



# H4K5 去乙酰化对镍胁迫下酿酒酵母细胞壁完整性途径的调控作用

包娜娜<sup>1,2</sup>, 郭艳飞<sup>1</sup>, 刘冬冬<sup>1</sup>, 赵秀娟<sup>1\*</sup>

1 内蒙古科技大学生命科学与技术学院, 内蒙古 包头 014010

2 包头市肿瘤医院, 内蒙古 包头 014030

包娜娜, 郭艳飞, 刘冬冬, 赵秀娟. H4K5 去乙酰化对镍胁迫下酿酒酵母细胞壁完整性途径的调控作用[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 869-881.

BAO Nana, GUO Yanfei, LIU Dongdong, ZHAO Xiujuan. H4K5 deacetylation regulates cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to nickel stress[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 869-881.

**摘要:**【目的】金属镍(nickel, Ni)是人类广泛接触的重金属污染物之一, 镍暴露会激活细胞内的细胞壁完整性(cell wall integrity, CWI)信号通路, 也会导致细胞内组蛋白乙酰化水平降低, 但 CWI 途径在镍胁迫时是否受组蛋白乙酰化调控尚不完全清楚。【方法】利用组蛋白定点突变型菌株 H4K5R (模拟去乙酰化状态), 分析镍胁迫下 H4K5 去乙酰化对酿酒酵母 CWI 途径的调控作用【结果】与野生型菌株相比, 定点突变型菌株 H4K5R 具有较强的镍抗性: 在 5.0 mmol/L NiCl<sub>2</sub> 胁迫下, 定点突变型菌株仍能生长良好; Western blotting 与 qRT-PCR 结果表明, 野生型菌株 BY4741 在 5.0 mmol/L NiCl<sub>2</sub> 胁迫下细胞壁完整性途径被激活, 甘露聚糖与葡聚糖调控基因 *Mnn9* 表达量显著上调 3.13 倍、*Fks1* 表达量显著上调 1.49 倍, 甘露聚糖、β-葡聚糖的含量也增加, 说明此时野生型菌株激活了 CWI 途径, 细胞壁成分含量增加; 定点突变型菌株 H4K5R 在 5.0 mmol/L NiCl<sub>2</sub> 胁迫下 CWI 途径激活程度较轻, 虽然 *Mnn9*、*Fks1* 表达量上调, 但甘露聚糖含量变化并不显著, 而相较于野生型菌株 β-葡聚糖含量增加幅度较小。【结论】在 5.0 mmol/L NiCl<sub>2</sub> 胁迫下, 定点突变型菌株 H4K5 位点的去乙酰化调控 CWI 途径, 进而影响细胞壁组分的变化。

**关键词:** 组蛋白去乙酰化; 镍胁迫; 酿酒酵母; 细胞壁完整性途径

资助项目: 国家自然科学基金(21767020); 自治区直属高校基本科研业务费项目(BR22-15-05, 2023RCTD019)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (21767020) and the Fundamental Research Funds for Autonomous Region Directly Affiliated Universities (BR22-15-05, 2023RCTD019).

\*Corresponding author. E-mail: nmzxj1977@163.com

Received: 2023-08-31; Accepted: 2023-12-11; Published online: 2023-12-18

# H4K5 deacetylation regulates cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to nickel stress

BAO Nana<sup>1,2</sup>, GUO Yanfei<sup>1</sup>, LIU Dongdong<sup>1</sup>, ZHAO Xiujuan<sup>1\*</sup>

1 School of Life Science and Technology, Inner Mongolia University of Science & Technology, Baotou 014010, Inner Mongolia, China

2 Baotou Cancer Hospital, Baotou 014030, Inner Mongolia, China

**Abstract:****[Objective]** Nickel (Ni) is one of the heavy metal pollutants to which humans are widely exposed, and nickel exposure activates the cell wall integrity (CWI) signaling pathway, which lowers the level of intracellular histone acetylation. However, whether the CWI pathway is regulated by histone acetylation under nickel stress remains to be fully understood. **[Methods]** We used the histone-targeted mutant strain H4K5R (mimicking the deacetylated state) to study the regulation of the CWI pathway in *Saccharomyces cerevisiae* by H4K5 deacetylation under nickel stress, aiming to lay a foundation for unveiling the regulatory role of histone modifications in eukaryotes in response to heavy metal stress. **[Results]** Compared with the wildtype strain, H4K5R had strong nickel resistance, being able to grow in the presence of 5.0 mmol/L NiCl<sub>2</sub>. The results of Western blotting and qRT-PCR showed that the CWI pathway of the wildtype strain BY4741 was activated under 5.0 mmol/L NiCl<sub>2</sub>, with the expression of *Mnn9* (encoding  $\alpha$ -1,6-mannosyl transferase) and *Fks1* (encoding glucan synthase) being up-regulated by 3.13 folds and 1.49 folds, respectively. Moreover, the content of mannan and  $\beta$ -glucan were increased, which indicated that the wildtype strain activated the CWI pathway to increase the content of cell wall component. The activation of the CWI pathway in H4K5R was mild under the stress of 5.0 mmol/L NiCl<sub>2</sub>. Although the expression of *Mnn9* and *Fks1* was up-regulated, the changes in mannan content were not significant, and the increase in  $\beta$ -glucan content was less than that of the wildtype strain. **[Conclusion]** Under 5.0 mmol/L NiCl<sub>2</sub> stress, the deacetylation of H4K5 in the mutant strain regulated the CWI pathway, which affected the changes in cell wall components.

