



酿酒酵母Snf1/AMPK蛋白激酶通过调节细胞壁合成相关基因的表达影响细胞壁完整性

张萍¹, 赵强¹, 魏东盛¹, 杨娇¹, 朱项阳¹, 朱旭东^{1,2*}

¹南开大学生命科学学院, 微生物学系, 天津 300071

²北京师范大学生命科学学院, 生化与分子生物学研究所, 北京 100875

摘要: 【目的】初步探讨酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中Snf1/AMPK蛋白激酶影响细胞壁完整性的机制。【方法】通过同源重组交换的方法, 构建酿酒酵母Snf1/AMPK蛋白激酶催化亚基的敲除菌株*snf1Δ*, 并通过基因回补对敲除菌株表型进行验证。在含有刚果红(Congo red)和荧光增白剂(Calcofluor white)的平板上检测*snf1Δ*菌株细胞壁的完整性, 通过qRT-PCR的方法检测*snf1Δ*菌株中已知的细胞壁合成相关基因的表达情况。【结果】*SNF1*基因敲除影响细胞壁的完整性, 并影响酿酒酵母对热激应答的反应。进一步研究发现, *SNF1*突变菌株中 β -1, 3-葡聚糖合成相关基因与 β -1, 6-葡聚糖合成相关基因的表达量均明显降低。【结论】结果显示酿酒酵母Snf1蛋白激酶影响细胞壁的完整性, 此影响发生在转录水平上, 即通过调节细胞壁合成相关基因的转录来实现, 揭示了Snf1蛋白的一个新角色。

关键词: 酿酒酵母, Snf1/AMPK蛋白激酶, 细胞壁合成, β -葡聚糖

AMP激活的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)广泛存在于真核细胞中, 属丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在糖、脂、蛋白质等营养物质的代谢中发挥着多样而重要的作用, 同时参与细胞对环境压力的应答反应, 维持细胞内稳态^[1-2]。在结构上, AMPK是一个由催化亚基(α 亚基)和调节亚基(β 和 γ 亚基)组成的异源三聚体蛋白。很多真菌中存在AMPK的同源物, 酿酒酵母的SNF1复合物便是其中之一, 其功能相当复杂。酿酒酵母

SNF1复合物也是由3个亚基组成的异源三聚体蛋白, 包括 α 催化亚基Snf1, 3个可以相互替代的 β 亚基Sip1, Sip2和Gal83, 以及 γ 亚基Snf4^[3]。上游的Sak1、Tos3或Elm1激酶能够持续激活Snf1蛋白激酶^[4-5]。此外, Snf1蛋白的活性还受两个机制调控。其一, 蛋白磷酸酶1复合体(Reg1/Glc7)对Snf1蛋白的调控^[6]。某些代谢信号(例如高浓度葡萄糖)能够调节Reg1/Glc7的活性, 使Snf1去磷酸化并失活; 其二, Msn3与葡萄糖感受器作用, 调控

基金项目: 国家自然科学基金(81271801)

*通信作者。Tel/Fax: +86-22-23506510; E-mail: xudong82@nankai.edu.cn

收稿日期: 2015-10-09; 修回日期: 2015-12-22; 网络出版日期: 2016-01-12

Snf1的催化活性^[4]。同时, SNF1复合物参与机体的营养代谢调节, 并对环境压力应答, 维持细胞稳态。研究发现, SNF1复合物在糖原代谢方面具有重要作用—Snf1突变菌株无法积累糖原, 且胞内葡萄糖-6-磷酸浓度大幅度降低^[7-9]。

细胞壁的完整性对于细胞维持形态以及抵抗外界环境压力具有重要意义, 因而, 真菌的细胞壁也是抗真菌药物研发的一个理想靶点。酵母细胞壁的主要成分为甘露糖、 β -葡聚糖和几丁质, 其中 β -葡聚糖在细胞壁干重中所占的比例过半^[10-12]。细胞壁的 β -葡聚糖又以 β -1, 3-葡聚糖为主, 兼有 β -1, 6-葡聚糖。 β -1, 3-葡聚糖的合成主要依赖 β -1, 3-葡聚糖合成酶, 其催化亚基由*FKS1*和*FKS2*编码^[13-14]。而 β -1, 6-葡聚糖的合成途径尚未阐明, 尽管通过基因敲除手段确定了一系列与 β -1, 6-葡聚糖合成

相关的基因^[15-19]。

本实验室前期率先报道了Snf1参与维持细胞壁完整性的发现——在人类致病菌新型隐球酵母(*Cryptococcus neoformans*)中Snf1蛋白激酶参与调节细胞壁的完整性^[20-21]。其后, 在酿酒酵母中, 也有人证实Snf1蛋白激酶和细胞壁形成相关^[22], 说明Snf1蛋白维持真菌细胞壁完整性的功能具有保守性, 但其作用机制尚未触及。本研究通过同源重组的方法敲除酿酒酵母的*SNF1*基因, 比较野生型菌株和敲除菌株在细胞壁完整性上的差异, 同时利用酿酒酵母研究的海量生物学数据, 选择一些已知的与细胞壁合成相关的基因, 通过*qRT-PCR*的方法, 检测它们在*snf1Δ*突变株中的表达情况, 结果发现Snf1通过调控这些基因的表达实现其对细胞壁合成的影响。

