

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_密级\_\_\_\_

学号: 21620131152604

UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

硕士学位论文

裂殖酵母中 Wee1 激酶蛋白稳定性调控机制的初步研究

A preliminary study on Wee1 kinase protein stability in  
fission yeast

邱翠

指导教师姓名: 靳全文 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2016 年 5 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期: 2016 年 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( )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

## 目 录

缩写词表.....	V
中文摘要.....	VI
英文摘要.....	VII
<b>一. 前言.....</b>	<b>1</b>
<b>1. 裂殖酵母细胞周期及有丝分裂 G2/M 期调控 .....</b>	<b>1</b>
1.1 裂殖酵母细胞周期.....	1
1.2 裂殖酵母细胞有丝分裂各时期 Cdk1 活性的调控.....	2
1.2.1 G1 期 Cdk1 活性的调控.....	3
1.2.2 S 期 Cdk1 活性的调控.....	3
1.2.3 G2/M 过渡时 Cdk1 活性的调控.....	4
<b>2. Wee1 蛋白激酶及其调控 .....</b>	<b>5</b>
2.1 Wee1 蛋白激酶.....	5
2.2 细胞周期 Wee1 蛋白激酶的调控.....	6
2.2.1 Wee1 蛋白稳定性的调控.....	6
2.2.2 Wee1 蛋白在细胞内定位的调控.....	7
2.2.3 Wee1 激酶协调细胞生长与细胞分裂的机制.....	8
<b>3. 蛋白激酶 CK2 及其对细胞周期的调控 .....</b>	<b>9</b>
3.1 CK2 蛋白激酶.....	9
3.2 蛋白激酶 CK2 在细胞周期调控中的作用 .....	10
3.2.1 人类细胞 CK2 $\beta$ 调节亚基参与细胞有丝分裂 G2/M 期的过渡.....	10
3.2.2 CK2 激酶参与芽殖酵母细胞周期 G1/S、G2/M 期的调控 .....	11
3.2.3 CK2 激酶调节细胞周期关键磷酸酶 Cdc25.....	11
<b>4. SCF 依赖性的蛋白泛素化降解.....</b>	<b>12</b>
4.1 蛋白的泛素化降解.....	12
4.2 SCF E3 泛素连接酶.....	13
<b>5. 裂殖酵母核仁蛋白 Dnt1 负调控 Wee1 蛋白水平 .....</b>	<b>15</b>
<b>6. 裂殖酵母纺锤体极体 SPB .....</b>	<b>15</b>
6.1 纺锤体极体 SPB .....	15
6.2 裂殖酵母细胞中 SPB 在 G2/M 过渡中的作用 .....	16

7. 本论文的研究目的、内容及意义 .....	17
<b>二. 材料与amp;方法 .....</b>	<b>19</b>
1. 材料 .....	19
1.1 大肠杆菌菌株.....	19
1.2 酵母菌株.....	19
1.3 质粒.....	26
1.4 引物.....	27
1.5 分子生物学工具酶.....	29
1.6 主要试剂与耗材.....	29
1.7 主要仪器及设备.....	30
1.8 常用培养基、主要缓冲溶液的配制.....	31
1.8.1 常用培养基的配制.....	31
1.8.2 主要缓冲溶液的配制.....	34
2. 方法 .....	36
2.1 裂殖酵母菌株的构建.....	36
2.2 裂殖酵母基因组提取—破碎法.....	37
2.3 裂殖酵母转化.....	38
2.4 质粒 DNA 的制备.....	39
2.5 琼脂糖胶回收 DNA 片段.....	40
2.6 PCR 产物纯化回收.....	40
2.7 大肠杆菌感受态细胞的制备.....	41
2.8 质粒 DNA 的细菌转化.....	41
2.9 常规 PCR.....	42
2.10 菌落 PCR.....	42
2.11 定点诱变 PCR.....	42
2.12 DNA 限制性内切酶酶切反应.....	43
2.13 DNA 连接.....	44
2.14 T-type cloning 构建质粒载体 .....	44
2.15 Drop Test 实验.....	45
2.16 细胞长度的测量.....	45