**Keywords:** histone deacetylation; nickel stress; *Saccharomyces cerevisiae*; cell wall integrity pathway

镍作为人类机体活动中一类必需的微量元素,不论在生活还是工业领域都得到了广泛的应用,然而由于其特殊的性质,长期(大量)接触镍及其化合物容易导致机体损伤<sup>[1]</sup>。尤其是工业生产中的镍化合物,如氯化镍、氧化镍和硫酸镍等,具有强致病性和致癌性<sup>[2]</sup>。随着对镍的深入了解,有研究表明镍离子能够通过降低哺乳动物细

胞和酵母细胞内的组蛋白乙酰化水平,进而调控基因表达<sup>[3]</sup>。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)拥有完整的细胞壁,其质量占整个干重的 15%–30%,主要由甘露聚糖(31%)、 $\beta$ -葡聚糖(29%–64%)以及几丁质(1%–2%)组成,这些成分之间通过多种方式进行交联,酿酒酵母细胞壁的外层富含 O-

和 N-甘露糖化蛋白, 在电子显微镜下呈现为电子致密部分, 在酿酒酵母中, 甘露糖蛋白被证明携带多达 200 个甘露糖残基, 每个 N-连接的多糖约占细胞壁干质量的 40%<sup>[4]</sup>。质膜附近的细胞壁主要由  $\beta$ -1,6 键分支的  $\beta$ -1,3-葡聚糖和少量几丁质组成, 几丁质将葡聚糖聚合物和其他壁上化合物连接成承载基质<sup>[5-6]</sup>。 $\beta$ -1,3-葡聚糖是酵母细胞壁的主要成分, 由  $\beta$ -1,3-葡聚糖合成酶合成,  $\beta$ -1,3-葡聚糖合成酶由至少两个亚单位组成, 即 FKS1 和 FKS2<sup>[7]</sup>。FKS 基因的破坏导致体外  $\beta$ -1,3-葡聚糖合成酶活性降低, 从而降低细胞壁中  $\beta$ -1,3-葡聚糖的水平<sup>[8]</sup>, 而同时删除这 2 个基因是致命的, 这表明  $\beta$ -1,3-葡聚糖合成对真菌存活具有重要意义。FKS1/FKS2 亚单位受 RHO1 GTPase 调节, RHO1 GTPase 也是生存所必需的<sup>[7]</sup>。几丁质可以通过连接  $\beta$ -1,6-葡聚糖或者  $\beta$ -1,3-葡聚糖, 有效地降低  $\beta$ -1,3-葡聚糖的可溶性, 帮助细胞壁提升机械强度, 酿酒酵母内有 3 种主要的几丁质合成酶, 分别是 CHS1、CHS2 和 CHS3, 其中 CHS3 为酵母细胞的主要几丁质合成酶, 大多数几丁质的合成主要由 CHS3 完成<sup>[9]</sup>。

酿酒酵母的细胞壁是一种坚固而有弹性的结构, 不仅对维持酿酒酵母的形状和完整性具有不可或缺的作用, 而且对细胞外应激信号的传导也是必不可少的。在 Levin<sup>[10]</sup>的研究中, 通过使用多糖结合剂, 如硫代荧光白、刚果红、氨基糖苷类抗生素和十二烷基硫酸钠, 或通过突变丧失制造细胞壁组分的能力削弱细胞壁, 从而使细胞受到胁迫。这种胁迫会有效地激活细胞壁完整性途径(cell wall integrity, CWI), 并导致细胞壁的补偿性合成。细胞外应激信号传导的过程主要受细胞壁完整性信号通路的调控。有研究表明, CWI 途径通过细胞壁感受器 WSC1、WSC2、WSC3、MID2 和 MTL1 的 N 末端区域与细胞壁相互作用, 这些传感器与 PIP2 一起刺激 RHO1

上的核苷酸交换, RHO1 激活 5 个效应因子, 其中 PKC1 MAP 激酶级联核心模块由丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶(mitosolysis activates protein kinase kinase kinase, MAPKKK)、丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶 (MAPK kinase kinase, MEKK/BCK1)、MAPKK 激酶(MKK1/MKK2)以及 MAPK SLT2 组成, MAPK 级联既用于放大细胞表面启动的小信号, 又用于将分级输入转换为高度灵敏的、类似开关的响应。MAPK 激酶级联不会由低幅度或低持续时间的信号触发, 但会对达到激活阈值的刺激做出快速和充分的反应。激活 CWI 信号可以调节细胞壁各种碳水化合物聚合物, 比如几丁质、甘露聚糖或者是葡聚糖等物质的产生和合成, 以对抗细胞壁应力<sup>[11-13]</sup>。

当酵母细胞受到重金属胁迫时会激活细胞内的细胞壁完整性信号通路<sup>[14]</sup>, 也会导致胞内组蛋白乙酰化水平降低<sup>[15]</sup>, 但 CWI 途径是否受组蛋白乙酰化调控尚不完全清楚。在本研究中, 基于组蛋白定点突变型菌株 H4K5R (组蛋白 H4 第 5 位 Lys 替换为 Arg), 模拟胞内 H4K5 位点去乙酰化的状态<sup>[16]</sup>, 检测其在 NiCl<sub>2</sub> 胁迫下菌株的生长情况, 同时观测与酵母细胞壁完整性途径具有相关性的基因表达, 分析 NiCl<sub>2</sub> 胁迫下酿酒酵母 CWI 途径受 H4K5 位点去乙酰化的具体调控作用机制, 为理解表观遗传修饰调控细胞对重金属胁迫的响应机制提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

酿酒酵母野生型菌株 BY4741 (*MATa*; *his3 $\Delta$ 1*; *leu2 $\Delta$ 0*; *met15 $\Delta$ 0*; *ura3 $\Delta$ 0*)及定点突变型菌株 H4K5R (组蛋白 H4 第 5 位 Lys 替换为 Arg)<sup>[17]</sup>均为本实验室保存。

