

促进染色质转录因子亚基Pob3调控嗜热四膜虫有性生殖过程

陈虹宇¹ 许静^{1,2} 薄涛¹ 连荫杰¹ 郝惠娟¹ 王伟^{1*}

(¹山西大学生物技术研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006;

²山西大学生命科学学院, 太原 030006)

摘要 促进染色质转录因子(facilitate chromatin transcription, FACT)在DNA复制、转录、损伤修复相关的染色质重塑过程发挥重要的作用。FACT复合物包含POB3/SSRP1(structure-specific recognition protein-1)和SPT16(suppressor of Ty 16)两个亚基, 该复合物及其亚基的功能虽在真菌、植物和动物上有些研究, 但具体功能仍不完全清楚。该文以原生动物四膜虫为研究对象, 对其促进染色质转录因子亚基Pob3进行研究。结果显示, 嗜热四膜虫FACT复合物中的POB3基因在营养生殖时期和饥饿时期表达, 在有性生殖时期表达上调。在生长期和饥饿期, Pob3定位于亲本大核和小核上; 在有性生殖时期, Pob3定位于功能小核和新大核, 在降解的小核和降解的亲本大核中定位消失。截短N-端的HA-Pob3 Δ 33在有性生殖前期定位在细胞质, 但在有性生殖后期定位在配子和新发育的大核。截短C-端的HA-Pob3 Δ 87只定位在细胞质。POB3敲减突变株发生了异常的配子核和合子核的有丝分裂, 导致有性生殖无法正常完成。结果表明, 促进染色质转录因子亚基Pob3参与调控嗜热四膜虫细胞核的有丝分裂, 对有性生殖的完成是必需的。

关键词 嗜热四膜虫; Pob3; 细胞定位; 突变; 有性生殖

Facilitate Chromatin Transcription Complex Subunit Pob3 Regulates Sexual Reproduction in *Tetrahymena thermophila*

CHEN Hongyu¹, XU Jing^{1,2}, BO Tao¹, LIAN Yinjie¹, HAO Huijuan¹, WANG Wei^{1*}

(¹Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; ²College of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract The FACT (facilitate chromatin transcription) complex is involved in chromatin remodeling during transcription, replication, and DNA repair. FACT contains two subunits: POB3/SSRP1 (structure-specific recognition protein-1) and SPT16 (suppressor of Ty 16). Although the function of the complex has been studied in fungi, plants, and animals, it's function is not completely clear. *Tetrahymena thermophila* contains two different nucleus and changes chromatin structure during sexual development stage. In the study, we found POB3 expressed at a lower level in the vegetative growth stage and starvation stage, and highly expressed throughout conjugation stage in *T. thermophila*. HA-Pob3 localized in the parental macronucleus and micronucleus during the growth and starvation

收稿日期: 2019-12-15 接受日期: 2020-02-20

国家自然科学基金项目(批准号: 31872224、31471999)和山西省自然科学基金(批准号: 201901D111008)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0351-7011499, E-mail: gene@sxu.edu.cn

Received: December 15, 2019 Accepted: February 20, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31872224, 31471999) and the Natural Science Foundation of Shanxi (Grant No.201901D111008)

*Corresponding author. Tel: +86-351-7011499, E-mail: gene@sxu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5218>

stage and localized in the new macronuclei and micronuclei during sexual developmental stage. Micronuclear staining was stronger than macronuclear signal through sexual developmental stage. Truncated HA-Pob3 Δ 33 localized in the cytoplasm in the early sexual reproduction, but occurred in the selected gametic nuclei and new macronuclei in the late sexual reproduction. Truncated HA-Pob3 Δ 87 localized only in the cytoplasm throughout sexual reproduction stage. *POB3* knockdown mutants failed to complete gametic mitosis and zygotic mitosis, which aborted sexual reproduction progress. The results showed that Pob3 regulated nuclear mitosis and was required for normal sexual reproduction progress in *T. thermophila*.

Keywords *Tetrahymena thermophila*; Pob3; localization; mutation; sexual reproduction

真核生物DNA和组蛋白八聚体组成核小体,核小体进一步螺旋缠绕形成高度折叠的染色质结构^[1]。染色质高级结构阻碍了DNA的转录、复制和损伤修复过程^[2]。ATP依赖的染色质重塑因子和组蛋白分子伴侣动态调控了核小体和染色体的结构^[3]。促进染色质转录因子(facilitate chromatin transcription, FACT)复合物是由POB3/SSRP1和SPT16两个亚基组成^[4]。FACT在调节基因转录、复制和损伤修复等方面都发挥着重要的作用^[5]。FACT复合物和H2A-H2B异二聚体结合形成稳定的复合物,促进基因的转录^[6]。通过干扰核小体中组蛋白-组蛋白和组蛋白-DNA之间的相互作用,重塑核小体。在DNA复制过程中,FACT复合物将H2A-H2B异二聚体和H3-H4四聚体呈递到DNA上,促进染色质重新组装。酵母*Pob3*敲除导致染色体的不稳定性^[7]。拟南芥Pob3参与H2A.X在DNA损伤修复过程中的整合和解离^[8],抑制基因转录起始位点以及昼夜节律的调节和花青素生物合成基因的应激诱导表达^[9]。人的Pob3募集到DNA损伤的位点,参与碱基切除修复^[10]。

嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)是一种纤毛类的单细胞真核生物,具有纤毛虫典型的核的二态性。在营养生长期,细胞进行二分裂,小核进行有丝分裂,大核进行无丝分裂;在有性生殖时,不同性别的细胞进行配对,小核经过减数分裂形成4个原核,4个原核选择其中的1个作为配子原核,其他3个降解。选择的配子原核通过复制和有丝分裂形成2个配子核,配子核相互交换融合形成合子核,合子核进行2次有丝分裂形成2个新的大核和2个新的小核,亲本大核凋亡。四膜虫细胞核发育的独特特征使其成为研究组蛋白分子伴侣在染色质组装中如何发挥功能的重要模式体系^[11-13]。嗜热四膜虫含有进化保守的FACT复合物,然而该复合物及其亚基在细胞中的具体功能并不清楚,本研究首次对FACT复合物亚

基Pob3在四膜虫中的功能进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料与方法

不同交配型的嗜热四膜虫B2086(交配型II)、CU428(交配型VII)和CU427(交配型VI)由四膜虫保藏中心提供(美国康奈尔大学)。DNA胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、pGM-Simple-T Fast连接试剂盒购自TIANGEN公司;T4 DNA连接酶、限制性内切酶购自Thermo公司;巴龙霉素购自上海生工生物工程有限公司;两性霉素、氨苄青霉素、链霉素购自Solarbio公司;胰蛋白胨、豚蛋白胨、酵母提取物购自英国Oxoid公司;多聚赖氨酸购自天津灏洋生物制品公司;山羊血清购自北京博士德生物工程有限公司;牛血清白蛋白购自Promega公司;HA兔源多抗、FITC标记羊抗兔二抗购自美国Millipore公司;反转录试剂盒和qRT-PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司;Hoechst33342、单丹磺酰尸胺、NiCl₂·6H₂O购自Sigma公司;DNA测序和引物合成上海生工生物工程有限公司完成。

