

研究论文

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

郑文萍¹ 薄涛¹ 刘亚¹ 许静^{1,2} 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 细胞核自噬在真核生物进化过程中具有重要作用, 然而不同生物中的自噬分子调控机制并不完全清楚。嗜热四膜虫有性生殖过程中亲本大核的程序化降解是一种独特的细胞核选择性自噬。该研究从嗜热四膜虫中鉴定出一种自噬相关基因TtATG4.1(TTHERM_00526270), 编码677个氨基酸。TtATG4.1在营养生长期和饥饿期不表达, 在有性生殖期2 h特异表达, 亲本大核开始降解的anlagen时期表达量最高。通过同源重组构建获得MTT1启动子调控表达的ATG4.1突变株, 免疫荧光定位显示, Atg4.1定位在细胞质和降解的亲本大核上。过量表达Atg4.1导致anlagen时期亲本大核未能正常凝缩, 且细胞核膨大。通过自噬体和溶酶体荧光探针标记发现过量表达Atg4.1不影响亲本大核的酸化, 但相比于野生型细胞, 过表达Atg4.1细胞株中, 亲本大核的降解更快。研究表明自噬相关蛋白Atg4.1参与调控嗜热四膜虫有性生殖中亲本大核程序化降解。

关键词 Atg4.1; 过表达; 亲本大核; 程序化降解; 嗜热四膜虫

Overexpression of Atg4.1 Promote Parental Macronucleus Programmed Degradation in *Tetrahymena thermophila*

Zheng Wenping¹, Bo Tao¹, Liu Ya¹, Xu Jing^{1,2}, Wang Wei^{1*}⁽¹⁾Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; ⁽²⁾College of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract Nuclear autophagy plays an important role in the evolution of eukaryotes. However, the molecular mechanism of the autophagy is not fully understood in different organisms. The programmed nuclear death (PND) of the parental macronucleus during the sexual reproduction of *Tetrahymena thermophila* is a novel selective autophagy. In this study, autophagy-related gene TtATG4.1 (TTHERM_00526270) encoding 677 amino acids was identified from *T. thermophila*. TtATG4.1 was not expressed during vegetative growth and starvation, but specifically expressed during conjugation stage. The expression level of TtATG4.1 was the highest during anlagen period with parental macronucleus degradation. MTT1-HA-Atg4.1 mutants were created

收稿日期: 2018-12-13 接受日期: 2019-03-07

国家自然科学基金(批准号: 31601857、31872224)和山西省应用基础研究计划(批准号: 201801D221241)资助的课题

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

Received: December 13, 2018 Accepted: March 7, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31601857, 31872224), the Applied Basic Research Program of Shanxi Province (Grant No.201801D221241)

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

网络出版时间: 2019-06-05 14:41:33 URL: http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190605.1441.002.html

by homologous recombination. Immunostaining showed that HA-Atg4.1 localized in the cytoplasm during early stage of sexual reproduction, and localized in the parental macronucleus in later conjugation stage. When Atg4.1 was overexpressed, the volume of parental macronucleus failed to condense normally and became larger. The acidification of parent macronuclei was not affected in overexpressing *TtATG4.1* paired cells. However, the degradation rate of parental macronucleus was faster in overexpressing *TtATG4.1* cells at 12 h for sexual reproduction stage. The results indicated that the autophagy-related protein Atg4.1 was involved in the regulation of parental macronucleus programmed degradation during the stage of sexual reproduction of *T. thermophila*.

Keywords Atg4.1; overexpression; parental macronucleus; programmed nuclear death; *Tetrahymena thermophila*

自噬广泛存在于各种真核生物中,在细胞面临饥饿等压力环境下,由溶酶体或液泡降解和回收利用细胞内生物大分子与细胞器^[1]。自噬促使物质循环利用,维持胞内代谢平衡。自噬调控功能的丧失与各种人类疾病相关,包括癌症^[2]、神经退行性疾病^[3]、代谢紊乱^[4]及微生物感染^[5-6]。根据对降解底物的选择性可将自噬分为非选择性自噬与选择性自噬^[7]。非选择性自噬能够大量地降解多余的细胞质成分和细胞器在饥饿时为细胞新陈代谢提供物质^[8-9]。选择性自噬包括线粒体自噬(mitophagy)^[10]、过氧化物酶体自噬(pexophagy)^[11]、内质网自噬(reticulophagy)^[12]、核糖体自噬(ribophagy)^[13]、脂肪自噬(lipophagy)^[14]、蛋白聚集体自噬(aggrephagy)^[15]、异体吞噬(xenophagy)^[16]和细胞核自噬(nucleophagy)^[17]等。

细胞核自噬于2003年在酵母中首次被报道^[17]。之后发现细胞核自噬不仅存在于酵母中,而且存在于哺乳动物以及单细胞生物等大多数真核生物中^[18]。巨细胞核大自噬是存在于嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)中的独特的核自噬类型^[18]。在四膜虫有性生殖过程中,小核进行减数分裂,产生4个配子核,3个配子核降解,保留1个配子核进行有丝分裂。有丝分裂产生的配子核进行交换,融合产生合子核,合子核通过有丝分裂产生新的大核和新的小核^[19]。而随着新大核的发育,亲本大核逐渐退化消失,这一过程被称为亲本大核程序化降解(programmed nuclear death, PND)^[20]。四膜虫PND以类似于凋亡的机制触发,但最终消失通过自噬作用完成^[21],自噬相关蛋白Atg8-65p调控早期自噬体的形成,而Atg8-2p调控自噬体与亲本大核发生融合,并进一步形成大自噬体结构^[22];而三型磷酸肌醇3-激酶TtVPS34能与Atg8-2p、Atg8-65p形成复合物参与调控自噬体的形成^[20-23]。Atg8在亲本大核PND中具有重要调控作用,基于四

膜虫基因组数据库(<http://www.ciliate.org>)和功能基因组数据库(<http://tfgd.ihb.ac.cn>),还预测出在四膜虫中9种自噬相关蛋白,这些自噬相关蛋白是否参与调控PND过程并不清楚。

本研究首次分析了嗜热四膜虫自噬相关基因ATG4.1的表达并获得了过表达基因ATG4.1细胞突变株;分析了自噬相关蛋白Atg4.1在亲本大核PND过程中的定位以及过量表达对PND过程的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

