



不同温度下酿酒酵母细胞分裂周期蛋白 Cdc5 在有丝分裂中的分子动力学研究

李慧¹, 杨彤¹, 陈茜², 白鑫¹, 丁祥^{2*}

¹西华师范大学生命科学学院, 西南野生动植物资源保护教育部重点实验室, 四川 南充 637009

²西华师范大学环境科学与工程学院, 四川 南充 637009

摘要:【目的】探究不同温度下酿酒酵母细胞分裂周期蛋白 Cdc5 蛋白在有丝分裂中的分子动力学变化。

【方法】本研究以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为材料, 采用活细胞成像的方法, 探究 Cdc5 蛋白在不同温度下在酿酒酵母有丝分裂过程中的精细分子动力学变化; 通过测量 OD_{595} 绘制生长曲线图, 看其宏观的分裂情况是否与微观下 Cdc5 蛋白的分子动力学变化一致; 利用流式细胞术检测细胞的细胞周期变化的情况。【结果】在胞质分裂时, Cdc5 蛋白从母细胞进入子细胞, 并在芽颈处发生聚集。25 °C 条件下细胞中 Cdc5 蛋白在芽颈处的聚集时间长, 37 °C 条件下 Cdc5 蛋白在芽颈处聚集时间短, 两者间存在显著差异; 但两个温度下, 细胞中 Cdc5 蛋白的表达量没有显著性差异。同时, 温度也会影响 Cdc5 蛋白在降解过程中的动力学行为, 包括 Cdc5 蛋白在母细胞与子细胞中荧光强度峰值出现的次数和时间。生长曲线结果显示, 酿酒酵母单一细胞分裂周期的变化影响了其宏观的细胞生长, 且酵母分裂速度越快, 子细胞长宽比越小; 细胞周期结果表明, 37 °C 下 Cdc5 蛋白的动力学变化与酿酒酵母细胞周期变化一致, 酿酒酵母细胞周期从 G₀/G₁ 期进入 S 期, 亦加速了酿酒酵母的分裂。【结论】本研究首次探究了不同温度下酿酒酵母有丝分裂中 Cdc5 蛋白的精细分子动力学及对应的酵母的宏观生长情况, 结果表明温度会对 Cdc5 蛋白的动力学产生影响, 且其精细分子动力学与酿酒酵母的分裂速度成正相关, 该结果为进一步研究其在细胞有丝分裂中的功能提供了前期研究基础。

关键词: 酿酒酵母, 有丝分裂, Cdc5 蛋白, 分子动力学, 细胞周期

细胞分裂是母细胞将细胞核和细胞质分裂为 2 个子细胞的过程, 该过程在生物体的整个生命周期中至关重要, 是生物体生长、发育和繁殖的基

础^[1]。酿酒酵母作为单细胞真核生物, 具有和动植物相似的细胞结构特征且基因组小, 生命周期短, 繁殖快速, 可以在二倍体和单倍体这两种状态间相

基金项目: 四川省科技厅应用基础重点项目(2018JY0087); 四川省科技厅重点研发项目(2018NZ0055)

*通信作者。Tel/Fax: +86-817-2568176; E-mail: dingxiang@cwnu.edu.cn

收稿日期: 2021-01-16; 修回日期: 2021-05-09; 网络出版日期: 2021-06-07

互转换,常用作研究真核生物的模式生物。通过对酿酒酵母细胞分裂机制的研究对揭示细胞生物学和人类健康中的重要问题具有重要意义^[2]。细胞的生长与分裂不仅受自身的生长与调控机制如必需基因表达调控、细胞分裂调控等的影响,而且还受外界环境如溶氧量、温度、pH 值等的影响,其中温度是影响细胞中蛋白表达和功能体现的极其重要的因素之一^[3]。Bembenek 等以酿酒酵母为对象对有丝分裂退出途径(mitotic exit network, MEN)中的关键蛋白进行了研究,研究结果表明,在 37 °C 条件下酿酒酵母 BY4743 菌株中细胞分裂周期蛋白 14 (cell division cycle protein 14, Cdc14)在参与芽颈形成的隔蛋白(septin)处的定位被打乱,且出现芽生长和胞质分裂不完全的现象^[4]。Zhang 等的研究发现,参与细胞组装的 6 种热休克蛋白(heat shock protein),包括 Hsp9、Hsp16、Hsp20、Hsp104 等,只有 Hsp9 参与正常温度下的营养代谢,而另外 5 种蛋白在高温胁迫中显示不同的蛋白功能^[5]。谷月等研究表明,酿酒酵母菌株 FFC2146 在 37 °C 胁迫下细胞壁蛋白质中出现热休克蛋白 Hsp70 家族伴侣蛋白 Ssa2 使得细胞壁在高温下依然保持完整,以维持细胞正常的生长繁殖^[6]。以上研究表明,不同温度下细胞中蛋白的表达和功能存在一定差异。

隔蛋白 Septin 是一类高度保守的鸟苷三磷酸(GTP)结合蛋白,在酿酒酵母分裂位点形成由 Cdc3、Cdc10、Cdc11、Cdc12 等蛋白构成的杆状同源寡聚复合体。这些复合体组装成细丝和其他高级结构(例如环或沙漏状结构),以执行胞质分裂、维持细胞形态等一系列重要的生理功能^[7-8]。在细胞周期开始时(G₁期),隔蛋白 Septin 通过胞吐作用募集到芽位点并形成隔蛋白 Septin 环。在子细胞生长过程中(S/G₂期),隔蛋白 Septin 会形成一个由双细

丝组成的沙漏结构。当细胞分裂进入后期时,隔蛋白 Septin 呈现出由双细丝和单细丝相互交织而成的纱布状的过渡结构。在胞质分裂时,隔蛋白 Septin 在芽颈处形成由双细丝和单细丝周向排列组成的双环结构^[9-10]。

在酿酒酵母中,*cdc5* 编码的蛋白与哺乳动物的 Polo 样激酶 1 (Polo-like kinase 1, Plk1)具有较高的同源性,其结构和功能与高级真核生物的 Plk1 高度保守^[11]。Cdc5 蛋白在 S 期的后期开始合成,其蛋白表达水平在有丝分裂后期达到顶峰,直到细胞分裂结束前降解。Cdc5 蛋白在 G₂ 期及有丝分裂后期都定位于芽颈^[12-14],对胞质分裂和调节膜沉积至关重要^[15]。研究发现,Cdc5 蛋白在有丝分裂早期聚集在细胞核中,对调节核形态与核膜扩张有着重要作用,有丝分裂后期若阻止 Cdc5 蛋白从细胞核中释放会导致细胞有丝分裂出现缺陷^[14,16]。

虽然有关于 Cdc5 蛋白在芽颈处定位的相关报道,但却未见其精细的分子动力学报道,因此本研究以酿酒酵母作为模型来探讨不同温度下酿酒酵母有丝分裂中 Cdc5 蛋白的分子动力学变化。因此,本文将为进一步研究 Cdc5 蛋白在细胞有丝分裂中的功能提供了前期研究基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本实验中所使用的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)基因型(genotype)如下: YEF2231 (WT: W303-1A: *MATa ade2-1 his3-11, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 can1-100*)、YEF9105 (WT: *Cdc3-mCherry: Leu2*)、YEF7869 (WT: *Cdc5-GFP: His3*)、YEF9087 (WT: *Cdc5-GFP: His3; Cdc3-mCherry: Leu2*), 以上菌株保存于四川省西华师范大学生命科

学学院西南野生动植物资源保护教育部重点实验室。

1.2 主要药品及仪器

1.2.1 实验试剂: 酵母无氨基酸基础氮源(Yeast Nittogen Base w/o Amino Acids) 购于 Becton Dickinson 公司, 葡萄糖(Dextrose) 购于 Thermo Fisher Scientific 公司, 丙氨酸(Alanine)、精氨酸(Arginine) 等 19 种氨基酸购于 Thermo Fisher Scientific 公司, 天冬酰胺(Asparagine) 购于 Acros 公司, 肌醇(Myo-Inositol)、腺嘌呤(Adenine)、氨基苯甲酸(Amiobenzoic Acid)、尿嘧啶(Uracil) 购于 Sigma-Aldrich 公司, 琼脂(Agar) 购于 Thermo Fisher Scientific 公司, 细胞周期与凋亡试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司, 高保真 DNA 聚合酶(Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase) 购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 质粒 DNA 提取试剂盒(ZR Plasmid Miniprep-Classic Kit) 购于北京天漠科技开发有限公司。