2.17 细胞荧光信号的观察.....	45
2.18 温度敏感性菌株的处理.....	46
2.19 nmt1 系列启动子的诱导表达 .....	46
2.20 荧光素酶活性的测定.....	46
<b>三. 结果与分析 .....</b>	<b>48</b>
1. 裂殖酵母中 Wee1 的泛素化降解依赖于 SCF <sup>Pof3</sup> 和 SCF <sup>Pof1</sup> .....	48
1.1 SCF 突变体 <i>skp1-A7</i> 对 Wee1 过表达敏感 .....	48
1.2 裂殖酵母中负责降解 Wee1 的 F-box 蛋白主要为 Pof3 和 Pof1.....	50
1.3 Wee1 过表达加强 <i>pof3Δ</i> 突变体生长缺陷和 G2/M 过渡缺陷.....	52
1.4 <i>skp1-A7</i> 和 <i>pof3Δ</i> 均增强 <i>cdc25-22</i> 突变体的 G2/M 过渡缺陷.....	54
2. CK2 影响 Wee1 蛋白水平 .....	56
2.1 CK2 突变引起 Wee1 水平升高, CK2 过表达则引起 Wee1 蛋白水平下降.....	56
2.2 CK2 激酶突变体对于 Wee1 过表达敏感 .....	59
2.3 CK2 突变体加强 <i>cdc25-22</i> 突变体的温度敏感性 .....	61
3. 通过定点突变寻找 Wee1 中潜在的 CK2 磷酸化位点.....	62
4. Dnt1 可能通过影响 CK2 的定位调控 Wee1 蛋白水平 .....	65
4.1 <i>dnt1Δ</i> 细胞中 CK2 更多地入核 .....	65
4.2 将 Wee1 强制定位于 SPB 或细胞核内对于 G2/M 过渡的影响.....	67
4.3 CK2 强制定位于 SPB 对 <i>dnt1Δ</i> 细胞中 Wee1 蛋白水平的影响 .....	69
<b>四. 讨论.....</b>	<b>72</b>
1. Wee1 蛋白降解机制的保守性 .....	72
2. Dnt1 对 Wee1 的调控作用.....	74
<b>参考文献.....</b>	<b>77</b>
<b>附录.....</b>	<b>82</b>
1. Dnt1 对影响 Pof3 的定位 .....	82
2. 不同水平过表达 Pof3 且将其强制定位于不同的亚细胞位置对细胞长度的影响 .....	83

2.1 Pof3 过表达且强制定位于不同亚细胞位置对细胞长度的影响	83
2.2 不同水平过表达 Pof3 对细胞长度的影响	85
<b>致谢</b>	<b>86</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## Contents

<b>Abbreviations .....</b>	<b>V</b>
<b>Chinese abstract .....</b>	<b>VI</b>
<b>English abstract.....</b>	<b>VII</b>
<b>Chapter 1 Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Cell cycle and mitotic G2/M regulation in fission yeast .....</b>	<b>1</b>
1.1 Cell cycle in fission yeast .....	1
1.2 Cdk1 activity regulations in fission yeast cell cycle.....	2
1.2.1 The regulation of Cdk1 in G1 phase .....	3
1.2.2 The regulation of Cdk1 in S phase.....	3
1.2.3 The regulation of Cdk1 at G2/M transition.....	4
<b>2. Wee1 kinase and its regulation in cell cycle.....</b>	<b>5</b>
2.1 Wee1 kinase .....	5
2.2 Regulation of Wee1 in cell cycle .....	6
2.2.1 Stability regulation of Wee1 .....	6
2.2.2 Localization regulation of Wee1 .....	7
2.2.3 Mechanism of Wee1 kinase coordinating cell cycle and cell growth .....	8
<b>3. CK2 kinase and its role in cell cycle regulation.....</b>	<b>9</b>
3.1 CK2 Kinase.....	9
3.2 The role of CK2 in cell cycle regulation.....	10
3.2.1 Somatic CK2 $\beta$ participates in G2/M transition.....	10
3.2.2 CK2 participate in G1/S and G2/M transition .....	11
3.2.3 CK2 regulates the activitiy of critical phosphatase Cdc25 .....	11
<b>4. The SCF dependent of ubiquitin-mediated protein degradation .....</b>	<b>12</b>
4.1 The ubiquitin-mediated protein degradation.....	12
4.2 SCF E3 ubiquitin ligase .....	13
<b>5. Nucleolar proteins Dnt1.....</b>	<b>15</b>
<b>6. Fission yeast spindle pole body SPB.....</b>	<b>15</b>
6.1 Fission yeast spindle pole body SPB .....	15
6.2 The role of SPB in G2/M transition in fission yeast .....	16



