

# 共生菌 *Wolbachia* 在宿主中诱导表达胞质不相容因子的研究进展

李文领, 肖云杰, 杨海涛, 王泽方\*

天津大学生命科学学院, 天津 300072

李文领, 肖云杰, 杨海涛, 王泽方. 共生菌 *Wolbachia* 在宿主中诱导表达胞质不相容因子的研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 324-339.

LI Wenling, XIAO Yunjie, YANG Haitao, WANG Zefang. *Wolbachia* in inducing expression of cytoplasmic incompatibility factors: a review[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 324-339.

**摘要:** 沃尔巴克氏体(*Wolbachia*)作为节肢动物的胞内共生菌, 可以引起宿主产生雌性化、孤雌生殖、杀雄和胞质不相容性(cytoplasmic incompatibility, CI) 4种生殖表型。其中 CI是最常见的现象, 表现为受感染的雄性昆虫与未感染或感染不兼容 *Wolbachia* 的雌性昆虫交配时引起胚胎死亡; 而雌性感染同种 *Wolbachia* 时胚胎能够正常发育。CI是由被称为 CI因子(*cifA*和*cifB*)的 *Wolbachia* 基因对调控的。其中, *CifB* 作为毒剂在雄性中表达诱导产生 CI, 而 *CifA* 作为解毒剂在雌性中表达拯救 CI。本文综述了 CI因子结构、功能和作用机制的研究, 以期为未来利用 *Wolbachia* 和 CI进行蚊媒疾病和农业虫害的防控奠定基础。

**关键词:** 沃尔巴克氏体; 胞质不相容性; 胞质不相容性(CI)因子; 作用机制

## *Wolbachia* in inducing expression of cytoplasmic incompatibility factors: a review

LI Wenling, XIAO Yunjie, YANG Haitao, WANG Zefang\*

School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China

**Abstract:** *Wolbachia* is a common group of intracellular bacteria in arthropods. They can alter host biology in diverse ways, including the induction of reproductive manipulations, such as feminization, thelytoky, male killing, and cytoplasmic incompatibility (CI). Among them, CI, the most common phenotype, refers to the fact that embryonic lethality occurs when a

资助项目: 国家自然科学基金(31970048, 82170680)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31970048, 82170680).

\*Corresponding author. E-mail: zefangwang@tju.edu.cn

Received: 2022-06-06; Accepted: 2022-07-06; Published online: 2022-07-21

*Wolbachia*-infected male insect mates with a *Wolbachia*-uninfected or incompatible female insect, whereas the cross between the male and female both infected with the same strain of *Wolbachia* is compatible. CI is caused by linked pairs of *Wolbachia* genes known as CI factors (CifA and CifB). CifB as a toxin can induce CI in male insects, while CifA as an antidote can rescue CI in female insects. This review summarized the research on the structure, function, and mechanism of CI factors, aiming to provide a solid base for the future application of *Wolbachia* and CI in the prevention and control of mosquito-borne diseases and agricultural pests.

**Keywords:** *Wolbachia*; cytoplasmic incompatibility (CI); CI factor; mechanism

沃尔巴克氏体(*Wolbachia*)是寄生于节肢动物体内的革兰氏阴性、立克次氏体样胞内共生体<sup>[1]</sup>,属于变形菌纲(*Proteobacteria*)的 $\alpha$ 亚纲<sup>[2]</sup>立克次氏体目(*Rickettsiales*)立克次氏体科(*Rickettsiaceae*)<sup>[3]</sup>。1936年 Marshall Hertig 在他的著作中向他的导师 Simeon B. Wolbach 致敬,将沃尔巴克氏体命名为 *Wolbachia*<sup>[4]</sup>。最近的研究发现,超过 65%的昆虫物种含有 *Wolbachia*,是截至目前发现的分布最广的细胞内生菌之一<sup>[5]</sup>,至少感染了 106 种昆虫,其中包括节肢动物的蜱螨亚纲、鞘翅目、双翅目、半翅目、膜翅目、等足目、鳞翅目和直翅目及丝状线虫<sup>[3]</sup>。

后续研究发现 *Wolbachia* 在宿主中具有两种传播方式,分别是垂直传播和水平传播<sup>[6-8]</sup>。垂直传播是指 *Wolbachia* 通过卵细胞质垂直从母本遗传给后代,而雄性不会传播 *Wolbachia*,因此又被称为母系遗传<sup>[9-10]</sup>。水平传播指在个体间进行传播,如通过捕食或同类相食将其传染给其他未感染的宿主<sup>[11-12]</sup>。*Wolbachia* 分布于昆虫的生殖组织及头、肌肉、中肠、唾液腺、马氏管、血淋巴和脂肪体等非生殖组织,影响宿主的生殖、睡眠、学习和记忆、交配、进食、运动和攻击等行为<sup>[5-6]</sup>。另外, *Wolbachia* 在宿主中会引起 4 种不同的生殖表型,分别是雌性化、孤雌生殖、杀雄<sup>[13]</sup>和胞质不相容性(cytoplasmic incompatibility, CI)<sup>[14-17]</sup>,其中最常见的是胞质不相容性。CI 是由于在有丝分裂前中期雄原核的

核膜破裂被延迟,导致雌雄原核发育不同步<sup>[18]</sup>。其中,CI 可分为单向 CI 和双向 CI 两种形式,在单向 CI 中,只有感染 *Wolbachia* 的雄性和未感染的雌性之间精卵结合后的胚胎不能正常发育。在双向 CI 中,感染不兼容 *Wolbachia* 菌株的雌雄交配导致后代胚胎死亡<sup>[19]</sup>(图 1)。

由于目前寨卡、登革热等蚊媒疾病尚无特效药和疫苗,所以控制病媒成为控制疾病的唯一方法,利用诱捕器等物理防治策略存在效率低、成本高等弊端,而且利用杀虫剂等化学防治策略会使蚊虫出现耐药性与抗药性,所以生物与遗传控制能从根源上解决问题<sup>[15]</sup>。野外释放感染 *Wolbachia* 的雄蚊与雌蚊可将蚊虫自然种群进行替换,降低其传播蚊媒病毒的能力,从源头抑制蚊媒病毒对人类的感染,或者采用昆虫不相容技术(incompatible insect technique, IIT),即野外释放感染 *Wolbachia* 的雄蚊通过 CI 减少自然种群中传播病毒的蚊虫数量,达到种群抑制的目的<sup>[16]</sup>。随着研究的深入,发现 CI 是由几对 CI 因子(CI factors, Cifs)控制的<sup>[20-21]</sup>,近年来 Cifs 的分子机制研究取得了突破性的进展<sup>[22]</sup>。

本文综述了调控 CI 发生与拯救的 CI 因子的研究进展,CI 因子的深入研究对实现胞质不相容的可控操纵具有指导作用,通过调控 CI 因子进而操纵胞质不相容的技术可应用于蚊媒疾病的防控和农业病虫害的防治。

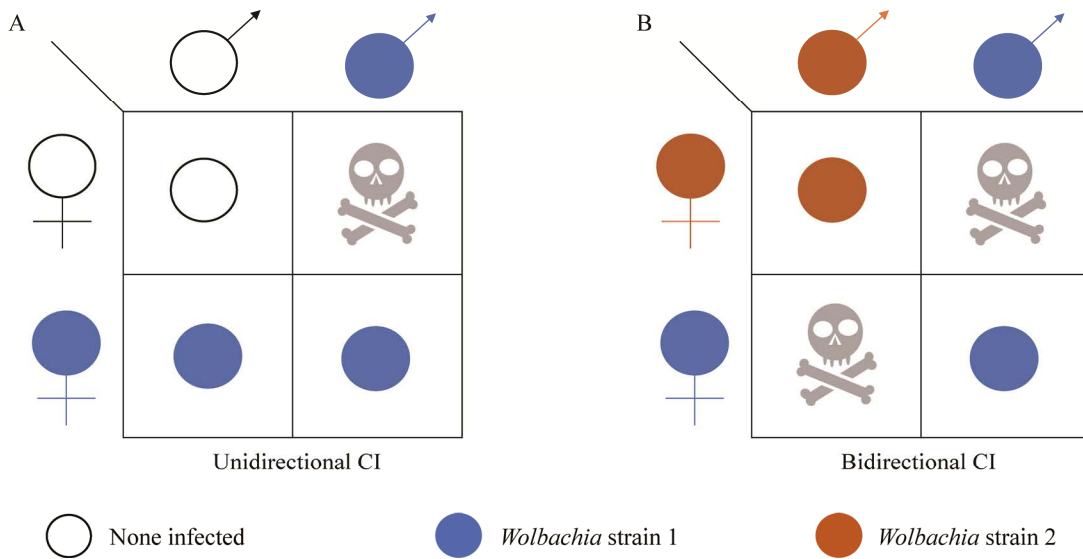


图 1 单向(A)和双向(B)细胞质不相容(CI)的插图<sup>[20]</sup>

Figure 1 Illustration of unidirectional (A) and bidirectional (B) cytoplasmic incompatibility (CI)<sup>[20]</sup>.

