

学校编码: 10384

分类号____密级____

学号: 21620131152542

UDC____

廈門大學

硕士学位论文

裂殖酵母中细胞端部定位的 Dma1 通过调节 Tip1/CLIP170 的泛素化修饰来调控细胞的极性生长

Cell end-localized Dma1 is involved in polar growth by regulating the ubiquitination of Tip1/CLIP-170 in fission yeast

孙莉云

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: 2016 年 4 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期: 2016 年 5 月

答辩委员会主席: _____

评阅人: _____

2016 年 5 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（靳全文）课题（组）的研究成果，获得（靳全文）课题（组）经费或实验室的资助，在（靳全文）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

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

目录

缩写词表.....	VII
摘要.....	IX
英文摘要.....	XI
第一章 前言.....	1
1 Rho 家族小 G 蛋白及其效应因子在极性生长中的作用.....	2
2 细胞骨架对极性生长的影响.....	4
2.1 微管骨架与极性生长.....	4
2.2 肌动蛋白骨架与极性生长.....	7
3 胞吞作用和胞外分泌参与极性生长.....	8
4 参与极性生长调控的其它因子.....	9
5 裂殖酵母蛋白 Dma1 的多功能性及其与细胞极性生长调控因子 Tip1 的潜在联系.....	10
5.1 裂殖酵母中 Dma1 的多功能性.....	10
5.2 裂殖酵母 Dma1 与细胞极性生长调控因子 Tip1 的潜在联系.....	11
6 本论文的研究目的、内容和意义.....	12
第二章 材料和方法.....	13
1 材料.....	13
1.1 大肠杆菌菌株.....	13
1.2 酵母菌株.....	13
1.3 质粒.....	19
1.4 引物.....	21
1.5 分子生物学工具酶.....	25
1.6 主要试剂及耗材.....	25

1.7 主要仪器及设备	26
1.8 常用培养基、主要缓冲溶液的配制.....	27
2 方法.....	34
2.1 裂殖酵母菌株的构建.....	34
2.2 裂殖酵母基因组提取—破碎法.....	36
2.3 裂殖酵母转化.....	36
2.4 质粒 DNA 的制备	37
2.5 琼脂糖胶回收 DNA 片段	38
2.6 PCR 产物纯化回收	39
2.7 大肠杆菌感受态细胞的制备.....	39
2.8 质粒 DNA 的细菌转化	40
2.9 常规 PCR.....	40
2.10 定点诱变 PCR.....	41
2.11 DNA 限制性内切酶酶切反应	41
2.12 DNA 连接	42
2.13 带有 6HA 标签, 同时带有点突变的 Tip1 突变体的构建	42
2.14 有关带有基因型 tip1-6HA 的菌株的实验处理	43
2.15 蛋白体外结合(in vitro pull-down)	43
2.16 免疫共沉淀 (co-IP)	44
2.17 免疫印迹检测 (Western blot).....	44
2.18 酵母细胞 Calcofluor 染色	44
第三章 实验结果和分析	46
1 影响 Dma1 在细胞端部定位的因子的筛查.....	46
2 Dma1 与 Tip1 的相互作用依赖于 Dma1 的 FHA 结构域.....	51
3 细胞末端定位的 Dma1 通过泛素化 Tip1 来调控细胞的极性生长.....	53
3.1 强制增加 Tip1 在细胞端部的定位会造成细胞极性生长缺陷	53
3.2 增加 Dma1 在细胞端部的定位可以抑制由于端部 Tip1 的增加所造成的极	

性生长缺陷.....	55
4 Tip1 的磷酸化可能是其泛素化的前提.....	57
4.1 Tip1 中的 T299 和 S302 位点的磷酸化影响 Tip1 的泛素化修饰.....	57
4.2 CK1 激酶 Hhp2 影响 Tip1 的泛素化修饰	60
4.3 <i>hhp2</i> ⁺ 缺失后细胞端部的 Tip1 增加, 细胞呈现极性生长缺陷	61
5 去除 Tip1 的泛素化对细胞极性生长的影响.....	62
5.1 所有 25 个赖氨酸全部突变的 Tip1 不再被泛素化.....	62
5.2 第 244 位的赖氨酸(K244)是 Tip1 连接泛素的位点之一	64
5.3 不能被泛素化的 Tip1 导致细胞端部 Tip1 增加和极性生长缺陷	64
6 Tip1 的泛素化修饰对其蛋白水平的影响.....	65
第四章 讨论.....	67
参考文献.....	70
附录.....	75
致谢.....	78