嗜热四膜虫野生型细胞株B2086和Cu428由美国康奈尔大学Peter J. Bruns博士惠赠;过表达载体pXS75由罗彻斯特大学Martin A. Gorovsky教授惠赠。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株由本室保存。DNA胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、pMD18-T克隆试剂盒购自Tiangen公司;Taq DNA聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA连接酶购自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、胨蛋白、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TaKaRa公司;GABARAPL-1多抗购自武汉三鹰生物技术有限公司;Hoechst 33342、单丹磺酰尸胺、NiCl₂·6H₂O购自Sigma公司;Lyso-Tracker Red购自Beyotime公司;DNA测序和引物合成由上海生工生物工程有限公司完成。

1.2 序列分析比对

以酵母Atg4(CAA93375.1)和人Atg4B(NP_037457.3)

蛋白序列在四膜虫基因组数据库(<http://www.ciliate.org>)中进行比对分析查找同源序列。多序列比对使用ClustalX 1.8软件进行^[24]。

1.3 嗜热四膜虫细胞株的培养

嗜热四膜虫在1×SPP(含1%蛋白胨、0.2%葡萄糖、0.1%酵母提取物和0.003% EDTA铁盐)液体培养基中30 °C静置培养,待细胞生长至对数期 $2.5 \times 10^5 \sim 3.5 \times 10^5$ 细胞/mL,使用Tris-HCl(10 mmol/L, pH7.4)饥饿16~24 h,调整细胞浓度为 2.5×10^5 细胞/mL,将两种交配型细胞B2086和Cu428按1:1比例混合,30 °C静置培养。

1.4 实时荧光定量PCR

分别收集生长期、饥饿期和接合2、4、6、8、10和12 h的四膜虫细胞(细胞数 2.5×10^5 细胞/mL),Trizol裂解法裂解细胞,提取总RNA,反转录得到cDNA,以cDNA为模板,17Sr RNA为内参,利用TaKaRa试剂盒,引物RT-ATG4.1-F/RT-ATG4.1-R以及引物17S-F/17S-R进行实时荧光定量(quantitative Real-time PCR, qRT-PCR)分析,每个样品设3个平行。

1.5 重组表达质粒pXS75-ATG4.1的构建

以嗜热四膜虫cDNA为模板,引物OE-ATG4.1-F和OE-ATG4.1-R扩增得到目的片段,经琼脂糖凝胶电泳分离回收,纯化得到的目的片段与pMD19-T连接,转化大肠杆菌DH5 α ,提取鉴定重组质粒pMD19-T-ATG4.1并测序。测序正确后,BamH I和Asc I双酶切质粒pMD19-T-ATG4.1和pXS75,回收载体和目的片段,T4DNA连接酶连接,获得重组质粒pXS75-ATG4.1。全文引物序列见表1。

1.6 细胞转化与稳定细胞突变株的筛选

表达载体pXS75-ATG4.1进行Sac I和Xho I双酶

切线性化,将线性化片段浓缩至终浓度0.8~1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,使用GJ-1000高压气体基因枪(宁波新芝科技有限公司),将浓缩后的片段转化B2086和Cu428四膜虫细胞株。通过巴龙霉素抗性筛选阳性克隆细胞株,引物MTT1-F/MTT1-R扩增分析同源替代条带,获得稳定突变细胞株。

1.7 间接免疫荧光定位

收集 2.5×10^6 个细胞于Lavdowsky固定液(乙醇:甲醛:乙酸:无菌水=50:10:1:39)中,4 °C过夜,固定的细胞铺于多聚赖氨酸包被的盖玻片上,用55 μL 的PBS封闭液(3% BSA、10%山羊血清和含0.1% Tween-20的PBS)室温封闭2 h,稀释的HA兔源一抗(1:500)在4 °C过夜孵育细胞,然后用稀释的FITC标记的二抗(1:1 000)于室温中避光孵育1 h,再用DAPI(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)室温染色10 min后封片,Delta Vision显微镜(GE Healthcare)下成像观察。

1.8 活细胞荧光探针标记与观察

用自噬体染色剂单丹磺酰尸胺(dansylcadaverine, MDC, 0.1 mmol/L)、溶酶体荧光探针(Lyso-Tracker Red, LTR, 50 nmol/L)和DNA染料Hoechst 33342(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 37 °C避光孵育四膜虫细胞(2.5×10^5 细胞/mL) 5 min,之后 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mmol/L)处理10 min,激光共聚焦显微镜(Olympus FV1000)观察。

1.9 统计学方法

采用Excel软件进行数据统计,分析采用 t 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATG4.1的鉴定和序列分析

基于酵母Atg4和人类Atg4B氨基酸序列,在

表1 PCR扩增使用的引物序列

Table 1 Primers used to amplify target sequences

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer (5'→3')
OE-ATG4.1-F:	<u>GGA TCC</u> ATG TCT TAG TCT AAA GAA ATT GAT TAT TT
OE-ATG4.1-R:	GGC GCG <u>CCT</u> CAA ATA CAA TTC TGA TTT TAT AAT AAG TT
MTT1-F:	GCT ACG TGA TTC ACG ATT TAT GCA ATG
MTT1-R:	CGA AAC TGA TTT TAT GCA ATT ATG AAT TAC
RT-ATG4.1-F:	TCT GAA GAT GGA AGA CGT GTT TCT ACT
RT-ATG4.1-R:	GAT GGG ATA TCA ACC TTA AGA TCT ATT G
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; AscI: GGC GCG CC。