1.2.2 仪器与设备: 激光共聚焦显微镜(Leica TCS-SP8); 荧光正置显微镜(Leica DMI3000B); Epoch 酶标仪(美国基因有限公司); T630SC 流式细胞仪(Bio-Rad); T100 PCR 仪(Bio-Rad)。

1.2.3 培养基: 酵母 SC 液体培养基(synthetic complete medium, SC Medium, g/L): 丙氨酸 0.0835, 精氨酸 0.0835, 天冬酰胺 0.0835, 天冬氨酸 0.0835, 半胱氨酸 0.0835, 谷氨酸 0.0835, 谷氨酰胺 0.0835, 甘氨酸 0.0835, 异亮氨酸 0.0835, 甲硫氨酸 0.0835, 苯丙氨酸 0.0835, 脯氨酸 0.0835, 丝氨酸 0.0835, 苏氨酸 0.0835, 酪氨酸 0.0835, 缬氨酸 0.0835, 肌醇 0.0835, 氨基苯甲酸 0.0083, 腺嘌呤 0.0209, 组氨酸 0.0835, 亮氨酸 0.1671, 赖氨酸 0.083, 色氨酸 0.0835, 尿嘧啶 0.0418, 酵母无氨基酸基础氮源 6.7, SC powder 1.91, 配制为 900 mL 溶液,

121 °C 灭菌 50 min, 葡萄糖 20 g/L, 配制为 100 mL 溶液, 121 °C 灭菌 50 min, 将两种溶液混合均匀后, 4 °C 保存。在酵母 SC 液体培养基配制基础上添加琼脂 20 g/L, 即为酵母 SC 固体培养基。

1.3 酿酒酵母菌株的构建

在 *Cdc5* 基因终止子前整合 *GFP* 基因。引物设计为 40 bp 目标基因同源片段+20 bp 质粒通用片段 (*Cdc5*-F5: GGAAGGTTTGAAGCAGAAGTCCACA ATTGTTACCGTAGATGGTGACGGTGCTGGTTT A, *Cdc5*-R3: GTAATTCGTATTCGTATTTCTTTCT ACTTTAATATTGGTTTCGATGAATTCGAGCTCG), PCR 反应以质粒为模板, 扩增 *GFP* 基因, 采用同源重组法, 将带有目的基因同源片段的筛选标记转入酵母中, 利用 His 营养缺陷筛选培养基, 挑出单克隆, 并在荧光显微镜下镜检, 分离带有荧光蛋白标记的菌株, 进行纯化和甘油保存。运用整合质粒 YIp128-*Cdc3*-mCherry (整合型, LEU2) 在其自身启动子的控制下携带一个 N 端带有 mCherry 标记的 *cdc3* (*Cdc3* 蛋白为酿酒酵母周期指示蛋白), 通过 *Bgl* II 酶进行酶切, 用酶切片段进行转化, 与 *cdc3* 基因通过同源重组, 将 YEF7869 转化为 YEF9187, 利用 Leu 营养缺陷筛选培养基, 挑出单克隆, 并在荧光显微镜下镜检, 分离带有荧光蛋白标记的菌株, 进行纯化和甘油保存^[17]。

1.4 显微镜镜检

在 25 °C 及 37 °C 下使用 Leica TCS-SP8 激光共聚焦显微镜进行活细胞成像。为了获得较高质量的图像, 在进行活细胞成像时, 采用的参数为: 连续光学切片 11 个, 成像间距 0.5 μm, GFP/mCherry 曝光时间为 300–500 ms, 间隔 2 min, 总时间 90 min^[18]。

1.5 生长曲线的测定

将 YEF9087 菌体均匀涂布到 SC 固体培养基

上, 于 25 °C 恒温培养箱培养 48 h。刮取 YEF9087 菌体, 接种至 4 mL SC 液体培养液中, 置于 25 °C, 120 r/min 恒温摇床振荡培养 24 h; 测得 OD_{595} (酶标仪) 为 0.5–0.8, 得到种子液。取 1 mL 种子液接种于 10 mL SC 液体培养中; 分别置 25 °C 和 37 °C 恒温摇床中培养 12 h, 每 2 h 取 200 μ L 菌液用酶标仪检测 OD_{595} , 每种培养 3 个重复; 收集数据, 并用 GraphPad Prism 8 作图, 以培养时间为横坐标, OD_{595} 为纵坐标, 绘制生长曲线。

1.6 流式细胞仪测定细胞周期

取 1 mL 处于对数生长期的菌液, 2000 r/min 离心 5 min, 去上清, 加入 1 mL 4 °C 预冷的 70% 乙醇后置于 -20 °C 冻存过夜。将上述混合液 2000 r/min 离心 5 min, 去上清, 向沉淀中加入 50 mmol/L 柠檬酸钠溶液 1 mL, 以 2000 r/min 离心 5 min, 去上清, 重复洗涤 1 次, 加入 500 μ L PI 染料染色, 37 °C 避光水浴 30 min 后, 立即上机测定^[19]。

1.7 数据分析

图像处理和分析使用 Fiji 图像处理软件。为了定量荧光强度, 在统计芽颈处 Cdc5 和 Cdc3 的荧光强度($n=12$)以及母细胞和子细胞中 Cdc5 的荧光强度($n=12$)时, 使用相同的 VANILE 比值, 以减少荧光强度的统计误差。通过对 Cdc5 蛋白从母细胞进入子细胞直至降解的过程中, Cdc5 蛋白的荧光强度进行求取平均值, 得到荧光强度平均值。

所有数据均表示为 $x \pm s$, 并且使用 SPSS 软件单因素方差分析对实验组与对照组之间的显著差异进行统计学分析。* $P < 0.05$ 表示差异显著, ** $P < 0.01$ 表示差异极显著。使用 GraphPad Prism 8 作图, 柱状图单个点显示所有数据, 每个柱形顶部的误差线表示该组数据的标准差。

2 结果和分析

2.1 不同温度下 Cdc5 的动力学变化

为了观察不同温度下酿酒酵母有丝分裂中 Cdc5 蛋白的分子动力学变化, 以 Cdc3-mCherry 和 Cdc5-GFP 作为检测信号, 通过激光共聚焦扫描检测 Cdc5 蛋白的运动过程。结果表明, Cdc5 在胞质分裂开始时由母细胞向子细胞移动, 并且在芽颈处发生聚集。Cdc5 蛋白定位于芽颈处, 聚集处的荧光颜色呈黄色(图 1-A)(箭头指向为 Cdc5 蛋白的聚集)。37 °C 条件下 Cdc5 蛋白在芽颈处也出现聚集(图 1-B)。以上结果提示, 在胞质分裂期间, Cdc5 蛋白从母细胞进入子细胞, 并在芽颈处发生聚集。该结果与 Botchkarev VV Jr 的研究结果相一致^[14]。

为探究 Cdc5 蛋白在芽颈处的分子动力学变化, 隔蛋白 septin 双环在胞质分裂完成时, 双环将会分开形成“八”字, 因此以隔蛋白 Septin 双环断裂为时间节点(隔蛋白 Septin 双环断裂前时间为“-”, 隔蛋白 Septin 双环断裂后时间为“+”), 分别统计了芽颈处 Cdc5 蛋白和 Cdc3 蛋白的荧光强度(Cdc3 蛋白为酿酒酵母周期指示蛋白)($n=12$)。在 25 °C 条件下, -42 min 时, Cdc5 蛋白在芽颈处发生聚集, 其荧光强度为 81 a.u., 而 37 °C 条件下, Cdc5 蛋白则在 -18 min 时发生聚集, 延迟了 24 min, 其荧光强度为 53 a.u. (图 2-A, B)。统计结果显示, 37 °C 条件下, Cdc5 蛋白的荧光强度亦较弱, 但与 25 °C 条件下 Cdc5 蛋白的荧光强度相比无显著性差异。