Contents

Abbreviations VII

Chinase abstract IX

Abstract..... XI

Chapter 1 Introduction..... 1

1 Rho family GTPase Cdc42 and its regulators in polarized growth control.....2

2 The role of cell cytoskeleton in regulating polarized growth4

 2.1 Microtubule cytoskeleton and cell polarity.....4

 2.2 Actin cytoskeleton and cell polarity.....7

3 Exocytosis and endocytosis in cell polarity control8

4 The role of other factors in regulating polarized growth9

5 The multiple functions of Dma1 and potential connection between Dma1 and polarity factor Tip1 in fission yeast 10

 5.1 The multiple functions of Dma1 in fission yeast 10

 5.2 Potential connection between Dma1 and polarity factor Tip1 in fission yeast ...
..... 11

6 Purpose, contents and significance of this study12

Chapter 2 Materials and methods 13

1 Materials 13

 1.1 Bacterium strains 13

 1.2 Yeast strains 13

 1.3 Plasmids 19

 1.4 Primers 21

 1.5 Molecular tool enzymes 25

1.6 Reagents	25
1.7 Main instruments	26
1.8 Solutions and buffers	27
2 Methods	34
2.1 Construction of yeast strains	34
2.2 Fission yeast genomic DNA isolation	36
2.3 Transformation of fission yeast	36
2.4 Preparation of plasmid DNA	37
2.5 Gel extraction of DNA	38
2.6 Extraction of digested DNA fragment	39
2.7 Preparation of competent <i>E.coli</i> cells	39
2.8 Plasmid DNA transformation.....	40
2.9 PCR.....	40
2.10 Mutagenesis PCR	41
2.11 Restriction endonuclease digestion of DNA	41
2.12 DNA ligation.....	42
2.13 Construction of <i>tip1</i> mutations with 6HA tag	42
2.14 Method of treatments in strains with <i>tip1-6HA</i> for ubiquitination detection	43
2.15 In vitro pull-down	43
2.16 Co-immunoprecipitation (co-IP).....	44
2.17 Western blot.....	44
2.18 Calcofluor staining	44
Chapter 3 Results and analyses	46
1 Screening for factors that affect Dma1 localization at cell ends	46
2 Dma1 and Tip1 interacts via the FHA domain of Dma1	51
3 Cell end-localized Dma1 is involved in polar growth by regulating the ubiquitination of Tip1	53

3.1 Forced localization of Tip1 to cell ends by Tea1-GFP in combination with Tip1-GBP causes defects in polarized growth	53
3.2 Forced localization of Dma1 to cell ends can rescue defects in polarized growth caused by overexpression of Tip1	55
4 The phosphorylation of Tip1 maybe a premise for its ubiquitination	57
4.1 Phosphorylation of Tip1 at Thr299 and Ser302 is required for its ubiquitination	57
4.2 Casein Kinase I homolog Hhp2 is involved in the ubiquitination of Tip1	60
4.3 Deletion of Hhp2 increases Tip1 intensity at cell ends and shows defects in polarized growth	61
5 The effects of eliminating Tip1 ubiquitination on polarized growth.....	62
5.1 Mutating all 25 lysines of Tip1 eliminates the ubiquitination of Tip1	62
5.2 K244 at Tip1 is one of the lysines that link ubiquitin	64
5.3 Removing Tip1 ubiquitination increases Tip1 at cell ends and shows defects in polarized growth	64
6 Tip1 ubiquitination affects its protein level.....	65
Chapter 4 Discussion	67
References.....	70
Appendix	75
Acknowledgements	78

缩写词表

aPKC	a typical protein kinase C 非典型性蛋白激酶
AMPK	AMP-activated protein kinase AMP 激活的蛋白激酶
CoIP	co-immunoprecipitation 免疫共沉淀
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
FOA	5-Fluorouracil 5-氟尿嘧啶
GBP	GFP binding protein GFP 结合蛋白
GEF	guanine nucleotide exchange factor 鸟苷酸交换因子
GAP	GTPase activating protein GTP 酶激活蛋白
GFP	green fluorescent protein 绿色荧光蛋白
HU	Hydroxyurea 羟基脲
LatB	latrunculinB, 红海海绵素 B
LB	luria broth medium 肉汤培养基
NETO	New End Take Off 新末端起飞
OD	optical density 光密度
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
PI	protease inhibitor 蛋白酶抑制剂