表1. 本实验所用引物
Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
SNF-F/SNF-R	GACG <u>GAGCTC</u> ACTTGTGTATACCCGTATACTTGC/CGGGG <u>TACCT</u> TTTGGGATCCTTTTGGTTGTA
URA3-F/URA3-R	CCG <u>CTCGAG</u> AGATGCTAAGAGATAGTGATGATA/GGA <u>AGATCTC</u> TTTACAGTCCTGTCTTATTG
FKS1-F/FKS1-R	AGGCTGAGCGTCGTATTTCTTTC/CCCATTCAACGGGATGTAATTGTTTT
FKS2-F/FKS2-R	TCGTTCAAATGTTCCGGTGGTAAT/AAGGGAGGTTCTTCATCCAGGTAGG
CWH41-F/CWH41-R	CACTTACAATAAACTTGGCACTA/TTCCCATAGAAATAACCGATTCCCTCC
ROT2-F/ROT2-R	CCGATAAGCGTCCTTTCTTCTAA/CGGCTCCTATAAATGGCATAACCAGC
KRE5-F/KRE5-R	TCGAAAGCGACCCGCAATATGAC/ACATTAACGGCACGAACCAACCCAC
CNE1-F/CNE1-R	TGATAAATAATGCCAAGTACAAAG/TGCTGCTCTTCGTAGTATAGCGGGT
KRE11-F/KRE11-R	GTTCTGTTACCCAAATCAACTCAA/TGTGACTTCTGTTTCCCATGATGTTC
KRE6-F/KRE6-R	TCTCCATTTGGTGGGTATCCTGCTT/ACCTCCTTCTATCCAGTCTTGCCTC
SKN1-F/SKN1-R	CACCTGACAGTGCGAAGACAAGA/GTAGTTGTAACGGCATCTGGTGAG
KRE9-F/KRE9-R	ACAACCACTACAAACAACGCCAA/GACCCAAAGGTAGAGTAATATGTC
KNH1-F/KNH1-R	GGTGCCACGATTGATTCTAAGAGTT/ACCCTGGTGTACGGTAGTATGTT
KRE1-F/KRE1-R	TCAACAGAGCCACTATGCTACCAAC/ATACAGTCCCGAAGACAACGATGA
P1-A	GGGGCCAAGACATAGCTTTGGGCTT
P1-B	CCTGGGCCACCACACCGTGTGCATTCCG
P1-C	AACAATACCTGGGCCACCACACCG

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基: 酿酒酵母(*S. cerevisiae*)营养缺陷型菌株JY102 (*MAT α ura3 leu2 lys2*)是S288c的衍生菌株, 由本实验室保藏。*E. coli* DH 5 α 的培养采用LB培养基(蛋白胨10 g, 氯化钠10 g, 酵母提取物5 g, ddH₂O 1 L, pH 7.2–7.4), 转化子筛选时添加终浓度为100 mg/L的 Amp。YPD培养基(葡萄糖20 g, 蛋白胨20 g, 酵母提取物10 g, ddH₂O 1 L, pH 6.2)用于酵母培养。基本培养基YNB(不含氨基酸的酵母氮源6.7 g, 葡萄糖20 g, ddH₂O 1 L, pH 6.0–6.2)用于敲除转化子的筛选。

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制性内切酶、T4 DNA连接酶、MLV反转录酶及DNase I等购自大连宝生物工程有限公司, Invitrogen TRIzol Kit 购自Invitrogen, FastStart Universal SYBR Green Master 购自Roche, StepOnePlus实时荧光定量PCR仪购自Applied Biosystems。

1.2 *SNF1*基因插入突变与回补菌株的构建

根据酿酒酵母S288c的*SNF1*基因序列(基因编号: YDR477W), 设计引物SNF-F和SNF-R扩增*SNF1*基因的全序列, 将扩增的基因片段经*Sac* I和*Kpn* I双酶切后连接至空载体pBluescript SK(+), 形成重组载体pBS-SNF1。以S288c的总DNA为模板, 以URA3-F和URA3-R为引物扩增筛选标记基因*URA3*的全序列。利用*SNF1*基因内部存在的*Xho* I和*Bgl* II限制性酶切位点, 将*URA3*基因插入到重组载体pBS-SNF1的*SNF1*基因中, 从而打断*SNF1*基因, 形成上下游同源臂。通过电转化的方式, 将敲除质粒转入酿酒酵母营养缺陷型菌株JY102中, 在YNB基本培养基(补充亮氨酸和赖氨酸)上筛选阳性克隆, 并通过PCR方法验证。

