

## 在全基因组范围内筛选酵母中砷抗性相关基因\*

杜丽<sup>1,2)</sup> 张新宇<sup>1,3)</sup> 虞甬<sup>1,2)</sup> 陈静思<sup>1,2)</sup>

刘艳<sup>1,2)</sup> 夏永静<sup>1,2)</sup> 刘湘军<sup>1,2,3)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup>清华大学医学院, 北京 100084; <sup>2)</sup>清华大学生物科学与技术系, 北京 100084;

<sup>3)</sup>清华大学生物信息学教育部重点实验室, 北京 100084)

**摘要** 砷化物是广泛应用的抗癌药物,特别是对白血病有显著疗效.然而,治疗过程中病人会因对砷化物具有耐药性而影响治疗效果,而目前对于砷抗性机制尚缺全面深入的研究.利用酵母作为模式生物,使用不同浓度的砷对由 4 757 个酵母缺失型突变体组成的菌株库进行筛查.共鉴定出 104 个基因/开放阅读框(ORF),其缺失导致酵母对砷的抗性增加.生物信息学分析结果提示,这些基因与 mRNA 分解代谢、应激反应、组蛋白乙酰化和蛋白质合成及分解代谢等功能有关.同时这些基因中多于半数具有哺乳动物同源类似物.所以,进一步研究这些基因有望为人类砷化物的耐药性及毒性机制研究提供富有价值的新线索.

**关键词** 砷化物, 筛选, 酵母, 表型, 抗性

**学科分类号** Q75, R73

虽然砷是一种有毒的类金属,但它同时也是被广泛使用的药物.临床实验表明,砷对急性早幼粒性白血病有显著的治疗效果,对复发、难治病例亦有良好疗效,并且其副作用不明显.然而,有的病人在治疗过程中会产生耐受<sup>[1]</sup>.迄今,细胞对砷抗性的产生机制还不十分清楚,有待深入研究.有研究报道认为,在哺乳动物细胞中存在的多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein 1, MRP1)以谷胱甘肽依赖的方式向胞外转运三价砷,故 MRP1 可以导致细胞对砷的抗性<sup>[2]</sup>.此外,PI3K-Akt 信号转导通路是膜受体信号向细胞内转导的重要途径之一,此通路也被报道与砷抗性相关<sup>[3]</sup>.

近年来,真核模式生物酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的砷抗性机制也引起了一些研究人员的关注.酵母中砷的抗性主要由 3 个基因来调控:ARR1, ARR2 和 ARR3<sup>[4]</sup>.其中,ARR1 编码一个属于 Yap 家族的转录因子<sup>[5]</sup>,参与亚砷酸盐诱导的 ARR2 和 ARR3 的表达<sup>[4]</sup>.在胞质中,砷酸盐被砷酸盐还原酶 Arr2p 还原成亚砷酸盐<sup>[6]</sup>,而后立即被 Arr3p 排出胞外<sup>[7]</sup>.人多药耐药相关蛋白的酵母类似物 Ycf1p 参与亚砷酸盐的转运<sup>[8]</sup>.甘油通道蛋白 Fps1p 调节亚砷酸盐的吸收, FPS1

缺失型菌株表现出对砷的抗性<sup>[9]</sup>.这些研究将某些基因与砷抗性联系在一起,但是缺少对于全基因组范围内砷抗性相关的基因和信号通路的全面认识.

本研究利用酵母基因缺失型突变体组成的菌株库,对基因组范围内的砷抗性相关基因进行筛查.并对筛查的结果进行了生物信息学分析,将这些耐药基因进行归纳、分类,试图通过其在哺乳动物类似物的推断,为了解砷剂耐药性和毒性的机制提供实验基础.

### 1 材料与方法

#### 1.1 酵母菌株库及其培养条件

本实验中用到的酵母菌株库是由 Invitrogen 公司购买的.它是以 BY4743 (MATa/MATa' his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/+ met15Δ0/+ ura3Δ0/ura3Δ0)为背景的,由 4 757 个缺失型菌株组成的菌株库.其中每个开放阅读框(ORF)被 KanMX 基因置换,形成了一个基因缺失型菌株.所

\* 国家教育部重点项目(104232),国家教育部跨世纪人才基金和清华裕元医学科学基金资助项目.

\*\* 通讯联系人. Tel: 010-62792997, E-mail: frankliu@tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2007-02-08, 接受日期: 2007-06-28

用菌株均于 30℃ 培养于 YPD 培养基中. YPD 培养基的组成: 1% 酵母提取物(yeast extract), 2% 蛋白胨(peptone)和 2% 葡萄糖(dextrose), 如需配制固体培养基, 再加 2% 琼脂.

