

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.01135

# 裂殖酵母 SAGA 复合物亚基 Spt20 参与钙调蛋白磷酸酶调节的 $\text{Cl}^-$ 胞内平衡

周楠, 雷秉坤, 周幸, 余珪, 吕红

复旦大学生命科学学院, 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433

**摘要:** SAGA(Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase)复合物是真核生物中高度保守的蛋白复合体, 参与转录激活、mRNA 转运等诸多生物学过程。为了探究 SAGA 复合物亚基的潜在生物学功能, 文章以裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)SAGA 复合物核心结构亚基 Spt20 为诱饵蛋白进行酵母双杂交筛选, 获得了 Ppb1 蛋白。Ppb1 是真核生物重要信号分子-钙调蛋白磷酸酶的催化亚基。酵母双杂交验证及免疫共沉淀实验均表明 Spt20 与 Ppb1 可以在体内发生蛋白相互作用。裂殖酵母 *ppb1*<sup>+</sup> 缺失突变体对高浓度  $\text{Cl}^-$  敏感, 而 *spt20*<sup>+</sup> 缺失突变体则能抵抗高浓度的外源  $\text{Cl}^-$ , 维持细胞的正常生长。荧光共定位分析表明, 当外源  $\text{Cl}^-$  浓度升高时, Ppb1 蛋白能够从细胞质迁移入核, 与 Spt20 蛋白在细胞核内发生共定位。遗传分析显示, *spt20*<sup>+</sup> 缺失可以抑制 *ppb1*<sup>+</sup> 缺失突变体对  $\text{Cl}^-$  高度敏感的表现, *spt20*<sup>+</sup> 与 *ppb1*<sup>+</sup> 处于  $\text{Cl}^-$  平衡调节的同一通路, 且 *spt20*<sup>+</sup> 位于 *ppb1*<sup>+</sup> 的下游。上述结果表明, *spt20*<sup>+</sup> 缺失突变体耐受外源高浓度  $\text{Cl}^-$ , Spt20 参与了钙调蛋白磷酸酶调节的  $\text{Cl}^-$  胞内平衡。在高等生物中胞内  $\text{Cl}^-$  浓度异常升高与心肌缺血/再灌注损伤等疾病的发生密切相关。鉴于 Spt20 在真核生物中高度保守, Spt20 可能成为潜在的药物靶点应用于  $\text{Cl}^-$  失衡相关疾病的防治中。

**关键词:** 裂殖酵母; SAGA 复合物; Spt20; 钙调蛋白磷酸酶;  $\text{Cl}^-$  胞内平衡

## SAGA complex subunit Spt20 involves in the calcineurin-mediated $\text{Cl}^-$ homeostasis in *Schizosaccharomyces pombe*

ZHOU Nan, LEI Bing-Kun, ZHOU Xing, YU Yao, LV Hong

State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

**Abstract:** SAGA (Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase) is a highly conserved protein complex in eukaryotes, which plays a role in many important cellular processes, including transcriptional activation and mRNA exportation. In order to investigate the potential biological function of SAGA subunit, we performed a yeast two-hybrid screen using a core structural subunit of SAGA in fission yeast, Spt20, as the bait. Ppb1, catalytic subunit of calcineurin was identified in the test. Calcineurin is a key regulator of signal transduction. The interaction between Spt20 and Ppb1 was confirmed by yeast

收稿日期: 2013-04-06; 修回日期: 2013-05-16

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(编号: 2009CB825601)和国家自然科学基金项目(编号: 31200961)资助

作者简介: 周楠, 硕士研究生, 专业方向: 微生物遗传学。E-mail: 10210700077@fudan.edu.cn

通讯作者: 吕红, 教授, 研究方向: 微生物遗传学。E-mail: honglv@fudan.edu.cn

网络出版时间: 2013-7-12 9:05:00

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130712.0905.001.html>

two-hybrid assay and co-immunoprecipitation. In *S. pombe*, *ppb1* $\Delta$  was hypersensitive to high concentration of  $\text{Cl}^-$ . In contrast, *spt20* $\Delta$  could resist high concentration of  $\text{Cl}^-$ , which maintained normal growth of cells. Fluorescent colocalization analysis showed that Ppb1 was translocated from cytoplasm to nucleus and colocalized with Spt20 upon the increase of extracellular  $\text{Cl}^-$ . Further genetic analysis revealed that loss of *spt20* $^+$  suppressed the hypersensitive phenotype to  $\text{Cl}^-$  of *ppb1* $\Delta$ . Thus, *spt20* $^+$  and *ppb1* $^+$  stayed in the same pathway of regulating  $\text{Cl}^-$  homeostasis and *spt20* $^+$  functioned downstream of *ppb1* $^+$ . Our data suggest that *spt20* $\Delta$  is able to resist high concentration of extracellular  $\text{Cl}^-$  and Spt20 involves in the calcineurin-mediated  $\text{Cl}^-$  homeostasis. The aberrant up-regulation of intracellular  $\text{Cl}^-$  is correlated with the diseases like myocardial ischemia reperfusion injury in higher organism. As Spt20 is highly conserved in eukaryotes, it might serve as a potential drug target in  $\text{Cl}^-$  imbalance related diseases.

