

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 转录抑制因子 Rdr1 负调控细胞胁迫应答*

苗敏 曹红平 钟彦 刘军 王一慧 刘昕 张年辉 刘科**

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要 Rdr1 是出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 的一个转录抑制因子, 参与控制细胞的多重药物耐受性, 并可能与细胞胁迫应答相关. 利用 PCR 方法扩增 *RDR1* 基因片段, 将其克隆至高拷贝表达载体 pYES2/NTA 上并诱导 Rdr1 蛋白在酵母细胞中过表达. 为了揭示转录抑制因子 Rdr1 在胁迫应答中的作用, 比较了 *RDR1* 过表达细胞、*RDR1* 缺失突变体细胞和野生型细胞在过氧化氢处理、热胁迫和高盐处理条件下的生长状态, 结果显示, *RDR1* 过表达导致细胞对上述 3 种胁迫作用更敏感, 而 *RDR1* 缺失则使细胞对这些胁迫作用的耐受性不受影响或有一定增强. 为了揭示上述不同细胞在胁迫条件下生长状态的差异与细胞内抗氧化酶活性之间的关系, 测定并比较了 *RDR1* 过表达细胞、*RDR1* 缺失突变体细胞和野生型细胞中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase SOD)、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase G6PDH)、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase GR)的活性. 结果表明, *RDR1* 缺失突变体细胞具高活性的 SOD、过氧化氢酶、G6PDH 和 GR, 而 Rdr1 过表达细胞中 SOD、过氧化氢酶、G6PDH 和 GR 的活性较低. *RDR1* 对 SOD 和过氧化氢酶活性的影响要大于 G6PDH 和 GR. 细胞抗氧化酶活性的变化初步揭示, *RDR1* 过表达细胞对胁迫的敏感和 *RDR1* 缺失突变体细胞对胁迫耐受性增加的原因. 为转录抑制因子 Rdr1 在胁迫应答中的负调控作用及其机理提供了初步的遗传学和生物化学证据.

关键词 Rdr1, 转录因子, 胁迫应答, 抗氧化酶

学科分类号 Q81

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00318

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 作为单细胞真核模式生物与哺乳动物细胞在大分子水平上和细胞器水平上有惊人的相似性, 并且很多酵母蛋白与高度同源的人类蛋白之间表现出功能上的互换性. 对酵母细胞信号传导及基因表达调控的研究有助于深入了解真核细胞生命活动的基本规律和分子机制.

酵母细胞转录抑制因子 Rdr1 由 546 个氨基酸组成, 分子质量 61.29 ku, 是锌簇蛋白 Gal4 家族的一员. Gal4 家族是当前研究最广泛的锌簇蛋白之一, 它在酵母的生长、生殖、代谢等过程中起着非常重要的作用, 参与糖代谢、糖原异生、呼吸作用、氨基酸代谢、维生素的合成、细胞的有丝分裂和减数分裂、染色质重组、过氧化物酶体的增殖等过程^[1], 同时也参与细胞对胁迫环境和多种药物耐受性(multidrug or pleiotropic drug resistance, PDR)的应答^[2]. 已有研究发现, *RDR1* 缺失的菌株不能在非发酵的碳源培养基和含有 Calcofluor white 的培

养基中生长^[3], *RDR1* 缺失后, 与细胞耐药性相关基因的表达量增加了 2 倍以上, 细胞对药物的抗性增加^[4]. 最近对 *FLO11* 的研究发现, 通过表形筛选出的 25 个受转座子插入影响的基因, 然而在这些基因被定向敲除后, 有 9 个基因并未表现出应有的表型, 其中包括 *RDR1* 基因, 这表明 *RDR1* 功能的复杂性^[5].

通过微阵列分析酵母 mRNA 在不同条件下的活性水平, 推测 *RDR1* 可能参与细胞的胁迫应答^[6]. 生物对胁迫应答的机制在进化上是保守的, 对胁迫应答的调节包括转录水平、转录后水平和翻译后水平. 其中通过转录因子来调节相关基因活性的转录水平调节是研究最为广泛的. 目前, 对酵母

* 国家自然科学基金资助项目(30671181).

** 通讯联系人.

Tel: 028-85415008, E-mail: kliu@scu.edu.cn

收稿日期: 2009-05-13, 接受日期: 2009-08-07

细胞转录抑制因子 Rdr1 的研究仅阐明了 *RDR1* 在多向药物耐受性应答中的作用机理, 而其在胁迫环境中的功能和作用机理尚无任何实验证明. 本文将 *RDR1* 基因蛋白编码片段构建到高拷贝表达载体 pYES2/NTA 上, 将 *RDR1* 基因进行过表达, 并将 Rdr1 蛋白进行了分离纯化. 初步研究了 Rdr1 在氧化胁迫、热胁迫、渗透压胁迫中的作用, 以及与细胞中抗氧化酶活性的相关性. 本研究为深入阐明 Rdr1 蛋白的结构与功能奠定了基础.

1 材料与amp;方法

1.1 材料

Saccharomyces cerevisiae 菌株 BY4741, *RDR1* 缺失突变型菌株 $\Delta rdr1$ (表 1), 表达载体 pYES2/NTA 均购于 Invitrogen 公司; 大肠杆菌 JM109 为本实验室保存; 主要培养基 LB、YPD、SC, 配方参见 Bonifacino 等^[7]的方法; Taq DNA 聚合酶、T4 连接酶、限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; 胶回收试剂盒购自 Invitrogen 公司; ECL 化学发光溶液购自 Millipore 公司. 其余常用试剂为进口或国产分析纯. 引物合成和测序由上海 Invitrogen 生物技术有限公司完成.