## 1.2 菌株库的筛选

我们参考 Huang 等<sup>[10]</sup>建立的一步筛选法对缺失型菌株库进行筛选. 简而言之, 就是把适当浓度的缺失型菌株库的菌液 (总计约 100 000 个菌) 涂布到含有 3 mmol/L 亚砷酸钠的 YPD 平板上. 使用 3 mmol/L 的亚砷酸钠作为筛选浓度是因为此浓度对于野生型酵母而言是致死浓度. 在 30℃ 培养 2 天后观察对 3 mmol/L 亚砷酸钠有抗性的克隆.

## 1.3 克隆鉴定

酵母基因组敲除项目在构建每个突变菌株时均插入了一段 UPTAG 标签序列. 这样使得每个菌株都具有独特的标签序列, 更加便于识别. 我们首先提取各抗性克隆的基因组 DNA, 然后以各抗性克隆提取得到的 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增出含有 UPTAG 的一个 DNA 片段. 其中所使用的引物是通用引物 U1 (5' GATGTCCACGAGGTCTCT 3') 和 KanMX 引物 B (5' CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT 3'). 将扩增的 DNA 片段测序, 与酵母基因组敲除项目提供的 UPTAG 序列 (见 [http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast\\_deletion\\_project/strain\\_heterozygous\\_diploid.txt](http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/strain_heterozygous_diploid.txt)) 进行比对, 从而鉴定出各抗性克隆所缺失基因.

## 1.4 砷抗性的验证

我们从单独存放各缺失菌株的菌株库中逐个挑出鉴定出的可能有砷抗性的缺失型菌株, 以验证其抗性. 在 30℃ 下的液体培养基中培养至平台期. 菌液稀释为  $5 \times 10^6$ /ml 和  $5 \times 10^5$ /ml. 将 2  $\mu$ l 稀释液点在含 3 mmol/L, 5 mmol/L, 7 mmol/L 砷或不含砷的 YPD 平板上, 2 天以后观察生长状况. 每个菌株的点点实验均独立进行 2 次.

## 1.5 生物信息学分析

我们使用酵母基因组数据库(SGD) (<http://www.yeastgenome.org/>) 网站上提供的基因分类软件 GO Slim Mapper 将我们鉴定的基因按其参与的生化过程进行分类. 这个软件也是基于 Gene Ontology(GO) 分类的, 分类结果见表 1.

为了比较砷化物刺激下酵母菌株的表型和表达谱变化相关性, 我们使用芯片显著性分析(SAM)方法对已经报道的砷诱导酵母基因表达水平变化的芯片数据<sup>[11]</sup>重新进行了分析, 然后将差异表达基因与

我们筛选得到的抗性基因进行了比较.

为了更全面地了解我们筛选得到的基因之间的相互关系, 我们从酵母基因组数据库(SGD)下载了酵母蛋白与蛋白质和蛋白质与 DNA 等各种相互作用的数据集合, 其中共包含 65 536 个相互作用关系. 用 Perl 语言编写程序以识别相互作用数据和我们实验得到的表型数据中所共有的基因, 然后用 Graphviz 软件描绘出我们得到的抗性基因之间的相互作用关系, 并且基于 GO 将基因分成了几个相关联的功能区域.

## 2 结果与讨论

### 2.1 酵母砷抗性突变体的筛选、鉴定与验证

为了研究酵母中与砷抗性相关的基因和信号通路, 我们使用 Huang 等建立的“一步法”对由 4 757 个酵母缺失型突变体组成的菌株库进行筛查. 实验中, 观察到四百多个大小不同的抗性菌落, 我们挑选了其中较大的 227 个菌落进行鉴定. 经过扩增、测序和比对分析, 我们鉴定出 104 个基因/ORF. 我们从单独存放各缺失菌株的菌株库中逐个挑出鉴定的菌株, 用点点实验对其砷抗性进行了验证. 这样就排除了这些突变体在实验过程中发生突变而导致砷抗性的可能性. 这 104 个突变体均对 3 mmol/L 亚砷酸钠具有一定程度的抗性. 图 1 示部分验证实验结果, 突变体对应的 104 个基因/ORF

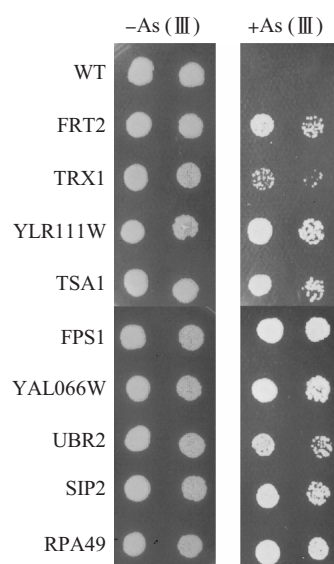


Fig. 1 Confirmation of arsenic resistance of individual deletion strains

Wild-type and deletion mutants were grown in liquid medium, and dilution of the cultures ( $1 \times 10^4$  and  $1 \times 10^3$ ) were spotted on YPD plate with or without 3 mmol/L arsenite as described in Materials and methods.