构建*SNF1*回补菌株: 将重组载体pBS-SNF1通过电转化的方式转入*SNF1*缺失菌株(*snf1 Δ*)中, 在添加了尿嘧啶和5-氟乳清酸(5-FOA)的YNB平板

上筛选阳性克隆。酿酒酵母*URA3*的存在能够使5-FOA转变成5-氟脱氧尿苷, 阻遏细胞增殖导致细胞死亡。因而只有*URA3*基因不存在的转化子能够在此筛选平板上存活, 即筛选到原位回补菌株。

1.3 细胞壁完整性的检测

离心收集过夜培养的酵母细胞, 用无菌双蒸水洗涤菌体3次并重新悬菌, 调节初始浓度为 2×10^7 cells/mL, 并以10倍梯度稀释法对酵母细胞进行稀释。取5 μ L各稀释梯度的酵母细胞滴至含有刚果红或荧光增白剂的YPD平板上, 30 $^{\circ}$ C静置培养2 d, 观察酵母的生长情况。

1.4 菌株热激敏感性的检测

离心收集过夜培养的酵母细胞, 用无菌双蒸水洗涤菌体3次, 并在45 $^{\circ}$ C水浴锅中孵育细胞2 h。重悬细胞于无菌双蒸水中, 调节初始浓度为 2×10^7 cells/mL, 之后进行连续的10倍梯度稀释。取5 μ L目的细胞悬液滴至YPD平板上, 30 $^{\circ}$ C静置培养2 d, 观察酵母的生长情况。

1.5 酵母总RNA的提取及实时定量PCR (*qRT-PCR*)

将活化的酵母细胞转接至液体YPD培养基中, 30 $^{\circ}$ C摇床振荡培养18–24 h, 菌体离心收集后采用TRIzol法提取总RNA, 并用DNase I消化去除残留的DNA。取1 μ g的总RNA作为模板, 利用MLV反转录酶将其反转录成cDNA。1 μ L cDNA、10 μ L FastStart Universal SYBR Green Master、0.5 μ L各引物及8 μ L无菌双蒸水构成*qRT-PCR*的反应体系。*GAPDH*基因用作本实验的内参基因, $\Delta\Delta C_T$ 法计算靶基因的表达量, 重复3次。

2 结果和分析

2.1 酿酒酵母*SNF1*基因敲除菌株和回补菌株的构建

为了验证Snf1/AMPK蛋白激酶的功能, 我们

构建了*SNF1*基因的缺失菌株和功能回补菌株。菌株验证的2对引物分别是P1-A/P1-C及P1-B/P1-C。如图1所示,上游引物P1-A为*SNF1*敲除载体上游同源臂以外一段DNA序列, P1-B是位于*URA3*基因内部的引物, P1-C是*SNF1*敲除载体下游同源臂以外的引物。以敲除菌株的基因组DNA为模板,用P1-B/P1-C引物能够扩增出目的条带,而以野生型基因组DNA为模板,在相同的条件下不能扩增出目的条带。同样,以P1-A/P1-C为引物时,敲除菌株中由于*URA3*基因的插入,得到与野生型菌株大小不同的特异性条带,该结果与理论预测值相符。同时将PCR产物测序,确证通过同源重组成功得到了*SNF1*的敲除菌株。

在构建*SNF1*的回补菌株时,选用加有尿嘧啶和5-FOA的YNB平板来筛选阳性转化子。采用此方法,仅和重组载体上完整的*SNF1*基因发生了同源重组且*URA3*基因被替换的转化子在筛选平板上

存活,即发生了原位回补。以P1-A/P1-C及P1-B/P1-C引物对回补菌株进行验证,预期得到和野生型菌株一致的特异性条带。结果如图1所示,相应的PCR产物条带与理论值相符。该结果表明*SNF1*基因的缺失菌株及回补菌株构建成功,分别命名为*snf1Δ*、*snf1C*。

2.2 *snf1Δ*突变株对细胞壁抑制剂敏感

为了验证*SNF1*基因缺失后,突变株细胞壁的完整性是否受到影响,我们在分别含有2种细胞壁抑制剂(刚果红、荧光增白剂)的培养基上检测该突变株对细胞壁抑制剂的敏感性。如图2所示,在添加0.06 mg/mL刚果红或0.03 mg/mL荧光增白剂的YPD平板上,突变株的生长受到了极大的抑制,而野生型和回补菌株长势良好,说明突变菌*snf1Δ*的细胞壁完整性已经受到了破坏。这个表型与新型隐球酵母*snf1Δ*的表型相似^[20-21]。