Table 1 Strains used in this study

Strain	Genotype
BY4741	<i>MATa: his3-delta1 leu2-delta0 met15-delta0 ura3-delta0</i>
$\Delta rdr1$	<i>MATa: his3-delta1 leu2-delta0 met15-delta0 ura3-delta0</i> $\Delta rdr1$, BY4741 background

1.2 重组质粒 pYES2/NTA-RDR1 的构建

根据 *Saccharomyces Genome Database*(SGD) 中的 *Saccharomyces cerevisiae* 基因全序列和载体 pYES2/NTA 含有的限制性酶切位点, 设计引物时在上下游分别引入 *Kpn* I 和 *Xho* I 限制酶切位点 (上游引物, 5' GAT GGT ACC TAT GGC ATC CCC AGG ATC GAC A 3', 下游引物, 5' GAA CTC GAG CAG GCG TGA CGG GAT TTC TTT 3'). 提取酵母菌株 BY4741 的基因组 DNA^[8]作为模板进行 PCR 扩增, 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 按试剂盒说明回收 PCR 产物. pYES2/NTA 和 PCR 产物均用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Xho* I 于 37℃ 双酶切 2 h, 切胶回收 2 个酶切片段, 用 T4 连接酶连接后转化 *E. coli* JM109 感受态细胞. 挑取阳性克隆扩增提取重组质粒, 菌落 PCR 和双酶切鉴定后测序, 将正确插入的重组表达质粒命名为 pYES2/NTA-RDR1.

1.3 酵母的转化和筛选

按 Invitrogen 公司提供的 LiAc/SS-DNA/PEG 酵母转化法. 制作酵母菌株 BY4741 感受态细胞 100 μ l, 并加入 36 μ l 1.0 mol/L LiAc、240 μ l 50% PEG3350(质量体积比)、50 μ l 变性鲑鱼精 DNA、34 μ l 重组质粒 pYES2/NTA-RDR1 混匀. 42℃ 热休克 40 min, 离心 1 min, 除去上清, 重悬于 500 μ l 无菌水中, 取 100 μ l 均匀涂于尿嘧啶营养缺陷型平板(SC-URA), 倒置 30℃ 培养 48~72 h, 至长出阳性克隆. 同法将质粒 pYES2/NTA 也转入酵母菌株 BY4741 中.

1.4 Rdr1 蛋白在酵母中的诱导表达

取 1.3 中含有重组表达载体的重组菌和只含有空白质粒的对照重组菌, 取单克隆接种至 10 ml SC-URA 液体培养基中. 30℃ 摇瓶培养至 A_{600} 为 1.5~3.0, 以 0.25% 的接种量转于 40 ml SC-URA 液体培养基, 30℃ 培养至 A_{600} 至 0.8~1.2 时, 加入 4 ml 的 20% 半乳糖诱导 10~12 h 后, 离心收集细胞, 6% 三氯乙酸(TCA)冰上处理 15 min, 4℃, 4 000 g, 离心 3 min, 预冷的 100% 丙酮洗沉淀 2 次, 用枪头加样器吸弃上清, 4℃ 开盖挥发, 待丙酮挥发完全后, 于 1.5 ml 离心管称取 10 mg 制备好的细胞干粉, 加入 100 μ l 玻璃珠, 然后加入 300 μ l 裂解液, 在旋涡混合仪上最大速振荡裂解 10 min, 14 000 r/min 离心 15 min, 取上清.

1.5 表达产物的免疫印迹鉴定

提取的蛋白质用 BardFord 法^[9]测定浓度. 10 μ g 蛋白质经过 10% SDS-PAGE 分离后, 使用全湿转印仪将蛋白质转移到醋酸纤维膜(PVDF 膜)上, 用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 基于表达产物末端的 6 \times His 标签, 用抗 6 \times His 鼠源单克隆抗体(1:200)在室温孵育 1 h, 孵育后的 PVDF 膜用 TTBS 溶液洗涤 5 \times 5 min, 再用 HRP 标记的 IgG 二抗(1:200)在室温孵育 1 h, 孵育后的 PVDF 膜用 TTBS 溶液洗 5 \times 5 min, 然后用 ECL 发光检测液对 PVDF 膜进行发光反应, Bio-Rad 凝胶成像系统进行检测.

1.6 Rdr1 的纯化和 SDS-PAGE 分析

将含重组质粒 pYES2/NTA-RDR1 的酵母阳性克隆接种到 10 ml SC-URA 液体培养基中, 30℃, 170 r/min 培养至 A_{600} 为 1.5~3.0, 以 0.25% 的接种量转于 800 ml SC-URA 液体培养基, 30℃, 170 r/min 培养, 当 A_{600} 至 0.8~1.2 时, 加入 80 ml 的 20% 半乳糖诱导 10~12 h, 离心收集细胞, 加入等体积的玻璃珠和裂解缓冲液涡旋震荡裂解细

胞, 13 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液(supernatant), 过 Ni-NTA-Sepharose 柱后, 用 2~3 个柱体积含 2 mmol/L 咪唑的清洗缓冲液(washing buffer)冲洗掉杂蛋白, 再用 1 ml 含 250 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液(elution buffer)洗脱, 收集 6 份洗脱液, 10% SDS-PAGE 检测, 扫描仪采集图像.