列在表 1 中. 此外, 我们还做了抗性梯度实验, 发现在这些突变菌株当中有 32 个突变菌株具有更强的抗性, 即这些菌株能抗 5 mmol/L 亚砷酸钠. 我们将这 32 个突变株及其对应的哺乳动物同源类似物列于表 2. 这 32 个突变菌株中有 5 个 (FPS1, TMA20, UPF3, YAL066W, YOR309C) 表现出更强的抗性, 即能抗 7 mmol/L 亚砷酸钠.

## 2.2 表型和表达谱的比较

在各种刺激的作用下许多基因的表达会发生变化, 同时某些基因的缺失又会导致对刺激的抗性. 因此, 我们对某一刺激下差异表达基因与同一条件下的抗性基因是否具有相关性进行了探询. 我们对前人报道的表达数据进行了重新分析, 并与我们的表型数据进行了比较. 在 104 个抗性基因中只有 13% 的基因 (如 NMD2, UPF3, SSB1, EAF7, UBR2, 和 TSA1 等) 表现出表达差异. 这种表达谱与表型之间缺乏直接关联的现象与前人报道一致<sup>[1]</sup>.

## 2.3 缺失导致砷抗性的基因的功能分类

前人也对酵母中砷相关的基因做过一些研究,

但是这些研究多是基于一个或几个特定的基因. 比如, 研究报道过缺失 ARR1、ARR3、YAP1 或 HOG1 会导致酵母对砷更加敏感<sup>[11~13]</sup>. 这些基因并没有出现在我们筛选出的基因列表中, 因为与上述基因不同, 我们筛选的是缺失导致砷抗性的基因. Wysocki 等<sup>[9]</sup>研究显示, FPS1 缺失会引起酵母细胞对砷产生抗性, 这个结果在我们的实验中得到了证实.

我们的研究是在基因组范围内砷抗性基因的筛选, 这有利于更全面地了解细胞对砷的反应. 根据 SGD 中的基因注释, 我们对筛选鉴定的基因进行了分类, 它们大部分属于几个特定生物过程, 如 mRNA 分解代谢、转录、应激反应和蛋白质合成等.

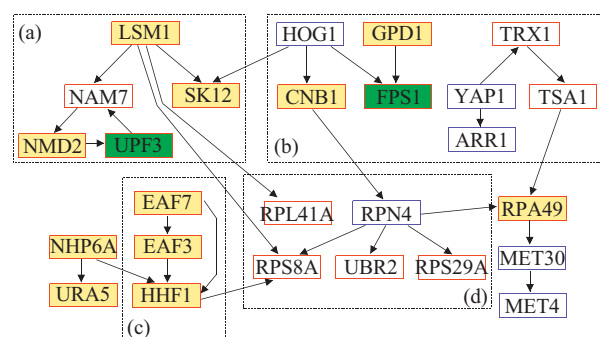
我们进一步将得到的砷抗性候选基因与 SGD 下载的 65 536 个蛋白质与蛋白质、蛋白质与 DNA 的相互作用数据进行比对与整合, 并基于 Gene Ontology(GO)对基因进行功能分类, 得出了 4 个相关联的区域 (图 2).

**Table 1 Major classes of genes/ORFs whose deletion causes resistance to 3 mmol/L arsenite**

| Gene classes                    | Observed genes                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Protein biosynthesis            | EBS1, NAM7, RPL12A, RPL15B, RPL20B, RPL41A, RPS11B, RPS29A, RPS6B, RPS8A, SKI2, SSB1, TMA20, YOR302W                                                                                                                                                                             |
| Transport                       | ATG20, BRE4, CDC50, FMP50, FPS1, PXA1, SIL1, SOL1, TIM18, TRX1, YIA6                                                                                                                                                                                                             |
| DNA metabolism                  | ASF2, CLB5, EAF3, EAF7, HHF1, MND2, NAM7, NHP6A, PAN2, RNR3, TRX1                                                                                                                                                                                                                |
| Response to stress              | ALD3, ASK10, FRT2, GPD1, PAN2, RHR2, SIP5, SIS2, TRX1, TSA1                                                                                                                                                                                                                      |
| RNA metabolism                  | LSM1, NAM7, NMD2, PAN2, SCD6, SKI2, SOL1, UPF3                                                                                                                                                                                                                                   |
| Protein modification/catabolism | DPH5, EAF3, EAF7, MND2, MNL1, RRI1, UBR2                                                                                                                                                                                                                                         |
| Transcription                   | ASF2, ASK10, EAF3, EAF7, NHP6A, RPA49                                                                                                                                                                                                                                            |
| Lipid metabolism                | CDC50, ERG5, IZH2, TGL4, YBR042C                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Cell wall                       | CNB1, ECM27, ECM8, FMP50, PST1                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Vesicle-mediated transport      | ATG20, BRE4, CDC50, FMP50, TRX1                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Cell cycle                      | CDC50, CLB5, MND2, SCM4, SIS2                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Vitamin metabolism              | CAT2, GPD1, NMA1                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Cytoskeleton                    | CLB5, FIN1, SIM1                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Others                          | ATG14, CYC7, HIS6, MCM22, MUB1, SSE2, URA5, YJL045W                                                                                                                                                                                                                              |
| Biological process unknown      | NCS6, JID1, TVP15, YAL066W, YDL023C, YDL162C, YDR417C, IRC4, YGL214W, YGL046W, YGR117C, YIL077C, YIL087C, YIL110W, YJL064W, YKR051W, YKR070W, YKR073C, YLR111W, YLR173W, YLR445W, YMR304C-A, YNL144C, YNL338W, YOR015W, YOR082C, IRC13, YOR309C, YPL014W, YPL150W, YPR076W, YPS7 |