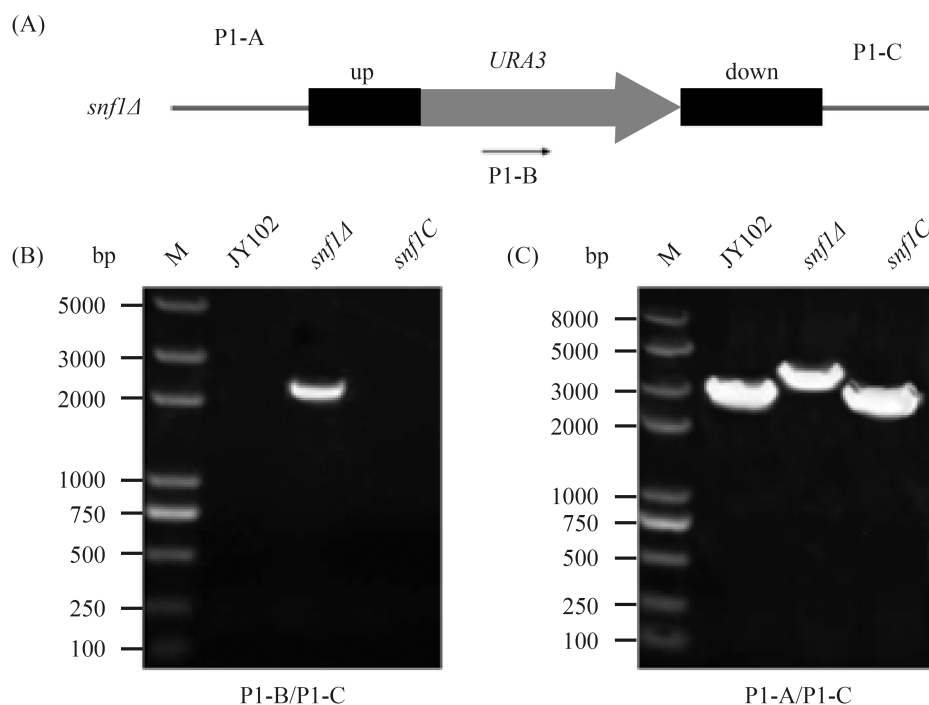


图 1. 敲除菌株和回补菌株的PCR验证

Figure 1. PCR verification of the *SNF1* disruption (A) and its complementation (B, C). The ORF of *SNF1* was replaced by *URA3* through homologous recombination. Primer pairs, P1-B/P1-C and P1-A/P1-C, were used for PCR verification. The locations of primers are indicated.

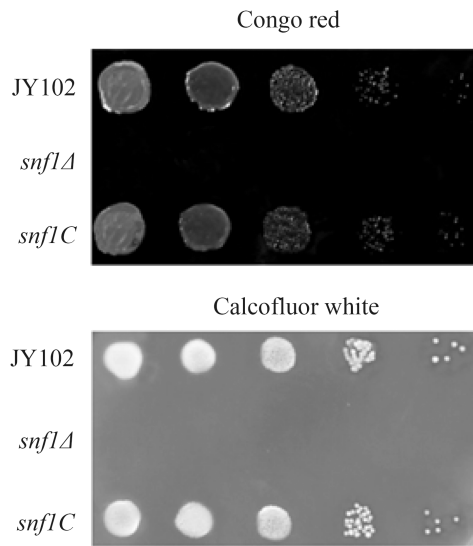


图 2. *snf1Δ* 突变株对细胞壁抑制剂敏感

Figure 2. *snf1Δ* mutant was severely sensitive to cell wall inhibitors. Fresh cells in serial dilution were spotted onto YPD agars supplemented with 0.06 mg/mL Congo red or 0.03 mg/mL Calcofluor white respectively, and cultured at 30 °C for 2 days.

2.3 *snf1Δ* 突变株对热激敏感

之前的研究工作表明, 新型隐球酵母 *SNF1* 基因参与机体的热激应答^[20]。为了验证酿酒酵母 *SNF1* 是否具有此功能, 我们检测了 *snf1Δ* 突变株对热激的敏感性。实验发现, 在经过 45 °C 热激 2 h 后, 与野生型和回补菌株相比, 突变菌株 *snf1Δ* 生长较弱(图3), 说明 *snf1Δ* 菌株在热激条件下的适应能力受到破坏。*snf1Δ* 突变株对热激的敏感可能是来源于热激应答的破坏, 也可能是由于细胞壁完整性的损坏。该表型与新型隐球酵母 *snf1Δ* 突变株表型相似^[20-21]。

2.4 qRT-PCR 分析 *snf1Δ* 突变株中细胞壁合成相关基因的表达

2.4.1 *SNF1* 是 β -1,3-葡聚糖合成相关基因的表达所必需的: 为探讨 Snf1 蛋白可能的下游作用通路, 本实验选择已知的参与细胞壁 β -1,3-葡聚糖合成的基因, *FKS1* 和 *FKS2*, 采用 qRT-PCR 的方法, 从转录水平上检测了 Snf1 蛋白激酶对其基因表达