1.7 胁迫分析

1.7.1 氧化胁迫分析. 将重组质粒 pYES2/NTA-RDR1 和质粒 pYES2/NTA 按 1.3 所述方法转化到酵母菌株 BY4741 中, 取单克隆接种至 10 ml SC-URA (2% Suc+2% Gal) 液体培养基, 同时将 BY4741 和 $\Delta rdr1$ 的单克隆接种于 10 ml SC(2% Suc+2% Ga) 液体培养基中, 30°C 过夜培养至对数期, 测定各个菌液的浓度, 取 1 个 A_{600} 的菌液, 13 000 r/min 离心, 1 ml 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液重悬浮, 13 000 r/min 离心除去上清液. 氧化胁迫组用 1 ml 含 20 mmol/L H_2O_2 的 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液重悬浮细胞, 对照组用 1 ml 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液重悬浮细胞, 30°C 温育 1 h, 1 ml 无菌水洗细胞, 再重悬浮于 1 ml 无菌水中, 然后系列稀释 5 倍、25 倍、125 倍; 将 5 μ l 不同浓度的菌液从高到低浓度至 YP (2% Suc+2% Ga) 平板上 30°C 培养 48~72 h, 观察结果, 采集图像.

1.7.2 热胁迫分析. 按 1.7.1 中方法培养细胞至对数期后, 测定各个菌液的浓度, 用无菌水将菌液稀释至 A_{600} 为 0.1, 然后再系列稀释 5 倍、25 倍、125 倍, 将 5 μ l 不同浓度的菌液从高到低浓度至 YP(2% Suc+2% Ga) 平板上, 对照组在 30°C 培养, 热胁迫组先在 55°C 培养 45 min 后转入 30°C 培养, 48~72 h 后观察结果, 采集图像.

1.7.3 渗透压胁迫分析. 方法同 1.7.2, 将 5 μ l 不同浓度的菌液从高到低浓度至 YP(2% Suc+2% Ga) 和含 1 mol/L NaCl 的 YP(2% Suc+2% Ga) 平板上 30°C 培养 48~72 h, 观察结果, 采集图像.

1.8 抗氧化酶活性的测定

取 1.7.1 中含有重组表达载体的重组菌(WT+Rdr1)和只含有空白质粒的对照重组菌(WT+vector), 挑单克隆接种至 10 ml SC-URA(2% Suc+2% Gal) 液体培养基中, 同时将 BY4741 和 $\Delta rdr1$ 的单克隆接种于 10 ml SC(2% Suc+2% Gal) 液体培养基中, 30°C 培养 24~36 h, 测定各个菌液的浓度, 取若干菌液加入 30 ml SC-URA(2% Suc+2% Gal) 或 30 ml SC(2% Suc+2% Gal) 培养基中, 使培养基中 A_{600} 为 0.05, 30°C 培养 12~18 h. 离心收集细胞, 加入 1 ml 玻璃珠和 1.5 ml 裂解缓冲液涡旋震荡裂解细胞, 14 500 g 离心 20 min, 收集上清即为细胞粗提物. 细胞粗提物中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH)和谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)的活性测定按参考文献报道的方法^[10,11].

2 结 果

2.1 表达载体 pYES2/NTA-RDR1 的构建

以酵母菌株 BY4741 的全基因组 DNA 作为模板, 进行 PCR 扩增, PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果如图 1a 所示: 在 2 000 bp 处有清晰的特异性条带, 与 RDR1 基因片段 1 900 bp 大小基本一致. 初步判断该扩增片段为 RDR1 基因.

PCR 产物和 pYES2/NTA 均用 *Kpn* I 和 *Xho* I

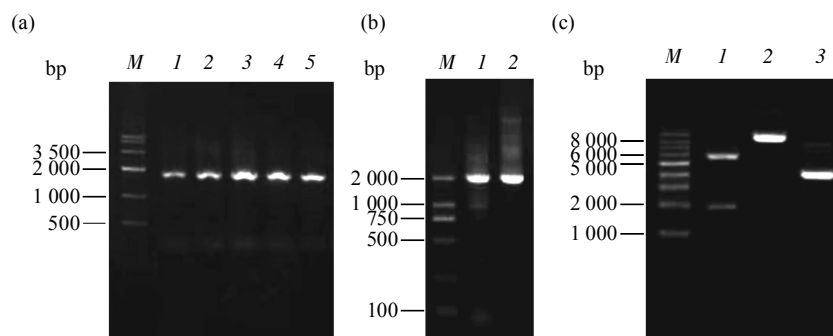


Fig. 1 Construction of recombinant plasmids pYES2/NTA-RDR1

(a) Electrophoresis analysis of RDR1 PCR product. M: DNA marker (Marker IV); 1~5: The PCR products under different annealing temperature (1: 50.7°C; 2: 51.9°C; 3: 53.2°C; 4: 54.5°C; 5: 57.1°C). (b) PCR of recombinant colonies. M: DNA marker (DL2000); 1, 2: PCR products of two recombinant colonies. (c) Restriction endonucleases digestion analysis of pYES2/NTA-RDR1. M: DNA marker (1 kb DNA ladder); 1: Digestion products of pYES2/NTA-RDR1 by *Kpn* I and *Xho* I; 2: Digestion products of pYES2/NTA-RDR1 by *Kpn* I; 3: pYES2/NTA.

双酶切, T4 连接酶连接后转化 *E. coli* JM109 感受态细胞. 选取阳性菌落培养, 进行菌液 PCR 反应, 在 2 000 bp 下方有清晰的单一条带(图 1b). 提取重组质粒, 重组子分别进行 *Kpn* I 单酶切、*Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定, 结果与预期片段大小相符(图 1c). *RDR1* 基因的序列经 T7 和 CYC1 引物双向测序, 证实所克隆的 *RDR1* 基因阅读框及序列完全正确, *RDR1* 基因已与 pYES2/NTA 正确融合.

2.2 表达产物的免疫印迹检测

含有重组表达载体的重组菌和只含有空白质粒的对照重组菌, 经 2% 半乳糖诱导表达, 6% 三氯乙酸处理, 玻璃珠破壁提取蛋白质. 10 μ g 总蛋白用于免疫印迹分析, 结果如图 2 所示: 阳性重组转化子表达上清液经免疫印迹分析, 发现有一条显色条带, 且条带位置与 62 ku 的 Rdr1 蛋白分子质量大小相符, 而空白载体转化对照菌株经同样条件诱导表达无显色条带, 说明阳性重组转化子能够胞内表达 Rdr1 融合蛋白.