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
+TIPs	plus-end tracking proteins 微管正极末端示踪蛋白复合物

摘要

细胞极性是大多数细胞的一个基本特征，细胞极性的建立是细胞周期中的重要事件。裂殖酵母 *S. pombe* 中的 CLIP170 家族蛋白 Tip1 能够监督微管使其沿着细胞的纵轴生长，并参与运输极性因子到达细胞端部的过程。人类肿瘤抑制因子 Chfr 同源蛋白 Dma1 是纺锤体检验点蛋白和胞质分裂的抑制因子。已有的研究发现它会泛素化修饰 SIN (septation initiation network) 通路中的 Sid4，导致 Plo1 激酶不能定位到 SPB (spindle pole body)，从而抑制 SIN 信号通路和阻止胞质分裂。

我们实验室的前期结果显示 Dma1 除定位在胞质、SPB 和中隔外，也定位在细胞生长端，并在细胞端部与 Tip1 共定位，两者在细胞内的相互作用也被证实，且 Tip1 的泛素化依赖于 Dma1 的 E3 泛素连接酶活性。本研究探讨了影响 Dma1 端部定位的可能因素，并通过大量突变体筛选，发现肌动蛋白斑的合成受阻会使 Dma1 端部定位的强度和范围扩大，并且 Dma1 的端部定位同时依赖于 Tip1 和 Pob1 两种蛋白。我们还证实了 Dma1 和 Tip1 的细胞内相互作用依赖于 Dma1 的 FHA 结构域。我们的研究发现强制增加细胞端部的 Tip1 会使细胞出现极性生长缺陷，而同时增强 Dma1 在细胞端部的定位则能够挽救这种极性生长缺陷表型。另外，我们还发现 Tip1 的 T299 和 S302 位点的磷酸化对于 Tip1 的泛素化是必需的，而 casein kinase I (CK1) 的同源蛋白 Hhp2 也参与 Tip1 的泛素化修饰，因而我们怀疑 CK1 通过磷酸化 Tip1 参与调控细胞的极性生长。

我们通过将 Tip1 中的全部 25 个 Lys 突变为 Arg 即 (Tip1^{25K→25R}) 以去除 Tip1 的泛素化修饰，发现 Tip1 的泛素化修饰发生在多个赖氨酸位点，并且 K244 是其中的一个位点。我们还发现，*hhp2Δ*、*tip1^{3A}* 和 *tip1^{25K→25R}* 突变体都会造成 Tip1 的端部积累，进而产生极性生长缺陷。这些结果说明 Tip1 的泛素化修饰会影响 Tip1 在细胞端部的动态水平进而调控细胞的极性生长，而这种泛素化修饰只介导一小部分 Tip1 的降解。

综上所述，我们提供了几个方面证据揭示出裂殖酵母 Dma1 通过泛素化 Tip1 参与细胞极性生长的可能机制，这对人们认识哺乳动物中极性生长调控机制具有重要的借鉴意义。

关键词：Dma1；Tip1；泛素化；极性生长

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Cell polarization is a major event of the cell cycle and underlies the function of most cells. In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, the microtubule plus end-tracking protein Tip1, a CLIP170 protein family member, is required to guide fission yeast cytoplasmic microtubules to their target zone located at the cell ends and involved in delivering cell polarity factors to cell tips. The human tumor suppressor Chfr's homologue Dma1 is a spindle checkpoint protein and cytokinesis inhibitor in fission yeast. Previous study showed that Dma1 ubiquitinates the SIN (separation initiation network) scaffold protein Sid4 to impede the mitotic localization of Plb1 kinase, and thus inhibits the SIN and prevents cytokinesis.