的影响。结果如图4所示, 与野生型及回补菌株相比, *snf1Δ* 突变株中 *FKS1* 和 *FKS2* 的表达量均降低, 仅为野生型的 0.3 倍左右, 表明 *SNF1* 基因的缺失严重影响了酿酒酵母中 β -1,3-葡聚糖的合成基因的表达。

2.4.2 *SNF1* 参与 β -1,6-葡聚糖合成相关基因的表达: β -1,6-葡聚糖的合成途径尚未研究清楚, 但糖蛋白的分泌及其在细胞外的定位对其合成至关重要^[15]。一些内质网蛋白(*KRE5*、*CNE1*、*CWH41* 及

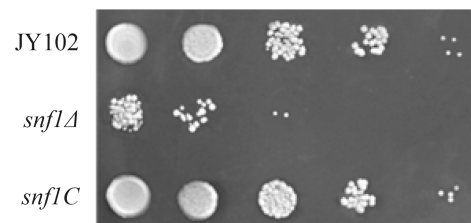


图 3. *snf1Δ* 突变株对热激敏感

Figure 3. Sensitivity of *snf1Δ* mutant to heat shock. Yeast cells were collected and incubated at 45 °C in water bath for 2 h. The cells were serially diluted and spotted onto YPD agars at 30 °C for 2 days.

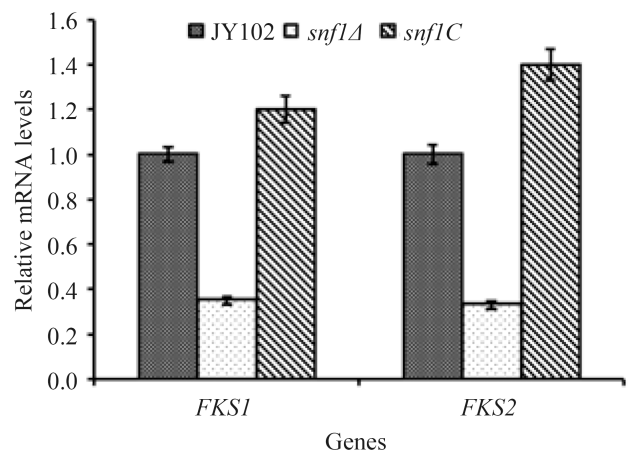


图 4. *snf1Δ* 突变株中 β -1, 3-葡聚糖合成相关基因的表达量

Figure 4. Expression of β -1,3-glucon-related genes in *snf1Δ* mutant. Total RNA was extracted and qRT-PCR was applied. The expression of *FKS1* and *FKS2* in *snf1Δ* mutant took account of approximate 30% of the JY102 wild-type strain respectively. The assay was performed in triplicate, and errors were expressed as the standard deviation.

ROT2, 分别编码葡糖转移酶、钙连蛋白、葡糖苷酶1和葡糖苷酶2)参与 β -1,6-葡聚糖的合成^[15,22]。本实验采用qRT-PCR的方法, 从转录水平上检测了Snf1蛋白激酶对该内质网蛋白表达的影响。结果如图5所示, 与野生型及回补菌株相比, *snf1Δ*突变株中*KRE5*、*CWH41*、*ROT2*及*CNE1*的表达量均降低, 分别为野生型的0.82、0.32、0.46及0.33倍。

*KRE11*基因编码1种胞浆蛋白, 参与葡聚糖在内质网和高尔基体之间的转运, 对 β -1,6-葡聚糖的合成至关重要^[23]。通过qRT-PCR的方法, 本研究发现*SNF1*基因缺失严重影响了*KRE11*基因的表达, 使其表达量降为野生型的0.43倍, 而*SNF1*基因的回补恢复了*KRE11*的正常表达(图6)。

*KRE6*和*SKN1*编码高尔基体上的II型膜蛋白, 在 β -1,6-葡聚糖的合成中具有重要作用^[16-17]。qRT-PCR的结果表明, 与野生型和回补菌株相比, *snf1Δ*突变株中*KRE6*和*SKN1*的表达量略微下调(图7)。

*KRE9*和*KNH1*编码细胞表面糖蛋白, *Kre1p*是一种和细胞壁相关的锚合蛋白^[15,19]。本实验发

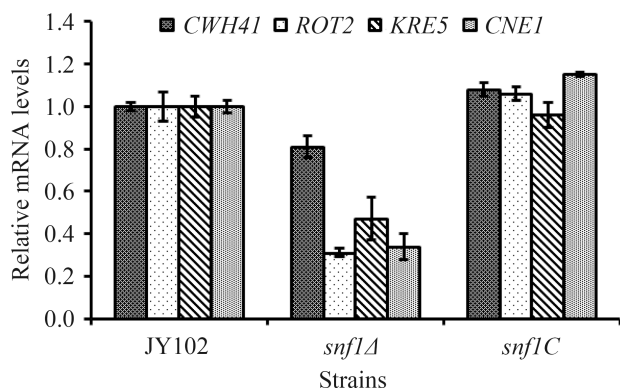


图5. 与 β -1,6-葡聚糖合成相关的内质网蛋白基因的表达量变化

Figure 5. Expression of β -1,6-glucan-related genes in *snf1Δ* mutant which encodes endoplasmic reticulum proteins. Transcriptional levels of *KRE5*, *CWH41*, *ROT2* and *CNE1* reduced to 82%, 32%, 46% and 33% of the respective level in JY102. The assay was performed in triplicate, and errors were expressed as the standard deviation.

