



前纤维蛋白点突变对粗糙脉孢菌生长的影响及其生化机制研究

韩慧凤, 孙海涛, 李艳红, 陈志玲*

首都师范大学生命科学学院, 北京 100048

韩慧凤, 孙海涛, 李艳红, 陈志玲. 前纤维蛋白点突变对粗糙脉孢菌生长的影响及其生化机制研究. 微生物学报, 2022, 62(5): 1936–1948.

Han Huifeng, Sun Haitao, Li Yanhong, Chen Zhiling. Effects of point-mutated profilins on the growth of *Neurospora crassa* and the biochemical mechanisms. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(5): 1936–1948.

摘要:【目的】为进一步了解前纤维蛋白(profilin, PFN)在丝状真菌中的功能, 本文以粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)为研究对象, 进行了前纤维蛋白对其菌落生长和肌动蛋白(actin)聚合特性影响的探究。【方法】通过采用定点突变、同源重组、分生孢子过膜和 PCR 等技术, 获得粗糙脉孢菌前纤维蛋白 F78 (F78A 和 F78D)和 V113 (V113E、V113R 和 V113W)的点突变体。利用平板生长法、竞争性生长管和显微镜观察检测表型变化, 并结合多聚脯氨酸亲和层析纯化、荧光分光光度技术和高速共沉淀等技术分析点突变的前纤维蛋白对肌动蛋白聚合特性的影响。【结果】获得的粗糙脉孢菌前纤维蛋白点突变株 F78A、F78D、V113E、V113R 和 V113W, 与对照菌株 *ku70^{RIP}* 相比, 突变株生长均明显减慢($P < 0.05$), 其中 PFN (F78D)和 PFN (V113W)的突变体在生长的 12–48 h, 菌落直径分别仅为对照的 20.0%–75.7%和 12.7%–39.2%。竞争性生长管分析表明, PFN (F78D)和 PFN (V113W)突变株菌丝生长速度受到显著抑制, 分生孢子形成的节律并未发生明显改变。将纯化获得的前纤维蛋白野生型及点突变株 F78D 和 V113W 蛋白进行肌动蛋白的成核研究发现, 前纤维蛋白能抑制肌动蛋白自发的成核过程, 并表现为浓度依赖效应; 而点突变蛋白 F78D 和 V113W 抑制肌动蛋白自发成核的作用减弱; 进一步对肌动蛋白聚合特性的研究发现: 野生型的前纤维蛋白在 0–5 $\mu\text{mol/L}$ 范围内可抑制肌动蛋白的聚合, 且随浓度上升抑制作用进一步增强, 致

基金项目: 国家自然科学基金(31470136); 首都师范大学实验室开放基金

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31470136) and by the Open Foundation of Laboratory of Capital Normal University

*Corresponding author. Tel: +86-10-68901494; E-mail: chenzhl@cnu.edu.cn

Received: 1 November 2021; Revised: 28 November 2021; Published online: 13 December 2021

使上清中单体肌动蛋白含量最高可上升至 82%左右; 而 5 $\mu\text{mol/L}$ 点突变蛋白 F78D 和 V113W 抑制肌动蛋白聚合的作用均明显减弱, 分别使单体肌动蛋白的含量比对照下降 12.0% ($P<0.01$)和 30.7% ($P<0.01$)。【结论】本研究证实前纤维蛋白在粗糙脉孢菌中起着重要的作用, 其 F78 和 V113 是重要的活性位点, 对于调节肌动蛋白的聚合解聚过程和粗糙脉孢菌的生长发育具有重要作用。

关键词: 粗糙脉孢菌; 前纤维蛋白; 肌动蛋白聚合; 定点突变

Effects of point-mutated profilins on the growth of *Neurospora crassa* and the biochemical mechanisms

HAN Huifeng, SUN Haitao, LI Yanhong, CHEN Zhiling*

College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048, China

Abstract: [Objective] In order to further clarify the functions of profilin (PFN) in filamentous fungi, we explored the effects of point-mutated PFNs on the colony growth and actin polymerization of *Neurospora crassa*. [Methods] The PFN F78 mutants (F78A and F78D) and V113 mutants (V113E, V113R and V113W) of *N. crassa* were obtained by techniques of site-directed mutagenesis, homologous recombination, filtration of conidia and PCR. With plate method, race tube assay and microscopy, the phenotypic changes of colonies were observed, and together with polyproline affinity chromatography, fluorescence spectrophotometry and high-speed co-sedimentation, the effect of point mutation of PFN on the actin nucleation and polymerization was analyzed. [Results] Mutants F78A, F78D, V113E, V113R, and V113W all grew slowly compared with the control strain *ku70^{RIP}* ($P<0.05$). Particularly, the colony diameters of F78D and V113W were only 20%–75.7% and 12.7%–39.2% that of the control at 12–48 h. Race tube analysis demonstrated that mycelia of F78D and V113W presented slow growth in comparison with the control. However, both of them exhibited near-normal conidiation rhythms. In addition, the purified wild-type PFN could inhibit the spontaneous nucleation of actin in a concentration-dependent manner, while the inhibition of mutant proteins PFN (F78D) and PFN (V113W) on the actin nucleation was weakened. Wild-type PFN could suppress the polymerization of actin in the concentration range of 0–5 $\mu\text{mol/L}$, and the suppression was enhanced with the increase of the concentration, causing the monomer actin content in the supernatant to peak at about 82%. However, the inhibitory effect of 5 $\mu\text{mol/L}$ PFN (F78D) and PFN (V113W) on actin polymerization was significantly weakened, as manifested by the decrease of actin monomer content by 12.0% ($P<0.01$) and 30.7% ($P<0.01$), respectively, from the control. [Conclusion] This study confirmed that PFN played an important role in *N. crassa*, and F78 and V113 were important active sites for regulating the polymerization and depolymerization of actin and the growth and development of *N. crassa*.

Keywords: *Neurospora crassa*; profilin; actin polymerization; site-directed mutagenesis

微丝骨架是细胞骨架的重要成员, 在真核生物中高度保守并且普遍存在, 主要由单体肌动蛋白(global actin, G-actin)、纤维状肌动蛋白(filamentous actin, F-actin)和肌动蛋白结合蛋白

(actin binding proteins, ABPs)组成, 调控细胞许多重要的生理活动, 包括: 顶端生长、囊泡运输、细胞分裂和逆境胁迫响应等^[1-2]。近年来, 关于微丝骨架在丝状真菌形态发生中的研究取得了一定进展, 例如: 粗糙脉孢菌经紫外线照射诱变后, 筛选获得的第 1 例肌动蛋白突变株 *act*¹, 与野生型相比较, 生长速率受到明显抑制^[3]。微丝骨架解聚药物 latrunculin B 处理马铃薯晚疫病菌后发现, 随着 latrunculin B 浓度的升高, 菌落生长速率逐渐下降, 菌丝的极性生长呈现异常, 表现为直径变粗, 尖端膨大等。丝束蛋白作为微丝交联蛋白, 当其被敲除后, 稻瘟病菌菌丝细胞内微丝束数量减少、胞吞作用及囊泡的转运受抑制, 菌丝的生长速率由 $\sim 0.79 \mu\text{m}/\text{min}$ 减慢至 $\sim 0.25 \mu\text{m}/\text{min}$ ^[4]。以上表型的改变是因为基于微丝骨架的生理活动受到了干扰, 同时也说明微丝骨架的解聚/聚合动态平衡对于维持丝状真菌正常生长是必需的。

