

研究报告

酵母 *PMT1* 基因参与内质网应激的调控机制崔红晶^{1,2} 冯文莉³ 何欣^{1,2} 赵炜^{1,2} 陈亚芹^{1,2} 郑慧玲^{1,2} 刘新光^{1,2*}

(1. 广东医科大学衰老研究所 广东 东莞 523808)

(2. 广东省医学分子诊断重点实验室 广东 东莞 523808)

(3. 重庆医科大学检验医学院 重庆 400016)

摘要:【目的】内质网应激(Endoplasmic reticulum stress, ERS)可激活细胞保护性信号级联反应——未折叠蛋白质反应(Unfolded protein response, UPR)。研究表明,酵母细胞中的UPR信号通路由转录因子 Hac1p 和 ERS 感应因子 Ire1p 共同介导。前期研究发现:蛋白质-*O*-甘露糖转移酶 1 (Protein-*O*-mannosyltransferase 1, *PMT1*)基因缺失能延长酵母细胞的复制性寿命,其机制与上调 UPR 通路活性相关。本文进一步探讨 *PMT1* 基因缺失在酵母 ERS 反应中的作用。【方法】观察 *PMT1* 基因与 *IRE1* 或 *HAC1* 基因双缺失酵母菌株(*pmt1Δhac1Δ*和 *pmt1Δire1Δ*) 在 ERS 反应条件下的克隆形成能力;通过比色法检测各菌株的细胞增殖活性;RT-PCR 检测各菌株 UPR 通路下游部分靶基因的转录水平。【结果】与对照菌株比较, *PMT1* 基因缺失菌株(*pmt1Δ*) 在 ERS 反应条件下生长较慢,而 *HAC1* 和 *IRE1* 单基因缺失菌株(*hac1Δ*和 *ire1Δ*) 在 ERS 反应条件下无法存活;在 *hac1Δ*或 *ire1Δ*菌株的基础上进一步缺失 *PMT1* 基因,可以改善 *hac1Δ*菌株在 ERS 反应条件下的生长状态;但缺失 *PMT1* 基因没有上调 *hac1Δ*菌株 UPR 通路靶基因的转录水平。【结论】缺失 *PMT1* 基因可增强 *hac1Δ*菌株对 ERS 诱导剂衣霉素的抗性,机制与已知的 UPR 通路不相关,提示可能存在其它途径参与 ERS 反应的调控。

关键词: 酿酒酵母, 内质网应激, 未折叠蛋白质反应, 衣霉素

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31101051, 81170327); Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 9252402301000002); Social Development Funding of Dongguan City (No. 2012108102022); Science & Technology Innovation Fund of Guangdong Medical College (No. STIF201102)

*Corresponding author: Tel: 86-769-22896371; E-mail: xgliu64@126.com

Received: July 23, 2015; **Accepted:** December 15, 2015; **Published online** (www.cnki.net): January 05, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31101051, 81170327); 广东省自然科学基金项目(No. 9252402301000002); 东莞市科技计划项目(No. 2012108102022); 广东医学院建博科技创新团队项目(No. STIF201102)

*通讯作者: Tel: 86-769-22896371; E-mail: xgliu64@126.com

收稿日期: 2015-07-23; **接受日期:** 2015-12-15; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-01-05

Role of *Saccharomyces cerevisiae* *PMT1* in endoplasmic reticulum stress response

CUI Hong-Jing^{1,2} FENG Wen-Li³ HE Xin^{1,2} ZHAO Wei^{1,2} CHEN Ya-Qin^{1,2}
ZHENG Hui-Ling^{1,2} LIU Xin-Guang^{1,2*}

(1. Institute of Aging Research, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong 523808, China)

(2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Dongguan, Guangdong 523808, China)

