠子于两个 1.5ml EP 管，做好标记。
- 5) 取 20ul 蛋白上清做 input，取 2mg 上清加入到上述的两个 EP 管中，用 PBS 补足液体到 1ml 左右，4℃旋转结合 4-6h,使蛋白-蛋白充分结合。
- 6) 500G 离心 1min，PBS+1%Triton-100 洗 3 次，PBS 洗 3 次。
- 7) 加 30ul 2×loading buffer，煮沸 5 分钟，高速离心，。

8) SDS PAGE, Western Blot 检测。用 Tankyrase1 抗体检测。

### 1.2.9 细胞周期同步化

- 1) 铺细胞: 在 100mm 培养皿, 密度约为 30-40%。
- 2) 加入 Thymidine 至终浓度为 2mM。
- 3) 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 培养 19h。
- 4) 用 PBS 洗涤 3 次, 换新鲜细胞培养基培养 9h。
- 5) 更换新鲜培养基, 加入 Thymidine 至终浓度为 2mM, 37°C 培养 16h。
- 6) 用 PBS 洗涤 3 次, 更换新鲜培养基培养, 此时细胞处于 G1 期。
- 7) M 期细胞在释放 4h 后加入 100ng/ml Nocodazole 再培养 10h 收细胞。
- 8) Western Blotting 鉴定分析。

### 1.2.10 lipofetamine2000 转染

- 1) 以 HeLa 细胞在 6 孔板中为例, 转染前一天铺细胞, 密度约为 40-45%, 第二天早上可达到 80-90%即可转染。
- 2) 4ug 质粒+250ul 的无血清培养基(或 Optimen), 配成 A 液。10ul 的 Lipofectamine 2000+250ul 的无血清培养基(或 Optimen), 配成 B 液。放置 5min, A 液和 B 液混匀, 20min。
- 3) 将转染混合物(A 液+B 液)轻加入孔中, 轻轻晃动混匀, 放细胞培养箱。
- 4) 转染后 6h 更换培养基培养, 减少对细胞的毒性。
- 5) 第二天观察培养基颜色, 及时换液。
- 6) 48h 后收集细胞, 进行后续实验。

### 1.2.11 lipofetamine RNAiMAX 转染

- 1) 以 HeLa 细胞在 6 孔板中为例, 转染之前一天铺细胞, 密度约为 15-20%。
- 2) 次日早上, 细胞长到大约 30%密度即可转染。
- 3) 转染混合液: 3ul siRNA+100ul 无血清培养基(或 Optimen)配成 A 液; 6ul lipofetamine RNAiMAX+100ul 配成 B 液。静置 5min。
- 4) A 液和 B 液混合, 20min。
- 5) 将混合液(A 液+B 液)加入 6 孔板中, 轻轻混匀后放入培养箱继续培养。
- 6) 转染后 6h 换液, 次日根据培养基颜色及细胞形态更换培养基。
- 7) 转染 72h 后收集细胞, 进行后续的实验。

## 1. 2. 12 质粒构建

pGEX-6P-3-MERIT40 质粒的构建以 pEYFP-C1-MERIT40 (Roger Greenberg 馈赠) 为模板, 将 MERIT40 亚克隆到 pGEX-6P-3 载体; pcDNA3.1-HA-MERIT40WT 质粒以 pOZ-C-MERIT40 (Roger Greenberg 馈赠) 为载体, 将 MERIT40 亚克隆到 pcDNATM3.1(-) 质粒; pcDNA3.1-HA-MERIT40<sup>R28A/R28P</sup> 用定点突变试剂 (NEB) 盒制备。

## 1.2.12.1 载体/目的基因酶切体系 (100ul)

成分	用量
10X buffer	10ul
DNA	6ug
BSA	1ul
内切酶 1	2.5ul
内切酶 2	2.5ul
ddH2O	补齐至 100ul

在 37°C 下反应 20h, 结束后用琼脂糖凝胶分离结束, Axygen 胶回收试剂盒回收酶切产物。

## 1. 2. 12. 2 连接体系 (10ul)

成分	用量
酶切后的 DNA	DNA、载体, 摩尔比:
酶切后的载体	DNA: 载体=1:1 或 3:1
Ligase complex	3.75ul
ddH2O	补齐至 10ul

室温孵育连接 2h 后转化。

## 1. 2. 12. 3 PCR 反应体系

Components	25 $\mu$ l RXN	FINAL CONC.
Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	12.5ul	1X
10 $\mu$ M Forward Primer	1.25ul	0.5uM
10 $\mu$ M Reverse Primer	1.25ul	0.5uM
Template DNA	1.0ul	1-25ng/ul
Nuclease-free water	9.0ul	-----

Mix reagents completely ,then transfer to a thermocycler.

## 1. 2. 12. 3 PCR 反应条件

STEP	TEMP	TIME
Initial Denaturation	98°C	30s
	98°C	10s
35 Cycles	50-72°C*	10-30s
Final Extension	72°C	20-30s/kb
Hold	4-10°C	-----

\* For a Q5-optimized annealing temperature of mutagenic primers, please use NEBaseChanger™, the online NEB primer design software. For pre-designed, back-to-back primer sets, a  $T_a = T_m + 3$  rule can be applied, but optimization may be necessary.

## 1. 2. 12. 4 KLD (kinase, ligase、KpnI) 处理

Components	Volume	FINAL CONC.
PRC Product	1ul	
2X KLD Reaction Buffer	5ul	1X
10X Enzyme Mix	1ul	1X
Nuclease-free water	3.0ul	-----

Mix well by pipetting up and down and incubate at room temperature for 5 minutes.

## 1. 2. 12. 5 转化及质粒提取

- 1) 将 100ul DH5  $\alpha$  超级感受态细胞取出至于冰上融化后, 加入连接产物混匀。
- 2) 在冰盒上静置 30min, 并提前将水浴锅温度调至 42°C。
- 3) 42°C 水浴热击 90s, 迅速至于冰上 3-5min。
- 4) 向 EP 管中加入 1ml 不含抗生素的 LB 培养基混匀, 37°C, 220rpm 摇床培养 1h, 使感受态细胞恢复生长状态, 表达质粒编码的抗性。
- 5) 取出 200ul 涂板过夜培养 (当转化效率较低时应离心, 加大涂板细菌的量)

- 6) 大约 16h 后琼脂糖凝胶板会长出单克隆菌落、挑克隆、摇菌、质粒提取、测序鉴定。

### 1.2.13 统计学分析

每个实验重复三遍，数据均以平均值±标准差（mean±SD）来表示，应用统计学软件 SPSS16 对实验结果进行分析，两组间比较采用独立样本 t 检验。P<0.05 具有统计学意义，P<0.01 具有显著统计学意义。

## 第 2 章 实验结果

### 1. Tankyrase1 与 MERIT40 相互作用并在纺锤极共定位

Tankyrase 通过 N 端的锚蛋白重复序列招募具有特异基序（通常叫做 RxxPEG “六肽”）蛋白底物<sup>[30, 36, 39, 40]</sup>。Guettler 的研究显示，MERIT40 与 Tankyrase2 相互作用并且 Tankyrase2 可以对其进行微弱的 PAR 修饰，同时根据 Tankyrase1/2 结构和序列预测并验证 MERIT40 也是 Tankyrase 的底物<sup>[38]</sup>。我们在 293T 细胞中瞬时转染带 FLAG 标签的 Tankyrase1 质粒，并 FLAG 免疫共沉淀实验，结果 FLAG-Tankyrase1 免疫共沉淀物中可以检测到 MERIT40 和 BRCC36（图 1）。

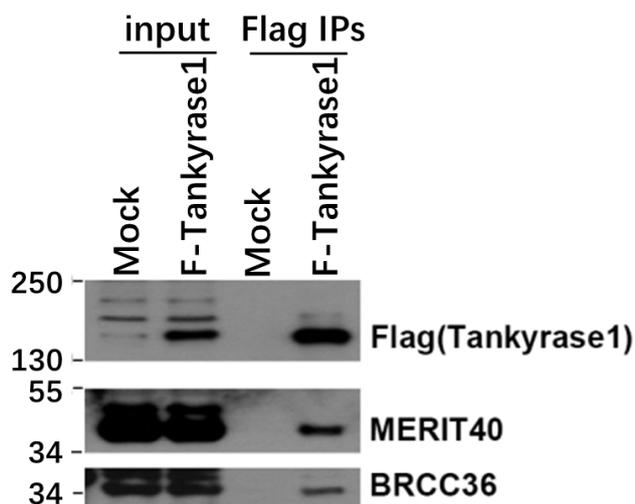


图 1. 免疫共沉淀证明 Tankyrase1 与 MERIT40、BRCC36 之间的相互作用。293T 细胞瞬转 Flag-Tankyrase1 和空载对照。转染 72h 收集细胞并裂解，细胞裂解液用抗 FLAG 琼脂糖凝胶珠子免疫沉淀，洗脱蛋白用 SDS-PAGE 分离，分别用 Flag, MERIT40 和 BRCC36 抗体免疫印迹分析。

为了验证 MERIT40 和 Tankyrase1 是否直接相互作用，我们用在细菌中表达和纯化的 GST 和 GST-MERIT40 重组蛋白（图 2）。

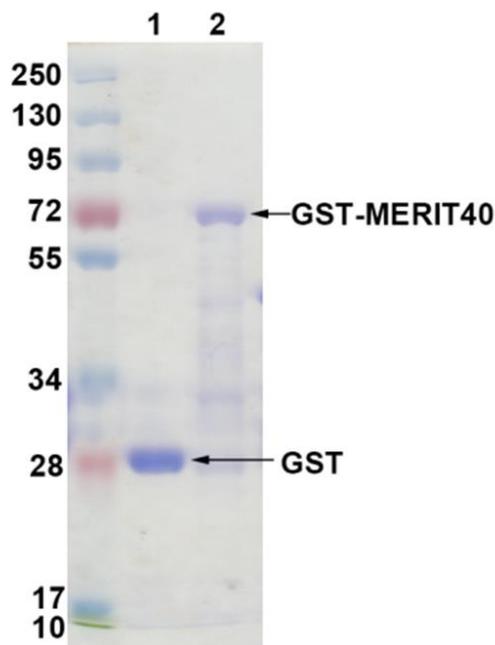


图 2. GST、GST-MERIT40 蛋白纯化效果图。SDS-PAGE 将从原核纯化的 GST、GST-MERIT40 蛋白分开，用考马斯亮蓝染色。（本结果由实验室严考文所做）

接着，用前面纯化的 GST、GST-MERIT40 原核蛋白进行 GST Pull-Down 实验，实验结果显示，内源性的 Tankyrase1 可以被 GST-MERIT40 重组蛋白直接拉下来（图.3）。

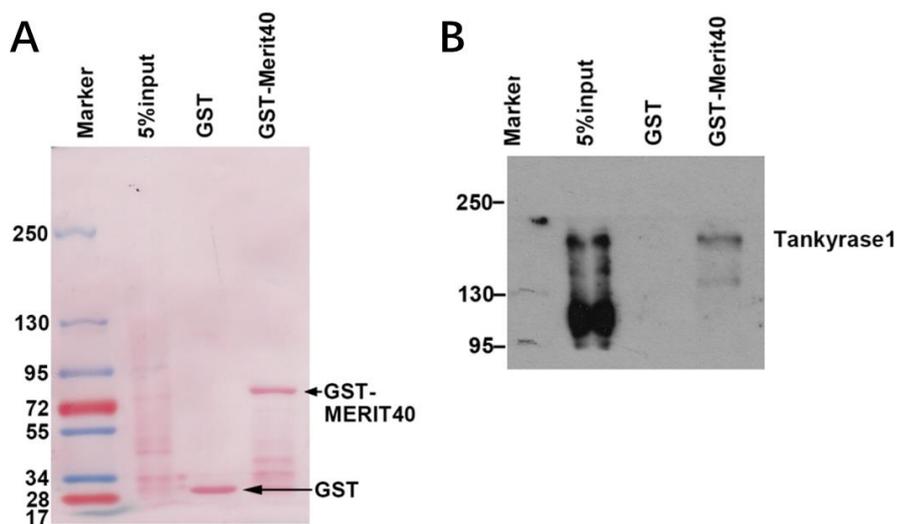


图 3. 在体外，Tankyrase1 直接与 MERIT40 相互作用。用 GST-MERIT40 融合蛋白和 HeLa 有丝分裂裂解液做的 Pull-Down 实验。结合下来的蛋白用丽春红染色（A）和用 Tankyrase1 抗体分析（B）。

这些数据表明 MERIT40 可以与 Tankyrase1 直接相互作用。实验室已发表的研究结

果显示, BRISC 可以与 NuMA 在纺锤极中共定位并通过调节 NuMA 的泛素化水平在纺锤体组装过程中发挥作用<sup>[91]</sup>。而 NuMA 是 Tankyrase1 在有丝分裂过程中作用的底物<sup>[65]</sup>, 并且 Tankyrase1 对 NuMA 的 PAR 修饰有助于有丝分裂纺锤极组装<sup>[59]</sup>。根据 NuMA 和 BRISC 之间的联系, 那么我们猜想 Tankyrase1、MERIT40、BRCC36 可能在纺锤极中共定位。为了验证这个设想, 我们在筛选的 eYFP-MERIT40 稳定细胞系中做了免疫荧光实验, 用 Tankyrase1 染色。结果显示 MERIT40 与 Tankyrase1 在纺锤极中共定位 (图 4)。

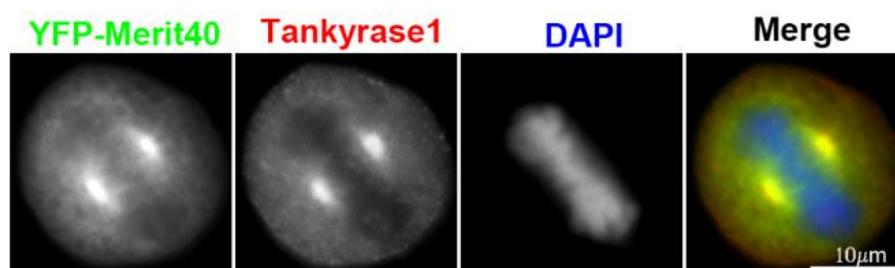


图 4. Tankyrase1 与 eYFP-MERIT40 在纺锤极中共定位。用预冷甲醇固定稳定表达 eYFP-MERIT40 的 HeLa 细胞和 Tankyrase1 抗体染色, DNA 用 DAPI 染色。

## 2. MERIT40 保守基序 RXXPEG 介导 MERIT40-Tankyrase1 相互作用和纺锤极形成

Tankyrase1 可以通过其 N 端的锚定蛋白重复序列 (ankyrin repeat) 靶向蛋白相互作用<sup>[40]</sup>, 在目前确定的 20 多种 Tankyrase 相互作用蛋白中都具有 RXXP/ADG 基序。因此, 我们在人、牛、小家鼠和非洲爪蟾中分析 MERIT40 的同源性发现, MERIT40 含有 Tankyrase 结合基序 RxxPEG (图 2A)。那么 MERIT40 的 RxxPEG 是否负责与 Tankyrase1 呢? 我们用丙氨酸 (A) 或脯氨酸 (P) 取代 MERIT40 在 28 位的精氨酸 (R) 准备了两个定点突变的 MERIT40 突变体, 将 FLAG-Tankyrase1 HA-MERIT40<sup>WT</sup>, HA-MERIT40<sup>R28A</sup> 或 HA-MERIT40<sup>R28P</sup> 瞬时转染 293T 细胞, 收集的细胞裂解液用 anti-FLAG-M2 Agarose 免疫共沉淀并免疫印迹分析。实验结果显示, 转入突变的 HA-MERIT40<sup>R28A</sup> 或 HA-MERIT40<sup>R28P</sup> 显著降低了与 Tankyrase1 的相互作用 (图 5)。这些结果表明 MERIT40 中的 RxxPEG 基序对 MERIT40 与 Tankyrase1 的相互作用非常重要。



图 5. MERIT40 中的 RxxPEG 基序有助于 MERIT40、Tankyrase1 相互作用。(A) MERIT40 中 RxxPEG 基序比对结果；(B) 293T 细胞共转 Flag-Tankyrase1 和 HA-MERIT40<sup>WT</sup> 或 HA-MERIT40<sup>R28A/R28P</sup>，细胞裂解液用抗 FLAG-M2 琼脂糖凝胶珠子免疫沉淀，分别用 FLAG、HA 和 BRCC36 抗体免疫印迹分析。

我们接下来研究了 MERIT40<sup>R28A</sup> 突变体在细胞中定位，结果显示，在 HeLa 细胞中野生型的 MERIT40 (eYFP-MERIT40<sup>WT</sup>) 能够在纺锤极定位，而突变的 MERIT40 (eYFP-MERIT40<sup>R28A</sup>) 不能定位到纺锤极。相反，突变的 MERIT40 分布在整个 HeLa 细胞中 (图 6)。