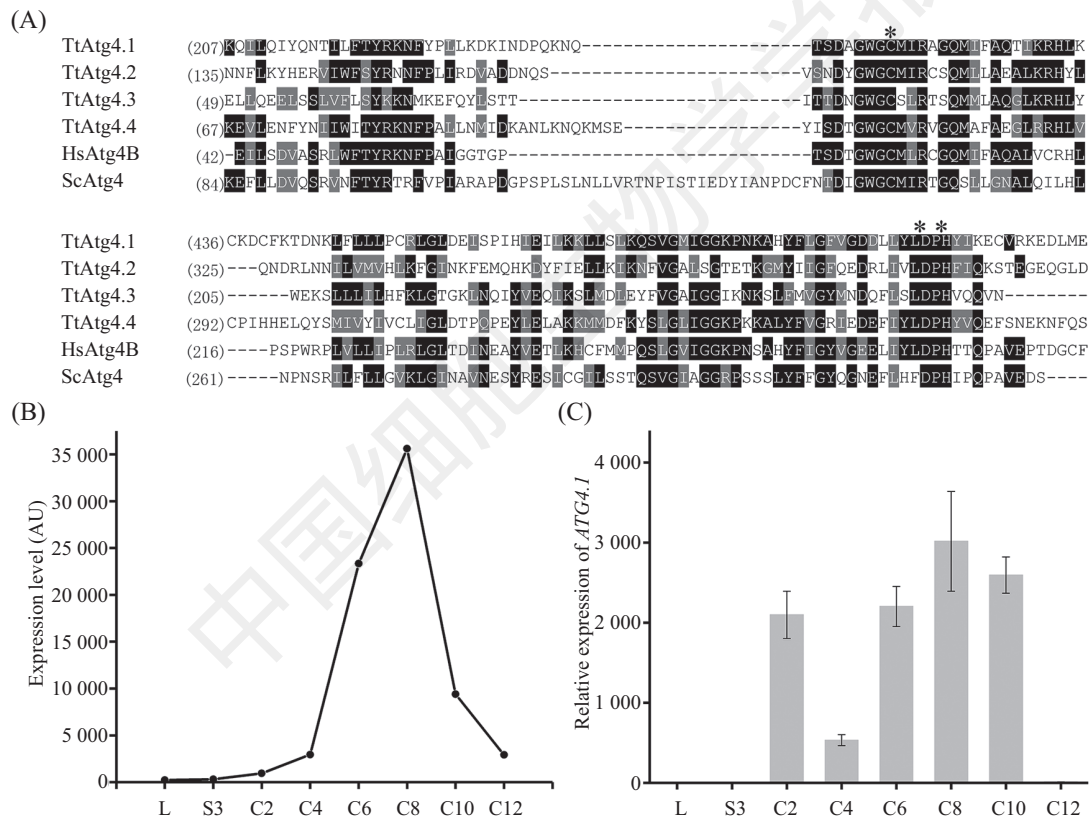
Bases with underlines indicate restriction endonuclease sites. BamH I: GGA TCC; Asc I: GGC GCG CC.

四膜虫基因组数据库(<http://www.ciliate.org>)中进行同源序列比对,发现4个C54肽酶家族蛋白,分别是TTHERM_00526270(TtATG4.1)、TTHERM_00622880(TtATG4.2)、TTHERM_00622890(TtATG4.3)和TTHERM_00011020(TtATG4.4)。4种Atg4自噬蛋白均含有半胱氨酸蛋白酶保守的催化活性位点Cys, Asp和His(图1A)。基于微阵列表达谱, TtATG4.1在有性生殖时期特异表达,并且在8 h表达量最高(图1B和图1C),这与亲本大核发生程序化降解的时间相吻合,暗示了Atg4.1可能参与调控PND过程。

2.2 Atg4.1在四膜虫有性生殖时期定位于细胞质和程序化降解的亲本大核上

在嗜热四膜虫有性生殖中, ATG4.1在接合10 h

前均有表达, 8 h表达量最高。为了研究Atg4.1的功能, 首先对Atg4.1的定位模式进行分析。带有HA标签的表达载体pXS75-ATG4.1(图2A和图2B)转化入嗜热四膜虫, 经巴龙霉素浓度梯度筛选, 获得突变细胞株。生长期加Cd²⁺诱导, 经qRT-PCR分析, HA-Atg4.1细胞突变株在有性生殖8 h过量表达(图2C)。免疫荧光定位显示, 新大核形成时期, 随着亲本大核移动到细胞后端, Atg4.1不仅定位于细胞质中, 同时在亲本大核周边出现定位信号, 有性生殖10 h时Atg4.1定位在整个核膜上, 配对细胞分开后仍定位在亲本大核上, 随着亲本大核的降解消失, Atg4.1定位信号消失(图3)。结果表明Atg4.1可能直接参与调控亲本大核PND过程。

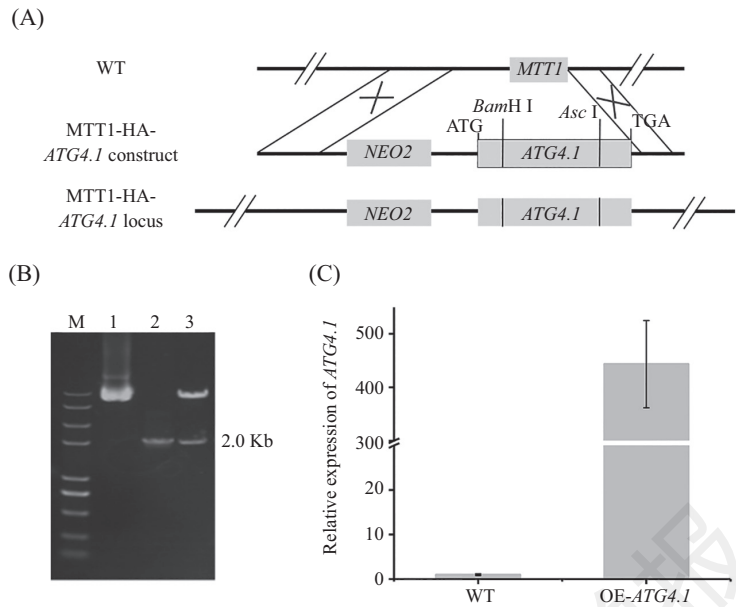


A: 不同物种Atg4氨基酸序列比对, TtAtg4.1(*T. thermophila*, TTHERM_00526270), TtAtg4.2(*T. thermophila*, TTHERM_00622880), TtAtg4.3(*T. thermophila*, TTHERM_00622890), TtAtg4.4(*T. thermophila*, TTHERM_00011020), HsAtg4B(*Homo sapiens*, NP_037457.3), ScAtg4 (*Saccharomyces cerevisiae*, CAA93375.1); 星号: Atg4催化活性位点; B: 四膜虫功能基因组数据库(<http://tfgd.ihb.ac.cn>)中基因ATG4.1表达图谱, L: 生长期细胞; S3: 饥饿3 h细胞; C2、C4、C6、C8、C10和C12: 接合2、4、6、8、10和12 h四膜虫细胞; C: 实时荧光定量分析ATG4.1不同时期表达水平。L: 生长期细胞; S3: 饥饿3 h细胞; C2、C4、C6、C8、C10和C12分别为接合2、4、6、8、10和12 h的细胞。

A: alignment of amino acid sequences of various Atg4 using Clustal W. TtAtg4.1 (*T. thermophila*, TTHERM_00526270), TtAtg4.2 (*T. thermophila*, TTHERM_00622880), TtAtg4.3 (*T. thermophila*, TTHERM_00622890), TtAtg4.4 (*T. thermophila*, TTHERM_00011020), HsAtg4B (*Homo sapiens*, NP_037457.3), ScAtg4 (*Saccharomyces cerevisiae*, CAA93375.1). Asterisks indicated the Atg4 catalytic active sites. B: expression pattern of the ATG4.1 gene from Tetrahymena Functional Genomics Database (<http://tfgd.ihb.ac.cn>). L: growing cells; S: starvation cells; C2, C4, C6, C8, C10 and C12 indicated conjugation 2, 4, 6, 8, 10 and 12 h. C: qRT-PCR analysis of ATG4.1 expression profile. L: growing cells; S3: starvation 3 h cells; C2, C4, C6, C8, C10 and C12 indicated conjugation 2, 4, 6, 8, 10 and 12 h cells.