前纤维蛋白(profilin, PFN)是最早发现的、含量最为丰富的一种低分子量 ABP。在动物和植物细胞中, PFN 的研究较为深入。它能与 3 类配体结合, 分别是: actin、磷脂酰肌醇和多聚脯氨酸^[5]。动物细胞中, PFN 对 F-actin 动态调控表现为双重作用: 一方面它能够与 G-actin 结合, 形成亲和力较高的复合物, 隔离 G-actin, 抑制 F-actin 的聚合。另一方面, PFN 还可以促进结合在 G-actin 上的 ADP 转换成 ATP, 使 G-actin 处于易于聚合的高亲和状态, 进而促进 F-actin 的聚合。植物细胞中 PFN 也具有抑制 F-actin 聚合的作用, 但目前未发现其促进核苷酸交换。成蛋白作为 F-actin 的成核因子, 含有 FH1、FH2 和 FH3 等结构域, 其中的 FH1 结构域富含脯氨酸(35%–100%), PFN 与它结合调控 actin 的组装在酵母和植物中已得到证实^[6]。

由此可见, PFN 不仅在 actin 动态组装, 还在调节其他 ABPs 的活性中都发挥着重要的功能。

伴随着分子生物学的不断发展, 近年来的研究表明, PFN 对于细胞生长、细胞形状的维持、信号转导等生命过程均起到重要的调控作用^[7-8]。例如, 用 RNAi 技术使小立碗藓中的 *PFN* 失去活性后, 细胞的顶端生长完全受到抑制, 细胞呈圆形。用反义 RNA 技术获得的拟南芥 *PFN-U* 植株, 相比野生型而言, 其下胚轴和根变短, 而过表达的拟南芥植株 *PFN-O* 中, 其根的长度比野生型的增加了 50%, 根毛数量至少增加了 1 倍。酵母细胞的 PFN 功能缺陷, 则导致细胞生长缓慢, 失去原有正常的椭球形状。但迄今为止, 人们对丝状真菌 PFN 的功能了解还非常有限。

本文对来自粗糙脉孢菌、酿酒酵母、阿米巴、拟南芥、小鼠和牛这 6 种模式生物的 PFN 进行结构比对, 发现它们的氨基酸序列并不保守, 相似性约 30%, 但是三级结构却非常相似。对来自拟南芥、阿米巴和牛的 PFNs, 已有报道通过结构生物学等手段确定了它们各自与 actin 结合的氨基酸位点, 在 16 个位点中只有 4 个氨基酸是高度保守的, 进一步分析发现它们主要集中在 β -折叠片 4、5、6 和羧基端 α -螺旋及周围^[9]。此外, 孙海涛等研究表明, *PFN* 在粗糙脉孢菌中为必需基因, 其缺失可能导致粗糙脉孢菌不能存活^[10]。基于以上对 PFN 的结构分析, 本研究从改变其与 actin 结合能力的角度出发, 选择具有潜在 actin 结合特性的 F78 和 V113 位点进行定点突变, 构建粗糙脉孢菌点突变菌株, 并检测其表型变化, 进一步对 PFN 及点突变蛋白进行纯化, 分析其对 actin 动态特性的影响, 以期阐明微丝骨架调控丝状真菌的生长发育机制提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒

所用粗糙脉孢菌 *ku70^{RIP}* 菌株由中国农业大学何群教授惠赠。大肠杆菌菌株 DH5 α 、BL21(DE3)购自北京江晨文轩生物科技有限责任公司。质粒 pBlueScript-SK-5'flank-PFN-3'UTR-hph、pBlueScript-SK-PFN 3'flank-hph 为本实验构建并保存, 质粒 pET23a 为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

引物合成由华大基因公司(北京)完成, 质粒测序由睿博兴科生物技术有限公司完成; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Phusion 高保真聚合酶购自 Fermentas 公司; DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒等购自天根生化科技(北京)有限公司; 点突变试剂盒购自北京赛百盛基因技术有限公司; 多聚脯氨酸(Mr=12 000)、PMSF、ATP 购自 Merck 公司; CNBr-Sepharose 4B 购自 GE 公司。

1.2 引物设计

从粗糙脉孢菌数据库中查找基因 *PFN* (NCU06397)的 DNA 序列, 利用引物设计软件 Primer Premier 5 对 PFN 中 F78 和 V113 这 2 个位点进行诱导突变设计, 并送华大基因公司(北京)进行合成, 引物名称和序列见表 1。

1.3 *PFN* 点突变菌株构建

以待突变的质粒 pBluescript-SK-5'flank-PFN-3'UTR-hph 为模板, 分别以 F78A-F/F78A-R、F78D-F/F78D-R、V113E-F/V113E-R、V113R-F/V113R-R、V113W-F/V113W-R 为引物进行 PCR 反应, 诱导目的基因 *PFN* 突变, 反应体系和程序参考赛百盛定点突变试剂盒说明书。PCR 结束后, 产物中加入 1 μ L MutazymeTM (10 U/ μ L), 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h, 以去除甲基化质粒模板, 消化后的产物热击法转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取单克隆提取质粒后送公司测序。分别以验证正确的质粒为模板扩增目的片段: 5'flank-PFN (F78A)-3'UTR-hph、5'flank-PFN (F78D)-3'UTR-hph、

表 1 定点突变引物

Table 1 Primers for site-directed mutagenesis

Primers	DNA sequences (5'→3')
F78A, F	GTAAGCGCTACGTTGCCGCAACATCGAGGGTTCGC
F78A, R	GCGACCCCTCGATGTTGCGGCAACGTAGCGCTGAC
F78D, F	GTAAGCGCTACGTTGCCGATAACATCGAGGGTTCGC
F78D, R	GCGACCCCTCGATGTTATCGGCAACGTAGCGCTGAC
V113E, F	CTACGGCGAGAACGCTGAGGCCGGCAACTCGACA
V113E, R	TGTCGAGTTGCCGGCCTCAGCGTTCTCGCCGTAG
V113R, F	CTACGGCGAGAACGCTCGAGGCCGGCAACTCGACA
V113R, R	TGTCGAGTTGCCGGCCTCGAGCGTTCTCGCCGTAG
V113W, F	CTACGGCGAGAACGCTTGGGCCGGCAACTCGACA
V113W, R	TGTCGAGTTGCCGGCCCAAGCGTTCTCGCCGTAG
PFN, F <i>EcoR</i> I	CCGGAATTCATGTCCTGGCAAGCCTATGTT
PFN, R <i>Hind</i> III	CCCAAGCTTTTAGTATCCGGCCTTGACGAG
<i>hph</i> -1	GAAAAAGCCTGAACTCACCG
<i>hph</i> -2	CGTCGGTTTTCCACTATCGGC

The site-directed mutagenesis positions were shown in wavy lines and the restriction enzyme recognition sites were underlined.