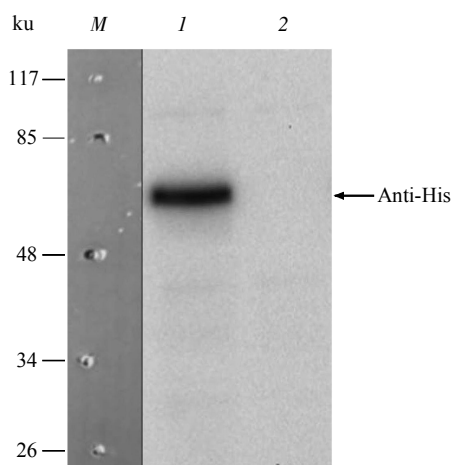


Fig. 2 Western blot of Rdr1

M: Prestained marker; I: Expression products of pYES2/NTA-RDR1 in BY4741; 2: Expression products of pYES2/NTA in BY4741.

2.3 Rdr1 纯化和 SDS-PAGE 分析

含 Rdr1 蛋白的细胞裂解液, 经 Ni-NTA-Sephacrose 层析, 收集 6 份洗脱液, 20 μ l 各步骤所得样品经 SDS-PAGE 检测, 结果见图 3, 在 66 ku 稍下方都出现一条蛋白质电泳条带, 这与 62 ku 的 Rdr1 蛋白分子质量大小相符. 细胞裂解液经 Ni-NTA-Sephacrose 层析后, 带 6 \times His 标签的 Rdr1 得到纯化, 第 5、6、7 泳道处收集的 Rdr1 浓度最高.

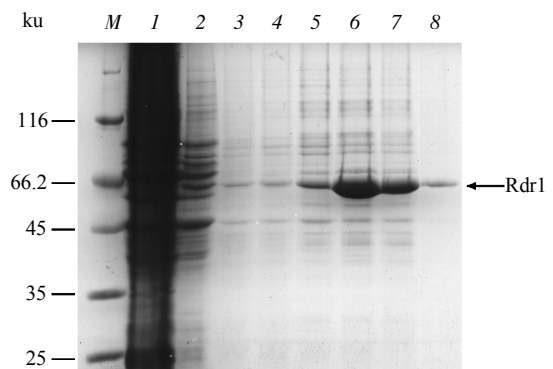


Fig. 3 SDS-PAGE analysis of fractions through Ni-NTA-Sephacrose column

M: Molecular mass markers; 1: The supernatant of yeast lysate after centrifuge; 2: The collection of washing; 3~8: 6 fractions of elution.

2.4 胁迫分析

在验证了 Rdr1 可以正确地过量表达并对该蛋白质进行了初步分离纯化的基础上, 我们进一步分析了 *RDR1* 在胁迫应答中的作用. 将 30 $^{\circ}$ C 培养的野生型细胞(WT)、*RDR1* 突变体细胞(Δ rdr1)、转入 pYESNTA-RDR1 的野生型细胞(WT+Rdr1)和转入 pYESNTA 空载的野生型细胞(WT+vector)收集并系列稀释后, 对比其在正常条件下和不同胁迫条件下的生长状态.

在对照组中 4 种细胞的生长状态无明显差别(图 4a), 而 20 mmol/L H_2O_2 处理 1 h 后, 4 种细胞表现出不同的生长状况(图 4b). WT 细胞在 125 倍稀释后在平板上已看不到菌落, 而 Δ rdr1 细胞在 125 倍稀释点上可以看到少量菌落. Δ rdr1 比 WT 生长状态略好, 表明 Δ rdr1 对 H_2O_2 胁迫的耐受性比 WT 略强. 由于未知的原因, WT + vector 对 H_2O_2 胁迫的耐受性略微增强, 与 Δ rdr1 相似. 而 WT+Rdr1 与 WT+vector 的对比显示出 WT+Rdr1 较差的生长状态, 说明过量表达 Rdr1 蛋白的细胞对 H_2O_2 胁迫敏感性增加, 这与 Δ rdr1 表现出的对氧化胁迫有一定的耐受性相印证. 上述实验数据表明 Rdr1 参与了细胞对氧化胁迫的响应, 并且其在此过程中起到负调控的作用.

在 55 $^{\circ}$ C 热处理 45min 后, 4 种细胞的生长状态有很大差别(图 4b). 热处理对 Δ rdr1 的影响较小, 其表现出较好的生长状态. Δ rdr1 对热胁迫的耐受性表明 Rdr1 参与了细胞对热胁迫的响应.

WT+Rdr1 在热胁迫处理后表现出很差的生长状态, 对热胁迫的极度敏感表明, 过量表达的 Rdr1 影响细胞对热胁迫的耐受性, 这与 $\Delta rdr1$ 表现出的对热胁迫有一定的耐受性相印证, 表明 Rdr1 负调控细胞对热胁迫应答机制.

在含有 1 mol/L NaCl 的培养基中, 各个细胞株的生长状态表现出差异(图 4c). 对比 WT 和 $\Delta rdr1$

的生长, 可以看出 $\Delta rdr1$ 稀释 5 倍、25 倍、125 倍的细胞比 WT 的生长状态好, 表现出对盐胁迫有一定耐受, 说明 RDR1 参与了细胞对盐胁迫应答的调控. 同时, WT+Rdr1 的生长受到显著的抑制, 说明, 含过量 Rdr1 的细胞对盐胁迫极度敏感, 这与 $\Delta rdr1$ 表现出的对盐胁迫有一定的耐受性相印证, 表明 Rdr1 在盐胁迫应答过程中起到负调控的作用.