**Table 2 Major classes of genes/ORFs whose deletion causes resistance to 5 mmol/L arsenite**

| Gene/ORF                   | Description of gene product                               | Resistance | Mammalian homology      |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------|------------|-------------------------|
| mRNA catabolism            |                                                           |            |                         |
| NMD2                       | Nonsense-mediated mRNA decay                              | +++        | UPF2                    |
| SKI2                       | RNA helicase activity                                     | +          | SKIV2L2                 |
| UPF3                       | Nonsense-mediated mRNA decay                              | ++++       | UPF3B                   |
| LSM1                       | RNA binding                                               | +          | LSM1                    |
| Response to osmotic stress |                                                           |            |                         |
| FPS1                       | Plasma membrane glycerol channel                          | ++++       | AQP9/AQP7/AQP3          |
| GPD1                       | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase                        | +++        | GPD1                    |
| Transcription              |                                                           |            |                         |
| ASK10                      | Component of the RNA polymerase II holoenzyme             | ++         | —                       |
| EA F3                      | Histone acetyltransferase activity                        | +          | MORF4L1/ MORF4L2/ARID4A |
| EA F7                      | Histone acetylation                                       | +          | MRGBP                   |
| NHP6A                      | Non-histone chromatin protein                             | +          | HMGB2/HMGB1/TFAM/HMGB3  |
| RPA49                      | RNA polymerase I subunit A49                              | ++         | PRAF1                   |
| HHF1                       | One of two identical histone H4 proteins                  | +          | HIST1H4A/HIST1H4G       |
| Protein biosynthesis       |                                                           |            |                         |
| EBS1                       | Negative regulation of translation                        | +          | SMG7                    |
| RPL12A                     | Protein component of 60S ribosomal subunit                | ++         | RPL12                   |
| RPL20B                     | Protein component of 60S ribosomal subunit                | +          | RPL18A                  |
| TMA20                      | Ribosome biogenesis                                       | +          | MCT-1                   |
| Others                     |                                                           |            |                         |
| CNB1                       | The regulatory subunit of calcineurin                     | +          | CIB1/CHP/CIB4/PPP3R1    |
| JID1                       | Probable Hsp40p co-chaperone                              | +          | —                       |
| MUB1                       | Regulation of cell budding                                | ++         | —                       |
| SCD6                       | RNA binding, RNA metabolism                               | +          | LSM14A/LSM14B           |
| SIS2                       | Phosphopantothenoylcysteine decarboxylase activity        | ++         | PPCDC                   |
| URA5                       | 'De novo' pyrimidine base biosynthesis                    | +          | UMPS                    |
| YPS7                       | Putative GPI-anchored aspartic protease                   | ++         | BACE2/CTSD/CTSE/ NAPSA  |
| Uncharacterized ORFs       |                                                           |            |                         |
| YAL066W                    | Hypothetical protein                                      | ++++       | —                       |
| YDL023C                    | Dubious, overlaps GPD1                                    | ++         | —                       |
| YDR417C                    | Hypothetical protein                                      | +          | —                       |
| YGL214W                    | Dubious, overlaps SKI8                                    | +          | —                       |
| YIL110W                    | Putative S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase | ++         | —                       |
| YKR073C                    | Dubious ORF unlikely to encode a protein                  | +          | —                       |
| YLR111W                    | Dubious ORF unlikely to encode a protein                  | +          | —                       |
| YOR309C                    | Hypothetical protein                                      | +++        | —                       |
| YPL150W                    | Hypothetical protein                                      | +          | —                       |



**Fig. 2 An overview of the network relationships between selected genes**

Genes whose deletion causes resistance to arsenic are marked with blue, and those which were reported to response to arsenic are marked with red. Genes whose deletion causes higher resistance are highlighted (5 mmol/L with yellow background and 7 mmol/L with green background). The selected genes were divided into four neighborhood based on Gene Ontology: (a) mRNA catabolism. (b) Response to stress. (c) Histone and its acetylation. (d) Protein biosynthesis and catabolism.