图1 嗜热四膜虫中TtATG4.1的鉴定

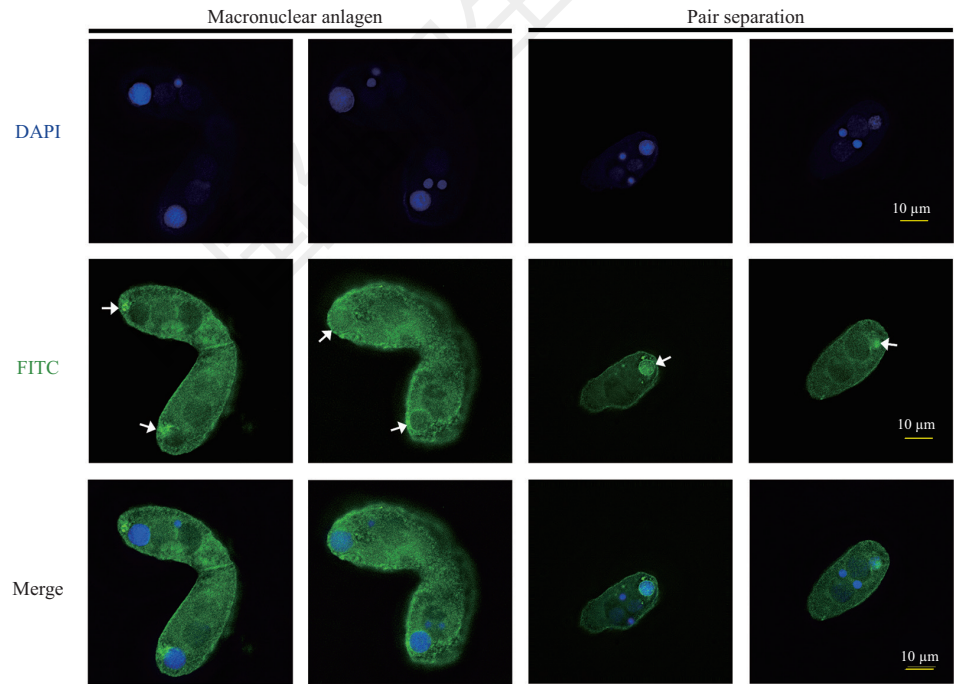
Fig.1 Characterization of TtATG4.1 in *T. thermophila*



A: *ATG4.1* 基因与 *MTT1* 基因同源重组示意图; B: 载体 pXS75-*ATG4.1* 的构建及鉴定; 1: pXS75-*ATG4.1* 质粒; 2: *ATG4.1* 的 PCR 产物; 3: pXS75-*ATG4.1* 质粒 *Bam*H I 和 *Asc* I 双酶切; M: Trans 2K plus DNA Maker (Trans)。C: 实时荧光定量分析过表达 *ATG4.1* 突变细胞株和野生型细胞株接合 8 h 基因 *ATG4.1* 表达水平。
A: diagram of the *ATG4.1* construct at the *MTT1* locus. B: construction and identification of pXS75-*ATG4.1*. 1: pXS75-*ATG4.1* plasmid; 2: PCR product of fusion gene sequence of *ATG4.1*; 3: pXS75-*ATG4.1* was double digested with *Bam*H I and *Asc* I; M: Trans 2K plus DNA Maker (Trans). C: expression level of *ATG4.1* Expression level was analyzed by qRT-PCR. Total RNA was isolated from conjugating cells after mixing for 8 h.

图2 OE-*ATG4.1* 过表达四膜虫细胞株的构建及鉴定

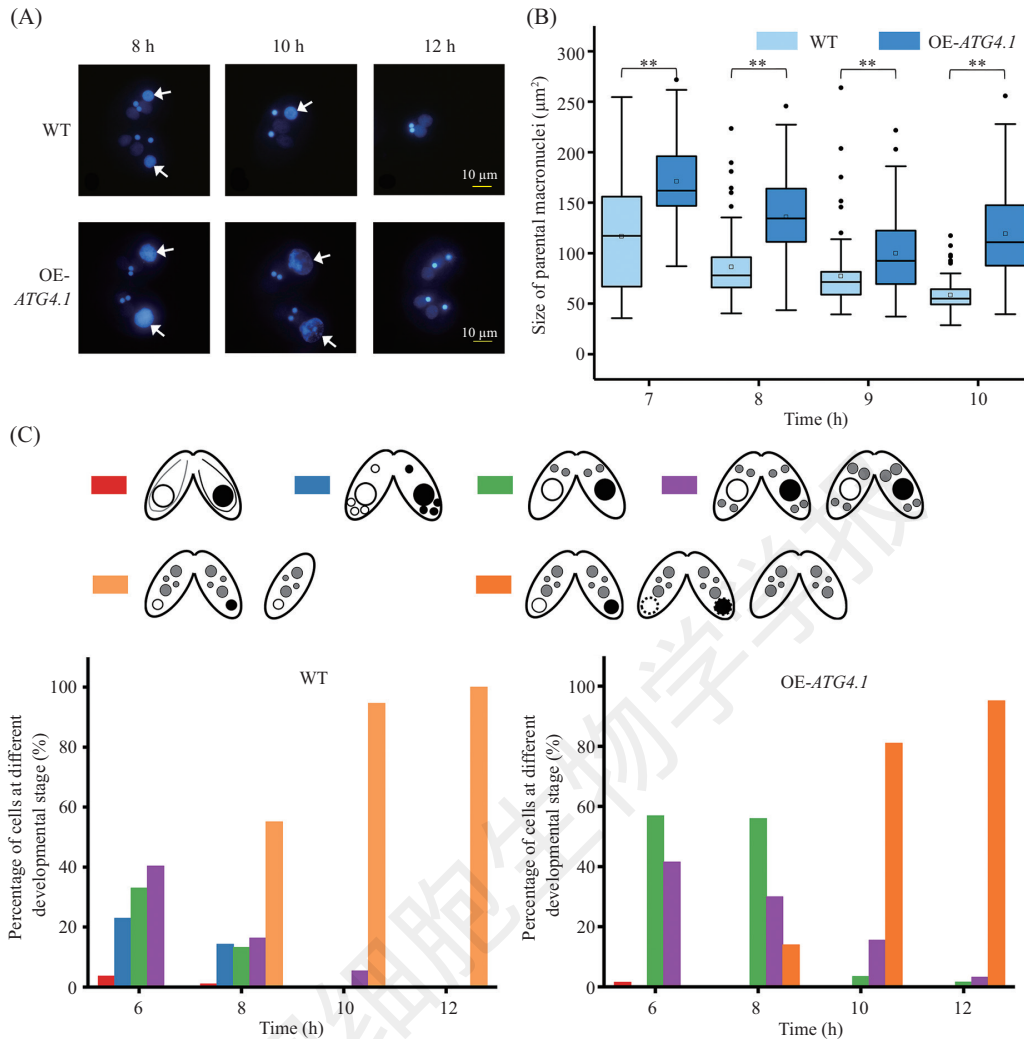
Fig.2 Construction and identification of *Tetrahymena* strains overexpressing *ATG4.1*