(3. College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: [Objective] Endoplasmic reticulum stress (ERS) activates a cytoprotective signaling cascade, termed as unfolded protein response (UPR). Recent advances have unveiled that UPR pathway was mainly mediated by Hac1p (transcription factor) and Ire1p (ERS sensor) in yeast. Our previous results suggest that protein-*O*-mannosyltransferase 1 (*PMT1*) deficiency enhanced the basal activity of UPR, and extended the replicative lifespan of yeast. In this study, we attempted to further study the effect of *PMT1*-deficiency on ERS response induced by tunicamycin in *Saccharomyces cerevisiae*. [Methods] Colony-forming ability of *PMT1/IRE1* and *PMT1/HAC1* double-gene deletion strains (*pmt1Δire1Δ* and *pmt1Δhac1Δ*) was analyzed under ERS condition. Cell proliferation assay was performed using the Microbial Viability Assay Kit. Expression levels of canonical UPR target genes were determined by quantitative RT-PCR (qRT-PCR). [Results] *PMT1* deficiency strain (*pmt1Δ*) grew slowly under ERS condition, while both the *IRE1*- and *HAC1*- deletion strain (*ire1Δ* and *hac1Δ*) were not viable under this condition, compared to the control strain. The double-gene deletion strain (*pmt1Δhac1Δ*) exhibited enhanced growth ability under ERS condition, compared with the *hac1Δ* strain. Nonetheless, expression levels of UPR target genes showed no significant difference between *pmt1Δhac1Δ* and *hac1Δ* strains. [Conclusion] *PMT1* deficiency enables *hac1Δ* strain to resist tunicamycin induced ERS, independent of the UPR activity.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Endoplasmic reticulum stress, Unfolded protein response, Tunicamycin

内质网应激(Endoplasmic reticulum stress, ERS)可激活细胞保护性信号级联反应——未折叠蛋白质反应(Unfolded protein response, UPR)^[1]。激活的UPR通路能增强内质网对未折叠或错误折叠蛋白质的处理能力,减轻ERS压力,维持内质网的内环境稳态。哺乳动物细胞中有3条互相联系的UPR通路(IRE1、PERK和ATF6)共同参与内质网蛋白质动态平衡的调控,而目前研究认为:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞中只存在单一的由转录因子(Homologous to ATF/CREB 1, Hac1p)和ERS感应因子需肌醇酶1(Inositol requiring enzyme 1, Ire1p)共同介导的UPR信号通路,调控方式相对简单^[1-2]。

蛋白质甘露糖糖基化修饰在进化过程中具有

一定的保守性^[3]。酿酒酵母蛋白质-*O*-甘露糖转移酶(Protein *O*-mannosyltransferase, PMT)家族共有7个成员,糖基化修饰分泌蛋白质和膜蛋白质参与调控细胞的多种生物学功能。Pmt1p (*PMT1* 基因编码)与Pmt2p (*PMT2* 基因编码)在酿酒酵母细胞内形成异聚体,共同参与调控内质网蛋白质的动态平衡^[4]。前期研究结果表明缺失*PMT1*基因延长酵母细胞的复制性寿命,其机制与UPR通路活性相关^[5]。本文进一步研究*PMT1*基因与ERS反应之间的关系,研究结果为探讨*PMT1*基因参与调控ERS反应的具体机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

单倍体酿酒酵母 BY4742 (MATa *his3Δ1 leu2Δ0*

lys2Δ0 ura3Δ0)由美国华盛顿大学 Matt Kaerberlein 博士赠送, 单基因缺失酵母菌株(*pmt1Δ*、*hac1Δ* 和 *ire1Δ*)和双基因缺失酵母菌株(*pmt1Δhac1Δ* 和 *pmt1Δire1Δ*)为本实验室构建^[5]。

1.2 主要试剂和仪器

酵母提取物(货号: LP0021)和胰蛋白胨(LP0042), 广州威佳科技有限公司; 衣霉素(TF1129), 生工生物工程(上海)有限公司, 溶于二甲基亚砜(DMSO)配制成 10 g/L 的储存液, 4 °C 保存; 微生物活性检测试剂盒 WST(M439), 日本同仁化学研究所; 酵母 RNA 提取试剂盒(D300)、反转录试剂盒(DRR047A)和定量试剂盒(DRR820A), TaKaRa 公司; 实时定量 PCR 引物和其它常规试剂为本实验室保存^[5]。实时荧光定量 PCR 仪, 美国应用生物系统(ABI)公司; 多功能酶标仪, 美国伯腾仪器(Bio-Tek)有限公司; 恒温摇床、离心机, 德国艾本德中国有限公司。