### 2.3.1 mRNA 分解代谢.

我们筛选到的砷抗性基因中有 5 个基因 (NAM7, NMD2, UPF3, LSM1 和 SKI2) 参与 mRNA 分解代谢. 其中, NAM7、NMD2 和 UPF3 属于无义介导的 mRNA 降解通路(NMD). 此代谢通路能够有选择性地迅速降解含有提前终止密码子的 mRNA, 避免或减少产生那些对细胞有害的 C 端截短蛋白质, 同时还可以对基因的整体表达水平起一定调控作用. Lsm1p 与 Lsm2p、Lsm3p、Lsm4p、Lsm5p、Lsm6p 和 Lsm7p 等形成复合物参与胞质当中 mRNA 的降解. Ski2p 与 Ski3p 及 Ski8p 形成的复合物则参与 mRNA 从 3' 端到 5' 端的降解. 我们发现, 缺失 mRNA 降解相关的其他基因如 NMD4、LSM6、LSM7、SKI3 或 SKI8 等也会导致酵母对砷的抗性, 说明这条通路很可能与砷抗性相关. Huang 等<sup>[10]</sup>的研究显示缺失 mRNA 分解相关的基因会引起酵母对其他化疗药物如顺铂、阿霉素和喜树碱等的抗性增加. 因此, mRNA 降解通路与砷及其他药物抗性的关系非常值得进一步的研究.

最近 Guan 等<sup>[14]</sup>的研究报道无义介导的 mRNA 降解通路也会作用于多药耐药相关蛋白. 多药耐药现象 (MDR) 是一种从酵母到人类都存在的一种保守的机制. 细胞可以通过这种机制排除威胁细胞生存的有毒有害的物质. 控制 MDR 的主要转录因子, 比如 PDR3、PDR8、RDR1 和 YRR1 等都是 NMD 通

路缺失菌株中表达量增高, 这可能是 NMD 通路相关基因缺失导致砷抗性的原因之一.

**2.3.2 应激反应.** 我们鉴定出的另一组基因是参与渗透压应激的某些基因, 包括 FPS1、GPD1 和 RHR2. FPS1 是在酵母细胞中介导无机砷转入的甘油水孔蛋白. 据报道它的缺失会使得酵母对砷具有抗性<sup>[9]</sup>, 这个结果与我们本实验的结果一致. 酵母 FPS1 与哺乳动物的甘油水孔蛋白 AQP9 是存在于不同物种的同源类似物, 酵母 Fps1p 运载能力受高渗透压甘油应答基因 HOG1 调节<sup>[13]</sup>. 研究表明, 人 AQP9 能在爪蟾细胞中运载三价砷<sup>[15]</sup>, 并且 AQP9 的表达可以调节白血病细胞的砷抗性<sup>[16]</sup>.

GPD1 (3-磷酸甘油脱氢酶) 和 RHR2 (甘油 -3-磷酸酶) 是甘油合成中 2 个重要的酶. 酵母中调节渗透胁迫的 HOG 途径对 GPD1 的表达起调控作用<sup>[17]</sup>. 而细胞内的甘油水平又可以反馈调节 HOG 信号通路<sup>[18]</sup>. 因此, 我们推测 GPD1 或 RHR2 缺失后造成的胞内甘油水平下降, 通过反馈调节 HOG 通路, 继而影响 FPS1 的对砷的转运活力, 从而导致酵母细胞对砷的抗性. 也有研究报道, 3-磷酸甘油脱氢酶能氧化有机砷, 同时释放亚砷酸盐, 这有可能造成细胞毒性<sup>[19]</sup>, 这篇报道为  $\Delta$ GPD1 的抗砷提供另一个可能的解释.