**Keywords:** *S. pombe*; SAGA complex; Spt20; calcineurin;  $\text{Cl}^-$  homeostasis

SAGA 复合物, 即 Spt-Ada-Gcn5 乙酰转移酶复合体, 是真核生物中重要的转录辅助因子。作为一类多功能蛋白复合体, SAGA 复合物通过对组蛋白翻译后修饰, 包括组蛋白乙酰化和去泛素化, 实现染色质结构在沉默和活跃状态之间的转换, 为基因转录起始创造了合适的条件<sup>[1]</sup>。同时, SAGA 复合物还能与基因特异性转录激活因子、通用转录因子以及 RNA 聚合酶 等作用, 帮助将它们募集到靶基因的启动子区域, 直接调节真核基因转录<sup>[2]</sup>。

SAGA 复合物最早被发现于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), 并在裂殖酵母、果蝇(*Drosophila melanogaster*)、小鼠(*Mus musculus*)和人(*Homo sapiens*)等真核生物中高度保守<sup>[3]</sup>。裂殖酵母中的 SAGA 复合物包含 21 个蛋白亚基, 这些亚基分别组成了募集模块、组蛋白乙酰化模块、TATA 框结合蛋白作用模块、组蛋白去泛素化模块以及结构模块一系列功能各异的亚复合物<sup>[4]</sup>。大量遗传、生化和结构学研究已经很好的阐明了 SAGA 复合物的构成及其在 RNA 聚合酶 依赖的基因转录中的调节作用, 而 SAGA 复合物亚基是如何通过调控某些特定基因的转录激活, 进而影响胞内重要生理途径和个体发育的过程则逐渐成为研究的热点<sup>[5]</sup>。已有的报道表明, SAGA 复合物能够通过其乙酰转移酶亚基 Gcn5 和 TATA 框结合蛋白作用亚基 Spt8, 激活或抑制交配途径重要因子 *ste11* $^+$  的表达, 进而调节裂殖酵母在营养生殖和有性生殖模式之间的转换<sup>[6]</sup>。哺乳动物中 SAGA 复合物亚基 TRRAP 和 hGCN5 则参与调控癌基因 *c-Myc* 的转录激活, 影响细胞的凋亡和恶性转化<sup>[7]</sup>。

Spt20 是 SAGA 复合物结构亚基, 在酿酒酵母中又被称为 Ada5<sup>[8]</sup>。前期研究表明 Spt20 作为骨架蛋白主要维持复合物的结构稳定性, 因为在酿酒酵母的 *SPT20* 缺失突变体中难以检测到完整的 SAGA 复合物<sup>[4]</sup>。在哺乳动物中, Spt20 同源蛋白 hSPT20 能够直接调控一系列压力应答基因的表达, 参与细胞内质网应激反应过程<sup>[9]</sup>。然而, Spt20 是否在其他重要生物过程中发挥调节作用, 仍有待深入研究。

丝/苏氨酸特异性钙调蛋白磷酸酶(Calcineurin)是真核生物信号转导途径中重要的信号分子<sup>[10]</sup>。Calcineurin 是由催化亚基和调节亚基组成的异源二聚体, 它通过催化亚基氨基端的催化结构域, 介导底物的去磷酸化, 参与胞吐作用、压力应答、胞质分裂及 T 细胞激活等诸多生理过程<sup>[11~13]</sup>。Calcineurin 最早在猪(*Sus scrofa*)的脑组织中被发现<sup>[11]</sup>, 之后的研究证明其广泛存在于从酵母到人的一系列真核生物中, 而且序列高度保守<sup>[13]</sup>。裂殖酵母中 *ppb1* $^+$  是唯一编码 Calcineurin 催化亚基的基因<sup>[14]</sup>。研究表明, Ppb1 维持裂殖酵母  $\text{Cl}^-$  的胞内平衡, *ppb1* $^+$  缺失突变体对外源  $\text{Cl}^-$  高度敏感<sup>[15]</sup>。作为机体细胞中极富生理意义的一类阴离子,  $\text{Cl}^-$  在细胞兴奋性、细胞内环境 pH 稳定、细胞容量以及细胞凋亡等方面都起着调节作用<sup>[16~18]</sup>。在哺乳动物中, 胞内  $\text{Cl}^-$  失衡与心肌肥大及心肌缺血/再灌注损伤等病理过程的发生发展密切相关<sup>[19~21]</sup>。

为了探究 Spt20 的潜在生物学功能, 本研究利用酵母双杂交的方法, 筛选获得了 Spt20 的相互作用蛋白 Ppb1。通过酵母菌系列稀释打点分析 *spt20* $^+$  缺失突变体对高浓度  $\text{Cl}^-$  处理的表型, 并进一步结合

荧光定位和遗传分析等手段, 揭示了 Spt20 参与钙调蛋白磷酸酶介导的胞内  $\text{Cl}^-$  平衡调节的新功能。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

本研究所使用的裂殖酵母菌株见表 1。大肠杆菌(*Escherichia coli*)Top10 菌株为本实验室保存。裂殖酵母基因同源敲除质粒 pCHGL、整合荧光质粒 pCHGL-GFP、pFAML-RFP、过表达质粒 pRep1-3xFlag、pJR2-41u-5xHA 均由本实验室构建和保存。酵母双杂交系统 Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid, 包括宿主菌株 AH109、Y2H gold, 克隆质粒 pGBKT7、pGADT7, 阳性对照质粒 pGBKT7-p53 和 pGADT7-T 购于 Clontech 公司。酵母生长所需培养基 SC 和 YES 配方参考文献[22]。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 酵母双杂交筛选

在酿酒酵母菌株 AH109 中转化克隆有裂殖酵母 *spt20<sup>+</sup>* 编码序列(1 422 bp)的诱饵质粒 pGBKT7-*spt20<sup>+</sup>*, 再转入构建在 pGAD424 质粒上的裂殖酵母减数分裂期 cDNA 文库(NBRP, Japan), 涂布 SC-Tryptophan(Trp)-Leucine(Leu)-Histidine(His)+5 mmol/L 3-aminotriazole(3-AT)平板。对平板上形成的克隆进行  $\beta$ -半乳糖苷酶活性检测, 以检验 *LacZ* 报告基因的表达。玻璃珠法抽提阳性克隆中的质粒, 使用通用引物 T7 和 3'AD 进行测序(引物序列见表 2), 得到阳性克隆的基因序列。详细流程参见 Matchmaker GAL4 Two-hybrid System 3[23]。

#### 1.2.2 酵母双杂交验证

将克隆有 *ppb1<sup>+</sup>* 的编码序列(1 665 bp)的 pGADT7-*ppb1<sup>+</sup>* 质粒和诱饵质粒 pGBKT7-*spt20<sup>+</sup>* 共转化酵母菌株 Y2H gold。将 pGBKT7-p53 和 pGADT7-T-antigen