1.2 嗜热四膜虫细胞的培养、饥饿和交配

嗜热四膜虫培养在1×SPP(含1%胰蛋白胨、1%豚蛋白胨、0.1%酵母提取物、0.2%葡萄糖、0.003% EDTA铁盐)液体培养基,30℃生长至对数生长期(2.5×10⁵~5.0×10⁵个/mL),不同交配型嗜热四膜虫细胞在10 mmol/mL Tris-HCl(pH7.4)中饥饿18~24 h,调整细胞浓度到2.0×10⁵~2.5×10⁵个/mL,两种交配型的细胞按照1:1比例混合后,30℃静置培养,进行有性生殖^[14]。

1.3 序列分析比对

以酵母和人Pob3蛋白序列在四膜虫基因组数据库(<http://www.ciliate.org>)中进行blastp比对分析,查找其同源序列。其他物种Pob3蛋白序列由NCBI

数据库获得,多序列比对及进化树分析使用 DNA MAN软件。

1.4 重组质粒pXS-POB3、pXS-POB3Δ33、pXS-POB3Δ87的构建

以嗜热四膜虫基因组 DNA 为模板,引物 OE-POB3-F/OE-POB3-R(文中所用引物见表 1)扩增 POB3 基因,PCR 扩增产物回收,并与 pGM-Simple-T 载体连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5α,筛选获得重组质粒 pGM-T-POB3,测序。BamH I 和 Sgs I 分别对质粒 pXS75 和 pGM-T-POB3 进行双酶切,回收载体与目的片段, T4 DNA 连接酶连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5α,筛选获得重组质粒 pXS-POB3。以 pGM-T-POB3 为模板,引物 OE-POB3Δ33-F/OE-POB3-R 扩增 POB3Δ33,将 PCR 扩增产物回收,并与 pGM-Simple-T 载体连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5α,筛选获得重组质粒 pGM-T-POB3Δ33,测序。BamH I 和 Sgs I 分别对质粒 pXS75 和 pGM-T-POB3Δ33 进行双酶切,回收载体与目的片段, T4 DNA 连接酶连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5α,筛选获得重组质粒 pXS-POB3Δ33。以 pGM-T-POB3 为模板,引物 OE-POB3-F/OE-POB3Δ87-R 扩增 POB3Δ87,将 PCR 扩增产物回收,并与 pGM-Simple-T 载体连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5α,筛选获得重组质粒 pGM-T-POB3Δ87,测序。BamH I 和 Sgs I 分别对质粒 pXS75 和 pGM-T-POB3Δ87 双酶切,回收载体与目的片段, T4 DNA 连接酶连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5α,筛选获得重组质粒 pXS-POB3Δ87。

1.5 重组质粒 pNeo4-POB3 和 pPOB3hpNEO 的构建

以嗜热四膜虫基因组为模板,引物 KO-POB3-5'-F/R 和 KO-POB3-3'-F/R 分别扩增 POB3 基因上游 971 bp 的侧翼序列和下游 1 092 bp 的侧翼序列,扩增产物分别与 pGM-Simple-T 连接。连接产物分别转化大肠杆菌 DH5α,筛选获得重组质粒 pGM-T-POB3-5' 和 pGM-T-POB3-3', Xho I 和 Kpn I 切割重组质粒 pGM-Simple-T-POB3-3' 和 pNeo4,目的片段回收后 T4 DNA 连接酶 16 °C 过夜连接并转化,筛选得到阳性克隆并提取质粒 pNeo4-POB3-3'。Sac I 和 Not I 切割质粒 pNeo4-POB3-3' 和 pGM-T-POB3-3',回收目的片段。T4 DNA 连接酶连接并转化大肠杆菌 DH5α,筛选阳性克隆,提取获得重组质粒 pNeo4-POB3。

以嗜热四膜虫基因组为模板,引物 RNAi-POB3-F1/R1 和 RNAi-POB3-F2/R2 分别扩增 482 bp

的目的片段,胶回收后分别与 pGM-Simple-T 连接,转化大肠杆菌 DH5α,筛选获得重组质粒 pGM-T-POB3-1 和 pGM-T-POB3-2。用 Pst I 和 Sma I 切割重组质粒 pGM-Simple-T-POB3-1 和干扰载体,胶回收后用 T4 DNA 连接酶 16 °C 过夜连接并转化大肠杆菌 DH5α,筛选获得阳性克隆细胞株并提取质粒 pPOB3-1-NEO。用 BamH I 和 Pme I 切割重组质粒 pGM-T-POB3-2 和 pPOB3-1-NEO,胶回收后用 T4 DNA 连接酶 16 °C 过夜连接并转化大肠杆菌 DH5α,筛选获得阳性克隆细胞株,提前获得重组质粒 pPOB3hpNEO。

1.6 细胞转化及突变株的筛选

重组质粒 pXS-POB3、pXS-POB3Δ33 和 pXS-POB3Δ87 使用 Sac I 和 Xho I 切割,重组质粒 pNeo4-POB3 使用 Sac I 和 Kpn I 切割,重组质粒 pPOB3hpNEO 使用 Xho I 和 Not I 切割。将线性化质粒分别浓缩,调整 DNA 浓度为 1.0~1.5 μg/μL,将浓缩的目的片段用高压气体基因枪 GJ-1000(宁波新芝生物科技股份有限公司)转化不同交配型的嗜热四膜虫细胞。经巴龙霉素抗性浓度梯度筛选阳性克隆细胞株,PCR 分析鉴定,获得突变细胞株。

1.7 间接免疫荧光定位和活细胞染色

收集 2.5×10^5 个细胞固定于 Lavdowsky 固定液(乙醇:甲醛:乙酸:灭菌水=50:10:1:39)中,4 °C 过夜,固定后的细胞平铺于包被多聚赖氨酸的盖玻片,用 50 μL 的 PBS 封闭液(3% BSA、10% 山羊血清和 0.1% Tween-20 的 PBS)封闭 2 h。HA 兔源一抗(1:100)在 4 °C 过夜孵育细胞,再用稀释的 FITC 标记的羊抗兔二抗(1:2 000)于室温避光孵育 1 h。DAPI(1 μg/mL)室温染色 10 min 后封片。在 Delta Vision 显微镜(GE Healthcare)下成像观察^[15]。

用自噬体染色剂单丹磺酰尸胺(monodansylcadaverine, MDC, 0.1 mmol/L)和 DNA 染料 Hoechst33342(10 μg/mL) 37 °C 避光孵育细胞 5 min,然后 NiCl₂·6H₂O(1 mmol/L)处理 10 min,激光共聚焦显微镜(Olympus FV1000)观察^[16]。

1.8 实时荧光定量 PCR

提取总 RNA,42 °C 孵育 2 min,随后 60 °C 孵育 5 min,去除基因组污染;55 °C 30 min,85 °C 5 min,反转录获得 cDNA。StepOnePlus™ Real-Time PCR System 进行 Real time PCR 反应,17S rRNA 作内参,引物 RT-POB3-F/RT-POB3-R 以及 17S-F/17S-R 扩增目标基因和内参