5'flank-PFN (V113E)-3'UTR-hph、5'flank-PFN (V113R)-3'UTR-hph 和 5'flank-PFN (V113W)-3'UTR-hph, 以及以质粒 pBlueScript-SK-PFN 3'flank-hph 为模板扩增 3'flank-hph 片段, 各自通过电穿孔法转化粗糙脉孢菌菌株 *ku70^{RIP}*, 利用细胞有丝分裂时发生的同源重组, 以 *PFN* 点突变片段替换 *PFN*, 同时引入潮霉素抗性基因 (*hph*), 在斜面培养基上传代 3–5 次后, 得到相应的点突变菌株, 然后取分生孢子悬液, 用孔径 5 μm 的滤膜过滤, 潮霉素抗性筛选, 提取基因组 DNA 后 PCR 产物测序验证, 获得纯合的 *PFN* 点突变菌株(图 1)。

1.4 平板培养基上 *PFN* 点突变菌株的表型检测

将对照菌株和各 *PFN* 点突变菌株的分生孢子制成孢子悬液, 以相同浓度接种于基本培养基的平板中央, 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 温箱倒置培养, 每隔 12 h 测量菌落直径、扫描并记录菌株生长状况, 实验设置 3 次重复。

1.5 *PFN* 点突变菌株菌丝生长速率和分生孢子带昼夜节律的检测

参考 Cao 等的方法^[11], 挑取适量分生孢子,

接种在竞争性生长管(race tube)一端, 室温光照培养 1 d 后转移至 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养, 每隔 24 h 红光下标记菌丝生长前沿。通过与对照菌株比较检测点突变菌株菌丝生长速率和分生孢子带昼夜节律是否有变化, 实验设置 3 次重复。

1.6 *PFN* 点突变菌株的菌丝分枝检测

向直径 10 cm 的平皿中加入 15 mL 基本培养基, 冷却后, 将无菌盖玻片以 45 $^{\circ}$ 角斜插入培养基中, 分别吸取对照和 *PFN* 点突变菌株的分生孢子悬液各 5 μL , 沿着盖玻片与培养基之间的狭窄缝隙接种, 30 $^{\circ}\text{C}$ 温箱培养 12 h 后, 经 3.7% 多聚甲醛固定后, 用 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Calcofluor White 染色后封片, Lecia DMRE 荧光显微镜观察。

1.7 *PFN* 及 *PFN* (F78D)、*PFN* (V113W) 点突变蛋白表达载体的构建

1.7.1 构建原核表达载体 pET23a-*PFN*

以粗糙脉孢菌总 cDNA 为模板, 以 *PFN*, F *EcoR* I/*PFN*, R *Hind* III/*PFN* 为引物, 进行 PCR, 获得 *PFN* cDNA 片段, *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切后与相同限制性酶切的载体片段 pET23a 连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取单克隆提取质粒, 酶切鉴定后送公司测序验证。

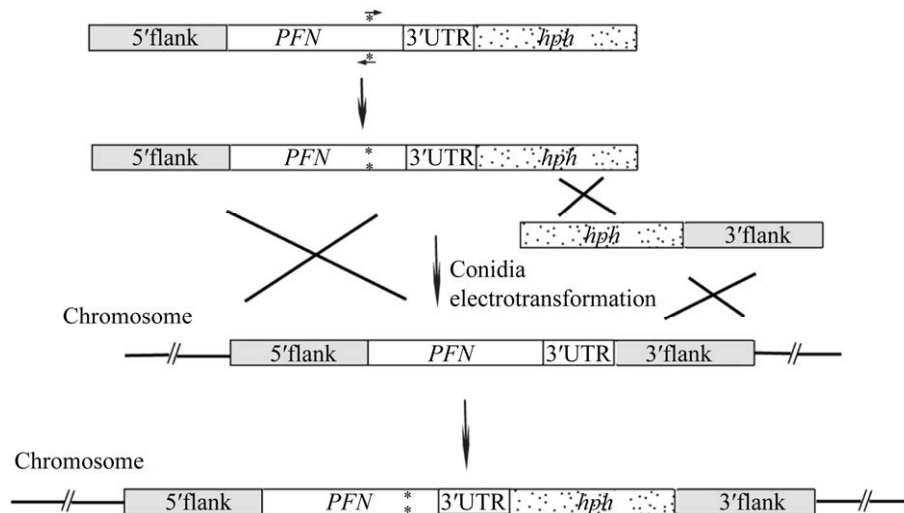


图 1 *PFN* 点突变株构建示意图

Figure 1 Schematic diagram of *PFN* point mutant strains construction.

1.7.2 构建点突变表达载体 pET23a-PFN (F78D)、pET23a-PFN (V113W)

参考 1.3, 以 pET23a-PFN 质粒为基础模板进行突变, 突变后的质粒送公司测序验证。

1.8 PFN 及 PFN (F78D)、PFN (V113W) 点突变蛋白的纯化

首先是诱导表达, 将 pET23a-PFN、pET23a-PFN (F78D)、pET23a-PFN (V113W) 分别转化大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3), 鉴定正确的单克隆接种至 10 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C 过夜培养, 次日按照 1:100 的比例在 LB 抗性培养基中扩大培养, 至 OD_{600} 为 0.6–0.8 时, 加入 0.1 mmol/L IPTG, 20 °C 诱导表达 10 h, 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体于 -80 °C 冻存。

其次是蛋白纯化, 利用 PFN 与多聚脯氨酸结合的特性进行纯化, 首先对 PLP-Sepharose 进行活化处理, 然后用 25 mL 预冷的 buffer I [10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 50 mmol/L KCl, 0.2 mmol/L DTT] 重悬冻存的一管菌体, 并加入 10 mmol/L PMSF, 超声波破碎细胞, 4 °C、7 500 r/min 离心 30 min, 上清液过 PLP 亲和层析柱, 先后用 buffer I 和 2 mol/L 尿素(溶于 buffer I) 冲洗杂蛋白, 7 mol/L 尿素(溶于 buffer I) 洗脱目的蛋白 PFN。目的蛋白溶液于 buffer I 中透析, 超滤管浓缩后, 12% SDS-PAGE 进行检测, 并进行蛋白浓度测定。

1.9 PFN 及 PFN (F78D)、PFN (V113W) 点突变蛋白对肌动蛋白聚合的影响

参考 Spudich 等的方法^[12], 制备兔骨骼肌丙酮粉, 通过离心、盐析、分子筛和透析等方法进行肌动蛋白纯化。Ca²⁺-ATP-actin 保存在 G-buffer (5 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 mmol/L ATP, 0.1 mmol/L CaCl₂, 0.5 mmol/L DTT 和 0.1 mmol/L NaN₃) 中。