质粒转入 Y2H gold 作为阳性对照组, 将 pGBKT7-*spt20<sup>+</sup>* 和 pGADT7 质粒共转化 Y2H gold 作为阴性对照组。SC-Trp-Leu 平板筛选转化子, 随后将转化子菌液点种于 SC-Trp-Leu+ABA(Sigma 公司)平板, 观察菌落生长情况来检测 *AUR1-C* 的表达水平, 并点种于 SC-Trp-Leu+X- $\alpha$ -gal(Sigma 公司)平板, 观察菌斑变色情况以检验报告基因 *MEL1* 是否激活。详细流程参见 Matchmaker Gold Yeast Two-hybrid System[24]。

#### 1.2.3 免疫共沉淀

培养裂殖酵母菌株至对数生长期, 收集约 50  $OD_{600}$  菌体, 采用玻璃珠法破碎细胞, 离心后收集总蛋白上清液。将预处理过的 protein A/G 琼脂糖珠(Santa cruz 公司)与蛋白上清液在 4 缓慢摇晃孵育 2 h, 以除去蛋白与琼脂糖珠的非特异性结合。4 、2 000 r/min 离心 1 min, 分别取 10  $\mu\text{L}$  上清液加入 10  $\mu\text{L}$  2 $\times$ SDS loading buffer, 沸水浴煮 10 min, 作为 Input 对照。其余上清液加入 20  $\mu\text{L}$  Flag M2 琼脂糖珠(Sigma 公司), 4 缓慢摇晃孵育 4 h, 使得 Flag 融合蛋白与 Flag M2 琼脂糖珠结合。4 、2 000 r/min 离心 1 min, 冰上静置 1 min 将琼脂糖珠沉至管底, 小心吸去上清, 加入 1 mL 裂解液清洗珠子, 4 摇晃孵育 5 min。重复洗涤 4 次, 最后用针头吸尽上清。加入 50  $\mu\text{L}$  1 $\times$ SDS 上样缓冲液与 Flag M2 琼脂糖珠混合, 沸水煮 10 min。利用 Anti-HA 和 Anti-FLAG 抗体(AbMART 公司)对样品进行蛋白质免疫印迹(Western blot)检测, 方法详见参考文献[25]。

#### 1.2.4 基因敲除菌株及荧光菌株构建

采用同源重组的方式[26]敲除 *spt20<sup>+</sup>* 和 *ppb1<sup>+</sup>*, 获得的菌株分别命名为 ZN1(简称为 *spt20 $\Delta$* )和 ZN2(简称为 *ppb1 $\Delta$* )。扩增 *spt20<sup>+</sup>* 上下游同源区域引物对 upout/upin, dwin/dwout 以及鉴定突变体各引物序列见表 2。引物所处位置参见图 3。通过类似的同源重

表 1 本研究使用的裂殖酵母菌株

菌株	简称	基因型	来源
F2 ↓	WT	<i>h<sup>+</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	实验室保存
ZN1	<i>spt20<math>\Delta</math></i>	<i>h<sup>+</sup> spt20<math>\Delta</math>::hphMX4 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	本实验构建
ZN ↓	<i>ppb1<math>\Delta</math></i>	<i>h<sup>+</sup> ppb1<math>\Delta</math>::hphMX4 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	本实验构建
ZN ↓	Spt20-RFP Ppb1-GF ↓	<i>h<sup>+</sup> Spt20-RFP::ura4<sup>+</sup> Ppb1-GFP::KanMX6 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	本实验构建
ZN ↓	<i>spt20<math>\Delta</math> ppb1<math>\Delta</math></i>	<i>h<sup>+</sup> spt20<math>\Delta</math>::KanMX6 ppb1<math>\Delta</math>::hphMX4 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	本实验构建

表 2 引物序列

引物名称	序列(5'→3')
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
3'AD	AGATGGTGCACGATGCACAG
upout	CCCAAGCTTGATTCTACTATAGAATCCAGA
upin	GGGAGATCTCTCTTAGTTCAACGAATATAC
dwin	CCCGAGCTCCTCTCAAATGCTTCATCATTTAAT
dwout	CCCACTAGTTTCATATCGCTATGGGTTAGTAAT
upch	GGGTAAGGTAGCTCTAGCAAT
CR	TGATGTGACTGTGCGCCGTA
CF	TCGTATGTGAATGCTGGTCG
dwch	TAAACTAATCAAGGTAAAGGTG

组策略分别在 *spt20<sup>+</sup>* 和 *ppb1<sup>+</sup>* 的 3' 端融合 RFP 和 GFP 荧光标签, 获得了表达 Spt20-RFP 和 Ppb1-GFP 融合蛋白的菌株 ZN3(简称为 Spt20-RFP Ppb1-GFP)。

#### 1.2.5 酵母菌系列稀释打点分析

挑取酵母菌株单克隆至 YES 培养基, 32 °C 过夜培养至菌体浓度  $OD_{600}$  至少大于 1。使用无菌水稀释初始菌体浓度  $OD_{600}=1$ , 随后按 5 倍梯度对菌体进行系列稀释, 取 2  $\mu$ L 依次点种于含有不同  $Cl^-$  浓度的 YES 固体平板上。32 °C 培养平板 3~4 d, 扫描仪拍摄图片。

#### 1.2.6 显微镜观察

荧光观察用显微镜为奥林巴斯 X51 基础型倒置显微镜(Olympus 公司)。对培养至对数生长期 ( $OD_{600}=1.0$  左右) 的裂殖酵母活细胞进行观察, 微分干涉(DIC)明场观察酵母细胞形态, 利用 WIBA 通道观察胞内 Ppb1-GFP 绿色荧光信号, WIGA 通道观察 Spt20-RFP 红色荧光信号。采用奥林巴斯 DP2-BSW 软件拍摄及分析细胞图片。

## 2 结果与分析

### 2.1 Spt20 与 Ppb1 在体内发生相互作用

为了挖掘 Spt20 可能参与的生物过程及潜在的相互作用因子, 本研究以 Spt20 为诱饵蛋白进行酵母双杂交的筛选。结果表明, 获得了一个长为 1 103 bp 的基因片段, 经 Blast 序列相似性比对, 发现该片段编码 Calcineurin 催化亚基 Ppb1 的 N 端部分。随后又克隆了 1 665 bp 的 *ppb1<sup>+</sup>* 全长基因, 将其构建于