## 1 胞质不相容因子的发现及分类

### 1.1 胞质不相容因子的发现与命名

2004年, Jaenike<sup>[23]</sup>和Wu等<sup>[24]</sup>将黑腹果蝇中 *Wolbachia* 基因组进行测序, 发现其基因组中含有大量的可移动遗传元件, 推动了对CI遗传学的研究进展。随后, Yamada等对 *Wolbachia* 进行了比较基因组学的研究, 在 wMel 基因组中发现了12个候选基因, 其中包括9个锚蛋白基因(WD0294、WD0385、WD0498、WD0514、WD0550、WD0633、WD0636、WD0754和WD0776)、2个毒素相关基因(WD0579和WD0580)及1个噬菌体相关甲基酶基因(WD0594), 它们通过构建转基因果蝇评估这些CI候选基因的作用, 结果显示, 这些基因的表达均不能产生或改变CI表型<sup>[25-26]</sup>。Papafotiou等在wAu和wRi菌株中分析了锚蛋白(ankyrin, ANK)同源基因的表达, 发现 *Wolbachia* 锚蛋白基因的转录和遗传变异均与菌株诱导CI的能力无关<sup>[27]</sup>。随后, Duron等在15种淡色库蚊中鉴定

出14种不同的杂交类型, 因此提出CI可能是由至少2个不同的基因单位驱动且它们独立调控着雄性和雌性CI功能的观点, 但是ANK基因并不影响CI外显率<sup>[28]</sup>, CI的分子机制尚不清楚。

2013年, Beckmann等<sup>[29]</sup>利用SDS-PAGE和质谱等蛋白质组学研究技术在感染 *Wolbachia* 的淡色库蚊(*C. pipiens*)生殖腺中发现了分子量约为25 kDa和18 kDa的蛋白, 而在未感染的组织中则未发现。在18 kDa蛋白条带中, 检测到 *Wolbachia* 蛋白HU (gi|190571020)与大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的DNA结合蛋白HU $\beta$ 同源, *Wolbachia*中HU $\beta$ 同源二聚体在雄原核中富集, 可以通过破坏母体组蛋白和真核染色质结构高流动性群体(high mobility group, HMG) Box蛋白的拮抗竞争机制, 导致染色质浓缩不当并在拟果蝇不相容杂交中雌雄原核之间发育不同步, 所以提出HU作为CI的候选效应因子<sup>[29]</sup>。随后, 为了探索 *Wolbachia* 编码的DNA结合蛋白HU $\beta$ 是否在感染 *Wolbachia* 的雄性库

蚊成熟精子中富集, Beckmann 等<sup>[30]</sup>解剖与受感染雄性交配的雌性受精囊, 并对蛋白质提取物进行 SDS-PAGE 和质谱分析, 检测到 wPip\_0282 编码的 56 kDa 的多肽, wPip\_0282 及其共转录的下游基因 wPip\_0283 的同源物在诱导 CI 的 *Wolbachia* 菌株基因组中以多个不同拷贝的形式出现, 进一步表明其可能是一种 CI 候选效应因子。研究发现, wPip\_0283 包含一个真核生物 Ulp1 C48 SUMO 蛋白酶结构域(pfam02902), 该结构域可能是通过从真核宿主水平转移获得的<sup>[31]</sup>。Ulp1 SUMO 蛋白酶功能的改变可以导致 G2/M 阻滞和细胞死亡<sup>[32]</sup>。另外, Ulp1 C48 SUMO 蛋白酶也通常与染色质结构蛋白相关, 如染色体的结构维持(structural maintenance of chromosomes, SMC)蛋白和组蛋白这些蛋白本身也会被类泛素化修饰, 宿主 SMC 蛋白和组蛋白的类泛素化修饰可能有助于 CI 修饰或挽救<sup>[33-35]</sup>。同源基因 wPip\_0295 虽然无 SUMO 蛋白酶结构域, 但编码了 DUF1703 蛋白结构域, DUF1703 结构域可能是 PD-(D/E)XK 家族中的一个核酸酶结构域<sup>[36]</sup>。因此, CI 由拯救(rescue, recs)因子和修饰(modify, mod)因子决定, 每种因子可能包括不同基因, 说明了 CI 的复杂性, 这为后基因组学的深入研究奠定了基础。

直到 2017 年, Beckmann 等不仅确定 wPa\_0282 基因是双基因操纵子的一部分, 还确定 wPa\_0283 是诱导 CI 的去泛素化酶(deubiquitylase, DUB), 并将基因 *cidA* (wPa\_0282)和 *cidB* (wPa\_0283)重新命名<sup>[37]</sup>(图 1)。淡色库蚊的 *Wolbachia* 基因组显示出了遗传重组和 CI 操纵子的分化, 这可能是双向不相容的原因。在 wPip 菌株中还有第 2 个操纵子编码与 *CidA* 和 *CidB* 相关的蛋白, 但下游基因可能编码一个有功能的 PD-(D/E)XK 核酸酶结构域(DUF1703)<sup>[36]</sup>, 将该操纵子中的 2 个基因命名为 *cinA* (wPa\_0294)和 *cinB* (wPa\_0295)<sup>[37]</sup>(图 2)。

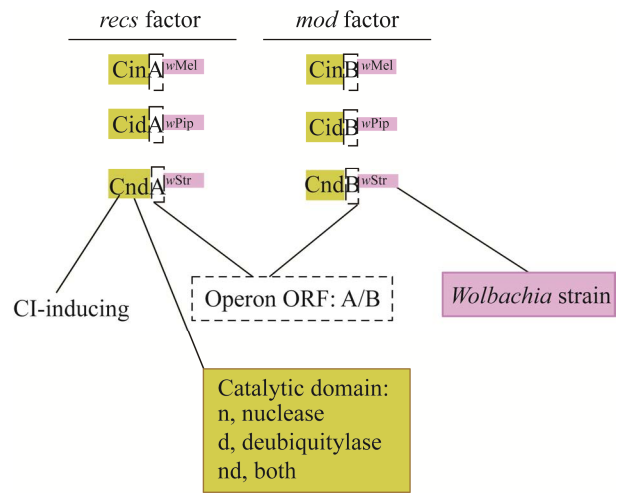


图 2 CI 因子分类及命名方式<sup>[20]</sup>

Figure 2 A classification and nomenclature schematic view of CI factors<sup>[20]</sup>.

通过近 13 年对 CI 遗传学的研究, Beckmann 等<sup>[20]</sup>最终发现 CI 是由成对的 CI 因子进行调控, 目前 CI 因子分为两种, 分别具有 recs 和 mod 功能, 又依据 mod 因子所含结构域的不同分为 Cin、Cid 和 Cnd 这 3 个系统。然而 CI 因子之间的相互作用分子机制仍有待研究, 这对于设计可用于生物控制的人工 CI 系统是至关重要的。

## 1.2 胞质不相容因子的分类

同年, Lepage 等推测编码 CI 的基因存在于所有诱导 CI 的 *Wolbachia* 菌株中, 确定了诱导 CI 的 *Wolbachia* 菌株 wMel、wRi、wPip 和 wRec 共享的核心基因组, 分析发现只有 wPip 菌株中的 2 个基因 WD0631 和 WD0632 在 4 个基因亚群中共享, 进一步分析了这 2 个基因的进化并预测了蛋白结构域, 发现它们的同源基因总是在原噬菌体 WO8 的真核生物关联模块中配对, 并且它们共同分化为 4 个不同的系统发育群, 将其定义为 I-IV 型<sup>[38]</sup>。I 型 WD0632 同源物与 Peptidase\_C48 结构域(Ulp1 蛋白酶的关键特征)具有弱同源性<sup>[30]</sup>; II 型变体中的 WD0632 同源基因被截断, 缺乏识别的蛋白结构域; III 型变

体是具有细胞色素 C552 结构域的 WD0631 同源物,参与硝酸盐的还原;IV 型变体可编码羧基(C)端 PD-(D/E)XK 核酸酶结构域<sup>[38]</sup>。

Cid 系统属于 I 型发育群,Cin 系统属于 IV 型发育群。CI 因子的发现与分类推动了对其功能与作用机制的进一步探究,对 CifA 和 CifB 的研究有助于阐释 *Wolbachia* 与其宿主之间的相互作用,促进病虫害和病媒的生物防控。

## 2 胞质不相容因子的功能

### 2.1 CifA 功能

根据预测,I 型 CifA 蛋白可编码过氧化氢相关(catalase-related, catalase-rel)结构域,与 Puf 家族 RNA 结合域同源的未知结构域(domain of unknown function, DUF3243)及一种类似不育的转录调控因子(sterile-like transcriptional regulator, STE)的结构域。Shropshire 等<sup>[39]</sup>分别对这 3 个区域及 N 端未注释区域的保守氨基酸进行丙氨酸突变,结果表明,CifA 的未标记区域和 catalase-rel 结构域在 CI 修饰与拯救中发挥着重要作用,CifA 的 DUF 中的位点发生突变时,CifA 只丧失了 CI 修饰能力。单独在雄性果蝇中表达 CidB<sup>wMel</sup> 并不能诱导 CI,当一个转基因系统同时表达 CidA 和 CidB 则能诱导强的 CI 作用<sup>[40-41]</sup>。2017 年,Lepage 等将 *cifA* 和 *cifB* 在 wMel 感染的 1 日龄和 7 日龄雄性黑腹果蝇的性梳中表达,结果发现,*cifA* 和 *cifB* 都是诱导 CI 表型所必需的<sup>[38]</sup>。基于这些发现,提出了一个“two-by-one”模型,其中 CidA<sup>wMel</sup> 在雄性中充当 mod 因子(用于 CI 修饰),在雌性中作为 resc 因子(用于 CI 拯救)表达,而 CidB<sup>wMel</sup> 在黑腹果蝇中仅是 mod 因子<sup>[42]</sup>。同年,Beckmann 等利用转基因果蝇和酵母细胞检测出 CidA<sup>wMel</sup> 只具有 CI 拯救功能<sup>[37]</sup>。随后,Chen 等在其综述中也提到突变 CidA<sup>wMel</sup> 各个结构域中的氨基酸位点

