

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.31.018

DRE2 基因参与酵母内质网应激调控机制的初步研究*

赵 炜¹, 牛宇杰¹, 袁 源¹, 刘新光^{1,2△}

(1. 广东医学院衰老研究所/广东省医学分子诊断重点实验室, 广东东莞 523808;

2. 广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 广东湛江 524023)

摘要:目的 初步研究 DRE2 基因在抗肿瘤药物衣霉素诱导的内质网应激中的作用机制。方法 以质粒 pRS306 为模板, 通过 PCR 扩增含有 URA3 开放阅读框的 DRE2 基因破坏元件 *der2::URA3*, 然后利用基因重组原理, 构建 DRE2 基因杂合缺失酵母菌株, 并进一步检测其对衣霉素的抗性和复制寿命。结果 相对于野生型菌株, DRE2 基因杂合缺失酵母菌株对衣霉素的抗性增高, 复制寿命缩短 ($P < 0.05$)。结论 DRE2 基因可能参与了酵母内质网应激和衰老的调控。

关键词: DRE2; 酵母; 内质网应激

中图分类号: Q255

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)31-4172-03

The role of *saccharomyces cerevisiae* DRE2 in endoplasmic reticulum stress response*

Zhao Wei¹, Niu YuJie¹, Yuan Yuan¹, Liu Xinguang^{1,2△}

(1. Institute of Aging Research, Guangdong Medical College/Key Laboratory for Medical Molecular

Diagnostics of Guangdong Province, Dongguan, Guangdong 523808, China; 2. Institute of

Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524023, China)

Abstract: Objective To study the role of *saccharomyces cerevisiae* DRE2 in endoplasmic reticulum response induced by tunicamycin. **Methods** The *der2::URA3* gene deletion cassette was amplified from the wild type genomic DNA by PCR; DRE2 deficiency heterozygote strain was made by gene recombination. The heterozygote strain resistant ability to tunicamycin and the replicative lifespan were analyzed in this study. **Results** DRE2 deficiency strain was resistant to tunicamycin, but the replicative lifespan was decreased compared to wild type strain ($P < 0.05$). **Conclusion** DRE2 may be involved in the yeast endoplasmic reticulum response and replicative lifespan regulation.

Key words: DRE2; *saccharomyces cerevisiae*; endoplasmic reticulum response

DRE2 从酵母到人类都很保守, 它的蛋白结构中含有铁硫簇, 因此被划分为铁硫蛋白^[1]。铁硫蛋白具有广泛的生理功能, 例如参与电子呼吸链中的电子传递, 催化三羧酸循环, 参与 DNA 修复和神经系统的发育等^[2]。DRE2 是细胞质铁硫簇组装机器 (cytosolic iron-sulfur cluster assembly, CIA) 复合体的成员之一。酵母 DRE2 人类的同源蛋白是 CIAPIN1 (cytokine-induced apoptosis inhibitor 1), 具有抗凋亡的作用, 研究发现在一些对抗肿瘤药物具有抗性的细胞系中 CIAPIN1 呈现高表达状态^[3]。

酵母 DRE2 主要位于细胞质和线粒体内膜上, DRE2 基因缺失酵母菌株表现出致死的表型, 在氧化应激条件下, DRE2 和 TAH18 可以形成蛋白质复合体, 共同参与维持线粒体的完整性和生存^[4-5]。本文利用二倍体酵母作为研究对象, 构建 DRE2 基因杂合缺失酵母菌株, 发现 DRE2 基因杂合缺失酵母菌株对抗肿瘤药物衣霉素表现出抗药性, 并且初步研究了其分子机制。为全面研究 DRE2 基因功能和内质网应激机制奠定了基础。

1 材料与与方法

1.1 材料 野生型二倍体酵母菌株 BY4743、载体 pRS306 由美国华盛顿大学 Matt Kaeberlein 博士赠送。La tap 酶 (货号

RR02MA) 购自 Takara 公司; 引物合成、测序由英骏生物科技有限公司完成; 其他常规试剂为本实验保存。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 DRE2-URA-F: 5'-ACA TTT GAT CTA AGC ATA TAC ACT GTA AGT GAA GGT ATC GAG ATT GTA CTG AGA GTG CA-3'; DRE2-URA-R: 5'-AGA CCA ATT GAC GTC ATT TAC TGA AAC GAA TGT GCA GGG TCT GTG CGG TAT TTC ACA CCG-3'; DRE2-F: 5'-TCT CGG GGG TAT GAT GGA CT-3'; DRE2-F: 5'-ACA TCA AAA GGC CTC TAG GTT CC-3'。