1.3 方法

1.3.1 检测衣霉素抗性: 取等量的酵母菌株新鲜培养物(OD_{600} 值约为 0.2), 无菌水倍比稀释(1:10), 取 3.5 μ L 稀释培养物滴入实验组 YPD 培养平板(含 1 g/L 衣霉素)^[6], 倒置 30 °C 培养, 从第 2 天起每隔 12 h 观察菌落形态, 并拍照。3 次独立重复实验。

1.3.2 检测酵母细胞增殖活性: 实验方法参照微生物活性检测试剂盒说明书进行^[7], 制备酵母菌株新鲜培养物(OD_{600} 值约为 0.2), 取 2.5 μ L 细胞悬液加到 187.5 μ L YPD 液体培养基(含 0.5 g/L 衣霉素)中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 4 h; 然后加 10 μ L 染色液, 继续 30 °C 恒温振荡培养, 每间隔 1 h 用酶标仪测定标本 A_{450} 。根据吸光度值, 计算酵母菌株的增殖活性, 并绘制生长曲线图。3 次独立重复实验。

1.3.3 RT-PCR 分析 UPR 通路下游靶基因的转录水平: 将酵母菌株培养至对数生长期, 收集 1 mL 酵母菌株新鲜培养物(OD_{600} 值约为 2.5), 加到 3 mL YPD 液体培养基中(含 2 g/L 衣霉素), 30 °C、180 r/min 振荡培养 1 h。酵母细胞总 RNA 提取、

cDNA 制备, 以及实时定量 PCR 均参照试剂盒说明书进行。实时定量 PCR 结束后, 以酵母 *PRP8* 基因为参比, 根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相关基因的转录水平。

1.3.4 统计分析: 采用 SPSS 17.0 统计软件。两组间的比较采用 *t* 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 酵母菌株对 ERS 诱导剂衣霉素的抗性能力

通过观察 *PMT1* 基因与 *IRE1* (ERS 感应因子)或 *HAC1* (转录因子)基因双缺失菌株的克隆形成能力, 研究 *PMT1* 基因参与调控 ERS 反应的机制。结果显示: 在无衣霉素的对照组培养平板上, 与酵母菌株(BY4742)比较, *pmt1Δ*菌株、*ire1Δ*菌株和 *hac1Δ*菌株形成的克隆大小无明显差异, *pmt1Δire1Δ*菌株和 *pmt1Δhac1Δ*菌株生长较慢, 形成较小克隆; 在含 1 g/L 衣霉素的实验组培养平板上, *ire1Δ*菌株、*hac1Δ*菌株和 *pmt1Δire1Δ*菌株无克隆生长, *pmt1Δ*菌株和 *pmt1Δhac1Δ*菌株生长较慢, 形成较小克隆(图 1)。结果说明进一步缺失 *PMT1* 基因能增强 *hac1Δ*菌株对 ERS 诱导剂衣霉素的抗性。

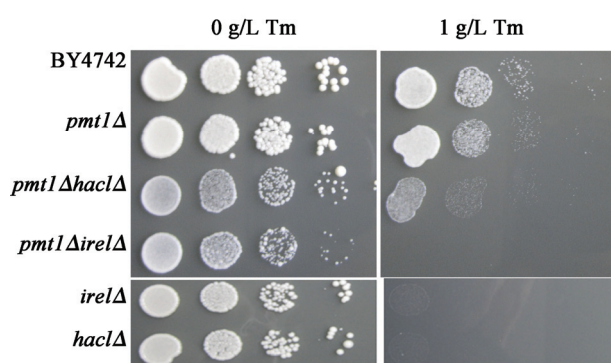


图 1 酵母菌株的克隆形成能力

Figure 1 Colony-forming ability of yeast was assayed with or without tunicamycin treatment

注: 取等量的酵母菌株培养液, 梯度倍比稀释(1:10)滴入 YPD 培养平板上。BY4742 为对照菌株, 衣霉素(Tunicamycin, Tm)为内质网应激诱导剂, 30 °C 培养 2–4 d, 拍照。

Note: Equal culture was 10 times-gradient diluted, then spotted onto the YPD plates with or without 1 g/L tunicamycin. BY4742 is the control strain. Tunicamycin (Tm) is the ERS inducer. All the strains were incubated on 30 °C for 2–4 d before photograph.