后,CidA<sup>wMel</sup> 会不同程度地失去 CI 修饰与拯救作用,这可能是因为突变改变了蛋白质构象或表达水平,所以这一观点尚不确定<sup>[43]</sup>。Lindsey 等指出尽管 *cifA* 和 *cifB* 可以共转录,但在 wMel 中除外,事实上,*cifB* 的表达水平约为 *cifA* 的 1/10,二者表达水平呈显著负相关,理论上,*cifA* 的 Puf 家族 RNA 结合域同源的结构域和 STE 结构域可以起到抑制 *cifB* 表达的作用<sup>[44]</sup>。

在 CI 因子被发现后,Xiao 等<sup>[45]</sup>对 CI 因子结构进行了系统研究,在解析了 CidA<sup>wPip</sup> 晶体结构后,将其与预测的 CifA 结构域进行比较分析发现,catalase-rel 结构域表现出“螺旋-环-螺旋”的结构,但其较短,无法发挥过氧化氢酶的生物学功能;同时,DUF3243 在 CidA 中呈现重复序列(HEAT repeats),STE 结构域在 CidA<sup>wPip</sup> 结构中是无序的,而且 CidA<sup>wPip</sup> 在酵母细胞和果蝇中只表现出 CI 拯救作用,因此推测 A 因子可能并无 CI 修饰功能。另外,Wang 等同时解析了 CidA<sup>wMel</sup> 的晶体结构,发现 CidA<sup>wPip</sup> 与 CidA<sup>wMel</sup> 含有相同的结构域,因此推测 A 因子在不同菌株中发挥类似的功能<sup>[46]</sup>。然而,Lepage 等<sup>[38]</sup>观察到 CidA<sup>wMel</sup> 在果蝇中的表达对 CI 修饰和挽救中均起作用,这与 Beckmann 等在酵母系统中观察到的 CidA<sup>wPip</sup> 只发挥 CI 拯救作用<sup>[37]</sup>不符。为了进一步分析 CifA 在 CI 诱导或拯救中的具体功能,还需进一步研究 CifA 上、下游互作蛋白,从而彻底探究 CifA 的作用机制。

### 2.2 CifB 功能

Shropshire 等通过对保守残基序列的比较分析构建了 4 个 CifB 突变体<sup>[42]</sup>。除了一个保守的丙氨酸突变为甘氨酸,其他 CifB 突变均是分别对 N 端未注释区域、第 1 个 PDDEXK 区域、第 2 个 PDDEXK 区域和 Ulp1 进行丙氨酸取代,通过未感染的雄性中将突变体 CifB 与野生型 CifA 共表达研究诱导 CI 的能力,结果表明,

所有突变位点在 CI 诱导中均起关键作用<sup>[39]</sup>。2017 年, Beckmann 等通过免疫印迹利用两种去泛素化酶 TsUCH37 和 Usp2 作为阳性对照, 证明 CidB 虽含有 2 个失活的核酸酶结构域, 并且缺乏保守的 PD-(D/E)XK 催化残基; 然而 DUB 结构域具有去泛素化酶活性, DUB 通过在体外切割含 K6、K11、K27、K29、K33、K48 和 K63 残基的多肽链可诱导 CI 的发生, 但倾向于切割 K63 连接的泛素<sup>[37]</sup>。K63 链与核转录因子  $\kappa$ B (nuclear transcription factor kappa B, NF- $\kappa$ B) 信号通路相关, NF- $\kappa$ B 信号通路具有多种功能, 包括先天免疫、DNA 转录、自噬<sup>[47]</sup> 和增殖细胞核抗原 (proliferation of cell nuclear antigen, PCNA)<sup>[48]</sup>。Landmann 等发现 CI 延迟了招募组蛋白 H3.3 和 H4, 而且还发现复制因子 PCNA 在雄原核中的保留时间延长至中期, 表明在 DNA 复制不完全的情况下进入了有丝分裂, 但是对于 CI 拯救和 *Wolbachia* 诱导的表型机制尚不清楚<sup>[49]</sup>。2019 年, Beckmann 等通过利用酿酒酵母和黑腹果蝇鉴定出核输入受体 karyopherin- $\alpha$  (Kap- $\alpha$ ) NLS 结合位点是抑制 CidB 毒性所必需的, CidB 还结合果蝇组蛋白伴侣 P32 和 Nap1 促进鱼精蛋白-组蛋白交换; 雌性昆虫胚胎中过表达 Kap- $\alpha$  或 P32 均可抑制天然 CI, 当同源 CidA 存在时, 其他蛋白消失并可拯救转基因和天然 CI<sup>[50]</sup>。因此, Kap- $\alpha$  和 P32 可能是宿主抗 *Wolbachia* 诱导的 CI 进化的重要因素。Hochstrasser 对 CidB 进行了定位研究, 结果表明 CidB 毒素是由精子携带进入卵细胞的, CidA 可以阻止 CidB 进入间期细胞核<sup>[51]</sup>。很多 CI 机制的细节仍然不清楚, 例如, CidA 结合到底如何中和 CidB 毒性。

2019 年, Chen 等通过生化实验证明重组 CinB 能切割单链和双链 DNA, 但无 RNA 核酸酶活性, 并且 CinB 有 2 个 PD-(D/E)xK 核酸酶

结构域, 这 2 个结构域均是在酵母和果蝇中表现核酸酶活性所必需的<sup>[52]</sup>。许多功能性的 PD-(D/E)XK 结构域不包含保守的 PD-(D/E)XK 催化残基, 而是含有替代催化残基和结构, 但缺乏催化位点的 PD-(D/E)XK 结构域仍然能够参与其他 DNA 相关过程<sup>[36]</sup>。2022 年, Sun 等指出, 尽管 *w*No 和 *w*Pip 的 CinB 核酸酶序列差异较大, 但它们在果蝇中都能诱导 CI, 在酵母中也能产生毒性, CinA<sup>*w*No</sup> 也可以拯救转基因果蝇中的 CI, 抑制酵母中的毒性<sup>[53]</sup>。明确 CI 的机制包括确定识别宿主中 CifB 的相关分子靶点和它们的作用时间, 以及确定 CifA 因子的直接结合如何在体内阻断或逆转 CifB 的作用。另外, Chen 等推测这 2 个核酸酶结构域通过保守的天冬氨酸和谷氨酸残基与二价阳离子形成配位键, 而保守的赖氨酸去质子化激活水分子攻击 DNA 磷酸主链<sup>[43]</sup>。总之, CinB 在 *E. coli* 中不会影响其生长, 可能裂解特定的 DNA 序列或结构, 为了更深入地了解 CinB 反应的确切机制, 需要进一步对 CinB 与核酸复合物进行结构分析。

## 3 CifA-CifB 的结构与作用机制

### 3.1 CinA-CinB 的结构与相互作用机制

近年来, 几种 Cifs 蛋白复合物的晶体结构已被报道<sup>[45-46]</sup>。这些结构揭示了 CI 因子相互作用模式保守的结构特征, 为 CI 的分子机制提供了重要的见解。研究发现 *Wolbachia* 的 *cin* 操纵子编码 CinA 和核酸酶 CinB 这 2 个蛋白, CinA 与 CinB 紧密结合, 2021 年 Xiao 等解析了分辨率为 2.2 Å 的 CinA<sup>*w*Pip(Pel)</sup>-CinB<sup>*w*Pip(Pel)</sup>复合物晶体结构(图 3A), 其中 CinA<sup>*w*Pip(Pel)</sup>具有 22 个  $\alpha$  螺旋, 其包含一个 N 端结构域(N-terminal domain, NTD)和一个 C 端结构域(C-terminal domain, CTD), NTD 是一种具有新的折叠方式的结构

域, CTD 与 HEAT repeats 相似, 推断其可能介导蛋白质间相互作用<sup>[45]</sup>。CinB<sup>wPip(Pel)</sup>包含 2 个 PD-(D/E)XK 核酸结构域<sup>[54-55]</sup>, 该结构域具有  $\alpha\beta\beta\alpha\beta$  拓扑结构, 与 IIG 型限制性内切酶 *BpuS I* 相似<sup>[56-58]</sup>。CinB<sup>wPip(Pel)</sup>的第 1 个活性中心可以结合锰和钴离子<sup>[59]</sup>, 而第 2 个活性中心未发现离子的结合。CinB<sup>wPip(Pel)</sup>的核酸酶活性和毒素功能需要 2 个核酸酶结构域都被激活, 这 2 个结构域可能具有 2 种机制, 其中一种可能是一个结构域参与底物识别, 而另一个结构域负责磷酸二酯键的裂解; 另一种可能是 2 个核酸酶结构域协同识别和切割 DNA 底物; 从复合物晶体结构中可以看出, CinA<sup>wPip(Pel)</sup>整体结构形似“C 型”并以一种类似盖子的形式结合于 CinB<sup>wPip(Pel)</sup>上方<sup>[45]</sup>。而且, Chen 等预测 CinB 包含 2 个 PD-(D/E)XK 核酸结构域, 其中 Glu、Asp 和 Lys 作为催化位点<sup>[43]</sup>, Xiao 等通过解析 CinA<sup>wPip(Pel)</sup>-CinB<sup>wPip(Pel)</sup>复合物晶体结构证实了前述假设<sup>[45]</sup>。