1.2.2 DRE2 基因破坏元件的扩增 以质粒 pRS306 作为 PCR 模板, DRE2-URA-F、DRE2-URA-R 为引物, 扩增含有 URA3 开放阅读框的破坏元件, 全长为 1 232 bp。Taq 酶采用的是 La tap, 反应体系按照试剂说明书进行, PCR 反应条件为 94 °C 1 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 33 个循环; 72 °C 5 min。

1.2.3 DRE2 基因缺失酵母菌株的构建 将 DRE2 基因破坏元件转化进野生型酵母 BY4743, 通过基因重组原理替换掉野生型酵母基因组上的 DRE2 基因^[6]。利用 URA 缺陷型培养基筛选阳性克隆。酵母感受态的制备和转化方法参考分子克

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31101051); 广东医学院博士启动项目 (B2012061)。作者简介: 赵炜 (1981—), 助理研究员, 博士, 主要从事细胞增殖与衰老的分子机制研究。△ 通讯作者, Tel: (0769) 22896425; E-mail: xgliu64@126.com。

隆进行^[7]。阳性克隆在液体 URA 缺陷型培养基中培养过夜,提取基因组后通过 PCR 鉴定,鉴定引物为 DRE2-F、DRE2-R, Taq 酶采用的是 La tap, PCR 反应条件为 94 ℃, 1 min; 94 ℃, 30 s, 58 ℃, 30 s, 72 ℃, 2 min, 35 个循环; 72 ℃, 5 min。

1.2.4 DRE2 基因缺失酵母菌株的克隆形成实验 取等量吸光度(A)值处于对数生长期的野生型菌株和 DRE2 基因缺失酵母菌株,用无菌水倍比稀释之后,分别取 5 μL 滴在 YPD 固体培养板和含 2 μmol/L 衣霉素的 YPD 固体培养板上,然后置于 30 ℃ 恒温培养箱中培养至克隆形成,实验结果重复 3 次。

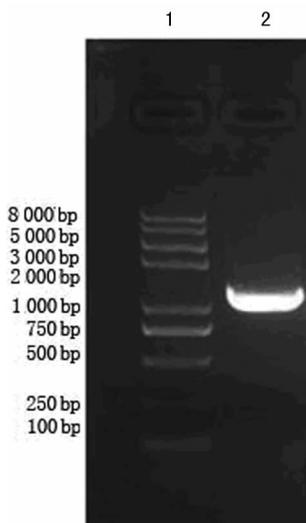
1.2.3 DRE2 基因缺失酵母菌株复制寿命的检测 酵母复制寿命的检测分析方法按照文献[8-9]的方法进行,在显微镜下分离、统计酵母母细胞产生子细胞的个数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,酵母复制寿命结果以平均数表示,采用 Wilcoxon 秩和检验方法进行统计学分析,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DRE2 基因破坏元件的扩增结果 DRE2 基因破坏元件全长为 1 232 bp, PCR 扩增产物大小经过琼脂糖凝胶电泳确认正确,见图 1。

2.2 DRE2 基因缺失酵母菌株的鉴定 DRE2 基因被 URA3 替换之后,利用位于 DRE2 基因编码区外侧的 1 条鉴定引物和位于 URA3 内部的 1 条引物可以将野生型菌株(因为无 URA3 替换原件,所以无扩增片段)和 DRE2 基因缺失酵母菌株(1 428 bp)区分,见图 2。

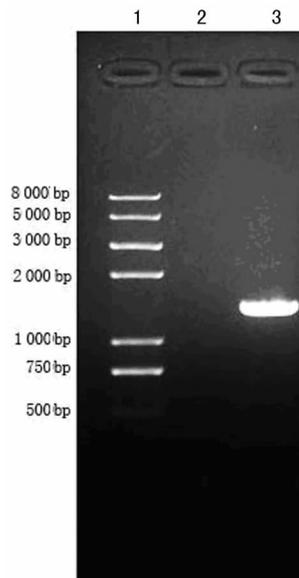


1: Marker; 2: PCR 产物。

图 1 DRE2 基因破坏元件的扩增结果

2.3 DRE2 基因缺失菌株对衣霉素抗性的检测 衣霉素是一种经典的内质网应激诱导剂,本研究发现 DRE2 基因杂合缺失酵母菌株在添加了 2 μmol/L 衣霉素的 YPD 固体培养基上的克隆形成能力显著高于野生型酵母菌株(实验结果重复 3 次),见图 3。