## 1.2 菌种活化

将实验室保存的原始菌悬液采用连续划线法在酵母膏胨葡萄糖琼脂固体培养基(yeast peptone dextrose, YPD)上接种,置于 30 °C 恒温箱培养 18–24 h 后,选择大小合适的单菌落,将其转接入无菌液体 YPD 培养基中,30 °C、200 r/min 进行活化,待其生长至对数生长末期( $OD_{600}$  为 1.95 左右)取出并用于后续试验。

## 1.3 菌种突变位点及组蛋白乙酰化水平的鉴定

收集  $NiCl_2$  处理后对数生长末期( $OD_{600}$  为 1.95)的野生型菌株 BY4741 与定点突变型菌株 H4K5R 的细胞;使用高速冷冻离心机于 4 °C、3 000 r/min 离心 5 min 后,弃去上清液,称量湿重;洗涤所得细胞 2 次,加入缓冲液对其进行重悬,浓度为 0.1 g/mL;使用超声破碎仪(50%功率)(SONICS)进行破碎,超声时间为 30 s 一次,间隔为 30 s,单个样本共计超声时间为 9 min,所有的操作均在冰上进行;随后,按照 1:100 的比例加入蛋白酶抑制剂,分装后于-20 °C 冷冻保存。提取的蛋白样品在 15% SDS-PAGE 蛋白胶上分离,并通过电泳迁移转移到聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。将膜封闭在 5% 牛奶/TBST(0.9% 氯化钠, 10 mmol/L Tris-HCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5)缓冲液中,并分别与一抗 Tublin (1:1 000, Abcam)、H4K5ac (1:2 000, Abcam) 4 °C 过夜。用 TBST 缓冲液洗涤 3 次后,将膜浸入含有辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)结合的二抗(1:12 000, Abcam)室温放置 1 h。

## 1.4 倍比稀释表型及生长曲线的测定

使用离心机 8 000 r/min 离心 3 min 后收集细胞,无菌 PBS 洗涤并重悬,采用倍比稀释法,依次按照  $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$  CFU/mL 调整细胞数,操作完成取 3  $\mu$ L 点样于含  $NiCl_2$  的固体 YPD 培养基上,固体培养基中  $NiCl_2$  的浓度

依次为 0、2.5、3.5、5.0 mmol/L, 30 °C 倒置培养 48 h。

将活化后的野生型菌株 BY4741 及定点突变型菌株 H4K5R 分别转接至液体 YPD 培养基进行活化培养,培养至对数生长期为止,再转接至含有 0、2.5、3.5、4.5、5.0、5.5、6.0、7.0、7.5 mmol/L  $NiCl_2$  的液体 YPD 培养基中进行培养。为保证试验数据的真实性,每组共设置 3 个生物学重复、3 个技术重复。在培养的过程中,恒温摇床温度设定为 30 °C,转速为 200 r/min。每间隔 2 h,使用紫外可见分光光度计对  $OD_{600}$  值进行一次检测,并详细记录。

## 1.5 RNA 提取及反转录

在酿酒酵母的培养当中,按照 1.2 中标准收集对数生长期的菌液,采用改良热酚法<sup>[18]</sup>提取酿酒酵母总 RNA,并进行反转录,反转录步骤详见试剂盒说明书(PrimeScript™ RT Reagent Kit, TaKaRa),反转录产物-20 °C 保存。

## 1.6 引物设计

根据参考酿酒酵母标准菌株 S288C 基因组中的 *Wsc2*、*Mid2*、*Rho1*、*Slt2*、*Chs3*、*Fks1* 和 *Mnn9* 基因序列,通过 NCBI 数据库中的 Primer-BLAST 软件进行引物设计,所选内参基因为  $\beta$ -actin<sup>[19]</sup>。引物合成自 GENEWIZ 公司,具体引物序列见表 1。

## 1.7 qRT-PCR 及数据处理

qRT-PCR 反应体系: OX Reference DyeII 0.8  $\mu$ L, TB Green™ Premix Ex TaqII 10  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, 上下游引物 0.4  $\mu$ L, 无菌水 6.8  $\mu$ L。qRT-PCR 扩增程序: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 60 °C 34 s, 循环 40 次。定量 PCR 仪购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

在进行上述步骤后,使用 SPSS 19.0 对相关的数据进行统计分析,使用 Origin 8.5 进行绘图。两组之间的数据比较采用单因素方差分析,其中,  $P < 0.05$  表示差异显著;  $P < 0.01$  表示差异极显著。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

Gene	Primer sequence (5'→3')
<i>β-actin</i>	F: ACTTTCAACGTTCCAGCCTTC R: CGTAAATTGGAACGACGACGTGAGTA
<i>Wsc2</i>	F: GATGCTGACGCTAACCCCTGT R: AATAGAATCTCTGCCGCCCG
<i>Mid2</i>	F: TCGTCTACCAGCATTGCCTC R: TCGGGATGTCGAAGAGATGG
<i>Rho1</i>	F: TGAGAAACGACCCACAAACC R: CAATGAAGCTCTAGTGCCGG
<i>Slf2</i>	F: TCCAAGAGAAATTGCCGTGC R: TCCACGGAATAGGCGTCTTA
<i>Chs3</i>	F: GTGCGATTGTGGCTTTCCTG R: TTGTATACCGAACGCGAGG
<i>Mnn9</i>	F: CCGCCTAAGAAAGAACCCGT R: GTGTGCCCATTTGTGTTGGG
<i>Fks1</i>	F: GGTAACGGGCAAAGTCAGGA R: CTTCACTACCAGCAGCGACA

