

周期蛋白 Cyc2 的过量表达及突变抑制嗜热四膜虫有性生殖发育

许 静^{1),2)}*, 郭玉凤²⁾, 王 伟²⁾

(¹⁾ 山西大学生命科学学院生物工程系, 太原 030006;

²⁾ 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西大学生物技术研究所, 太原 030006)

摘要 周期蛋白在细胞增殖过程中呈现周期性表达变化, 不同的周期蛋白通过结合周期蛋白激酶 (cyclin-dependent kinase, CDKs) 及靶向特定蛋白质参与细胞有丝分裂和减数分裂过程的精确调控。嗜热四膜虫有性生殖期特异表达的 B3 型周期蛋白 Cyc2 (cyclin 2, Cyc2) 对减数分裂的启始是必需的, 但 Cyc2 蛋白的分子调控机制并不清楚。本研究通过 0.1 μg/mL 和 0.3 μg/mL 镉离子诱导突变细胞株 OE-CYC2-B2086 和 OE-CYC2-CU428 中 CYC2 基因在金属硫蛋白 1 基因 (metallothionein gene 1, MTT1) 启动子调控下上调表达。实时荧光定量 PCR 检测突变株 OE-CYC2-B2086 和 OE-CYC2-CU428 中 CYC2 的转录水平分别上调 7.8 倍和 9.8 倍。细胞有性生殖发育进程的荧光显微观察发现 CYC2 的表达上调并不影响有性生殖前期减数分裂的启始, 但是干扰四膜虫有性生殖后期中新大核和新小核的正确形成。同时突变株 OE-CYC2-B2086 和 OE-CYC2-CU428 交配后, 在镉离子诱导下不能产生有性生殖后代, 但是该突变株分别和两种不同野生型细胞或 CYC2 敲除的突变细胞株交配能够恢复产生 3%, 15% 或 32% 的有性生殖后代, 有性生殖发育异常程度与 CYC2 的表达水平成正相关。进一步突变 Cyc2 第 312 位磷酸化位点丝氨酸为丙氨酸, 获得 CYC2 单位点突变细胞株 CYC2-S312A-B 和 CYC2-S312A-C。丝氨酸单位点突变阻止了四膜虫有性生殖期小核减数第 1 次分裂起始。结果表明周期蛋白 2 的表达水平和磷酸化修饰影响了不同阶段细胞核的功能, 周期蛋白 2 对四膜虫有性生殖发育的正常进行是必需的。

关键词 嗜热四膜虫; 周期蛋白 2; 过表达; 突变; 有性生殖

中图分类号 Q952

Overexpression and Mutation of Cyclin 2 Inhibit Sexual Reproduction in *Tetrahymena thermophila*

XU Jing^{1),2)}*, GUO Yu-Feng²⁾, WANG Wei²⁾

(¹⁾ Department of Bioengineering, School of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

²⁾ Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract Cyclins undergo a cycle of synthesis and degradation in each cell cycle and play key roles in both mitosis and meiosis by activating its cyclin-dependent kinase (Cdk) partners and directing it to specific target proteins. In *Tetrahymena thermophila*, Cyclin Cyc2 is required for initiation of micronuclear meiosis during the sexual reproduction stage, but the molecular function of Cyc2 is not well understood.

收稿日期: 2018-12-12; 修回日期: 2019-01-17; 接受日期: 2019-02-22
国家自然科学基金项目 (No31872224, 31572253) 资助
* 通讯作者 Tel: 0351-7011499; E-mail: xujing@sxu.edu.cn
Received: December 12, 2018; Revised: January 17, 2019; Accepted: February 22, 2019
Supported by National Natural Science Foundation of China (No.31872224, 315672253)
* Corresponding author Tel: 0351-7011499; E-mail: xujing@sxu.edu.cn

In this study, Cyc2 was overexpressed in the mating mutants OE-CYC2-B2086 and OE-CYC2-CU428 under 0.1 $\mu\text{g/mL}$ Cd^{2+} and 0.3 $\mu\text{g/mL}$ Cd^{2+} induction, respectively. Expression levels of *CYC2* increased 7.8 times and 9.8 times under 0.1 $\mu\text{g/mL}$ Cd^{2+} and 0.3 $\mu\text{g/mL}$ Cd^{2+} induction, respectively. Overexpression of Cyc2 had no effect for initiation of micronuclear meiosis during the early sexual reproduction stage, but affected formation and differentiation of the new macronucleus and new micronucleus during the late sexual reproduction stage. The mating between mutants OE-CYC2-B2086 and OE-CYC2-CU428 under 0.1 $\mu\text{g/mL}$ Cd^{2+} and 0.3 $\mu\text{g/mL}$ Cd^{2+} failed to produce progeny. However, the mutant phenotype was rescued by WT or *CYC2* knockout cells and 3%, 15%, and 32% progenies were produced, respectively. The abnormal phenotype was dose-dependent for expression levels of *CYC2*. Furthermore, Ser312 of Cyc2 was mutated into alanine and the mutants *CYC2*-S312A-B and *CYC2*-S312A-C were created. The mutation of Ser312 of Cyc2 led to the developmental blockage at meiotic prophase I during the early conjugation stage. These results showed that expression levels and phosphorylation of Cyc2 affect nuclear development during different sexual stages, and Cyc2 is required for sexual reproduction in *Tetrahymena*.