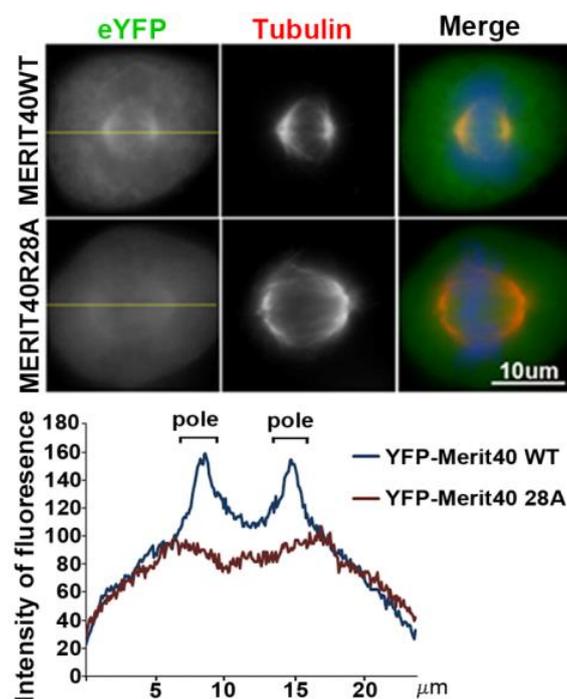


图 6. MERIT40 中 RxxPEG 基序有助于完整的纺锤体组装。免疫荧光分析 eYFP-MERIT40<sup>WT</sup> eYFP-MERIT40<sup>R28A</sup> 在 HeLa 细胞中的定位。

### 3. Tankyrase1 的亚结构域 ARC V 介导 Tankyrase1 与 MERIT40、BRCC36 相互作用

Tankyrase 结构中含有 24 个 ANK 重复序列组成锚蛋白结构域 (ankyrin domain)。锚蛋白结构域由锚蛋白重复序列形成 5 个锚蛋白重复序列簇 (ARCs) 亚结构域构成<sup>[36, 39, 40, 98]</sup>, 可以作为 TRF1 以及其他 Tankyrase 结合蛋白离散的结合位点<sup>[30, 36]</sup>。为了进一步确定 Tankyrase1 与 MERIT40 结合的结构域, 我们构建了带 Flag-HA 标签的 ARCs I、II、III、IV 和 V 质粒 (图 7.A), 并这些质粒转染到 293T 细胞中, 转染 72h 后收集细胞。然后用 anti-FLAG-M2 Agarose 免疫共沉淀, 蛋白洗脱液经 SDS-PAGE 分离后转膜分别用  $\alpha$ -HA、 $\alpha$ -MERIT40 和  $\alpha$ -BRCC36 抗体检测。我们的实验结果显示, 只有 ARC V 可以将 MERIT40 和 BRCC36 拉下来 (图 7.B), 这说明 ARC V 才是主要负责 Tankyrase1 与 MERIT40-BRCC36 相互作用的结构域。

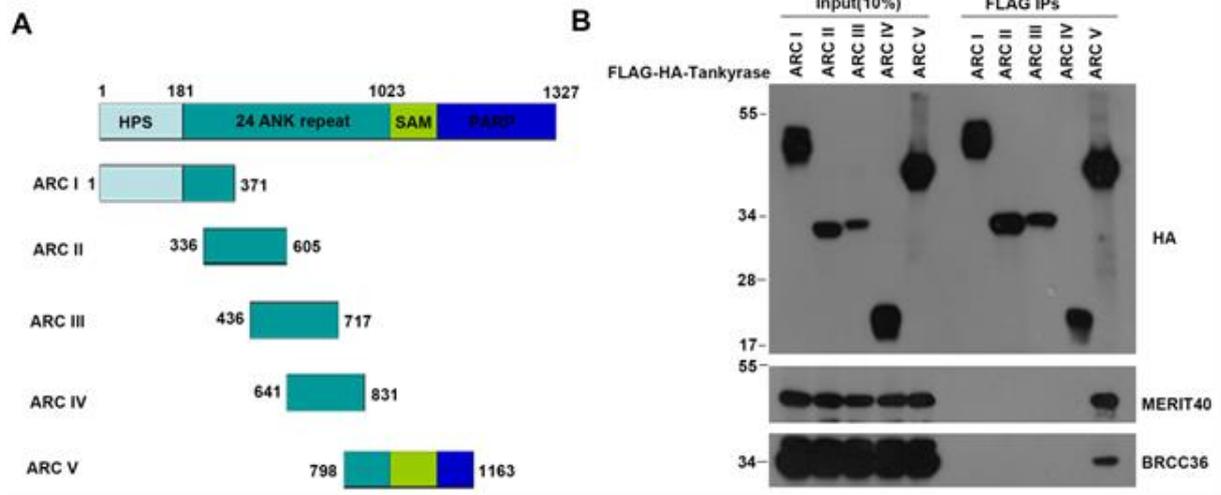


图 7. Tankyrase1 的 ARC V 亚结构域介导 Tankyrase1 与 MERIT40-BRCC36 相互作用。(A) ARC I, II, III, IV, V 片段所在位置示意图；(B)293T 细胞瞬转 FLAG-HA-Tankyrase1 的 ARC I,II,III,IV,V 质粒，细胞裂液用抗 FLAG-M2 琼脂糖凝胶珠子免疫沉淀。用 HA、MERIT40 和 BRCC36 抗体免疫印迹分析。

#### 4. RXXPEG 介导 MERIT40 纺锤极定位和维持完整纺锤体结构

为了进一步探索 MERIT40 中 Tankyrase 结合基序 RxxPEG 在纺锤体组装中的功能，我们将 eYFP-MERIT40<sup>WT</sup> 或 eYFP-MERIT40<sup>R28A</sup> 与靶向于 MERIT40 3'UTR 的 siRNA 或对照 siRNA 共转染，过表达 eYFP-MERIT40 的同时，敲低内源性 MERIT40。Western blotting 分析显示内源性的 MERIT40 几乎被敲低（图 8）。

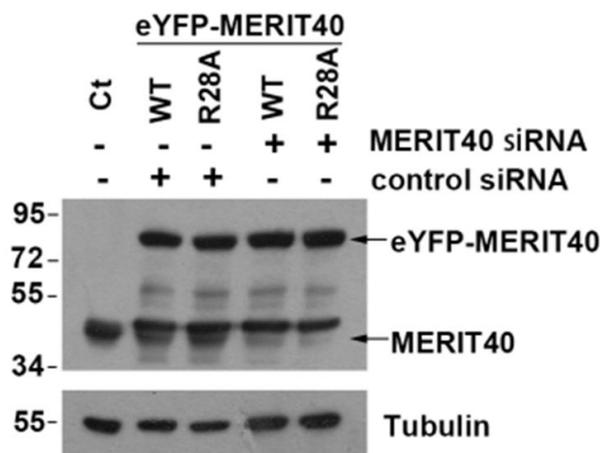


图 8. western blotting 检测 eYFP-MERIT40<sup>WT</sup> 或 eYFP-MERIT40<sup>R28A</sup> 过表达和内源性 MERIT40 敲低效果。

过表达 eYFP-MERIT40<sup>R28A</sup> 并用靶向于 MERIT40 3'UTR 的 siRNA 敲低内源性的 MERIT40 导致有丝分裂纺锤体结构遭到破坏；而在过表达 eYFP-MERIT40<sup>WT</sup> 并用靶向于 MERIT40 3'UTR 的 siRNA 敲低内源性的 MERIT40 时，有丝分裂纺锤体结构则没有受到明显的影响（图 9.A,B）。这结果表明 MERIT40 中 Tankyrase 结合基序 RxxPEG 在维持有丝分裂纺锤体结构中发挥着重要的作用。

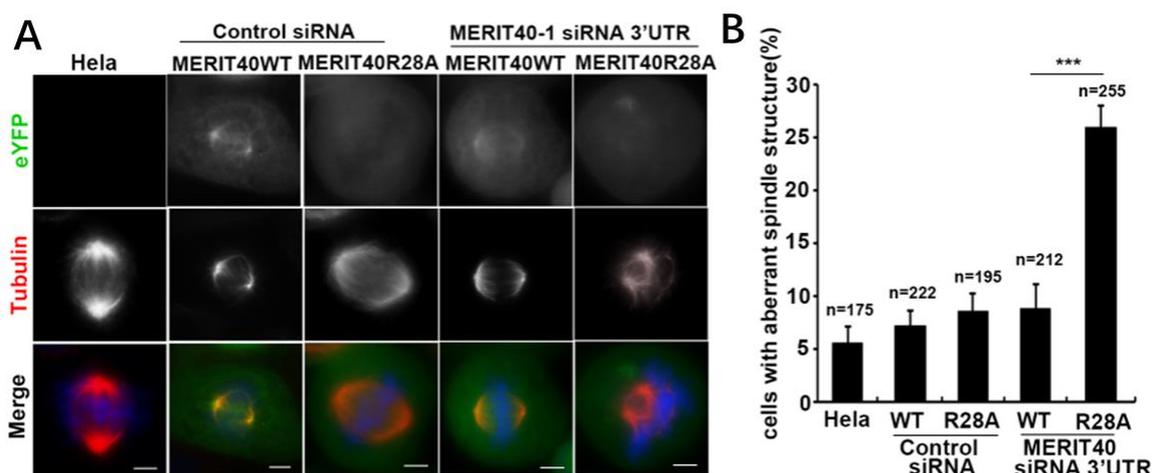


图 9. MERIT40 中的 RxxPEG 基序有助于 MERIT40 在纺锤体定位和维持完整的纺锤体结构。(A)共转对照 siRNA 和 eYFP-MERIT40<sup>WT</sup> 或 eYFP-MERIT40<sup>R28A</sup>、MERIT40 siRNA 和 eYFP-MERIT40<sup>WT</sup> 或 eYFP-MERIT40<sup>R28A</sup> 的 HeLa 细胞的有丝分裂纺锤体结构代表性图片，Bars: 5 $\mu$ m；(B)异常纺锤体结构的细胞百分定量，平均值 $\pm$  s.d.\*\*\*, P < 0.001, Student's t test。

## 5. MERIT40 复合物调控 Tankyrase1 K63 连接泛素化修饰

鉴于 MERIT40 与 Tankyrase1 之间的相互作用在纺锤体组装中的重要性，本文探索了它们之间的相互作用对 Tankyrase1 修饰的影响。研究已经证明，MERIT40 在细胞核和细胞质中分别与 ABRAXAS 和 ABRO1 相互作用，它分别存在于 BRCA1-A 复合物和 BRISC 中<sup>[87, 94, 95]</sup>。MERIT40 是上述两个去泛素化酶复合物的核心亚基，对于复合物的完整性至关重要。MERIT40 复合物具有特异的 K63 连接泛素水解酶活性，可以调节蛋白质底物的 K63 连接泛素修饰水平。我们实验室之前的研究发现，BRISC 可以对纺锤体组装因子 NuMA 进行去泛素化修饰，从而促进双极纺锤体组装。BRISC 的敲低导致大量的多极纺锤体、染色体滞后、双核和多核以及胞质分裂失败<sup>[91]</sup>。

Tankyrase1 对 NuMA 的 PAR 修饰调节有助于纺锤体组装<sup>[59, 65]</sup>。因此，Tankyrase1

自身的修饰对其与目的蛋白的相互作用、其自身 PAR 修饰酶催化活性,以及对纺锤体装来说至关重要。有丝分裂过程中, Plk1 对 Tankyrase1 磷酸化修饰对 Tankyrase1 起到稳定作用,从而提高 Tankyrase1 的催化活性。相反,抑制 Plk1 介导的 Tankyrase1 磷酸化修饰减弱了 Tankyrase1 在纺锤体和端粒的功能<sup>[48]</sup>。研究发现 K63 泛素化连接酶 RNF8 能定位在中心体上,对 SEPT7 进行 K63 泛素化修饰<sup>[99]</sup>。Thomson 等发现在过表达 K63 泛素化连接酶 RNF8 后,胞质分裂异常<sup>[100]</sup>。

基于以下 3 点:(1) K63 连接泛素化修饰在有丝分裂纺锤体组装分子的调控中发挥重要作用;(2) MERIT40 是 K63 连接特异的去泛素化酶;(3) Tankyrase1 与 MERIT40 相互作用,我们推测 Tankyrase1 可能存在 K63 连接泛素化修饰,而 MERIT40 复合物可能通过 RXXPEG 基序与 Tankyrase1 相互作用从而调控其泛素化修饰水平。针对上述假设,我们进行了构建了稳定细胞系 EYFP-MERIT40<sup>WT</sup>-HeLa、EYFP-MERIT40<sup>R28A</sup>-HeLa (图 10),根据稳定细胞系检测结果,选取第 10 号 eYFP-MERIT40<sup>WT</sup>-HeLa 稳定细胞和第 12 号 eYFP-MERIT40<sup>R28A</sup>-HeLa 稳定细胞继续培养。然后在 HeLa 细胞、稳定细胞系 EYFP-MERIT40<sup>WT</sup>-HeLa、EYFP-MERIT40<sup>R28A</sup>-HeLa 中转入对照 (Ctr) 或靶向 3'-UTR 的 MERIT40 siRNA 并作同步化处理,收集 M 期细胞。首先,我们用 MERIT40 抗体检测了内源性 MERIT40 敲低效果,结果显示内源性 MERIT40 基本都被敲低 (图 11.A)。

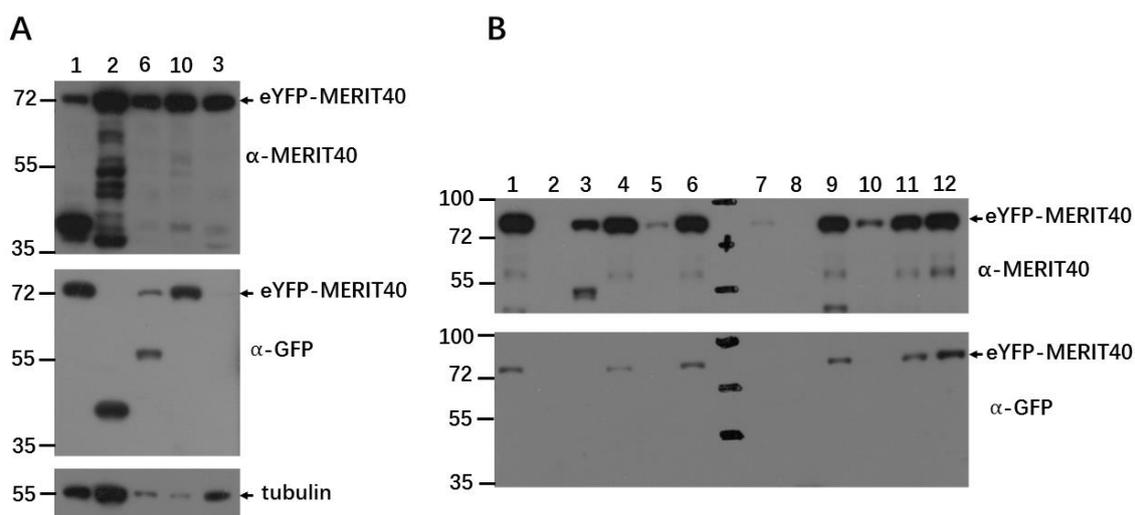


图 10. 稳定细胞系鉴定。(A) 分别用 MERIT40 和 GFP 抗体检测稳定细胞系 EYFP-MERIT40<sup>WT</sup>-HeLa 中 MERIT40 的表达情况;(B) 分别用 MERIT40 和 GFP 抗体检测稳定细胞系 EYFP-MERIT40<sup>R28A</sup>-HeLa 中 MERIT40 的表达情况。

接下来我们取这些细胞裂解液用  $\alpha$ -Tankyrase1 抗体进行免疫共沉淀，分别用  $\alpha$ -Tankyrase1、 $\alpha$ -K63 Ub 抗体检测。结果显示，与敲低内源性 MERIT40 的稳定细胞系 eYFP-MERIT40<sup>WT</sup>-HeLa 相比，敲低内源性 MERIT40 显著增加稳定细胞系 eYFP-MERIT40<sup>R28A</sup>-HeLa 中 Tankyrase1 的 K63 泛素化水平（图 11.B）。这个结果表明 Tankyrase1 在有丝分裂中期受到 K63 连接泛素化修饰，这种泛素化修饰水平可以被 MERIT40 去泛素化酶负性调控。MERIT40 去泛素化酶可能通过调节 K63 泛素化修饰水平调控 Tankyrase1 的 PAR 修饰活性，影响后者对其底物如 NuMA 的 PAR 修饰，从而在有丝分裂纺锤体组装中发挥重要功能。

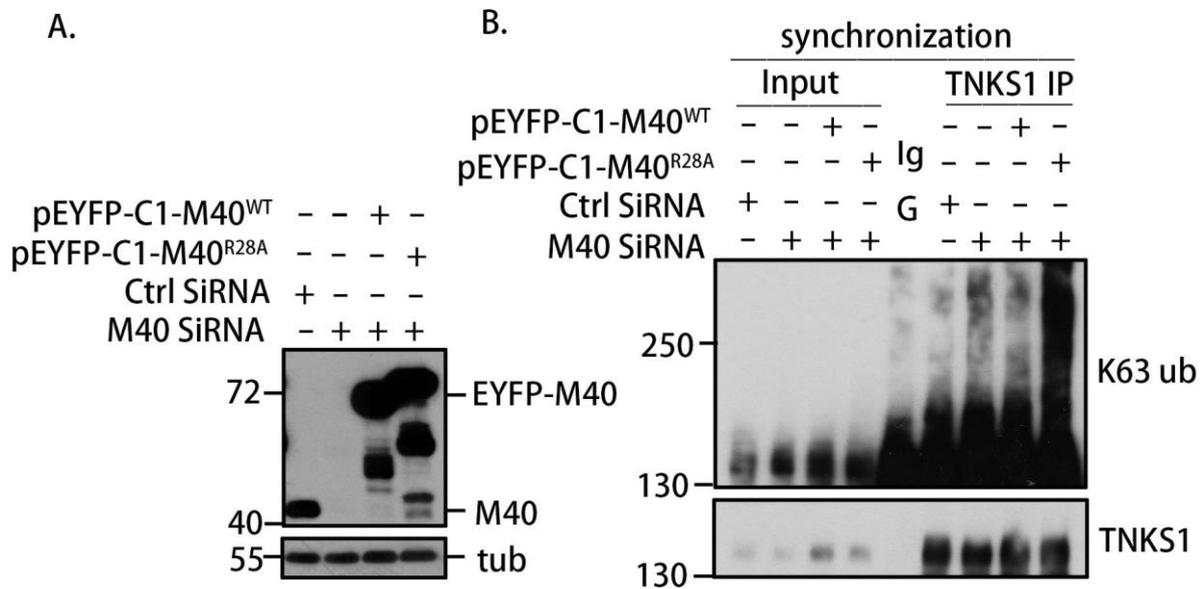


图 11. MERIT40 复合物促进 Tankyrase1 去泛素化修饰。(A) HeLa 细胞转染 Ctrl SiRNA, HeLa、稳定细胞系 EYFP-MERIT40<sup>WT</sup>-HeLa 和稳定细胞系 EYFP-MERIT40<sup>R28A</sup>-HeLa 转染靶向于 MERIT40 3' UTR 的 SiRNA 敲低内源性的 MERIT40, 期间做同步化处理, 转染后 72h 收集 M 期细胞。Western blot 检测内源性 MERIT40 的敲低效果, 检测 tubulin 作为上样内参; (B) 用 M 期的细胞裂解液做 Tankyrase1 免疫共沉淀实验, 用  $\alpha$ -K63 Ub 检测 Tankyrase1 的 K63 泛素化修饰和 Tankyrase1 抗体检测 IP 下来的 Tankyrase1。