## 1.8 Western blotting 检测

蛋白提取详细步骤参考 1.3。将提取出的蛋白样品分别与一抗 Tubulin (1:1 000, Abcam)、SLT2 (1:2 000, Abcam, ab 124 636)、p-SLT2 (1:1 000, Abcam, ab124 637) 4 °C 过夜。用 TBST 洗涤 3 次后,将膜浸入含有辣根过氧化物酶(HRP)结合的二抗(1:12 000, Abcam)室温放置 1 h。

## 1.9 葡聚糖、甘露聚糖含量的测定

葡聚糖、甘露聚糖检测试剂盒均购自南京钻恒试剂公司,具体操作步骤参考试剂盒说明书。

## 1.10 几丁质测定

对野生型菌株 BY4741 和定点突变型菌株 H4K5R 进行活化,将其转接到液体 YPD 培养基中,培养至对数生长末期为止。取活化好的酿酒酵母细胞于 1.5 mL EP 管中,8 000 r/min 离心 2 min 后去除上清,收集菌体沉淀。向荧光增白剂中加入一定量的蒸馏水,制备成浓度为 5 mmol/L 的母液备用。对荧光增白剂母液进行稀释,一直到终浓度为 25 μmol/L 为止,制备出染液

工作液。取染液工作液 500 μL,加入酵母细胞涡旋振荡。30 °C 避光孵育 45 min 后,8 000 r/min 离心 2 min,去除上清液,收集细胞。对收集好的细胞进行洗涤,洗涤液 TE 缓冲液(主要成分为浓度为 10 mmol/L Tris-HCL 和 EDTA, pH 8.0)量为 1 mL。8 000 r/min 离心 2 min 后再次去除上清液,收集细胞。最后用 1 mL TE 缓冲液重悬细胞,取 200 μL 使用荧光酶标仪在黑色酶标板中进行荧光值测定<sup>[20]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 定点突变型菌株 H4K5R 乙酰化水平

通过测序手段对定点突变型菌株 H4K5R 的突变位点进行验证,试验结果如图 1A 所示,组蛋白 H4 第 5 位密码子由 AAG (编码赖氨酸 K)

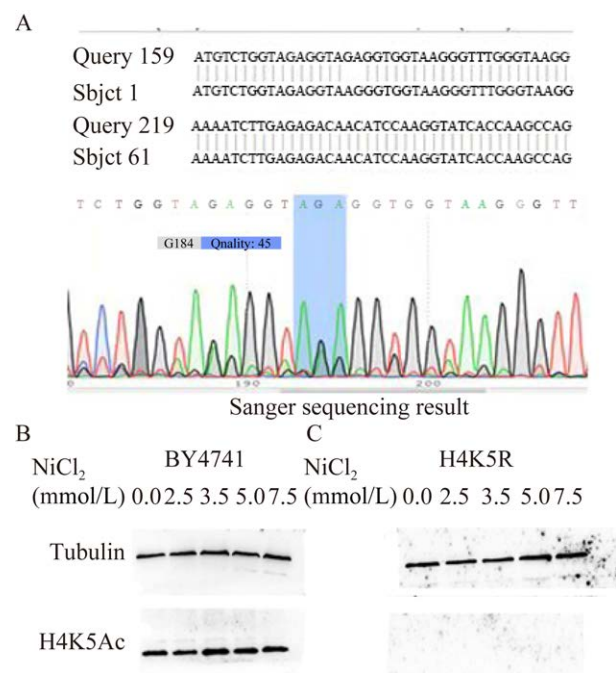


图 1 H4K5R 定点突变位点及乙酰化水平的检测  
Figure 1 Detection of H4K5R site-directed mutagenesis sites and acetylation levels. A: Sanger sequencing. B: H4K5 acetylation level of BY4741. C: H4K5 acetylation level of H4K5R.

变为 AGA (编码精氨酸 R), 说明突变株在 H4K5 位点发生突变; 再采用 Western blotting 对该位点的乙酰化水平进行检测, 已有研究表明, H4K5 位点由赖氨酸突变为精氨酸后可以模拟细胞内去乙酰化状态<sup>[16]</sup>, 我们对此也进行了验证, 野生株 BY4741 在正常情况下 H4K5 位点未发生突变, 乙酰化状态如图 1B 所示, 定点突变型菌株 H4K5R 乙酰化状态如图 1C 所示, H4K5 位点由赖氨酸突变为精氨酸后, 未发生乙酰化, 故可以用该菌株模拟 H4K5 位点去乙酰化状态, 进行后续的试验。

## 2.2 组蛋白定点突变型菌株生长表型与生长曲线

采用倍比稀释表型分析法, 检测组蛋白定点突变型菌株及野生型菌株在不同 NiCl<sub>2</sub> 浓度胁迫下菌株的生长情况。由图 2A–C 可见, 在浓度为

0、2.5、3.5 mmol/L NiCl<sub>2</sub> 的 YPD 培养基上, 野生型菌株与定点突变型菌株的生长情况基本一致, 差异不大。当 NiCl<sub>2</sub> 浓度增加至 5.0 mmol/L 时(图 2D), BY4741 生长受到抑制, 而 H4K5R 几乎不受影响。

为了筛选出最适镍胁迫的浓度, 本文对不同浓度 NiCl<sub>2</sub> 处理的野生型菌株和定点突变型菌株进行了比对分析, 并绘制了生长曲线。由图 3A 可知, 在 2.5 mmol/L NiCl<sub>2</sub> 处理下, 野生型菌株未受到影响, 但是随着 NiCl<sub>2</sub> 浓度的逐渐升高, BY4741 的生长受到显著抑制; 由图 3B 可知, 在 NiCl<sub>2</sub> 浓度小于 5.0 mmol/L 时, H4K5R 生长未受到抑制, 随着 NiCl<sub>2</sub> 浓度升高至 6.0 mmol/L 时, H4K5R 生长才受到抑制。根据以上试验结果, 选择 5.0 mmol/L NiCl<sub>2</sub> 作为胁迫浓度。