CinA<sup>wPip(Pel)</sup>主要带负电, 而 CinB<sup>wPip(Pel)</sup>带正电, CinB<sup>wPip(Pel)</sup>表面强烈的正电荷可能会促进与 DNA 底物的结合或切割(图 3B、3C), CinA<sup>wPip(Pel)</sup>主要通过复杂的氢键和盐桥网络结合 CinB<sup>wPip(Pel)</sup>, 形成约 2510 Å<sup>2</sup> 的相互作用界面面积, 界面可分为 3 个区域, 单个界面突变不足以破坏 CinA<sup>wPip(Pel)</sup>-CinB<sup>wPip(Pel)</sup>复合体的形成, 然而, 界面中相互作用残基组合突变大大削弱了 CinA<sup>wPip(Pel)</sup>-CinB<sup>wPip(Pel)</sup>结合; CinB<sup>wPip(Pel)</sup>和 CinB(I-III)<sup>wPip(Pel)</sup> (3 个界面的关键带电残基突变成带相反电荷的残基)突变体在酿酒酵母细胞中单独表达均抑制细胞生长, 单独表达野生型 CinA<sup>wPip(Pel)</sup>和 CinA(I-III)<sup>wPip(Pel)</sup>突变体均未引起酵母细胞生长缺陷, 但如果同源 CinA 与 CinB 共表达, 酵母细胞恢复生长, 类似于昆虫中的 CI 修饰和拯救, 总而言之, CinA<sup>wPip(Pel)</sup>-CinB<sup>wPip(Pel)</sup>复合物的 3 个界面中的残基对二者相互作用及 CI

修饰与拯救至关重要<sup>[45]</sup> (图 3D、3E、3F 和 3G)。

综合分析可知, CinA 与 CinB 之间的相互作用模式更符合“toxin-antidote” (TA)模型, CinA 作为解毒剂, CinB 则为毒素, TA 模型类似于“lock-and-key”模型, 强调 A 因子与 B 因子之间的相互作用<sup>[60-61]</sup>。Wolbachia 既能产生毒素, 也能产生特定的解毒剂, 精子形成过程中会将 Wolbachia 排出, 解毒剂可能不稳定, 会比毒素降解得更快<sup>[60]</sup>。当感染 Wolbachia 的精卵细胞结合时, 卵细胞中的解毒剂与精子中的毒素结合并中和, 从而维持胚胎的活性<sup>[20]</sup>。是否其他 CI 因子的相互作用机制也符合 TA 模型还需进一步验证。

### 3.2 CidA-CidB 的结构与相互作用机制

CidA 与 CinA 具有相同的三维结构(rmsd: 2.2 Å, 超过 306 个 C $\alpha$  原子) (图 4A); 在 CidA-CidB<sub>ND1-ND2</sub>复合物中, 氢键和盐桥仍起主要作用, 其与 CinA<sup>wPip(Pel)</sup>-CinB<sup>wPip(Pel)</sup>复合物在界面上的残基通常是不同的, 包括表面电荷通常是相反的<sup>[45]</sup> (图 4B、4C)。CidB<sup>wPip</sup>由 2 个(无活性)核酸酶结构域和一个 C 端去泛素化酶 (DUB)结构域组成, 每个核酸酶结构域(nuclease domain, ND)外都有一个额外的 PD-(D/E)XK 基序, 这可能促进 CidB 与染色质结合并稳定整体结构<sup>[45]</sup>。DUB 核心由两侧的  $\alpha$ 螺旋和 5 个  $\beta$ 折叠组成。His963、Asp982 和 Cys1022 形成催化三联体<sup>[46]</sup>, 而且, DUB 结构域与 CE clan/Ulp1 样蛋白酶家族中其他蛋白酶的结构相似, 所以 CidB<sup>wPip</sup>可以水解 7 个赖氨酸连接的异肽键和 Ub-AMC<sup>[37]</sup>。此外, Chen 等还提出 CE clan/Ulp1 样蛋白酶家族中其他蛋白酶已被证明包含额外的辅助结构域, 有助于 DUB 生物功能的发挥<sup>[43]</sup>。例如, 具有 ulp1 样结构域的沙门氏菌效应蛋白 SseL 也具有 VHS 结构域, 有利于其定位于含沙门氏菌的液泡<sup>[62]</sup>。

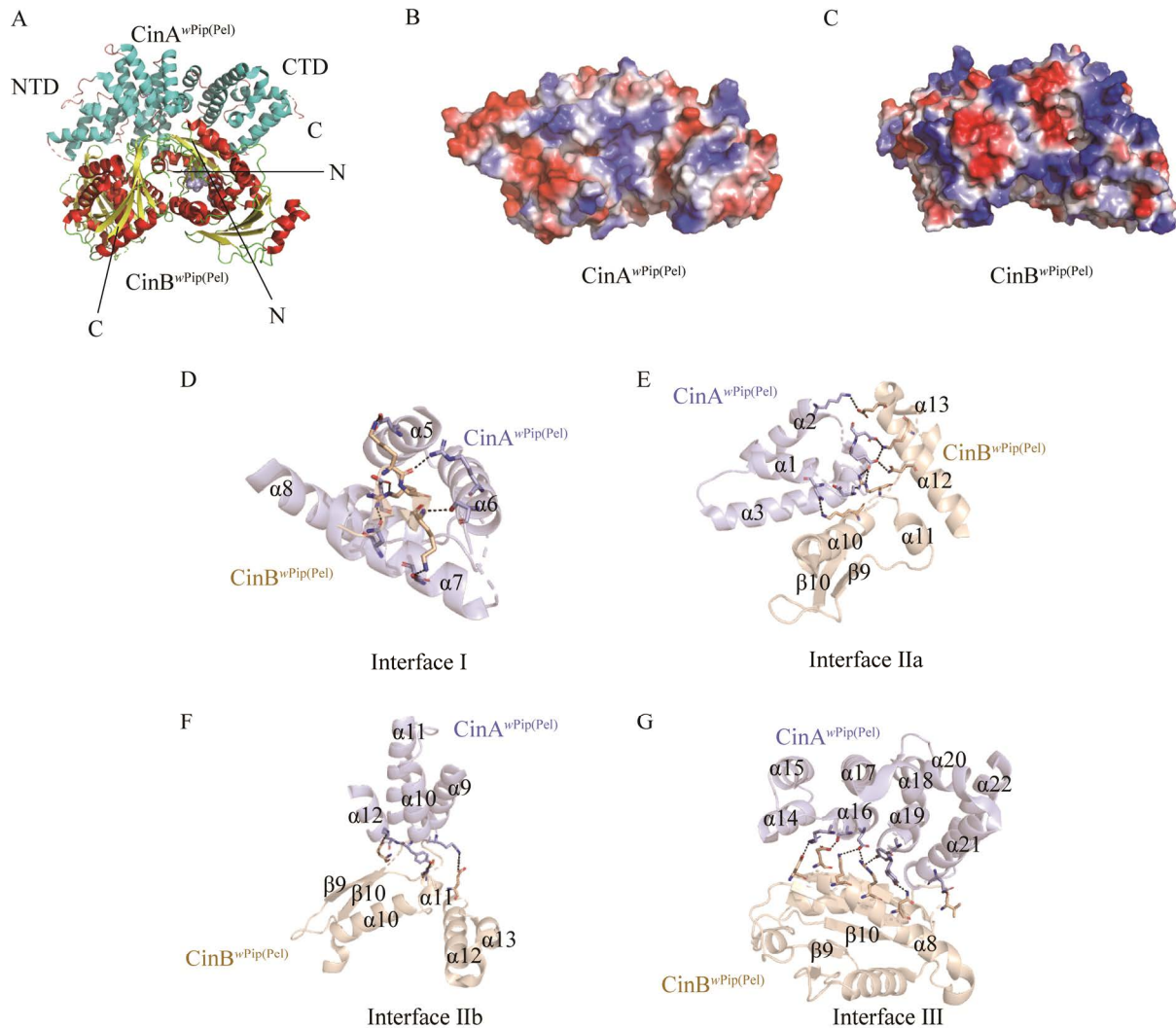


图3  $\text{CinA}^{\text{wPip(Pel)}}\text{-CinB}^{\text{wPip(Pel)}}$ 复合物结构<sup>[45]</sup> A: CinA-CinB 复合物结构(PDB ID: 7ET0). B-C: CinA, CinB 单独结构的电势图. D-G: CinA 与 CinB 相互作用界面的关键氢键示意图

Figure 3 The structure of CinA-CinB complex<sup>[45]</sup>. A: The structure of CinA-CinB complex (PDB ID: 7ET0). B-C: CinA and CinB surface potentials. D-G: Schematic diagram of key hydrogen bonds at the interaction interface between CinA and CinB.