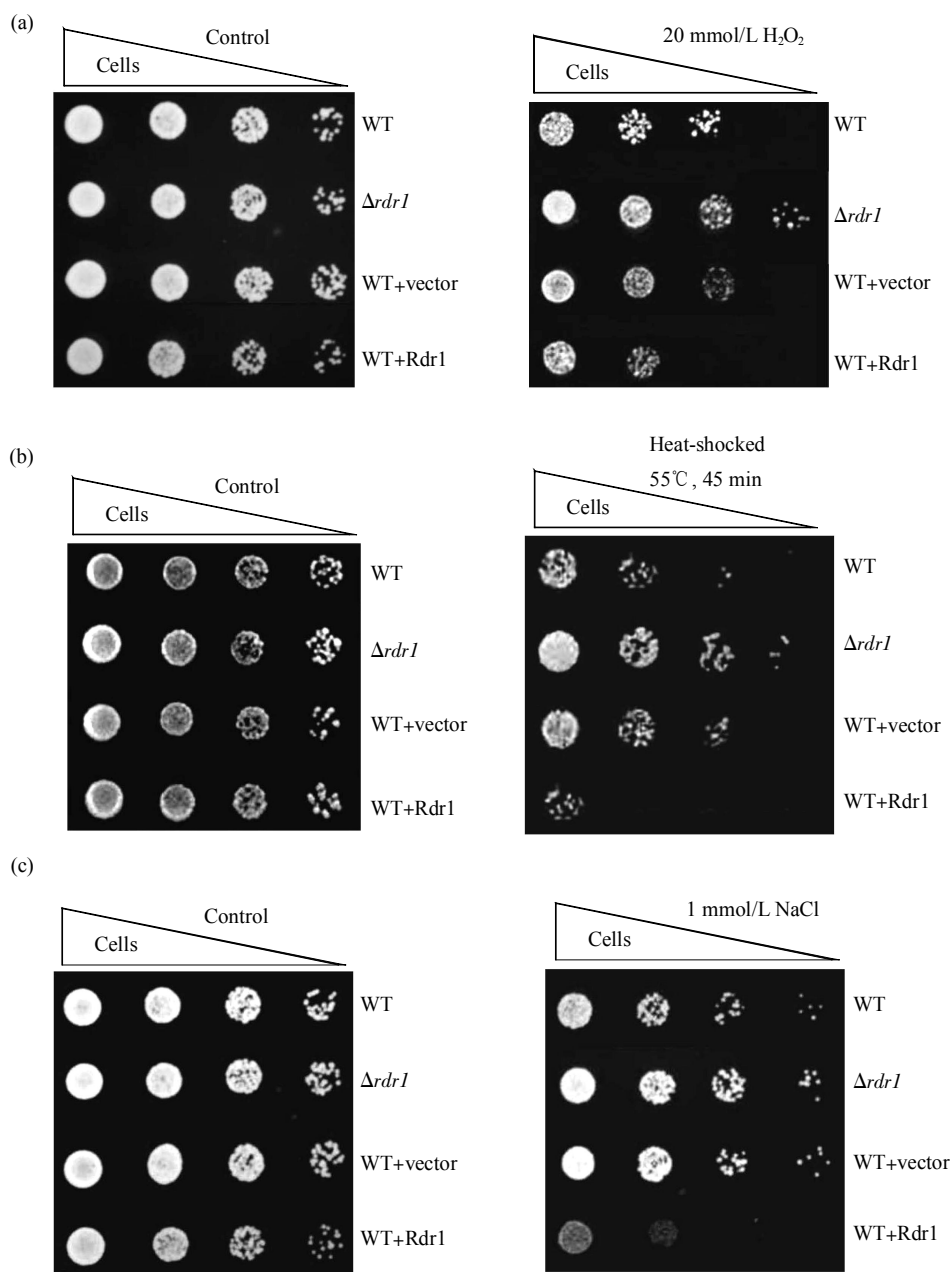


Fig. 4 Stress treatments of yeast strains

(a) Treatment of yeast strains by oxidative stress. Left panel: Yeast strains grow in YP(2% sucrose+2% galactose) plate. Right panel: Yeast strains treated by 20 mmol/L H_2O_2 and culture in YP(2% sucrose+2% galactose) plate. (b) Treatment of yeast strains by heat-shocked. Left panel: Yeast strains culture in 30°C. Right panel: Yeast strains heat-shocked by 55°C 45 min then culture in 30°C. (c) Treatment of yeast strains by osmotic stress. Left panel: Yeast strains culture in YP(2% sucrose+2% galactose) plate. Right panel: Yeast strains culture in YP(2% sucrose+2% galactose+1 mol/L NaCl) plate. WT(BY4741), WT+vector(BY4741 transformed with pYES2/NTA), WT+Rdr1 (BY4741 transformed with pYES2/NTA-RDR1).

2.5 RDR1 调控抗氧化酶的活性

酵母细胞对不同胁迫的应答途径存在着交互作用. 我们推测转录抑制因子 Rdr1 对氧化胁迫、热胁迫、盐胁迫的负调控作用可能与抗氧化酶的调控有关. 为了进一步解释 Rdr1 在氧化胁迫、热胁迫、盐胁迫中负调控的作用, 研究了 *RDR1* 与细胞中抗氧化酶活性的关系.

超氧化物歧化酶(SOD)是一种重要的抗氧化剂, 超氧阴离子(O_2^-)在 SOD 的催化下可以被还原为过氧化氢(H_2O_2), H_2O_2 再通过不同的途径得以清除. 4 种细胞中 SOD 的活性如图 5a: $\Delta rdr1$ 中 SOD 的活性最高, 这与 $\Delta rdr1$ 在各种胁迫条件下生长状态好, 对胁迫有耐受性相印证. 过表达 Rdr1 细胞(WT+Rdr1)中 SOD 活性显著低于只含空载的细胞, 这与过表达 Rdr1 细胞对胁迫的高敏感性相印证. WT 和 WT+vector 中 SOD 活性大小相似.