酵母双杂交猎物物质粒 pGADT7 上, 利用酵母双杂交在体内验证了 Spt20 与 Ppb1 的结合。实验结果表明, 共转化 BD-SPT20 和 AD-PPB1 质粒的 Y2H gold 菌株(实验组), 以及共转化 BD-P53 和 AD-T 质粒的菌株(阳性对照组)均能够激活报告基因 *AURI-C*, 因此可以在含有环脂肽类抗生素(ABA)的平板上生长; 同时这些菌株也能激活 *MEL1*, 在含有 X- $\alpha$ -半乳糖的平板上呈现蓝色。作为阴性对照组, 共转化 BD-SPT20 和 AD 空载质粒的酵母菌株则无法激活任何报告基因(图 1)。

为了进一步确认 Spt20 与 Ppb1 的蛋白质结合, 本研究通过免疫共沉淀的方法验证了两者在裂殖酵母完整细胞内的相互作用。使用 Anti-FLAG M2 琼脂糖珠免疫沉淀过量表达 Spt20-HA 和 Ppb1-3xFLAG 的细胞裂解液, 利用 Anti-HA 抗体在免疫沉淀产物中检测到了 Spt20 蛋白的存在。作为阴性对照, 利用 Anti-FLAG M2 琼脂糖珠免疫沉淀单独表达 Spt20-HA 的细胞裂解液后, 免疫沉淀产物经 Anti-HA 抗体检测未发现任何条带, 说明 Spt20 和 Ppb1 可以在体内发生特异性的结合(图 2)。但是, GST pull-down 体外实验未能检测到 Spt20 与 Ppb1 直接的蛋白质结合(结果未显示), 两者在体内的相互作用可能还需要其他蛋白质的介导。

### 2.2 *spt20<sup>+</sup>* 缺失突变体抵抗高浓度 $Cl^-$

在裂殖酵母中, Sugiura 等<sup>[27]</sup>研究发现 *ppb1<sup>+</sup>* 缺失突变体对  $Cl^-$  高度敏感, 表明 *ppb1<sup>+</sup>* 参与维持了  $Cl^-$

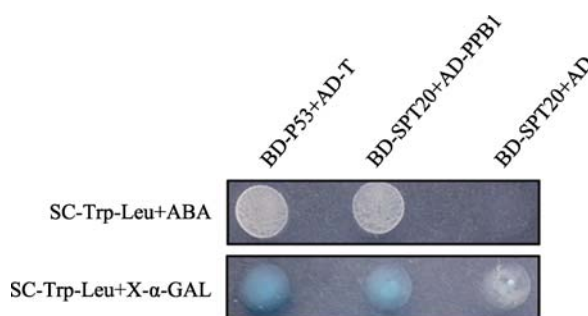


图 1 Spt20 与 Ppb1 相互作用的酵母双杂交验证

在酿酒酵母菌株 Y2H gold 中分别共转化 pGBKT7-p53(BD-P53)+ pGADT7-T(AD-T)、pGBKT7-*spt20<sup>+</sup>*(BD-SPT20)+ pGADT7-*ppb1<sup>+</sup>*(AD-PPB1)及 pGBKT7-*spt20<sup>+</sup>*(BD-SPT20)+ pGADT7(AD)3 质粒。无菌水稀释阳性转化子至  $OD_{600}=1.0$ , 取 3  $\mu$ L 菌液点种于 SC-Trp-Leu+ABA 和 SC-Trp-Leu+X- $\alpha$ -GAL 平板上, 置于 32 °C 培养 1~2 d, 观察菌落生长和显色反应。



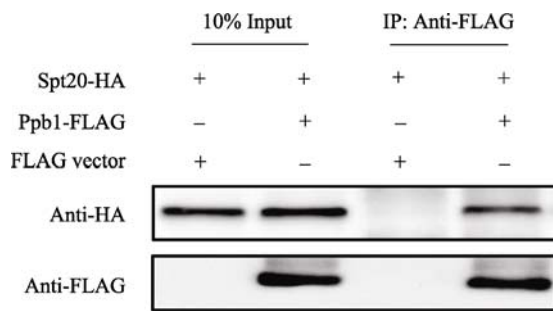


图 2 免疫共沉淀验证 Spt20 与 Ppb1 体内相互作用  
在野生型裂殖酵母 F274(简称为 WT)中过量表达 3'端融合 HA 标签的 Spt20 和 3'端融合 3xFLAG 标签的 Ppb1 蛋白。使用 Anti-FLAG 免疫沉淀 Ppb1-FLAG 融合蛋白, 在沉淀中可以利用 Anti-HA 检测到 Spt20-HA。

的胞内平衡。本研究发现 Spt20 与 Ppb1 可以在体内发生相互作用, 因此这一结果提示 Spt20 可能也参与了 Ppb1 介导的  $\text{Cl}^-$  胞内平衡。为了探究 Spt20 在

$\text{Cl}^-$  平衡中的作用, 本研究首先利用同源重组的方法在野生型单倍体裂殖酵母中敲除  $spt20^+$ (图 3)。通过 PCR 的方法, 利用图 3A 所示的不同引物对筛选平板上生长的转化子进行基因型的鉴定, 结果表明潮霉素抗性基因筛选标记替换了  $spt20^+$  的开放阅读框(图 3B), 获得了  $spt20^+$  缺失突变体  $spt20\Delta$ 。采用类似的方法本研究也获得了  $ppb1^+$  缺失突变体  $ppb1\Delta$ 。