为了更加明确 Cdc5 蛋白在芽颈处的精细动力学变化, 以隔蛋白 Septin 双环断裂时的荧光强度为基准, 定量统计了芽颈处 Cdc5 蛋白和 Cdc3 蛋白的荧光强度百分比。结果显示, 在 25 °C 条件下, Cdc5 蛋白在芽颈处的荧光强度出现双峰(图 2-C),

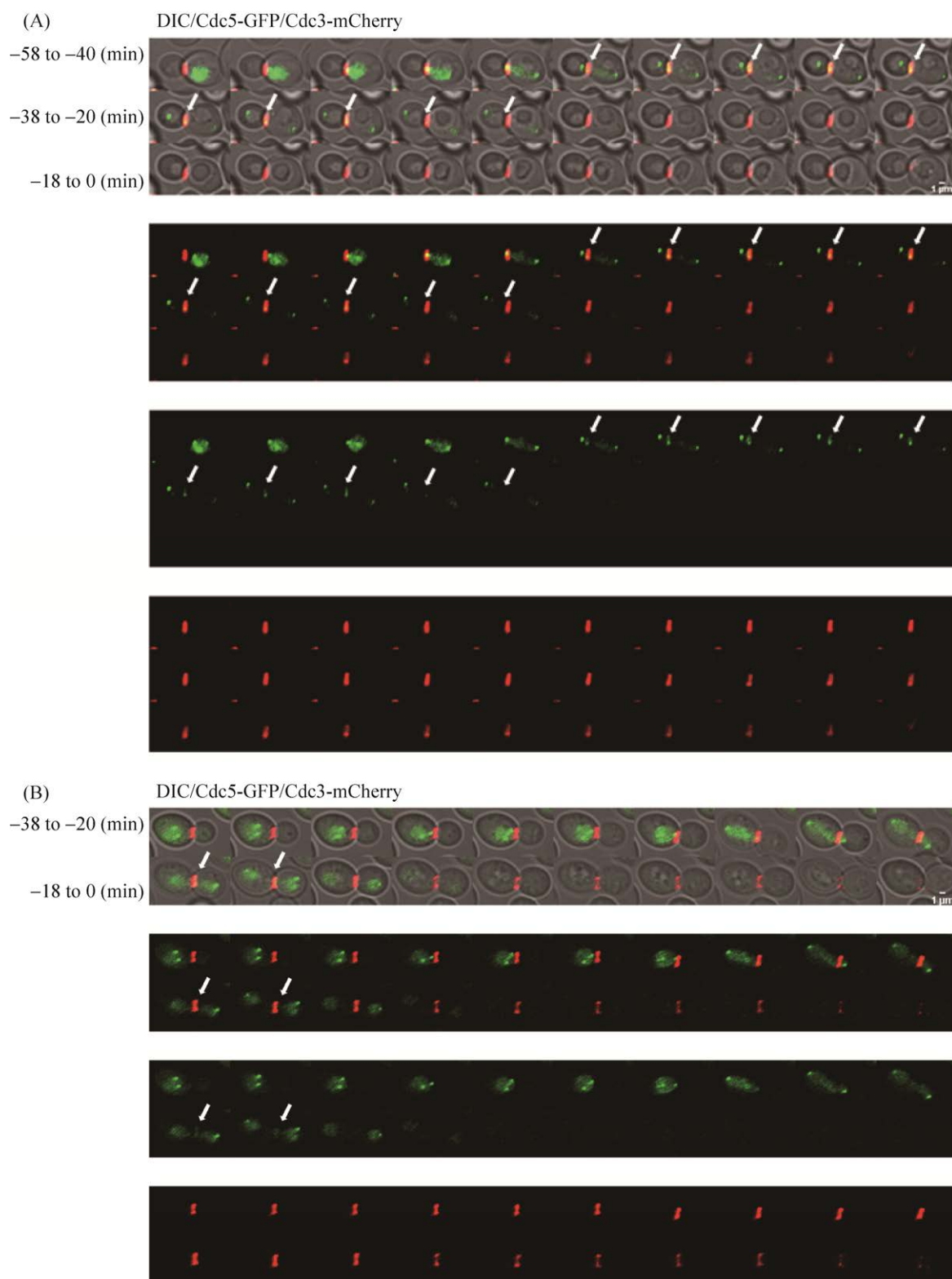


图 1. 25 °C (A)与 37 °C (B)条件下酿酒酵母细胞有丝分裂过程中 Cdc5 蛋白的动力学变化图示

Figure 1. The dynamic changes of Cdc5 protein and of budding yeast mother cells during mitosis at 25 °C (A) and 37 °C (B). Cdc3 acts as a clock protein.

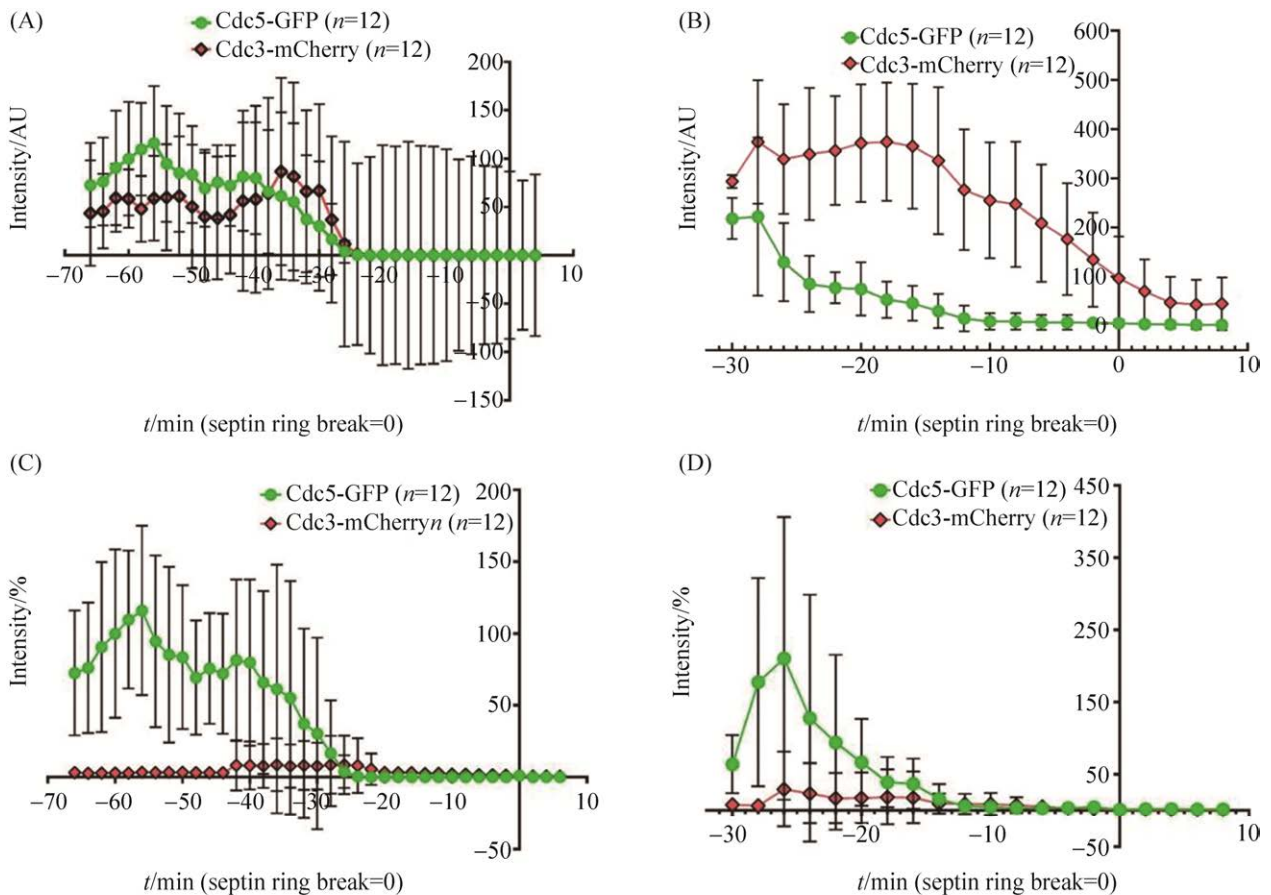


图 2. 25 °C (A、C)与 37 °C (B、D)条件下在酿酒酵母有丝分裂中处于芽颈处的 Cdc5 蛋白的荧光强度统计图和荧光强度百分比统计图($n=12$)

Figure 2. Statistical chart of fluorescence intensity and percentage of fluorescence intensity of Cdc5 protein at the bud neck of budding yeast during mitosis at 25 °C (A, C) and 37 °C (B, D). Cdc3 acts as a clock protein ($n=12$).