Key words *Tetrahymena thermophila*; cyclin(Cyc2); overexpression; mutation; sexual reproduction

细胞周期在周期蛋白(cyclins)与周期蛋白依赖激酶(cyclin-dependent kinase, CDKs)复合体的精确调控下有序进行。周期蛋白的表达水平随着细胞周期而变化^[1]。周期蛋白与 CDKs 周期性结合和解离,其表达水平变化以及周期蛋白的磷酸化修饰和泛素化降解协同调控细胞周期循环^[2-4]。减数分裂过程中,周期蛋白同样起到重要的调节作用。周期蛋白 A1(cyclin A1, Cyc A1)的表达缺失导致拟南芥减数第 1 次分裂前期粗线期和减数第 2 次分裂延迟^[5];而过表达周期蛋白 A1 不仅造成减数分裂过程中形成二联体和三联体,还导致减数第 1 次分裂前期染色体轴成分 ASY1 表达水平降低^[6]。周期蛋白 B3 对于果蝇减数第 1 次和第 2 次分裂后期同源染色体的分离是必需的,并且周期蛋白 A 与周期蛋白 B3 共同阻止减数第 1 次分裂过程中新的 DNA 复制^[7]。过表达周期蛋白 A 则诱导果蝇精子发生过程在减数第 2 次分裂后细胞进入一个额外的 M 期^[8]。周期蛋白 E 过量表达减少小鼠精子发生数量并造成睾丸萎缩^[9]。周期蛋白 A2 在小鼠卵母细胞的减数第 1 次分裂中期到后期转变过程中的稳定表达,将导致姐妹染色体的提前分开^[10]。人的周期蛋白 B3 在小鼠睾丸的偶线期后持续表达导致精子数量减少,形态异常^[11]。在有丝分裂过程中,周期蛋白 Y 磷酸化修饰导致 cyclin Y/CDK14 复合物持续磷酸化下游底物,促进了 S 和 G₂/M 期细胞的积累^[12]。周期蛋白 E 第 384 位的磷酸化使其进行泛素化降解,而该位点的去磷酸化则会防止周期蛋白 E 被降解,并维持 cyclin E-CDK2 的活性^[13]。

嗜热四膜虫是一种纤毛虫类单细胞真核原生动物,具有纤毛虫典型的核的二态性。营养生长时期,

大核转录活跃,进行无丝分裂;小核转录沉默,进行有丝分裂。有性生殖时期,小核减数分裂形成配子核,配子核交换、融合,形成合子核,合子核经两次有丝分裂,分化成新的大核和小核^[14,15]。小核减数分裂前期时会极度拉伸,形成特殊的“Crescent”结构,同源染色体配对发生^[16,17]。周期蛋白 *CYC2* 的敲除或者周期蛋白依赖激酶 *CDK3* 的敲除都可抑制减数第 1 次分裂前期小核延伸,阻滞有性生殖进程^[18,19]。本研究对 *CYC2* 过量表达及其磷酸化位点突变进行了分析,发现 *CYC2* 过量表达导致四膜虫有性生殖发育无法完成,第 312 位丝氨酸突变导致有性生殖发育阻滞在减数第 1 次分裂前期。结果表明 *CYC2* 的正常表达水平和磷酸化修饰对四膜虫有性生殖正常进行是必需的。

1 材料与方法

1.1 材料

嗜热四膜虫 B2086 和 CU428 细胞株由美国康奈尔大学 Peter J. Bruns 博士惠赠,过表达载体 pXS75 由罗彻斯特大学 Martin A. Gorovsky 教授惠赠,表达载体 pNeo4-3HA 为本实验室构建^[20]。DNA 胶回收试剂盒(北京全式金生物技术有限公司),*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶(Fermentas 和 NEB 公司),质粒提取试剂盒(TIANGEN 公司),pMD18-T Vector 克隆试剂盒(TAKARA 公司)、巴龙霉素(上海生工公司),两性霉素、氨苄青霉素、链霉素(Solarbio 公司),胰蛋白酶、脲蛋白,酵母提取物(英国 OXOID 公司),DNA 测序(武汉金开瑞生物工程有限公司),引物合成(上海生工生物公司),荧光定量 PCR 试剂盒

(TAKARA 公司)。

1.2 四膜虫细胞培养

嗜热四膜虫不同交配型细胞 B2086 和 CU428 培养在 1×SPP 液体培养基中(1%蛋白胨,0.2%葡萄糖,0.1%酵母提取物,0.003% EDTA 铁盐),30 ℃培养至对数生长期($2.5 \sim 5.0 \times 10^5$ 细胞/mL),10 mmol/L Tris-HCl(pH7.4)饥饿 18~24 h,调整细胞浓度为 2.5×10^5 细胞/mL,两种交配型的细胞等量混合后,30 ℃静置培养。

1.3 重组表达质粒 pXS75-CYC2 的构建

以四膜虫基因组 DNA 为模板,引物 OE-CYC2-P1/OE-CYC2-P2 扩增目的片段,经琼脂糖凝胶电泳分离回收,纯化目的片段与 pMD18-T 连接,转化大肠杆菌,筛选获得重组质粒 pMD18-T-CYC2,测序。然后用 BamH I 和 Asc I 分别对 pMD18-T-CYC2 和 pXS75 双酶切,回收载体和目的片段,T4 DNA 连接酶连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,筛选获得重组质粒 pXS75-CYC2。