为了检测  $spt20\Delta$ 、 $ppb1\Delta$  对  $\text{Cl}^-$  的敏感性, 分别在含有不同  $\text{Cl}^-$  浓度的 YES 平板上对 WT、 $spt20\Delta$  及  $ppb1\Delta$  进行稀释打点实验(图 4)。结果与已有的报道相符, Ppb1 可以维持  $\text{Cl}^-$  的胞内平衡, 用 0.2 mol/L  $\text{MgCl}_2$  处理就使  $ppb1\Delta$  的生长受到完全抑制。有趣的是,  $spt20\Delta$  并没有表现出对  $\text{Cl}^-$  的高度敏感性, 相反, 在高浓度的  $\text{Cl}^-$  处理下(0.3~0.5 mol/L  $\text{MgCl}_2$ ),  $spt20^+$  缺失突变体仍能够正常生长, 而野生型菌株 WT 的

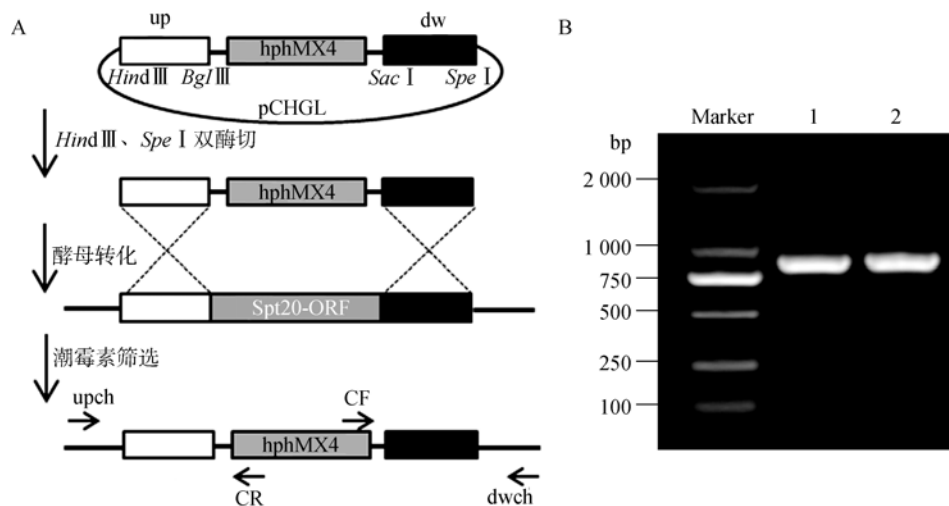


图 3 裂殖酵母  $spt20^+$  缺失突变体的构建与鉴定

A:  $spt20^+$  缺失突变体的构建流程。PCR 分别扩增裂殖酵母  $spt20^+$  的上游序列(up)和下游序列(dw), 并引入图示酶切位点。将 up 片段和 dw 片段分别装入 pCHGL 敲除质粒, 利用 *Hind*、*Spe* 双酶切释放线性化重组 DNA 片段转化野生型裂殖酵母, 上下游序列将与基因组上的同源区域发生同源重组, 使潮霉素抗性基因筛选标记(hphMX4)替换  $spt20^+$ , 随后利用潮霉素(Sigma 公司)筛选阳性转化子; B:  $spt20^+$  缺失突变体的鉴定。1: upch/CR 引物对鉴定, upch 位于  $spt20^+$  上游 745 bp 处, CR 为潮霉素筛选标记内部反向引物, PCR 反应获得与预期一致的 861 bp 片段; 2: CF/dwch 引物对鉴定, CF 为潮霉素筛选标记内部正向引物, dwch 位于  $spt20^+$  下游 785 bp 处, PCR 反应获得与预期一致的 869 bp 片段。

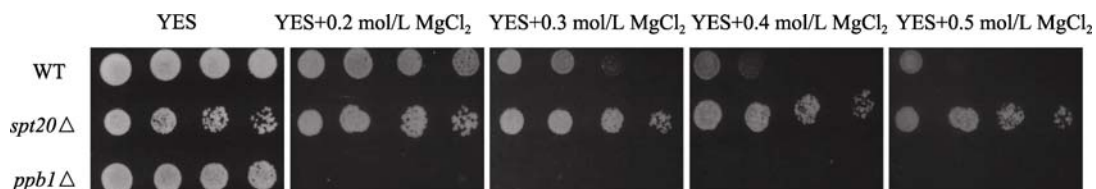


图 4 酵母菌 5 倍系列稀释打点分析  $spt20^+$  缺失突变体及  $ppb1^+$  缺失突变体对不同浓度  $\text{Cl}^-$  的敏感性

培养野生型裂殖酵母菌株 WT,  $spt20^+$  缺失突变体  $spt20\Delta$  及  $ppb1^+$  缺失突变体  $ppb1\Delta$  至对数生长期中期, 使用无菌水分别调节初始菌体浓度  $OD_{600}=1.0$ , 以 5 倍梯度稀释并接种于含不同浓度(0~0.5 mol/L)  $\text{MgCl}_2$  的 YES 平板上。32 培养 3~4 d。

生长状况则逐渐受到影响。以上数据提示, 对于  $\text{Cl}^-$  胞内平衡的调节, Spt20 的作用与 Ppb1 相反, 因此 *spt20Δ* 在胞外  $\text{Cl}^-$  浓度过高时仍保持正常生长。

### 2.3 Ppb1 在 $\text{Cl}^-$ 处理下迁移入核与 Spt20 发生共定位

为了进一步研究 Spt20 是否协同 Ppb1 在  $\text{Cl}^-$  胞内平衡调节中发挥作用, 本研究检验了 Spt20 与 Ppb1 在外界  $\text{Cl}^-$  浓度变化情况下在胞内的结合。采用图 3 所示的同源重组策略, 分别将 GFP 和 RFP 克隆到野生型裂殖酵母基因组 *ppb1*<sup>+</sup> 和 *spt20*<sup>+</sup> 基因的 C 端, 以表达内源性的 Ppb1-GFP 和 Spt20-RFP 荧光蛋白。荧光显微镜观察结果表明, 在野生型酵母菌株中, Ppb1 主要分布于细胞质中, 而 Spt20 则主要集中分布于细胞核内; 0.3 mol/L 浓度  $\text{MgCl}_2$  处理过夜后, Ppb1 的分布发生了显著的改变, 部分 Ppb1 蛋白迁移到了细胞核内, 而 Spt20 则仍然分布在细胞核中, 因此两者在核内发生了共定位(图 5)。该结果显示在细胞外界  $\text{Cl}^-$  浓度升高后, Ppb1 能够由细胞质迁移至细胞核内, 与核内的 Spt20 发生相互作用进而调节胞内  $\text{Cl}^-$  的平衡。