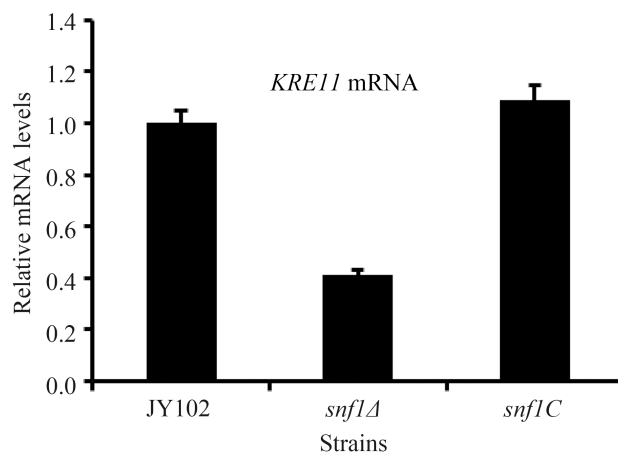


图6. 与 β -1,6-葡聚糖合成相关的胞浆蛋白基因的表达量变化

Figure 6. Expression of β -1,6-glucan-related genes in *snf1Δ* mutant which encodes a predicted cytoplasmic protein. Transcriptional level of *KRE11* reduced to 43% of that in JY102. The assay was performed in triplicate, and errors were expressed as the standard deviation.

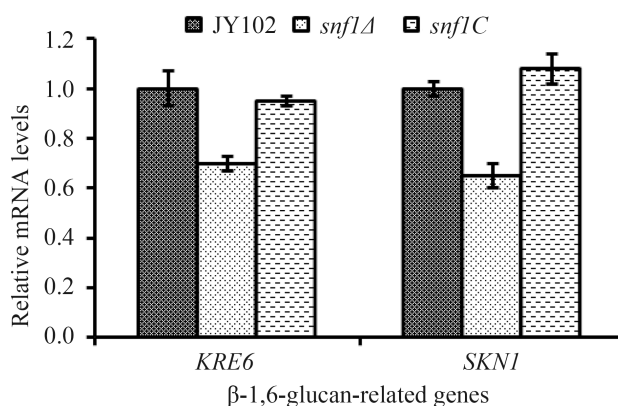


图7. 与 β -1,6-葡聚糖合成相关的高尔基体糖蛋白基因的表达量变化

Figure 7. The expression of β -1,6-glucan-related genes in *snf1Δ* mutant which encodes glycoproteins located in the Golgi. Transcriptional levels of *KRE6* and *SKN1* reduced slightly compared to that of JY102. The assay was performed in triplicate, and errors were expressed as the standard deviation.

现, *snf1Δ*突变株中*KRE9*和*KRE1*的表达量分别降至野生型的0.49及0.36倍, 而*KNH1*基因的表达量降至野生型的0.08倍(图8)。

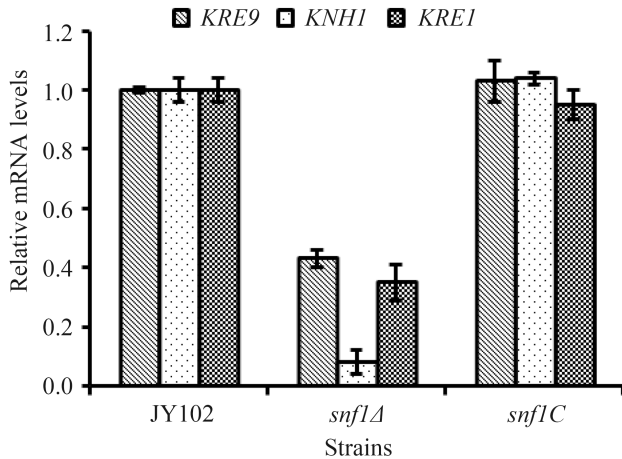


图 8. 与 β -1,6-葡聚糖合成相关的细胞表面蛋白基因的表达量变化

Figure 8. The expression of β -1,6-glucan-related genes in *snf1Δ* mutant which encodes cell-surface proteins. Transcriptional levels of *KRE9*, *KNH1* and *KRE1* took account of approximate 49%, 8% and 36% of the respective level in JY102. The assay was performed in triplicate, and errors were expressed as the standard deviation.