1.4 pNeo4-CYC2-3HA 丝氨酸突变载体的构建

以四膜虫基因组为模板,引物 CYC2-Phos-3'-P1/CYC2-Phos-3'-P2 扩增 CYC2 基因下游序列,回收片段与 pMD18-T 连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,筛选获得质粒 pMD18-T-3'。将 pMD18-T-3' 和 pNeo4-3HA 分别用 Xho I 和 Kpn I 双酶切,胶回收目的片段经 T4 DNA 连接酶连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,抗性筛选获得 pNeo4-3'-3HA 质粒。

以 pXS75-CYC2 为模板,引物 CYC2-Phos-5'-P1/CYC2-Phos-5'-P2 扩增获得的目的序列,胶回收产物与 pMD18-T 连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,筛选获得重组质粒 pMD18-T-5' 并测序。pMD18-T-5' 和质粒 pNeo4-3'-3HA 分别用 Sac I 和 Not I 酶切,分别胶回收目的片段后经 T4 DNA 连接酶连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,抗性筛选获得 pNeo4-CYC2-3HA 质粒。

1.5 细胞转化及稳定突变细胞株的筛选

重组质粒 pXS75-CYC2 经 SacI 酶切线性化,浓缩至终浓度 $1 \sim 1.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$;以质粒 pNeo4-CYC2-3HA 为模板,引物 CYC2-Phos-shot-P1/ CYC2-Phos-shot-P2 经 Pfu DNA 聚合酶(TIANGEN 公司)扩增获得线性序列,浓缩至终浓度 $1 \sim 1.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。使用高压气体基因枪(GJ-1000,宁波新芝科技有限公司)转化不同交配型野生嗜热四膜虫细胞。经巴龙霉素抗性浓度梯度筛选阳性克隆细胞株,以 MTT1-F 和 MTT1-R 为引物经 PCR 分析鉴定,获得突变体细胞。

1.6 实时荧光定量 PCR

四膜虫野生和突变细胞株不同配对型细胞经 Cd²⁺ 处理,在配对 2.5 h 时收集样品。不同样品的总 RNA 经 Trizol 裂解法提取获得,反转录获得 cDNA 第一链,以此 cDNA 为模板,17S-F/17S-R 为内参引物,qRT-CYC2-F/ qRT-CYC2-R 为目的基因引物,94 ℃变性 5 s,60 ℃延伸 34 s,经 40 个循环,进行实时荧光定量 PCR (quantitative Real-Time PCR,qRT-PCR)检测基因的转录水平。

1.7 突变细胞株核发育和后代存活率分析

将经饥饿配对后的野生型和突变细胞在不同时间点取样 200 μL ,加甲醛 5 μL 固定细胞,用 20 μL 的 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI 对细胞染色 10 min,在激光共聚焦显微镜(FV1000,日本)下进行观察。将不同交配型细胞经配对 7 h,吸取单个配对细胞放入 SPP 液滴中,30 ℃培养箱中放置 48 h,将每个液滴中繁殖的细胞取 10 μL ,分别放入含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 巴龙霉素(抗性来源于被转化的亲本大核)或 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 6-甲基嘌呤(抗性来源于 CU428 亲本小核)的 SPP 培养基中,进行后代存活检测。

2 结果

2.1 过表达 CYC2 导致有性生殖过程中新大核和小核的异常分化

MTT1 启动子调控的靶基因突变细胞株在 Cd²⁺ 诱导下实现过量表达,我们之前的研究获得 CYC2 在 MTT1 调控下的突变细胞株,发现周期蛋白 2 定位在小核和胞质中。CYC2 敲除突变体显示,周期蛋白 2 对细胞的减数分裂的起始是必需的^[20]。为了进一步分析 CYC2 过量表达对减数分裂及后期细胞发育的影响,本文用不同 Cd²⁺ 浓度诱导 CYC2 表达,0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Cd²⁺ 诱导突变株(OE-CYC2-B2086x OE-CYC2-CU428)有性生殖期的 CYC2 的转录水平比野生型高 7.8 倍,0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cd²⁺ 诱导的 CYC2 的转录水平比野生型高出 9.8 倍。在有性生殖 2~4 h 发育过程中,过表达 CYC2 导致细胞株有性生殖前期的减数分裂进程加快(Fig. 1 A-2,4 h)。4 h 时,当野生型细胞 3% 发育到配子核交换前后的阶段时,CYC2 过表达突变株中已经有 12% 的配对发育到合子核两次有丝分裂完成阶段(Fig.1 A-4 h)。在有性生殖 6~12 h 发育过程中,过表达 CYC2 细胞株的细胞发育出现异常(Fig. 1 A, 6-12 h)。即配对细胞中小核异常降解(Fig. 1B, OE-CYC2-i)或异常膨胀(Fig. 1B, OE-CYC2-j)。随着配对细胞分开,新大

核和新小核全部降解 (Fig. 1B, OE-*CYC2*-k-1)。当 0.3 $\mu\text{g/mL}$ Cd^{2+} 诱导 *CYC2* 突变细胞株时,有性生殖发育异常程度进一步加剧。在 6~7 h,所有配对细

