

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620070153815

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

裂殖酵母中 Dnt1 在有丝分裂早期抑制 SIN 信号
通路负调控因子 Dma1 的功能研究

Functional Analyses of Dnt1 as an Inhibitor of Dma1 in Early
Mitosis in Fission Yeast

李文珠

指导教师姓名: 靳全文教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2010 年 6 月

论文答辩时间: 2010 年 8 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

论文说明

本学位论文分为两部分：

第一部分研究裂殖酵母有丝分裂早期 Dma1 和 Dnt1 之间的相互作用机制及生物学意义；

第二部分研究裂殖酵母热激蛋白 Hsp90 在异染色质区基因沉默中的功能。

目录

缩写词表	I
第一部分 裂殖酵母中 Dnt1 在有丝分裂早期抑制 SIN 信号通路负调控因子 Dma1 的功能研究	III
第一部分 中文摘要	IV
第一部分 英文摘要	V
第一部分 前言	1
1 裂殖酵母中的细胞周期调控及细胞周期检验点	1
1.1 裂殖酵母中的细胞周期检验点	1
1.2 γ -微管蛋白复合体在裂殖酵母有丝分裂中的作用	3
1.3 Plo1 激酶在裂殖酵母有丝分裂中的调控作用	6
2 裂殖酵母中调控细胞胞质分裂的信号途径 SIN	7
2.1 SIN 的蛋白组分及其功能	7
2.2 SIN 信号通路的保守性	8
3 细胞核分裂与细胞胞质分裂的准确协调及 Dma1 在这一过程中的功能	9
3.1 Dma1 与人类肿瘤抑制因子 Chfr 具有序列同源性	9
3.2 Dma1 通过抑制 SIN 信号途径阻止胞质分裂的起始	11
4 Dnt1 是一个新发现的胞质分裂的抑制因子	11
5 本部分的研究目的、内容和意义	12
第一部分 材料和方法	14
1 材料	14
1.1 大肠杆菌菌株	14
1.2 酵母菌株	14
1.3 质粒	18
1.4 引物	19
1.5 分子生物学工具酶	19
1.6 主要试剂及耗材	20
1.7 主要仪器及设备	21

1.8 常用培养基、主要缓冲溶液的配制	22
2 方法	29
2.1 裂殖酵母菌株的构建	29
2.2 Drop Test	31
2.3 裂殖酵母基因组提取 — 酶解法	31
2.4 裂殖酵母转化	32
2.5 质粒 DNA 的制备	32
2.6 琼脂糖胶回收 DNA 片段	32
2.7 酶切后 DNA 片段的回收	33
2.8 大肠杆菌感受态细胞的制备	33
2.9 质粒 DNA 的细菌转化	33
2.10 聚合酶链式反应	34
2.11 DNA 限制性内切酶酶切反应	34
2.12 DNA 连接	35
2.13 酵母双杂交	35
2.14 Dnt1 蛋白的去磷酸化处理	36
2.15 蛋白纯化后的去磷酸化处理	37
2.16 蛋白体外结合	38
2.17 免疫共沉淀	38
2.18 免疫印迹检测	38
第一部分 结果与分析	39
1 裂殖酵母中 Dma1 与 Dnt1 具有细胞内相互作用	39
1.1 裂殖酵母中与 Dma1 结合蛋白的分离和鉴定	39
1.2 Dma1 与 Dnt1 蛋白相互作用的验证	39
1.3 Dma1 与 Dnt1 的相互作用依赖于 Dnt1 的中央区域(176-263aa)	41
1.4 Dma1 与 Dnt1 的结合依赖于 Dma1 的 FHA 结构域	41
2 Dma1 与 Dnt1 的结合在有丝分裂中期达到最强，并且 Dma1 结合被磷酸化的 Dnt1	42
2.1 Dma1 与 Dnt1 的结合在有丝分裂中期达到最强	42
2.2 在有丝分裂中期 Dma1 结合被磷酸化的 Dnt1	43