接合 8 h (Macronuclear anlagen) 和 10 h (Pair separation) 四膜虫细胞用于间接免疫荧光定位, 一抗使用 HA 抗体, 二抗使用 FITC 标记的二抗, 并使用 DAPI 标记细胞 DNA, Delta Vision 显微镜下成像观察, 箭头指示 Atg4.1 蛋白荧光信号位置。标尺 = 10 μm。
Cells collected at 8 h (Macronuclear anlagen) and 10 h (Pair separation) after mixing cells were fixed and processed for immunofluorescence staining, with anti-HA primary and FITC-conjugated secondary antibodies. Cells were also stained with DAPI to visualize DNA. Fluorescent images were taken with DeltaVision deconvolution microscope. Arrow indicates the fluorescence signal location of Atg4.1 protein. Scale bars = 10 μm.

图3 HA-Atg4.1 在四膜虫有性生殖大核 anlagen 时期的定位

Fig.3 Localization of HA-Atg4.1 during the stage of macronuclear anlagen of sexual reproduction



A: 收集接合8 h、10 h和12 h的细胞用于DAPI染色, 箭头指示亲本大核; B: 野生型细胞株和过表达 $ATG4.1$ 细胞株接合7、8、9和10 h中亲本大核面积, 箱线图图示: 箱体上边缘线为上四分位数; 箱体下边缘线为下四分位数; 箱体内部线为中位数; 箱体外上边缘线为最大值; 箱体外下边缘线为最小值; 圆圈表示异常值; 每个时间点统计配对细胞数 $n=100$; $**P<0.01$; C: 野生型细胞株和过表达 $ATG4.1$ 细胞株有性生殖细胞种类统计, Y轴表示不同时期细胞所占百分比, 每个时间点统计细胞数 $n>200$ 。标尺=10 μm 。

A: cells were collected at 8, 10 and 12 h, and stained by DAPI, arrowheads indicated parental macronuclei; B: comparison of parental macronuclear size of mating WT and mating OE- $ATG4.1$ cells at 7, 8, 9 and 10 h. Box plot explanation: upper horizontal line of box, 75th percentile; lower horizontal line of box, 25th percentile; horizontal bar within box, median; upper horizontal bar outside box, 90th percentile; lower horizontal bar outside box, 10th percentile. Circles represent outliers. $n=100$ (cell number of pair cells). $**P<0.01$. C: developmental profile of mating WT and mating OE- $ATG4.1$ cells. The Y-axis indicates percentage of different cell development stage, $n>200$ (cell number of each sample). Scale bars=10 μm .