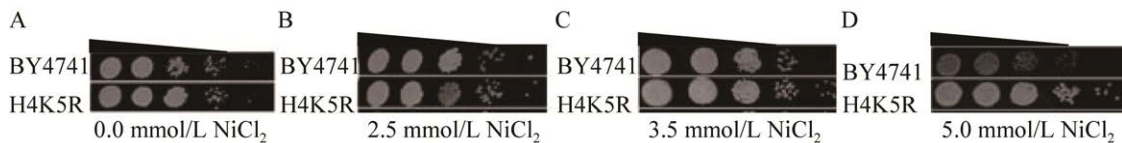


图 2 不同浓度氯化镍胁迫下酿酒酵母 BY4741 及组蛋白定点突变型菌株的生长表型

Figure 2 The phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and histone site-directed mutagenesis strains under different concentrations of nickel stress. A: YPD+0 mmol/L NiCl<sub>2</sub>. B: YPD+2.5 mmol/L NiCl<sub>2</sub>. C: YPD+3.5 mmol/L NiCl<sub>2</sub>. D: YPD+5.0 mmol/L NiCl<sub>2</sub>.

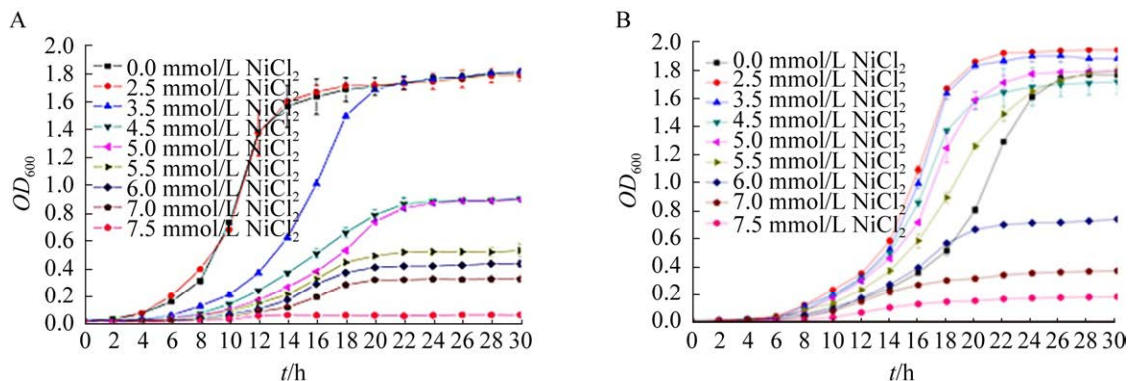


图 3 不同浓度氯化镍胁迫下酿酒酵母生长曲线

Figure 3 Growth curve of *Saccharomyces cerevisiae* under nickel stress with different concentrations. A: Growth curve of BY4741. B: Growth curve of H4K5R. Average values and standard deviations from three independent experiments are shown.



### 2.3 氯化镍胁迫下 CWI 途径的激活

SLT2 磷酸化是 CWI 途径激活的标志, 采用 Western blotting 检测转录因子 SLT2 磷酸化水平, 确定 CWI 途径是否被激活。如图 4A 所示, 野生型菌株 BY4741 在 5.0 mmol/L NiCl<sub>2</sub> 胁迫下, SLT2 发生磷酸化, 在 7.5 mmol/L NiCl<sub>2</sub> 胁迫下, 结合图 3A 生长曲线可以看到野生型菌株 BY4741 几乎不生长, 因此 SLT2 未发生磷酸化。如图 4B 所示, 定点突变型菌株在 7.5 mmol/L NiCl<sub>2</sub> 胁迫下, SLT2 发生磷酸化。说明野生型菌株 BY4741 在 5.0 mmol/L NiCl<sub>2</sub> 胁迫下 CWI 途径被激活, 定点突变型菌株 H4K5R 在 7.5 mmol/L

NiCl<sub>2</sub> 胁迫下激活 CWI 途径。

### 2.4 氯化镍胁迫下 CWI 途径关键基因表达的检测

采用荧光定量 PCR 对 CWI 途径关键基因的表达水平进行检测, 如图 5A 所示, 在无重金属胁迫下, 定点突变型菌株 H4K5R 与野生型菌株 BY4741 相比较, 除 *Mid2* 和 *Slr2* 上调不显著外, CWI 途径关键基因表达量均显著高于野生株; 如图 5B 所示, 野生型菌株 BY4741 在 NiCl<sub>2</sub> 胁迫下 *Wsc2* 上调 17.4 倍, *Rho1* 上调 1.55 倍, *Slr2* 上调 18.91 倍, *Mnn9* 上调 3.13 倍, *Fks1* 上调 1.49 倍; 如图 5C 所示, 定点突变型菌株 H4K5R

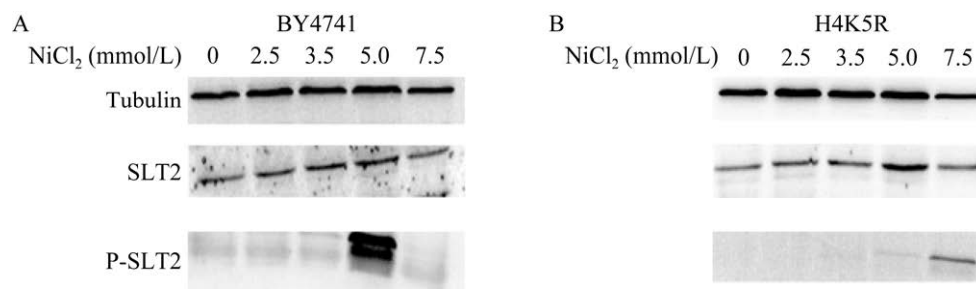


图 4 转录因子 SLT2 磷酸化水平检测

Figure 4 Detection of phosphorylation level of transcription factor SLT2. A: Wild type strain BY4741 transcription factor SLT2 phosphorylation levels. B: Site-directed mutant strain H4K5R transcription factor SLT2 phosphorylation levels.