表1 实验所用的引物

Table 1 Primers used in the experiment

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primers (5'→3')
OE-POB3-F:	<u>GGA TCC</u> ATG AGT GAT AGG TGT TAT AAA GGT GT
OE-POB3-R:	<u>GCG GCG CCT</u> CAT TAT TCA AAA TCT TCA TCT TCA TCT
OE-POB3Δ33-F:	<u>GGA TCC</u> TCT TTA AAG AAA TTC ACA AAC TCT ACT G
OE-POB3Δ87-R:	<u>GCG GCG CCA</u> TAT GTA ATC TTA ATA TTT TTA GAT TTA AAG
MTTI-F:	GCT ACG TGA TTC ACG ATT TAT GCA ATC
MTTI-R:	CGA AAC TGA TTT TAT GCA ATT ATG AAT TAC
KO-POB3-5'-F:	<u>GAG CTC</u> GTT TGT ATA TTT CGG TGG AAT GCA C
KO-POB3-5'-R:	<u>GCG GCC GCT</u> CTG TCA ATC AGA ATT CAA TAT AAT CAG
KO-POB3-3'-F:	<u>CTC GAG</u> TTA CGA ACT AGG AAT TTT ATG TAA TC
KO-POB3-3'-R:	<u>GGT ACC</u> CTA AAC CTA TCA TTA CCT ATA TGA C
JD-KO-POB3-F:	GTC TGA TTA TAT TGA ATT CTG ATT GAC
JD-KO-POB3-R:	AGT ATT CGG ATA GAA TTA ATT ATC
RNAi-POB3-F1:	<u>CTG CAG</u> ATA ATG TAT AAA TCA TCA TGC CTG CTG
RNAi-POB3-R1:	<u>CCC GGG</u> CAT CCT CAT CAT CAA AAG TGG CTC
RNAi-POB3-F2:	<u>GGA TCC</u> ATA ATG TAT AAA TCA TCA TGC CTG CTG
RNAi-POB3-R2:	GTT TAA ACC ATC CTC ATC ATC AAA AGT GGC TC
qRT-POB3-F:	CAT GCC TGC TGG TTT CTA AAG CTC TG
qRT-POB3-R:	GAG TAG CAT TAC CAA CTC TAT TAA ATT CG
17S-F:	GAT CCT GCC AGT TAC ATA TGC TTG
17S-R:	GCC CAA CAA TTA GCT CGG TTA TCC

下划线部分为酶切位点。BamH I: GGA TCC; Sgs I: GCG GCG CC; Sac I: GAG CTC; Not I: GCG GCC GC, Xho I: CTC GAG; Kpn I: GGT ACC; Pst I: CTG CAG; Sma I: CCC GGG; Pme I: GTT TAA AC.

Underlines indicate restriction endonuclease sites. BamH I: GGA TCC; Sgs I: GCG GCG CC; Sac I: GAG CTC; Not I: GCG GCC GC; Xho I: CTC GAG; Kpn I: GGT ACC; Pst I: CTG CAG; Sma I: CCC GGG; Pme I: GTT TAA AC.

基因, 反应程序为: 95 °C预变性15 min; 95 °C变性15 s, 60 °C退火30 s, 68 °C延伸35 s, 进行40个循环; 2^{-ΔΔCt} 进行数据分析。

2 结果

2.1 嗜热四膜虫中POB3基因的鉴定及分析

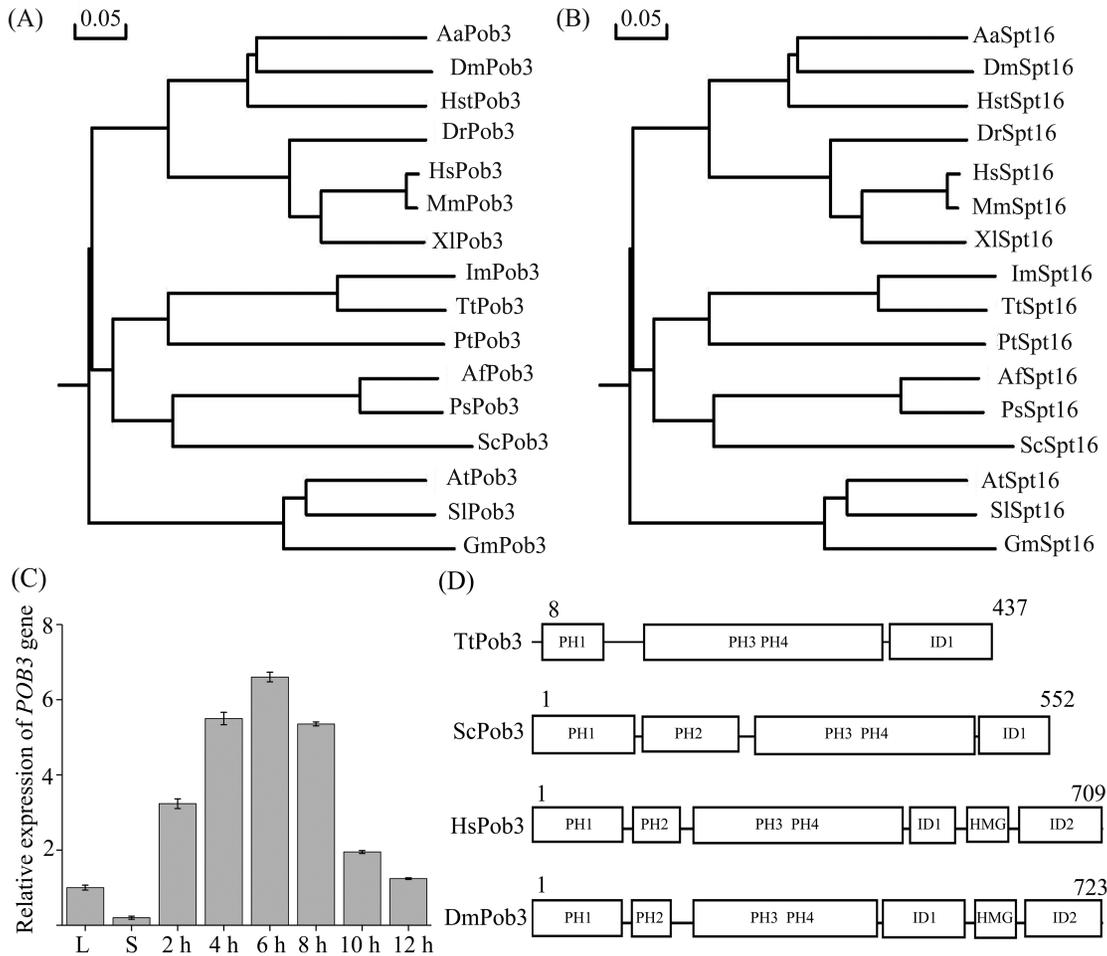
为了分析FACT复合物亚基Pob3的功能, 从四膜虫大核基因组数据库 (<http://www.ciliate.org>) 和功能基因组数据库 (<http://tfgd.ihb.ac.cn>) 鉴定出FACT复合物SPT16亚基(TTHERM_00283330)和POB3亚基(TTHERM_00049080)。SPT16基因全长4 140 bp, 包含11个内含子, 开放阅读框3 027 bp, 编码1 008个氨基酸。POB3基因全长1 980 bp, 有7个内含子, 开放阅读框1 314 bp, 编码437个氨基酸。不同物种来源的SPT16和POB3编码蛋白具有相似的聚类分枝并且动物、植物、真菌、原生动物的Spt16和Pob3蛋白分别聚为一枝, 表明四膜虫FACT复合物的两个亚基存在协同进化(图1A和图1B)。实时荧光定量PCR表明, POB3在营养生殖时期和饥饿时期低表达, 有性生殖时期高表达, 且在结合生殖6 h表达水

平最高(图1C)。

Pob3的N-端有一个PH结构域(pleckstrin homology domain), MD有两个串联的PH结构域, C-端有酸性无序区。典型的PH结构域是由7个β折叠片组成的桶状结构, 促使蛋白-蛋白之间的相互作用^[17]。在人、酵母和果蝇等生物中Pob3的N-端有两个PH domain, PH2结构域决定了不同亚基之间及同类亚基之间的结合。但是嗜热四膜虫的N-端仅有一个PH domain, 同时C-端缺乏与DNA结合的高迁移率蛋白结构域HMG(high mobility group) (图1D)^[18]。四膜虫的Pob3序列的变化和功能结构的缺失暗示其可能具有功能上的分化, 也正是这种分化使得四膜虫细胞核具有独特的结构特征和重塑过程。