胞的新大核和新小核发生异常膨胀;在 9~10 h,细胞中的新大核和新小核已完全降解 (Fig. 1B, OE-*CYC2*-1)。

Table 1 Primers used in the study

Primer names	Sequences (5'→3')
OE- <i>CYC2</i> -P1;	ACGGATCCATGTACATAAGTGGTAAATCAGTTA
OE- <i>CYC2</i> -P2;	ATGGCGCGCCTCAATTCAAGATAAACTTTTAGAATTT
<i>CYC2</i> -mu-P1;	GCTATGAAATGGAT T CTTTAATGAC
<i>CYC2</i> -mu-P2;	GTCATTAAAG A ATCCATTTTCATAGC
<i>CYC2</i> -Phos-5'-P1;	<u>GAGCTCCAGTTAAGACATTCGTAACA</u> ACTAGC
<i>CYC2</i> -Phos-5'-P2;	<u>GCGGCCGCATTCAAGATAAACTTTTAGAATTTATCTC</u>
<i>CYC2</i> -Phos-3'-P1;	<u>TCTCGAGGAGGAGTGAGTGAGTGAGTGAATTG</u>
<i>CYC2</i> -Phos-3'-P2;	<u>TGGTACCCAGCACCTGATCCATCAGTTCC</u>
<i>CYC2</i> -Phos-shot-P1;	CAAAAAATATCT G CACCATAAAAAAGAAG
<i>CYC2</i> -Phos-shot-P2;	CTTTTCTGTCATCAGTGTTTGTGTC
qRT- <i>CYC2</i> -F;	CTAATCCTCCTCTAGCTAAGTAAG
qRT- <i>CYC2</i> -R;	GTTCTACTTGTTTGGATTGGACTAC
17S-F;	GATCCTGCCAGTTACATATGCTTG
17S-R;	GCCCAACAATTAGCTCGGTTATCC
<i>MTT1</i> -F;	GCTACGTGATTACAGATTTATGCAATG
<i>MTT1</i> -R;	CGAAACTGATTTTATGCAATTATGAATTAC

underlines indicate restriction endonuclease sites: *Bam*H I : GGATCC, *Asc* I : GCGCGGCC, *Not* I : GCGGCCGC, *Sac* I : GAGCTC, *Xho* I : CTCGAG, *Kpn* I : GGTACC; the boxes indicate mutant sites

2.2 四膜虫有性生殖完成依赖于 *CYC2* 表达水平

为进一步了解 *CYC2* 的表达水平与四膜虫正常有性生殖发育的关系,分别将筛选获得的突变细胞株 OE-*CYC2*-B2086 和 OE-*CYC2*-CU428 (Fig.2 A) 与野生型细胞株及 *CYC2* 敲除的突变体交配,在 0.1 $\mu\text{g/mL}$ Cd^{2+} 诱导下,不同的交配类型表现出不同的 *CYC2* 基因转录表达水平 (Fig. 2B)。它们的表达量分别比野生型高出 2.3、1.7 和 1.2 倍。OE-*CYC2*-B2086 和 OE-*CYC2*-CU428 在 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cd^{2+} 或 0.3 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cd^{2+} 镉离子诱导下,不能产生有性生殖后代 (Fig. 2C, OE-0.1 and OE-0.3); OE-*CYC2*-B2086 和 WT-CU428 产生 3% 的有性生殖后代 (Fig. 3C, OE-B x WT-C); OE-*CYC2*-CU428 和 WT-B2086 产生 15% 的有性生殖后代 (Fig. 3C, OE-C x WT-B)。而 OE-*CYC2*-CU428 和 *CYC2* 敲除突变株 KO-*CYC2*-B 可以获得产生 32% 的有性生殖后代 (Fig. 3C, KO-B x OE-C)。结果表明, *CYC2* 的表达水平影响了四膜虫的有性生殖后代的产生。

2.3 *CYC2* 的定点突变阻滞小核延伸

周期蛋白的磷酸修饰对其自身降解和功能具有

重要的调节作用。Yan 等研究表明,周期蛋白 2 含有 1 个磷酸化修饰位点 S312PQK^[19]。敲除周期蛋白激酶 Cdk3 抑制了该位点的磷酸化修饰。为了分析该位点功能,本文将其中编码丝氨酸的位点突变为编码丙氨酸密码子,模拟去磷酸化修饰 (Fig. 3 A, B)。通过浓度梯度巴龙霉素筛选,获得 *CYC2*-S312 A 突变细胞株 (Fig. 3C)。突变细胞株在减数第 1 次分裂前期 stage I (膨胀期), early-stage II (水滴期) 和 late-stage II (纺锤体期) 的小核发育与野生型一致 (Fig. 3D a-c and g-i)^[16], 但当野生型细胞小核继续拉伸并形成完全延伸的 Crescent 时 (Fig. 3D d-f), *CYC2*-S312A 突变细胞株的小核发育停滞在了 late stage II 阶段,并逐渐回缩 (Fig. 3D j-l)。配对细胞最终分开后成为含有 1 个大核和 1 个小核的单细胞,无法获得有性生殖后代 (Table 2)。当用野生型细胞与突变株进行交配, *CYC2*-S312A-B x WTC 可以获得 0.3% 后代,而 *CYC2*-S312A-C x WTB 则可以获得 6.7% 后代 (Table 2), 突变株的异常表型部分恢复,表明该蛋白质的磷酸化修饰具有重要的核发育调节作用。