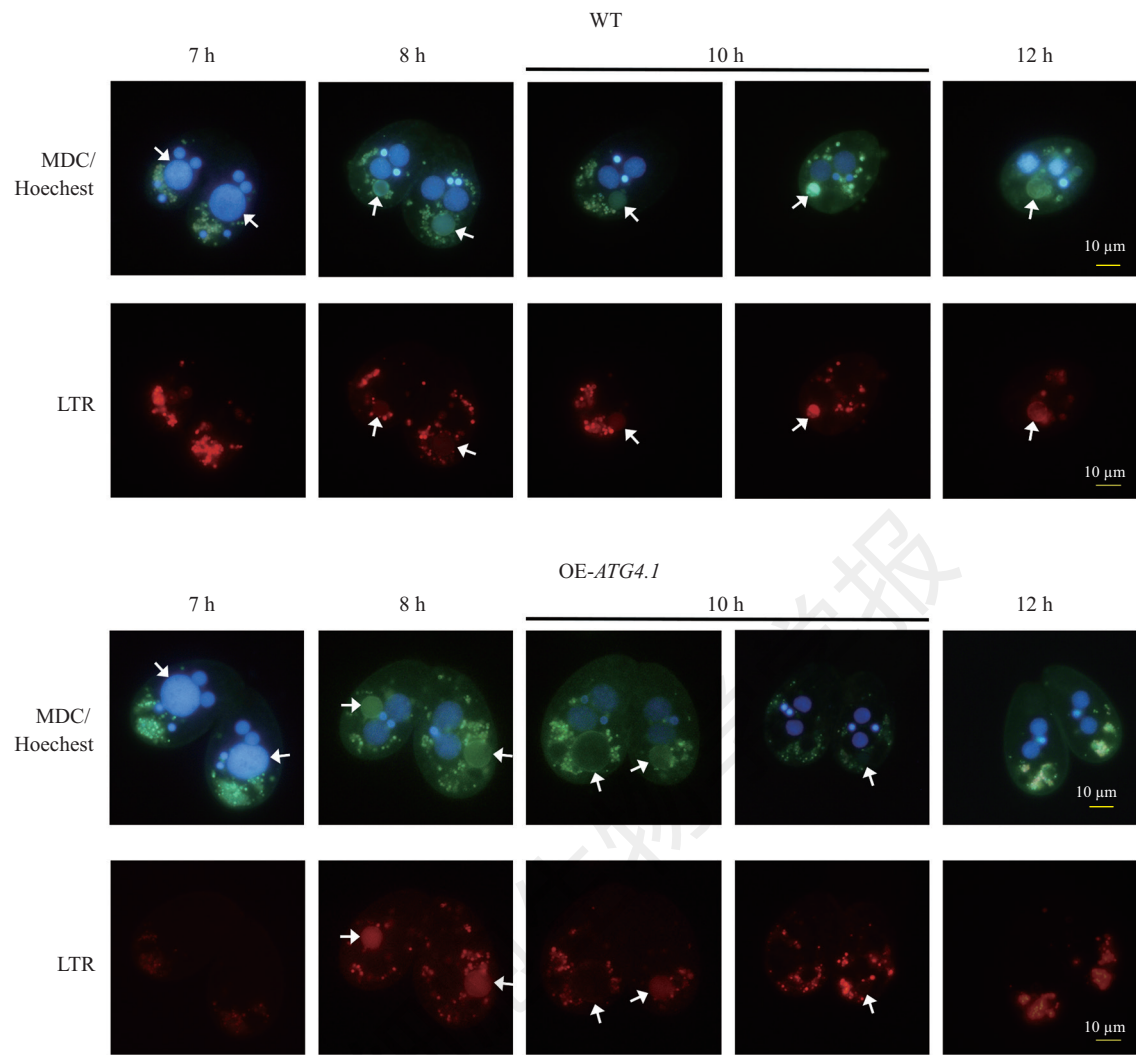
图4 过表达 $ATG4.1$ 影响四膜虫的有性生殖过程

Fig.4 Overexpression of $ATG4.1$ affects sexual reproduction progress

2.3 过表达Atg4.1阻碍亲本大核凝缩降解

为了分析过表达Atg4.1对四膜虫细胞有性生殖过程的影响, 野生型细胞和过表达细胞株分别交配。野生型细胞接合2 h配对率为79.5%, 过表达细胞株配对率为79.4%。接合6 h之前, 相较于野生型细胞株, 过表达突变株核发育正常。野生型细胞有性生殖8 h, 55.1%的细胞进入大核原基(anlagen)发育时期; 过

表达株HA-Atg4.1细胞株14%进入该阶段。发育至10 h, 94.5%的野生型配对细胞进入anlagen时期, 而81%的过表达配对细胞进入anlagen时期(图4C)。结果表明, 过量表达Atg4.1延迟了有性生殖细胞的发育。发育至10 h, 在野生型细胞中, 合子核经过2次有丝分裂后, 形成4个核, 其中2个开始向新大核分化, 亲本大核开始向细胞后端移动, 并且发生凝缩。有趣



接合7、8、10和12 h野生型细胞株和过表达细胞株用于荧光染色, WT和OE-*ATG4.1*上方图片为MDC和Hoechst 33342荧光标记四膜虫, 下方为LTR荧光标记四膜虫, 箭头指示亲本大核。标尺=10 μm。
Conjugating cells at 7, 8, 10 and 12 h were stained with a combination of MDC (upper) and LTR (lower) in WT and OE-*ATG4.1* strains. Hoechst was also used to visualize nuclei. Arrows indicated parental macronuclei. Scale bars=10 μm.

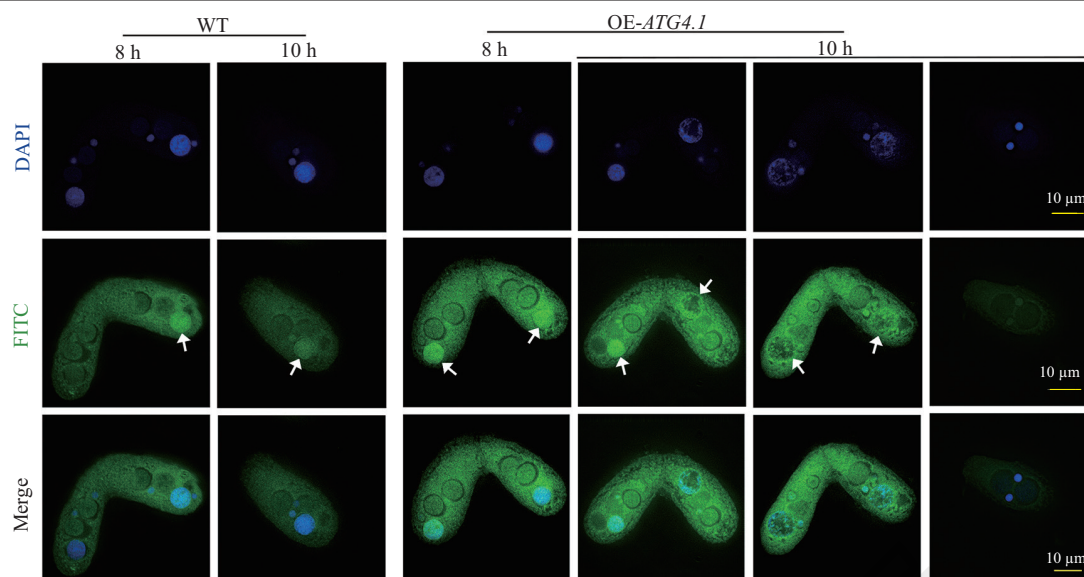
图5 过表达ATG4.1对PND过程中自噬体和溶酶体的影响
Fig.5 Effects of overexpression of *ATG4.1* on autophagic and lysosomal events during PND

的是, 在过表达细胞株中, 虽然也能发生凝缩, 但凝缩幅度很小。发育至10 h, 野生型配对细胞分开, 亲本大核依然存在, 而过表达细胞株亲本大核显著膨大, 松散(图4A)。因此, 我们对有性生殖7~10 h亲本大核的体积进行了比较。以亲本大核投射在二维平面的面积(单位: μm²)作为指标, 利用DAPI染色, 分别对不同时间点100个细胞进行统计分析。野生型细胞中, 有性生殖7 h亲本大核的中位数值为117.2, 随着细胞发育进行, 细胞核凝缩, 在10 h中位值降低到55.1。而过表达细胞株中, 7 h亲本大核的中位数值为161.9, 之后细胞核小幅度凝缩, 9 h的中位值降为92.44, 但在接合10 h数值升高到110.8。在有性生殖