提示 Cdc5 蛋白从母细胞通过芽颈处进入子细胞后, 再次在芽颈处发生聚集。而在 37 °C 条件下, Cdc5 蛋白在芽颈处的荧光强度出现单峰及短暂的平台期(图 2-D), 提示 Cdc5 蛋白从母细胞通过芽颈处进入子细胞后, 亦在芽颈处发生聚集。结果表明, 37 °C 条件下, 酿酒酵母的分裂时间加快。在 25 °C 条件下, Cdc5 蛋白从-42 min 时在芽颈处开始聚集且聚集时间为 (13.5 ± 4.4) min, 而在 37 °C 条件下, Cdc5 蛋白从-18 min 时开始在芽颈处聚集, 但 Cdc5 蛋白的聚集时间极显著缩短($P<0.01$), 为 (3.8 ± 1.3) min (图 3)。该结果首次展示了在酿酒酵母

有丝分裂中 Cdc5 蛋白处于芽颈处的聚集时间及荧光强度, 结果表明, 25 °C 条件下细胞中 Cdc5 蛋白在芽颈处的聚集时间长, 37 °C 条件下 Cdc5 蛋白在芽颈处聚集时间短, 两条件下 Cdc5 蛋白的聚集时间存在显著差异; 但在两个温度下, 细胞中 Cdc5 蛋白的荧光强度并没有显著性差异。该结果提示, 温度会影响 Cdc5 蛋白在芽颈处的聚集时间, 但不影响其表达量。

为探究 Cdc5 蛋白在完成其使命后的降解过程中的动力学变化, 以隔蛋白 Septin 双环断裂为时间节点(隔蛋白 Septin 双环断裂前时间为“-”, 隔蛋白

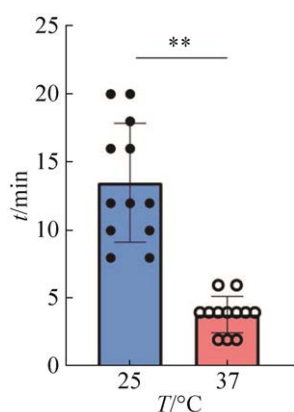


图 3. 在 25 °C 和 37 °C 条件下在酿酒酵母有丝分裂中 Cdc5 蛋白处于芽颈处的聚集时间($n=12$)

Figure 3. The accumulation time of Cdc5 at the bud neck of budding yeast during mitosis at 25 °C and 37 °C ($n=12$). *: significant difference at $P<0.05$; **: significant difference at $P<0.01$.

Septin 双环断裂后时间为“+”), 本实验分别统计了 Cdc5 蛋白从母细胞进入子细胞的前 2 min 直到分裂完成过程中 Cdc5 蛋白的荧光强度($n=12$)。结果显示, 25 °C 条件下, 在-40 至-24 min 期间, 子细胞中的 Cdc5 蛋白荧光强度高于其在母细胞中的荧光强度, 在-38 min 时子细胞中 Cdc5 蛋白荧光强度最强, 为 36 AU, 而母细胞中 Cdc5 蛋白在-40 min 时荧光强度最强, 为 31 AU (图 4-A); 而在 37 °C 条件下, 在-22 至-14 min 期间, 子细胞中的 Cdc5 蛋白荧光强度亦高于其母细胞中的荧光强度, -18 min 时子细胞中 Cdc5 蛋白荧光强度最强为 40 AU, 而母细胞中 Cdc5 蛋白在-22 min 时荧光强度最强, 为 34 AU (图 4-B)。在细胞分裂结束前, 两种温度下母细胞和子细胞中的 Cdc5 蛋白的荧光强度趋于一致并开始降解。该统计结果显示, 在 2 个温度条件下, Cdc5 蛋白进入子细胞直至降解过程中, 母细胞中的 Cdc5 蛋白的荧光强度平均值均高于其在子细胞中的荧光强度。值得注意的是, 在 25 °C 条件下, Cdc5 蛋白在母细胞与子细胞中的荧光强度平

均值分别为 29 AU 和 26 AU, 而在 37 °C 条件下, 其在母细胞与子细胞中的荧光强度平均值分别为 27 AU 和 26 AU, 由此可见不同温度下 Cdc5 蛋白在母细胞与子细胞中的荧光强度平均值没有显著性差异(图 4-C, D)。

为了更加明确 Cdc5 蛋白在降解过程中的精细动力学变化, 以 Cdc5 蛋白进入子细胞时的荧光强度为基准, 定量统计了 Cdc5 蛋白从母细胞进入子细胞的前 2 min 直到分裂完成过程中 Cdc5 蛋白的荧光强度百分比。结果显示, 不同温度条件下, Cdc5 蛋白从母细胞进入子细胞后, 均维持一段时间后才开始发生降解。25 °C 条件下, 子细胞中 Cdc5 蛋白的荧光强度分别在-54、-46、-38 min 出现峰值(图 4-C), 而 37 °C 条件下, 子细胞中 Cdc5 蛋白的荧光强度分别在-22 min 和-24 min 出现峰值(图 4-D)。值得注意的是, 在 25 °C 和 37 °C 条件下, 母细胞中 Cdc5 蛋白的荧光强度分别在-42 min 和-22 min 出现了一个小峰。该结果首次展示了 Cdc5 蛋白降解过程中在母细胞与子细胞中的动力学变化。结果表明, 温度会影响 Cdc5 蛋白在降解过程中的动力学行为, 包括 Cdc5 蛋白在母细胞与子细胞中出现的次数和时间, 值得注意的是, 虽然在胞质分裂过程中, 不同温度下母细胞中 Cdc5 蛋白的荧光强度平均值均高于子细胞中 Cdc5 蛋白的荧光强度平均值, 但温度并不影响 Cdc5 蛋白在母细胞与子细胞中的表达量。在 25 °C 条件下, Cdc5 蛋白从胞质分裂开始至降解的时间为(33.5 ± 8.0) min 且酿酒酵母从胞质分裂至分裂完成的时间为(58.5 ± 10.3) min, 而 37 °C 条件下, Cdc5 蛋白的持续时间与酵母分裂时间都极显著($P<0.01$)缩短了, 分别为(13.8 ± 2.0) min 与(24.7 ± 2.5) min (图 5)。结果提示, 升高温度会影响 Cdc5 蛋白在胞质分裂过程中的持续时间。