1.9.1 荧光分光光度计检测 PFN 及点突变蛋白对肌动蛋白自发成核的影响

3% 芘(pyrene) 标记的 G-actin 与 1×ME (1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L MgCl₂) 孵育 2 min 后加入不同浓度(0、1、3、5 μmol/L) 的 PFN 或者 5 μmol/L PFN、PFN (F78D)、PFN (V113W) 蛋白, 孵育 3 min, 之后加入 1×KMEI, 用 G-buffer 补齐至 150 μL 体系。用荧光测定仪 [QuantaMaster Luninescence QM 3 PH Fluorometer (Photon Technology International, Inc.)] 检测反应体系内荧光值的变化。检测的激发波长和发射波长分别为 365 nm 和 407 nm。

1.9.2 高速共沉淀检测 PFN 及点突变蛋白对肌动蛋白聚合的影响

参考 Jiang 等方法^[13], 首先将 3 μmol/L G-actin 与不同浓度(0、1、3、5 μmol/L) 的 PFN 蛋白, 4 °C 共孵育 50 min, 然后加入 10×KMEI (10 mmol/L EGTA, 10 mmol/L MgCl₂, 500 mmol/L KCl, 100 mmol/L imidazole, pH 8.0) 至终浓度为 1 倍, 室温聚合 16 h, 随后 4 °C、90 000 r/min 离心 30 min。上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE, Image J 软件分析蛋白条带丰度, 进行统计分析, 实验重复 3 次。

参考上述方法, 分别检测 PFN 及 PFN (F78D)、PFN (V113W) 点突变蛋白在不同浓度(0、1、3、5 μmol/L) 时, 对 F-actin 聚合的影响。

2 结果与分析

2.1 PFN 的结构分析

利用生物信息学软件, 将粗糙脉孢菌 PFN 与来自酵母、拟南芥、牛、阿米巴、小鼠 5 种真核生物的同源序列进行比对, 结果显示它们的氨基酸序列一致性较低, 但是三级结构相似度较高, 均含有 4 个 α-螺旋、7 个 β-折叠片, 与肌动蛋白的相互作用主要分布在 β-折叠片 3、

4、5 和羧基端 α -螺旋及附近。基于以上的结构分析,结合本实验室前期对粗糙脉孢菌 PFN 的研究,本文选择位于 β -折叠片 4 的 F78 和紧邻羧基端 α -螺旋的 V113 两处位点对 PFN 进行定点突变(图 2),分别将 78 位苯丙氨酸(F)突变为丙氨酸(A)或天冬氨酸(D),将 113 位缬氨酸(V)突变为谷氨酸(E)或精氨酸(R)或色氨酸(W),从体内和体外两个角度研究其功能,以期阐明 PFN 调控粗糙脉孢菌的生长发育机制。

2.2 PFN 点突变株(F78A、F78D、V113E、V113R、V113W)的获得

以质粒 pBluescript-SK-5'flank-PFN-3'UTR-hph 为定点突变模板,分别以 F78A-F/F78A-R、F78D-F/F78D-R、V113E-F/V113E-R、V113R-F/V113R-R、V113W-F/V113W-R 为引物进行 PCR 反应,诱导目的基因 PFN 突变,再分别以测序验证正确的质粒为模板扩增目的片段:5'flank-PFN (F78A)-3'UTR-hph、5'flank-PFN (F78D)-3'UTR-hph、5'flank-PFN (V113E)-3'UTR-hph、5'flank-PFN (V113R)-3'UTR-hph 和 5'flank-PFN

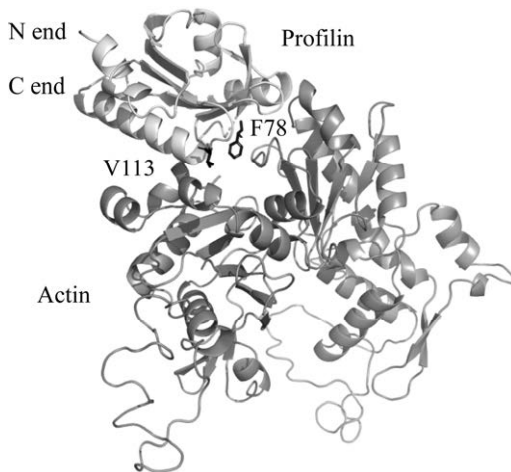


图 2 粗糙脉孢菌 PFN 与 actin 的复合体结构
Figure 2 Predicted three-dimensional structure of *Neurospora crassa* PFN-actin complex based on the structure of bovine PFN-actin coordinates (PDB ID: 3Ub5). Light grey: PFN; dark grey: actin.

(V113W)-3'UTR-hph,各自以质粒 pBlueScript-SK-PFN 3'flank-hph 为模板扩增获得的 3'flank-hph 片段(图 3A),作为 knock-in 片段通过电穿孔法转化粗糙脉孢菌菌株 *ku70^{RIP}*,含潮霉素的斜面培养基上传代 3-5 次后,利用分生孢子过膜的方法获得纯合 PFN 点突变株 (F78A、F78D、V113E、V113R、V113W),PCR 鉴定并进一步测序验证。

从测序结果(图 3B)可以看出,所有序列与预期结果完全相符,F78 突变为 A (5'-3': TTC→GCC)/D (5'-3': TTC→GAT),V113 突变为 E (5'-3': GTC→GAG)/R (5'-3': GTC→CGA)/W (5'-3': GTC→TGG)。

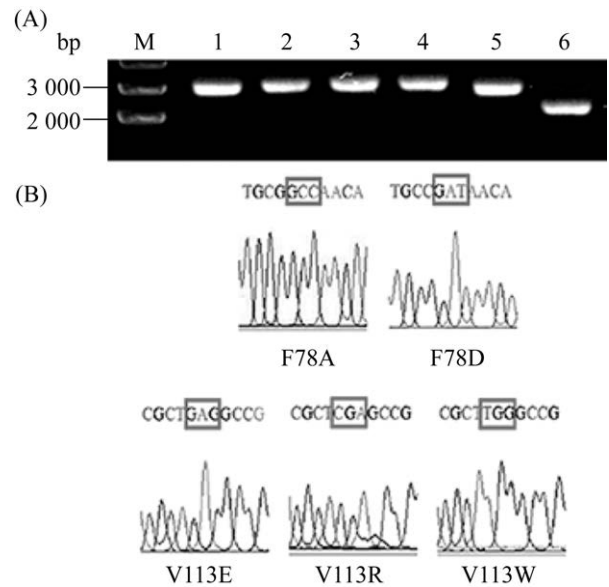


图 3 PFN 点突变株的构建

Figure 3 Construction of PFN point mutants. A: PCR amplification of the target fragments. M: marker; lane 1: 5'flank-PFN (F78A)-3'UTR-hph; lane 2: 5'flank-PFN (F78D)-3'UTR-hph; lane 3: 5'flank-PFN (V113E)-3'UTR-hph; lane 4: 5'flank-PFN (V113R)-3'UTR-hph; lane 5: 5'flank-PFN (V113W)-3'UTR-hph, lane 6: 3'flank-hph; B: sequencing results of site-directed mutagenesis. Mutated characters were shown with rectangles.