**2.3.3 组蛋白及其乙酰化.** 众所周知, 组蛋白乙酰化 / 去乙酰化通过影响染色质结构调节基因转录. 近年来研究人员还发现, 某些组蛋白去乙酰化抑制剂能通过调节组蛋白乙酰化水平来调控基因转录, 诱导恶性细胞分化或凋亡, 可能成为新的抗癌化疗药物. 我们的实验数据显示缺失 HHF1、EAF3 或 EAF7 会增大酵母细胞对砷的抗性. HHF1 是组蛋白 H4 的结构蛋白之一, 而 EAF3 和 EAF7 则是酵母细胞中组蛋白乙酰转移酶复合物 NuA 的组成部分. 前人研究显示, 在果蝇细胞中砷处理会诱导组蛋白乙酰化模式的改变<sup>[20]</sup>, 而在人髓细胞白血病细胞中砷处理会引起组蛋白 H3 和 H4 的超乙酰化<sup>[21]</sup>. 我们推测, 酵母细胞中砷处理也会影响组蛋白乙酰化水平, 继而影响某些基因的转录, 引起细胞生长抑制或细胞凋亡. 而组蛋白或其乙酰化相关基因的缺失使得砷失去了作用的靶标, 从而造成了细胞对砷的抗性. 砷处理以后组蛋白乙酰化的具体变化模式及组蛋白乙酰化水平改变后调控哪些基因的转录, 这些问题都值得进一步深入研究.

**2.3.4 蛋白质合成及分解代谢.** 在酵母核糖体的大小亚基中共有 78 种核糖体蛋白, 其中 59 种由复制

型基因编码. 本研究中我们发现 8 个复制型核糖体基因 (RPS6B、PS8A、RPS11B、RPL12A、RPS29A、RPL15B、RPL20B 和 RPL41A) 可能与酵母砷抗性相关, 因为这 8 个基因的缺失会导致酵母细胞对砷的抗性. 酵母与哺乳动物的核糖体蛋白存在高度相似性. 核糖体是蛋白质合成的主要场所, 同时也参与复制、转录和翻译的调控等<sup>[22]</sup>. 多项研究中, 编码核糖体蛋白的基因在肿瘤中出现高表达, 比如 RPS6 和 RPS8 在结肠癌<sup>[23]</sup>, RPL12A 和 RPS8A 在肝癌<sup>[24]</sup>, 及 RPL15 在食管癌<sup>[25]</sup>中均高表达. 有报道表明, RPL15 在甲基丙烯酸环氧丙酯诱导的人肺成纤维细胞的致瘤性转化时表达上调<sup>[26]</sup>. 此外, Khanna 等<sup>[27]</sup>的研究报道 PRS29 在肺癌细胞中的表达可以诱导细胞凋亡, 并且增大细胞对化疗药物鬼臼亚乙苷和顺铂的敏感性. 我们鉴定出的核糖体蛋白在酵母细胞乃至哺乳动物肿瘤细胞对砷或是其他化疗药物耐受性的形成机制, 应当成为今后核糖体蛋白研究的重要方向之一.

Tma20p 在翻译过程中起调控作用, TMA20 与人癌基因 MCT-1 具有高度同源性. 在 TMA20 缺失型酵母菌株  $\Delta$ tma20 中表达人 MCT-1 可以弥补翻译相关的缺陷, 说明 MCT-1 也在翻译相关的生化过程中发挥一定的作用<sup>[28]</sup>. 我们的实验显示 TMA20 缺失会导致酵母细胞对砷的抗性, 那么 TMA20 的人同源物 MCT-1 是否对于砷抗性也有影响值得进一步研究.

泛素-蛋白酶体途径是细胞内 ATP 依赖的非溶酶体蛋白降解机制, 在异常蛋白降解代谢过程中发挥重要作用<sup>[29]</sup>. 我们的实验表明, 泛素蛋白连接酶 UBR2 的缺失会增大酵母细胞对砷的抗性. Ubr2p 不仅在泛素与蛋白质底物结合中具有重要作用, 同时它还参与泛素依赖的 Rpn4p 降解. RPN4 是蛋白酶体重要的激活调控因子. 有研究报道, 适宜浓度的砷会降低蛋白酶体活力, 而泛素蛋白不能被蛋白酶体迅速有效地降解, 堆积在细胞内将会导致细胞生存能力的下降<sup>[30]</sup>. 根据以上结果, 我们对 UBR2 的缺失增大酵母砷抗性做出了可能的解释: UBR2 的缺失使 Rpn4p 降解减少, 而 Rpn4p 水平增加激活蛋白酶体相关基因的表达, 上升的蛋白酶体水平阻止了泛素化蛋白的堆积, 导致细胞生存能力的恢复.

**2.3.5 其他.** 除了上述几类基因之外, 细胞离子稳态相关的 CNB1、调节细胞出芽的 MUB1、参与核酸代谢的 URA5 等基因也会因其缺失造成细胞的

砷抗性. 此外, 我们发现筛选出的某些开放阅读框 (ORF) 与其他已知基因相互重叠. 比如 YDL023C 与 GPD1 基因存在部分重叠, 而 YGL214W 与 mRNA 分解代谢相关基因 SKI8 存在部分重叠. 这些具重叠部分的 ORF 是否因为其缺失造成与之重叠的基因部分缺失而引起砷抗性, 需要进一步验证.