7. Contents and significance of this study .....	17
<b>Chapter 2 Materials and methods.....</b>	<b>19</b>
<b>1. Materials .....</b>	<b>19</b>
1.1 Bacterium strain .....	19
1.2 Yeast strains.....	19
1.3 Plasmids .....	26
1.4 Primers .....	27
1.5 Molecular tool enzymes .....	29
1.6 Reagents .....	29
1.7 Instruments.....	30
1.8 Media and buffers .....	31
1.8.1 Media .....	31
1.8.2 Buffers.....	34
<b>2. Methods.....</b>	<b>36</b>
2.1 Construction of yeast strains .....	36
2.2 Fission yeast genomic DNA isolation.....	37
2.3 Transformation of fission yeast.....	38
2.4 Preparation of plasmid DNA .....	39
2.5 Gel extraction of DNA.....	40
2.6 Extraction of digested DNA fragment .....	40
2.7 Preparation of competent E.coli cells .....	41
2.8 Plasmid DNA transformation.....	41
2.9 PCR.....	42
2.10 Colony PCR .....	42
2.11 Mutagenesis PCR.....	42
2.12 DNA digestion with restriction endonuclease.....	43
2.13 DNA ligation.....	44
2.14 Plasmid construction with T-type cloning.....	44
2.15 Drop test.....	45
2.16 Measurement of cell length.....	45

2.17 Fluorescence microscopy .....	45
2.18 Handling the temperature sensitive strains .....	46
2.19 Induction of <i>nmt1</i> promoter in EMM5S .....	46
2.20 Quantification of luciferase activity .....	46
<b>Chapter 3 Results and analyses .....</b>	<b>48</b>
<b>1. Wee1 degradation is dependent on the SCF<sup>Pof3/Pof1</sup> in fission yeast .....</b>	<b>48</b>
1.1 SCF mutant <i>skp1-A7</i> is sensitive to Wee1 overexpression .....	48
1.2 Pof3 and Pof1 are two major F-box proteins responsible for Wee1 degradation in fission yeast .....	50
1.3 <i>pof3Δ</i> mutant are sensitive to Wee1 overexpression and enhance G2/M transition defects .....	52
1.4 <i>skp1-A7</i> and <i>pof3Δ</i> enhance G2/M transition defects in <i>cdc25-22</i> .....	54
<b>2. CK2 affects Wee1 stability .....</b>	<b>56</b>
2.1 Wee1 is stabilized in CK2 mutants and degraded upon CK2 overexpression .....	56
2.2 CK2 mutants are sensitive to Wee1 overexpression .....	59
2.3 CK2 mutants enhance temperature sensitivity and G2/M transition defects in <i>cdc25-22</i> cells .....	61
<b>3. Screening of the potential CK2 phosphorylation sites in Wee1 through site- specific mutagenesis .....</b>	<b>62</b>
<b>4. Dnt1 possibly influences Wee1 stability through controlling the localization of CK2 .....</b>	<b>65</b>
4.1 CK2 is enriched in nuclei in <i>dnt1Δ</i> cells .....	65
4.2 Effect of artificial targeting of Wee1 at SPB or in nucleus on G2/M transition .....	67
4.3 Effect of artificial targeting of CK2 to different subcellular loci on Wee1 stability in <i>dnt1Δ</i> cells .....	69
<b>Chapter 4 Discussion .....</b>	<b>72</b>
<b>1. Conservative mechanism of Wee1 degradation .....</b>	<b>72</b>