### 第 3 章 讨论

细胞分裂是细胞增殖和生命延续的基本活动，高等真核细胞通过有丝分裂的方式完成细胞核的分裂，将带有完全相同遗传物质的两条染色体通过染色体分离的方式分配到两个子代细胞中，从而保证基因组的完整性。这是一个依赖于微管为基础的双极纺锤体的组装和功能的过程。为了保证双极纺锤体的正确组装及其功能，许多蛋白质的翻译后修饰参与这一过程的严密调控，包括磷酸化、泛素化和 PAR 修饰等。

蛋白的泛素化修饰是一种动态可逆、多功能的翻译后修饰，调控着蛋白分子的泛素化水平和功能。在泛素活化酶 E1、泛素结合酶 E2 和泛素连接酶 E3 的依次作用下将泛素分子共价连接到目的蛋白 Lys 位点。依据不同连接方式，多聚泛素化链可分为 K11、K48 和 K63 等不同类型。Lys48 相关链接是细胞内主要的泛素连接方式（通常大于所有连接的 50%），其主要作用是使其靶向的蛋白进入蛋白酶体降解的途径<sup>[73]</sup>。相反，细胞内另一种通过 Lys63 相关的链接类型则发挥许多非蛋白酶体降解的作用<sup>[74]</sup>，比如内吞作用、囊泡转运、NF $\kappa$ B-介导的转录及 DNA 损伤等。

相比以往热衷于对泛素化的研究，近年来大家对去泛素化的研究越来越多。比如，K63 连接特异的去泛素化酶 BRISC 是微管相关蛋白，主要定位在动力纤维（K-fibers）、纺锤极并且直接与微管结合，BRISC 对 NuMA 的去泛素化调节减少 NuMA 与 dynein、importin- $\beta$  的相互作用的时间，促进纺锤体组装<sup>[91]</sup>。

MERIT40 在细胞核中与 ABRAXAS 相互作用，是细胞核 BRCA1-A 复合物的组成成分。MERIT40 能稳定 BRCA1-A 复合物并募集到 DNA 双链断裂部位参与 DNA 损伤修复<sup>[87, 94, 95]</sup>。在细胞质中，MERIT40 与 ABRO1 相互作用，是 K63 连接特异的去泛素化酶 BRISC 的组成亚基<sup>[78, 81, 82, 89]</sup>。最近，全基因组关联研究（genome-wide association study, GWAS）确定了染色体 19p13 作为 BRCA1 突变携带者乳腺癌风险的修饰位点<sup>[101]</sup>。在 Rebbeck 的分析中，最重要的单核苷酸多态性分析（single-nucleotide polymorphisms, SNP）就是位于包含三个基因的区域，它们当中的 *C19orf62* 编码 BRCA1 相互作用蛋白 MERIT40。基因突变引起的 MERIT40 功能或表达的改变可能影响 BRCA1 突变携带者依赖 BRCA1 的 DNA 损伤修复和有丝分裂检查点的活性，从而提高他们发生乳腺癌的风险<sup>[102]</sup>。

Guettler 等的研究证明，MERIT40 是 Tankyrase 结合蛋白并且 Tankyrase2 能对

MERIT40 微弱的 PAR 修饰。实验室前面的研究发现, BRISC 是一个 MAP, 在细胞分裂间期定位于中心体, 在有丝分裂期能特异性地沿着微管分布, 定位在 K-fiber 末端、纺锤体两极和中体 (midbody)。BRISC 能够促进染色体微管组装和微管与动粒结合, 对 NuMA 的去泛素化修饰减少了与 Importin- $\beta$  或者 dynein 相互作用的时间, 促进纺锤体组装<sup>[91]</sup>。对 MERIT40 氨基酸序列分析可知, 在 MERIT40 的 N 端存在两个 TBM<sup>[38]</sup>。我们通过 Flag-Tankyrase1 免疫共沉淀实验也证明了 Tankyrase1 与 MERIT40 之间的相互作用, 同时我们通过免疫荧光发现 Tankyrase1 与 MERIT40 在纺锤极共定位。本实验把 MERIT40 第 28 位即 TBM 第一位的精氨酸 (R) 突变成丙氨酸 (A) 之后发现 Tankyrase1 与 MERIT40 之间的相互作用显著降低, 这与 Guettler 等的研究结果一致, 即 TBM 中的第一位精氨酸 (R) 和第六位甘氨酸 (G) 对蛋白结合非常重要<sup>[38]</sup>。

Tankyrases 的锚蛋白重复序列分为五个锚蛋白重复簇 (ARCs) 结构域, 每个结构域含有 5 个堆积的锚蛋白重复序列<sup>[38]</sup>。ARC I、II、IV 和 V 介导 Tankyrase 与不同蛋白多肽结合。底物蛋白的 TBM(Tankyrase-binding motif)通常含有相同的序列 RxxPDG<sup>[30, 36, 39, 40]</sup>。我们的结果显示, 在 ARCs 的五个亚结构域中, 含有 SAM 结构域的 ARC V 才能与 MERIT40 发生相互作用。在体内, 全长的 Tankyrase1 可以通过 SAM 结构域聚合或与 Tankyrase2 聚合可以形成异质二聚体<sup>[30]</sup>。Tankyrases1 中锚蛋白重复序列可以形成一个可变的结合平台, 负责与靶蛋白结合进而对底物进行 PAR 修饰<sup>[103]</sup>。Tankyrases 寡聚物与 TRF1 相互作用并对 TRF1 修饰表明 SAM 结构域是 Tankyrases 发挥最优催化活性所需的<sup>[37]</sup>。

与野生型的 MERIT40 相比, MERIT40<sup>R28A</sup> 突变体不能有效定位在纺锤极。在敲低内源性 MERIT40 的 eYFP-MERIT40<sup>R28A</sup>-HeLa 细胞中, 纺锤体结构遭到破坏。相反, 在 eYFP-MERIT40<sup>WT</sup>-HeLa 细胞中纺锤体结构依旧保持完整。那么野生型的 MERIT40 是通过什么机制维持完整的纺锤体结构的呢? Jackson 等在酵母上研究发现 K63 泛素化连接酶 RNF8 能定位在中心体上, 对 SEPT7 进行 K63 泛素化修饰<sup>[99]</sup>。Thomson 等发现在过表达 K63 泛素化连接酶 RNF8 后, 胞质分裂异常<sup>[100]</sup>。从前期开始到中期结束, NuMA 与 Tankyrase1 在纺锤极共定位<sup>[65]</sup>, 实验室前面的研究发现 BRISC 与 NuMA 在纺锤极共定位并对 NuMA 进行 K63 去泛素化修饰<sup>[91]</sup>。这提示 Tankyrase1 可能存在 K63 泛素化修饰并且 MERIT40<sup>R28A</sup> 突变体可能改变了 Tankyrase1 K63 连接泛素化水平, 进而影响 Tankyrase1 在纺锤体组装中的功能。本实验通过 Tankyrase1 免疫共沉淀实验发现, 与 eYFP-MERIT40<sup>R28A</sup>-HeLa 稳定细胞系相比, 在 eYFP-MERIT40<sup>WT</sup>-HeLa 稳定细胞系中

Tankyrase1 的 K63 连接泛素化水平显著降低, 表明 Tankyrase1 可以被 K63 连接泛素化所修饰, 且其修饰水平可通过 BRISC 去泛素化酶负性调控。当本实验正研究发现 Tankyrase1 的 K63 连接泛素化及其 MERIT40 对其进行去泛素化修饰, 以及寻找 Tankyrase1 K63 连接泛素化修饰的 E3 连接酶的同时, Tripathi 和 Smith 的研究也发现了与我们类似的结果。他们研究发现泛素 E3 连接酶 RNF8 可以介导 Tankyrase1 K63 多聚泛素化修饰提高 Tankyrase1 稳定性以及 BRISC 去泛素化酶可以去除 Tankyrase1 的 K63 泛素链<sup>[47]</sup>。这些结果表明, RxxPEG 能促进 MERIT40 对 Tankyrase1 去泛素化修饰, 调节 Tankyrase1 泛素化水平。

Tankyrase 在有丝分裂中发挥多种不同的功能: (1) 后期前, Tankyrase 促进姐妹染色体的解离<sup>[54, 104, 105]</sup>; (2) 中期, Tankyrase 与 ATM、BRCA1 和 NuMA 组成复合物, 对 NuMA 进行 PAR 修饰保证双极纺锤体组装<sup>[59, 64, 106]</sup>; (3) 与中心体相关蛋白 (比如 CPAP 和 MIKI) 相互作用, 调节中心体功能, 进而对纺锤体组装进行调控<sup>[57, 61]</sup>。eYFP-MERIT40<sup>R28A</sup>-HeLa 在纺锤体结构出现异常, 可能的解释就是 (1) RXXPEG 突变之后, 突变体 MERIT40<sup>R28A</sup> 与 Tankyrase1 的相互作用被破坏或减弱, 不能对 Tankyrase1 进行去泛素化, 使细胞内 Tankyrase1 的 K63 连接泛素化修饰维持在高水平状态、或导致 Tankyrase1 催化活性增强, 使纺锤体组装因子 NuMA 过度 PAR 修饰, 从而干扰了纺锤体组装因子 NuMA 在纺锤体组装中的正常功能; (2) 细胞内高水平 K63 连接泛素化可能引起 Tankyrase1 催化活性增强, 从而导致中心体蛋白 Miki 过度被 PAR 修饰, 造成 Miki 蛋白水平降低或使中心体相关蛋白 Miki 不能定位到中心体与  $\gamma$ -tubulin 指环复合物的支架蛋白 CG-NAP 结合, 进而减少了星体微管的形成, 影响纺锤体组装; (3) 细胞内高水平的 Tankyrase1 或 Tankyrase1 催化活性增强对中心体蛋白 CPAP 过度 PAR 修饰, 造成 CPAP 蛋白酶体降解, 降低胞内 CPAP 蛋白水平, 阻止中心体复制。这也就是我们后续研究需要进一步探索的工作, 将为我们解释 MERIT40 中 RxxPEG 突变之后纺锤体结构出现异常提供可靠的证据。

## 第 4 章 综述

### DUBs 在有丝分裂中的作用

#### 4.1 泛素化修饰

泛素 (ubiquitin) 是一个含有 76 个氨基酸高度保守的氨基酸多肽<sup>[67]</sup>, 同时泛素本身也有许多可能的翻译后修饰位点。泛素最主要的特征就是含有七个可以被进一步泛素化修饰的赖氨酸 (Lys) 位点。此外, 它还存在第八种链型, 即当泛素分子被连接到第二个泛素分子的 N 端时产生的 Met1 相关或线性的链。蛋白质组学研究表明, 所有可能的连接类型都共存于细胞内<sup>[68-72]</sup>。Lys48 相关链接是细胞内主要的泛素连接方式 (通常大于所有连接的 50%), 其主要作用是使其靶向的蛋白进入蛋白酶体降解的途径<sup>[73]</sup>。而细胞内通过 Lys63 相关的链接类型则发挥许多非蛋白酶体降解的作用<sup>[74]</sup>, 比如内吞作用、囊泡转运、NF $\kappa$ B-介导的转录及 DNA 损伤等。

泛素化修饰 (ubiquitination) 是一种将泛素共价连接到目的蛋白 Lys 位点的翻译后修饰。泛素化修饰需要三种不同的酶依次参与, 分别为泛素活化酶 E1、泛素结合酶 E2 和泛素连接酶 E3。泛素在 ATP 的作用下被泛素活化酶 E1 活化, 然后活化的泛素共价结合到泛素结合酶 E2, 随后在泛素连接酶 E3 的作用下将泛素连接到目的蛋白对目的蛋白进行泛素化修饰<sup>[75-77]</sup>。在 HECT 结构域的 E3 酶 (HECT-domain E3s) 的情况下, 活化的泛素转移到泛素连接酶 E3 先形成共价中间体, 并最终将泛素结合到底物蛋白; 而具有 RING 结构域的 E3 酶 (RING-domain E3s) 本身没有活性, 泛素连接酶 E3 促进泛素通过泛素结合酶 E2 直接结合到底物。也就是说泛素 E3 连接酶通过将目的蛋白招募到泛素结合酶 E2 赋予底物特异性, 因为泛素结合酶 E2 本身不能识别 (或至少很少识别) 指定的蛋白。

泛素化修饰是一个动态可逆的过程, 即通过去泛素化酶 (Deubiquitinating Enzymes, DUBs) 将靶蛋白上的泛素化修饰去除, 从而参与蛋白质泛素化修饰的动态调节。所以 DUBs 在泛素化调控中扮演着与泛素连接酶 E3 同等重要的作用。

人类细胞中含有两种 E1 酶、约 50 种 E2 酶、600 种 E3 酶和 100 种 DUB 酶。根据它们的同源性, DUBs 酶可以分为 5 大类: 泛素羧基末端水解酶家族 (ubiquitin C-terminal hydrolases,UCHs)、卵巢肿瘤结构域蛋白酶 (ovarian tumor domain proteases,OTUs)、泛素特异性蛋白酶家族 (ubiquitin-specific proteases,USPs) 和 JAMM/MPN+蛋白酶家族。

除了作用于大多数泛素化修饰底物的 DUBs 外，还有一些与泛素样分子（ubiquitin like molecules, UBLs）结合的特异性酶，但它们的作用目前还不是十分清楚。DUBs 与包括细胞凋亡，DNA 修复，神经退行性疾病，癌症在内的生理和病理过程密切相关<sup>[107]</sup>。但目前我们只知道它们一些过程中的确切底物和调节机制。在这我们根据 DUBs 在细胞分裂中的功能进行了总结并根据 DUBs 特异地作用于有丝分裂中例子来阐明它们调节的复杂性。

最近，质谱分析表明在人细胞内的泛素化底物蛋白多达 5,000 多种，具有 19,000 个可能的修饰位点。因此，保证这些酶高度的特异性对于 DUBs 家族的酶来说具有很大的进化压力。由于这些酶能特异性识别和结合各种泛素化信号，许多 DUBs 的失活会导致细胞和机体特异的表型。