Our previous results revealed that Dma1 is also present at the growing ends of the cells in addition to cytoplasm, spindle pole body (SPB) and cell division sites and co-localizes with Tip1 at cell tips. We also confirmed that Dma1 indeed physically interacts with Tip1 *in vivo* and the ubiquitination of Tip1 is dependent on the E3 ligase activity of Dma1. In this study, we explored the possible factors that affect the localization of Dma1 at cell tips. We found that the disruption of the organization of actin patches causes spreading of Dma1 at cell tips, and Dma1 localization at cell ends depends on both Tip1 and Pob1 simultaneously. We showed that the interaction between Dma1 and Tip1 depends on the FHA domain of Dma1. When Tip1 levels at cell ends are artificially increased, cells develop defects in polarized growth. In addition, phosphorylation of Tip1 at both Thr 299 and Ser302 is required for its ubiquitination, and CK1 homolog Hhp2 affects ubiquitination of Tip1. Thus, we assume that Hhp2 possibly regulates polar growth of fission yeast through Tip1 phosphorylation.

Tip1 contains 25 lysines and mutating all 25 sites simultaneously eliminated the ubiquitination of Tip1. We found Tip1 is ubiquitinated through multiple lysine residues, and K244 is one of them required for Tip1 ubiquitination. Localization analysis indicated that Tip1 accumulated at cell ends in *hhp2Δ*, *tip1^{3A}*, *tip1^{25K→25R}* cells and these cells display polarized growth defects. These suggest that the

ubiquitination of Tip1 controls Tip1 level at cell ends and regulates the polar growth of fission yeast, while only a small portion of Tip1 is destined for degradation.

Taken together, our studies provided several lines of evidence and revealed a possible mechanism of Dma1 in regulation of cell polarized growth through ubiquitinating Tip1. These data also pave the way for better understanding of the mechanisms of polarized growth in mammalian and human cells.

Key words: Dma1; Tip1; ubiquitination; polarized growth

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 前言

极性是大多数细胞的一个基本特征。细胞极性生长在细胞分化、迁移、胞质分裂以及组织器官的形成等过程中起着关键性的作用^[1]。研究证明，细胞极性的建立和维持是一个被精确调控的复杂生物学过程，其核心调节机制从低等生物，如：酵母、线虫、果蝇到高等生物，如哺乳动物都是非常保守的。细胞进行对称性分裂，通过肌动蛋白胞质骨架和微管胞质骨架的共同作用来获得极性，分裂后会引引起细胞内细胞器和极性因子的不对称性分布，使细胞形成了极性的生长方式^[2]。现已发现，许多不同类型动物细胞的极性建立均受到一个进化上保守的蛋白复合体的调控，这个蛋白复合体是由非典型蛋白激酶 C (atypical kinase protein C, aPKC)和两个 PAR (Partitioning defective)支架蛋白 PAR6、PAR3 相互作用而组成，简称为 aPKC 复合体。aPKC 复合体中的 PAR6 作为接头分子进一步介导极性信号从小分子 GTPase Cdc42 向 aPKC 的传递。细胞在诱原(cue)的作用下，伴随信号通路和 CDC42/PAR-6/aPKC/PAR-3 四元复合体及其下游分子的共同作用，细胞极性逐步形成，但其分子机制还有待更详细的阐明^[3]。同时肌动蛋白和微管作为细胞骨架的主要成员，在控制细胞的极性建立和极性生长中扮演着关键的角色。由于越来越多的证据表明细胞极性蛋白的缺失、表达量上升或定位错误与癌症的发生和发展有关^[4]，因此深入研究细胞极性的分子调控机制不仅具有极其重要的生物学意义，同时也具有潜在的医学应用价值。

对于极性研究，裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)是一个极富吸引力的单细胞模式生物，不仅遗传背景简单，同时具有易培养、生长快、易于进行遗传杂交等优点。进行营养生长的裂殖酵母细胞呈规则的杆状，细胞形态比较稳定，一般直径为 3 μ m，长度在 8-14 μ m 变化，通过细胞端部的延长进行生长，并且这种生长受到细胞周期的调控^[5]。在裂殖酵母中，细胞极性是其形态维持和细胞分裂的基础，经过胞质分裂产生两个相同大小的子细胞，极性延伸和生长只发生在分裂前已存在的细胞末端，即“旧末端”(old end)；经过 G1、S 期，在 G2 期的某个时间点细胞的“新末端”(new end)才启动极性生长，称之

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.