2.3 去磷酸化处理可以减弱 Dnt1 结合 Dma1 的能力	44
3 在缺失 <i>dnt1</i> ⁺ 基因的细胞里过量表达 Dma1 会导致细胞周期阻断在有丝分裂中期, 且阻断依赖于纺锤体组装检验点	45
4 在缺失 <i>dnt1</i> ⁺ 基因的细胞里过量表达 Dma1 会破坏 SPB 的完整性	48
5 在缺失 <i>dnt1</i> ⁺ 基因的细胞里过量表达 Dma1 引起 γ -tubulin 复合体中部分蛋白水平的下降	50
6 <i>dma1</i> ⁺ 基因的缺失可以部分逆转 <i>dnt1</i> Δ 细胞中 SPB 功能的异常	52
7 Dnt1 影响 Dma1 在 SPB 上的定位, 但并不影响 Dma1 的蛋白水平	54
第一部分 讨论	56
1 Dnt1 与 Dma1 之间的关系	56
2 Dma1 与 SPB 结构完整性之间的关系	56
3 什么是 Dma1 检验点监控的对象?	57
第二部分 热激蛋白 Hsp90 在裂殖酵母异染色质区基因沉默中的功能研究	59
第二部分 中文摘要	60
第二部分 英文摘要	62
第二部分 前言	64
1 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)及其机制	64
1.1 裂殖酵母中的 RNAi	65
1.2 RNAi 调控异染色质形成及基因沉默	69
2 Hsp90(Heat shock protein 90)蛋白	73
3 本部分的研究内容和意义	75
第二部分 材料和方法	76
1 材料	76
1.1 酵母菌株	76
1.2 质粒	78
1.3 引物	79
1.4 分子生物学工具酶	80

2 方法	81
2.1 酵母活细胞 Hoechst 33342 染色	81
2.2 目的蛋白的诱导表达	81
2.3 目的蛋白的检测	81
第二部分 结果与分析	83
1 裂殖酵母中 Hsp90 蛋白 Swo1 具有维持 RNAi 关键蛋白 Ago1 稳定性的功能	83
2 裂殖酵母 Hsp90 蛋白对于异染色质区基因沉默的影响	83
3 裂殖酵母 Hsp90 蛋白对于人工异染色质区基因沉默的影响依赖于 RITS 复合体的功能	86
4 裂殖酵母中 Hsp90 蛋白 Swo1 与 Ago1 具有细胞内相互作用	87
5 Swo1 与 Ago1 的相互作用依赖于 Swo1 的 N 端和中央结构域	87
6 Swo1 与 Ago1 的相互作用依赖于 Ago1 的 N 端和 PAZ 结构域	88
7 裂殖酵母 Hsp90 蛋白突变体 <i>swo1-26</i> 中突变位点的确定	89
第二部分 讨论	91
参考文献	94
致谢	107

Contents

Abbreviations	I
Part I: Functional analyses of Dnt1 as an inhibitor of Dma1 in early mitosis in fission yeast	III
Part I: Chinese abstract	IV
Part I: English abstract	V
Part I: Introduction	1
1 Cell cycle regulation and cell cycle checkpoints in fission yeast	1
1.1 Cell cycle checkpoints in fission yeast	1
1.2 Effects of γ -tubulin complex on mitosis in fission yeast	3
1.3 Plo1's function on regulation of mitosis in fission yeast	6
2 The SIN signaling pathway in cytokinesis regulation in fission yeast	7
2.1 Main components of SIN signaling pathway and their functions	7
2.2 Conservation of SIN signaling pathway	8
3 Dma1's function in tight coordination between mitosis and cytokinesis	9
3.1 Dma1's sequence similarity to human tumor suppressor Chfr	9
3.2 Dma1 negatively regulates cytokinesis by inhibiting the SIN	11
4 Dnt1 as a novel inhibitor of cytokinesis	11
5 Purpose, contents and significance of this study	12
Part I: Materials and methods	14
1 Materials	14
1.1 Bacterium strains	14
1.2 Yeast strains	14
1.3 Plasmids	18
1.4 Primers	19
1.5 Molecular tool enzymes	19
1.6 Reagents	20
1.7 Main instruments	21
1.8 Solutions and buffers	22
2 Methods	29
2.1 Construction of yeast strains	29
2.2 Drop Test	31