## 4.2 DUBs 逆转非蛋白水解泛素化信号

**USP44** 纺锤体组装检查点（spindle assembly checkpoint, SAC）保证染色体动粒正确结合到纺锤体微管时有丝分裂才能通过中期，确保染色体和遗传信息精确分配到两个子

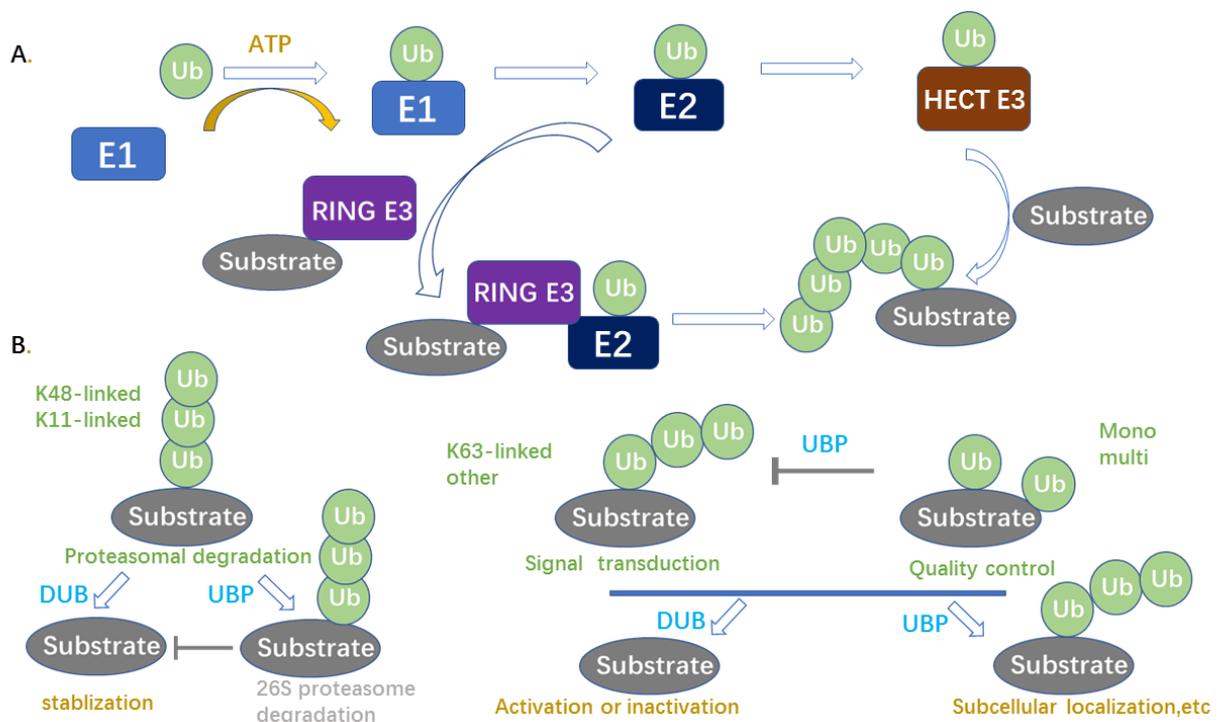


图 2. 泛素化和去泛素化及其作用。(A) E1、E2、E3 泛素连接酶催化的泛素化修饰过程。(B) 细胞中泛素化修饰蛋白的不同去向。

代细胞中。SAC 可以检测动粒和纺锤体微管的结合及姐妹动粒之间由两极结合产生的拉力<sup>[108]</sup>。激活的 SAC 通过由 SAC 效应蛋白 MAD2 和 BubR1、Bub3 及 CDC20 组成的有丝分裂检查点复合物 (mitotic checkpoint complex, MCC)<sup>[109]</sup> 隔离 APC/C 主要的有丝分裂共激活蛋白 CDC20 抑制泛素 E3 连接酶 APC/C 活性<sup>[110, 111]</sup>。MAD2 与 CDC20 结合发生在未连接的动粒上, 但也需要其它调节检查点的成分来保证和加强 SAC 的抑制效应。当所有的动粒都结合好之后, 细胞周期得以从 SAC 的作用中释放出来, 使泛素 E3 连接酶 APC/C 作用于 Securin (姐妹染色体分离的抑制蛋白) 和 Cyclin B 蛋白介导它们的泛素化蛋白水解, 是细胞进入后期和退出有丝分裂。Stegmeier 及其同事<sup>[112]</sup> 致力于确定人细胞中 SAC 新的成分, 筛查了可以使细胞通过由微管药物诱导的有丝分裂检查点阻滞、靶向于泛素信号相关的大约 800 个基因文库。其中一个确定的筛查结果就是去泛素化酶 (DUB) USP44。在实验中, 共转 USP44 的 siRNA 和 siRNA 耐受的野生型 USP44 (但不是催化失活的酶) 可以拯救纺锤体检查点缺陷。此外, 在没处理的细胞中失活的 USP44 会造成后期过早开始和染色体分离缺陷, 表明有效的 SAC 信号和后期开始的时间需要 USP44 去泛素化酶活性。有趣的是, USP44 敲除的细胞中的 SAC 缺陷并不是检查点成分在动粒上的募集缺陷造成的。相反, 是由于这些细胞中 MAD2 与 APC/C<sup>CDC20</sup> 结合受到干扰, 表明 USP44 通过稳定 MAD 与 CDC20 的联系来维持有丝分裂阻滞。更有趣的是, 在其它平行的实验中表明, 依赖 APC/C 的 CDC20 非蛋白水解泛素化主要负责 MAD2-CDC20 复合物分解<sup>[113]</sup>。APC/C 的激活需要由 E2 泛素结合酶 UbcH10 介导的 CDC20 泛素化。与这结果一致的是, Stegmeier 及其同事的研究表明在有丝分裂提取物中, USP44 可以抑制 APC/C 的泛素化活性。因此, 在 USP44 敲除的细胞中, UbcH10 失活导致 CDC20 的泛素化水平降低, 恢复 MAD2-CDC20 的联系并最终拯救有丝分裂检查点阻滞。这些结果表明 USP44 是通过依赖 APC/C 自身的 CDC20 的泛素化拮抗剂。所以, SAC 受到依赖 APC/C 的非蛋白水解泛素化和依赖 USP44 的去泛素化动态平衡的调控。在中期最后阶段, 出现染色体动粒与纺锤体微管没有结合或结合异常时, SAC 通过依赖 USP44 的保障机制激活, 即通过对 CDC20 去泛素化修饰稳定 MAD2-CDC20 复合物的途径激活 SAC 功能。因此, SAC 建立于两条相互拮抗的途径。这两条途径可以快速转换, 检测微管与动粒结合状态。

那么, CDC20 泛素化和去泛素化之间的平衡是如何调节的? 研究证明, 在有丝分裂细胞中 USP44 的蛋白水平达到最高并且在染色体结合到有丝分裂纺锤体时立即下降<sup>[112]</sup>。此外, USP44 在有丝分裂早期被磷酸化并在 SAC 发挥功能和 Cyclin B 降解前立即

去磷酸化。研究证明, RNA 聚合酶 II 碳端结构域磷酸酶 Fcp1 介导 USP44 去磷酸化<sup>[114]</sup>。Fcp1 是一个转录调节因子, 在构巢曲霉 (*aspergillus nidulans*) 中可以拮抗 CDK1 的作用<sup>[115]</sup>。在构巢曲霉同时表达表达缺陷的 Fcp1 等位基因和抗磷酸化抑制的 CDK1 可以诱导严重的有丝分裂缺陷, 包括减弱细胞核分裂。有丝分裂提取物研究表明, USP44 磷酸化状态可以调节 USP44 活性: Fcp1 对 USP44 的去磷酸化修饰降低 USP44 活性, 使 MAD2-CDC20 的联系和有丝分裂退出显著下降。因此, USP44 的磷酸化状态可能控制着 CDC20 的泛素化、去泛素化平衡。

Stegmeier 及其同事提出的有丝分裂检查点调控模式<sup>[112]</sup>, 即通过拮抗的泛素化和去泛素化调控有丝分裂检查点目前正面临着其它研究的挑战<sup>[116]</sup>。其它的研究表明, 在检查点激活的 HeLa 细胞中, CDC20 被 APC/C 泛素化修饰后经蛋白酶体降解。研究证明, 检查点激活时, 酿酒酵母中 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的酵母 CDC20 同源蛋白经泛素化降解<sup>[117]</sup>。此外, CDC20 的赖氨酸突变体可以通过促进有丝分裂退出来促进有丝分裂检查点抑制, 这与 CDC20 泛素化降解维持 SAC 的模式更为一致<sup>[116]</sup>。在检查点阻滞的细胞中表达 CDC20 赖氨酸突变体显示其有丝分裂并不立即退出, 这是由于这些细胞的 SAC 至少有 2h 是处于激活状态的。这表明还需要其它依赖泛素的机制来维持检查点阻滞。Reddy 及其研究团队在检查点阻滞的提取物中加入 UbcH10 和泛素可以观察到部分

表 1. DUBs 在细胞分裂中的作用列表

Name	Family/Domains	Cell cycle	Function	Substrate	Reference
USP13	USP/ZnF-UBP, UBA, USP	G1	together with Ufd1, couples the endoplasmic reticulum stress response to cell cycle control	Skp2	[118]
BAP1	UCH/UCH, coiled coil	G1/S	Promotes cell cycle progression by interacting with HCF-1, a transcriptional cofactor for genes required for S phase	HCF1	[119]
USP1	USP/USP	S	Switches off DNA damage pathways, limits the error-prone replication in absence or presence of extrinsic DNA damage	FANCD2-FANCI, PCNA	[120-123]

USP3	USP/ZnF-UBP, USP	S	Necessary for proper pro-gression through S phase, involved in DNA damage response and prevents replicative stress	H2A (major substrate), H2B	[124]
BRCC36	JAMM/JAMM, coiled coil	DNA damage checkpoint, SA	Allows the turnover of BRCA1-mediated repairin DNA damage response	H2A, H2AX	[80, 87]
OTUB1	OTU/OTU	DNA damage checkpoint	Noncanonical inhibition of DNA damage response (by blocking ubiquitin transfer)	UBC13 (interacting protein)	[125, 126]
USP28	USP/UBA, UIM, USP, coiled coil	DNA damage checkpoint	Regulates the stability of DNA-damage signaling factors, controls stability of c-Myc	Chk2, 53BP1, Claspin, c-Myc	[127, 128]
USP7	USP/MATH, USP, UBL	G1/S and G2/M	Regulates the p53-MDM2 pathway	MDM2, p53	[129, 130]
USP37	USP/UIM, USP	G1/S, G2/M	Promotes the G1/S transition by inhibiting the APC/C-dependent degradation of Cyclin A, re-gulation of un-known substrate necessary for the prevention of mitotic entry	Cyclin A, itself, other unknown substrate	[131, 132]
USP42	USP/USP	G1/S and G2/M	Necessary for early activation of p53 response	p53	[133]
USP2a	USP/USP	G1/S and G2/M	Regulates the p53-MDM2 pathway	MDM2	[134]
CYLD	USP/CAP-Gly domains,USP with B-box	M, G1/S	Regulates mitotic entry, assembly of the mitotic spindle, cytokinesis rate after TPA	PLK1 (?), Bcl3	[135-137]

			treatment, ne-gatively regulates G1/S pro-gression after TPA treatment		
USP16	USP/ZnF-UBP, USP	M	Necessary for M phase progression, associated with reversal of DNA silencing after DNA damage response	H2A	[138, 139]
USP44	USP/ZnF-UBP, USP	M	Regulation of spindle assembly checkpoint (SAC)	CDC20	[112, 113]
USP4	USP/DUSP, UBL, USP	M	Regulation of spindle assembly checkpoint(SAC)	Splicing of $\alpha$ -tubulin and Bub1 mRNA, other mRNAs important for SAC (?)	[140]
USP39	USP/ZnF-UBP, USP(inactive)	M	Regulation of spindle assembly checkpoint(SAC)	Splicing of AuroraB mRNA, other mRNAs im-portant for SAC (?)	[141]
USP9x	USP/UBL, USP	M	Regulation of chromosome alignment and segregation by controlling the dynamic dissociation of Survivin from centromeres	Survivin	[142]
UBPY	USP, MIT, Rhodanese, USP	M	Deubiquitination of proteins (including VAMP8) during cytokinesis	VAMP8, other substrates	[143]
AMSH	JAMM/MPN+,	M	Deubiquitination of proteins	VAMP8, other	[143]

	MIT		(including VAMP8) during cytokinesis	substrates	
--	-----	--	---	------------	--

The table depicts DUBs known to be involved in cell cycle progression at different cell cycle stages (S [S phase], G1, G2, and M [mitosis]) and transitions. The role and regulation of mitotic DUBs are described in detail in the text. The domain composition and specific substrates of the DUBs are depicted. ? Indicates unconfirmed speculation.

CDC20 发生蛋白水解；但是，这种蛋白水解并不调节 MCC 复合物的稳定性。与野生型的 CDC20 相比，CDC20 赖氨酸突变体与检查点蛋白 MAD2 和 BubR1 结合力更强，与 Stegmeier 及其团队的模式一直，即 CDC20 的泛素化可以调节 CDC20 与 MAD2 和 BubR1 的结合。但 Nilsson 和他同事认为，CDC20 赖氨酸突变体与 MAD2、BubR1 之间这种强的相互作用是由于 CDC20 中 MAD2 结合位点的赖氨酸转换成精氨酸提高了它们之间的作用力。原则上来说，这两种机制在维持 SAC 信号上并不冲突并且可以同时存在。CDC20 与 MCC 成分的相互联系可以被 APC/C 泛素化，使 CDC20 与 MCC 分开并可能随后被蛋白酶体降解。在这样情况下，CDC20 可以被两种不同的泛素信号进一步修饰：首先是非蛋白酶体水解然后是蛋白酶体水解。CDC20 的泛素化状态需要 USP44 的作用来校对并且 USP44 可以阻止不正确的泛素链组装。因此，这就需要未来的工作进一步阐明在 SAC 反应的精确时间内 CDC20 上的泛素链类型。有趣的是，在小鼠胚胎细胞中过表达 USP44 提高了 MAD2 与 CDC20 的联系，造成后期延迟，这与 USP44 在 SAC 的调节作用一致<sup>[144]</sup>。

**CYLD** 与确定 USP44 一样，基于 shRNA 的筛查发现另一种去泛素化酶 (DUB)，即作用于有丝分裂早期的调节因子 CYLD<sup>[136]</sup>。肿瘤抑制基因 CYLD 的突变造成人家族圆柱瘤遗传易感性<sup>[145]</sup>。研究表明，CYLD 去泛素化酶负向调节 NF $\kappa$ B, JNK<sup>[146-148]</sup>和 Wnt 信号通路<sup>[149]</sup>。一些体外的研究表明 CYLD 可以特异地切割 K63 连接和线性的泛素链<sup>[150]</sup>。Stegmeier 及其同事的研究中，用紫杉醇处理细胞后，CYLD 可以导致非有丝分裂细胞的聚集。这些具有正常间期细胞核的细胞反映了有丝分裂进入过程的延迟。在这种表型 NF $\kappa$ B 通路中，这种表型不依赖于 CYLD 的调节功能。这种有丝分裂前的阻滞表型可以通过过表达野生型 CYLD 而不是失活的 CYLD 突变体拯救，表明有丝分裂早期的功能需要 CYLD 的去泛素化活性。与这一致的是，CYLD 敲除的细胞可以延迟第十位丝氨酸磷酸化的组蛋白 H3 积累，可以延迟 CDC25C 磷酸化和延迟 Emil 的降解。有趣的是，有丝分裂激酶 Plk1 (Polo-like kinase 1) 的下调会导致相同的表型和延迟 CDC25C

磷酸化及有丝分裂的进入<sup>[151-153]</sup>。蛋白质组学研究确定 Pik1 是 CYLD 的结合蛋白,表明这两个蛋白在有丝分裂早期协同发挥作用。为了给 CYLD 下调的细胞出现有丝分裂进入延迟一个功能解释,作者认为 CYLD 可能作用于前期检查点。前期检查点可以调节进入有丝分裂早期<sup>[154]</sup>和管结构受损造成的染色体浓缩微延迟。E3 泛素连接酶 CHFR (checkpoint with FHA and RING domains) 是这条途径重要的成分<sup>[155-157]</sup>。研究证明, CHFR 与 E2 连接酶异质二聚体 Ubc13-MMS 在体外可以产生 K63 连接的泛素化链<sup>[155]</sup>。因此,可以推断在微管缺陷解决之后为了重启细胞周期进展 CYLD 可以拮抗 CHFR 的活性。事实上,基于非洲爪蟾卵提取物的实验已经提出 Pik1 可以被 CHFR 泛素化修饰并降解以通过有丝分裂应激延迟进入有丝分裂<sup>[157]</sup>。但目前还不清楚 CHFR 在细胞内是否会对 Pik1 泛素化修饰有以及通过哪一种泛素信号途径。CHFR 介导的 K63 泛素化修饰的前期检查点信号未知的成分可能是 CYLD 直接作用的重要底物。因此,这需要接下来的工作证实 CYLD 是否参与前期检查点的调节。

研究证明,稳定表达 CYLD 的 U2OS 细胞导致核碎片和多核细胞增多,反映了染色体分离和/或胞质分裂受损<sup>[136]</sup>。此外,定位分析表明过表达的 CYLD 在间期与微管相关并在末期与中体 (midbody) 相关,表明 CYLD 在有丝分裂中存在其它重要的功能。与这观察结果一致的是, CYLD 除了 USP 结构域外还含有 3 个细胞骨架相关蛋白甘氨酸 (CAP-Gly) 保守的重复序列。CAP-Gly 结构域是一个存在于大量微管相关蛋白 (microtubule associated proteins, MAPs) 中的保守基序,这可以解释 CYLD 的微管定位。实际上, CYLD 通过两个第一的 CAP-Gly 与微管的亚单位微管蛋白 (tubulin) 相互作用,这个过程不依赖于 CYLD 的去泛素化活性<sup>[137, 158]</sup>。这种相互作用使得 CYLD 可以调节微管的动态,因为用诺考达唑 (nocodazole) 处理 CYLD 敲除的 HeLa 细胞后会诱发微管再生变慢<sup>[158]</sup>,和在黑色素瘤细胞过表达 CYLD 会加速微管的生长<sup>[137]</sup>。此外, CYLD 在中体的定位已经在原代小鼠角质形成细胞的内源性蛋白水平得以证实<sup>[137]</sup>。因为许多参与胞质分裂的蛋白定位在中体,所以 CYLD 可能在这个过程中发挥着重要的作用。研究证明, CYLD 与组蛋白去乙酰化酶 HDAC6 共定位于中体,导致 HDAC6 活性抑制和高水平的乙酰化,更稳定的微管。这表明 CYLD 在胞质分裂后期可以参与微管动态调节。然而 CYLD 对微管乙酰化状态的调节不需要其去泛素化活性,目前尚不清楚 CYLD 准确发挥其在中体的功能机制。

然而, CYLD 好像也作用于在有丝分裂纺锤体组装<sup>[135]</sup>。这种功能与 CYLD 和参与中心体成熟和微管成核的中心体蛋白 CEP192 的相互作用相关<sup>[159, 160]</sup>。在 CEP192 敲除

的细胞中，微管在染色体附近组装且不能自己组织形成两极纺锤体。共敲除 CYLD 和 CEP192 可以减轻纺锤体组装缺陷，表明 CYLD 的作用可以被 CEP192 抑制。因为 CYLD 在间期可以调节微管动态，Gomez-Ferreria 及其团队成员提出在有丝分裂开始时 CEP192 可能抑制 CYLD 使微管解聚和/或保持可能的 K63 泛素化介导的相互作用是纺锤体组装所必需的。