2.2 HA-Pob3定位在大核和小核

为了分析Pob3在嗜热四膜虫细胞中的定位, 首先构建了带有HA标签的重组质粒pXS75-POB3(图2A), 目的基因POB3由金属硫蛋白MTTI启动子调控, 在Cd²⁺诱导下高效表达。经基因枪转化, 同源重组和巴龙霉素浓度梯度筛选, PCR扩增鉴定获得稳定的突变细胞株(图2B)。免疫荧光定位发现, HA-



A: Pob3的聚类分析。埃及伊蚊(XP_001655339.1), AaPob3; 果蝇(CAA48471.1), DmPob3; 跳镰猛蚁(EFN83393.1), HstPob3; 斑纹鱼(NP_997967.2), DrPob3; 智人(NP_003137.1), HsPob3; 小家鼠(NP_001129553.1), MmPob3; 非洲爪蟾(NP_001084164.1), XlPob3; 小瓜虫(EGR30466.1), ImPob3; 嗜热四膜虫(EAR94676.2), TtPob3; 草履虫(CAK85998.1), PtPob3; 黄曲霉(EED56911.1), AfPob3; 亚青霉(OKO95219.1), PsPob3; 酿酒酵母(KZV08773.1), ScPob3; 拟南芥(OAP03105.1), AtPob3; 番茄(XP_004232241), SlPob3; 大豆(XP_014620777.1), GmPob3; B: Spt16的聚类分析。埃及伊蚊(XP_001662009.2), AaSpt16; 果蝇(NP_728686.2), DmSpt16; 跳镰猛蚁(EFN79862.1), HstSpt16; 斑纹鱼(NP_001091053.1), DrSpt16; 智人(NP_009123.1), HsSpt16; 小家鼠(NP_291096.2), MmSpt16; 非洲爪蟾(NP_001084166.1), XlSpt16; 小瓜虫(EGR30454.1), ImSpt16; 嗜热四膜虫(EAR97944.2), TtSpt16; 草履虫(CAK88706.1), PtSpt16; 黄曲霉(EED55015.1), AfSpt16; 亚青霉(OKP04279.1), PsSpt16; 酿酒酵母(CAA96920.1), ScSpt16; 拟南芥(OAO97562.1), AtSpt16; 番茄(XP_010327152.1), SlSpt16; 大豆(XP_014626356.1), GmSpt16; C: 嗜热四膜虫中*POB3*的表达谱。营养生长期(L), 饥饿时期(S)和接合生殖时期(2 h、4 h、6 h、8 h、10 h和12 h)提取总RNA, 并使用qRT-PCR分析。内源性对照是17S rRNA; D: 不同模式生物中Pob3的结构域比较。

A: the phylogenetic analysis of Pob3. *Aedes aegypti* (XP_001655339.1), AaPob3; *Drosophila melanogaster* (CAA48471.1), DmPob3; *Harpegnathos saltator* (EFN83393.1), HstPob3; *Danio rerio* (NP_997967.2), DrPob3; *Homo sapiens* (NP_003137.1), HsPob3; *Mus musculus* (NP_001129553.1), MmPob3; *Xenopus laevis* (NP_001084164.1), XlPob3; *Ichthyophthirius multifiliis* (EGR30466.1), ImPob3; *Tetrahymena thermophila* (EAR94676.2), TtPob3; *Paramecium tetraurelia* (CAK85998.1), PtPob3; *Aspergillus flavus* (EED56911.1), AfPob3; *Penicillium subrubescens* (OKO95219.1), PsPob3; *Saccharomyces cerevisiae* (KZV08773.1), ScPob3; *Arabidopsis thaliana* (OAP03105.1), AtPob3; *Solanum lycopersicum* (XP_004232241), SlPob3; *Glycine max* (XP_014620777.1), GmPob3; B: the phylogenetic analysis of Spt16. *Aedes aegypti* (XP_001662009.2), AaSpt16; *Drosophila melanogaster* (NP_728686.2), DmSpt16; *Harpegnathos saltator* (EFN79862.1), HstSpt16; *Danio rerio* (NP_001091053.1), DrSpt16; *Homo sapiens* (NP_009123.1), HsSpt16; *Mus musculus* (NP_291096.2), MmSpt16; *Xenopus laevis* (NP_001084166.1), XlSpt16; *Ichthyophthirius multifiliis* (EGR30454.1), ImSpt16; *Tetrahymena thermophila* (EAR97944.2), TtSpt16; *Paramecium tetraurelia* (CAK88706.1), PtSpt16; *Aspergillus flavus* (EED55015.1), AfSpt16; *Penicillium subrubescens* (OKP04279.1), PsSpt16; *Saccharomyces cerevisiae* (CAA96920.1), ScSpt16; *Arabidopsis thaliana* (OAO97562.1), AtSpt16; *Solanum lycopersicum* (XP_010327152.1), SlSpt16; *Glycine max* (XP_014626356.1), GmSpt16; C: expression profiles of the *POB3* in *Tetrahymena*. Total RNA from vegetative growing stage(L), starvation stage(S), and conjugating cells (2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h and 12 h postmixing) were extracted and analyzed using quantitative RT-PCR. The endogenous control is 17S rRNA; D: Comparison of the domains of Pob3 in different model organisms.

图1 嗜热四膜虫Pob3的生物信息学分析

Fig.1 Bioinformatic analysis of Pob3 from *T. thermophila*

Pob3在生长期和饥饿期定位于大核和小核; 在有性生殖前期定位于大核和进行减数分裂的小核, 其中凋亡的小核没有定位; 在有性生殖后期定位于新大核和新小核, 在凋亡的亲本大核中定位消失。有性生殖末期, 大核定位消失, 小核仍保持较强的信号(图2C)。Pob3在转录活跃的大核和转录沉默的生殖系小核的特异定位表明, Pob3可能不仅参与大核的转录, 同时参与小核的复制和结构维持。