对比  $\text{CinA}^{\text{wPip(Pel)}}\text{-CinB}^{\text{wPip(Pel)}}$  和  $\text{CidA}^{\text{wPip}}\text{-CidB}^{\text{wPip}}_{\text{ND1-ND2}}$  复合物结构发现, 二者整体结构相似, 均通过 3 个界面的氢键和盐桥网络结合, 但是 3 个相互作用界面的氨基酸残基具有非保守性, 表面电荷分布恰好相反。由于已经解析了 3 种 CI 因子中的其中 2 种, 因此推测 CI 因子之间的相互作用模式保守, 均通过 3 个界面

的变化来调节 CI 因子之间的结合特异性。CI 因子的结构研究揭示了 CI 因子之间的相互作用, 为了解 CI 修饰和拯救的分子机制提供了理论依据。上述 2 种 CI 因子复合物结构的特点更加符合 TA 模型, 然而, CifA 和 CifB 在 CI 产生和拯救过程中的具体作用机制目前仍不清楚, 有待进一步研究, 以彻底揭示 CI 分子机制。



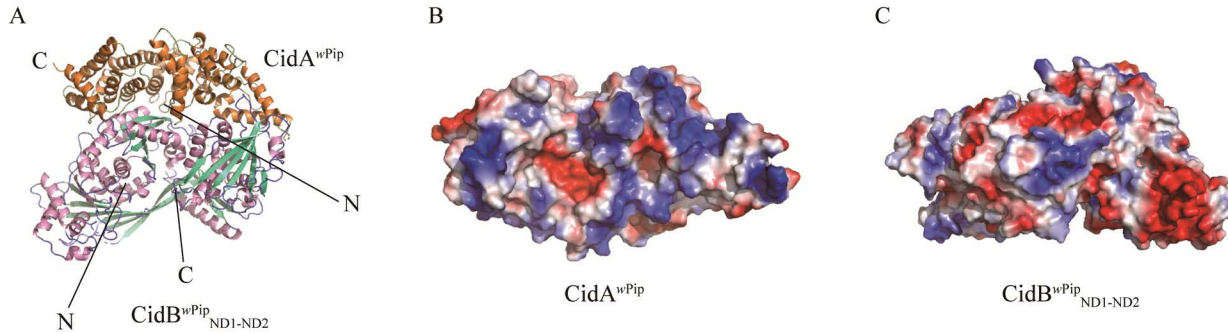


图 4  $CidA^{wPip}$ - $CidB^{wPip}_{ND1-ND2}$  复合物结构<sup>[45]</sup> A:  $CidA^{wPip}$ - $CidB^{wPip}_{ND1-ND2}$  复合物结构(PDB ID: 7ESY). B:  $CidA^{wPip}$  结构的电势图. C:  $CidB^{wPip}_{ND1-ND2}$  结构的电势图

Figure 4 The structure of  $CidA^{wPip}$ - $CidB^{wPip}_{ND1-ND2}$  complex<sup>[45]</sup>. A: The structure of  $CidA^{wPip}$ - $CidB^{wPip}_{ND1-ND2}$  complex (PDB ID: 7ESY). B:  $CidA^{wPip}$  surface potentials. C:  $CidB^{wPip}_{ND1-ND2}$  surface potentials.

## 4 人工设计改造 CifA

截至目前,同源 CifA 和 CifB 蛋白被证明可以进行特异性结合,CifA 和 CifB 之间的特异性相互作用由 3 个互作界面调控,从而发挥 CI 修饰和拯救的作用<sup>[46]</sup>(图 5)。来自 *Wolbachia* 菌株  $wMel$  和  $wPip$  的 Cid 系统在进化上是相关的,但这些菌株存在于不同的进化支或超家族(分别为超家族 A 和 B)<sup>[63-64]</sup>(表 1),研究证明这 2 种菌株是不相容的<sup>[65]</sup>(图 5)。这些 *Wolbachia* 菌株中的 CidA-CidB 均是通过氢键和盐桥网络相互作用,但结合界面中的残基具有非保守性,而且它们是特异性结合的关键位点<sup>[45]</sup>。 $CidAST^{wMel}$  是一种基于合理设计的嵌合体,包含  $CidA^{wMel}$  的主体残基和  $CidA^{wPip}$  的界面残基(图 6A),可与  $CidB^{wPip(Pel)}$  结合并挽救  $CidB^{wPip(Pel)}$  对酵母细胞产生的生长抑制作用,这证明了不同 *Wolbachia* 菌株的 CidA 变体通过相同的途径来执行其功能<sup>[46]</sup>。利用回复突变技术将这些结合关键氨基酸残基突变成原本的序列,并通过 Pull-down 技术和酵母表型分析实验发现了  $CidA^{ST^{wMel}}$  中参与相互作用的关键残基;其中, $CidA^{ST^{wMel}}$  的 R114 和 K121 残基与

$CidB^{wPip(Pel)}$  的 E460 和 D459 残基可形成氢键; $CidA^{ST^{wMel}}$  的 R288 和 D299 残基与  $CidB^{wPip(Pel)}$  的 D246 和 R252 残基具有电荷互补性; $CidA^{ST^{wMel}}$  的 R393 残基可与  $CidB^{wPip(Pel)}$  的 E257 和 D261 残基形成盐桥(图 6B-6D)<sup>[46]</sup>。该工作是首例基于结构进行人工设计 CI 因子并调控它们间的相互作用(图 5),首次实现了人工操纵胞质不相容,为分析 CI 作用模型提供了一些思路,同时也为今后将人工设计改造 CI 因子策略应用于不同种属 *Wolbachia* 进行寨卡等蚊媒疾病的防控提供了一些方法。Epis 等也通过构建嵌合体的方法设计了一种 *Asaia* 属的蚊子嵌合共生体进行 *Wolbachia* 表面蛋白的异源表达,刺激蚊子免疫并抑制寄生丝虫的发育<sup>[66]</sup>,所以这种方法也具有广阔的应用前景。

## 5 序列变化对 CI 和 CifA-CifB 相互作用的影响

研究表明, $wPip$  菌株已分化为 5 个系统发育群( $wPip_I$  到  $wPip_V$ )<sup>[44,67]</sup>。同一个发育群的  $wPip$  菌株之间的交配通常是相容的,而来自不

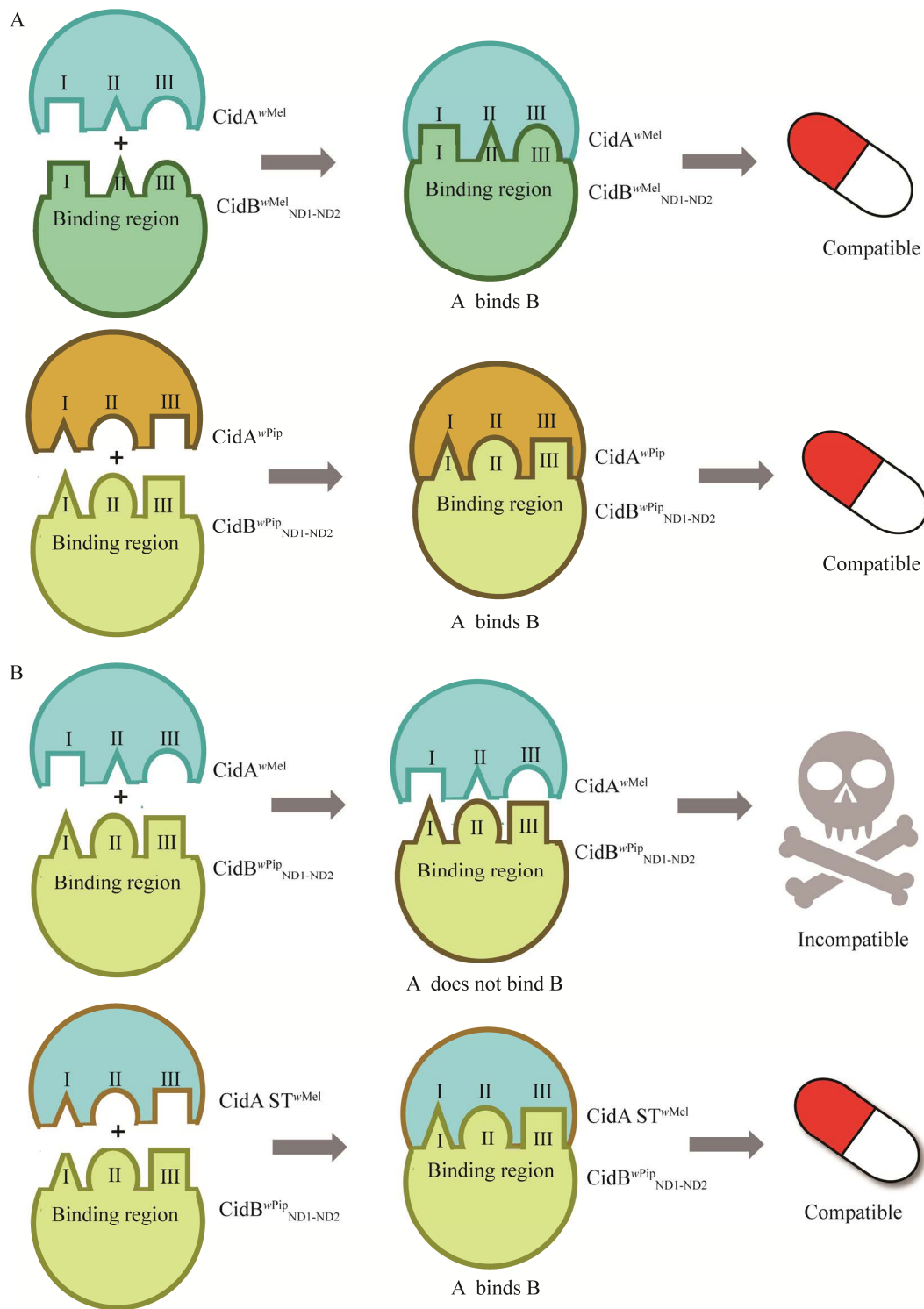


图 5 CifA 与 CifB 相互作用模型<sup>[46]</sup> A: 同源 CifA 与 CifB 相互作用模型. B: 非同源 CifA 与 CifB 相互作用模型

Figure 5 The interaction model of CifA and CifB<sup>[46]</sup>. A: Homologous CifA and CifB interaction model. B: Non-homologous CifA and CifB interaction model.