7~10 h, 过表达细胞亲本大核体积均显著大于野生型细胞($P<0.01$)。结果表明, 过量的Atg4.1影响了亲本大核正常降解模式, 并且Atg4.1可能参与调控亲本大核的凝缩(图4B)。此外, 发育至12 h, 66.1%的野生型配对细胞分开, 但亲本大核未完全降解。相比之下, 过表达细胞株只有6.4%的配对细胞分开, 但是在33.6%的配对细胞中, 亲本大核已经完全降解(图4C)。这表明, 过量表达Atg4.1在有性生殖10 h后能够加快亲本大核的降解, Atg4.1参与调控亲本大核的正常降解。

2.4 过表达Atg4.1不影响亲本大核的酸化

过表达Atg4.1改变了亲本大核的降解模式, 为



接合8 h和10 h四膜虫细胞用于间接免疫荧光定位,一抗使用GABARAPL1(Atg8)抗体,二抗使用FITC标记的二抗,并使用DAPI标记细胞DNA,Delta Vision显微镜下成像观察,箭头指示Atg8定位。标尺=10 μm。

Cells collected at 8 and 10 hours after mixing cells were fixed and processed for immunofluorescence staining with anti-GABARAPL1 primary and FITC-conjugated secondary antibodies. Cells were also stained with DAPI (1 μg/mL) to visualize DNA. Fluorescent images were taken with a Delta Vision deconvolution microscope. Arrows indicated location of Atg8-positive nucleus. Scale bars=10 μm.

图6 Atg8在野生型细胞和过表达TtATG4.1细胞中的定位

Fig.6 Localization of Atg8 in wild type and overexpression of TtATG4.1 strains

了分析过表达Atg4.1是否会对亲本大核的酸化产生影响,利用自噬体染色剂单丹磺酰尸胺,溶酶体荧光探针以及DNA染料Hoechst 33342对有性生殖时期的四膜虫进行活体染色。结果显示,野生型细胞anlagen时期的亲本大核核膜首先被MDC与LTR标记,表明自噬溶酶体开始与核膜相融合。然后,亲本大核内部呈现MDC绿色或LTR红色荧光,表明整个亲本大核逐渐被酸化,而新大核与小核依然呈现蓝色荧光,表明未被酸化。最后,配对细胞分开后,亲本大核上MDC和LTR荧光信号减弱,直至全部消失,只留下核膜轮廓,核内溶物被酸化降解。ATG4.1过表达细胞株亲本大核同样能够被MDC和LTR荧光探针标记。结果表明,过表达Atg4.1并不影响自噬溶酶体与亲本大核核膜的互融及正常酸化,但是亲本大核显著膨大(图5)。

2.5 过表达Atg4.1不影响Atg8在亲本大核上的定位

Atg8作为核心自噬蛋白,会在自噬发生过程中不断的募集到自噬体上,是自噬体膜延伸与待降解货物识别的关键因子^[25]。Atg8功能正常发挥依赖于Atg4。Atg4对Atg8具有两方面作用,在Atg4作用下加工新生Atg8为成熟的Atg8-I在自噬中发挥功能,也可将Atg8-II从自噬体上解离下来继续参与自噬过程^[26-28]。那么四膜虫中Atg4.1过表达是否会影响

Atg8在亲本大核PND中的功能。通过间接免疫荧光定位分析,野生型细胞PND过程中Atg8定位于细胞质和亲本大核上。过表达ATG4.1细胞株在PND前期,Atg8的定位模式与野生型细胞株相同,PND后期亲本大核发生膨大,松散,亲本大核细胞膜仍有Atg8的定位(图6)。

3 讨论

真核生物中细胞核的一部分甚至整个细胞核能够通过选择性自噬降解^[18]。在酵母的细胞核碎片化小自噬(piecemeal microautophagy of the nucleus, PMN)中,除核心自噬蛋白发挥重要的调控作用外,与选择性自噬调控相关的Atg11和Atg17也是必需的^[29]。在水稻稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)中,自噬蛋白MoAtg1、MoAtg4和MoAtg8参与调控了细胞核自噬^[30-31]。米曲霉(*Aspergillus oryzae*)中自噬蛋白AoAtg8和AoAtg15参与调控了细胞核自噬^[32]。尽管自噬蛋白在调控细胞核选择性自噬过程中发挥关键作用,但不同生物中细胞核选择性自噬调控机制并不相同。

嗜热四膜虫有性生殖中,自噬蛋白Atg4.1在亲本大核PND之前定位于细胞质中,而在亲本大核PND过程中,随着新大核的发育,亲本大核移动至

细胞后端, Atg4.1开始在亲本大核表面出现特异定位, 直至亲本大核完全降解, 表明Atg4.1参与调控PND过程。先前的研究表明, 嗜热四膜虫Atg8-2在anlagen初期开始定位于亲本大核, 此时亲本大核仍位于细胞的前端, 未出现酸化, 也没有溶酶体的聚集^[22]。而Atg4.1在亲本大核移至细胞底端时才出现定位, 在亲本大核上出现定位的时间点晚于Atg8-2。在酵母的大自噬中, Atg4可以攻击与自噬体外膜相接的Atg8-II, 阻断Atg8-II与PE酰胺结合, 并将其从膜上解离下来, 促使Atg8与自噬体膜的结合变成可逆过程, 游离的Atg8-I可以循环并再次参加结合反应^[28,33]。在PND过程中, Atg8-II定位于亲本大核表面, 介导自噬溶酶体与亲本大核的互溶^[22], 当Atg8-II完成使命后, 由Atg4.1将其从亲本大核表面解离下来, 重新转化为Atg8-I的形式继续发挥功能。