### 2.4 *spt20*<sup>+</sup> 与 *ppb1*<sup>+</sup> 处于调节 $\text{Cl}^-$ 胞内平衡的同一通路

上述结果表明, Ppb1 与 Spt20 均参与了  $\text{Cl}^-$  胞内平衡的调节。然而, 两者是否处于调控  $\text{Cl}^-$  平衡的同一信号通路及它们在通路中所处的上下游关系仍不得知。为此, 本研究通过遗传杂交的方法<sup>[14]</sup>构建了裂殖酵母 *spt20*<sup>+</sup> 和 *ppb1*<sup>+</sup> 双缺失突变体菌株 ZN4(简称为 *spt20Δppb1Δ*), 通过酵母菌系列稀释打点实验

检测其对  $\text{Cl}^-$  的敏感性, 以确定 *spt20*<sup>+</sup> 与 *ppb1*<sup>+</sup> 在  $\text{Cl}^-$  平衡调节中的遗传关系。

在含有 0.3 mol/L  $\text{MgCl}_2$  的 YES 平板上分别对裂殖酵母野生型菌株 WT、*spt20Δ*、*ppb1Δ* 以及 *spt20Δppb1Δ* 进行 5 倍梯度稀释打点。结果表明, *spt20*<sup>+</sup> 的缺失拯救了 *ppb1Δ* 对高浓度  $\text{Cl}^-$  敏感的表现型。*spt20Δppb1Δ* 与 *spt20Δ* 一致, 能够拮抗高浓度的  $\text{Cl}^-$  处理, 在 YES+0.3 mol/L  $\text{MgCl}_2$  平板上正常生长(图 6)。说明 *spt20*<sup>+</sup> 与 *ppb1*<sup>+</sup> 在  $\text{Cl}^-$  平衡调节中处于同一通路, 且在遗传关系上 *spt20*<sup>+</sup> 处于 *ppb1*<sup>+</sup> 的下游。

## 3 讨论

真核基因的转录起始受到包括基因特异性转录激活因子、通用转录因子及转录激活辅因子在内的多种因素的高度调节<sup>[28]</sup>。作为一类重要的转录辅因子, SAGA 复合物调控了真核生物约 10% 的基因表达<sup>[29]</sup>, 影响了性分化、端粒稳定、生长发育等诸多生物学过程<sup>[3]</sup>, 而其在胞内离子平衡中的作用仍不清楚。本研究结果显示, SAGA 复合物核心亚基 Spt20 与 Calcineurin 催化亚基 Ppb1 在体内可以发生相互作用。Ppb1 维持了  $\text{Cl}^-$  胞内平衡, *ppb1*<sup>+</sup> 缺失突变体对  $\text{Cl}^-$  高度敏感, 而 *spt20*<sup>+</sup> 缺失突变体对高浓度的  $\text{Cl}^-$  不敏感, 说明对于  $\text{Cl}^-$  胞内平衡的调节, Spt20 的作用机制与 Ppb1 相反。而进一步的遗传分析结果则显示 *spt20*<sup>+</sup> 与 *ppb1*<sup>+</sup> 在  $\text{Cl}^-$  平衡调节中处于同一通路, 且在遗传关系上 *spt20*<sup>+</sup> 处于 *ppb1*<sup>+</sup> 的下游。

Calcineurin 是真核生物信号转导途径的重要一

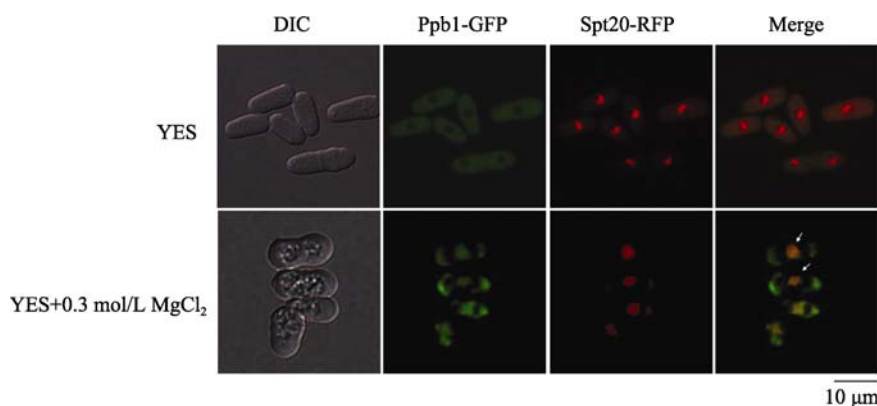


图 5 Ppb1 在  $\text{Cl}^-$  处理下迁移入核与 Spt20 发生荧光共定位

内源性表达 Ppb1-GFP 和 Spt20-RFP 荧光蛋白的裂殖酵母菌株 Spt20-RFP Ppb1-GFP 分别在 YES 及 YES+0.3 mol/L  $\text{MgCl}_2$  液体培养基中 32 °C 培养至对数生长期。使用奥林巴斯 X51 倒置显微镜检测酵母活细胞内绿色和红色荧光蛋白信号, DP2-BSW 软件拍摄及分析细胞图片。标尺=10 μm

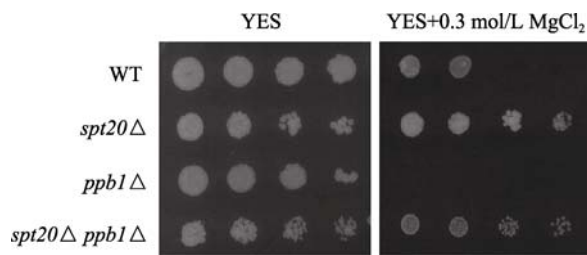


图6 酵母菌5倍系列稀释打点分析  $spt20\Delta ppb1\Delta$  对  $\text{Cl}^-$  的敏感性

野生型裂殖酵母菌株 WT、 $spt20^+$  缺失突变体  $spt20\Delta$ 、 $ppb1^+$  缺失突变体  $ppb1\Delta$  及  $spt20^+$ 、 $ppb1^+$  双缺失突变体  $spt20\Delta ppb1\Delta$  培养至对数生长期中期, 使用无菌水分别调节初始菌体浓度  $OD_{600}=1.0$ , 以5倍梯度稀释并点种于 YES 及 YES+0.3 mol/L  $\text{MgCl}_2$  平板上。32℃ 培养 3~4 d。