## 2.4 小结

基因突变是肿瘤中常见的分子机制, 而化疗也可能导致某些基因突变. 这些突变可能会导致治疗过程中病人的肿瘤组织对某些药物的抗性. 了解药物的抗性机制有助于个体化医疗的实施. 酵母是非常有用的研究抗药性的细胞模型. 识别酵母突变后导致药物抗性的基因, 进而对这些基因的哺乳动物同源类似物进行进一步研究, 有助于揭示耐药机制, 为肿瘤的个性化治疗提供依据.

本研究中我们对由 4 757 个酵母缺失型突变体组成的菌株库进行筛查, 共鉴定出 104 个基因 / 开放阅读框 (ORF), 它们的缺失会导致酵母对砷的抗性增加. 这些被筛选和识别出的砷抗性基因当中有许多与人存在同源类似物. 对这些人同源类似物的研究必将有助于识别哺乳动物的砷中毒机理、抗性产生的机制. 总之, 本研究可为哺乳动物的砷耐药机制及其相关通路的识别提供一定的线索.

## 参 考 文 献

- 1 Soignet S L, Maslak P, Wang Z G, *et al.* Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med*, 1998, **339** (19): 1341~1348
- 2 Leslie E M, Haimeur A, Waalkes M P. Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *J Biol Chem*, 2004, **279** (31): 32700~32708
- 3 Tabellini G, Cappellini A, Tazzari P L, *et al.* Phosphoinositide 3-kinase/Akt involvement in arsenic trioxide resistance of human leukemia cells. *J Cell Physiol*, 2005, **202** (2): 623~634
- 4 Bobrowicz P, Ulaszewski S. Arsenical-induced transcriptional activation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ACR2 and ACR3 genes requires the presence of the ACR1 gene product. *Cell Mol Biol Lett*, 1998, **3** (1): 13~20
- 5 Fernandes L, Rodrigues-Pousada C, Struhl K. Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol Cell Biol*, 1997, **17** (12): 6982~6993
- 6 Mukhopadhyay R, Shi J, Rosen B P. Purification and characterization of ACR2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. *J Biol Chem*, 2000, **275** (28): 21149~21157
- 7 Wysocki R, Bobrowicz P, Ulaszewski S. The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *J Biol Chem*, 1997, **272** (48): 30061~30066

- 8 Ghosh M, Shen J, Rosen B P. Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, **96** (9): 5001~5006
- 9 Wysocki R, Chery C C, Wawrzycka D, *et al.* The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol, 2001, **40** (6): 1391 ~ 1401
- 10 Huang R, Eddy M, Vujcic M, *et al.* Genome-wide screen identifies genes whose inactivation confer resistance to cisplatin in *Saccharomyces cerevisiae*. Cancer Res, 2005, **65** (13): 5890~5897
- 11 Haugen A C, Kelly R, Collins J B, *et al.* Integrating phenotypic and expression profiles to map arsenic-response networks. Genome Biol, 2004, **5** (12): R95
- 12 Bobrowicz P, Wysocki R, Owsianik G, *et al.* Isolation of three contiguous genes, ACR1, ACR2 and ACR3, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1997, **13** (9): 819~828
- 13 Thorsen M, Di Y, Tangemo C, *et al.* The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. Mol Biol Cell, 2006, **17** (10): 4400~4410
- 14 Guan Q, Zheng W, Tang S, *et al.* Impact of nonsense-mediated mRNA decay on the global expression profile of budding yeast. PLoS Genet, 2006, **2** (11): 1925~1943
- 15 Liu Z, Shen J, Carbrey J M, *et al.* Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, **99** (9): 6053~6058
- 16 Bhattacharjee H, Carbrey J, Rosen B P, *et al.* Drug uptake and pharmacological modulation of drug sensitivity in leukemia by AQP9. Biochem Biophys Res Commun, 2004, **322** (3): 836~841
- 17 Albertyn J, Hohmann S, Thevelein J M, *et al.* GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. Mol Cell Biol, 1994, **14** (6): 4135~4144
- 18 Siderius M, Wuytswinkel O Van, Reijenga K A, *et al.* The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature. Mol Microbiol, 2000, **36** (6): 1381~1390
- 19 Mutenda E K, Sparkes M J, Dixon H B. Arsenite release on enzymic transformation of arsonomethyl substrate analogues: a potentially lethal synthesis by glycerol-3-phosphate dehydrogenase. Biochem J, 1995, **310** (3): 983~988
- 20 Arrigo A P. Acetylation and methylation patterns of core histones are modified after heat or arsenite treatment of *Drosophila* tissue culture cells. Nucleic Acids Res, 1983, **11** (5): 1389~1404
- 21 Perkins C, Kim C N, Fang G, *et al.* Arsenic induces apoptosis of multidrug-resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-x (L). Blood, 2000, **95** (3): 1014~1022
- 22 Wool I G. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. Trends Biochem Sci, 1996, **21** (5): 164~165
- 23 Pogue-Geile K, Geiser J R, Shu M, *et al.* Ribosomal protein genes are overexpressed in colorectal cancer: isolation of a cDNA clone encoding the human S3 ribosomal protein. Mol Cell Biol, 1991, **11** (8): 3842~3849
- 24 Kondoh N, Shuda M, Tanaka K, *et al.* Enhanced expression of S8, L12, L23a, L27 and L30 ribosomal protein mRNAs in human hepatocellular carcinoma. Anticancer Res, 2001, **21** (4A): 2429 ~ 2433
- 25 Wang Q, Yang C, Zhou J, *et al.* Cloning and characterization of full-length human ribosomal protein L15 cDNA which was overexpressed in esophageal cancer. Gene, 2001, **263** (122): 205 ~ 209
- 26 Yin X J, Xu J N, Zou C Q, *et al.* Genes differentially expressed in human lung fibroblast cells transformed by glycidyl methacrylate. Biomed Environ Sci, 2004, **17** (4): 432~441
- 27 Khanna N, Sen S, Sharma H, *et al.* S29 ribosomal protein induces apoptosis in H520 cells and sensitizes them to chemotherapy. Biochem Biophys Res Commun 2003, **304** (1): 26~35
- 28 Fleischer T C, Weaver C M, McAfee K J, *et al.* Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. Genes Dev, 2006, **20** (10): 1294~1307
- 29 Herskho A, Ciechanover A. The ubiquitin system. Annu Rev Biochem, 1998, **67**: 425~479
- 30 Kirkpatrick D S, Dale K V, Catania J M, *et al.* Low-level arsenite causes accumulation of ubiquitinated proteins in rabbit renal cortical slices and HEK293 cells. Toxicol Appl Pharmacol, 2003, **186** (2): 101~109