通过上述实验发现, 在*snf1Δ*突变株中, β -1,6-葡聚糖合成相关基因的表达量均降低。该结果表明, *SNF1*基因的缺失在转录水平上影响了 β -1,6-葡聚糖的合成。

3 讨论

外界环境压力复杂多变, 细胞壁作为细胞的一个重要屏障, 为保护细胞免受一些极端环境的损害起到了重要作用。本研究通过同源重组的方法构建了*SNF1*基因敲除菌株, 验证了*SNF1*缺失菌株对细胞壁抑制剂异常敏感, 表明*SNF1*参与细胞壁的合成和细胞壁完整性的维持。在本实验中, 采用了2种细胞壁抑制剂来检测该菌株细胞壁的完整性。刚果红主要和细胞的葡聚糖相互作用, 抑制细胞壁微纤丝的排列, 其作用细胞后使细胞表现为出芽但是不分离的现象, 若浓度过高则会抑制细胞的生长; 荧光增白剂主要干扰细胞壁几丁

质的分布。在添加0.06 mg/mL 刚果红或0.03 mg/mL 荧光增白剂的YPD平板上, 与野生型及回补菌株相比, 突变株细胞几乎不能生长, 说明突变菌株的细胞壁完整性受到破坏。

为探究Snf1蛋白激酶是通过什么通路来影响细胞壁完整性的, 我们利用酿酒酵母研究积累的丰富信息和数据, 检测了下游的一些参与细胞壁合成的基因表达情况。酿酒酵母细胞壁的主要成分为甘露糖, 葡聚糖与几丁质, 其中又以葡聚糖为主。研究表明, *FKS1*和*FKS2*基因对于 β -1,3-葡聚糖的合成至关重要, 其缺失突变导致 β -1,3-葡聚糖的合成减少, β -1,6-葡聚糖的合成也受到轻微影响。*Fks1p*及*Fks2p*是 β -1,3-葡聚糖合成酶的重要组件^[12-14]。本实验通过qRT-PCR检测发现, *snf1Δ*突变株中*FKS1*和*FKS2*的表达量均降低(仅为野生型的30%), 说明*SNF1*基因的突变导致细胞壁 β -1,3-葡聚糖合成相关基因的转录抑制。

β -1,6-葡聚糖是真菌特异性的细胞壁组分, 其合成酶及合成途径尚未研究清楚。之前的研究通常采用基因敲除的方法来确定 β -1,6-葡聚糖合成相关的基因。初步的研究结果表明糖蛋白的运输及分泌在 β -1,6-葡聚糖的合成中具有重要作用^[15-19]。在本实验中, 我们检测了一系列和 β -1,6-葡聚糖合成有关的基因, 涉及 β -1,6-葡聚糖在内质网、高尔基体和胞质中的运输及其在细胞表面的定位。研究发现, 在*snf1Δ*突变株中, β -1,6-葡聚糖合成相关基因的表达量均有不同程度下调, 说明*SNF1*基因的突变也导致细胞壁 β -1,6-葡聚糖合成相关基因的转录抑制。这些证据预示了*SNF1*基因通过影响葡聚糖合成相关基因的转录调控着细胞壁的完整性。同时, 该研究结果也为 β -1,6-葡聚糖合成途径的探索提供了一些指引。值得注意的是, β -1,3-葡聚糖和 β -1,6-葡聚糖的合成途径并不是完全分开的, 比如*fks1Δ*突变株中 β -1,6-葡聚糖的合成略微降低^[14], *kre6Δ*突变株中 β -1,3-葡聚糖也有所减少^[16]。

另外, 本实验还发现酿酒酵母*SNF1*基因缺失影响细胞对热激反应的应答能力, 该表型在新型隐球酵母中也得到验证, 其中的应答机制有待研究。综上所述, 本实验验证了酿酒酵母Snf1蛋白激酶对细胞壁完整性的影响, 并在转录水平上提供了证据表明*SNF1*参与细胞壁合成过程, 促进细胞壁合成相关基因的表达。另一方面, 该实验结果初步表明*SNF1*调节 β -1,6-葡聚糖合成基因, 启发我们可以从*SNF1*出发, 探索 β -1,6-葡聚糖的合成途径。