环, 其通常被认为仅在细胞质内发挥磷酸酶的活性, 通过去磷酸化某些转录因子使之迁移入核进行基因表达的调控<sup>[30]</sup>, 如在裂殖酵母中 Calcineurin 可以去磷酸化转录因子 Prz1, 促使其入核并调节  $\text{Ca}^{2+}$  通道运输蛋白 Pmc1 的表达<sup>[31]</sup>。然而哺乳动物细胞中的研究表明 Calcineurin 同样也能在细胞核内发挥作用, 例如在  $\text{Ca}^{2+}$  信号刺激下 Calcineurin 能够协同 NF-AT 转录因子家族成员 NF-AT4 转移至核内调控下游靶基因的表达式<sup>[32]</sup>。本研究在裂殖酵母中的蛋白荧光定位实验说明, Calcineurin 催化亚基 Ppb1 能够在外界环境  $\text{Cl}^-$  升高时由胞质向细胞核迁移, 并与核内其他蛋白发生作用, 说明在裂殖酵母中 Calcineurin 也可以在细胞核中发挥功能, 提示这种作用方式可能保守地存在于真核生物中。

胞内  $\text{Cl}^-$  浓度失衡会导致细胞功能的失调。如在心肌缺血/再灌注损伤中, 细胞内  $\text{Cl}^-$  浓度会急剧增加, 并引起心律失常, 甚至心肌细胞的凋亡, 对机体造成损害<sup>[20]</sup>。细胞外低  $\text{Cl}^-$  灌流以及强效  $\text{Cl}^-$  通道阻断剂如二苯二乙烯衍生物的使用, 可以降低细胞内  $\text{Cl}^-$  浓度, 对心肌起到保护作用<sup>[33,34]</sup>。本研究发现  $spt20^+$  的缺失可以抵抗胞外高浓度  $\text{Cl}^-$  对细胞的毒性, 维持细胞的正常生长, 暗示  $spt20^+$  缺失突变能够有效抑制胞内  $\text{Cl}^-$  浓度的上调, 对细胞起到保护作用。基于 SAGA 复合物在真核生物中高度保守, 裂殖酵母中 Spt20 参与调节由 Calcineurin 介导的  $\text{Cl}^-$  胞内平衡的机制, 也许存在于高等生物中。因此, 随着研究的深入, Spt20 可能有希望作为针对胞内  $\text{Cl}^-$  失衡的药物作用靶点, 用于防治心肌缺血/再灌注损伤等疾病。

除了  $\text{Cl}^-$ , 机体内其他离子如钙离子  $\text{Ca}^{2+}$ 、钠离子  $\text{Na}^+$  也在生长发育<sup>[30]</sup>、信号转导<sup>[35]</sup>以及细胞内环境电解质平衡中具有重要的生理学意义。Helmlinger 等<sup>[28]</sup>基因芯片(Microarray)数据显示, 在裂殖酵母中, 主要负责  $\text{Na}^+$  外流的基因  $sod2^+$ <sup>[36]</sup>的表达水平在 SAGA 复合物亚基  $spt7^+$  缺失突变体中上调了 2~3 倍; 而负责调节  $\text{Ca}^{2+}$  胞内平衡的转录因子 Prz1<sup>[31]</sup>, 其表达水平则在  $spt20^+$  缺失突变体中显著下调(约 2 倍)。因此, SAGA 复合物各亚基是否也参与调节了除  $\text{Cl}^-$  以外其他离子的胞内平衡, 将是值得进一步研究的问题。

#### 参考文献(References):

- [1] Berger SL. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12(2): 142–148. DOI
- [2] Rodriguez-Navarro S. Insights into SAGA function during gene expression. *EMBO Rep*, 2009, 10(8): 843–850. DOI
- [3] Koutelou E, Hirsch CL, Dent SY. Multiple faces of the SAGA complex. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(3): 374–382. DOI
- [4] Sterner DE, Grant PA, Roberts SM, Duggan LJ, Belotserkovskaya R, Pacella LA, Winston F, Workman JL, Berger SL. Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-binding protein interaction. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(1): 86–98. DOI
- [5] Baker SP, Grant PA. The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. *Oncogene*, 2007, 26(37): 5329–5340. DOI
- [6] Helmlinger D, Marguerat S, Villén J, Gygi SP, Bahler J, Winston F. The *S. pombe* SAGA complex controls the switch from proliferation to sexual differentiation through the opposing roles of its subunits Gcn5 and Spt8. *Genes Dev*, 2008, 22(22): 3184–3195. DOI
- [7] McMahon SB, Wood MA, Cole MD. The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(2): 556–562. DOI
- [8] Roberts SM, Winston F. SPT20/ADA5 encodes a novel protein functionally related to the TATA-binding protein and important for transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(6): 3206–3213. DOI
- [9] Nagy Z, Riss A, Romier C, le Guezennec X, Dongre AR, Orpinell M, Han J H, Stunnenberg H, Tora L. The human SPT20-containing SAGA complex plays a direct role in the regulation of endoplasmic reticulum stress-induced genes. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(6): 1649–1660. DOI
- [10] Aramburu J, Heitman J, Crabtree GR. Calcineurin: a cen-