2.3 Fission yeast genomic DNA isolation	31
2.4 Transformation in fission yeast	32
2.5 Preparation of plasmid DNA	32
2.6 Gel extraction of DNA	32
2.7 Extraction of digested DNA fragment	33
2.8 Preparation of competent <i>E.coli</i> cells	33
2.9 Plasmid DNA transformation	33
2.10 Polymerase chain reaction (PCR)	34
2.11 Restriction endonuclease digestion of DNA	34
2.12 DNA ligation	35
2.13 Yeast two-hybrid assay	35
2.14 Dephosphorylation of Dnt1	36
2.15 Dephosphorylation of purified protein	37
2.16 <i>in vitro</i> pull-down	38
2.17 co-immunoprecipitation (co-IP)	38
2.18 Western blot	38
Part I: Results and analyses	39
1 Dma1 physically interacts with Dnt1 in fission yeast	39
1.1 Purification and identification of new proteins interacting with Dma1	39
1.2 Dma1 interacts with Dnt1	39
1.3 The interaction between Dma1 and Dnt1 depends on Dnt1's central domain (176-263aa)	41
1.4 The interaction between Dma1 and Dnt1 depends on Dma1's FHA domain	41
2 Dma1 interacts with phosphorylated Dnt1 at metaphase	42
2.1 The strongest interaction between Dma1 and Dnt1 at metaphase	42
2.2 Dnt1 bound to Dma1 is phosphorylated form	43
2.3 Dephosphorylation treatment reduces Dnt1's binding efficiency to Dma1	44
3 Overexpression of Dma1 in <i>dnt1</i>Δ cells leads to metaphase arrest, and the arrest depends on spindle assembly checkpoint	45
4 Overexpression of Dma1 in <i>dnt1</i>Δ cells disrupts SPB integrity	48
5 Overexpression of Dma1 in <i>dnt1</i>Δ cells results in decreased protein level of some components of γ-tubulin complex	50
6 The SPB defects in <i>dnt1</i>Δ can be rescued by deletion of <i>dma1</i>⁺	52

7 Dnt1 affects Dma1's localization at SPB without affecting Dma1's protein level	54
Part I: Discussion	56
1 Relationship between Dnt1 and Dma1	56
2 Targets of Dma1 involved in SPB integrity	56
3 What does the Dma1 checkpoint monitor?	57
Part II: Studies on the function of heat shock protein 90 (Hsp90) in heterochromatic gene silencing in fission yeast	59
Part II: Chinese abstract	60
Part II: English abstract	62
Part II: Introduction	64
1 RNA interference (RNAi) and its mechanisms	64
1.1 RNAi in fission yeast	65
1.2 RNAi is involved in heterochromatin formation and gene silencing	69
2 Hsp90 (Heat shock protein 90)	73
3 Contents and significance of this study	75
Part II: Materials and methods	76
1 Materials	76
1.1 Yeast strains	76
1.2 Plasmids	78
1.3 Primers	79
1.4 Molecular enzymes	80
2 Methods	81
2.1 Hoechst 33342 staining of live cells	81
2.2 Induction of protein expression in bacteria	81
2.3 Detection of expressed proteins	81
Part II: Results and analyses	83
1 Hsp90/Swo1 is required for maintaining the stability of RNAi key protein Ago1 in fission yeast	83
2 Effect of Hsp90 on heterochromatic gene silencing in fission yeast	83
3 Effect of Hsp90 on artificial heterochromatic gene silencing system depends on the functional RITS complex in fission yeast	86

4 Hsp90/Swo1 physically interacts with Ago1 in fission yeast87

5 Interaction between Swo1 and Ago1 depends on the N-terminal and central regions of Swo187

6 Interaction between Swo1 and Ago1 depends on the N-terminal and PAZ domains of Ago188

7 Identification of mutation in sites in *swol-26* yeast strain89

Part II: Discussion91

References94

Acknowledgements 107

厦门大学博硕士论文摘要库

缩写词表

APC	anaphase promoting complex 促后期复合体
APS	ammonium persulfate 过硫酸铵
3-AT	3-amino-1,2,4-triazole
BSA	bovine albumin serum 牛血清白蛋白
CDK	cyclin-dependent kinase 周期蛋白依赖性蛋白激酶
CIAP	calf-intestinal alkaline phosphatase 小牛小肠碱性磷酸酶
co-IP	co-immunoprecipitation 免疫共沉淀
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole 4',6-二脒基-2-苯基吲哚
DMSO	dimethyl sulfoxide 二甲亚砜
DNA	deoxyribonucleic acid 脱氧核糖核酸
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate 脱氧核苷三磷酸
DTT	dithiothreitol 二硫苏糖醇
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i> 大肠杆菌
EB	ethidium bromide 溴化乙啶
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid 乙二胺四乙酸
5-FOA	5-fluoroorotic acid 5-氟乳清酸
γ -TuC	γ -tubulin complex γ -微管蛋白复合体
GAP	GTPase-activating protein GTP 酶激活蛋白
GFP	green fluorescent protein 绿色荧光蛋白
IPTG	isopropylthio-D-galactoside 异丙基--D-半乳糖苷
LB	luria broth medium 肉汤培养基
MBP	maltose binding protein 麦芽糖结合蛋白
MEN	mitotic exit network 芽殖酵母中有丝分裂退出信号途径
MPF	maturation promoting factor 成熟促进因子
MS	mass spectrometry 质谱
MTOC	microtubule organizing center 微管组织中心