2.3 Pob3的N-端结构域和C-端结构域共同参与蛋白定位

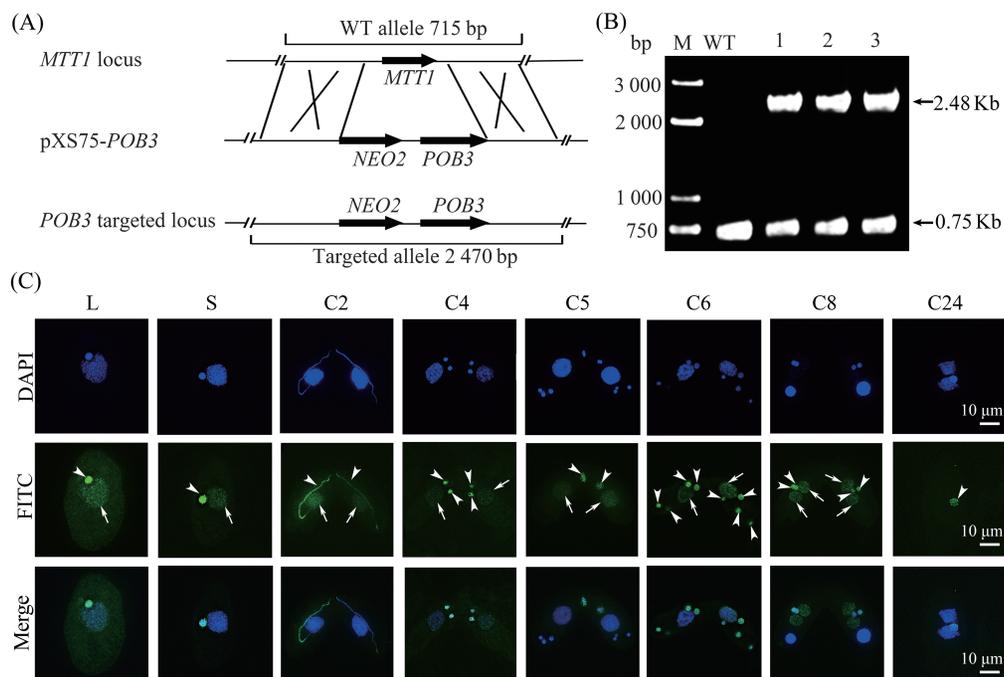
为了分析Pob3在嗜热四膜虫不同细胞核中的定位机制, 我们首先构建获得删除包含核定位信号序列NLS(24-33)的N-端结构域且带有HA标签的重组质粒pXS75-POB3Δ33(图3A)。经基因枪转化, 巴龙霉素浓度梯度筛选, 获得突变的细胞株(图3B)。免疫荧光定位表示, HA-Pob3Δ33在有性生殖前期无定位; 在核选择时期, HA-Pob3Δ33只定位于选择出来的配子核, 而凋亡的小核和大核没有定位; 在

anlagen时期, HA-Pob3Δ33定位于新大核, 在小核的定位消失(图3D)。

Pob3的C-端结构域富含连续的酸性氨基酸, 为了分析C-端结构域的功能, 构建删除C-端(350~437)酸性区结构域的重组质粒pXS75-POB3Δ87(图3A)。经基因枪转化, 巴龙霉素浓度梯度筛选, 获得突变的细胞株HA-Pob3Δ87(图3C)。免疫荧光定位表示, 在有性生殖时期, 截短C-端结构的Pob3只定位在细胞质中(图3D)。C-端酸性结构域直接影响了Pob3的细胞核定位。结果表明, Pob3的N-端核定位信号结构域和C-端的酸性结构域共同参与了Pob3蛋白在嗜热四膜虫中的定位, 并且可能具有不同的入核机制。

2.4 POB3敲减抑制了嗜热四膜虫配子核和合子核的有丝分裂

为了进一步分析Pob3的功能, 我们首先构建了POB3基因的敲除质粒pNeo4-POB3(图4A), 将pNeo4-POB3转化不同交配型的细胞, 通过提高巴龙霉素浓度筛选基因敲除突变体细胞株, 结果表

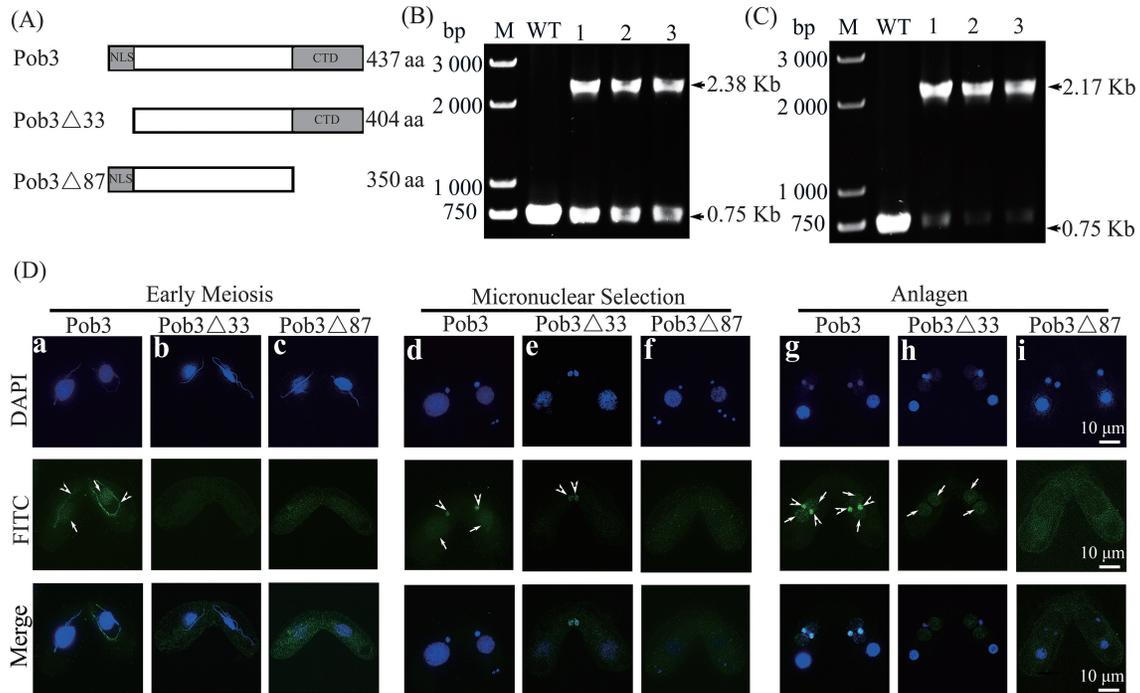


A: HA-POB3同源重组示意图; B: POB3突变细胞株鉴定; 箭头分别指示重组片段(2.48 Kb)和野生型片段(0.75 Kb); M: Trans 2K plus DNA marker; WT: 野生型; 泳道1、2、3: 不同的HA-POB3-CU428突变株的鉴定; C: HA-Pob3的免疫荧光定位; L: 营养生长期; S: 饥饿期; C2: 减数分裂前期; C4: 第一次减数分裂; C5: 配子核选择期; C6: 合子核有丝分裂期; C8: anlagen时期; C24: 有性生殖末期; 箭头指示小核, →指示大核。

A: diagram of the HA-POB3 homologous recombination; B: identification of OE-POB3 mutants. The arrowheads indicate positive recombinant fragments (2.48 Kb) and WT fragments (0.75 Kb), respectively. M: Trans 2K plus DNA marker; WT: wild type; Lanes 1, 2, 3: Identification of HA-POB3-CU428 mutants by PCR; C: immunofluorescence localization of the HA-Pob3 in the vegetative growing, starvation and conjugation stage. L: vegetative stage; S: starvation; C2: early meiosis; C4: meiosis stage; C5: gametic selection; C6: zygotic mitosis stage; C8: anlagen stage; C24: sexual reproduction telophase. Arrow heads indicate micronuclei; → indicate macronuclei.