过氧化氢酶能催化细胞内的 H_2O_2 降解为 H_2O 和 O_2 , 这是细胞清除 H_2O_2 的主要途径. 细胞内过氧化氢酶活性的变化与 SOD 活性变化类似(图 5b),

$\Delta rdr1$ 比 WT 的过氧化氢酶活性高 40%, WT + Vector 比 WT + Rdr1 的酶活性高大约 60%, $\Delta rdr1$ 中的酶活性是 WT + Rdr1 的 3 倍.

过氧化氢还有另外一条清除途径:在谷胱甘肽过氧化物酶(GR)的作用下, 还原型谷胱甘肽(GSH)与 H_2O_2 反应形成氧化型谷胱甘肽(GSSG), 后者又在 GR 的作用下得以还原. 正常细胞一般具有较高的 GSH/GSSG 比值. 如图 5c 所示, WT 细胞 GR 活性比 $\Delta rdr1$ 细胞略低, 而 WT+vector 细胞 GR 活性比 WT+Rdr1 细胞略高, 表明 *RDR1* 可在一定程度影响 GR 酶活性. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)催化反应生成的 NADPH 是谷胱甘肽还原酶的辅酶. 4 种细胞 G6PDH 活性差异与谷胱甘肽还原酶在 4 种细胞中的表现一致(图 5d), 反映了 2 种酶功能上的联系. 上述实验结果表明, *RDR1* 对 4 种细胞内抗氧化酶的活性均表现为负调控作用. 其中过氧化氢酶和 SOD 酶活性受 *RDR1* 影响比较大, 而 GR 和 G6PDH 活性受 *RDR1* 影响比较轻微.

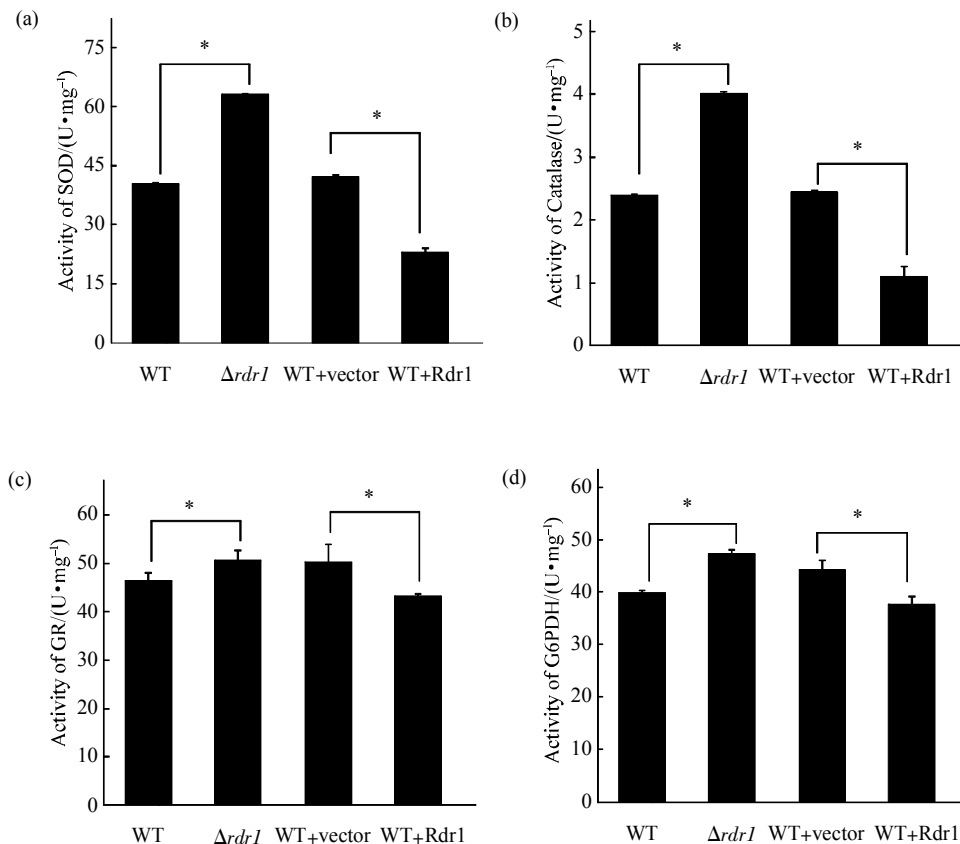


Fig. 5 Activities of antioxidant enzymes

(a) SOD activity. (b) Catalase activity. (c) GR activity. (d) G6PDH activity. Data are presented as $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments. Values represent $\bar{x} \pm s$, for $n = 3$ and those that are statistically different ($P < 0.05$ Student's t test) are indicated with an asterisk.

3 讨 论

Rdr1 是 Gal4 家族的一员. 锌簇蛋白 Gal4 家族成员有着广泛的生理作用. 如 Pdr1p、Pdr3p 和 Stb5p 是药物流出泵 *PDR5* 的转录激活因子^[12~14], Hap1p 可激活呼吸作用相关基因的表达^[15], Oaf1p 调控与过氧化物酶体产生过程相关的基因^[16], Oaf1p-Pip2p 的复合体调控油酸应答基因^[17], Tea1p 激活反转录转座子 Ty1 的转录^[18], Pdr8p 介导对 ketoconazole 和 oligomycin 两种药物的抗性^[19], War1p 调节对弱酸胁迫的应答^[20,21].