总之，CYLD 在有丝分裂早期和有丝分裂退出过程中发挥着重要的作用。目前还需要更多的研究来证明 DUBs 特异和直接作用的底物以及在有丝分裂过程中的调控模式。

**USP39 和 USP4** van Leuken 及其团队在基于 RNAi 的筛查中确定 USP39 为 SAC 另外有一个重要的调节因子。在同步化的 U2OS 细胞中敲低 USP39 导致细胞 DNA 含量增加，反映出染色体分离和/或胞质分裂缺陷。有趣的是，USP39 敲除的细胞可以通过微管稳定药物紫杉醇处理诱导的有丝分裂阻滞，但不是诱导微管解聚的诺考达唑（nocodazole）。与前面提到的一样，SAC 可以被没有结合的动粒和姐妹中心粒之间的拉力不足激活。而紫杉醇可以降低动粒之间的拉力，这表明维持依赖张力的 SAC 分支通路需要 USP39。USP39 是一个分子量为 65KD 的 SR（small ribonuclear）相关蛋白，参与 mRNA 剪接过程<sup>[161]</sup>。van Leuken 及其同事发现，敲除 USP39 会导致有丝分裂激酶 Aurora B 的 mRNA 水平和蛋白水平降低。Aurora B cDNA 异位转染可以修复 USP39 敲除细胞的 Aurora B 蛋白水平，但是不能通过紫杉醇诱发的有丝分裂阻滞。这些现象表明，USP39 作用于 Aurora B mRNA 剪接过程和和其它重要的有丝分裂调节因子的 mRNA，在依赖拉力的有丝分裂检查点中发挥重要的调节作用。Aurora B 激酶是 CPC（chromosomal passenger complex）复合物中的催化成分，CPC 主要组成成分为 Aurora B、INCENP、Survivin、Borealin/Dasra B、和 Telophase-Disc-60 (TD60)。Aurora B 可以改正错误的微管结合，尤其是单向和同向的结合不能在姐妹染色体之间产生足够的拉力<sup>[162-164]</sup>。

USP39 含有泛素蛋白酶结构域，但 DUBs 的半胱氨酸蛋白酶中催化三分子的半胱氨酸和组氨酸残基并不是保守的，研究证明 USP 在体外没有催化活性。尽管 USP39 是催化失活的，但仍可以参与到一条重要的分子途径。实际上，其它研究推测一些 DUBs 以非催化的方式发挥作用。比如，OTUB1 在抑制 DNA 双链断裂中的功能不依赖于它的催化活性<sup>[125]</sup>，酵母 Ubp6 以非催化的方式参与依赖蛋白酶体的降解调节。这些研究显示了 DUBs 失活的可能性，包括之前被预测失活的 USP50 和 USP52-54 发挥非经典的 DUB 功能<sup>[165]</sup>，这可能是这些 DUBs 只是作为泛素结合受体而非加工酶。

另外的研究证明 USP4 在 SAC 信号中的发挥剪接作用。在紫杉醇和单星素 (monastrol, 驱动蛋白 Eg5 抑制剂) 诱发的 SAC 应答中, USP4 是剪接体功能的调节因子<sup>[140]</sup>。下调 USP4 可使这些药物处理后造成的 SAC 作用失效, 细胞中  $\alpha$ -tubulin (微管组成成分) 和 Bub1 (SAC 蛋白) 的 mRNA 水平降低。剪接体的组装过程为: 首先 U1 snRNP 结合到 5'剪接位点; 然后通过 SF1/BBP 和 U2AF 分别识别分支位点和 3'剪接位点<sup>[166]</sup>。U2 snRNP 募集之后形成剪接前体, 然后 U4/U6 和 U5 snRNPs 加到预组装的 U4/U6.U5 tri-snRNP 形成失活复合物。通过释放 U1 和 U4 snRNPs, 剪接作用就开始启动。mRNA 剪接之后, 剪接体分解, 进入另一轮剪接。USP4 和它的靶向因子即 U4/U6 再生因子 Start3 可以对 U4 snRNP 成分 Prp3 去泛素化修饰<sup>[140]</sup>。Prp19 复合物(Nine Teen Complex, NTC) 成员 U box-containing 蛋白 Prp19 介导 Prp3 的泛素化修饰。在酵母中, NTC 通过影响 U4/U6 snRNP 生物合成和在 U4 释放之后稳定 U5 和 U6 snRNPs 在剪接体上的结合参与剪接过程<sup>[167, 168]</sup>。Prp3 的泛素化信号是非蛋白水解途径的, Prp3 上 K63 连接的泛素化链然后被 U5 snRNP 的成分 Prp8 识别。在之前的研究已经证明, Prp8 在体外可以通过不同的 Jab1/MPN 结构域结合泛素<sup>[169]</sup>。这种相互作用是稳定 U4/U6.U5 tri-snRNP 所必需的, 这证明之前的研究即稳定 U4/U6.U5 需要泛素的参与<sup>[170]</sup>。这种工作模式表明在失活的剪接体形成时, Prp3 泛素化作用于 U4/U6.U5 的稳定性调节。U4/U6.U5 trisnRNP 募集到剪接体之后, USP4-Start3 对 Prp3 去泛素化修饰, 促进 U4 snRNP 的释放, 激活剪接机制。为突出剪接在细胞分裂保真性中的作用, Song 及其团队的研究表明, 敲除其它剪接体因子会造成紫杉醇处理过的 HeLa 细胞出现有丝分裂缺陷。有趣的是, 敲除 U4/U6.U5 tri-snRNP 的 SR 相关蛋白 USP39 可以使细胞通过 SAC, 证实了 van Leuken 及其同事的研究结果<sup>[141]</sup>。因此, USP4 和 USP39 对剪接过程的间接作用对有丝分裂的调节非常重要。

这些研究表明, 剪接是一个高度动态的过程并且剪接体是持续构象重排的中心。纵观剪接周期, 不同的 RNAs 和蛋白在精确的时间点组装、分解。因此, 蛋白的泛素化修饰使得剪接体组成过程中高度动态的重排得以调控。在剪接过程中, 可逆的泛素化修饰和特异的泛素受体蛋白结合调节稳定的蛋白复合物和亚复合物。这些研究说明其它动态的细胞过程可能也通过剪接机制的泛素化调节。

有趣的是, USP4 基因属于非小细胞肺癌 (small-cell lung cancer, SCLC) 中高频缺失的染色体区域。此外, SCLC 与 USP4 表达降低<sup>[171]</sup>和倍性变化<sup>[172]</sup>有关。因为 SAC 缺陷通常导致多倍体的增加, USP4 缺失与肿瘤的发生相关。

### 4.3 DUBs 逆转蛋白泛素化水解信号

**USP37** 泛素蛋白酶体系统不可逆的降解赋予细胞周期方向性。E3 泛素连接酶 APC/C 和它的共激活因子 (CDC20 和 CDH1) 调节细胞周期进程通过有丝分裂期和 G1 期<sup>[173]</sup>。在有丝分裂期, CDC20 激活 APC/C, 而 CDH1 在细胞退出有丝分裂和在 G1 期时激活 APC/C。这种序贯激活的方式, 又叫底物顺序使得 APC/C 底物如 Cyclin A、Securin、Cyclin B、Geminin、PLK1 和 Aurora A78 按时间顺序降解<sup>[174]</sup>和确保可靠的细胞周期进程。通过平衡 E3 泛素连接酶的活性, DUBs 参与泛素化底物的降解时间的调节。Huang 和他的团队通过蛋白质组学的方法确定调节 APC/C 底物的 DUBs<sup>[132]</sup>, 有趣的是 USP37 特异地与共活化物 CDH1 相互作用, 但不与 CDC20 相互作用<sup>[132]</sup>。此外, APC/C 亚单位如 CDC27、APC5 和 APC7 都可以被内源性的 USP37 共沉淀下来, 而且敲低 CDH1 可减弱 USP37 与 CDC27 之间的相互作用, 表明 USP37 通过共活化物 CDH1 与 APC/C 结合。在同步化的 U2OS 细胞中过表达 USP37 导致 Cyclin A 蛋白积累, 反映 Cyclin A 的蛋白酶体降解减少。过表达 USP37 的细胞进入 S 期的速度加快。相反, 细胞表达特异的 USPP37 shRNA, 从诺考达唑诱导的有丝分裂阻断释放之后 Cyclin A 的积累和 S 期进入延迟。因此, USP37 可能调节 Cyclin A 的翻转并由此调节 G1/S 期的过渡。此外, Huang 和他的团队证明内源性的 USP37 可以结合 Cyclin A<sup>[132]</sup>, 表明 Cyclin A 是 USP37 的直接底物。与催化失活突变不一样的是, 野生型的 USP37 在细胞中可以降低 Cyclin A 的泛素化修饰并在体外可以平衡的活性<sup>[132]</sup>。这些结果有力地证明 USP37 是 APC/C<sup>CDH1</sup> 介导的 Cyclin A 泛素化的拮抗剂, 使 Cyclin A 蛋白酶体降解得以拯救, 确保 G1/S 期的过渡准确进行。但如何 USP37 的功能以确保时间特异性呢? 通过对 USP37 蛋白水平的分析发现 USP37 的蛋白水平随着细胞周期而变化波动。USP37 的蛋白水平在 G1 期末达到最高水平, 有丝分裂期末开始下降, G1 期末再次达到最高。反映出在 M/G1 过渡时由 APC/C<sup>CDH1</sup> 掌控的、典型的蛋白降解模式。我们知道, APC/C<sup>CDH1</sup> 通过 D-或 KEN-box 识别底物<sup>[175, 176]</sup>。USP37 结构中含有由 APC/C<sup>CDH1</sup> 介导的 K11 泛素化修饰和降解所需的 KEN-box 基序。有趣的是, 在 G1 期末, USP37 可以拯救自己不被降解。因此, 在有丝分裂末期, USP37 作为 APC/C<sup>CDH1</sup> 的底物。在 G1 期末平衡 APC/C<sup>CDH1</sup> 对自身和 Cyclin A 的作用。这些相反的功能受到 CDK2 介导的 USP37 磷酸化调节。研究证明, CyclinE-CDK2 在 G1 期末对 USP37 磷酸化修饰, 使 USP37 激活和拯救自己不被泛素化降解。USP37 同样作用于泛素化的 Cyclin A, Cyclin A 反过来与 CDK2 相互联系进一步

激活 USP37。这种正反馈调节促进 G1/S 过渡。Cyclin A-CDK2 介导的 APC/C<sup>CDH1</sup> 磷酸化抑制 APC/C<sup>CDH1</sup> 的活性进一步激活 USP37<sup>[177]</sup>。在有丝分裂期末,细胞周期蛋白(cyclin)被降解,阻止 USP37 的磷酸化激活。与此同时,激活的 APC/C<sup>CDH1</sup> 负责 USP37 泛素化蛋白水解。Huang 及其团队的研究工作完美地阐明了 DUB 与 E3 泛素连接酶之间的动态相互作用,这对重要的细胞周期调节因子时间上的调控是必需的。最近的蛋白质组学研究发现实际上很多 DUBs 都与 E3 泛素连接酶复合物相互联系<sup>[178]</sup>,表明 USP37 与 APC/C<sup>CDH1</sup> 交叉调控是其它重要生物途径在时空上调控的普遍机制。了解是否存在别的平衡 APC/C 其它底物泛素化的 DUBs 将会是很有意思的工作。比如,一般认定的新的 DUBs 在有丝分裂早期可能作用于 E3 连接酶 SCF 的底物以及有丝分裂进程中基于 CUL3 的 E3 泛素连接酶底物目前还不知道。

最近, Burrows 及其同事研究证明 USP37 在细胞周期进程中受到 SCF <sup>$\beta$ TrCP</sup> 第二波的泛素化降解。一部分 USP37 在 G2/M 过渡时被 E3 泛素连接酶 SCF <sup>$\beta$ TrCP</sup> 降解。这种降解依赖于 Pik1 对 USP37 序列中非经典降解决定子 (degron) 的磷酸化。过表达抗 SCF <sup>$\beta$ TrCP</sup> 的 USP37 突变体导致有丝分裂进入延迟,表明 USP37 池中存在别的调节未知底物的成分,这种底物恰好是有丝分裂进入抑制所需的。但 USP37 池并不调节 Cyclin A<sup>[131]</sup>。因此,确定 USP37 新的底物对于了解 USP37 成分在细胞周期中的作用就显得非常重要。

#### 4.4 UBPs 在有丝分裂中的作用

泛素结合蛋白 (ubiquitin binding proteins, UBPs) 是一个泛素受体 (或解码器) 介导泛素化底物的识别,在它的结构中存在至少 1 个泛素结合结构域 (ubiquitin-binding domain, UBD)。基于它们的结构特征,UBD 可以分为泛素相关结构域 (ubiquitin-associated domain, UBA)、泛素相互作用基序 (ubiquitin-interacting motif, UIM)、与泛素相互作用的基序 (motif interacting with ubiquitin, MIU) 和其它<sup>[179]</sup>。这些 UBDs 共同的结构特征就是以非共价结合的方式与泛素结合。越来越多的实验表明,UBPs 通过介导它们的蛋白酶体降解、调节它们的细胞定位和/或与其它蛋白的相互作用在时空上确定泛素化底物的命运中发挥着重要的作用。最近的研究表明,UBPs 也作用于有丝分裂过程。在酿酒酵母中 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的研究确定 Rad23、Dsk2、Ddi1 和 Rpn10 是有丝分裂调节因子,通过关闭泛素化底物蛋白酶体降解途径调节有丝分裂进程<sup>[180-184]</sup>,而第二组,包括 UBPs 介导其靶向底物涉及 p97 (Cdc48/p97-Ufd1-Npl4) 复合物在哺乳动物细胞的重新定位。研究认为 p97 复合物作用于染色体分离和纺锤体动

态,但对哺乳动物细胞中控制有丝分裂的特异性 DUBs 了解甚少,尤其是 Rad23 途径的功能性同源蛋白。在这,对 UBPs 在控制细胞周期中的作用进行了总结(表 2)。此外,这里将讨论人 p97 复合物在有丝分裂中的作用。

#### 4.5 UBPs 靶向底物经蛋白酶体降解

**Rad23, Dsk2 和 Ddi1** 在酿酒酵母中, Rad23 和 Ddi1 关闭泛素化蛋白进入 26S 蛋白酶体降解<sup>[183]</sup>。这些属于 UBPs 的蛋白具有与泛素和泛素化蛋白相互作用的 UBA 结构域<sup>[185, 186]</sup>。此外, Rad23 和 Ddi1 在 N 末端具有与蛋白酶体相互作用的泛素样结构域(ubiquitin-like domain, UBL)<sup>[187, 188]</sup>。在 PDS1、pds1-128 的温度敏感突变体等位基因抑制物筛查中确定 Rad23 和 Ddi1 基因<sup>[181]</sup>。Pds1(高等有脊椎动物细胞的 securin)是有丝分裂重要的调节因子和后期开始的抑制剂<sup>[189, 190]</sup>。Pds1 的蛋白酶体降解使得 Pds1 对 Separin、Esp1(高等有脊椎动物细胞的 Separase)的抑制作用解除,而 Separin、Esp1 介导结蛋白复合物(cohesin complex)的切割、姐妹染色体分离和后期纺锤体延长确保酵母细胞有丝分裂成功完成<sup>[191]</sup>。后期开始前,APC/C 对 Pds1 去泛素化修饰,导致 Pds1 在后期开始的时候被 26S 蛋白酶体降解<sup>[192]</sup>。有趣的是,共敲除 Rad23 和 Ddi1 基因可以拯救 pds1-128 温度敏感表型,表明这些蛋白在有丝分裂期间可能参与调节 Pds1 蛋白降解<sup>[181]</sup>。此外,后期调控机制在于 Rad23 和 Ddi1 结合泛素化的 Pds1,

抑制 Pds1 泛素链延长和蛋白降解<sup>[181]</sup>。然而,目前仍不清楚 Rad23-Ddi1-Pds1 复合物分解并最终导致 Pds1 蛋白酶体降解的机制。

第三个 UBA-UBL 蛋白即 Dsk2 作用于泛素化底物进入蛋白酶体降解的控制过程<sup>[187, 193]</sup>。过表达 Dsk2 引起泛素化底物积累、有丝分裂阻滞、异常的核定位和影响纺锤体动态,导致细胞毒性<sup>[180, 187]</sup>。以目前的研究结果来看,Dsk2 在纺锤极体(即哺乳动物细胞中的中心体)复制的作用是存在争议的。一些研究认为 Dsk2 与 Rad23 协助 Cdc31 组装到纺锤极体,这对纺锤极体的复制时非常重要的<sup>[180]</sup>。然而,随后的研究发现敲除 Rad23 和/或 Dsk2 以及三敲除 Rad23-Ddi1-Dsk2 并不影响纺锤极体复制<sup>[194]</sup>。研究表明, Rad23、Ddi1 和 Dsk2 在细胞周期进展中发挥部分冗余的作用<sup>[194]</sup>(106)。Rad23-Dsk2 双敲除和 Rad23-Ddi1 双敲除后细胞在 G2/M 期有轻微积累;然而,单敲除这三个基因和双敲除 Ddi1-Dsk2 不表现任何有丝分裂缺陷。此外,三敲除 Rad23-Ddi1-Dsk2 导致严重的 G2 期或后期阻滞。在三敲除 Rad23-Ddi1-Dsk2 细胞株的纺锤体动态也会受到影响;然而这些潜在机制仍不清楚<sup>[194]</sup>。根据这些结果, Rad23 在有丝分裂控制中与 Ddi1 和 Dsk2 发