图2 HA-Pob3在嗜热四膜虫的定位

Fig.2 Localization of HA-Pob3 in *T. thermophila*



A: P_{ob3}及其截短突变体的示意图; B: OE-*POB3*Δ33突变株鉴定; 箭头分别指示重组片段(2.38 Kb)和野生型片段(0.75 Kb); M: Trans 2K plus DNA marker; WT: 野生型; 泳道1、2、3分别指示不同的HA-*POB3*Δ33-CU428突变株的PCR鉴定; C: OE-*POB3*Δ87突变株鉴定; 箭头分别指示重组片段(2.17 Kb)和野生型片段(0.75 Kb); M: Trans 2K plus DNA marker; WT: 野生型; 泳道1、2、3分别指示不同的HA-*POB3*Δ87-CU428突变株的PCR鉴定; D: P_{ob3}及其突变体的定位; 在2 h(减数分裂前期: a、b、c), 5 h(核选择阶段: d、e、f)和8 h(有性生殖后期: g、h、i)收集细胞; 细胞核用DAPI染色。

A: schematic diagram of P_{ob3} and its truncated mutants; B: identification of OE-*POB3*Δ33 mutants. The arrowheads indicate positive recombinant fragments (2.38 Kb) and WT fragments (0.75 Kb), respectively. M: Trans 2K plus DNA marker; WT: wild type; Lanes 1, 2, 3: Identification of different HA-*POB3*Δ33-CU428 mutants by PCR; C: identification of OE-*POB3*Δ87 mutants. The arrowheads indicate positive recombinant fragments (2.17 Kb) and WT fragments (0.75 Kb), respectively. M: marker; WT: wild type; Lanes 1, 2, 3: Identification of different HA-*POB3*Δ87-CU428 by PCR; D: localization of the P_{ob3}, P_{ob3}Δ33, and P_{ob3}Δ87. The cells collected at 2 h (early meiosis stage: a, b, c), 5 h (micronuclear selection stage: d, e, f) and 8 h (late stage of sexual reproduction: g, h, i). Nuclei were stained with DAPI.

图3 HA-Pob3Δ33和HA-Pob3Δ87的定位

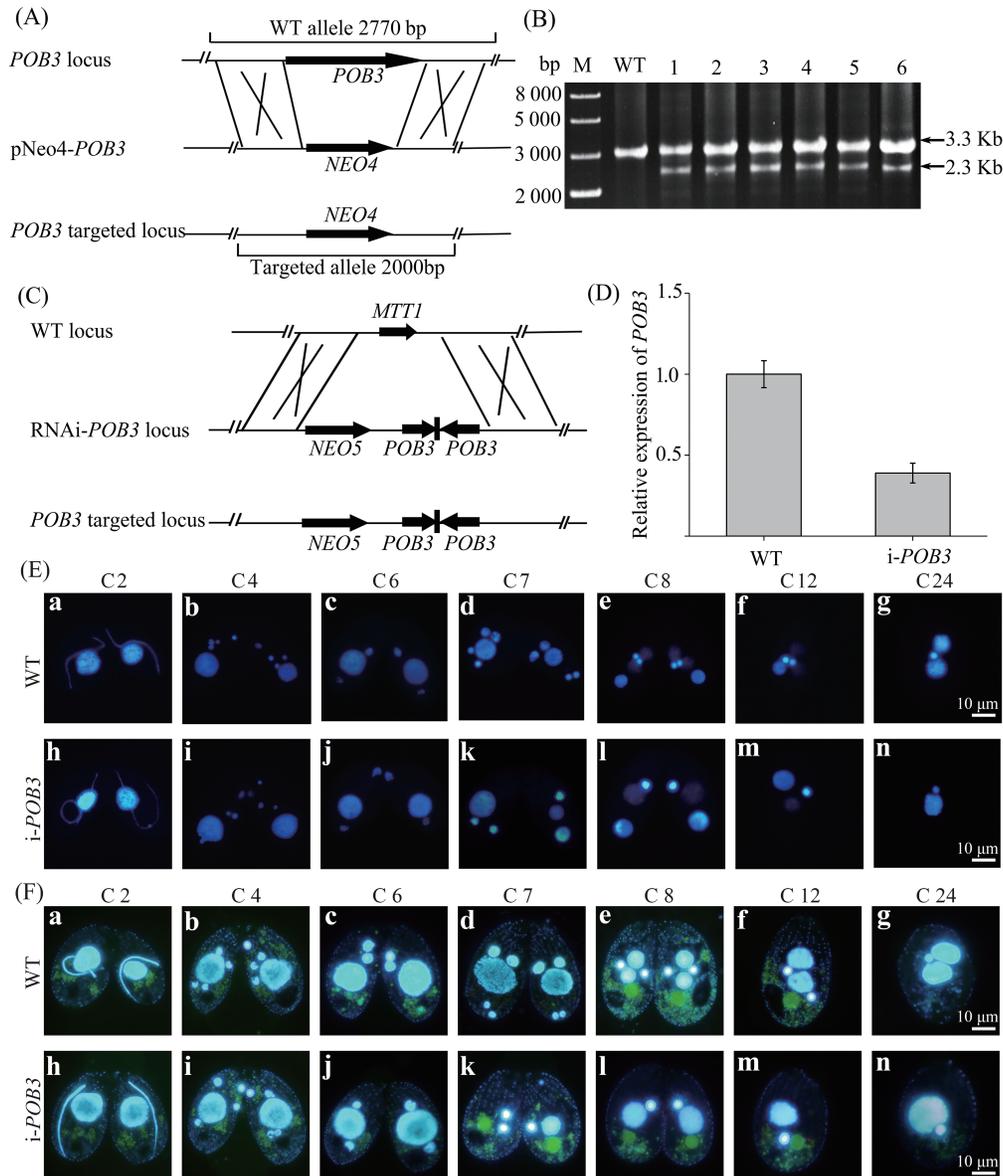
Fig.3 Localization of HA-Pob3Δ33 and HA-Pob3Δ87

明, *POB3*基因并不能通过表型分配被*Neo4*抗性基因完全替代(图4B), 表明*POB3*基因的表达对于嗜热四膜虫的营养生长是必需的。因此, 进一步构建了在镉离子诱导下的*POB3*基因的条件干扰质粒p*POB3*hpNEO(图4C), 在Cd²⁺诱导下, 实现双链RNA的表达和siRNA的产生。将p*POB3*hpNEO转化不同交配型的细胞, 经巴龙霉素浓度梯度筛选, 获得不同交配型的突变细胞株。实时荧光定量PCR显示, *POB3*表达下调(图4D)。观察*POB3*敲减的嗜热四膜虫在有性生殖过程中的核发育, 结果发现, 在配子核有丝分裂阶段, 27%的配对细胞提前分开变成异常的多小核单细胞($n=300$)。继续发育的配对细胞中75%的细胞无法正常完成合子核的第二次有丝分裂, 合子核有丝第一次分裂完成后, 其中1个小核膨大变成新大核, 随后配对细胞分开, 亲本大核降解, 形成

含有1个大核和1个小核的单细胞(图4E), 而野生型细胞进行了两次有丝分裂, 形成含有2个新大核和1个新小核的单细胞。通过自噬体和溶酶体荧光探针标记活体有性生殖细胞, 发现*POB3*敲减细胞的配对细胞的亲本大核可以通过自噬途径发生程序化降解(图4F)。结果表明, *POB3*参与调控了配子核和合子核的复制和有丝分裂。

3 讨论

组蛋白分子伴侣是一类组蛋白结合蛋白, 参与了多种与组蛋白相关的过程, 如染色质组装、蛋白存储、转运等过程^[19]。促进染色质转录因子FACT复合物的不同亚基SPT16和SSRP1/*POB3*能够结合组蛋白H2A-H2B二聚体、H3-H4四聚体以及DNA序列。*POB3*亚基不仅与SPT16形成异源二聚体, 而且