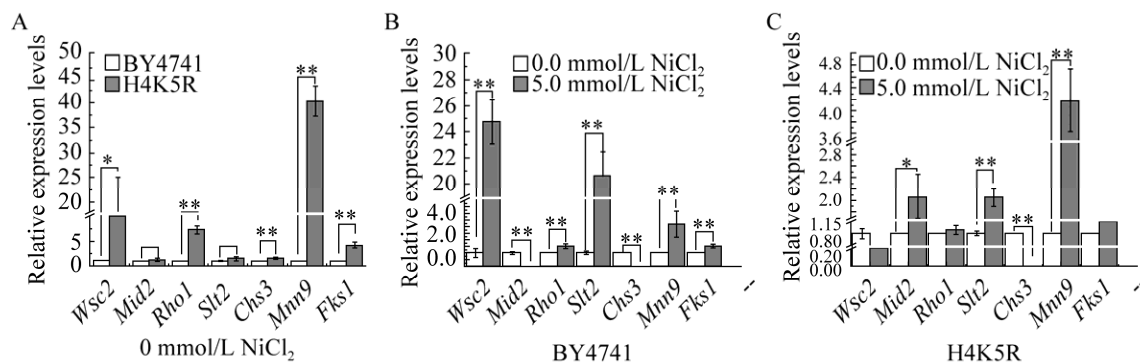


图 5 CWI 途径关键基因相对表达量

Figure 5 Relative expression of key genes in CWI pathway. A: Relative expression levels of BY4741 and H4K5R. B: Relative expression levels of BY4741. C: Relative expression levels of H4K5R. Average values and standard deviations from three independent experiments are shown. Asterisks indicate statistically significant differences from the corresponding control as analyzed by one-way ANOVA (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P \leq 0.01$ ).

在  $\text{NiCl}_2$  胁迫后 *Mid2* 显著上调 2.07 倍, *Wsc2* 显著下调 2.1 倍, *Slt2* 上调 2.67 倍, *Fks1* 上调 2.07 倍, *Mnn9* 上调 4.16 倍。在  $\text{NiCl}_2$  胁迫下, 定点突变型菌株 H4K5R 的 CWI 途径下游效应因子 *Mnn9*、*Fks1* 上调倍数高于野生型菌株 BY4741, 而转录因子 *Slt2* 上调倍数低于野生型菌株。

### 2.5 氯化镍胁迫下酿酒酵母细胞壁主要成分含量的检测

如图 6 所示, 在 5.0 mmol/L 氯化镍胁迫下, 野生型菌株 BY4741 中  $\beta$ -葡聚糖含量升高至 0.11 mg/g, 甘露聚糖含量升高至 28.4  $\mu\text{g/mL}$ , 几丁质含量下降 53.16 (荧光值); 定点突变型菌株 H4K5R 中  $\beta$ -葡聚糖含量升高至 0.096 mg/g, 甘露聚糖含量升高至 12.21  $\mu\text{g/mL}$ , 几丁质含量下降 65.89 (荧光值)。结果表明在镍胁迫下, 野生型菌株 BY4741 与定点突变型菌株 H4K5R 中  $\beta$ -葡聚糖、甘露聚糖含量均升高, 但定点突变型菌株升高程度低于野生型菌株, 且甘露聚糖含量变化并不显著, 几丁质含量均下降。

## 3 讨论

在现代工业生产中, 镍的冶炼、电镀、镍镉

电池及其镍化合物受到广泛的应用<sup>[21]</sup>, 但是由于其属于重污染类物质, 所以镍固体废物的燃烧或者是化合物的制造, 会导致工作场所以及周围环境的空气污染, 影响人体健康<sup>[22]</sup>。目前, 随着对镍暴露导致的表观遗传效应研究的深入, 学者们发现镍引起的表观遗传效应可能是镍致病与致癌的原因之一<sup>[2,23-27]</sup>, 其中组蛋白修饰与染色体的功能状态与决定细胞命运和细胞生长的过程均紧密相关, 且发挥着重要的作用<sup>[28]</sup>。组蛋白翻译后修饰的形式多样, 包括甲基化与去甲基化、乙酰化与去乙酰化、泛素化与去泛素化等。因赖氨酸化学结构的特殊性, 其可被乙酰化酶催化, 将乙酰辅酶 A 的乙酰基转移到赖氨酸的  $\epsilon\text{NH}_3^+$  中和掉 1 个正电荷, 使组蛋白与 DNA 之间的相互作用减弱, 促使参与转录调控的蛋白因子与特异的 DNA 序列结合, 而将 H4K5 之一位点的赖氨酸替换为精氨酸正是通过阻止这一过程来模拟去乙酰化的状态<sup>[14]</sup>。在酵母和哺乳动物细胞中, 镍是组蛋白乙酰化的有效抑制剂。Zoroddu 等<sup>[29]</sup>的研究结果也验证了镍在体内与 H4 的组氨酸 18 结合的假设, 镍通过阻止乙酰基添加到附近的赖氨酸残基上, 建立了被抑制的染色质状态, 从而实现基