表 1 19 种菌株的基因组(按超家族 A 和 B 排序, 然后按字母顺序排列)<sup>[64]</sup>Table 1 The genomes of 19 strains (ordered by supergroups A and B, and then alphabetically)<sup>[64]</sup>

Strain	Host	Supergroup	Accession No.	Genome size (bp)
wAu	<i>Drosophila simulans</i>	A	LK055284	1 268 461
wCauA	<i>Carposina sasakii</i>	A	NZ_CP041215	1 449 344
wCer1	<i>Rhagoletis cerasi</i>	A	JADCNC01000000	1 255 676
wCer2	<i>Drosophila simulans</i>	A	SOZK01000000	1 325 568
wCer4	<i>C. capitata</i>	A	JADCND01000000	1 239 646
wHa	<i>Drosophila simulans</i>	A	NC_021089	1 295 804
wIrr	<i>Haematobia irritans irritans</i>	A	NZ_CP037426	1 352 354
wMeg	<i>Chrysomya megacephala</i>	A	NZ_CP021120	1 376 868
<b>wMel</b>	<b><i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>A</b>	<b>NC_002978</b>	<b>1 267 782</b>
wRec	<i>Drosophila recens</i>	A	NZ_JQAM01000000	1 126 656
wRi	<i>Drosophila simulans</i>	A	NC_012416	1 445 873
wSuz	<i>Drosophila suzukii</i>	A	NZ_CAOU02000000	1 415 350
wVitA	<i>Nasonia vitripennis</i>	A	NZ_MUJM01000000	1 211 929
wAlbB	<i>A. albopictus</i>	B	NZ_CP031221	1 484 007
wCer5	<i>Rhagoletis cerasi</i>	B	JADCNE01000000	1 180 723
wDi	<i>Diaphorina citri</i>	B	CP051264	1 538 623
wNo	<i>Drosophila simulans</i>	B	NC_021084	1 301 823
<b>wPip</b>	<b><i>Culex quinquefasciatus</i></b>	<b>B</b>	<b>NC_010981</b>	<b>1 482 455</b>
wStri	<i>Laodelphax striatellus</i>	B	NZ_MUIX01000000	1 786 382

粗体: 本文综述的 CI 因子所属的 *Wolbachia* 菌株基因组

Bold: *Wolbachia* strain genomes to which the CI factors reviewed in this paper.

同发育群的菌株之间的杂交可能不相容<sup>[68]</sup>。wPip *cidA-cidB* 操纵子具有多样性, 而 *cinA-cinB* 操纵子只有单一的基因种类<sup>[69]</sup>。然而, 在 CidA<sup>wPip</sup> 和 CidB<sup>wPip</sup> 变体中, 只有某些位置的残基不同, 如果不同的残基位于 CidA<sup>wPip</sup>-CidB<sup>wPip</sup> 结合界面, 它们可能会影响这些蛋白质的相互作用, 并在 CI 诱导或拯救中发挥作用, 一个 CidA\_I 变体能够结合 4 个 CidB\_I 变体中的 3 个, 而 CidA 变体 I( $\alpha/1$ )、I( $\gamma/1$ )、I( $\beta/2$ )和 I( $\gamma/2$ )不能结合 CidB 变体 I( $b/2$ )、I( $b/1$ )、I( $a/2$ )和 I( $a/1$ ), 这些结果与 CifA-CifB 界面残基进化调节它们的相互作用的假设一致<sup>[46]</sup>。此外, 相互作用不受“1-to-1”方式的限制<sup>[53]</sup>, 一个 CidA 变体可以与多个 CidB 变体相互作用, 反之亦然, 这可能有助于

解释 *C. pipiens* 多样化的 CI 表型。

CifA 和 CifB 的共同进化部分解释了不同的 CI 表型<sup>[38,44,69-70]</sup>。最近使用转基因黑腹果蝇模型证实了这一假设, 由 *Wolbachia* 菌株 wMel、wRec 中的 *cidA* 和 *cidB* 基因在雄性体内表达产生的 CI 修饰, 可以通过 wMel、wRec 或 wRi 的高度同源 *cidA* 基因来挽救<sup>[71]</sup>。另外, 雄性体内 CidA<sup>wRi</sup> 和 CidB<sup>wRi</sup> 的表达产生了 CI 样表型, 可以通过雌性体内的 CidA<sup>wMel</sup> 进行挽救; 反之, 由 CidA<sup>wMel</sup> 和 CidB<sup>wMel</sup> 在雄性体内共表达诱导的 CI 不能通过 CidA<sup>wRi</sup> 在雌性体内挽救<sup>[71]</sup>。这种单向胞质不相容现象的机制尚不清楚, 但研究人员已经提出宿主遗传背景在扩大天然 CidA<sup>wMel</sup> 的救援能力方面发挥作用<sup>[38]</sup>。

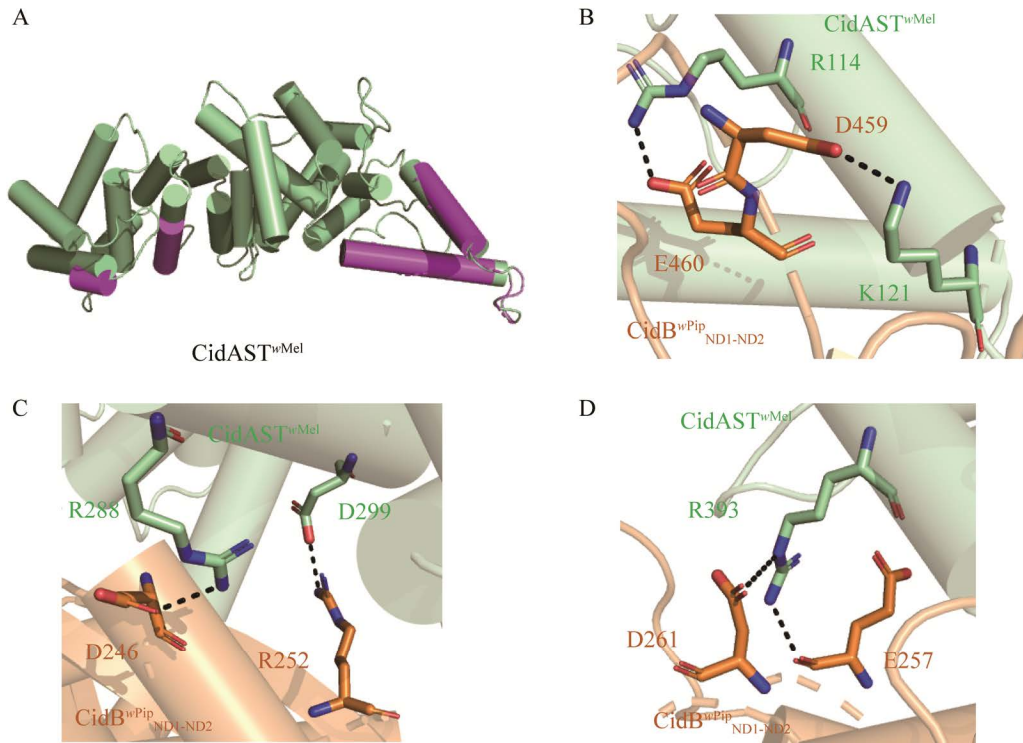


图 6  $CidAST^{wMel}$ - $CidB^{wPip}_{ND1-ND2}$  复合物结构<sup>[46]</sup>

A:  $CidAST^{wMel}$  结构. B-D:  $CidAST^{wMel}$  与

$CidB^{wPip}_{ND1-ND2}$  相互作用界面的关键氨基酸示意图

Figure 6 The structure of  $CidAST^{wMel}$ - $CidB^{wPip}_{ND1-ND2}$  complex<sup>[46]</sup>. A: The structure of  $CidAST^{wMel}$ . B-D: Schematic diagram of key amino acids at the interaction interface between  $CidAST^{wMel}$  and  $CidB^{wPip}_{ND1-ND2}$ .

综上所述,野生型  $CidA^{wPip}$  和  $CidB^{wPip}$  相互作用区域中的序列共同变化可能是驱动 CI 多样化的原因,而且 *Wolbachia* 中 A 因子的种类比 B 因子多,可能会加快 CI 系统的进化。

## 6 展望

*Wolbachia* 通过表达 CI 因子来调控 CI, CI 因子分为 A 因子和 B 因子, B 因子通过其功能域发挥 CI 修饰,使宿主产生 CI, A 因子与 B 因子相互作用进而发挥 CI 拯救作用。综上所述,本文系统地总结了 CI 因子的结构与作用机制的研究进展,但是目前 CI 因子的研究较为滞后,在获得 CI 因子结构的基础上,需要开展大

量关于深入研究 CI 因子作用机制和改造 CI 因子的工作。未来 CI 因子研究重点为:(1) 阐明 A 因子行使 CI 拯救功能的分子机制,以及 B 因子在体内具体如何进行 CI 修饰,确定 CI 因子的作用模型;(2) 利用结构生物学手段解析 CI 因子中的 CndA 与 CndB 结构,验证其相互作用机制是否与已经解析的 Cid 或 Cin 相互作用机制一致,是否在所有 CI 因子中具有保守性;(3) 继续拓展 Cifs 因子的细胞生物学和分子机制研究,探究其上游或下游参与 CI 的相关基因,加深对其作用机制的理解与认识,彻底揭示 CI 机制,为利用 *Wolbachia* 和 CI 进行蚊媒疾病和农业病虫害的防控提供理论指导;(4) 设计更多 CI 因子