对 *RDR1* 的研究发现, $\Delta rdr1$ 不能在只含有非发酵碳源如甘油、乳酸的培养基中生长^[3], 而只有呼吸基因缺失的突变菌种不能在非发酵碳源上生长, 这表明 *RDR1* 参与细胞的呼吸. $\Delta rdr1$ 也不能在含有 Calcofluor white 的培养基中生长^[3]. Calcofluor whit 是一种对细胞壁成分几丁质有高度亲和力的化合物, 对 Calcofluor whit 的敏感表明 *RDR1* 参与细胞壁完整性的调控. Hellauer 等^[4]发现, Rdr1 与编码多药物转运子的 *PDR5* 基因启动子上的多种药物耐受元件(pleiotropic drug resistance elements, PDREs)结合, 抑制 *PDR5* 的表达, 实现其在多药耐药性机制中负调控作用. 最近对 *FLO11* 研究表明, *RDR1* 可能参与了 *FLO11* 的表达调控从而影响细胞应答外界环境条件^[5], 然而该研究进一步核实在 *RDR1* 的作用时却无法证实 *RDR1* 对 *FLO11* 表达调控的影响.

调控细胞应对各种胁迫的重要转录因子 Yap1 和 Msn2 同时也调节多药物转运子 *PDR5*、*PDR15* 的活性. Yap1 是细胞在转录水平应答氧化胁迫的主要转录因子, 参与氧化应激基因 *YCF1* 的调节, 而且 Yap1 可激活 *PDR5* 的表达^[22]. 锌指蛋白 Msn2 参与广泛的胁迫应答途径, 调节大量的基因响应多种不同环境的刺激^[23], 在热休克、高渗透压、弱酸等条件下 Msn2 诱导 *PDR15* 的表达参与细胞的解毒作用^[24]. Yap1、Msn2、Rdr1 都参与调节多种药物耐受性(pleiotropic drug resistance, PDR)基因的表达. 本实验结果中 Rdr1 表现出的在对热休克、氧化胁迫、渗透压胁迫响应的负调控作用, 说明 Rdr1 在细胞应答环境胁迫时也具有与调节子 Yap1、Msn2 类似的功能, 在这些条件下转录抑制因子 Rdr1 可能抑制了相应的胁迫应答蛋白的表达. 2006 年耶鲁大学用基因组分析法分析了酵母调节网络的层次结构, 将转录因子(transcription

factors, TFs)划分为 4 个层次, 第四层(顶层)的 TFs 最少, 第一层(底层)的 TFs 最多, 构成一金字塔状. 顶层的 TFs 通过蛋白质-蛋白质相互作用的方式接受信号, 再逐层地将信号传递下去, 形成一信号网络实现响应. 在该层次结构中, Msn2、Rdr1 在第一层, Yap1 在第二层^[25]. Yap1、Msn2、Rdr1 在调节 *PDR* 基因、应答外界胁迫等方面具有很多共同点, 但在调解网络中处于不同层次, 推测三者可能在某些信号通路中相互作用实现信号的传导. 酵母自然寿命(chronological life span, CLS)的延长与抵抗胁迫的能力增加相关. 酵母 *RSA2* 缺失后, CLS 增加了 1 倍且对胁迫的抵抗能力增加, 胁迫应答调节因子 Msn2/Msn4 可能参与该过程^[26]; *SCH9* 缺失后, 对氧化胁迫的抵抗力增加, 细胞 CLS 延长了 3 倍, 这也需要 Msn2/Msn4 的参与^[27]. 这些表明, 与 Msn2/Msn4 类似的 Rdr1 也有可能参与细胞寿命的调节.

本文根据酵母 *RDR1* 基因设计引物, 克隆表达 Rdr1 蛋白, 并且证明 Rdr1 在多种胁迫中起负调控作用. 对胁迫应答调控机理研究的深入不仅有利于研究酵母寿命调节的信号通路, 推进生物与环境作用机制的阐释, 而且还可以为遗传育种、工农业生产条件的优化以及人体免疫及疾病防治等带来新的曙光. 进一步的研究将着重关注 Rdr1 所调控基因的鉴定, Rdr1 与目的基因具体作用机理, 以及 Rdr1 与其他蛋白质因子间的关系和相互作用机制等.

参 考 文 献

- 1 MacPherson S, Larochelle M, Turcotte B. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Micro Mol Biol Rev*, 2006, **70**(3): 583~604
- 2 Akache B, Turcotte B. New regulators of drug sensitivity in the family of yeast zinc cluster proteins. *J Biol Chem*, 2002, **277**(24): 21254~21260
- 3 Akache B, Wu K, Turcotte B. Phenotypic analysis of gene encoding yeast zinc cluster protein. *Nucleic Acids Research*, 2001, **29**(10): 2181~2190
- 4 Hellauer K, Akache B, MacPherson S. Zinc cluster protein Rdr1p is a transcriptional repressor of the *PDR5* gene encoding a multidrug transporter. *J Biol Chem*, 2002, **277**(20): 17671~17676
- 5 Barrales R R, Jimenez J, Ibeas J I. Identification of novel activation mechanisms for *FLO11* regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2008, **178**(1): 145~156
- 6 Segal E, Shapira M, Regev A, et al. Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data. *Nat Genetics*, 2003, **34**(2): 166~176
- 7 Bonifacino J S, Dasso M, Harford J B, et al. *Short Protocols in Cell*