参考文献

- [1] Ghillebert R, Swinnen E, Wen J, Vandesteene L, Ramon M, Norga K, Rolland F, Winderickx J. The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. *FEBS Journal*, 2011, 278(21): 3978–3990.
- [2] Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8(10): 774–785.
- [3] Hedbacker K, Carlson M. SNF1/AMPK pathways in yeast. *Frontiers in Bioscience*, 2008, 13(7): 2408–2420.
- [4] Hedbacker K, Hong SP, Carlson M. Pak1 protein kinase regulates activation and nuclear localization of Snf1-Gal83 protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(18): 8255–8263.
- [5] Kim MD, Hong SP, Carlson M. Role of Tos3, a Snf1 protein kinase, during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on nonfermentable carbon sources. *Eukaryotic Cell*, 2005, 4(5): 861–866.
- [6] Sanz P, Alms GR, Haystead TAJ, Carlson M. Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20(4): 1321–1328.
- [7] Cannon JF, Pringle JR, Fiechter A, Khalil M. Characterization of glycogen-deficient *glc* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1994, 136(2): 485–503.
- [8] Huang DQ, Wilson WA, Roach PJ. Glucose-6-P control of glycogen synthase phosphorylation in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(36): 22495–22501.
- [9] Thompson-Jaeger S, Francois J, Gaughran JP, Tatchell K. Deletion of *Snf1* affects the nutrient response of yeast and resembles mutations which activate the adenylate cyclase pathway. *Genetics*, 1991, 129(3): 697–706.
- [10] Lipke PN, Ovalle R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(15): 3735–3740.
- [11] Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2002, 26(3): 239–256.
- [12] Manners DJ, Masson AJ, Patterson JC. The structure of a β -(1→3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochemical Journal*, 1973, 135(1): 19–30.
- [13] Inoue SB, Takewaki N, Takasuka T, Mio T, Adachi M, Fujii Y, Miyamoto C, Arisawa M, Furuichi Y, Watanabe T. Characterization and gene cloning of (1→3)- β -D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *The FEBS Journal*, 1995, 231(3): 845–854.
- [14] Dijkgraaf GJP, Abe M, Ohya Y, Bussey H. Mutations in Fks1p affect the cell wall content of β -1,3- and β -1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2002, 19(8): 671–690.
- [15] Lesage G, Bussey H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(2): 317–343.
- [16] Roemer T, Bussey H. Yeast β -glucan synthesis: *KRE6* encodes a predicted type II membrane protein required for glucan synthesis *in vivo* and for glucan synthase activity *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(24): 11295–11299.
- [17] Roemer T, Delaney S, Bussey H. SKN1 and KRE6 define a pair of functional homologs encoding putative membrane proteins involved in β -glucan synthesis. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, 13(7): 4039–4048.
- [18] Roemer T, Paravicini G, Payton MA, Bussey H. Characterization of the yeast (1→6)- β -glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. *Journal of Cell Biology*, 1994, 127(2): 567–579.
- [19] Brown JL, Bussey H. The yeast KRE9 gene encodes an O glycoprotein involved in cell surface β -glucan assembly. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, 13(10): 6346–6356.
- [20] Yang J, Li D, Pan J, Zhu XD. Snf1/AMPK protein kinase modulates cell wall integrity in the human pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Acta Microbiologica Sinica*,

- 2011,51(6): 740–746. (in Chinese)
- 杨娇, 李东, 潘皎, 朱旭东. 人类致病菌新型隐球酵母 Snf1/AMPK 蛋白激酶调节细胞壁的完整性. *微生物学报*, 2011,51(6): 740–746.
- [21] Yang J, Li D, Liu XG, Pan J, Yan B, Zhu XD. Regulation of virulence factors, carbon utilization and virulence by *SNF1* in *Cryptococcus neoformans* JEC21 and divergent actions of *SNF1* between cryptococcal strains. *Fungal Genetics and Biology*, 2010, 47(12): 994–1000.
- [22] Backhaus K, Rippert D, Heilmann CJ, Sorgo AG, De Koster CG, Klis FM, Rodicio R, Heinisch JJ. Mutations in *SNF1* complex genes affect yeast cell wall strength. *European Journal of Cell Biology*, 2014, 92(12): 383–395.
- [23] Shahinian S, Bussey H. β -1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 2000, 35(3): 477–489.

Snf1/AMPK affects cell wall integrity through regulating the transcription of cell wall assembly-related genes in *Saccharomyces cerevisiae*

Ping Zhang¹, Qiang Zhao¹, Dongsheng Wei¹, Jiao Yang¹, Xiangyang Zhu¹,
Xudong Zhu^{1,2*}

¹ National Key Program of Microbiology and Department of Microbiology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

² Institute of Biochemistry and Molecular Biology, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

Abstract: [Objective] To study the role of Snf1/AMPK kinase in cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae* JY102. [Methods] *SNF1* deletion mutant of *S. cerevisiae* was created by homologous recombination. Congo red and Calcofluor white were applied to evaluate the cell wall integrity for the mutant strain. *qRT*-PCR was used to analyze the transcription of cell wall-related genes. [Results] The *SNF1* disruption mutant was severely sensitive to Congo red and Calcofluor white, manifesting the impairment of cell wall integrity. The mutant exhibited apparently growth defect at high temperature. The results of *qRT*-PCR revealed down-regulated transcription of several genes involved in β -glucan biosynthesis. [Conclusion] The deletion of *Snf1* impairs the cell wall integrity by reducing the transcription of β -glucan-related genes, suggesting a new role of Snf1 in the activation of cell wall synthesis.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Snf1/AMPK protein kinase, cell wall integrity, β -glucan

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81271801)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-22-23506510; E-mail: xudong82@nankai.edu.cn

Received: 9 October 2015; Revised: 22 December 2015; Published online: 12 January 2016