2. Dnt1 regulates Wee1 stability.....74

**References .....77**

**Appendix .....82**

1. Dnt1 affects the localization of Pof3 .....82

2. Cell length upon overexpression of different levels of Pof3 and targeted to different subcellular loci .....83

    2.1 Cell length with Pof3 targeted to different subcellular loci .....83

    2.2 Cell length upon overexpression of different levels of Pof3 .....85

**Acknowledgements .....86**

厦门大学博硕士学位论文摘要

## 缩写词表

- APC: anaphase promoting complex 促后期复合体
- CDK: cyclin-dependent kinase 周期蛋白依赖性蛋白激酶
- CK2: casein kinase II II型酪蛋白激酶
- 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
- E.coli: Escherichia coli 大肠杆菌
- EB: ethidium bromide 溴化乙啶
- EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid 乙二胺四乙酸
- MPF: maturation promoting factor 促成熟因子
- GFP: green fluorescent protein 绿色荧光蛋白
- GBP: GFP binding protein 绿色荧光蛋白结合蛋白
- OD: optical density 光密度
- LB: luria broth medium 肉汤培养基
- PBD: Plk1 binding domain Plk1结合结构域
- PCR: polymerase chain reaction 聚合酶链式反应
- mRNA: messenger ribonucleic acid 信使核糖核酸
- SPB: spindle pole body 纺锤体极体
- SIN: septation initiation network 裂殖酵母中隔起始信号途径

## 摘要

Wee1 作为真核生物中调控细胞有丝分裂 G2/M 期过渡的重要激酶，它的功能可以被 Cdc25 磷酸酶所拮抗。如果细胞中的 Wee1 蛋白水平或者活性过高，细胞进入有丝分裂期延迟；而反之则 G2 期缩短，细胞提前进入有丝分裂期，因此在整个细胞周期中 Wee1 受到了非常精细地调控。高等生物中的研究表明，Wee1 蛋白水平和稳定性受到了 SCF 的调控。为了研究裂殖酵母中参与调控 Wee1 激酶蛋白水平的细胞因子，本研究以裂殖酵母这一经典的单细胞真核生物为模式生物，开展了对有丝分裂 G2/M 过渡时期参与调控 Wee1 蛋白水平的因子的研究。

首先，我们研究了目前已知的裂殖酵母中的 F-box 蛋白对于 Wee1 激酶蛋白水平的影响。通过 Dual-Luciferase 检测系统测量这些 F-box 蛋白缺失或突变体细胞中 Wee1 的蛋白水平，我们筛选到了影响 Wee1 蛋白水平的 F-box 蛋白为 Pof3 和 Pof1，并且发现当 Pof3 缺失或者 Pof1 突变时，细胞出现了 G2/M 过渡缺陷。

其次，我们还发现与高等生物类似，裂殖酵母中的 CK2 激酶也是参与对 Wee1 蛋白稳定性的调控。当 CK2 激酶缺失或突变时，细胞中 Wee1 蛋白水平升高；而当 CK2 过表达时，细胞中 Wee1 的蛋白水平下降。另外我们还尝试了寻找 Wee1 中潜在的 CK2 磷酸化位点，尽管目前我们还没有最终确定 Wee1 被 CK2 磷酸化的位点，但是我们通过 GFP-GBP 强制定位系统改变 CK2 激酶的亚细胞定位发现：虽然过多地把 CK2 定位于 SPB 上不能进一步降低 CK2 过表达细胞中的 Wee1 蛋白水平，但是将过表达的 CK2 强制定位于细胞核基质内会导致细胞中 Wee1 蛋白水平无法下降。

我们实验室已有的研究表明，核仁蛋白 Dnt1 参与负调控 Wee1 蛋白水平，但其机制不甚清楚。本研究发现 Dnt1 能够影响 CK2 催化亚基 Cka1 的定位，在 *dnt1Δ* 细胞中 Cka1 更多地集中到细胞核内而在胞质侧的 SPB 上定位减少，当在 *dnt1Δ* 细胞中表达入核序列突变的 Dnt1 时，我们发现 Dnt1 入核序列突变的细胞中 Cka1 在 SPB 上的定位同样比野生型的低。另外，我们还发现当 CK2 激酶被强制定位到 SPB 上时 *dnt1Δ* 突变体细胞中 Wee1 的蛋白水平被下调，说明 Dnt1 很有可能是通过调控 CK2 激酶在 SPB 上的定位来影响 Wee1 的蛋白水平的。

**关键词：**Wee1、G2/M 期转换、F-box 蛋白、CK2、Dnt1

## Abstract

Wee1 is an important kinase in the eukaryotes and plays a vital role in mitosis G2/M transition. Its effect is counteracted by phosphatase Cdc25. When the cellular Wee1 protein level or activity is high, mitotic entry is delayed. Conversely, when Wee1 is lower, G2 phase is shortened and M phase is prematurely initiated. So Wee1 kinase is accurately regulated in the whole cell cycle. The studies in higher eukaryotes show that the Wee1 protein stability is controlled by SCF E3 ubiquitin ligase. In order to study the factors involved in stability control of Wee1, we used the unicellular eukaryote fission yeast as the model organism to explore the factors involved in the regulation of Wee1 at G2/M transition.