- Biology. Hoboken, NJ: John Wiley, 2004. 1417~1420
- 8 Brent R, Kingston R E. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc, 1997. 13.11.1-13.11.3
 - 9 Bardford M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. Anal Biochem, 1976, **72**(1~2): 248~254
 - 10 Lushchak V I, Gospodaryov D V. Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. Cell Biology International, 2005, **29**(3): 187~192
 - 11 Balazs L, Leon M. Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. Neurochemical Research, 1994, **19**(9): 1131~1137
 - 12 Balzi E A, Goffeau A. Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance. Biochim Biophys Acta, 1994, **1187**(2): 152~162
 - 13 Delaveau T A, Delahodde E, Carvajal J, et al. *PDR3*, a new yeast regulatory gene, is homologous to *PDR1* and controls the multidrug resistance phenomenon. Mol Gen Genet, 1994, **244**(5): 501~511
 - 14 Akache B, Turcotte B. New regulators of drug sensitivity in the family of yeast zinc cluster proteins. J Biol Chem, 2002, **277**(24): 21254~21260
 - 15 Creusot F, Verdier J, Gaisne M, et al. *CYP1 (HAP1)* regulator of oxygen-dependent gene expression in yeast. I. Over all organization of the protein sequence displays several novel structural domains. J Mol Biol, 1988, **204**(2): 263~276
 - 16 Rottensteiner H, Kal A J, Hamilton B. A heterodimer of the Zn2Cys6 transcription factors Pip2p and Oaf1p controls induction of genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Eur J Biochem, 1997, **247**(3): 776~783
 - 17 Karpichev I V, Durand-Heredia J M. Binding characteristics and regulatory mechanisms of the transcription factors controlling oleate-responsive genes in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2008, **238**(16): 10264~10275
 - 18 Gray W M, Fassler J S. Isolation and analysis of the yeast TEA1 gene, which encodes a zinc cluster Ty enhancer-binding protein. Mol Cell Biol, 1996, **16**(1): 347~358
 - 19 Hikkel I, Lucau-Danila A, Delaveau T, et al. A general strategy to uncover transcriptionfactor properties identifies a new regulator of drug resistance in yeast. J Biol Chem, 2003, **278**(13): 11427~11432
 - 20 Kren A, Mamnun Y M, Bauer B E, et al. War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast. Mol Cell Biol, 2003, **23**(5): 1775~1785
 - 21 Schüller C, Mamnun Y M, Mollapour M, et al. Global phenotypic analysis and transcriptional profiling defines the weak acid stress response regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell, 2004, **15**(2): 706~720
 - 22 Rodrigues C A, Nevitt T, Menezes R, et al. Yeast activator proteins and stress response: an overview. FEBS Lett, 2004, **567**(1): 80~85.
 - 23 Gasch A P, Spellman P T, Kao C M, et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. Mol Biol Cell, 2000, **11**(12): 4241~4257
 - 24 Wolfger H, Mamnun Y M, Kuchler K. The yeast Pdr15p ATP-binding cassette (ABC) protein is a general stress response factor implicated in cellular detoxification. J Biol Chem, 2004, **279**(12): 11593~11599
 - 25 Haiyuan Y, Gerstein M. Genomic analysis of the hierarchical structure of regulatory networks. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, **103**(40): 14724~14731.
 - 26 Fabrizio P, Lee-Loung Liou, Moy V, et al. SOD2 functions downstream of sch9 to extend longevity in yeast. Genetics, 2003, **163**(1): 35~46
 - 27 Fabrizio P, Pozza F, Pletcher S D, et al. Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. Science, 2001, **292**(5515): 288~290

Transcriptional Repressor Rdr1 Negatively Regulates Stress Response in Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae**

MIAO Min, CAO Hong-Ping, ZHONG Yan, LIU Jun, WANG Yi-Hui, LIU Xin, ZHANG Nian-Hui, LIU Ke**

(Key Laboratory of Bio-resource and Eco-environment, Ministry of Education, School of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract The study of signal transduction and gene expression regulation in yeast cells has contributed to understand the fundamental principle and molecular mechanism of cellular processes in higher eukaryotes. Rdr1 is a transcriptional repressor in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which was supposed to control pleiotropic drug resistance of cell and probably regulate genes involved in stress response. It still lacks enough evidence to conclude that Rdr1 involves in stress response. *RDR1* gene was cloned by PCR and ligated into multicopy vector pYES2/NTA resulting an overexpression plasmid pYES2/NTA-RDR1. The overexpression of Rdr1 protein was induced by 2% galactose to achieve a gain-of-function phenotype. In order to reveal the function of transcription repressor Rdr1 in stress response, the growth state of wild type cells, cells with overexpressed Rdr1 protein and *RDR1* mutant cells under H₂O₂, heat-shock and salt stress treatments were compared. The data demonstrated that cells with overexpressed Rdr1 protein were hypersensitive to above three stress treatments, while *RDR1* mutant cells were equal or more tolerant to these stress treatments compared to wild type cells. Yeast cells elevate antioxidant enzymes activity when challenged with different stressors. The role of *RDR1* in stress response may relate to its regulation of antioxidant enzymes activity. To verify this hypothesis, the activities of antioxidant enzymes including superoxide dismutase (SOD), catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), glutathione reductase (GR) were measured. It was showed that *RDR1* mutant cells had higher activities of SOD, catalase, G6PDH and GR compared to wild type cells, while cells with overexpressed Rdr1 protein had lower activities of SOD, catalase, G6PDH and GR. The negative effect of *RDR1* on activities of SOD and catalase was more intense than it on activities of G6PDH and GR. The results might explain the phenomenon that overexpressed Rdr1 protein were hypersensitive to above three stress treatments, while *RDR1* mutant cells were equal or more tolerant to these stress treatments compared to wild type cells. Therefore, the study provided preliminary genetics and biochemistry evidences for the negative regulatory role of transcription repressor Rdr1 in stress response.

Key words Rdr1, transcription factor, stress response, antioxidant enzymes

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00318

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30671181).

**Corresponding author.

Tel: 86-28-85415008, E-mail: kliu@scu.edu.cn

Received: May 13, 2009 Accepted: August 7, 2009