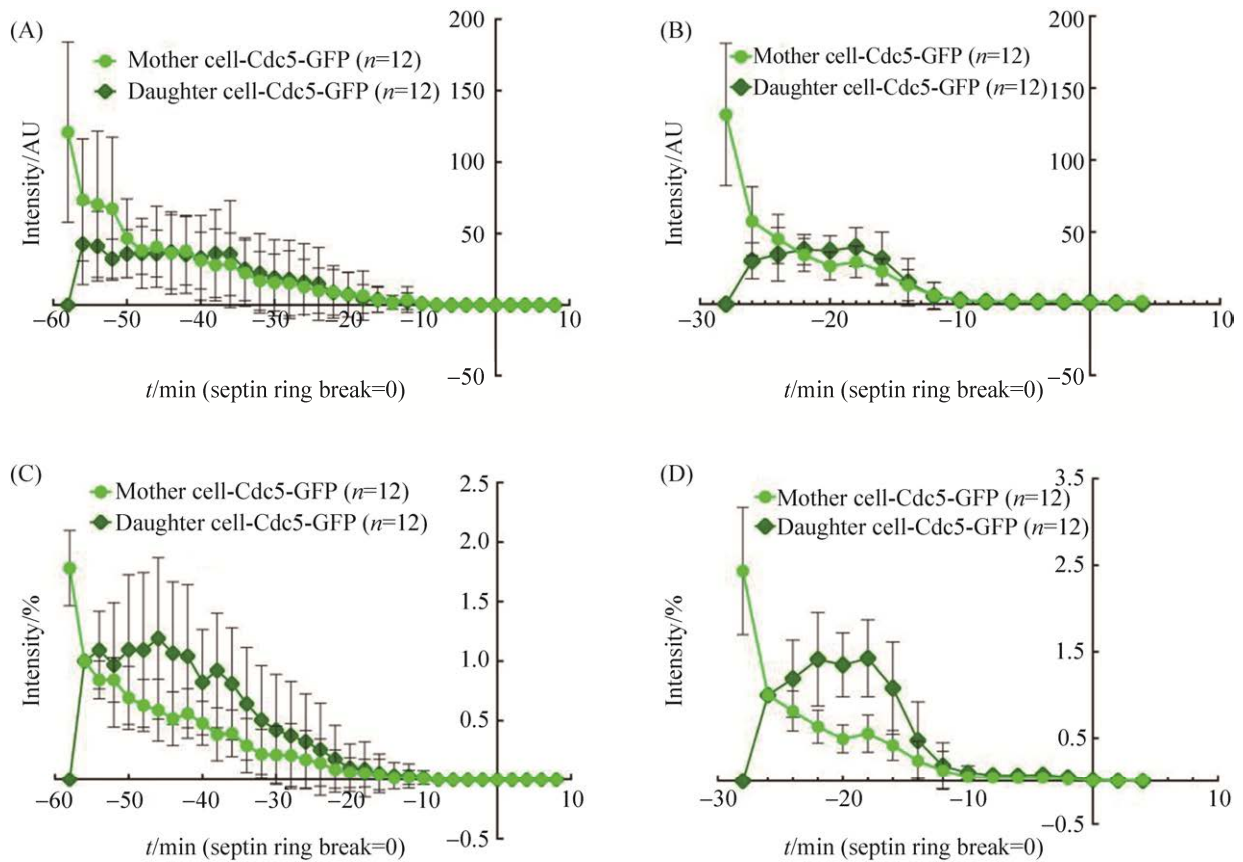


图 4. 25 °C (A、C)与 37 °C (B、D)条件下酿酒酵母有丝分裂中母细胞与子细胞中 Cdc5 蛋白的荧光强度统计图和荧光强度百分比统计图($n=12$)

Figure 4. Statistical chart of fluorescence intensity and percentage of fluorescence intensity of Cdc5 protein in mother cells and daughter cells of budding yeast during mitosis at 25 °C (A, C) and 37 °C (B, D) ($n=12$).

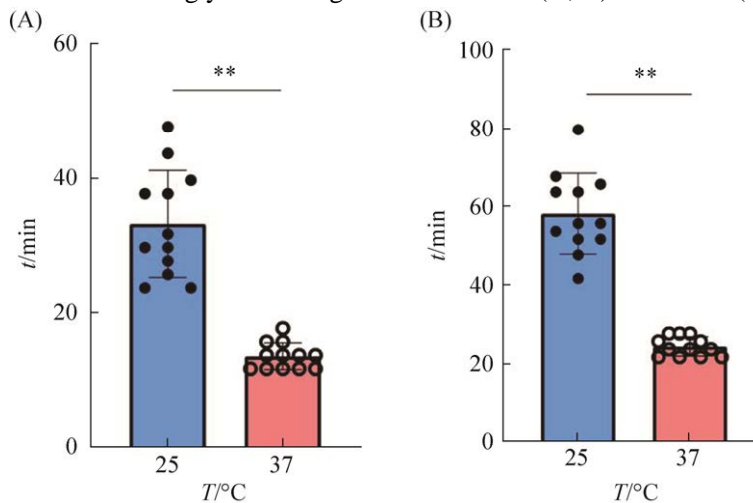


图 5. 25 °C 与 37 °C 条件下酿酒酵母有丝分裂过程中 Cdc5 蛋白从胞质分裂至降解(A)与胞质分裂至分裂完成(B)的时间($n=12$)

Figure 5. The time of Cdc5 protein from cytokinesis to degradation (A) and from cytokinesis to division completion (B) during mitosis of *Saccharomyces cerevisiae* at 25 °C and 37 °C ($n=12$). *: significant difference at $P<0.05$; **: significant difference at $P<0.01$.

2.2 不同温度对酿酒酵母形态及生长影响

为了探究酿酒酵母宏观的分裂情况与微观的 Cdc5 蛋白的分子动力学变化的一致性, 本实验分别在 25 °C 及 37 °C 条件下检测了酿酒酵母的生长曲线(图 6-A)。结果表明, 在 25 °C 和 37 °C 条件下, 0–2 h 酿酒酵母生长速度差别不明显; 2 h 后, 酿酒酵母在两温度下的生长速度加快, 其生长斜率分别为 0.2392 和 0.2882; 37 °C 条件下, 酿酒酵母在 6 h 时进入平台期, 其 OD_{595} 为 0.839, 而 25 °C 条件下, 酿酒酵母在 8 h 时才进入平台期, 其 OD_{595} 为 0.768。这一结果表明, 37 °C 条件下酿酒酵母的生长速度较快。但从形态上看(图 6-B), 不同温度下, 处于对数生长期的酿酒酵母形态均为椭圆形和类椭圆形, 这与 Dominguez 等的研究结果一致^[20]。前面, 我们统计了 Cdc5 蛋白从胞质分裂开始到降解的时间, 结果表明, 升高温度会使 Cdc5 蛋白从胞质分裂开始到降解的持续时间发生显著性缩短, 且胞质分裂开始至分裂完成的时间也发生显著性缩短。以上结果提示, 酿酒酵母单一细胞分裂周期的变化, 影响了其宏观的细胞生长。

为了进一步探究酿酒酵母子细胞大小变化与分裂情况的关系, 通过激光共聚焦扫描, 统计了胞质分裂时及分裂末期时酿酒酵母子细胞的长宽比 ($n=10$)。结果表明(图 7), 25 °C 条件下, 酿酒酵母细胞开始进入胞质分裂时的子细胞的长宽比为 (1.190 ± 0.083) , 分裂完成时子细胞的长宽比为 (1.256 ± 0.089) 。而在 37 °C 条件下, 酿酒酵母细胞开始进入胞质分裂时的子细胞的长宽比为 (1.091 ± 0.095) , 分裂完成时子细胞的长宽比为 (1.144 ± 0.069) (图 7)。和 25 °C 条件相比, 37 °C 条件下, 进入胞质分裂时的子细胞的长宽比减小了 0.099, 差异具有显著性 ($P<0.05$), 而分裂完成时子细胞的长宽比减小了 0.112, 差异极显著 ($P<0.01$)。以上结果提示, 温度越高, Cdc5 蛋白从胞质分裂开始到降解的持续时间发生显著性缩短, 酵母分裂速度越快, 子细胞长宽比越小。

2.3 酿酒酵母细胞周期分析

为了进一步探究酿酒酵母在不同温度下生长周期的变化情况与 Cdc5 蛋白的分子动力学变化的关系, 将处于对数生长期的酿酒酵母细胞经过 PI

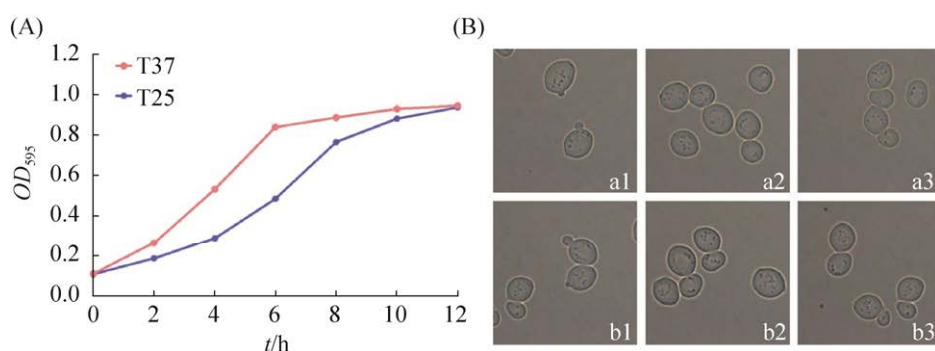


图 6. 酿酒酵母在 25 °C 和 37 °C 条件下的生长曲线(A)及细胞形态学(B)

Figure 6. Growth curve (A) and cell morphology (B) of budding yeast at 25 °C and 37 °C. a1–a3: The cell morphology of budding yeast during budding, cytokinesis and division at 25 °C; b1–b3: The cell morphology of budding yeast during budding, cytokinesis and division at 37 °C.