2.2 酵母菌株在 ERS 条件下的增殖活性

通过检测菌株在 ERS 反应条件下的细胞增殖情况, 进一步研究 *pmt1Δhac1Δ* 菌株对 ERS 诱导剂衣霉素的抗性。结果显示: 在无衣霉素培养条件下, 与酵母菌株(BY4742)比较, *pmt1Δ* 菌株和 *hac1Δ* 菌株的生长曲线无明显差异, 而 *pmt1Δire1Δ* 菌株和 *pmt1Δhac1Δ* 菌株的细胞生长活力较差, 生长曲线低平; 在含 0.5 g/L 衣霉素培养条件下, *hac1Δ* 菌株和 *pmt1Δire1Δ* 菌株的生长状态较差, 而 *pmt1Δhac1Δ* 菌株的细胞代谢较快, 生长曲线与 *pmt1Δ* 菌株接近。结果说明缺失 *PMT1* 或 *HAC1* 基因对酵母细胞在无衣霉素培养条件下的细胞活性没有明显影响, 但缺失 *PMT1* 基因能增强 *hac1Δ* 菌株在 ERS 反应条件下的活力(图 2)。

2.3 酵母菌株中 UPR 通路下游靶基因的转录水平

实时定量 PCR 检测酵母菌株中 UPR 通路下游部分靶基因的转录水平, 研究 *pmt1Δhac1Δ* 菌株的衣霉素抗性与 UPR 通路活性之间的关系。结果显示: 在无衣霉素培养条件下, 与酵母菌株(BY4742)和 *pmt1Δ* 菌株比较, *hac1Δ* 菌株、*pmt1Δire1Δ* 菌株和 *pmt1Δhac1Δ* 菌株中 UPR 通路靶基因的表达水平降低; 经衣霉素培养后, 与 BY4742 和 *pmt1Δ* 菌株比较, *hac1Δ*、*pmt1Δire1Δ* 和 *pmt1Δhac1Δ* 菌株中 UPR 通路靶基因的表达水平明显降低, 说明 ERS 诱导剂衣霉素不能诱导菌株(*hac1Δ*、*pmt1Δire1Δ* 和 *pmt1Δhac1Δ*) UPR 靶基因的上调表达; 在两种培养条件下, 与 *hac1Δ* 菌株比较, *pmt1Δhac1Δ* 菌株中 UPR 通路靶基因的表达水平无明显变化。结果说明缺失 *PMT1* 基因不能上调 *hac1Δ* 菌株中 UPR 靶基因的表达水平, 因此, 提示 *pmt1Δhac1Δ* 菌株中 UPR 通路可能无活性(图 3)。