的人工嵌合体, 将其应用于不同种属 *Wolbachia*, 实现更广泛的 CI 人工调控。可以预见, 对于 *Wolbachia* 和 CI 因子的研究有助于推进基于 *Wolbachia* 生物防控策略的发展和实施。

## REFERENCES

- [1] GILLESPIE JJ, DRISCOLL TP, VERHOEVE VI, RAHMAN MS, MACALUSO KR, AZAD AF. A tangled web: origins of reproductive parasitism[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2018, 10(9): 2292-2309.
- [2] BI J, WANG YF. The effect of the endosymbiont *Wolbachia* on the behavior of insect hosts[J]. *Insect Science*, 2020, 27(5): 846-858.
- [3] KOZEK WJ. What is new in the *Wolbachia/Dirofilaria* interaction?[J]. *Veterinary Parasitology*, 2005, 133(2/3): 127-132.
- [4] PIETRI JE, DEBRUHL H, SULLIVAN W. The rich somatic life of *Wolbachia*[J]. *Microbiology Open*, 2016, 5(6): 923-936.
- [5] ELEFThERIANOS I, ATRI J, ACCETTA J, CASTILLO JC. Endosymbiotic bacteria in insects: guardians of the immune system?[J]. *Frontiers in Physiology*, 2013, 4: 46.
- [6] HOFFMANN AA, TURELLI M, HARSHMAN LG. Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*[J]. *Genetics*, 1990, 126(4): 933-948.
- [7] CORDAUX R, MICHEL-SALZAT A, FRELON-RAIMOND M, RIGAUD T, BOUCHON D. Evidence for a new feminizing *Wolbachia* strain in the isopod *Armadillidium vulgare*: evolutionary implications[J]. *Heredity*, 2004, 93(1): 78-84.
- [8] KAUR R, SHROPSHIRE JD, CROSS KL, LEIGH B, MANSUETO AJ, STEWART V, BORDENSTEIN SR, BORDENSTEIN SR. Living in the endosymbiotic world of *Wolbachia*: a centennial review[J]. *Cell Host & Microbe*, 2021, 29(6): 879-893.
- [9] SANA EI, CHARLAT S, ENGELSTÄDTER J. *Wolbachia* host shifts: routes, mechanisms, constraints and evolutionary consequences[J]. *Biological Reviews*, 2021, 96(2): 433-453.
- [10] HONG XY, GOTOH T, NAGATA T. Vertical transmission of *Wolbachia* in *Tetranychus kanzawai* kishida and *Panonychus mori* Yokoyama (*Acari: Tetranychidae*)[J]. *Heredity*, 2002, 88(3): 190-196.
- [11] ZIMMERMANN BL, CARDOSO GM, BOUCHON D, PEZZI PH, PALAORO AV, ARAUJO PB. Supergroup F *Wolbachia* in terrestrial isopods: horizontal transmission from termites?[J]. *Evolutionary Ecology*, 2021, 35(2): 165-182.
- [12] BERGMAN A, HESSON JC. *Wolbachia* prevalence in the vector species *Culex pipiens* and *Culex torrentium* in a Sindbis virus-endemic region of Sweden[J]. *Parasites & Vectors*, 2021, 14(1): 428.
- [13] RIPARBELLI MG, GIORDANO R, UEYAMA M, CALLAINI G. *Wolbachia*-mediated male killing is associated with defective chromatin remodeling[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30045.
- [14] SALUNKHE RC, NARKHEDE KP, SHOUCHE YS. Distribution and evolutionary impact of *Wolbachia* on butterfly hosts[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2014, 54(3): 249-254.
- [15] WERREN JH. Biology of *Wolbachia*[J]. *Annual Review of Entomology*, 1997, 42: 587-609.
- [16] HUNTER MS, PERLMAN SJ, KELLY SE. A bacterial symbiont in the bacteroidetes induces cytoplasmic incompatibility in the parasitoid wasp *Encarsia pergandiella*[J]. *Proceedings Biological Sciences*, 2003, 270(1529): 2185-2190.
- [17] 杨翠, 奚志勇, 胡志勇. 应用沃尔巴克氏体通过种群压制阻断蚊媒病传播的研究进展[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2020, 31(1): 113-116.
- YANG C, XI ZY, HU ZY. Blocking transmission of mosquito-borne diseases through population suppression using *Wolbachia*[J]. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 2020, 31(1): 113-116 (in Chinese).
- [18] TRAM U, SULLIVAN W. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility[J]. *Science*, 2002, 296(5570): 1124-1126.
- [19] ENGELSTÄDTER J, TELSCHOW A. Cytoplasmic incompatibility and host population structure[J]. *Heredity*, 2009, 103(3): 196-207.
- [20] BECKMANN JF, BONNEAU M, CHEN HL, HOCHSTRASSER M, POINSOT D, MERÇOT H, WEILL M, SICARD M, CHARLAT S. The toxin-antidote model of cytoplasmic incompatibility: genetics and evolutionary implications[J]. *Trends in Genetics*, 2019, 35(3): 175-185.
- [21] LINDSEY ARI. Sensing, signaling, and secretion: a review and analysis of systems for regulating host interaction in *Wolbachia*[J]. *Genes*, 2020, 11(7): 813.

- [22] LI TP, ZHA SS, ZHOU CY, XIA X, HOFFMANN AA, HONG XY. Two newly introduced *Wolbachia* endosymbionts induce cell host differences in competitiveness and metabolic responses[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(22): e0147921.
- [23] JAENIKE J. Spontaneous emergence of a new *wolbachia* phenotype[J]. Evolution, 2007, 61(9): 2244-2252.
- [24] WU M, SUN LV, VAMATHEVAN J, RIEGLER M, DEBOY R, BROWNLIE JC, MCGRAW EA, MARTIN W, ESSER C, AHMADINEJAD N, WIEGAND C, MADUPU R, BEANAN MJ, BRINKAC LM, DAUGHERTY SC, DURKIN AS, KOLONAY JF, NELSON WC, MOHAMOUD Y, LEE P, et al. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements[J]. PLoS Biology, 2004, 2(3): E69.
- [25] YAMADA R, ITURBE-ORMAETXE I, BROWNLIE JC, O'NEILL SL. Functional test of the influence of *Wolbachia* genes on cytoplasmic incompatibility expression in *Drosophila melanogaster*[J]. Insect Molecular Biology, 2011, 20(1): 75-85.
- [26] 王英藩, 何坤, 郭蔚, 王海防, 张东辉, 公茂庆, 季旻珺, 陈琳. 淡色库蚊自然种群沃尔巴克氏体感染致细胞质不亲和相关基因初探[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2020, 32(5): 517-521.
- WANG YF, HE K, GUO W, WANG HF, ZHANG DH, GONG MQ, JI MJ, CHEN L. Genes associated with *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in natural populations of *Culex pipiens pallens*: a preliminary study[J]. Chinese Journal of Schistosomiasis Control, 2020, 32(5): 517-521 (in Chinese).
- [27] PAPAFOTIU G, OEHLER S, SAVAKIS C, BOURTZIS K. Regulation of *Wolbachia* ankyrin domain encoding genes in *Drosophila* gonads[J]. Research in Microbiology, 2011, 162(8): 764-772.
- [28] DURON O, BOUREUX A, ECHAUBARD P, BERTHOMIEU A, BERTICAT C, FORT P, WEILL M. Variability and expression of ankyrin domain genes in *Wolbachia* variants infecting the mosquito *Culex pipiens*[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(12): 4442-4448.
- [29] BECKMANN JF, MARKOWSKI TW, WITTHUHN BA, FALLON AM. Detection of the *Wolbachia*-encoded DNA binding protein, HU beta, in mosquito gonads[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 43(3): 272-279.
- [30] BECKMANN JF, FALLON AM. Detection of the *Wolbachia* protein WPIP0282 in mosquito spermathecae: implications for cytoplasmic incompatibility[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 43(9): 867-878.
- [31] WIMMER P, SCHREINER S, DOBNER T. Human pathogens and the host cell SUMOylation system[J]. Journal of Virology, 2012, 86(2): 642-654.
- [32] LI SJ, HOCHSTRASSER M. A new protease required for cell-cycle progression in yeast[J]. Nature, 1999, 398(6724): 246-251.
- [33] LEE MT, BAKIR AA, NGUYEN KN, BACHANT J. The SUMO isopeptidase Ulp2p is required to prevent recombination-induced chromosome segregation lethality following DNA replication stress[J]. PLoS Genetics, 2011, 7(3): e1001355.
- [34] MCALEENAN A, CORDON-PRECIADO V, CLEMENTE-BLANCO A, LIU IC, SEN N, LEONARD J, JARMUZ A, ARAGÓN L. SUMOylation of the  $\alpha$ -kleisin subunit of cohesin is required for DNA damage-induced cohesion[J]. Current Biology, 2012, 22(17): 1564-1575.
- [35] CUBEÑAS-POTTS C, MATUNIS MJ. SUMO: a multifaceted modifier of chromatin structure and function[J]. Developmental Cell, 2013, 24(1): 1-12.
- [36] KNIZEWSKI L, KINCH LN, GRISHIN NV, RYCHLEWSKI L, GINALSKI K. Realm of PD-(D/E)XK nuclease superfamily revisited: detection of novel families with modified transitive meta profile searches[J]. BMC Structural Biology, 2007, 7: 40.
- [37] BECKMANN JF, RONAU JA, HOCHSTRASSER M. A *Wolbachia* deubiquitylating enzyme induces cytoplasmic incompatibility[J]. Nature Microbiology, 2017, 2: 17007.
- [38] LEPAGE DP, METCALF JA, BORDENSTEIN SR, ON J PERLMUTTER JI, SHROPSHIRE JD, LAYTON EM, FUNKHOUSER-JONES LJ, BECKMANN JF, BORDENSTEIN SR. Prophage WO genes recapitulate and enhance *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility[J]. Nature, 2017, 543(7644): 243-247.
- [39] SHROPSHIRE JD, KALRA M, BORDENSTEIN SR. Evolution-guided mutagenesis of the cytoplasmic incompatibility proteins: identifying CifA's complex functional repertoire and new essential regions in CifB[J]. PLoS Pathogens, 2020, 16(8): e1008794.
- [40] SHROPSHIRE JD, LEIGH B, BORDENSTEIN SR,