A: 同源重组敲除*POB3*质粒构建示意图; B: *POB3*敲除细胞株的鉴定; 箭头分别指示重组片段(2.2 Kb)和野生型片段(3.3 Kb); M: Trans 2K plus DNA marker; WT: 野生型; 泳道1、2、3: 不同的KO-*POB3*-CU428突变株; 泳道4、5、6: 不同的KO-*POB3*-CU427突变株; C: RNAi干扰敲减*POB3*质粒构建示意图; D: *POB3*的相对表达水平。WT: 野生型; *i-POB3*: *POB3*敲减的细胞株; E: 嗜热四膜虫有性生殖过程细胞核发育示意图。甲醛固定细胞后的DAPI染色。WT: CU428和CU427配对的有性生殖过程, *i-POB3*: *i-POB3*-CU428和*i-POB3*-CU427配对的有性生殖过程。a、h: 减数分裂前期; b、i: 减数分裂; c、j: 合子核第一次分裂; d、k: 合子核有丝第二次分裂; e: 新大核形成; l: 异常的有丝分裂; f: 有性生殖后期; m: 异常单细胞; g: 有性生殖末期; n: 单细胞; F: 嗜热四膜虫有性生殖过程细胞核发育示意图。活细胞用MDC和Hoechst33342染色。WT: CU428和CU427配对的有性生殖过程, *i-POB3*: *POB3*敲减的CU428和CU427的有性生殖过程。a、h: 减数分裂前期; b、i: 减数分裂; c、j: 合子核第一次分裂; d、k: 合子核有丝第二次分裂; e: 新大核形成; l: 异常的有丝分裂; f: 有性生殖后期; m: 异常单细胞; g: 有性生殖末期; n: 单细胞。

A: schematic representation of *POB3* knockout construction; B: identification of *POB3* knockout mutants. The arrowheads indicate positive recombinant fragments (2.3 Kb) and WT fragments (3.3 Kb), respectively. M: Trans 2K plus DNA marker; WT: wild type; Lanes 1, 2, 3: the identification of different KO-*POB3*-CU428 mutants by PCR; Lanes 4, 5, 6: the identification of different KO-*POB3*-CU427 mutants by PCR; C: schematic representation of *POB3* knockdown construction; D: the relative expression level of *POB3*. WT: wild type; *i-POB3*: *POB3* knockdown; E: Schematic representation of nuclear development. Mating cells were fixed and stained with DAPI. WT: CU428 mating with CU427, *i-POB3*: *i-POB3*-CU428 mating with *i-POB3*-CU427. a, h: early meiosis; b, i: meiosis; c, j: zygotic first mitosis; d, k: zygotic second mitosis; e: new macronuclear formation; l: abnormal mitosis; f: late stage of sexual reproduction; m: abnormal cells; g: telophase of sexual reproduction; n: single cells. Scale bar 10 μ m. F: Schematic representation of nuclear development. Living cells were stained with MDC and Hoechst. WT: CU428 mating with CU427, *i-POB3*: *i-POB3*-CU428 mating with *i-POB3*-CU427. a, h: early meiosis; b, i: meiosis; c, j: zygotic first mitosis; d, k: zygotic second mitosis; e: new macronuclear formation; l: abnormal mitosis; f: late stage of sexual reproduction; m: abnormal cells; g: telophase of sexual reproduction; n: single cells.

图4 敲减*POB3*影响嗜热四膜虫有性生殖时期合子核的有丝分裂

Fig.4 *POB3* knockdown affects zygotic mitosis during sexual reproduction of *T. thermophila*

可以形成同源二聚体结构^[18]。人的POB3/SSRP1包含的PH2结构域决定了不同亚基之间及同类亚基之间的结合, C-端的酸性结构域参与了与H2B间的相互作用, 而HMG结构域决定了与DNA间的相互作用^[18]。酵母的Pob3蛋白并不存在HMG结构域, 但是能够与含有HMG结构域的Nhp6直接相互作用。近来单分子磁镊技术分析表明, 在单核小体水平上, FACT复合物不仅使核小体去稳定, 而且参与核小体的重新组装, 维持核小体的稳定性^[20]。FACT的两个亚基在核小体的动态变化中发挥了不同但是协调的作用, SPT16偏爱结合H2A/H2B二聚体, 而SSRP1/POB3偏爱结合DNA和H3/H4四聚体^[21]。缺失HMG结构域的人的SSRP1突变体影响了核小体的完整性^[18]。本研究鉴定的嗜热四膜虫Pob3蛋白包含有保守的PH1结构域和C-端的酸性结构域, 但是不存在PH2结构域和HMG结构域。聚类分析表明, Pob3和Spt16存在协同进化, 暗示它们存在相互作用。我们先前的研究表明, 四膜虫含有多种不同的包含HMG结构域蛋白^[22], 是否存在和Pob3直接相互作用的HMG蛋白, 有待进一步研究。

在人类和小鼠中, SSRP1/POB3与转录因子和p63结合, 调节转录活性^[23]。拟南芥Pob3定位于细胞核, 控制亲本印迹基因的表达, 是DNA去甲基化所必需的^[24]。酵母Pob3能够结合到激活的基因上并且能在编码区域与RNA聚合酶II共定位, 且只定位在启动子区域的下游^[4]。Pob3在转录起始中起着重要作用, 能够解除核小体对TATA序列的屏障, 促进TATA结合蛋白(TATA binding protein)特异结合TATA序列。在嗜热四膜虫营养生长期, 大核转录活跃, 而小核转录沉默。在生长期和饥饿期, HA-Pob3定位于大核和小核, 在小核具有更强的定位信号。在有性生殖时期, HA-Pob3定位于大核和小核, 其中将要凋亡的小核和凋亡的亲本大核没有定位, 当有性生殖完成后, 大核定位消失, 小核具有较强的定位信号。在凋亡小核和凋亡大核的缺失暗示其可能参与了功能核的识别过程。HA-Pob3的表达来源于亲大核的转录和翻译。在有性生殖后期, 新大核开始表达新的Pob3蛋白, 因此, HA-Pob3在大核的定位消失, 发挥功能主要是来源于新大核表达的Pob3蛋白。HA-Pob3在有性生殖末期在小核上的稳定存在暗示其作为结构蛋白的功能。果蝇Pob3表达降低会导致与转录相关的组蛋白H3甲基化修饰显著降

低^[25]。人Pob3和H2B单泛素化协同作用, 从而调节RNA聚合酶II的延伸^[26]。酵母Pob3的酸性C末端的核定位信号会与H2A-H2B结合, 同时其C-端还能与Importin- α 相互作用, 且这两种相互作用是相互抑制的, 酵母Pob3-CTD缺少会导致致死效应^[27]。嗜热四膜虫Pob3的N-端截短33个氨基酸后, 在有性生殖前期无定位, 但能够定位在配子核和发育中的新大核。四膜虫的大核和小核具有不同的核孔蛋白复合物, 进化出多样化的蛋白核质转运的调控机制^[28]。嗜热四膜虫Pob3的C-端截短87个酸性氨基酸后, 在有性生殖时期只定位在细胞质。酵母FACT与H2A-H2B的结合取决于Pob3和Spt16的C-端酸性区域^[29], 而四膜虫Pob3的C-端酸性区域缺失, 可能影响了其与组蛋白H2A-H2B的结合和核转运的进程, 进而影响其在有性生殖时期小核的定位。

在DNA复制过程中, 酵母Pob3会与DNA聚合酶、单链DNA结合蛋白RPA、复制解旋酶MCM结合, 而且需要PCNA的参与^[30]。爪蟾Pob3对于其卵细胞提取物的DNA复制是必需的^[31]。小鼠Pob3能够被募集在复制叉上^[32]。敲减POB3导致嗜热四膜虫营养生长时期增殖变慢, 同时影响有性生殖期配子核和合子核的有丝分裂过程, 表明Pob3的缺失可能主要干扰该阶段DNA的复制过程。人Pob3可促进有丝分裂中微管的聚合和生长^[33], 而四膜虫的Pob3在减数分裂时期在纺锤体结构也有定位, 暗示其也参与了微管的功能。四膜虫在无性生殖和有性生殖过程中染色质进行了高度的动态重塑, 因此进一步分析Pob3相互作用的蛋白因子及其在四膜虫不同细胞核组装中的功能, 能够为深入了解染色质组装的分子机制提供新的科学数据。