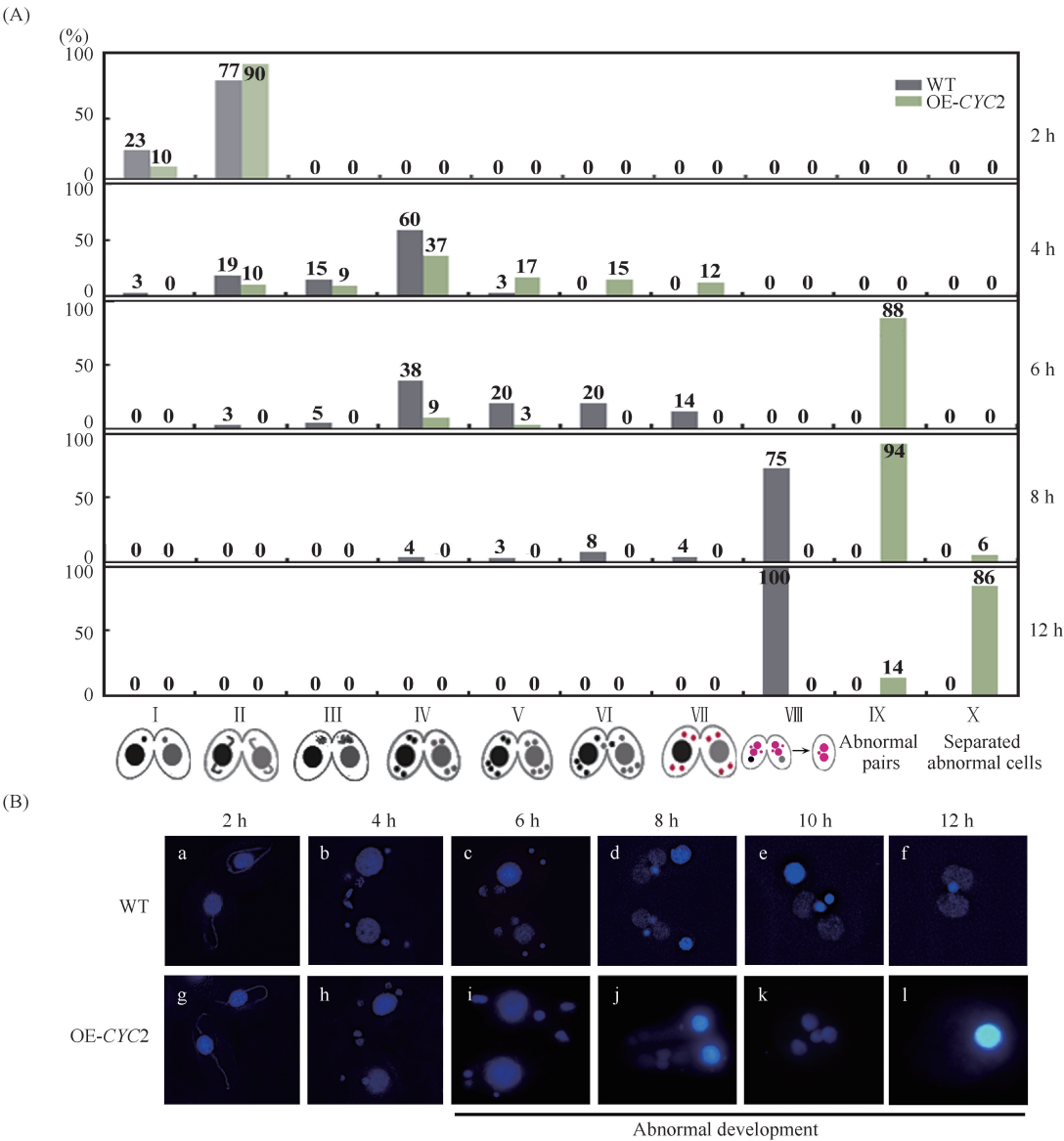


Fig.1 Overexpression of *CYC2* resulted in abnormal nuclear development during the sexual development stage in *Tetrahymena* (A) Developmental profiles of wild type (WT) and overexpression of *CYC2* cells (OE-*CYC2*) during conjugation. WT and OE-*CYC2* cells were induced for two hours under 0.1 $\mu\text{g/mL}$ Cd^{2+} induction during the growing stage. The mating cells were stained with 0.1 $\mu\text{g/mL}$ DAPI. The Y axis indicates the percentage of cells at different development stages at 2, 4, 6, 8 and 12 hours after mixing. The stages at the X axis were categorized as follows: I, Pair formation; II, Mic Elongation stage; III, Chromosome condensation; IV, Meiosis; V, 3rd prezygotic stage; VI, Pronuclear exchange; VII, Pronuclear fusion; VIII, anlagen stage; IX, Abnormal pairs; X, Separated abnormal cells. Gray columns indicate WT; greyish-green columns indicate OE-*CYC2*. (B) Comparison of developmental nuclei between mating WT cells and mating *CYC2* overexpression mutants. Normal pairs (a-h); abnormal separated cells (i-l). Cells were stained with 0.1 $\mu\text{g/mL}$ DAPI and observed by an Olympus confocal microscope

Table 2 *CYC2*-S312A mutants failed to produce viable progenies

Type of mating cells	Number of individual pairs examined	Survival rate of progeny (%)
B2086 x CU428	213	80
<i>CYC2</i> -S312A-B3.4 x <i>CYC2</i> -S312A-C3.1	218	0
<i>CYC2</i> -S312A-B3.4 x WTC	222	0.3
<i>CYC2</i> -S312A-C3.1 x WTB	208	6.7