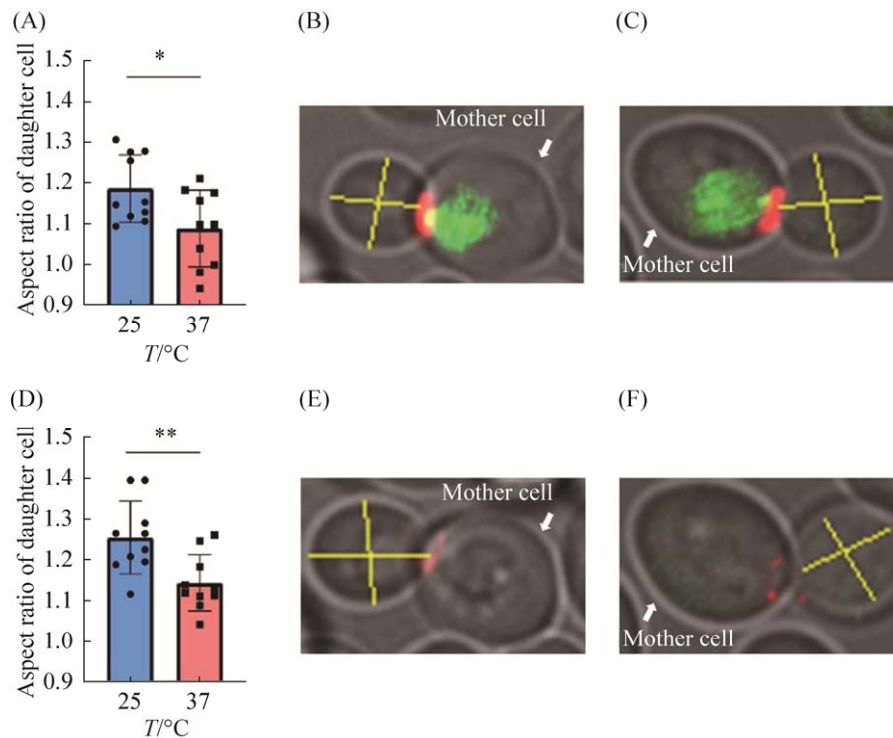


图 7. 25 °C 和 37 °C 条件下酿酒酵母子细胞的长宽比值($n=10$)

Figure 7. The aspect ratio of daughter cells at 25 °C and 37 °C ($n=10$). A: the statistical results of aspect ratio of daughter cell when entering cytokinesis; B: measurement of daughter cells when entering cytokinesis at 25 °C; C: measurement of daughter cells when entering cytokinesis at 37 °C; D: the statistical results of aspect ratio of daughter cell at the end of cell division; E: measurement of daughter cells at the end of cell division at 25 °C; F: measurement of daughter cells at the end of cell division at 37 °C. Blue indicates the aspect ratio of the daughter cell at 25 °C, red indicates the aspect ratio of the daughter cell at 37 °C. *: significant difference at $P<0.05$; **: significant difference at $P<0.01$.

染色后, 用流式细胞仪检测, 用 FlowJo_V10 处理分析酿酒酵母细胞周期, 通过 FSC/SSC 设门的方法确定原始细胞群(图 8-A), 通过 FL3-A/FL3-H 设门, 去除粘连体, 进行细胞周期分析(图 8-B), 得到 25 °C 与 37 °C 条件下细胞周期直方图(图 8-C)。结果表明, 在 25 °C 条件下, 酿酒酵母细胞周期中各期的细胞数量比分别为 G_0/G_1 ($58\pm 0.72\%$)、S ($7.04\pm 0.83\%$)、 G_2/M ($28.43\pm 2\%$), 而在 37 °C 条件下, 细胞周期中各期的细胞数量比分别为 G_0/G_1 ($46.83\pm 1.89\%$)、S ($16.6\pm 0.72\%$)、 G_2/M ($25.87\pm 0.84\%$)

(图 9)。37 °C 较 25 °C 条件下, 处于 G_0/G_1 的细胞数量降低了 11.17%, 差异具有显著性($P<0.05$), 而 S 期的细胞数量增加了 9.56%, 差异极显著($P<0.01$), 同时, 虽然 G_2/M 的细胞数量降低了 2.56%, 但统计结果显示没有显著性差异。以上结果提示, 37 °C 条件下, Cdc5 蛋白的动力学变化与酿酒酵母细胞周期变化一致, Cdc5 蛋白在芽颈处聚集的时间和在胞质分裂过程中的持续时间缩短, 酿酒酵母细胞周期发生改变, 从 G_0/G_1 期进入 S 期细胞数量增加, 细胞分裂加速。

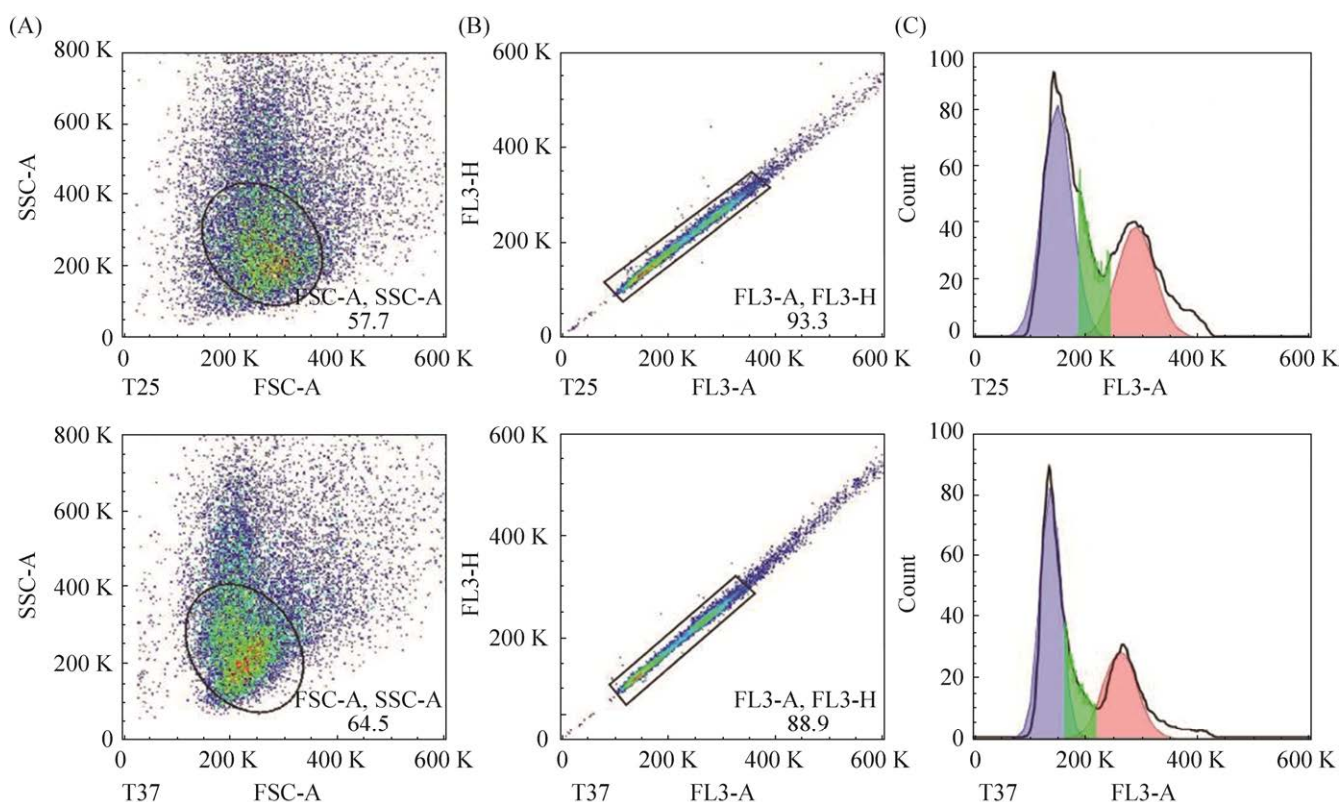


图 8. 酿酒酵母在 25 °C 和 37 °C 条件下细胞周期变化情况

Figure 8. Cell cycle changes of budding yeast at 25 °C and 37 °C.