2.3 PFN 及点突变株(F78A、F78D、V113E、V113R、V113W)表型分析

2.3.1 菌落生长表型观察

为了分析 PFN (F78、V113W)定点突变后对粗糙脉孢菌生长发育的影响, 本文对所有点突变菌株进行了平板培养观察, 并在接种后 12、24、36 和 48 h 4 个时间点对菌落直径分别进行了测量(图 4)。与对照相比, PFN 点突变株 (F78A、F78D、V113E、V113R、V113W)表现出不同程度的长势差异, 其中 PFN (F78A)、PFN (V113E)和 PFN (V113R)菌株在培养前期, 与对照菌株菌落生长相比明显减慢, 而到 48 h 时, 差异不明显。PFN (F78D)和 PFN (V113W)菌株在所检测的时间段生长均缓慢, 在 12、24、36 和 48 h 时, PFN (F78D)突变体菌落直径分别约为对照的 20.0%、31.6%、27.8%和 75.7%, PFN (V113W)突变体菌落直径分别约为对照的 21.1%、12.7%、23.5%和 39.2%, 表明 PFN (F78D)和 PFN (V113W)突变明显抑制了菌落的生长。

此外, PFN (F78D)菌落呈紧实伞状, PFN (V113W)菌落呈疏松簇状, 分生孢子数量也明显减少。以上结果表明, F78 和 V113 对于粗糙脉孢菌的生长发育具有重要的调控作用, 并且 PFN (F78D)和 PFN (V113W)的作用尤为显著。

2.3.2 菌丝生长速率和分生孢子形成节律观察

Race tube 分析是研究菌丝生长速度和分生孢子形成节律最常用的检测手段。基于平板分析的结果, 后续主要对突变株 PFN (F78D)和 PFN (V113W)进行研究。利用 Race tube 分析的结果如图 5 所示, 菌株 PFN (F78D)的菌丝平均生长速率为(1.06±0.14) cm, PFN (V113W)的菌丝平均生长速率为(0.81±0.15) cm, 分别约为对照菌株 *ku70^{RIP}* (3.31±0.39) cm 的 32.0%和 24.5%, 表明 F78D 和 V113W 显著抑制了菌丝的生长。从分生孢子形成的节律来看, 呈现清晰的周期性, 与对照菌株相似, 表明 F78D 和 V113W 突变未对分生孢子的形成节律产生明显影响。

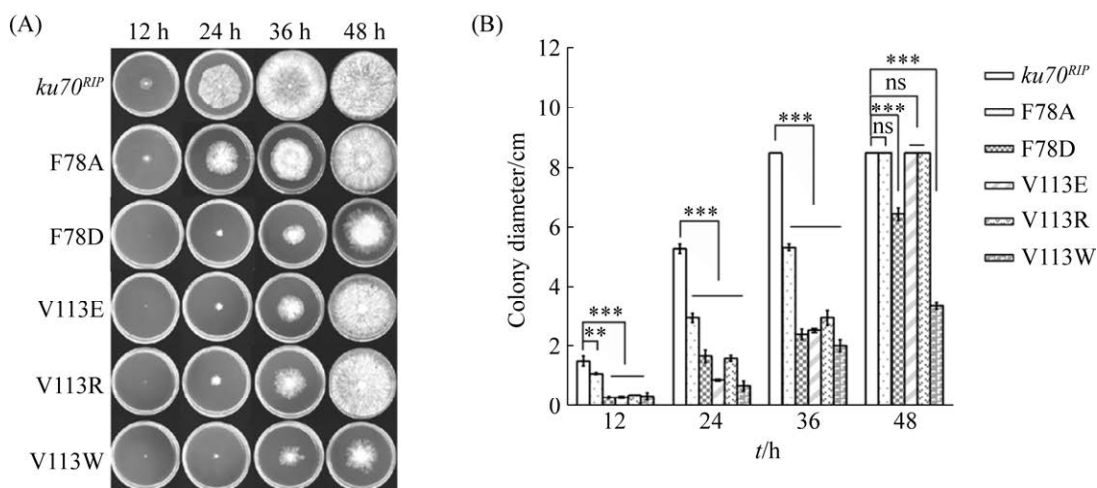


图 4 PFN 点突变株在平板上的表型

Figure 4 The phenotypes of PFN point mutants strains grown on plates with minimal medium. A: the colony morphologies of PFN point mutant strains; B: analysis of colony diameter of PFN point mutant strains. Results are means±SD of three parallel measurements. Different numbers of star indicate a significant difference. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; student's t -test.

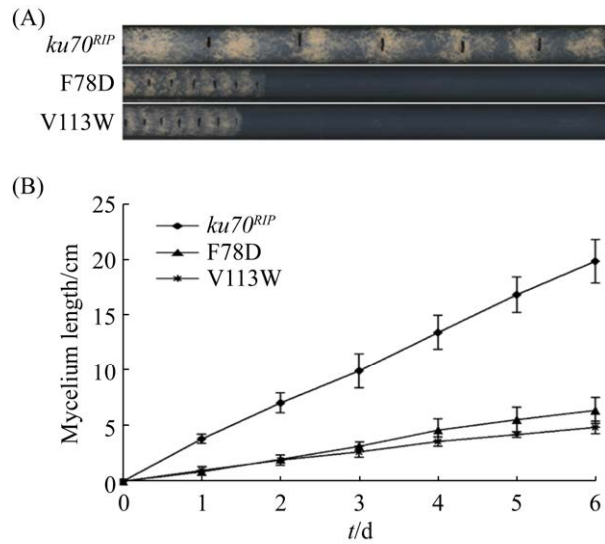


图 5 *PFN* 点突变株菌丝生长速率和分生孢子形成节律的检测

Figure 5 Race tube assays of *ku70^{RIP}* and *PFN* point mutant strains on minimal medium. A: mycelium growth and circadian conidiation rhythm in *ku70^{RIP}* and *PFN* point mutant strains; B: growth rate of *ku70^{RIP}* and *PFN* point mutant strains. Data were measured at 25 °C in constant darkness. Results are means±SD of three parallel measurements. Student's *t*-test.