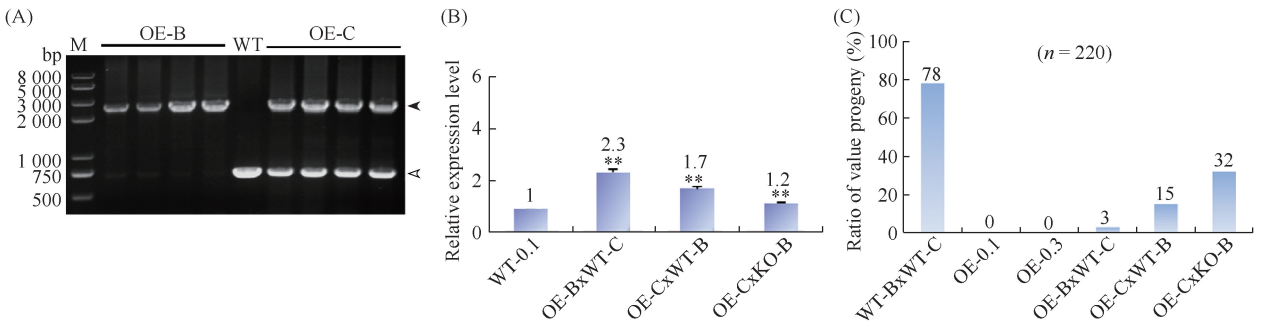


Fig.2 The sexual development was affected by *CYC2* expression level (A) *CYC2* overexpression mutants, OE-B and OE-C, were confirmed by PCR. Empty arrows indicate - WT sequence; black arrows indicate mutant sequences. (B) Analysis of *CYC2* expression levels in different mating cells by qRT-PCR. Total RNA was isolated at two hours after mixing. 17S rRNA was used as the internal reference gene. The Y-axis is fold-change of relative *CYC2* expression levels; the X-axis is different type conjugation cells. WT-0.1, OE-B and OE-C, wild type, B2086 or CU428 of overexpression *CYC2* cells were induced respectively by 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cd^{2+} for two hours during the growing stage. *, $P < 0.01$; **, $P < 0.05$. (C) Viability of progenies in different mating cells ($n = 220$). WT-BxWT-C, mating between wild-type B2086 and CU428; OE-0.1, mating between OE-*CYC2*-B2086 and OE-*CYC2*-CU428 with 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cd^{2+} induction; OE-0.3, mating between OE-*CYC2*-B2086 and OE-*CYC2*-CU428 with 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cd^{2+} induction; OE-B x WT-C, mating between OE-*CYC2*-B2086 and CU428; OE-C x WT-B, mating between OE-*CYC2*-cu428 and B2086; OE-C x KO-B, mating between OE-*CYC2*-CU428 and *CYC2*-knockout B2086