3 讨论

细胞应激反应与寿命之间存在着较为复杂的关系, 长寿命细胞系通常对某些应激因素表现出抗性, 却对另外一些表现出敏感性^[8-10]。研究发现大

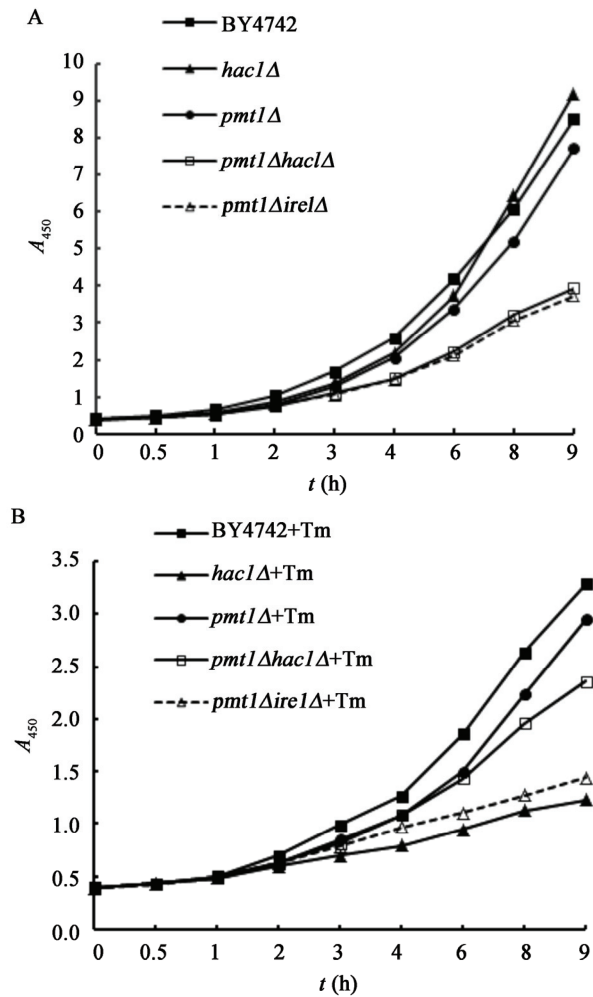


图 2 酵母菌株的细胞增殖活性

Figure 2 The proliferation activity of the yeast strains

注: A: BY4742、*hac1Δ* 菌株、*pmt1Δ* 菌株、*pmt1Δire1Δ* 菌株和 *pmt1Δhac1Δ* 菌株在无衣霉素条件下的生长曲线; B: 含 0.5 g/L 衣霉素培养条件下的生长曲线。

Note: The cell proliferation activity of BY4742, *hac1Δ*, *pmt1Δ*, *pmt1Δire1Δ* and *pmt1Δhac1Δ* strains without (A) or with 0.5 g/L tunicamycin (Tm) treatment (B).

部分长寿命酵母菌株会对衣霉素诱导的内质网应激(ERS)存在抗性^[10], 小部分长寿命菌株或者细胞系对 ERS 诱导剂敏感^[9-10]。目前认为, 适当的应激反应可以诱导细胞产生应激耐受, 延长寿命, 然而, 过强的应激将加速细胞衰老。研究者们把这种应激与寿命之间的关系归因为“毒物兴奋”效应在衰老调控中的作用^[11]。