2.3.3 菌丝分枝表型观察

为了进一步分析 *PFN* (F78D、V113W) 定点突变后在细胞水平上对粗糙脉孢菌菌丝生长的影响, 本文通过 Calcofluor White 对 *ku70^{RIP}* 对

照菌株和 *PFN* (F78D) 和 *PFN* (V113W) 突变菌株细胞壁进行了染色, 荧光显微镜观察结果如图 6 所示。可以看出, 与对照菌株 *ku70^{RIP}* 的菌丝比较, 突变体菌丝形态表现出不同程度的异常, 其中 *PFN* (F78D) 变细且分枝较短, *PFN* (V113W) 菌丝明显变细。

2.4 *PFN* (F78D、V113W) 点突变蛋白对肌动蛋白动态特性的调节

为了研究 *PFN* (F78D) 和 *PFN* (V113W) 定点突变对粗糙脉孢菌生长发育的调控机制, 本文在 *E. coli* BL21(DE3) 中对 *PFN*、*PFN* (F78D) 和 *PFN* (V113W) 蛋白进行了诱导表达和纯化, 并对它们的体外生化特性进行了分析。

2.4.1 pET23a-*PFN* 及点突变 pET23a-*PFN* (F78D)、pET23a-*PFN* (V113W) 表达载体的构建

以粗糙脉孢菌总 cDNA 为模板, PCR 扩增获得 *PFN* 片段, 与 pET23a 载体连接后, 转化至大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒进行双酶切鉴定, 从图 7 可以看出, 酶切后片段大小分别为 3 666 bp 和 402 bp, 与预期大小一致。测序验证正确后获得蛋白表达载体 pET23a-*PFN*。以 pET23a-*PFN* 为定点突变质粒模板, 利用引入定点突变的引物进行 PCR 扩增, 构建获得相应的表达载体 pET23a-*PFN* (F78D)、pET23a-*PFN* (V113W), 测序验证正确后进行蛋白表达和纯化(图 7)。

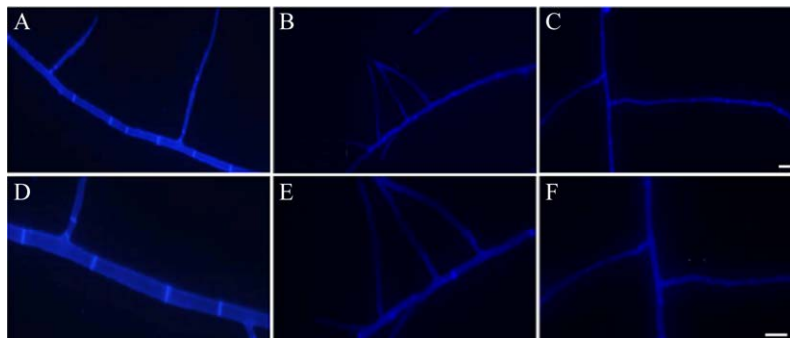


图 6 *PFN* 点突变株菌丝的形态观察

Figure 6 Hyphal morphologies of control and *PFN* point mutant strains. A, D: *ku70^{RIP}*; B, E: *PFN* (F78D); C, F: *PFN* (V113W). Bar: 10 μ m.

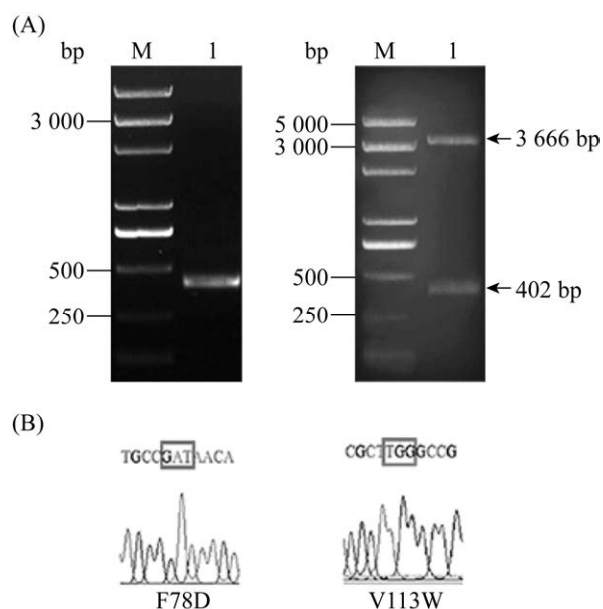


图 7 PFN 点突变表达载体构建

Figure 7 Construction of expression vector pET23a-PFN (F78D) and pET23a-PFN (V113W). A: results of PCR amplification (left panel) and enzyme digestion (right panel); B: sequencing results of site-directed mutagenesis. Mutated characters were shown with rectangles.

2.4.2 PFN、PFN (F78D)和 PFN (V113W)蛋白的纯化

利用 PFN 与多聚脯氨酸结合的特性, 通过多聚脯氨酸亲和层析柱对 PFN 及 PFN (F78D) 和 PFN (V113W) 突变蛋白进行纯化, 12% SDS-PAGE 检测, 从图 8 可以看出, 在大约 14 kDa 处分别有特异性条带, 成功纯化获得了 PFN 及 PFN (F78D) 和 PFN (V113W) 突变蛋白。

2.4.3 PFN、PFN (F78D)、PFN (V113W) 蛋白对肌动蛋白聚合自发成核的调节

利用 pyrene 标记的 G-actin 在合适条件下聚合成 F-actin 后荧光信号增强的特点, 可通过荧光分光光度计检测 G-actin 聚合的动态以及 PFN 对 G-actin 聚合动态过程的影响。结果表明, 不加 PFN 时, G-actin 聚合呈现典型的 S 型曲线, 包括成核期、生长期和稳定期 3 个

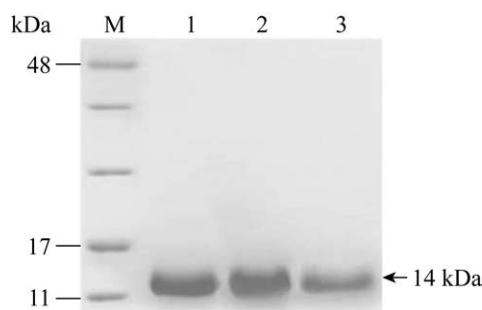


图 8 PFN 及点突变蛋白的 SDS-PAGE 检测

Figure 8 Purified recombinant wild-type PFN and its mutants. M: protein marker; lane 1: PFN; lane 2: PFN (F78D); lane 3: PFN (V113W).

阶段, 加入不同浓度的 PFN (1、3、5 $\mu\text{mol/L}$) 后, 荧光信号快速上升起始的时间滞后, 达到稳定期的时间也随之延迟, 表明 PFN 抑制了 F-actin 的自发成核过程, 并且抑制程度表现为剂量效应(图 9A)。

当聚合体系中加入同等浓度(5 $\mu\text{mol/L}$) PFN 及点突变蛋白 PFN (F78D)、PFN (V113W) 后, 荧光信号快速上升起始的时间均滞后, 表明它们都能够抑制 F-actin 的自发成核过程, 与 PFN 比较, PFN (F78D)、PFN (V113W) 抑制作用减弱(图 9B)。

2.4.4 PFN、PFN (F78D)、PFN (V113W) 蛋白对肌动蛋白聚合的调节

在 actin 的聚合体系中加入不同浓度的 PFN 以及突变蛋白, 待达到稳定状态后, 通过强大离心力, 将 G-actin (上清) 和 F-actin (沉淀) 分开, 进行 SDS-PAGE, 并对上清中 G-actin 的含量进行分析。结果表明, 未加入 PFN 时, 上清中 G-actin 含量占反应体系中加入总 G-actin 含量的 $8.92\% \pm 0.93\%$, 随着体系中 PFN 浓度的增加, 上清中未聚合的 G-actin 含量逐渐增加, 当 PFN 浓度升至 5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 上清中 G-actin 含量增加到 $82.22\% \pm 1.13\%$, 说明 PFN 抑制了 F-actin 的聚合, 并表现为浓度依赖效应(图 10A)。当分