挥共同的作用，但不清楚如何调控这些蛋白协同完成共同的任務。这种调控可能的层面是 Rad23、Ddi1 和 Dsk2 特异性结合泛素化底物形成同源或异质二聚体<sup>[185, 193]</sup>。UBA 和/或 UBL 结构域对 Rad23 和 Dsk2 同源二聚化及 Rad23 与 Dsk2、Ddi1 异质二聚化非常重要<sup>[183, 185, 195]</sup>。根据其中一种模式，在泛素化底物经过蛋白酶体时，UBA/UBL 蛋白二聚化在阻止不必要的泛素链延长或过早分解发挥着重要的作用：底物的多聚泛素链可能被富含多个 UBA 结构域复合物覆盖，阻止 E3 泛素连接酶和/或去泛素化酶与底物结合<sup>[183]</sup>。然而 UBPs 二聚化的生物作用还实验进一步确定。

研究表明 Ddi1 除了在有丝分裂中的作用之外，还通过与胞外 v-和 t- SNAREs 相互作用参与分泌途径末的负向调节<sup>[195]</sup>。目前尚不清楚 Ddi1 在两个过程中如何协同发挥作用，尤其是刺激是如何调节 Ddi1 在细胞中的定位（在胞膜或胞核），在两个功能之间发挥开关的作用。

总之，这些结果表明 UBA-UBL 蛋白 Rad23、Ddi1 和 Dsk2 在调控有丝分裂进程中的作用。这些蛋白可以抑制泛素化的 Pds1 被蛋白酶体降解，由此延迟后期的开始和影响纺锤体动态。泛素受体的冗余和协作调节复杂的 UBPs 功能。因此，Rad23、Ddi1 和 Dsk2 对有丝分裂调控的确切机制有待进一步阐明。Rad23-Ddi1-Dsk2 蛋白在有丝分裂进程中未知的靶向底物需要今后的实验进一步确定，与此同时，高等有脊椎动物在这条途径中功能同源基因也有待后续的研究来确定。

表 2. 调节细胞周期的 UBPs 列表

Name	Domains	Cell cycle	Function	Substrate	Reference
KPC2	UBL-UBA	G1	Cell proliferation control: degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 (cooperatively with KPC1)	P27	[196, 197]
YEAST RPN10 (Human: PSMD4)	UIM	G1/S M/G1	Proteasome receptor for ubiquitinated substrates, regulates G1/S and M/G1 transition in budding yeast	Clb2, Sic1 (Yeast)	[184, 198]
Polymerase eta	UBZ	S	Translesion synthesis, tolerance of DNA damage by replicative bypass, negative self-regulation of the activity	PCNA, polymerase eta itself	[199-201]

Polymerase kappa	UBZ	S	Translesion synthesis, tolerance of DNA damage by replicative bypass	PCNA	[202, 203]
Polymerase iota	UBZ	S	Translesion synthesis, tolerance of DNA damage by replicative bypass	PCNA	[204, 205]
Polymerase Rev1	UBZ	S	Translesion synthesis, tolerance of DNA damage by replicative bypass	PCNA	[204]
YEAST DDI1/VSM1	UBL (DDI1), UBA-UBL (VSM1)	G1/S G2/M M	Sister chromatid separation, Pds1dependent S-phase checkpoint control, degradation of a SCF component, the F-box protein Ufo1, involved in the G1/S transition, spindle dynamics	(?), Pds1p, Ufo1 (Yeast)	[181, 194, 195, 206]
YEAST: DSK2 (Human: Ubiquilin2, hPLIC1/2)	UBA, UBL	G2/M M	Transfer of the ubiquitylated proteins to the proteasome, spindle pole body duplication, spindle dynamics	(?), Pds1, Kre22 (Yeast)	[180, 181, 194, 207]
YEAST RAD23 (Human: hRAD23A/B)	UBA, UBL	G2/M M	Metaphase-anaphase transition, spindle pole body duplication, G2/M, sister chromatids separation, spindle dynamics	(?), Pds1p (Yeast)	[180, 181, 183, 185]
RAP80	IUM	G2/M	BRCA1-dependent DNA damage response and double-strand break repair	K63 linked ubiquitinated histones H2A and H2AX at DNA lesions sites	[85, 208]
Ufd1	NZF	M	Nucleus reformation, chromosome alignment and segregation	Aurora B Survivin	[142, 209, 210]
Npl4	NZF	M	Nucleus reformation, chromosome alignment and segregation	Aurora B Survivin	[142, 209, 210]

The table depicts UBPs known to be involved in cell cycle progression at different cell cycle stages (S [S phase], G1, G2 and M [mitosis]) and transitions. The role and regulation of mitotic UBPs are described in detail in the text. The predicted human orthologs of these genes are indicated. The domain composition and specific substrates of the UBPs are depicted. ? indicates unconfirmed speculation.

**Rpn10** 在酵母细胞中，Rad23 途径的成分在有丝分裂调控中并不是唯一的 UBPs。Rpn10 在确定关键的有丝分裂因子的命运中发挥着重要的作用。Rpn10 是 26S 蛋白酶体的组成成分。根据预测，Rpn10 是控制泛素化蛋白降解的一种泛素受体<sup>[198, 211]</sup>。Rpn10 含有两个结构域：N 末端的 VWA 结构域（von Willebrand A domain）和 C 末端的 UIM 结构域（ubiquitin-interacting motif domain）。Rpn10 与蛋白酶体相互作用需要 VWA 结构域，UIM 确保 Rpn10 与泛素化底物结合。在这些底物中，Rpn10 控制着细胞周期关键调节因子 Sic1 的翻转和降解<sup>[184, 198]</sup>。在酵母细胞中，Sic1 是 S、G2 及 M 期进程和促进纺锤极体分离所需的 Cdk1/Clb 复合物（哺乳动物细胞中的 CDK/Cyclin）特异的抑制因子<sup>[212, 213]</sup>。Sic1 在有丝分裂末期合成并在 S 期开始时以依赖 Rpn10 的方式降解<sup>[198, 214]</sup>。在有丝分裂后期，Sic1 抑制 Cdk1/Clb2 的活性并被认为是 M/G1 过渡的激活因子，尽管明确的机制有待阐明<sup>[215-218]</sup>。与此同时，一些研究结果表明其它的泛素受体，尤其是 Rad23-Ddi1-Dsk2（和其它的 UBPs）与 Rpn10 在关闭泛素化蛋白进入降解过程中起着相同的作用。敲除酵母细胞的 Rpn10 并不会致死且重组的 Rad23 可以在一定程度上拯救 Rpn10 敲除出现的表型。相反，在黑腹果蝇中敲除 Rpn10 导致黑腹果蝇蛹致死，而且在布氏锥虫中 siRNA 介导的 Rpn10 敲低导致 G2/M 期阻滞<sup>[184, 219, 220]</sup>。因此，Rpn10 与其它 UBPs 的冗余和 Rpn10 不同结构域的确切功能值得深入研究。

#### 4.6 UBPs 调节底物定位

**p97 复合物** Cdc48/p97-Ufd1-Npl4 是进化保守的蛋白复合物，作用于内质网降解（endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD）途径。p97 复合物结合泛素化的蛋白及错误折叠的蛋白经内质网（endoplasmic reticulum, ER）运送到胞质被蛋白酶体降解<sup>[221]</sup>。在这个复合物中，AAA+ ATP 酶 Cdc48/p97（在有脊椎动物中又叫 VCP）与适配蛋白 Ufd1-Npl4 相互作用，Ufd1-Npl4 通过 NZF (Npl4 Zn-F) 结构域与泛素相互作用<sup>[222-224]</sup>。在非洲爪蟾（*Xenopus laevis*）卵提取物中的研究显示，除了在 ER 中的功能，p97 复合物在有丝分裂末期还参与纺锤体的拆卸和核膜关闭。这通过适配蛋白 Ufd1-Npl4

在有丝分裂末期去除染色体上泛素化的 CPC 复合物成分有丝分裂激酶 Aurora B 来实现<sup>[210]</sup>。与这个现象相比,在 HeLa 细胞中 p97 复合物适配蛋白 Ufd1-Npl 在有丝分裂早期拮抗染色体相关激酶 Aurora B 的活性,使细胞通过有丝分裂时出现染色体分离缺陷<sup>[209]</sup>。这些现象与染色体上 Aurora B 及 CPC 复合物中其它可能成分被泛素化修饰和去除 P97 复合物作用的现象一致。但目前还不清楚泛素化的 Aurora B 结合到 p97 复合物的结果以及两者的相互作用的调控。Aurora B 是 APC/C 介导泛素化蛋白水解的底物,但这发生在有丝分裂退出之后的阶段。研究表明, Aurora B 在有丝分裂早期被基于 CUL3 的 E3 泛素连接酶泛素化修饰,与 APC/C 介导的泛素化修饰相比,这种泛素化修饰并不影响 Aurora B 的稳定性而是影响 Aurora B 在有丝分裂纺锤体中的准确定位<sup>[225, 226]</sup>。目前不清楚适配蛋白 Ufd1-Npl4 是否定位在有丝分裂纺锤体或是否会改变泛素化的 CPC 与微管的结合力。需要提到的是,在 HeLa 细胞中的另一个研究表明, Ufd1 反而在有丝分裂过程中可以募集 Aurora B 到染色体<sup>[142]</sup>。此外,还确定了一个推定存在的去泛素化酶 USP9x,参与 CPC 复合物成分 Survivin 的动态调节。利用 siRNA、免疫染色及光脱色恢复技术 (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) 研究发现, USP9x 调节 Survivin 从中心体分离进而调节染色体排列、分离和胞质分裂<sup>[142]</sup>。但是 Survivin 的蛋白水平并不受到 USP9x 下调的影响。研究表明, USP9x 特异性水解 K29 和 K33 连接的多聚泛素化链,进而调控 AMPK 相关的激酶活性。因此, USP9x 在细胞有丝分裂期间精确的亚细胞定位值得深入去研究。

尽管使这些现象一致有明显的难度,但可能的是 CPC 的不同成分通过一些协同的途径调节,包括泛素化修饰、去泛素化酶 USP9x 校对和在 p97 复合物的作用下 CPC 从染色体上分离或尚未确定的微管相关的 UBPs。有趣的是,其它在秀丽隐杆线虫的研究表明,有丝分裂进程中并不需要 p97 复合物<sup>[227, 228]</sup>。总的来说,研究认为 Cdc48/p97-Ufd1-Npl4 复合物作用于有脊椎动物细胞有丝分裂,但是泛素结合适配蛋白 Ufd1-Npl4 在这个过程中确切的功能有待进一步研究。

#### 4.7 结束语和展望

最近在泛素途径的研究揭示了这条信号通路的许多功能及其灵活性。这其中的复杂性不仅反映在众多与底物结合的不同泛素信号,还体现在生理过程中它们的结合发生在精确的时间点及非常特异的细胞定位。通过泛素信号途径中的“解码器”使得这个过程更加复杂,一方面可逆的泛素化像 DUBs,或另一方面,在 UBPs 存在的时候将修饰的

底物转移到下游途径。对于两个大的蛋白家族来说，至少可以分为两大功能组：一种为调节蛋白酶体降解（分别拯救或转移），另一种为非蛋白酶水解泛素信号，调节底物的定位活性和/或蛋白复合物的稳定性（图 1b）。目前尽管对这个网络成分在有丝分裂中作用的了解取得了一定的进展，但 DUBs 和 UBPs 在有丝分裂中的研究还远未完成。因此，确定这个领域中新的关键蛋白将会对我们更好地了解有丝分裂调节原理产生重大影响。同样，在了解这些新“解码器”精确的调节模式也需要投入主要的精力，因为“解码器”的调节确保了与底物结合的特异性。随着成像技术的发展，尤其是特异的泛素荧光传感器使我们能在细胞内看到特异泛素信号的结合，将会使我们在这个领域取得更大的进展。

## 参考文献

- [1] Bakhoun, S.F., et al., *Genome stability is ensured by temporal control of kinetochore-microtubule dynamics*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(1): p. 27-35.
- [2] Clarke, P.R. and C. Zhang, *Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(6): p. 464-77.
- [3] Walczak, C.E., S. Cai, and A. Khodjakov, *Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(2): p. 91-102.
- [4] Brinkley, B.R., I. Ouspenski, and R.P. Zinkowski, *Structure and molecular organization of the centromere-kinetochore complex*. Trends Cell Biol, 1992. **2**(1): p. 15-21.
- [5] Nasmyth, K., J.M. Peters, and F. Uhlmann, *Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids*. Science, 2000. **288**(5470): p. 1379-85.
- [6] Wollman, R., et al., *Efficient chromosome capture requires a bias in the 'search-and-capture' process during mitotic-spindle assembly*. Curr Biol, 2005. **15**(9): p. 828-32.
- [7] Lara-Gonzalez, P., F.G. Westhorpe, and S.S. Taylor, *The spindle assembly checkpoint*. Curr Biol, 2012. **22**(22): p. R966-80.
- [8] Dumont, S. and T.J. Mitchison, *Force and length in the mitotic spindle*. Curr Biol, 2009. **19**(17): p. R749-61.
- [9] Kraus, W.L., *PARPs and ADP-Ribosylation: 50 Years ... and Counting*. Mol Cell, 2015. **58**(6): p. 902-10.
- [10] Bai, P., *Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance*. Mol Cell, 2015. **58**(6): p. 947-58.
- [11] Ame, J.C., C. Spencehauer, and G. de Murcia, *The PARP superfamily*. Bioessays, 2004. **26**(8): p. 882-93.
- [12] Schreiber, V., et al., *Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(7): p. 517-28.
- [13] Weaver, A.N. and E.S. Yang, *Beyond DNA Repair: Additional Functions of PARP-1 in Cancer*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 290.

- [14] Hottiger, M.O., *Snapshot: ADP-Ribosylation Signaling*. Mol Cell, 2015. **58**(6): p. 1134-1134 e1.
- [15] Barkauskaite, E., G. Jankevicius, and I. Ahel, *Structures and Mechanisms of Enzymes Employed in the Synthesis and Degradation of PARP-Dependent Protein ADP-Ribosylation*. Mol Cell, 2015. **58**(6): p. 935-46.
- [16] Hottiger, M.O., et al., *Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(4): p. 208-19.
- [17] Feijs, K.L., et al., *Macrodomain-containing proteins: regulating new intracellular functions of mono(ADP-ribosylation)*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(7): p. 443-51.
- [18] Mashimo, M., J. Kato, and J. Moss, *Structure and function of the ARH family of ADP-ribosyl-acceptor hydrolases*. DNA Repair (Amst), 2014. **23**: p. 88-94.
- [19] Min, W. and Z.Q. Wang, *Poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) and its therapeutic potential*. Front Biosci (Landmark Ed), 2009. **14**: p. 1619-26.
- [20] Bock, F.J., T.T. Todorova, and P. Chang, *RNA Regulation by Poly(ADP-Ribose) Polymerases*. Mol Cell, 2015. **58**(6): p. 959-69.
- [21] Szanto, M., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-2: emerging transcriptional roles of a DNA-repair protein*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(24): p. 4079-92.
- [22] Smeenk, G. and H. van Attikum, *The chromatin response to DNA breaks: leaving a mark on genome integrity*. Annu Rev Biochem, 2013. **82**: p. 55-80.
- [23] D'Amours, D., et al., *Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions*. Biochem J, 1999. **342** ( Pt 2): p. 249-68.
- [24] Bouchard, V.J., M. Rouleau, and G.G. Poirier, *PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage*. Exp Hematol, 2003. **31**(6): p. 446-54.
- [25] Kraus, W.L. and J.T. Lis, *PARP goes transcription*. Cell, 2003. **113**(6): p. 677-83.
- [26] Krishnakumar, R. and W.L. Kraus, *The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets*. Mol Cell, 2010. **39**(1): p. 8-24.
- [27] Bai, P. and C. Canto, *The role of PARP-1 and PARP-2 enzymes in metabolic regulation and disease*. Cell Metab, 2012. **16**(3): p. 290-5.
- [28] Luo, X. and W.L. Kraus, *On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1*. Genes Dev, 2012. **26**(5): p. 417-32.
- [29] Tangutoori, S., P. Baldwin, and S. Sridhar, *PARP inhibitors: A new era of targeted therapy*.

- Maturitas, 2015. **81**(1): p. 5-9.
- [30] Sbodio, J.I. and N.W. Chi, *Identification of a tankyrase-binding motif shared by IRAP, TAB182, and human TRF1 but not mouse TRF1. NuMA contains this RXXPDG motif and is a novel tankyrase partner.* J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 31887-92.
- [31] Kickhoefer, V.A., et al., *The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase.* J Cell Biol, 1999. **146**(5): p. 917-28.
- [32] Smith, S., *The world according to PARP.* Trends Biochem Sci, 2001. **26**(3): p. 174-9.
- [33] Smith, S. and T. de Lange, *Tankyrase promotes telomere elongation in human cells.* Curr Biol, 2000. **10**(20): p. 1299-302.
- [34] Karlberg, T., et al., *Structural basis for the interaction between tankyrase-2 and a potent Wnt-signaling inhibitor.* J Med Chem, 2010. **53**(14): p. 5352-5.
- [35] Lehtio, L., et al., *Zinc binding catalytic domain of human tankyrase 1.* J Mol Biol, 2008. **379**(1): p. 136-45.
- [36] Seimiya, H. and S. Smith, *The telomeric poly(ADP-ribose) polymerase, tankyrase 1, contains multiple binding sites for telomeric repeat binding factor 1 (TRF1) and a novel acceptor, 182-kDa tankyrase-binding protein (TAB182).* J Biol Chem, 2002. **277**(16): p. 14116-26.
- [37] De Rycker, M. and C.M. Price, *Tankyrase polymerization is controlled by its sterile alpha motif and poly(ADP-ribose) polymerase domains.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(22): p. 9802-12.
- [38] Guettler, S., et al., *Structural basis and sequence rules for substrate recognition by Tankyrase explain the basis for cherubism disease.* Cell, 2011. **147**(6): p. 1340-54.
- [39] De Rycker, M., et al., *Vertebrate tankyrase domain structure and sterile alpha motif (SAM)-mediated multimerization.* Biochem J, 2003. **372**(Pt 1): p. 87-96.
- [40] Seimiya, H., et al., *Functional subdomain in the ankyrin domain of tankyrase 1 required for poly(ADP-ribosylation) of TRF1 and telomere elongation.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(5): p. 1944-55.
- [41] Morrone, S., et al., *Crystal structure of a Tankyrase-Axin complex and its implications for Axin turnover and Tankyrase substrate recruitment.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(5): p. 1500-5.
- [42] Bisht, K.K., et al., *GDP-mannose-4,6-dehydratase is a cytosolic partner of tankyrase 1 that inhibits its poly(ADP-ribose) polymerase activity.* Mol Cell Biol, 2012. **32**(15): p. 3044-53.
- [43] Lyakhovich, A., et al., *Fanconi anemia protein FANCD2 inhibits TRF1 polyADP-ribosylation through tankyrase1-dependent manner.* Genome Integr, 2011. **2**(1): p. 4.