First, we examined whether the known F-box proteins in the fission yeast influence the protein levels of Wee1. Through measuring the Wee1 protein levels by dual-luciferase assay system, we found that Pof3 and Pof1 are the major F-box proteins responsible for Wee1 protein degradation. Both *pof3* deletion and *pof1* ts mutants are delayed in G2/M transition.

Second, we found, similarly to higher eukaryotes, CK2 kinase is also participated in the regulation of Wee1 protein stability in fission yeast. In CK2 kinase mutants, the Wee1 protein levels are elevated. Conversely when the CK2 is over-expressed, Wee1 level is declined. In addition, we tried to search for the potential CK2 target phosphorylation sites in Wee1, although we did not identify any target sites. However, by changing the subcellular localization of CK2 kinase through GFP-GBP system, we found excessive CK2 localized on SPB does not further reduce the Wee1 protein levels, whereas when CK2 is restrained to nucleus, Wee1 level cannot be decreased.

Our previous studies showed that, the nucleolar protein Dnt1 is involved in the negative regulation of Wee1 protein stability. However, its regulating mechanism is still unclear. In this study, we found that Dnt1 can influence the localization of Cka1 which is the catalytic subunit of CK2 kinase. In *dnt1*Δ cells, Cka1 is more enriched in nucleus and its localization at cytoplasmic side of SPB is decreased. Upon expression of Dnt1

carrying NLS mutations in *dnt1*Δ cells, we found that Cka1 localize at SPB inefficiently. In addition, we also found that when CK2 kinase is forced to be targeted to SPBs, Wee1 protein level is down-regulated, suggesting that Dnt1 likely affects Wee1 protein level through influencing localization of CK2 at SPB.

**Key words:** Wee1; G2/M; F-box; CK2; Dnt1.

厦门大学博硕士论文摘要库

## 一. 前言

众所周知，有丝分裂是真核生物细胞一项基本的生命活动，是一连串复杂的细胞生物学事件正常有序进行的过程，而细胞周期调控则是为这一程序性过程的正确发生提供保障。正常情况下，细胞在周期时相的变迁中进行生长、复制、分裂、衰老和死亡等生理活动。如果细胞周期调控不当，出现紊乱或不平衡，细胞将进入病理状态，就会产生细胞转化和癌变。

癌症的发生和发展涉及众多的基因突变，并通过进化选择成为最具侵袭性的肿瘤表型。癌症的几种重要特质，如：漠视增殖、分化停止信号的存在；具备无限增殖的能力；逃避凋亡；侵袭性等都与细胞周期密切相关。因此，对细胞周期的深入研究为癌症的治疗提供了新思路，为诊断及临床治疗提供了新策略。正确认识细胞的分裂和变异，对于了解生物体的正常生理活动，尤其对于掌握病理情况下的细胞行为改变，具有非常重要的意义，所以细胞周期调控也成为生命科学发展中一个重要的研究领域。

裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)作为经典的实验材料，在细胞分裂与细胞周期研究方面有着其独特的优势，如：易培养、细胞周期短、易分离突变体、遗传学、生物化学及分子生物学操作性强等。特别是其全基因组测序已经完成多年、遗传背景清晰，并且很多人类基因在酵母中又都可以找到同源基因，这使得在酵母中研究与人类疾病相关基因的功能有着特殊的意义，因而引发了研究者广泛的兴趣，成为细胞周期调控研究领域一种广受欢迎的模式生物<sup>[1]</sup>。

### 1. 裂殖酵母细胞周期及有丝分裂 G2/M 期调控

#### 1.1 裂殖酵母细胞周期

裂殖酵母细胞属于单细胞真核生物，是一类非常经典的模式生物，其细胞呈长棒状，主要通过依赖于端部延伸的方式进行生长<sup>[2, 3]</sup>，而细胞的繁殖主要依靠有性生殖和无性繁殖两种方式。正常情况下裂殖酵母细胞繁殖后代主要是通过有丝分裂进行，而当环境中的营养条件发生改变，氮元素的含量减少或者缺失时便会进行性别的分化从而进入减数分裂<sup>[4, 5]</sup>。裂殖酵母细胞有丝分裂的细胞周期如



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.