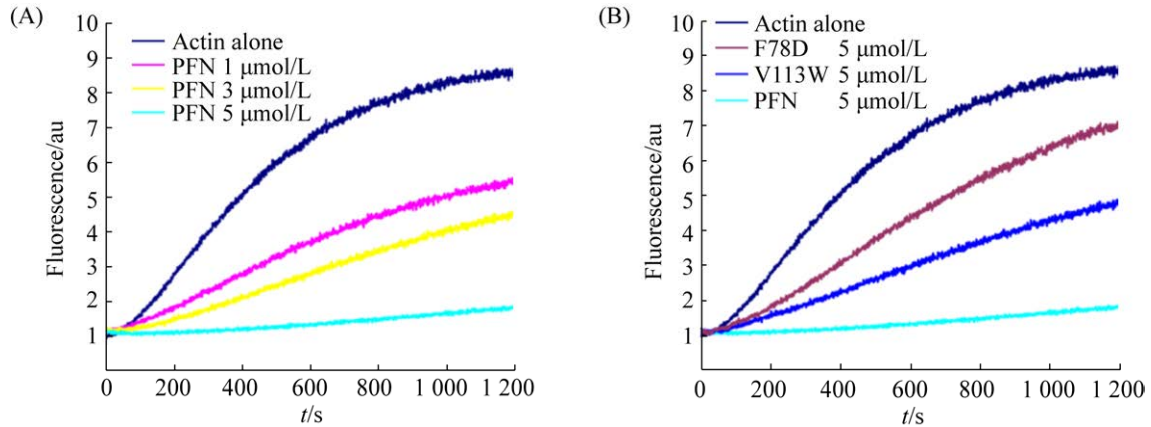


图9 利用 pyrene 标记的 actin 分析 PFN 和突变蛋白对 actin 聚合的影响

Figure 9 Pyrene conjugated actin assay to measure actin polymerization in the presence of PFN and mutant PFNs. A: assay to measure actin polymerization in the presence of increasing concentrations of PFN; B: assay to measure actin polymerization in the presence of 5 $\mu\text{mol/L}$ PFN and mutant proteins (F78D, V113W).

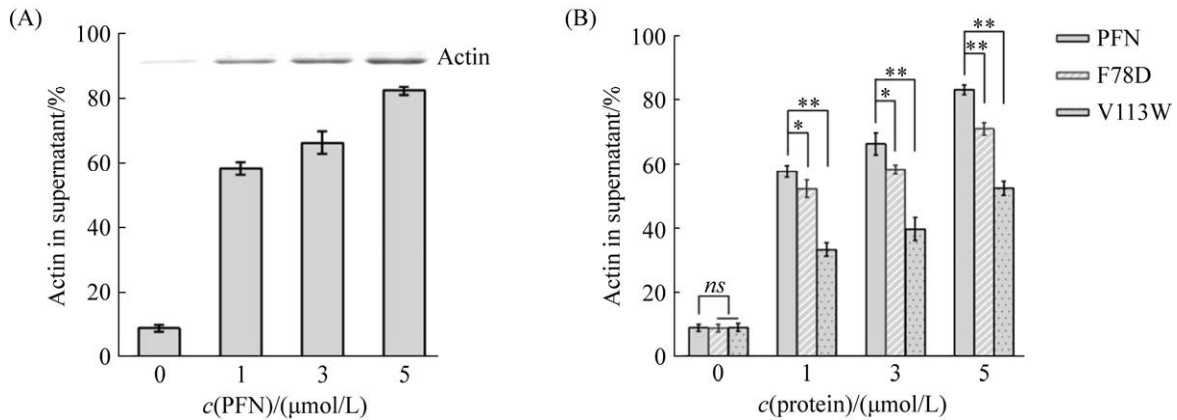


图10 PFN 和点突变蛋白与 actin 的高速共沉淀结果

Figure 10 High-speed co-sedimentation assay to assess actin polymerization in the presence of PFN and mutant PFNs. A: results of various concentrations of PFN copolymerized with actin; B: results of various concentrations of PFN and mutant PFNs (F78D, V113W) copolymerized with actin. Different numbers of star indicate a significant difference. *ns*: not significant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; student's *t*-test.

别加入同等浓度的 PFN 及突变蛋白 PFN (F78D)、PFN (V113W)后, 上清中未聚合的 G-actin 含量逐渐减少, 在检测的浓度 1、3、5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 与野生型 PFN 相比, 加入 PFN (F78D)的体系上清中 G-actin 含量分别减少了约 5.5%、8.0%和 12.0%, 加入 PFN (V113W)的体系上清中 G-actin 含量分别减少了约 23.4%、

26.6%和 30.7%, 结果差异显著, 表明 PFN (F78D)、PFN (V113W)与 G-actin 结合的能力减弱, 抑制 F-actin 聚合的能力显著下降(图 10B)。

3 讨论与结论

微丝骨架的解聚/聚合动态特性对于生物体维持正常生长发育是必需的, 而且是其执行

功能的前提, PFN 是调节微丝骨架动态最关键的一种 ABP。在粗糙脉孢菌中, PFN 是必需基因, 因此研究其蛋白结构及功能具有非常重要的意义, 预测活性位点并分析其功能则是一种重要的研究途径。Schutt 等利用 X-射线晶体衍射等方法研究牛 PFN-actin 复合体结构时发现, PFN 与 actin 之间的相互结合面, 位于 PFN β -折叠片 4、5、6 和羧基端 α -螺旋及附近, 通过与 Actin 亚结构域 1 和 3 的氨基酸残基之间的疏水相互作用、离子键和氢键等非共价键来维持二者之间紧密的结合^[14]。基于对粗糙脉孢菌 PFN 的结构分析, 结合本实验室的前期研究, 从改变 PFN 与 actin 的结合能力大小为出发点, 选择位于 β -折叠片 4 的 F78 和紧邻羧基端 α -螺旋的 V113 两处位点对 PFN 进行定点突变研究。分别将 F78 突变为 A 或 D, 将 V113 突变为 E 或 R 或 W, 成功构建了粗糙脉孢菌 PFN (F78A)、PFN (F78D)、PFN (V113E)、PFN (V113R) 和 PFN (V113W) 点突变株, 并对其生长表型进行了观察, 进一步完成了 PFN、PFN (F78D) 和 PFN (V113W) 蛋白的纯化及体外生化性质分析。

适量的 G-actin 被 PFN 结合对于细胞正常生长是必需的, 当 PFN 与 G-actin 之间的平衡被打破, 细胞的生长会受到影响^[15]。真菌菌丝的生长需要 F-actin 作为轨道运输囊泡至生长点, 这些囊泡含有细胞壁和细胞膜合成的原料^[16-17]。丝束蛋白作为 F-actin 的交联蛋白, 在稻瘟病菌中被敲除后, 细胞内 F-actin 束减少, 囊泡运输受到阻碍, 菌落生长速度变慢^[4]。禾谷镰刀菌调节 F-actin 动态的加帽蛋白功能缺失后, 菌落紧密, 生长明显受到抑制^[18]。本研究中 PFN (F78D) 和 PFN (V113W) 突变株菌落和菌丝呈现与上述报道相似的表型, 生长缓慢, 推测其原因是 PFN 突变后菌丝细胞 F-actin 组装异常, 从