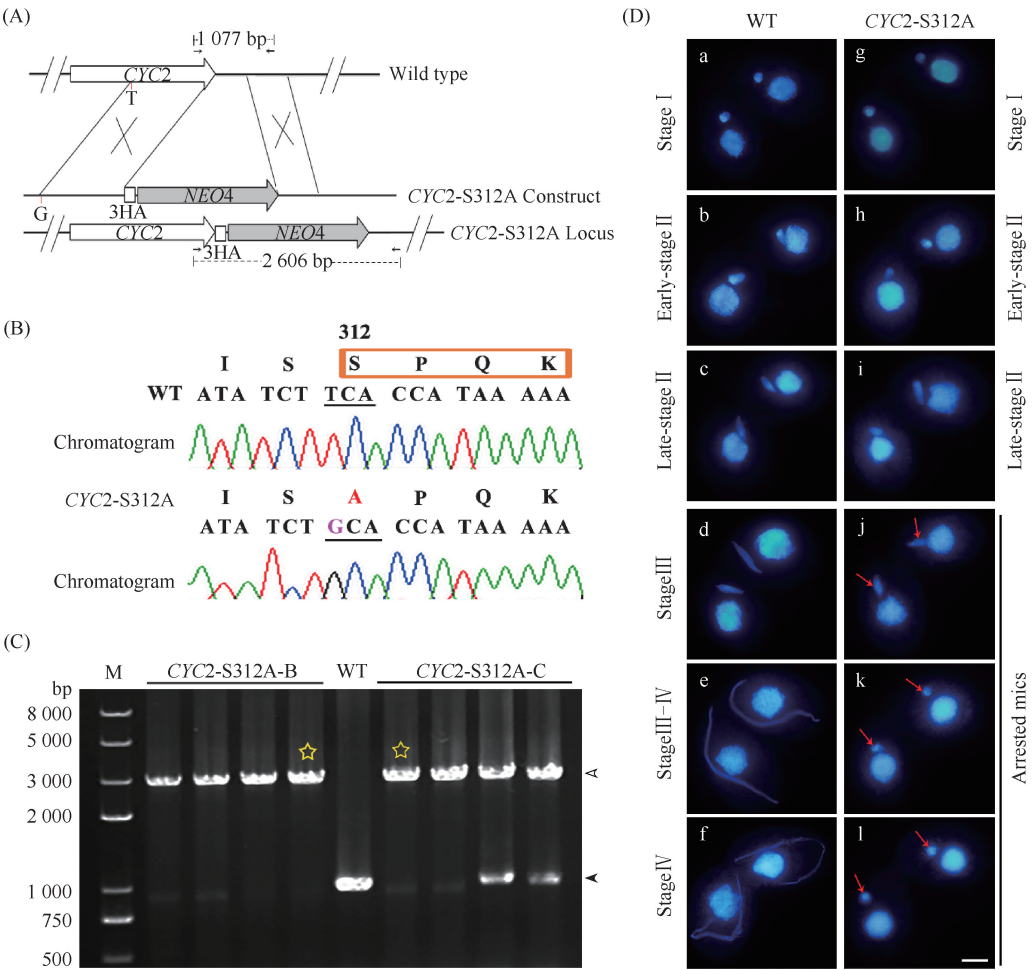


Fig.3 *Cyc2* phosphorylation is essential for micronuclear elongation during conjugation development (A) Schematic representation of the *CYC2*-S312A mutation. The *CYC2*-S312A construct was built under the endogenous promoter with TCA codon was replaced by GCA. The Neo4 cassette was inserted after the 3' flank sequence of *CYC2* to provide the paromomycin resistance for screening the mutants. Arrows indicated the sites of screening primers and the numbers indicated the identification sequence length of wild type and mutants. (B) The mutant sequence analysis of Ser312. Orange box, the phosphorylation site in *Cyc2*, SPQK, with the mutation sites underlined. Red letter, A, is the mutation amino acid. (C) *CYC2*-S312A-B and *CYC2*-S312A-C mutants were confirmed by PCR. Empty arrowheads indicate mutant sequences; black arrowheads indicate WT sequences. The yellow pentagrams indicate the PCR products from the mutant strains for observing the nuclear development. (D) DAPI staining showed progression through early conjugation in WT (a-f) and *CYC2*-S312A (g-l) strains. Red arrows indicated arrested abnormal micronuclei (Mics)

3 讨论

周期蛋白及周期蛋白依赖性激酶形成的复合体在细胞周期调控过程中发挥关键作用^[21]。经典的细胞周期家族蛋白有: Cyclin A, Cyclin B, Cyclin D 及 Cyclin E。Cyclin D1 和 Cyclin E 调控 G₁ 期到 S 期, Cyclin A 调控 S 期到 G₂ 期, Cyclin B 调控 G₂ 期到 M 期。周期蛋白周期性表达变化的分子机制包括转录和转录后调节。多种周期蛋白的 mRNA 具有细胞循环依赖的表达波动,同时周期蛋白的稳定性起到重要的调节作用。B3 型周期蛋白主要聚集在减数分裂时期^[22]。在异体住囊虫的卵子形成过程中,周期蛋白 B3a 参与了减数分裂纺锤体组装^[23]。四膜虫具有 34 种不同的周期蛋白,并且表现出不同的表达图谱。周期蛋白 2 和周期蛋白 28 都在有性生殖时期特异表达。敲除 *CYC28* 对四膜虫的有性生殖无影响,但过表达 *CYC28* 导致有性生殖过程中原核有丝分裂异常^[24]。周期蛋白 2 的敲除抑制了四膜虫减数分裂的起始^[18,20]。本研究则发现周期蛋白 2 的过量表达未影响减数分裂前期小核的延伸,但导致了合子核在后期发育的异常 (Fig. 1),并使突变细胞株无法获得有性生殖后代 (Table 2)。因此周期蛋白 2 表达水平的改变,在发育不同阶段调控了细胞核的发育,进而决定了四膜虫有性生殖进程。

周期蛋白结合 CDK 形成的复合物促进了细胞周期的进行。周期蛋白激酶复合物不仅促进下游底物的磷酸化修饰,而且催化周期蛋白自身的磷酸化修饰,通过正负反馈通路调节蛋白激酶活性。泛素依赖的周期蛋白 B 的降解对其退出有丝分裂是必需的^[25]。芽殖酵母周期蛋白 Cln 的磷酸化修饰参与了泛素依赖的该周期蛋白降解^[26]。人周期蛋白 E (Thr-380) 和周期蛋白 D1 (Thr-286) 的磷酸化修饰,对其泛素依赖的降解同样发挥重要作用^[27,28]。四膜虫周期蛋白激酶基因 *CDK3* 具有和 *CYC2* 基因相似的表达图谱,敲除突变株具有相似的表型,暗示二者可能形成功能性激酶复合体。敲除四膜虫周期蛋白激酶 Cdk3 后, Cyc2 的磷酸化丰度随之降低^[19],本研究通过对 Cyc2 氨基酸序列中第 312 位的丝氨酸位点进行模拟去磷酸化突变,发现 Cyc2 丝氨酸的突变抑制小核减数第 1 次分裂前期染色体延伸,表现出与 *CYC2* 敲除突变株和 *CDK3* 敲除突变株相似的表型。同时 *CYC2* 点突变细胞株与野生型细胞配对可部分恢复突变细胞表型 (Fig. 3C and

Table 2),这些结果提示,Cdk3 促使 Cyc2 磷酸化修饰,进而促进了二者的相互作用。因此,我们推测 Cdk3 促进了 Cyc2 特定位点的磷酸化修饰,磷酸化的 Cyc2 又进一步促进了二者的结合,Cdk3 和 Cyc2 的磷酸修饰存在正反馈调节,并最终实现对下游靶标进行的磷酸化修饰。当阻止 Cyc2 磷酸化修饰后可能抑制二者的相互作用,导致复合物酶活性缺失,从而抑制减数分裂的起始。*CYC2* 转录水平的改变以及翻译后的修饰变化,在不同层次上影响了四膜虫的有性生殖进程,暗示其在多个层次参与了细胞周期调控,对其具体作用的分子机制仍有待进一步深入分析。

参考文献 (References)

[1] Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited [J]. Cell, 2004, **116**(2): 221-234

[2] Bloom J, Cross FR. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, **8**(2): 149-160

[3] Gali-Muhtasib H, Bakkar N. Modulating cell cycle: current applications and prospects for future drug development [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2002, **2**(4): 309-336

[4] Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway [J]. Nature, 1991, **349**(6305): 132-138

[5] Magnard JL, Yang M, Chen YC, et al. The Arabidopsis gene tardy asynchronous meiosis is required for the normal pace and synchrony of cell division during male meiosis [J]. Plant Physiol, 2001, **127**(3): 1157-1166