- [44] Callow, M.G., et al., *Ubiquitin ligase RNF146 regulates tankyrase and Axin to promote Wnt signaling*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22595.
- [45] Zhang, Y., et al., *RNF146 is a poly(ADP-ribose)-directed E3 ligase that regulates axin degradation and Wnt signalling*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(5): p. 623-9.
- [46] Huang, S.M., et al., *Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling*. Nature, 2009. **461**(7264): p. 614-20.
- [47] Tripathi, E. and S. Smith, *Cell cycle-regulated ubiquitination of tankyrase 1 by RNF8 and ABRO1/BRCC36 controls the timing of sister telomere resolution*. EMBO J, 2017. **36**(4): p. 503-519.
- [48] Ha, G.H., et al., *Tankyrase-1 function at telomeres and during mitosis is regulated by Polo-like kinase-1-mediated phosphorylation*. Cell Death Differ, 2012. **19**(2): p. 321-32.
- [49] Yeh, T.Y., J.I. Sbodio, and N.W. Chi, *Mitotic phosphorylation of tankyrase, a PARP that promotes spindle assembly, by GSK3*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **350**(3): p. 574-9.
- [50] Chi, N.W. and H.F. Lodish, *Tankyrase is a golgi-associated mitogen-activated protein kinase substrate that interacts with IRAP in GLUT4 vesicles*. J Biol Chem, 2000. **275**(49): p. 38437-44.
- [51] Guo, H.L., et al., *The Axin/TNKS complex interacts with KIF3A and is required for insulin-stimulated GLUT4 translocation*. Cell Res, 2012. **22**(8): p. 1246-57.
- [52] Cockman, M.E., et al., *Proteomics-based identification of novel factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) substrates indicates widespread asparaginyl hydroxylation of ankyrin repeat domain-containing proteins*. Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(3): p. 535-46.
- [53] Yang, M., et al., *Factor-inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) catalyses the post-translational hydroxylation of histidinyl residues within ankyrin repeat domains*. FEBS J, 2011. **278**(7): p. 1086-97.
- [54] Kim, M.K. and S. Smith, *Persistent telomere cohesion triggers a prolonged anaphase*. Mol Biol Cell, 2014. **25**(1): p. 30-40.
- [55] Smith, S., et al., *Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres*. Science, 1998. **282**(5393): p. 1484-7.
- [56] Smith, S. and T. de Lange, *Cell cycle dependent localization of the telomeric PARP, tankyrase, to nuclear pore complexes and centrosomes*. J Cell Sci, 1999. **112** ( Pt 21): p. 3649-56.
- [57] Ozaki, Y., et al., *Poly-ADP ribosylation of Miki by tankyrase-1 promotes centrosome maturation*.

- Mol Cell, 2012. **47**(5): p. 694-706.
- [58] Yeh, T.Y., et al., *Tankyrase recruitment to the lateral membrane in polarized epithelial cells: regulation by cell-cell contact and protein poly(ADP-ribosylation)*. Biochem J, 2006. **399**(3): p. 415-25.
- [59] Chang, P., M. Coughlin, and T.J. Mitchison, *Interaction between Poly(ADP-ribose) and NuMA contributes to mitotic spindle pole assembly*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(21): p. 4575-85.
- [60] Hsiao, S.J. and S. Smith, *Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond*. Biochimie, 2008. **90**(1): p. 83-92.
- [61] Kim, M.K., C. Dudoignon, and S. Smith, *Tankyrase 1 regulates centrosome function by controlling CPAP stability*. EMBO Rep, 2012. **13**(8): p. 724-32.
- [62] Lan, J., et al., *The 68-kDa telomeric repeat binding factor 1 (TRF1)-associated protein (TAP68) interacts with and recruits TRF1 to the spindle pole during mitosis*. J Biol Chem, 2014. **289**(20): p. 14145-56.
- [63] Boehler, C., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(7): p. 2783-8.
- [64] Chang, P., M. Coughlin, and T.J. Mitchison, *Tankyrase-1 polymerization of poly(ADP-ribose) is required for spindle structure and function*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(11): p. 1133-9.
- [65] Chang, W., J.N. Dynek, and S. Smith, *NuMA is a major acceptor of poly(ADP-ribosylation) by tankyrase 1 in mitosis*. Biochem J, 2005. **391**(Pt 2): p. 177-84.
- [66] Korzeniewski, N., M. Hohenfellner, and S. Duensing, *The centrosome as potential target for cancer therapy and prevention*. Expert Opin Ther Targets, 2013. **17**(1): p. 43-52.
- [67] Pickart, C.M. and M.J. Eddins, *Ubiquitin: structures, functions, mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1695**(1-3): p. 55-72.
- [68] Dammer, E.B., et al., *Polyubiquitin linkage profiles in three models of proteolytic stress suggest the etiology of Alzheimer disease*. J Biol Chem, 2011. **286**(12): p. 10457-65.
- [69] Kim, W., et al., *Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome*. Mol Cell, 2011. **44**(2): p. 325-40.
- [70] Wagner, S.A., et al., *A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(10): p. M111 013284.
- [71] Xu, P., et al., *Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in*

- proteasomal degradation*. Cell, 2009. **137**(1): p. 133-45.
- [72] Ziv, I., et al., *A perturbed ubiquitin landscape distinguishes between ubiquitin in trafficking and in proteolysis*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(5): p. M111 009753.
- [73] Hershko, A. and A. Ciechanover, *The ubiquitin system*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 425-79.
- [74] Chen, Z.J. and L.J. Sun, *Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling*. Mol Cell, 2009. **33**(3): p. 275-86.
- [75] Amerik, A.Y. and M. Hochstrasser, *Mechanism and function of deubiquitinating enzymes*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1695**(1-3): p. 189-207.
- [76] Ciechanover, A., et al., *ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(3): p. 1365-8.
- [77] Ciechanover, A., et al., *Degradation of the tumor suppressor protein p53 by the ubiquitin-mediated proteolytic system requires a novel species of ubiquitin-carrier protein, E2*. J Biol Chem, 1994. **269**(13): p. 9582-9.
- [78] Cooper, E.M., et al., *K63-specific deubiquitination by two JAMM/MPN+ complexes: BRISC-associated Brcc36 and proteasomal Poh1*. EMBO J, 2009. **28**(6): p. 621-31.
- [79] Dong, S., et al., *Essential role for the dimerization domain of NuMA-RARalpha in its oncogenic activities and localization to NuMA sites within the nucleus*. Oncogene, 2003. **22**(6): p. 858-68.
- [80] Sobhian, B., et al., *RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites*. Science, 2007. **316**(5828): p. 1198-202.
- [81] Feng, L., J. Wang, and J. Chen, *The Lys63-specific deubiquitinating enzyme BRCC36 is regulated by two scaffold proteins localizing in different subcellular compartments*. J Biol Chem, 2010. **285**(40): p. 30982-8.
- [82] Patterson-Fortin, J., et al., *Differential regulation of JAMM domain deubiquitinating enzyme activity within the RAP80 complex*. J Biol Chem, 2010. **285**(40): p. 30971-81.
- [83] Wang, B., et al., *Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response*. Science, 2007. **316**(5828): p. 1194-8.
- [84] Dong, Y., et al., *Regulation of BRCC, a holoenzyme complex containing BRCA1 and BRCA2, by a signalosome-like subunit and its role in DNA repair*. Mol Cell, 2003. **12**(5): p. 1087-99.
- [85] Kim, H., J. Chen, and X. Yu, *Ubiquitin-binding protein RAP80 mediates BRCA1-dependent DNA damage response*. Science, 2007. **316**(5828): p. 1202-5.

- [86] Kim, H., J. Huang, and J. Chen, *CCDC98 is a BRCA1-BRCT domain-binding protein involved in the DNA damage response*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(8): p. 710-5.
- [87] Shao, G., et al., *The Rap80-BRCC36 de-ubiquitinating enzyme complex antagonizes RNF8-Ubc13-dependent ubiquitination events at DNA double strand breaks*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(9): p. 3166-71.
- [88] Wang, B. and S.J. Elledge, *Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brcal/Brcc36 complex in response to DNA damage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(52): p. 20759-63.
- [89] Hu, X., et al., *NBA1/MERIT40 and BRE interaction is required for the integrity of two distinct deubiquitinating enzyme BRCC36-containing complexes*. J Biol Chem, 2011. **286**(13): p. 11734-45.
- [90] Zheng, H., et al., *A BRISC-SHMT complex deubiquitinates IFNAR1 and regulates interferon responses*. Cell Rep, 2013. **5**(1): p. 180-93.
- [91] Yan, K., et al., *The deubiquitinating enzyme complex BRISC is required for proper mitotic spindle assembly in mammalian cells*. J Cell Biol, 2015. **210**(2): p. 209-24.
- [92] Zhang, J., et al., *ABRO1 suppresses tumorigenesis and regulates the DNA damage response by stabilizing p53*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5059.
- [93] Brown, K.K., et al., *MERIT40 Is an Akt Substrate that Promotes Resolution of DNA Damage Induced by Chemotherapy*. Cell Rep, 2015. **11**(9): p. 1358-66.
- [94] Feng, L., J. Huang, and J. Chen, *MERIT40 facilitates BRCA1 localization and DNA damage repair*. Genes Dev, 2009. **23**(6): p. 719-28.
- [95] Wang, B., et al., *NBA1, a new player in the Brca1 A complex, is required for DNA damage resistance and checkpoint control*. Genes Dev, 2009. **23**(6): p. 729-39.
- [96] Py, B.F., et al., *Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity*. Mol Cell, 2013. **49**(2): p. 331-8.
- [97] Chi, W., et al., *Mitochondrial DNA oxidation induces imbalanced activity of NLRP3/NLRP6 inflammasomes by activation of caspase-8 and BRCC36 in dry eye*. J Autoimmun, 2017.
- [98] Sbodio, J.I., H.F. Lodish, and N.W. Chi, *Tankyrase-2 oligomerizes with tankyrase-1 and binds to both TRF1 (telomere-repeat-binding factor 1) and IRAP (insulin-responsive aminopeptidase)*. Biochem J, 2002. **361**(Pt 3): p. 451-9.

- [99] Gibson, B.A. and W.L. Kraus, *New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(7): p. 411-24.
- [100] Plans, V., M. Guerra-Rebollo, and T.M. Thomson, *Regulation of mitotic exit by the RNF8 ubiquitin ligase*. Oncogene, 2008. **27**(10): p. 1355-65.
- [101] Antoniou, A.C., et al., *A locus on 19p13 modifies risk of breast cancer in BRCA1 mutation carriers and is associated with hormone receptor-negative breast cancer in the general population*. Nat Genet, 2010. **42**(10): p. 885-92.
- [102] Rebbeck, T.R., et al., *Modification of BRCA1-Associated Breast and Ovarian Cancer Risk by BRCA1-Interacting Genes*. Cancer Res, 2011. **71**(17): p. 5792-805.
- [103] Eisemann, T., et al., *Tankyrase-1 Ankyrin Repeats Form an Adaptable Binding Platform for Targets of ADP-Ribose Modification*. Structure, 2016. **24**(10): p. 1679-1692.
- [104] Hsiao, S.J. and S. Smith, *Sister telomeres rendered dysfunctional by persistent cohesion are fused by NHEJ*. J Cell Biol, 2009. **184**(4): p. 515-26.
- [105] Dynek, J.N. and S. Smith, *Resolution of sister telomere association is required for progression through mitosis*. Science, 2004. **304**(5667): p. 97-100.
- [106] Palazzo, L., et al., *ATM controls proper mitotic spindle structure*. Cell Cycle, 2014. **13**(7): p. 1091-100.
- [107] Hay, R.T., *SUMO-specific proteases: a twist in the tail*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(8): p. 370-6.
- [108] Musacchio, A. and E.D. Salmon, *The spindle-assembly checkpoint in space and time*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(5): p. 379-93.
- [109] Sudakin, V., G.K. Chan, and T.J. Yen, *Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2*. J Cell Biol, 2001. **154**(5): p. 925-36.
- [110] Hwang, L.H., et al., *Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint*. Science, 1998. **279**(5353): p. 1041-4.
- [111] Kim, S.H., et al., *Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint*. Science, 1998. **279**(5353): p. 1045-7.
- [112] Stegmeier, F., et al., *Anaphase initiation is regulated by antagonistic ubiquitination and deubiquitination activities*. Nature, 2007. **446**(7138): p. 876-81.
- [113] Reddy, S.K., et al., *Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint*

- inactivation*. Nature, 2007. **446**(7138): p. 921-5.
- [114] Visconti, R., et al., *Fcp1-dependent dephosphorylation is required for M-phase-promoting factor inactivation at mitosis exit*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 894.
- [115] Son, S. and S.A. Osmani, *Analysis of all protein phosphatase genes in Aspergillus nidulans identifies a new mitotic regulator, fcp1*. Eukaryot Cell, 2009. **8**(4): p. 573-85.
- [116] Nilsson, J., et al., *The APC/C maintains the spindle assembly checkpoint by targeting Cdc20 for destruction*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(12): p. 1411-20.
- [117] Pan, J. and R.H. Chen, *Spindle checkpoint regulates Cdc20p stability in Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev, 2004. **18**(12): p. 1439-51.
- [118] Chen, M., G.J. Gutierrez, and Z.A. Ronai, *Ubiquitin-recognition protein Ufd1 couples the endoplasmic reticulum (ER) stress response to cell cycle control*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(22): p. 9119-24.
- [119] Eletr, Z.M. and K.D. Wilkinson, *An emerging model for BAP1's role in regulating cell cycle progression*. Cell Biochem Biophys, 2011. **60**(1-2): p. 3-11.
- [120] Huang, T.T., et al., *Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(4): p. 339-47.
- [121] Nijman, S.M., et al., *The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway*. Mol Cell, 2005. **17**(3): p. 331-9.
- [122] Oestergaard, V.H., et al., *Deubiquitination of FANCD2 is required for DNA crosslink repair*. Mol Cell, 2007. **28**(5): p. 798-809.
- [123] Smogorzewska, A., et al., *Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair*. Cell, 2007. **129**(2): p. 289-301.
- [124] Nicassio, F., et al., *Human USP3 is a chromatin modifier required for S phase progression and genome stability*. Curr Biol, 2007. **17**(22): p. 1972-7.
- [125] Nakada, S., et al., *Non-canonical inhibition of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB1*. Nature, 2010. **466**(7309): p. 941-6.
- [126] Sato, Y., et al., *Molecular basis of Lys-63-linked polyubiquitination inhibition by the interaction between human deubiquitinating enzyme OTUB1 and ubiquitin-conjugating enzyme UBC13*. J Biol Chem, 2012. **287**(31): p. 25860-8.
- [127] Popov, N., et al., *The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability*. Nat Cell

- Biol, 2007. **9**(7): p. 765-74.
- [128] Zhang, D., et al., *A role for the deubiquitinating enzyme USP28 in control of the DNA-damage response*. Cell, 2006. **126**(3): p. 529-42.
- [129] Li, M., et al., *A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway*. Mol Cell, 2004. **13**(6): p. 879-86.
- [130] Li, M., et al., *Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization*. Nature, 2002. **416**(6881): p. 648-53.
- [131] Burrows, A.C., J. Prokop, and M.K. Summers, *Skp1-Cul1-F-box ubiquitin ligase (SCF(betaTrCP))-mediated destruction of the ubiquitin-specific protease USP37 during G2-phase promotes mitotic entry*. J Biol Chem, 2012. **287**(46): p. 39021-9.
- [132] Huang, X., et al., *Deubiquitinase USP37 is activated by CDK2 to antagonize APC(CDH1) and promote S phase entry*. Mol Cell, 2011. **42**(4): p. 511-23.
- [133] Hock, A.K., et al., *Regulation of p53 stability and function by the deubiquitinating enzyme USP42*. EMBO J, 2011. **30**(24): p. 4921-30.
- [134] Stevenson, L.F., et al., *The deubiquitinating enzyme USP2a regulates the p53 pathway by targeting Mdm2*. EMBO J, 2007. **26**(4): p. 976-86.
- [135] Gomez-Ferreria, M.A., et al., *CEP192 interacts physically and functionally with the K63-deubiquitinase CYLD to promote mitotic spindle assembly*. Cell Cycle, 2012. **11**(19): p. 3555-8.
- [136] Stegmeier, F., et al., *The tumor suppressor CYLD regulates entry into mitosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(21): p. 8869-74.
- [137] Wickstrom, S.A., et al., *CYLD negatively regulates cell-cycle progression by inactivating HDAC6 and increasing the levels of acetylated tubulin*. EMBO J, 2010. **29**(1): p. 131-44.
- [138] Joo, H.Y., et al., *Regulation of cell cycle progression and gene expression by H2A deubiquitination*. Nature, 2007. **449**(7165): p. 1068-72.
- [139] Shanbhag, N.M., et al., *ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks*. Cell, 2010. **141**(6): p. 970-81.
- [140] Song, E.J., et al., *The Prp19 complex and the Usp4Sart3 deubiquitinating enzyme control reversible ubiquitination at the spliceosome*. Genes Dev, 2010. **24**(13): p. 1434-47.
- [141] van Leuken, R.J., et al., *Usp39 is essential for mitotic spindle checkpoint integrity and controls*