2.4 DRE2 基因缺失菌株复制寿命的测定 本研究同时检测了野生型酵母菌株和 DRE2 基因杂合缺失酵母菌株的复制寿命(图 4),结果显示:两者平均寿命分别是 34、29 代,DRE2 基因杂合缺失酵母菌株的复制寿命相对野生型菌株缩短了 14.7%,差异有统计学意义($P<0.05$)。



1: Marker; 2: 野生型酵母基因组 PCR 结果; 3: DRE2 基因缺失菌株的 PCR 结果。

图 2 PCR 鉴定 DRE2 基因缺失酵母菌株

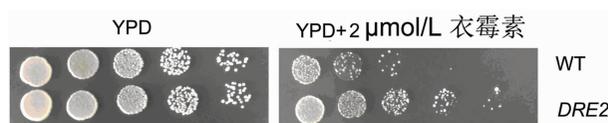
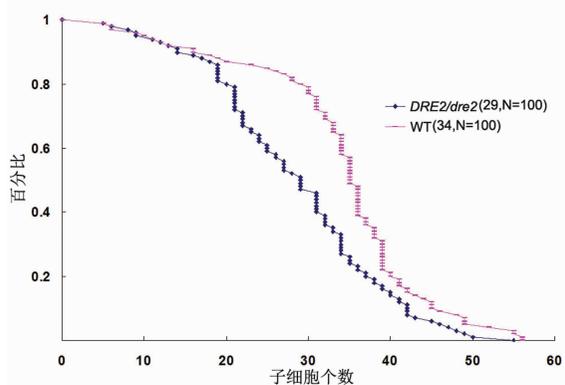


图 3 酵母菌株对衣霉素抗性的检测



横坐标:母细胞产生的子细胞个数;纵坐标:产生相同数目子细胞的母细胞占总检测母细胞的比例。

图 4 酵母菌株复制寿命的检测

3 讨论

酿酒酵母是简单的单细胞生物,遗传背景清晰,易培养、生活周期短,因此成为研究基因功能的重要模式生物,被广泛应用于药物筛选、衰老等研究领域^[10]。

衣霉素是一种天然的核苷抗菌药物,可以阻碍内质网内新生蛋白质糖基化修饰,造成内质网中未折叠蛋白质蓄积,最终导致细胞的坏死或者凋亡。内质网中未折叠或错误折叠的蛋白质堆积于内质网内,会激发细胞保护性的应答反应,即内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS),也称为未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)。适度的内质网应激能降低细胞内的蛋白质合成水平,促进蛋白质的正确折叠,或者使错误折叠的蛋白降解,起到保护细胞的作用。但过度的应激反应会激活相应的凋亡调节因子^[11-12]。衣霉素作为经典的

内质网应激诱导剂,在许多实验中已经被证实可以与多种抗肿瘤药物联合运用,诱导肿瘤细胞凋亡,但是具体的分子机制还不甚明了^[13-14]。

本研究发现,*DRE2* 基因杂合缺失酵母的菌落形成能力明显大于野生型,表明 *DRE2* 基因杂合缺失酵母对衣霉素的抗性明显高于野生型菌株,暗示 *DRE2* 很可能参与内质网应激的调节,可能在内质网应激中起负调控作用。

研究表明,内质网应激反应会随着细胞衰老而发生一些改变,导致或者加剧细胞衰老的进程^[15]。为了进一步研究 *DRE2* 基因杂合缺失酵母在含有衣霉素的固体培养基上的菌落形成能力大于野生型是否与其复制寿命(指一个酵母细胞在死亡之前所能分裂增殖的次数,即产生子细胞的个数)有关,本研究检测了两者的复制寿命,结果显示:*DRE2* 基因缺失酵母菌株的复制寿命明显低于野生型菌株,表明 *DRE2* 基因杂合缺失酵母对衣霉素的抗性增加不依赖于其复制寿命。

综上所述,*DRE2* 基因可能作为酵母内质网应激的负调控因子,调节细胞内质网的未折叠蛋白反应,同时参与酵母的复制寿命的调控。这对于进一步研究内质网应激机制,揭示衣霉素的抗肿瘤作用机制提供了有益借鉴。