[6] Wang Y, Yang M. Loss-of-function mutants and overexpression lines of the Arabidopsis cyclin CYCA1;2/Tardy Asynchronous Meiosis exhibit different defects in prophase-I meiocytes but produce the same meiotic products [J]. PLoS One, 2014, **9**(11): e113348

[7] Bourouh M, Dhaliwal R, Rana K, et al. Distinct and overlapping requirements for cyclins A, B, and B3 in Drosophila female meiosis [J]. G3 (Bethesda), 2016, **6**(11): 3711-3724

[8] Gonczy P, Thomas BJ, DiNardo S. Roughex is a dose-dependent regulator of the second meiotic division during *Drosophila* spermatogenesis [J]. Cell, 1994, **77**(7): 1015-1025

[9] Liberal V, De Miguel MP, Henze M, et al. Reduced spermatogonial proliferation and decreased fertility in mice overexpressing cyclin E in spermatogonia [J]. Cell Cycle, 2010, **9**(20): 4222-4227

[10] Touati SA, Cladiere D, Lister LM, et al. Cyclin A2 is required for sister chromatid segregation, but not separase control, in mouse oocyte meiosis [J]. Cell Rep, 2012, **2**(5): 1077-1087

[11] Refik-Rogers J, Manova K, Koff A. Misexpression of cyclin B3 leads to aberrant spermatogenesis [J]. Cell Cycle, 2006, **5**(17): 1966-1973

[12] Li S, Song W, Jiang M, et al. Phosphorylation of cyclin Y by CDK14 induces its ubiquitination and degradation [J]. FEBS Lett, 2014, **588**(11): 1989-1996

[13] Davis RJ, Swanger J, Hughes BT, et al. The PP2A-B56 phosphatase opposes cyclin E autocatalytic degradation via site-specific dephosphorylation [J]. Mol Cell Biol, 2017, **37**(8): e00657-16

[14] Eisen JA, Coyne RS, Wu M, et al. Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote [J]. PLoS Biol, 2006, **4**(9): e286

[15] Lin CG, Lin IT, Yao MC. Programmed minichromosome elimination as a mechanism for somatic genome reduction in *Tetrahymena thermophila* [J]. PLoS Genet, 2016, **12**

- (11): e1006403
- [16] Loidl J, Scherthan H. Organization and pairing of meiotic chromosomes in the ciliate *Tetrahymena thermophila* [J]. J Cell Sci, 2004, **117**(24): 5791-5801
- [17] Loidl J, Mochizuki K. Tetrahymena meiotic nuclear reorganization is induced by a checkpoint kinase-dependent response to DNA damage [J]. Mol Biol Cell, 2009, **20**(9): 2428-2437
- [18] Xu Q, Wang R, Ghanam A, *et al.* The key role of *CYC2* during meiosis in *Tetrahymena thermophila* [J]. Protein Cell, 2016, **7**(4): 236-249
- [19] Yan GX, Zhang J, Shodhan A, *et al.* Cdk3, a conjugation-specific cyclin-dependent kinase, is essential for the initiation of meiosis in *Tetrahymena thermophila* [J]. Cell Cycle, 2016, **15**(18): 2506-2514
- [20] Xu J, Li X, Song W, *et al.* Cyclin Cyc2p is required for micronuclear bouquet formation in *Tetrahymena thermophila* [J]. Sci China Life Sci, 2019, doi: 10.1007/s11427-018-9369-3.
- [21] Yasutis KM, Kozminski KG. Cell cycle checkpoint regulators reach a zillion [J]. Cell Cycle, 2013, **12**(10): 1501-1509
- [22] Zhang T, Qi ST, Huang L, *et al.* Cyclin B3 controls anaphase onset independent of spindle assembly checkpoint in meiotic oocytes [J]. Cell Cycle, 2015, **14**(16): 2648-2654
- [23] Feng H, Thompson EM. Specialization of CDK1 and cyclin B paralog functions in a coenocystic mode of oogenic meiosis [J]. Cell Cycle, 2018, **17**(12): 1425-1444
- [24] 张宇良, 许静, 王伟. 过表达周期蛋白 Cyc28 影响四膜虫的有性生殖进程 [J]. 中国生物化学与分子生物学报 (Zhang YL, Xu J, Wang W. Overexpression of Cyc28 affects sexual reproduction in *Tetrahymena thermophila* [J]. Chin J Biochem Mol Biol), 2017, **33**(3): 252-259
- [25] Pecani K, Cross FR. Degradation of the mitotic cyclin Clb3 is not required for mitotic exit but is necessary for G1 cyclin control of the succeeding cell cycle [J]. Genetics, 2016, **204**(4): 1479-1494
- [26] Willems AR, Lanker S, Patton EE, *et al.* Cdc53 targets phosphorylated G1 cyclins for degradation by the ubiquitin proteolytic pathway [J]. Cell, 1996, **86**(3): 453-463
- [27] Ye X, Nalepa G, Welcker M, *et al.* Recognition of phosphodegron motifs in human cyclin E by the SCF (Fbw7) ubiquitin ligase [J]. J Biol Chem, 2004, **279**(48): 50110-50119
- [28] Eo HJ, Park GH, Song HM, *et al.* Silymarin induces cyclin D1 proteasomal degradation via its phosphorylation of threonine-286 in human colorectal cancer cells [J]. Int Immunopharmacol, 2015, **24**(1): 1-6