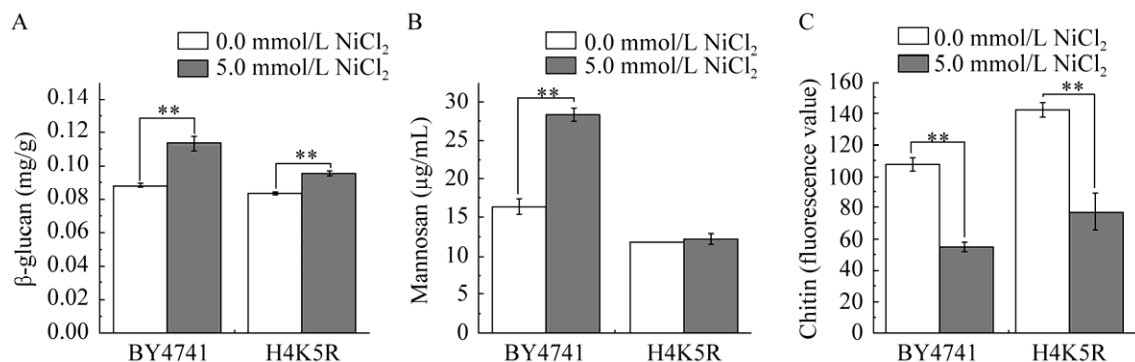


图 6 酿酒酵母细胞壁主要成分含量测定

Figure 6 Main components in *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. A:  $\beta$ -glucan content. B: Mannosan content. C: Chitin content. Average values and standard deviations from three independent experiments are shown. Asterisks indicate statistically significant differences from the corresponding control as analyzed by one-way ANOVA (\*\*:  $P \leq 0.01$ ).



因表达调控。上述研究明确了  $\text{NiCl}_2$  对真核细胞内组蛋白乙酰化的影响, 然而组蛋白乙酰化在真核生物响应重金属镍胁迫中的调控作用还不清楚。

细胞壁完整性信号通路作为一条真菌中最经典的信号通路, 能够通过细胞膜感受器检测到细胞外界的刺激并及时作出应答。CWI 途径包括: 细胞膜感受器 WSC1、WSC2、WSC3、MID2 和 MTL1 等; 调节因子 RHO1、蛋白激酶 PKC1 等; MAPKs 级联系统(BCK1, MKK1/2, SLT2)及其下游的效应器等。PKC1 激活核心组分 MAPKs 中的 MAPKKK-BCK1, 进而磷酸化 MAPKK-MKK1/2, 最终磷酸化 MAPK-SLT2 的 Thr<sup>190</sup> 和 Tyr<sup>192</sup> 位点, 表明 SLT2 被激活。磷酸化的 SLT2 激活下游的转录因子, 调控基因的表达, 进而改变细胞壁成分, 对外界环境刺激作出应答。这种信号传导系统不仅可以放大细胞表面的信号, 还可以把信号转化成梯度形式再输出, 起到类似开关的作用。

细胞壁的内层主要由  $\beta$ -葡聚糖( $\beta$ -1,3-葡聚糖和  $\beta$ -1,6-葡聚糖)和几丁质微纤维组成, 少量甘露糖化蛋白质分布于整个内层<sup>[30]</sup>。 $\beta$ -葡聚糖( $\beta$ -1,3-葡聚糖)和几丁质( $\beta$ -1,4-N-乙酰氨基葡萄糖)是细胞壁的主要结构多糖,  $\beta$ -1,3-葡聚糖形成了可与柔性钢丝弹簧相媲美的三维网络, 这解释了细胞壁的弹性性质, 并为  $\beta$ -1,6-葡聚糖和几丁质的附着提供了平台<sup>[31]</sup>。几丁质与  $\beta$ -1,3-葡聚糖网络共价交联, 有助于真菌细胞壁的刚性和物理强度<sup>[32]</sup>。甘露糖蛋白的合成始于  $\alpha$ -1,6-连接的甘露糖骨架<sup>[33]</sup>。该反应由 M-Pol I 催化, M-Pol I 是由甘露糖基转移酶 MNN9 和 VAN1 形成的异二聚体复合物<sup>[34-37]</sup>。异五聚体甘露糖基转移酶复合物 M-PolIII 进一步延伸骨架, 形成  $\alpha$ -1,6-连接的甘露糖残基<sup>[38]</sup>。 $\alpha$ -1,2-或  $\alpha$ -1,3-连接的甘露糖和磷酸甘露糖的分支被添加到这个骨架上<sup>[39-40]</sup>。