参考文献 (References)

- [1] LUGER K, MADER A W, RICHMOND R K, et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution [J]. *Nature*, 1997, 389(6648): 251-60.
- [2] VENKATESH S, WORKMAN J L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2015, 16(3): 178-89.
- [3] AVVAKUMOV N, NOURANI A, COTE J. Histone chaperones: modulators of chromatin marks [J]. *Mol Cell*, 2011, 41(5): 502-14.
- [4] MASON P B, STRUHL K. The FACT complex travels with elongating RNA polymerase II and is important for the fidelity of transcriptional initiation *in vivo* [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(22): 8323-33.
- [5] WITTMAYER J, FORMOSA T. The *Saccharomyces cerevisiae*

- DNA polymerase alpha catalytic subunit interacts with Cdc68/Spt16 and with Pob3, a protein similar to an HMG1-like protein [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(7): 4178-90.
- [6] KROGAN N J, KIM M, AHN S H, et al. RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(20): 6979-92.
- [7] LEJEUNE E, BORTFELD M, WHITE S A, et al. The Chromatin-Remodeling Factor FACT contributes to centromeric heterochromatin independently of RNAi [J]. *Curr Biol*, 2007, 17(14): 1219-24.
- [8] HEO K, KIM H, CHOI S H, et al. FACT-mediated exchange of Histone variant H2A.X regulated by phosphorylation of H2A.X and ADP-ribosylation of Spt16 [J]. *Mol Cell*, 2008, 30(1): 86-97.
- [9] PFAB A, BREINDL M, GRASSER K D. The *Arabidopsis* histone chaperone FACT is required for stress-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes [J]. *Plant Mol Biol*, 2018, 96(4/5): 367-74.
- [10] RICHARD J L C, SHUKLA M S, MENONI H, et al. FACT assists base excision repair by boosting the remodeling activity of RSC [J]. *PLoS Genet*, 2016, 12(7): e1006221.
- [11] ORIAS E, CERVANTES M D, HAMILTON E P. *Tetrahymena thermophila*, a unicellular eukaryote with separate germline and somatic genomes [J]. *Res Microbiol*, 2011, 162(6): 578-86.
- [12] GAO F, WARREN A, ZHANG Q, et al. The All-Data-Based evolutionary hypothesis of ciliated protists with a revised classification of the phylum ciliophora (Eukaryota, Alveolata) [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 24874.
- [13] MARTINDALE D W, ALLIS C D, BRUNS P J. Conjugation in *Tetrahymena thermophila*: a temporal analysis of cytological stages [J]. *Exp Cell Res*, 1982, 140(1):227-36.
- [14] 陈波, 许静, 王伟. 抗沉默因子Asf1调控嗜热四膜虫细胞核的稳定性[J]. *中国生物化学与分子生物学报*(CHEN B, XU J, WANG W. Anti-silencing Factor Asf1 regulates the nuclear stability in *Tetrahymena thermophila* [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*), 2015, 31(1): 55-63.
- [15] 袁亚静, 许静, 王伟. 嗜热四膜虫Tcd1蛋白功能结构域的突变分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*(YUAN Y J, XU J, WANG W. Mutational analysis of the functional domain of Tcd1 from *Tetrahymena thermophila* [J]. *Chinese Journal of Biochemistry & Molecular Biology*), 2016, 32(05): 528-35.
- [16] 郑文萍, 薄涛, 刘亚, 等. 自噬相关蛋白Atg4.1过表达促进嗜热四膜虫亲本大核程序化降解[J]. *中国细胞生物学学报*(ZHENG W P, BO T, LIU Y, et al. Overexpression of Atg4.1 promote parental macronucleus programmed degradation in *Tetrahymena thermophila* [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2019, 41(5): 841-50.
- [17] LEMMON M A. Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides [J]. *Biochem Soc Trans*, 2004, 32(5): 707-11.
- [18] MARCIANO G, DA VELA S, TRIA G, et al. Structure specific recognition protein-1 (*SSRP1*) is an elongated homodimer that binds histones [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(26): 10071-83.
- [19] PARK Y J, LUGER K. Structure and function of nucleosome assembly proteins [J]. *Biochem Cell Biol*, 2006, 84(4): 549-58.
- [20] CHEN P, DONG L, HU L, et al. Functions of FACT in breaking the nucleosome and maintaining its integrity at the single-nucleosome level [J]. *Mol Cell*, 2018, 71(2): 284-93.
- [21] WINKLER D D, MUTHURAJAN U M, HIEB A R, et al. Histone chaperone FACT coordinates nucleosome interaction through multiple synergistic binding events [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(48): 41883-92.
- [22] XU J, TIAN H, LIU X, et al. Localization and functional analysis of HmgB3p, a novel protein containing high-mobility-group-box domain from *Tetrahymena thermophila* [J]. *Gene*, 2013, 526(2): 87-95.
- [23] ZENG S X, DAI M S, KELLER D M, et al. SSRP1 functions as a co-activator of the transcriptional activator p63 [J]. *EMBO J*, 2014, 21(20): 5487-97.
- [24] IKEDA Y, KINOSHITA Y, SUSAKI D, et al. HMG domain containing SSRP1 is required for DNA demethylation and genomic imprinting in *Arabidopsis* [J]. *Dev Cell*, 2011, 21(3): 589-96.
- [25] PAVRI R, ZHU B, LI G, et al. Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II [J]. *Cell*, 2006, 125(4): 703-17.
- [26] STANLIE A, AIDA M, MURAMATSU M, et al. Histone3 lysine4 trimethylation regulated by the facilitates chromatin transcription complex is critical for DNA cleavage in class switch recombination [J]. *P Natv Acad Sci USA*, 2010, 107(51): 22190-95.
- [27] SCHLESINGER M B, FORMOSA T. POB3 is required for both transcription and replication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Genetics*, 2000, 155(4): 1593-606.
- [28] IWAMOTO M, KOUJIN T, OSAKADA H, et al. Biased assembly of the nuclear pore complex is required for somatic and germline nuclear differentiation in *Tetrahymena* [J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(9):1812-23
- [29] KEMBLE D J, MCCULLOUGH LL, WHITBY F G, et al. FACT disrupts nucleosome structure by binding H2A-H2B with conserved peptide motifs [J]. *Mol Cell*, 2015, 60(2): 294-306.
- [30] YANG J, ZHANG X, FENG J, et al. The histone chaperone FACT contributes to DNA replication-coupled nucleosome assembly [J]. *Cell Rep*, 2016, 14(5): 1128-41.
- [31] OKUHARA K, OHTA K, SEO H, et al. A DNA unwinding factor involved in DNA replication in cell-free extracts of *Xenopus* eggs [J]. *Curr Biol*, 1999, 9(7): 341-50.
- [32] HERTEL L, DE ANDREA M, BELLOMO G, et al. The HMG protein T160 colocalizes with DNA replication foci and is down-regulated during cell differentiation [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 250(2): 313-28.
- [33] ZENG S X, LI Y, JIN Y, et al. Structure-specific recognition protein 1 facilitates microtubule growth and bundling required for mitosis [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(4): 935-47.