## Genome-wide Identification of Genes Whose Disruption Confer Resistance to Arsenic in *Saccharomyces cerevisiae*\*

DU Li<sup>1,2</sup>, ZHANG Xin-Yu<sup>1,3</sup>, YU Yong<sup>1,2</sup>, CHEN Jing-Si<sup>1,2</sup>,  
LIU Yan<sup>1,2</sup>, XIA Yong-Jing<sup>1,2</sup>, LIU Xiang-Jun<sup>1,2,3</sup>\*\*

(<sup>1</sup>School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

<sup>2</sup>Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

<sup>3</sup>Ministry of Education Key Laboratory of Bioinformatics, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract** Arsenic is highly effective in treating acute promyelocytic leukemia (APL), especially for relapsed patients. However, the treatment is highly affected by the resistance of the drug by patients, while the arsenic-resistance mechanism has not been well studied. A genome-wide screen was performed against a pool of 4 757 *Saccharomyces cerevisiae* mutants, each with one different gene individually deleted, to isolate genes that may mediate cellular resistance to arsenic. A one-step selection method was used. An aliquot of the pooled yeast library was plated on YPD agar plates supplemented with 3 mmol/L sodium arsenite. The genomic DNAs of the arsenic resistant strains were separately extracted, and amplified by PCR to get DNA fragments with UPTAG. The corresponding deleted genes were identified by comparing the PCR-amplified sequences with the UPTAG sequences from the *Saccharomyces* Genome Deletion Project. Mutations were identified in 104 genes/ORFs showing resistance to arsenic as compared to the wild type strain. To rule out the possibility that the resistant phenotype of these mutants is a result of arsenic-induced mutation during the screening process, the individual deletion strains from the mutant collection were picked up and tested individually for arsenic resistance using the spot assay. Of the 104 mutants identified in the screen, all exhibited significantly more resistance than the wild-type cells. Among the verified strains, 32 mutants turned out to have stronger phenotype that is resistant to 5 mmol/L arsenite. Five of the 32 mutants (FPS1, TMA20, UPF3, YAL066W, YOR309C) showed resistance to 7 mmol/L arsenite. The phenotype data were mapped onto the regulatory network. Bioinformatic studies of the genes revealed four neighborhoods, including mRNA catabolism, response to stress, histone acetylation, and protein synthesis and catabolism.

**Key words** arsenic, screen, yeast, phenotype, resistance

---

\*This work was supported by grants from The Key Project of Chinese Ministry of Education (104232), Trans-Century Training Program Foundation for the Talents by the Ministry of Education, and Tsinghua-Yue-Yuen Medical Sciences Fund.

\*\*Corresponding author. Tel: 86-10-62792997, E-mail: frankliu@tsinghua.edu.cn

Received: February 8, 2007 Accepted: June 28, 2007