酿酒酵母 Pmt1p-Pmt2p 异聚体是 PMT 家族中

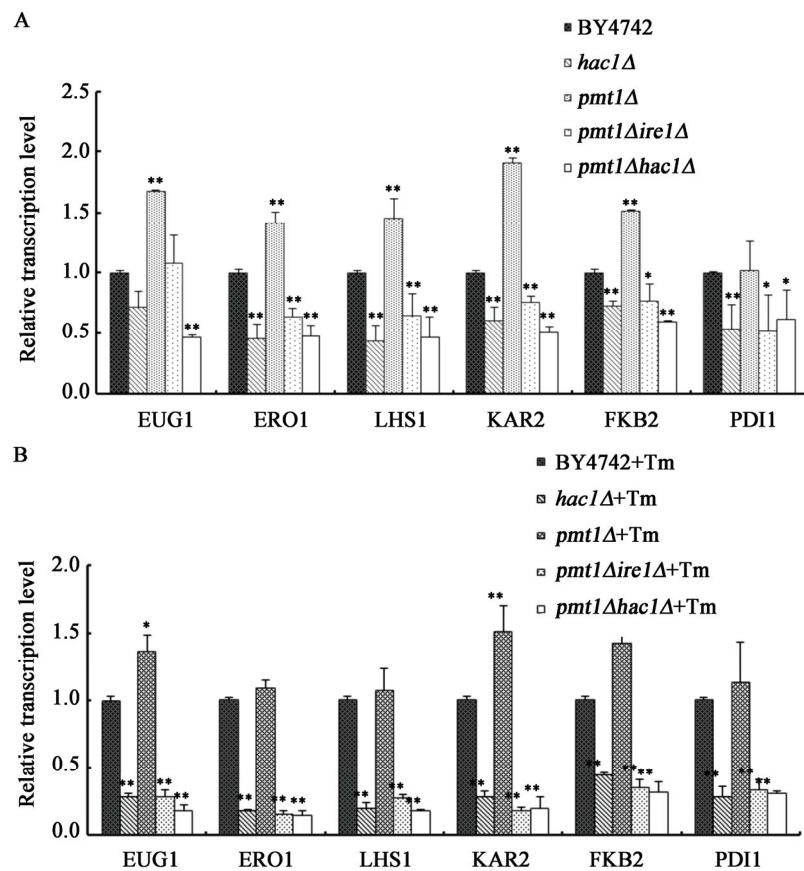


图3 酵母菌株的 UPR 靶基因转录水平

Figure 3 The expression levels of UPR target genes in yeast strains

注：A：BY4742、*hac1Δ*、*pmt1Δ*、*pmt1Δire1Δ*和*pmt1Δhac1Δ*菌株在无衣霉素培养条件下 UPR 靶基因的转录水平；B：含 2 g/L 衣霉素培养条件下 UPR 靶基因的转录水平。数据表示为均值±标准差($n=4$)；*： $P<0.05$ ；**： $P<0.01$ vs BY4742。

Note: The relative mRNA expression levels of UPR target genes were measured by quantitative RT-PCR without (A) or with 2 g/L tunicamycin (Tm) treatment (B) for BY4742, *hac1Δ*, *pmt1Δ*, *pmt1Δire1Δ* and *pmt1Δhac1Δ* strains; Columns, mean of 4 independent experiments ($n=4$); bars, SEM. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$, compared to the BY4742 strain.

功能研究较为清楚的二聚体，参与内质网蛋白质的糖基化修饰，调控内质网蛋白质的动态平衡^[4,12]。*PMT1* 与 *PMT2* 双基因缺失可激活未折叠蛋白质反应(UPR)通路^[13]，同时，UPR 活性也可影响 *PMT1*、*PMT2*、*PMT3* 和 *PMT5* 基因的表达水平^[14]。最近本课题组研究表明长寿命 *pmt1Δ* 菌株中的 UPR 活性增强^[5]，但是，*pmt1Δ* 菌株对 ERS 应激能力的研究未见报道。为探讨 *PMT1* 基因缺失在酵母 ERS 反应中的作用，通过观察酵母菌株在 ERS 反应条件下的克隆形成能力和细胞增殖活性，结果显示长寿命 *pmt1Δ* 菌株在 ERS 反应条件下细胞生长较慢，形成

较小克隆，对衣霉素的抗性略有减弱，但是，其在无衣霉素生长条件下的生长状态没有受到影响。推测原因可能是药物应激刺激之后，*pmt1Δ* 菌株中 ERS 反应水平过高，已超出细胞可承受的范围，扰乱了内质网蛋白质的动态平衡，对细胞造成一定的生理毒性。美国 Keabberlein 课题组研究报道，长寿命酵母菌株 *afg3Δhac1Δ* 在含低浓度衣霉素营养平板上可生长，而在含高浓度衣霉素平板上不能存活^[10]，这也表明过强的 ERS 反应影响细胞的存活。

为进一步探讨 ERS 应激能力与 UPR 活性之间的关系，通过研究双基因缺失菌株(*pmt1Δhac1Δ*和

pmt1Δire1Δ)对衣霉素的抗性能力和 UPR 靶基因的转录水平,结果显示在无衣霉素抗性的 *hac1Δ*菌株基础上,进一步缺失 *PMT1* 基因能增强其对 ERS 诱导剂的抗性,但不改变 *hac1Δ*菌株中 UPR 靶基因的表达水平。因此,推测 *pmt1Δhac1Δ*菌株对 ERS 诱导剂衣霉素产生抗性不依赖已知的 UPR 通路。目前,也有研究人员提出 UPR 通路不是调控酵母 ERS 反应的唯一通路^[15-17]。例如:基因芯片筛选发现 *SIN4* 等位基因的改变能恢复 *ire1Δ*菌株的 UPR 活性,提示存在着不依赖 *IRE1* 或 *HAC1* 基因的 ERS 反应转录激活机制^[15-16]。另外, *ire1Δ*菌株中 *HAC1* mRNA 表达量增加,这称为超 UPR (Super-UPR, S-UPR)^[15]。已有研究报道内质网膜扩张可增加未折叠蛋白质的折叠空间,减轻 ERS 压力;并且,内质网膜的明显扩张是不依赖 UPR 通路的^[17]。基于以上文献报道,推测 *pmt1Δhac1Δ*菌株对 ERS 诱导剂衣霉素产生抗性可能是通过 S-UPR 或内质网膜扩张等其它未知通路调控的。