而造成了囊泡运输至菌丝顶端及嵌入质膜的速率发生改变, 这还需后续进一步研究证实。

来自其他生物的研究大多显示 PFN 上 actin 结合位点突变后与 actin 的亲合力降低的现象, 如: 体外研究重组牛 PFN1 对 actin 聚合的影响时, 通过生物信息学分析设计定点突变引入额外的化学键, 目的是增强 PFN (V60E)、PFN (G120F) 与 actin 的亲合力, 结果却反而降低了与 G-actin 的亲合力, PFN 的 F59、K125 分别与 actin 的 H173、E364 相互作用, 当将 F59 突变为 A、K125 突变为 A 后, 达到了与 G-actin 的亲合力下降的预期效果^[19]。来自盘基网柄菌的点突变蛋白 PFN (K114E) 比例提高 3 倍才能达到野生型 PFN 对 actin 聚合同等的抑制效果^[20]。在对 COS 7 细胞星状体形成的研究过程中发现, PFN (H119E) 缺乏与 G-actin 的亲合力, 但是保持与其他配体结合的能力^[21]。有报道表明, 位于 actin 亚结构域 3 的 W-loop (aa: 165-172) 和亚结构域 1 的 C 末端 (aa: 349-375) 是与 PFN 稳定结合的主要界面, 依据本研究预测的粗糙脉孢菌 PFN-actin 结构可以看出, F78 和 V113 分别与 actin 的 W-loop 和 C 末端结合, 当它们分别被突变后, 对 F-actin 聚合和自发成核的抑制能力下降, 我们推测是 PFN 突变蛋白与 actin 的相互作用力减弱, 或者由于空间位阻引起临近氨基酸发生位移, 导致了 PFN (F78D) 和 PFN (V113W) 与 G-actin 的亲合力降低。从已搜集的相关文献看, PFN 中负责与 actin 相互作用的氨基酸残基仅有少数几个是高度保守的, 其他大多数并不保守, 因此本研究结果为 PFN 如何调节 actin 动态提供了新的数据, 为进一步阐明 PFN 调控生物体生长发育机制奠定了基础。

致谢: 感谢清华大学黄善金教授在实验过程中给予的指导。

参考文献

- [1] Velle KB, Fritz-Laylin LK. Diversity and evolution of actin-dependent phenotypes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2019, 58/59: 40–48.
- [2] Takeshita N. Coordinated process of polarized growth in filamentous fungi. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2016, 80(9): 1693–1699.
- [3] Virag A, Griffiths AJF. A mutation in the *Neurospora crassa* actin gene results in multiple defects in tip growth and branching. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41(2): 213–225.
- [4] Li YB, Xu R, Liu CY, Shen NN, Han LB, Tang DZ. *Magnaporthe oryzae* fimbrin organizes actin networks in the hyphal tip during polar growth and pathogenesis. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(3): e1008437.
- [5] Davey RJ, Moens PD. Profilin: many facets of a small protein. *Biophysical Reviews*, 2020, 12(4): 827–849.
- [6] Liu C, Zhang Y, Ren HY. Profilin promotes formin-mediated actin filament assembly and vesicle transport during polarity formation in pollen. *The Plant Cell*, 2021, 33(4): 1252–1267.
- [7] Vidali L, Augustine RC, Kleinman KP, Bezanilla M. Profilin is essential for tip growth in the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell*, 2007, 19(11): 3705–3722.
- [8] Ramachandran S, Christensen HE, Ishimaru Y, Dong CH, Chao-Ming W, Cleary AL, Chua NH. Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2000, 124(4): 1637–1647.
- [9] Thorn KS, Christensen HE, Shigeta R Jr, Huddler D Jr, Shalaby L, Lindberg U, Chua NH, Schutt CE. The crystal structure of a major allergen from plants. *Structure*, 1997, 5(1): 19–32.
- [10] 孙海涛, 黄璐, 陈志玲. 粗糙脉孢菌前纤维蛋白 Y86 和 R88 位点突变抑制菌丝生长. *中国生物化学与分子生物学报*, 2015, 31(9): 952–959.
Sun HT, Huang L, Chen ZL. Profilin mutations Y86R/R88E and Y86R/R88E inhibit hyphal growth in *Neurospora crassa*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 31(9): 952–959. (in Chinese)
- [11] Cao XM, Liu X, Li HD, Fan YM, Duan JB, Liu Y, He Q. Transcription factor CBF-1 is critical for circadian gene expression by modulating white collar complex recruitment to the *frq* locus. *PLoS Genetics*, 2018, 14(9): e1007570.
- [12] Spudich JA, Watt S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction: i. biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *Journal of Biological Chemistry*, 1971, 246(15): 4866–4871.
- [13] Jiang YX, Wang J, Xie YR, Chen NZ, Huang SJ. ADF10 shapes the overall organization of apical actin filaments by promoting their turnover and ordering in pollen tubes. *Journal of Cell Science*, 2017, 130(23): 3988–4001.
- [14] Schutt CE, Myslik JC, Rozycki MD, Goonesekere NCW, Lindberg U. The structure of crystalline profilin- β -actin. *Nature*, 1993, 365(6449): 810–816.
- [15] Fan TT, Zhai HH, Shi WW, Wang J, Jia HL, Xiang Y, An LZ. Overexpression of profilin 3 affects cell elongation and F-actin organization in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(1): 149–160.
- [16] Bergs A, Ishitsuka Y, Evangelinos M, Nienhaus GU, Takeshita N. Dynamics of actin cables in polarized growth of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 682.
- [17] Riquelme M, Martínez-Núñez L. Hyphal ontogeny in *Neurospora crassa*: a model organism for all seasons. *F1000Research*, 2016, 5: 2801.
- [18] Tang GF, Chen A, Dawood DH, Liang JT, Chen Y, Ma ZH. Capping proteins regulate fungal development, DON-toxisome formation and virulence in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant Pathology*, 2020, 21(2): 173–187.
- [19] Schluter K, Schleicher M, Jockusch BM. Effects of single amino acid substitutions in the actin-binding site on the biological activity of bovine profilin I. *Journal of Cell Science*, 1998, 111(22): 3261–3273.
- [20] Lee SS, Karakesisoglou I, Noegel AA, Rieger D, Schleicher M. Dissection of functional domains by expression of point-mutated profilins in *Dictyostelium* mutants. *European Journal of Cell Biology*, 2000, 79(2): 92–103.
- [21] Suetsugu S, Miki H, Takenawa T. The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *The EMBO Journal*, 1998, 17(22): 6516–6526.

(本文责编 张晓丽)