- mRNA-levels of aurora B*. Cell Cycle, 2008. **7**(17): p. 2710-9.
- [142] Vong, Q.P., et al., *Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin*. Science, 2005. **310**(5753): p. 1499-504.
- [143] Mukai, A., et al., *Dynamic regulation of ubiquitylation and deubiquitylation at the central spindle during cytokinesis*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 8): p. 1325-33.
- [144] Zhang, Y., J. van Deursen, and P.J. Galardy, *Overexpression of ubiquitin specific protease 44 (USP44) induces chromosomal instability and is frequently observed in human T-cell leukemia*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23389.
- [145] Bignell, G.R., et al., *Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene*. Nat Genet, 2000. **25**(2): p. 160-5.
- [146] Brummelkamp, T.R., et al., *Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB*. Nature, 2003. **424**(6950): p. 797-801.
- [147] Kovalenko, A., et al., *The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination*. Nature, 2003. **424**(6950): p. 801-5.
- [148] Trompouki, E., et al., *CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members*. Nature, 2003. **424**(6950): p. 793-6.
- [149] Tauriello, D.V., et al., *Loss of the tumor suppressor CYLD enhances Wnt/beta-catenin signaling through K63-linked ubiquitination of Dvl*. Mol Cell, 2010. **37**(5): p. 607-19.
- [150] Komander, D., et al., *Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains*. EMBO Rep, 2009. **10**(5): p. 466-73.
- [151] Cogswell, J.P., et al., *Dominant-negative polo-like kinase 1 induces mitotic catastrophe independent of cdc25C function*. Cell Growth Differ, 2000. **11**(12): p. 615-23.
- [152] Qian, Y.W., et al., *The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in Xenopus oocytes*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(6): p. 1791-9.
- [153] Sumara, I., et al., *Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles*. Curr Biol, 2004. **14**(19): p. 1712-22.
- [154] Scolnick, D.M. and T.D. Halazonetis, *Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase*. Nature, 2000. **406**(6794): p. 430-5.
- [155] Bothos, J., et al., *The Chfr mitotic checkpoint protein functions with Ubc13-Mms2 to form Lys63-linked polyubiquitin chains*. Oncogene, 2003. **22**(46): p. 7101-7.

- [156] Chaturvedi, P., et al., *Chfr regulates a mitotic stress pathway through its RING-finger domain with ubiquitin ligase activity*. *Cancer Res*, 2002. **62**(6): p. 1797-801.
- [157] Kang, D., et al., *The checkpoint protein Chfr is a ligase that ubiquitinates Plk1 and inhibits Cdc2 at the G2 to M transition*. *J Cell Biol*, 2002. **156**(2): p. 249-59.
- [158] Gao, J., et al., *The tumor suppressor CYLD regulates microtubule dynamics and plays a role in cell migration*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(14): p. 8802-9.
- [159] Gomez-Ferreria, M.A., et al., *Human Cep192 is required for mitotic centrosome and spindle assembly*. *Curr Biol*, 2007. **17**(22): p. 1960-6.
- [160] Zhu, F., et al., *The mammalian SPD-2 ortholog Cep192 regulates centrosome biogenesis*. *Curr Biol*, 2008. **18**(2): p. 136-41.
- [161] Makarova, O.V., E.M. Makarov, and R. Luhrmann, *The 65 and 110 kDa SR-related proteins of the U4/U6.U5 tri-snRNP are essential for the assembly of mature spliceosomes*. *EMBO J*, 2001. **20**(10): p. 2553-63.
- [162] Hauf, S., et al., *The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint*. *J Cell Biol*, 2003. **161**(2): p. 281-94.
- [163] Lampson, M.A., et al., *Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division*. *Nat Cell Biol*, 2004. **6**(3): p. 232-7.
- [164] Tanaka, T.U., et al., *Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections*. *Cell*, 2002. **108**(3): p. 317-29.
- [165] Quesada, V., et al., *Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **314**(1): p. 54-62.
- [166] Wahl, M.C., C.L. Will, and R. Luhrmann, *The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine*. *Cell*, 2009. **136**(4): p. 701-18.
- [167] Chan, S.P., et al., *The Prp19p-associated complex in spliceosome activation*. *Science*, 2003. **302**(5643): p. 279-82.
- [168] Chen, C.H., et al., *Functional links between the Prp19-associated complex, U4/U6 biogenesis, and spliceosome recycling*. *RNA*, 2006. **12**(5): p. 765-74.
- [169] Bellare, P., et al., *Ubiquitin binding by a variant Jab1/MPN domain in the essential pre-mRNA*

- splicing factor Prp8p*. RNA, 2006. **12**(2): p. 292-302.
- [170] Bellare, P., et al., *A role for ubiquitin in the spliceosome assembly pathway*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(5): p. 444-51.
- [171] Frederick, A., M. Rolfe, and M.I. Chiu, *The human UNP locus at 3p21.31 encodes two tissue-selective, cytoplasmic isoforms with deubiquitinating activity that have reduced expression in small cell lung carcinoma cell lines*. Oncogene, 1998. **16**(2): p. 153-65.
- [172] Hann, C.L. and C.M. Rudin, *Fast, hungry and unstable: finding the Achilles' heel of small-cell lung cancer*. Trends Mol Med, 2007. **13**(4): p. 150-7.
- [173] Peters, J.M., *The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(9): p. 644-56.
- [174] Rape, M., S.K. Reddy, and M.W. Kirschner, *The processivity of multiubiquitination by the APC determines the order of substrate degradation*. Cell, 2006. **124**(1): p. 89-103.
- [175] Glotzer, M., A.W. Murray, and M.W. Kirschner, *Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway*. Nature, 1991. **349**(6305): p. 132-8.
- [176] Pflieger, C.M. and M.W. Kirschner, *The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1*. Genes Dev, 2000. **14**(6): p. 655-65.
- [177] Lukas, C., et al., *Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex*. Nature, 1999. **401**(6755): p. 815-8.
- [178] Sowa, M.E., et al., *Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape*. Cell, 2009. **138**(2): p. 389-403.
- [179] Rahighi, S. and I. Dikic, *Selectivity of the ubiquitin-binding modules*. FEBS Lett, 2012. **586**(17): p. 2705-10.
- [180] Biggins, S., I. Ivanovska, and M.D. Rose, *Yeast ubiquitin-like genes are involved in duplication of the microtubule organizing center*. J Cell Biol, 1996. **133**(6): p. 1331-46.
- [181] Clarke, D.J., et al., *Dosage suppressors of pds1 implicate ubiquitin-associated domains in checkpoint control*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(6): p. 1997-2007.
- [182] Elsasser, S., et al., *Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 26817-22.
- [183] Kang, Y., et al., *UBL/UBA ubiquitin receptor proteins bind a common tetraubiquitin chain*. J Mol Biol, 2006. **356**(4): p. 1027-35.

- [184] Verma, R., et al., *Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system*. Cell, 2004. **118**(1): p. 99-110.
- [185] Bertolaet, B.L., et al., *UBA domains mediate protein-protein interactions between two DNA damage-inducible proteins*. J Mol Biol, 2001. **313**(5): p. 955-63.
- [186] Chen, L., et al., *Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly*. EMBO Rep, 2001. **2**(10): p. 933-8.
- [187] Funakoshi, M., et al., *Budding yeast Dsk2p is a polyubiquitin-binding protein that can interact with the proteasome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 745-50.
- [188] Lambertson, D., L. Chen, and K. Madura, *Investigating the importance of proteasome-interaction for Rad23 function*. Curr Genet, 2003. **42**(4): p. 199-208.
- [189] Hilioti, Z., et al., *The anaphase inhibitor Pds1 binds to the APC/C-associated protein Cdc20 in a destruction box-dependent manner*. Curr Biol, 2001. **11**(17): p. 1347-52.
- [190] Salah, S.M. and K. Nasmyth, *Destruction of the securin Pds1p occurs at the onset of anaphase during both meiotic divisions in yeast*. Chromosoma, 2000. **109**(1-2): p. 27-34.
- [191] Ciosk, R., et al., *An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast*. Cell, 1998. **93**(6): p. 1067-76.
- [192] Cohen-Fix, O., et al., *Anaphase initiation in Saccharomyces cerevisiae is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p*. Genes Dev, 1996. **10**(24): p. 3081-93.
- [193] Rao, H. and A. Sastry, *Recognition of specific ubiquitin conjugates is important for the proteolytic functions of the ubiquitin-associated domain proteins Dsk2 and Rad23*. J Biol Chem, 2002. **277**(14): p. 11691-5.
- [194] Diaz-Martinez, L.A., et al., *Yeast UBL-UBA proteins have partially redundant functions in cell cycle control*. Cell Div, 2006. **1**: p. 28.
- [195] Gabriely, G., et al., *Different domains of the UBL-UBA ubiquitin receptor, Ddi1/Vsm1, are involved in its multiple cellular roles*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(9): p. 3625-37.
- [196] Hara, T., et al., *Role of the UBL-UBA protein KPC2 in degradation of p27 at G1 phase of the cell cycle*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(21): p. 9292-303.
- [197] Kamura, T., et al., *Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(12): p. 1229-35.

- [198] Mayor, T., et al., *Analysis of polyubiquitin conjugates reveals that the Rpn10 substrate receptor contributes to the turnover of multiple proteasome targets*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(6): p. 741-51.
- [199] Bienko, M., et al., *Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis*. Science, 2005. **310**(5755): p. 1821-4.
- [200] Bienko, M., et al., *Regulation of translesion synthesis DNA polymerase eta by monoubiquitination*. Mol Cell, 2010. **37**(3): p. 396-407.
- [201] Guzzo, C.M., et al., *RNF4-dependent hybrid SUMO-ubiquitin chains are signals for RAP80 and thereby mediate the recruitment of BRCA1 to sites of DNA damage*. Sci Signal, 2012. **5**(253): p. ra88.
- [202] Guo, C., et al., *Requirements for the interaction of mouse Polkappa with ubiquitin and its biological significance*. J Biol Chem, 2008. **283**(8): p. 4658-64.
- [203] Williams, H.L., M.E. Gottesman, and J. Gautier, *Replication-independent repair of DNA interstrand crosslinks*. Mol Cell, 2012. **47**(1): p. 140-7.
- [204] Bomar, M.G., et al., *Unconventional ubiquitin recognition by the ubiquitin-binding motif within the Y family DNA polymerases iota and Rev1*. Mol Cell, 2010. **37**(3): p. 408-17.
- [205] Plosky, B.S., et al., *Controlling the subcellular localization of DNA polymerases iota and eta via interactions with ubiquitin*. EMBO J, 2006. **25**(12): p. 2847-55.
- [206] Bertolaet, B.L., et al., *UBA domains of DNA damage-inducible proteins interact with ubiquitin*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(5): p. 417-22.
- [207] Liu, C., et al., *A genome-wide synthetic dosage lethality screen reveals multiple pathways that require the functioning of ubiquitin-binding proteins Rad23 and Dsk2*. BMC Biol, 2009. **7**: p. 75.
- [208] Yan, J., et al., *The ubiquitin-interacting motif containing protein RAP80 interacts with BRCA1 and functions in DNA damage repair response*. Cancer Res, 2007. **67**(14): p. 6647-56.
- [209] Dobrynin, G., et al., *Cdc48/p97-Ufd1-Npl4 antagonizes Aurora B during chromosome segregation in HeLa cells*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 9): p. 1571-80.
- [210] Ramadan, K., et al., *Cdc48/p97 promotes reformation of the nucleus by extracting the kinase Aurora B from chromatin*. Nature, 2007. **450**(7173): p. 1258-62.
- [211] Deveraux, Q., et al., *A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates*. J Biol Chem, 1994. **269**(10): p. 7059-61.

- [212] Barberis, M., et al., *Sic1 plays a role in timing and oscillatory behaviour of B-type cyclins*. Biotechnol Adv, 2012. **30**(1): p. 108-30.
- [213] Chee, M.K. and S.B. Haase, *B-cyclin/CDKs regulate mitotic spindle assembly by phosphorylating kinesins-5 in budding yeast*. PLoS Genet, 2010. **6**(5): p. e1000935.
- [214] Verma, R., et al., *Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase*. Science, 1997. **278**(5337): p. 455-60.
- [215] Calzada, A., et al., *Cdc6 cooperates with Sic1 and Hct1 to inactivate mitotic cyclin-dependent kinases*. Nature, 2001. **412**(6844): p. 355-8.
- [216] Donovan, J.D., et al., *P40SDB25, a putative CDK inhibitor, has a role in the M/G1 transition in Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev, 1994. **8**(14): p. 1640-53.
- [217] Lengronne, A. and E. Schwob, *The yeast CDK inhibitor Sic1 prevents genomic instability by promoting replication origin licensing in late G(1)*. Mol Cell, 2002. **9**(5): p. 1067-78.
- [218] Tripodi, F., et al., *In CK2 inactivated cells the cyclin dependent kinase inhibitor Sic1 is involved in cell-cycle arrest before the onset of S phase*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **359**(4): p. 921-7.
- [219] Li, Z. and C.C. Wang, *Functional characterization of the 11 non-ATPase subunit proteins in the trypanosome 19 S proteasomal regulatory complex*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42686-93.
- [220] Szlanka, T., et al., *Deletion of proteasomal subunit S5a/Rpn10/p54 causes lethality, multiple mitotic defects and overexpression of proteasomal genes in Drosophila melanogaster*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 6): p. 1023-33.
- [221] Ye, Y., *Diverse functions with a common regulator: ubiquitin takes command of an AAA ATPase*. J Struct Biol, 2006. **156**(1): p. 29-40.
- [222] Kondo, H., et al., *p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion*. Nature, 1997. **388**(6637): p. 75-8.
- [223] Meyer, H.H., et al., *A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways*. EMBO J, 2000. **19**(10): p. 2181-92.
- [224] Schubert, C. and A. Buchberger, *UBX domain proteins: major regulators of the AAA ATPase Cdc48/p97*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(15): p. 2360-71.
- [225] Sumara, I. and M. Peter, *A Cul3-based E3 ligase regulates mitosis and is required to maintain the spindle assembly checkpoint in human cells*. Cell Cycle, 2007. **6**(24): p. 3004-10.

- [226] Maerki, S., et al., *The Cul3-KLHL21 E3 ubiquitin ligase targets aurora B to midzone microtubules in anaphase and is required for cytokinesis*. J Cell Biol, 2009. **187**(6): p. 791-800.
- [227] Heallen, T.R., et al., *An Afg2/Spaf-related Cdc48-like AAA ATPase regulates the stability and activity of the C. elegans Aurora B kinase AIR-2*. Dev Cell, 2008. **15**(4): p. 603-16.
- [228] Mouysset, J., et al., *Cell cycle progression requires the CDC-48/UFD-1/NPL-4 complex for efficient DNA replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(35): p. 12879-84.

## 致 谢

三年的硕士生活就要结束了，在毕业论文即将完成之际，感激所有关心、帮助、支持我的老师、家人、同学和朋友。

感谢我的导师姜文奇教授以及我的指导老师郑多教授、邵根泽教授的悉心指导和教育，在他们科学严谨和耐心指导下完成了实验设计、实施、数据统计及论文的撰写，逐渐养成了科学严谨的科研思维方式，掌握了基本的分子生物学和细胞生物学技术，具备了一定的独立思考和解决问题的能力。他们对科学严谨求精的态度，对学生无私的关怀和忘我的敬业精神，不断激励鞭策着我，驱我向前！

感谢北京大学医学部基础医学院细胞系李莉副教授，李莉副教授在我平时的实验和科研提供技术指导和生活上的帮助及建议。

感谢北京大学医学部基础医学院细胞系林明老师和深圳大学医学部郑多教授课题组助理胡跃明师兄在我的实验过程中及时订购试剂和耗材，为我的学习提供良好的条件。

感谢深圳大学医学部郑多教授课题组肖田老师、徐亚菲老师以及朱江博士、韩荣飞博士、曹婷博士和王洪钟博士在我实验上给予的意见和帮助。

感谢北京大学医学部基础医学院邵根泽教授课题组严考文师兄在本实验中的前期的大量探索工作和帮助，感谢匡静宇、刘菲、曹丽师姐以及张莹、常芬、许永杰、张婷、李琴一路走来的帮助关心。

感谢深圳大学医学部郑多教授课题组何世平、杜杰师兄在我初到实验室时在实验上的指导和生活中的关心，感谢陈文聪同学和黄静瑛、黄冠群、李帅虎师弟师妹们在研究生工作和生活中的帮助和支持。

衷心感谢我的家人和朋友对我默默的关怀和支持，二十年的求学征程，有他们的艰辛付出与相伴，才会有我的不断进步！

最后，感谢曾经热心教导和帮助过我的所有老师、同学和朋友！衷心的感谢为评阅本论文付出宝贵时间和辛勤劳动的专家和教授！