在四膜虫有性生殖anlagen时期, 野生细胞亲本大核体积凝缩开始整体酸化降解; 而在ATG4.1过表达细胞株中, 亲本大核并没有正常凝缩, 反而在anlagen后期体积显著增大, 但其依然可以被酸化降解, 相较野生型细胞, 突变细胞中膨大后的亲本大核降解速度更快。这表明Atg4.1直接参与调控PND过程。此外, 过表达的Atg4可能会产生更多成熟的Atg8-I, 也可能对Atg8-II的解离活性增强。过表达Atg4.1不但没有影响Atg8定位于亲本大核上, 反而Atg8在亲本大核上定位似乎还有所增多(图6)。我们推测, 亲本大核体积膨大和降解速度加快的原因可能是过表达Atg4.1导致Atg8在细胞核膜上过度定位引起。敲除Atg8, 自噬溶酶体无法靠近亲本大核, 亲本大核也无法被正常酸化, Atg8.2在自噬溶酶体与亲本大核间的互溶发挥关键作用^[22]。过表达Atg4.1可能会加工新生Atg8产生更多成熟的Atg8-I, 导致更多的Atg8-II定位于亲本大核上, 异常Atg8的定位可能在一定程度上造成核膜松散, 此外Atg8-II可以招募更多的自噬溶酶体与亲本大核互融, 进而使细胞核体积增大, 同时加快亲本大核的酸化降解。四膜虫有性生殖中亲本大核的自噬以及自噬与细胞核分化的作用机制的深入研究进一步拓展了我们对细胞核选择性自噬的理解。

参考文献 (References)

- 1 Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* 2014;

- 20(3): 460-473.
- 2 高原, 王莹, 黄智慧. 自噬在癌症的预防、发展和治疗中的作用. *中国细胞生物学学报* (Gao Yuan, Wang Ying, Huang Zhihui. Role of autophagy in cancer prevention, development and therapy. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2015; 37(11): 1581-92.
- 3 Guo F, Liu X, Cai H, Le W. Autophagy in neurodegenerative diseases: pathogenesis and therapy. *Brain Pathol* 2018; 28(1): 3-13.
- 4 陈燕锋, 曾群力. 自噬与代谢及代谢性疾病. *中国细胞生物学学报* (Chen Yanfeng, Zeng Qunli. Autophagy, metabolism and metabolic diseases. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2015; 37(02): 249-55.
- 5 Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 2010; 12(9): 814-22.
- 6 Stromhaug PE, Klionsky DJ. Approaching the molecular mechanism of autophagy. *Traffic* 2001; 2(8): 524-31.
- 7 Gatica D, Lahiri V, Klionsky DJ. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat Cell Biol* 2018; 20(3): 233-42.
- 8 Kopitz J, Kisen GO, Gordon PB, Bohley P, Seglen PO. Nonselective autophagy of cytosolic enzymes by isolated rat hepatocytes. *J Cell Biol* 1990; 111(3): 941-53.
- 9 Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, *et al.* The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004; 432(7020): 1032-6.
- 10 Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12(1): 9-14.
- 11 Scott SV, Klionsky DJ. Delivery of proteins and organelles to the vacuole from the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10(4): 523-9.
- 12 Cebollero E, Reggiori F, Kraft C. Reticulophagy and ribophagy: regulated degradation of protein production factories. *Int J Cell Biol* 2012; 2012: 182834.
- 13 Kraft C, Deplazes A, Sohrmann M, Peter M. Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat Cell Biol* 2008; 10(5): 602-10.
- 14 Weidberg H, Shvets E, Elazar Z. Lipophagy: Selective catabolism designed for lipids. *Developmental Cell* 2009; 16(5): 628-30.
- 15 Klionsky DJ, Cuervo AM, Dunn WA Jr, Levine B, van der Klei I, Seglen PO. How shall I eat thee? Autophagy 2007; 3(5): 413-6.
- 16 Levine B. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 2005; 120(2): 159-62.
- 17 Roberts P, Moshitch-Moshkovitz S, Kvam E, O'Toole E, Winey M, Goldfarb DS. Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2003; 14(1): 129-41.
- 18 Luo M, Zhao X, Song Y, Cheng H, Zhou R. Nuclear autophagy: An evolutionarily conserved mechanism of nuclear degradation in the cytoplasm. *Autophagy* 2016; 12(11): 1973-83.
- 19 Orias E, Cervantes MD, Hamilton EP. *Tetrahymena thermophila*, a unicellular eukaryote with separate germline and somatic genomes. *Res Microbiol* 2011; 162(6): 578-86.
- 20 Akematsu T, Pearlman RE, Endoh H. Gigantic macroautophagy in programmed nuclear death of *Tetrahymena thermophila*. *Autophagy* 2010; 6(7): 901-11.
- 21 Lu E, Wolfe J. Lysosomal enzymes in the macronucleus of *Tetrahymena* during its apoptosis-like degradation. *Cell Death Differ* 2001; 8(3): 289-97.
- 22 Liu ML, Yao MC. Role of ATG8 and autophagy in programmed

- nuclear degradation in *Tetrahymena thermophila*. Eukaryot Cell 2012; 11(4): 494-506.
- 23 Akematsu T, Fukuda Y, Attiq R, Pearlman RE. Role of class III phosphatidylinositol 3-kinase during programmed nuclear death of *Tetrahymena thermophila*. Autophagy 2014; 10(2): 209-25.
- 24 Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 1997; 25(24): 4876-82.
- 25 Abdollahzadeh I, Schwarten M, Gensch T, Willbold D, Weiergraber OH. The Atg8 family of proteins-modulating shape and functionality of autophagic membranes. Front Genet 2017; 8: 109.
- 26 Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, *et al.* The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. J Cell Biol 2000; 151(2): 263-76.
- 27 Hirata E, Ohya Y, Suzuki K. Atg4 plays an important role in efficient expansion of autophagic isolation membranes by cleaving lipidated Atg8 in *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS One 2017; 12(7): e0181047.
- 28 Yu ZQ, Ni T, Hong B, Wang H Y, Jiang FJ, Zou S, *et al.* Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy. Autophagy 2012; 8(6): 883-92.
- 29 Krick R, Muehe Y, Prick T, Bremer S, Schlotterhose P, Eskelinen E L, *et al.* Piecemeal microautophagy of the nucleus requires the core macroautophagy genes. Mol Biol Cell 2008; 19(10): 4492-505.
- 30 Kershaw MJ, Talbot NJ. Genome-wide functional analysis reveals that infection-associated fungal autophagy is necessary for rice blast disease. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106(37): 15967-72.
- 31 He M, Kershaw M J, Soanes D M, Xia Y, Talbot N J. Infection-associated nuclear degeneration in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* requires non-selective macro-autophagy. PLoS One 2012; 7(3): e33270.
- 32 Shoji J Y, Kikuma T, Arioka M, Kitamoto K. Macroautophagy-mediated degradation of whole nuclei in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. PLoS One 2010; 5(12): e15650.
- 33 Nakatogawa H, Ishii J, Asai E, Ohsumi Y. Atg4 recycles inappropriately lipidated Atg8 to promote autophagosome biogenesis. Autophagy 2012; 8(2): 177-86.