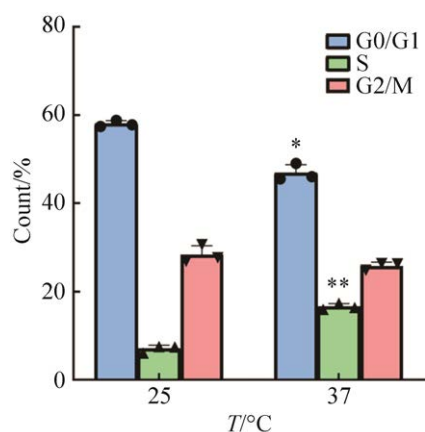


图 9. 酿酒酵母在 25 °C 和 37 °C 条件下细胞周期统计结果($n=3$)

Figure 9. Statistical results of cell cycle of budding yeast at 25 °C and 37 °C ($n=3$). *: significant difference at $P<0.05$; **: significant difference at $P<0.01$.

3 讨论

Cdc5 蛋白在酿酒酵母的细胞分裂中具有调节

有丝分裂起始、染色体分离、调节细胞核的形状、有丝分裂退出途径以及胞质分裂等方面有重要作用^[21-22]。以往的研究表明 Cdc5 蛋白主要通过触发 Cdc14 有丝分裂后期的早期释放途径(Cdc14 early anaphase release, FEAR)以及有丝分裂退出途径(mitotic exit network, MEN)促进有丝分裂的完成。同时, Cdc5 能够使 Rho1、GEF、Tus1 和 Rom2 磷酸化来促进肌动蛋白收缩环(CAR)的装配, 从而将其定位于芽颈^[22]。温度会影响 Cdc5 蛋白的活性, 从而影响纺锤体功能的正常进行, 与 23 °C 相比, 37 °C 条件下 Cdc5 蛋白 C 端 Polo-box 结构域诱变得到的温度敏感突变株 *Cdc5-11* 的纺锤体形态出现异常^[23]。随着温度从 37 °C 降低到 10 °C, 微管的聚合速率与解聚速率均会降低, 但是解聚的速率比聚合的速率更慢, 且微管解聚前的长度随着温度的

降低而趋于减小^[24]。我们的结果首次明确了在酿酒酵母细胞有丝分裂过程中 Cdc5 蛋白在芽颈处的动力学变化。结果表明, 25 °C 条件下细胞中 Cdc5 蛋白在芽颈处的聚集时间长, 37 °C 条件下 Cdc5 蛋白在芽颈处聚集时间短, 两者间存在显著差异; 但在两个温度下, 细胞中 Cdc5 蛋白的荧光强度没有显著性差异。该结果提示, 温度虽然会影响 Cdc5 蛋白在芽颈处的聚集时间, 但不影响其荧光强度。我们的结果还首次展示了 Cdc5 蛋白降解过程中在母细胞与子细胞中的动力学变化。结果表明, 温度也会影响 Cdc5 蛋白在降解过程中的动力学行为, 包括 Cdc5 蛋白在母细胞与子细胞中荧光强度峰值出现的次数和时间, 且在胞质分裂过程中, 不同温度下子细胞中 Cdc5 蛋白的荧光强度均高于母细胞中 Cdc5 蛋白的荧光强度, 但温度并不影响 Cdc5 蛋白在母细胞与子细胞中的表达量。以上结果表明, 温度会对 Cdc5 蛋白的动力学产生影响, 为进一步研究其在细胞有丝分裂中的功能提供了前期研究基础。

目前, 学者们已经研究鉴定出数百种 Cdc5 蛋白的底物^[25], 但其中许多底物尚待充分表征。Lepore 等的研究表明^[16], Cdc5 蛋白在胞质分裂过程中还会使芽颈处的 Sec4 磷酸化, 从而阻止 Sec4 与下游效应子 Sec15 相互作用, 并阻止芽颈处的膜转运作用, 最终调节芽殖分裂的细胞大小。Zakhartsev 等的研究结果表明^[26], 与 26.3 °C 条件下出芽酵母子细胞的直径相比, 37.5 °C 条件下子细胞的直径更小。我们的结果首次表明, 37 °C 条件下胞质分裂时及分裂完成时的子细胞的长宽比均小于 25 °C 条件下的子细胞的长宽比, 这也验证了 Lepore 等对芽殖分裂的细胞大小的研究。

Cdc5 蛋白是从 S 期到胞质分裂中细胞周期的

高度保守的关键调控因子^[27]。酿酒酵母细胞周期结果表明, 37 °C 与 25 °C 相比, 处于 G₀/G₁ 的细胞数量减少, 处于 S 期的细胞数量增多。同时激光共聚焦显示, 37 °C 条件下的酵母细胞分裂的速度远快于 25 °C 下的酵母细胞。这表明 37 °C 条件下, 酿酒酵母细胞周期发生改变, 在这期间, Cdc5 蛋白在芽颈处聚集的时间和在胞质分裂过程中的持续时间缩短, 酿酒酵母细胞从 G₀/G₁ 期进入 S 期细胞数量增加, 细胞分裂加速。

本研究首次揭示了酿酒酵母有丝分裂中 Cdc5 蛋白的精细分子动力学变化及酿酒酵母宏观生长情况与 Cdc5 蛋白的分子动力学变化的关系, 为进一步研究其在细胞有丝分裂中的功能提供了前期研究基础。

参 考 文 献

- [1] Ong JY, Torres JZ. Dissecting the mechanisms of cell division. *The Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(30): 11382–11390.
- [2] Liu Q, Yu L. Yeast, a kind of model organism. *Chemistry of Life*, 2000, 20(2): 61–65. (in Chinese)
刘擎, 余龙. 酵母: 一种模式生物. *生命的化学*, 2000, 20(2): 61–65.
- [3] Yalcin SK, Ozbas ZY. Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2008, 39(2): 325–332.
- [4] Bembenek J, Kang J, Kurischko C, Li B, Raab JR, Belanger KD, Luca FC, Yu HT. Crm1-mediated nuclear export of Cdc14 is required for the completion of cytokinesis in budding yeast. *Cell Cycle*, 2005, 4(7): 961–971.
- [5] Zhang J, Liu JL. Temperature-sensitive cytoophidium assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Genetics and Genomics*, 2019, 46(9): 423–432.
- [6] Gu Y, Piao YZ, Du W, Wang XY, Wang CY. A protein differential analysis of cell wall in *Saccharomyces cerevisiae* under different temperatures. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(12): 200–206. (in Chinese)