- DUPOUY A, RIEGLER M, BROWNLIE JC, BORDENSTEIN SR. Models and nomenclature for cytoplasmic incompatibility: caution over premature conclusions—a response to beckmann et al[J]. Trends in Genetics, 2019, 35(6): 397-399.
- [41] RICHARDSON KM, GRIFFIN PC, LEE SF, ROSS PA, ENDERSBY-HARSHMAN NM, SCHIFFER M, HOFFMANN AA. A *Wolbachia* infection from *Drosophila* that causes cytoplasmic incompatibility despite low prevalence and densities in males[J]. Heredity, 2019, 122(4): 428-440.
- [42] SHROPSHIRE JD, BORDENSTEIN SR. Two-by-one model of cytoplasmic incompatibility: synthetic recapitulation by transgenic expression of cifA and cifB in *Drosophila*[J]. PLoS Genetics, 2019, 15(6): e1008221.
- [43] CHEN HL, ZHANG MW, HOCHSTRASSER M. The biochemistry of cytoplasmic incompatibility caused by endosymbiotic bacteria[J]. Genes, 2020, 11(8): 852.
- [44] LINDSEY ARI, RICE DW, BORDENSTEIN SR, BROOKS AW, BORDENSTEIN SR, NEWTON ILG. Evolutionary genetics of cytoplasmic incompatibility genes cifA and cifB in prophage WO of *Wolbachia*[J]. Genome Biology and Evolution, 2018, 10(2): 434-451.
- [45] XIAO YJ, CHEN HL, WANG HF, ZHANG MW, CHEN X, BERK JM, ZHANG LL, WEI Y, LI WL, CUI W, WANG FH, WANG QF, CUI C, LI T, CHEN C, YE S, ZHANG L, JI XY, HUANG JH, WANG W, et al. Structural and mechanistic insights into the complexes formed by *Wolbachia* cytoplasmic incompatibility factors[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(41): e2107699118.
- [46] WANG HF, XIAO YJ, CHEN X, ZHANG MW, SUN GX, WANG F, WANG L, ZHANG HX, ZHANG XY, YANG X, LI WL, WEI Y, YAO DQ, ZHANG B, LI J, CUI W, WANG FH, CHEN C, SHEN W, SU D, et al. Crystal structures of *Wolbachia* CidA and CidB reveal determinants of bacteria-induced cytoplasmic incompatibility and rescue[J]. Nature Communications, 2022, 13: 1608.
- [47] TAN JMM, WONG ESP, KIRKPATRICK DS, PLETNIKOVA O, KO HS, TAY SP, HO MWL, TRONCOSO J, GYGI SP, LEE MK, DAWSON VL, DAWSON TM, LIM KL. Lysine 63-linked ubiquitination promotes the formation and autophagic clearance of protein inclusions associated with neurodegenerative diseases[J]. Human Molecular Genetics, 2007, 17(3): 431-439.
- [48] RIPLEY BM, GILDENBERG MS, WASHINGTON MT. Control of DNA damage bypass by ubiquitylation of PCNA[J]. Genes, 2020, 11(2): 138.
- [49] LANDMANN F, ORSI GA, LOPPIN B, SULLIVAN W. *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility is associated with impaired histone deposition in the male pronucleus[J]. PLoS Pathogens, 2009, 5(3): e1000343.
- [50] BECKMANN JF, SHARMA GD, MENDEZ L, CHEN HL, HOCHSTRASSER M. The *Wolbachia* cytoplasmic incompatibility enzyme CidB targets nuclear import and protamine-histone exchange factors[J]. eLife, 2019, 8: e50026.
- [51] HOCHSTRASSER M. Cytoplasmic incompatibility: a *Wolbachia* toxin-antidote mechanism comes into view[J]. Current Biology, 2022, 32(6): R287-R289.
- [52] CHEN HL, RONAUA JA, BECKMANN JF, HOCHSTRASSER M. A *Wolbachia* nuclease and its binding partner provide a distinct mechanism for cytoplasmic incompatibility[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(44): 22314-22321.
- [53] SUN GX, ZHANG MW, CHEN HL, HOCHSTRASSER M. The CinB nuclease from *wNo Wolbachia* is sufficient for induction of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*[J]. mBio, 2022, 13(1): e0317721.
- [54] RIMSELIENE R, JANULAITIS A. Mutational analysis of two putative catalytic motifs of the type IV restriction endonuclease Eco57I[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(13): 10492-10497.
- [55] PINGOUD A, FUXREITER M, PINGOUD V, WENDE W. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2005, 62(6): 685-707.
- [56] SHEN BW, XU D, CHAN SH, ZHENG Y, ZHU ZY, XU SY, STODDARD BL. Characterization and crystal structure of the type IIG restriction endonuclease RM. *BpuS I*[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(18): 8223-8236.
- [57] DEIBERT M, GRAZULIS S, JANULAITIS A, SIKSNYS V, HUBER R. Crystal structure of *Mun I* restriction endonuclease in complex with cognate DNA at 1.7 Å resolution[J]. The EMBO Journal, 1999, 18(21): 5805-5816.
- [58] ANJUM A, BRATHWAITE KJ, AIDLEY J, CONNERTON PL, CUMMINGS NJ, PARKHILL J, CONNERTON I, BAYLISS CD. Phase variation of a type IIG restriction-modification enzyme alters

- site-specific methylation patterns and gene expression in *Campylobacter jejuni* strain NCTC 11168[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(10): 4581-4594.
- [59] HORTON NC, PERONA JJ. DNA cleavage by *EcoR* V endonuclease: two metal ions in three metal ion binding sites[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(22): 6841-6857.
- [60] SBERRRO H, LEAVITT A, KIRO R, KOH E, PELEG Y, QIMRON U, SOREK R. Discovery of functional toxin/antitoxin systems in bacteria by shotgun cloning[J]. *Molecular Cell*, 2013, 50(1): 136-148.
- [61] BECKMANN JF, BONNEAU M, CHEN HL, HOCHSTRASSER M, POINSOT D, MERÇOT H, WEILL M, SICARD M, CHARLAT S. Caution does not preclude predictive and testable models of cytoplasmic incompatibility: a reply to Shropshire[J]. *Trends in Genetics*, 2019, 35(6): 399-400.
- [62] PRUNEDA JN, DURKIN CH, GEURINK PP, OVAA H, SANTHANAM B, HOLDEN DW, KOMANDER D. The molecular basis for ubiquitin and ubiquitin-like specificities in bacterial effector proteases[J]. *Molecular Cell*, 2016, 63(2): 261-276.
- [63] FALLON AM. DNA recombination and repair in *Wolbachia*: RecA and related proteins[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2021, 296(2): 437-456.
- [64] DUPLOUY A, BRATTSTRÖM O. *Wolbachia* in the genus *bicyclus*: a forgotten player[J]. *Microbial Ecology*, 2018, 75(1): 255-263.
- [65] LIANG X, LIU JL, BIAN GW, XI ZY. *Wolbachia* inter-strain competition and inhibition of expression of cytoplasmic incompatibility in mosquito[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1638.
- [66] EPIS S, VAROTTO-BOCCAZZI I, CROTTI E, DAMIANI C, GIOVATI L, MANDRIOLI M, BIGGIOGERA M, GABRIELI P, GENCHI M, POLONELLI L, DAFFONCHIO D, FAVIA G, BANDI C. Chimeric symbionts expressing a *Wolbachia* protein stimulate mosquito immunity and inhibit filarial parasite development[J]. *Communications Biology*, 2020, 3: 105.
- [67] BORDENSTEIN SR, BORDENSTEIN SR. Eukaryotic association module in phage WO genomes from *Wolbachia*[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 13155.
- [68] Frank. Dynamics of cytoplasmic incompatibility with multiple *Wolbachia* infections[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 1998, 192(2): 213-218.
- [69] BONNEAU M, ATYAME C, BEJI M, JUSTY F, COHEN-GONSAUD M, SICARD M, WEILL M. *Culex pipiens* crossing type diversity is governed by an amplified and polymorphic operon of *Wolbachia*[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 319.
- [70] SICARD M, NAMIAS A, PERRIAT-SANGUINET M, CARRON E, UNAL S, ALTINLI M, LANDMANN F, WEILL M. Cytoplasmic incompatibility variations in relation with *Wolbachia* *cid* genes divergence in *Culex pipiens*[J]. *mBio*, 2021, 12(1): e02797-e02720.
- [71] SHROPSHIRE JD, ROSENBERG R, BORDENSTEIN SR. The impacts of cytoplasmic incompatibility factor (*cifA* and *cifB*) genetic variation on phenotypes[J]. *Genetics*, 2021, 217(1): 1-13.