- tral controller of signalling in eukaryotes. *EMBO Rep*, 2004, 5(4): 343–348. [DOI](#)
- [11] Klee CB, Draetta GF, Hubbard MJ. Calcineurin. In: Meister A, ed. *advances in enzymology and related areas of molecular biology* (Volume 61). New York: John Wiley & Sons, Inc., 2006: 149–200. [DOI](#)
- [12] Lu Y, Sugiura R, Yada T, Cheng H, Sio SO, Shuntoh H, Kuno T. Calcineurin is implicated in the regulation of the septation initiation network in fission yeast. *Genes Cells*, 2002, 7(10): 1009–1019. [DOI](#)
- [13] Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev*, 2000, 80(4): 1483–1521. [DOI](#)
- [14] Yoshida T, Toda T, Yanagida M. A calcineurin-like gene *ppb1<sup>+</sup>* in fission yeast: mutant defects in cytokinesis, cell polarity, mating and spindle pole body positioning. *J Cell Sci*, 1994, 107(7): 1725–1735. [DOI](#)
- [15] Sugiura R, Toda T, Shuntoh H, Yanagida M, Kuno T. *pmp1<sup>+</sup>*, a suppressor of calcineurin deficiency, encodes a novel MAP kinase phosphatase in fission yeast. *EMBO J*, 1998, 17(1): 140–148. [DOI](#)
- [16] Lucas JH, Emery DG, Rosenberg LJ. Physical injury of neurons: Important roles for sodium and chloride ions. *Neuroscientist*, 1997, 3(2): 89–101. [DOI](#)
- [17] Hudson AJ, Ebers GC, Bulman DE. The skeletal muscle sodium and chloride channel diseases. *Brain*, 1995, 118(Part 2): 547–563. [DOI](#)
- [18] Okada Y, Shimizu T, Maeno E, Tanabe S, Wang X, Takahashi N. Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. *J Membr Biol*, 2006, 209(1): 21–29. [DOI](#)
- [19] Xiong D, Heyman NS, Airey J, Zhang M, Singer CA, Rawat S, Ye L, Evans R, Burkin DJ, Tian H, McCloskey DT, Valencik M, Britton FC, Duan D, Hume JR. Cardiac-specific, inducible *ClC-3* gene deletion eliminates native volume-sensitive chloride channels and produces myocardial hypertrophy in adult mice. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(1): 211–219. [DOI](#)
- [20] 赖仲方. 心肌细胞内氯离子浓度与缺血再灌注期间心律失常的关联. *中国医学科学院学报*, 2002, 24(2): 190–196. [DOI](#)
- [21] 陈涛, 雷兰萍, 周和平, 金振晓. 氯通道阻滞剂对大鼠心肌缺血再灌注损伤致心肌细胞凋亡的作用. *中国体外循环杂志*, 2011, 9(2): 85–88. [DOI](#)
- [22] Forsburg SL, Rhind N. Basic methods for fission yeast. *Yeast*, 2006, 23(3): 173–183. [DOI](#)
- [23] Bd Biosciences Clontech. Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual PT3247–1(PR742219). US: Clontech Laboratories, Inc., 2007. [DOI](#)
- [24] Bd Biosciences Clontech. Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual PT4084–1 (PR033493). US: Clontech Laboratories, Inc., 2010. [DOI](#)
- [25] Shen L, Hu J, Lu H, Wu M, Qin W, Wan D, Li YY, Gu J. The apoptosis-associated protein BNIPL interacts with two cell proliferation-related proteins, MIF and GFER. *FEBS Lett*, 2003, 540(1–3): 86–90. [DOI](#)
- [26] Gregan J, Rabitsch PK, Rumpf C, Novatchkova M, Schleiffer A, Nasmyth K. High-throughput knockout screen in fission yeast. *Nat Protoc*, 2006, 1(5): 2457–2464. [DOI](#)
- [27] Sugiura R, Sio SO, Shuntoh H, Kuno T. Calcineurin phosphatase in signal transduction: lessons from fission yeast. *Genes Cells*, 2002, 7(7): 619–627. [DOI](#)
- [28] Helmlinger D, Marguerat S, Villén J, Swaney DL, Gygi SP, Bähler J, Winston F. Tra1 has specific regulatory roles, rather than global functions, within the SAGA co-activator complex. *EMBO J*, 2011, 30(14): 2843–2852. [DOI](#)
- [29] Lee TI, Causton HC, Holstege F, Shen WC, Hannett N, Jennings EG, Winston F, Green NR, Young RA. Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature*, 2000, 405(6787): 701–704. [DOI](#)
- [30] Shibasaki F, Mckeeon F. Calcineurin functions in  $\text{Ca}^{2+}$ -activated cell death in mammalian cells. *J Cell Biol*, 1995, 131(3): 735–743. [DOI](#)
- [31] Hirayama S, Sugiura R, Lu YB, Maeda T, Kawagishi K, Yokoyama M, Tohda H, Giga-Hama Y, Shuntoh H, Kuno T. Zinc finger protein Prz1 regulates  $\text{Ca}^{2+}$  but not  $\text{Cl}^-$  homeostasis in fission yeast. *J Biol Chem*, 2003, 278(20): 18078–18084. [DOI](#)
- [32] Shibasaki F, Price ER, Milan D, Mckeeon F. Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature*, 1996, 382(6589): 370–373. [DOI](#)
- [33] Ridley PD, Curtis MJ. Anion manipulation: a new antiarrhythmic approach. Action of substitution of chloride with nitrate on ischemia- and reperfusion- induced ventricular fibrillation and contractile function. *Circ Res*, 1992, 70(4): 617–632. [DOI](#)
- [34] Lai ZF, Liu J, Nishi K. Effects of stilbene derivatives SITS and DIDS on development of intracellular acidosis during ischemia in isolated guinea pig ventricular papillary muscle *in vitro*. *Jpn J Pharmacol*, 1996, 72(2): 161–174. [DOI](#)
- [35] Graef IA, Chen F, Chen L, Kuo A, Crabtree GR. Signals transduced by  $\text{Ca}^{2+}$ /calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell*, 2001, 105(7): 863–875. [DOI](#)
- [36] Dibrov P, Smith JJ, Young PG, Fliegel L. Identification and localization of the *sod2* gene product in fission yeast. *FEBS Lett*, 1997, 405(1): 119–124. [DOI](#)