- 谷月, 朴永哲, 杜维, 王小瑜, 王春艳. 不同温度培养下酿酒酵母细胞壁蛋白质差异分析. *生物技术通报*, 2015, 31(12): 200–206.
- [7] Ma Q, Fei HZ. Research progress of septin gene family classification and its physiological function. *Education Teaching Forum*, 2015(38): 75–76. (in Chinese)
马强, 费慧芝. Septin 基因家族分类及其生理功能的研究进展. *教育教学论坛*, 2015(38): 75–76.
- [8] Marquardt J, Yao LL, Okada H, Svitkina T, Bi EF. The LKB₁-like kinase Elm1 controls septin hourglass assembly and stability by regulating filament pairing. *Current Biology*, 2020, 30(12): 2386–2394.e4.
- [9] Mela A, Momany M. Septin mutations and phenotypes in *S. cerevisiae*. *Cytoskeleton*, 2019, 76(1): 33–44.
- [10] Bhavsar-Jog YP, Bi EF. Mechanics and regulation of cytokinesis in budding yeast. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2017, 66: 107–118.
- [11] Zhao WY, Xu ZK, Miao Y. The relationship between PLK1 gene and pancreatic cancer. *Chinese Journal of Pancreatology*, 2006(4): 246–248. (in Chinese)
赵闻雨, 徐泽宽, 苗毅. Plk1 基因及其与胰腺癌的关系. *胰腺病学*, 2006(4): 246–248.
- [12] Sakchaisri K, Asano S, Yu LR, Shulewitz MJ, Park CJ, Park JE, Cho YW, Veenstra TD, Thorner J, Lee KS. Coupling morphogenesis to mitotic entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(12): 4124–4129.
- [13] Song S, Grenfell TZ, Garfield S, Erikson RL, Lee KS. Essential function of the polo box of Cdc5 in subcellular localization and induction of cytokinetic structures. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20(1): 286–298.
- [14] Botchkarev VV, Rossio V, Yoshida S. The budding yeast Polo-like kinase Cdc5 is released from the nucleus during anaphase for timely mitotic exit. *Cell Cycle: Georgetown, Tex*, 2014, 13(20): 3260–3270.
- [15] Meitinger F, Boehm ME, Hofmann A, Hub B, Zentgraf H, Lehmann WD, Pereira G. Phosphorylation-dependent regulation of the F-BAR protein Hof1 during cytokinesis. *Genes & Development*, 2011, 25(8): 875–888.
- [16] Lepore D, Spassibojko O, Pinto G, Collins RN. Cell cycle-dependent phosphorylation of Sec4p controls membrane deposition during cytokinesis. *The Journal of Cell Biology*, 2016, 214(6): 691–703.
- [17] Oh Y, Schreiter JH, Okada H, Wloka C, Okada S, Yan D, Duan XD, Bi EF. Hof1 and Chs4 interact via F-BAR domain and Sell-like repeats to control extracellular matrix deposition during cytokinesis. *Current Biology*, 2017, 27(18): 2878–2886.e5.
- [18] Chen X, Wang KJ, Svitkina T, Bi EF. Critical roles of a RhoGEF-anillin module in septin architectural remodeling during cytokinesis. *Current Biology*, 2020, 30(8): 1477–1490.e3.
- [19] Dai HM, Zheng J, Huang Y. Effect in cell cycle caused by overexpression of SpTrz2p in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 40(22): 11173–11174, 11178. (in Chinese)
戴鸿梅, 郑佳, 黄鹰. 高表达粟酒裂殖酵母 SpTrz2p 对细胞周期的影响. *安徽农业科学*, 2012, 40(22): 11173–11174, 11178.
- [20] Dominguez A, Varona RM, Villanueva JR, Sentandreu R. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* cell division cycle defective in cytokinesis. Biosynthesis of the cell wall and morphology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1982, 48(2): 145–157.
- [21] Mishra PK, Olafsson G, Boeckmann L, Westlake TJ, Jowhar ZM, Dittman LE, Baker RE, D'Amours D, Thorpe PH, Basrai MA. Cell cycle-dependent association of polo kinase Cdc5 with CENP-A contributes to faithful chromosome segregation in budding yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 2019, 30(8): 1020–1036.
- [22] Yoshida S, Kono K, Lowery DM, Bartolini S, Yaffe MB, Ohya Y, Pellman D. Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis. *Science*, 2006, 313(5783): 108–111.
- [23] Park CJ, Park JE, Karpova TS, Soung NK, Yu LR, Song S, Lee KH, Xia X, Kang E, Dabanoglu I, Oh DY, Zhang JY, Kang YH, Wincovitch S, Huffaker TC, Veenstra TD, McNally JG, Lee KS. Requirement for the budding yeast polo kinase Cdc5 in proper microtubule growth and dynamics. *Eukaryotic Cell*, 2008, 7(3): 444–453.
- [24] Li G, Moore JK. Microtubule dynamics at low temperature: evidence that tubulin recycling limits assembly. *Molecular Biology of the Cell*, 2020, 31(11): 1154–1166.
- [25] Snead JL, Sullivan M, Lowery DM, Cohen MS, Zhang C, Randle DH, Taunton J, Yaffe MB, Morgan DO, Shokat KM. A coupled chemical-genetic and bioinformatic approach to polo-like kinase pathway exploration. *Chemistry & Biology*, 2007, 14(11): 1261–1272.

- [26] Zakhartsev M, Reuss M. Cell size and morphological properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in relation to growth temperature. *FEMS Yeast Research*, 2018, 18(6): foy052.
- [27] Matos-Perdomo E, Machín F. The ribosomal DNA metaphase loop of *Saccharomyces cerevisiae* gets condensed upon heat stress in a Cdc14-independent TORC1-dependent manner. *Cell Cycle*, 2018, 17(2): 200–215.

Kinetics of cell division cyclin protein Cdc5 in budding yeast during mitosis at different temperatures

Hui Li¹, Tong Yang¹, Xi Chen², Xin Bai¹, Xiang Ding^{2*}

¹ Key Laboratory of Southwest China Wildlife Resources Conservation, Ministry of Education, College of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong 637009, Sichuan Province, China

² College of Environmental Science and Engineering, China West Normal University, Nanchong 637009, Sichuan Province, China

Abstract: [Objective] To explore the molecular dynamics changes of cell division cyclin protein Cdc5 in budding yeast during mitosis at different temperatures. [Methods] In this study, *Saccharomyces cerevisiae* was used as the experimental material objective to explore the molecular dynamic changes of Cdc5 protein in the mitosis process of budding yeast at different temperatures by using living cell imaging method; draw the growth curve by measuring OD_{595} to see whether the macro division is consistent with the micro dynamic changes of Cdc5 protein; use flow cytometry to detect the cell cycle changes. [Results] During cytokinesis, Cdc5 protein entered into daughter cells from mother cells and aggregated at bud neck. The aggregation time of Cdc5 protein at the bud neck was long at 25 °C, and the aggregation time of Cdc5 protein at the bud neck was short at 37 °C. There was a significant difference between them. However, there was no significant difference in the expression of Cdc5 protein between the two temperatures. At the same time, the temperature also affected the dynamics of Cdc5 protein during degradation process, including the occurrence of frequency and time of the peak of fluorescence intensity of Cdc5 in mother cells and daughter cells. The growth curve results showed that the single cell division cycle of budding yeast affected its macroscopic cell growth, and the faster the division rate of budding yeast, the smaller the ratio of length to width of the daughter cell. The cell cycle results showed that the dynamic changes of Cdc5 protein at 37 °C were consistent with the cell cycle changes of budding yeast. The cell cycle results showed that the cell cycle of budding yeast changed from G₀/G₁ phase to S phase at 37 °C, which also accelerated the division of budding yeast. [Conclusion] This study was to explore the molecular dynamics of Cdc5 protein in the mitosis of budding yeast at different temperatures and the corresponding macro growth of budding yeast for the first time. The results showed that the temperature had an effect on the dynamics of Cdc5 protein, and its molecular dynamics was positively correlated with the division speed of budding yeast, which provided a basis for further study of its function in mitosis.

Keywords: budding yeast, mitosis, cell division cycle protein 5, molecular dynamics, cell cycle

(本文责编: 李磊)

Supported by the Key Application Foundation Projects of Sichuan Science and Technology Department (2018JY0087) and by the Key Research and Development & D Projects of Sichuan Science and Technology Department (2018NZ0055)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-817-2568176; E-mail: dingxiang@cwnu.edu.cn

Received: 16 January 2021; Revised: 9 May 2021; Published online: 7 June 2021