综上,缺失 *PMT1* 基因不能上调 *hac1Δ*菌株中 UPR 通路保护性靶基因的表达,但可以增强 *hac1Δ*菌株对 ERS 诱导剂衣霉素的抗性,这提示经典的 UPR 通路不是调控 ERS 反应的唯一途径,这为深入研究 UPR 通路和 ERS 反应提供了新的线索。

致谢:感谢美国华盛顿大学 Matt Keabnerle 博士和美国 BUCK 衰老研究所 Brian K Kennedy 博士赠送 BY4742 菌株,及在酵母实验技术方面给予的精心指导。

参 考 文 献

- [1] Wu HX, Ng BSH, Thibault G. Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans[J]. Bioscience Reports, 2014, 34(4): e00118
- [2] Gardner BM, Pincus D, Gotthardt K, et al. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2013, 5(3): a013169
- [3] Lengeler KB, Tielker D, Ernst JF. Protein-O-mannosyltransferases in virulence and development[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008, 65(4): 528-544
- [4] Goder V, Melero A. Protein O-mannosyltransferases participate in ER protein quality control[J]. Journal of Cell Science, 2011, 124(Pt 1): 144-153
- [5] Cui HJ, Liu XG, McCormick M, et al. *PMT1* deficiency enhances basal UPR activity and extends replicative lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. AGE, 2015, 37: 46
- [6] Moslehi A, Nabavizadeh F, Dehpour AR, et al. Naltrexone attenuates endoplasmic reticulum stress induced hepatic injury in mice[J]. Acta Physiologica Hungarica, 2014, 101(3): 341-352
- [7] Zhao W, Zheng HZ, Niu YJ, et al. *CIA2* deficiency results in impaired oxidative stress response and enhanced intracellular basal UPR activity in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2015. DOI: 10.1093/femsle/fnv013
- [8] Harper JM, Salmon AB, Leiser SF, et al. Skin-derived fibroblasts from long-lived species are resistant to some, but not all, lethal stresses and to the mitochondrial inhibitor rotenone[J]. Aging Cell, 2007, 6(1): 1-13
- [9] Salmon AB, Akha AAS, Buffenstein R, et al. Fibroblasts from naked mole-rats are resistant to multiple forms of cell injury, but sensitive to peroxide, ultraviolet light, and endoplasmic reticulum stress[J]. Journals of Gerontology Series A Biological Sciences and Medical Sciences, 2008, 63(3): 232-241
- [10] Delaney JR, Ahmed U, Chou AN, et al. Stress profiling of longevity mutants identifies Apg3 as a mitochondrial determinant of cytoplasmic mRNA translation and aging[J]. Aging Cell, 2013, 12(1): 156-166
- [11] Salminen A, Kaarniranta K. ER stress and hormetic regulation of the aging process[J]. Ageing Research Reviews, 2010, 9(3): 211-217
- [12] Xu CC, Wang SY, Thibault G, et al. Futile protein folding cycles in the ER are terminated by the unfolded protein O-mannosylation pathway[J]. Science, 2013, 340(6135): 978-981
- [13] Arroyo J, Hutzler J, Bermejo C, et al. Functional and genomic analyses of blocked protein O-mannosylation in baker's yeast[J]. Molecular Microbiology, 2011, 79(6): 1529-1546
- [14] Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, et al. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation[J]. Cell, 2000, 101(3): 249-258
- [15] Leber JH, Bernales S, Walter P. *IRE1*-independent gain control of the unfolded protein response[J]. PLoS Biology, 2004, 2(8): e235
- [16] Schröder M, Clark R, Kaufman RJ. *IRE1*- and *HAC1*-independent transcriptional regulation in the unfolded protein response of yeast[J]. Molecular Microbiology, 2003, 49(3): 591-606
- [17] Schuck S, Prinz WA, Thorn KS, et al. Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response[J]. The Journal of Cell Biology, 2009, 187(4): 525-536