OD	optical density 光密度
ONPG	<i>o</i> -nitrophenyl- β -D-galactopyranoside
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis 聚丙烯酰胺凝胶电泳
PCR	polymerase chain reaction 聚合酶链式反应
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride 苯甲基磺酰氟
RNA	ribonucleic acid 核糖核酸
RNAi	RNA interference RNA 干扰
SAC	spindle assembly checkpoint 纺锤体组装检验点
SDS	sodium dodecyl sulfate 十二烷基磺酸钠
SIN	septation initiation network 裂殖酵母中隔起始信号途径
SPB	spindle pole body 纺锤体极体
TAP	tandem affinity purification 串联亲和纯化
TE(Tris/EDTA)	Tris/EDTA 缓冲盐溶液
TEMED	N N N' N'-tetramethylethylenediamine N N N' N'-四甲基二乙胺
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane 三羟基甲基氨基甲烷

第一部分

裂殖酵母中 Dnt1 在有丝分裂早期抑制 SIN 信号通路负调控因子 Dma1 的功能研究

**Functional Analyses of Dnt1 as an Inhibitor of Dma1 in
Early Mitosis in Fission Yeast**

摘要

人类肿瘤抑制因子 Chfr 是一种 E3 泛素连接酶,当细胞受到不良条件刺激(如微管解聚药物等)时, Chfr 可以阻止细胞进入有丝分裂。然而,人们目前还不清楚 Chfr 的功能是否也受到调控。Dma1 是 Chfr 在裂殖酵母中的同源蛋白,两者在序列上存在一定的相似性。已有的研究表明, Dma1 在有丝分裂晚后期负调控有丝分裂的退出(mitotic exit)和胞质分裂(cytokinesis)。最近,为了进一步研究 Dma1 的功能,我们实验室通过串联亲和纯化(tandem affinity purification, TAP)的方法在裂殖酵母细胞中纯化了 Dma1 蛋白复合物,并配合质谱分析的方法鉴定出与 Dma1 一起被纯化的蛋白,其中检出了一个丰度很高的蛋白 Dnt1。

在本研究中,我们利用免疫共沉淀技术证实了 Dma1 与 Dnt1 在细胞内存在相互作用。同时,我们还发现这两种蛋白之间的相互作用分别依赖于 Dma1 的 FHA 结构域与 Dnt1 中央区域的一段氨基酸。另外, Dma1 结合被磷酸化的 Dnt1,二者的相互作用在有丝分裂中期达到最强。

我们进一步利用遗传学与细胞生物学等手段对有丝分裂中期 Dma1 与 Dnt1 的相互作用进行了研究,期望发现两者在功能上的联系。几方面的结果显示,在有丝分裂中期, Dnt1 具有抑制 Dma1 活性的功能。首先,在缺失 *dnt1*⁺基因的细胞中过量表达 Dma1 引起纺锤体极体(spindle pole body, SPB)结构的破坏和纺锤体形成的缺陷,最终导致细胞被阻断在有丝分裂中期,并且这种阻断依赖于纺锤体组装检验点(spindle assembly checkpoint, SAC)。其次, *dma1*⁺基因的缺失可以部分逆转 *dnt1*Δ细胞中 SPB 功能的异常。该现象表明,缺失 *dnt1*⁺基因的细胞中有丝分裂缺陷的表型可能是由于 Dma1 过度激活所造成的。最后,我们发现 Dnt1 能够影响 Dma1 在 SPB 上的定位但并不影响 Dma1 的蛋白水平。

综上所述,本研究表明 Dnt1 在有丝分裂早期对于 Dma1 的活性具有一定的抑制作用,这有利于保证 SPB 和纺锤体的正常组装及有丝分裂的正常进行。鉴于裂殖酵母中的 Dma1 是哺乳动物中 Chfr 的同源蛋白,对于 Dma1 的深入研究将加深我们对于 Chfr 的功能的认识。

关键词: Dma1; Dnt1; SIN 信号途径;

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库