参考文献:

- [1] Zhang Y, Lyver ER, Nakamaru-Ogiso E, et al. *DRE2*, a conserved eukaryotic Fe/S cluster protein, functions in cytosolic Fe/S protein biogenesis[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(18):5569-5582.
- [2] Beinert H, Holm RH, Munck E. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures [J]. *Science*, 1997, 277(5326):653-659.
- [3] Hao Z, Li X, Qiao T, et al. *CIAPIN1* confers multidrug resistance by upregulating the expression of *MDR-1* and *MRP-1* in gastric cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(3):261-266.
- [4] Netz DJ, Stümpfig M, Doré C, et al. *Tah18* transfers electrons to *DRE2* in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis [J]. *Nat Chem Biol*, 2010, 6(10):758-765.

- [5] Vernis L, Facca C, Delagoutte E. A newly identified essential complex, *DRE2-Tah18*, controls mitochondria integrity and cell death after oxidative stress in yeast[J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(2):e4376.
- [6] 方炳雄, 赵炜, 崔红晶, 等. 酿酒酵母寿命的研究方法及进展[J]. *国际老年医学杂志*, 2013, 34(1):28-34.
- [7] 奥斯伯, 布伦特, 金斯顿, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京:科学出版社, 2005:577-578.
- [8] Steffen KK, Kennedy BK, Kaerberlein M. Measuring replicative life span in the budding yeast[J]. *J Vis Exp*, 2009 (28):1209.
- [9] 赵炜, 刘依娜, 牛宇杰, 等. 酿酒酵母 *Nar1p* 参与寿命调控机制的初步研究[J]. *海南医学院学报*, 2014, 20(3):293-296.
- [10] Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span—from yeast to humans [J]. *Science*, 2010, 328(5976):321-326.
- [11] Wu J, Kaufman RJ. From acute ER stress to physiological roles of the unfolded protein response[J]. *Cell Death Differentiation*, 2006, 13(3):374-384.
- [12] Lee J, Ozcan U. Unfolded Protein Response Signaling and Metabolic Diseases[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(3):1203-1211.
- [13] Hiss DC, Gabriels GA, Folb PI. Combination of tunicamycin with anticancer drugs synergistically enhances their toxicity in multidrug-resistant human ovarian cystadenocarcinoma cells[J]. *Cancer Cell Int*, 2007, 7(5):1-14.
- [14] Huong PT, Moon DO, Kim SO, et al. Proteasome inhibitor-I enhances tunicamycin-induced chemosensitization of prostate cancer cells through regulation of NF- κ B and CHOP expression[J]. *Cell Signal*, 2011, 23(5):857-865.
- [15] 常乐, 丛羽生. 内质网应激反应与衰老相关疾病[J]. *北京师范大学学报:自然科学版*, 2010, 46(4):435-439.

(收稿日期:2014-04-11 修回日期:2014-07-16)

(上接第 4171 页)

- [10] Zhao J, Qi R, Li R, et al. Protective effects of aspirin against oxidized LDL-induced inflammatory protein expression in human endothelial cells[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2008, 51(1):32-37.
- [11] Orr AW, Hahn C, Blackman BR, et al. p21-activated kinase signaling regulates oxidant-dependent NF- κ B activation by flow[J]. *Circ Res*, 2008, 103(6):671-679.
- [12] Kaneko H, Anzai T, Morisawa M, et al. Resveratrol prevents the development of abdominal aortic aneurysm through attenuation of inflammation, oxidative stress, and neovascularization[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 217(2):350-357.
- [13] 申严, 戴爱国. γ -GCS 的信号传导与慢性阻塞性肺疾病[J]. *国外医学:内科学分册*, 2004(6):260-263.

- [14] Decraene D, Smaers K, Gan D, et al. A synthetic superoxide dismutase/catalase mimetic (EUK-134) inhibits membrane-damage-induced activation of mitogen-activated protein kinase pathways and reduces p53 accumulation in ultraviolet B-exposed primary human keratinocytes[J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 122(2):484-491.
- [15] Park JY, Cho HY, Kim JK, et al. *Chlorella* dichloromethane extract ameliorates NO production and iNOS expression through the down-regulation of NF- κ B activity mediated by suppressed oxidative stress in RAW 264.7 macrophages[J]. *Clin Chim Acta*, 2005, 351(1/2):185-196.

(收稿日期:2013-04-10 修回日期:2014-07-22)