最后, 甘露糖蛋白被运输到细胞外空间, 并与  $\beta$ -葡聚糖结合或共价连接, 形成真菌细胞壁的外层。

本实验中, 在无重金属胁迫下, 定点突变型菌株 H4K5R 与野生型菌株 BY4741 相比较, 除 MID2 和 SLT2 上调不显著外, CWI 途径关键基因表达量均显著高于野生株; 野生型菌株 BY4741 在 5.0 mmol/L 氯化镍胁迫下, 转录因子 SLT2 发生磷酸化, CWI 途径被激活, 野生株细胞壁感受器 *Mid2* 显著下调、*Wsc2* 显著上调, CWI 途径主要调控基因 *Slr2*、*Mnn9*、*Fks1* 上调, 且甘露聚糖含量与  $\beta$ -葡聚糖含量显著升高; 定点突变型菌株 H4K5R 中细胞壁感受器 *Mid2* 显著上调、*Wsc2* 显著下调, *Slr2*、*Fks1*、*Mnn9* 上调,  $\beta$ -葡聚糖含量与野生型菌株相比增加程度较小, 甘露聚糖含量变化不显著。以上结果说明在 5.0 mmol/L 氯化镍胁迫下野生型菌株 BY4741, 通过上调 *Mnn9*、*Fks1* 的表达量, 大量合成  $\beta$ -葡聚糖和甘露聚糖。葡聚糖主要为真菌细胞壁提供弹性支承, 并为  $\beta$ -1,6 葡聚糖和几丁质的附着提供平台, 而其含量的增加正说明在 5.0 mmol/L 氯化镍胁迫下, 野生型菌株 BY4741 通过增加细胞壁组分的方式提升自身抵御外界刺激的能力。突变型菌株 H4K5R 激活 CWI 途径, 促进了细胞壁组分含量的增加, 虽然其细胞壁含量增加程度与野生型菌株相比较小, 但它的细胞壁感受器基因之一 *Mid2* 的表达量显著上调, 这一结果与野生型菌株截然相反。Ketela 等<sup>[41]</sup>的研究表明 MID2 是诱导细胞壁应激合成的部分必需因子。MID2 和 PKC1-MPK1 途径元件之间的遗传相互作用, 以及在各种应激条件下诱导 MPK1 酪氨酸磷酸化过程中对 MID2 的需求, 也共同提示了 MID2 在 PKC1-MPK1 细胞壁完整性途径上游的作用。由此推测, H4K5 这一位点的突变使得定点突变型菌株在应对外界刺激时 CWI 途径的传

导速度更快,这可能是其具有镍耐受性的原因之一。RHO 家族的小分子 GTP 酶是许多重要信号转导通路的关键调节者<sup>[42-44]</sup>。RHO1 存在 6 个效应因子,分别为 PKC1 蛋白激酶、葡聚糖合成酶、 $\beta$ -1,6-葡聚糖合成酶等。这些效应物共同协调细胞壁葡聚糖和甲壳素的合成、细胞壁生物发生重要基因的表达(图 7)。研究发现,在 5.0 mmol/L 氯化镍胁迫下,野生型菌株 BY4741 和定点突变型菌株 H4K5R 中 Rho1 的表达量均显著上调,

且葡聚糖含量也都显著增加。这与之前得到的结论有相悖的地方,为什么定点突变型菌株 H4K5R 应对外界刺激时传导速度更快,但其葡聚糖含量没有野生型菌株 BY4741 的含量高呢?因此,大胆推测,定点突变型菌株 H4K5R 中是否有其他的调控机制呢?是否与细胞内的抗氧化物质有关呢?后续可以以此为切入点,进一步进行研究,以得到定点突变型菌株 H4K5R 具有抗镍性的原因。

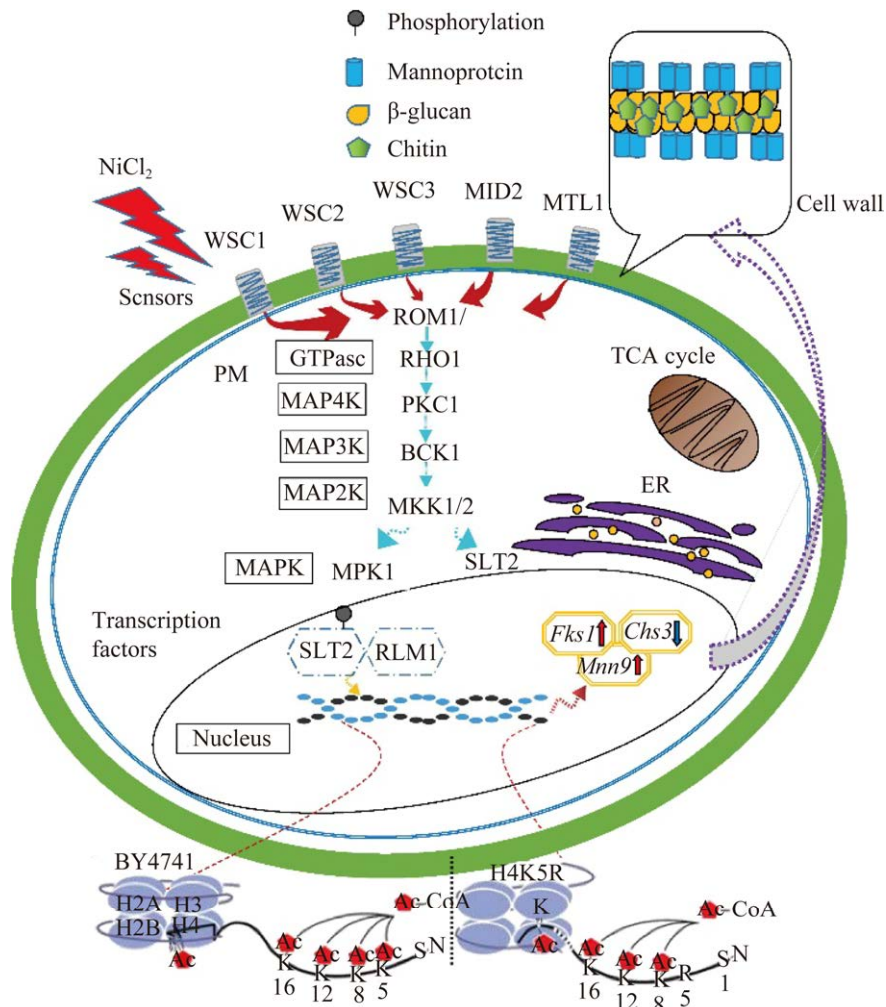


图 7 点突变型菌株 H4K5 位点的去乙酰化调控 CWI 途径机制图

Figure 7 Mechanism diagram of deacetylation at H4K5 locus of point mutant strain to regulate CWI pathway.

## 4 结论

综上所述,本研究基于组蛋白定点突变菌株 H4K5R (组蛋白第 5 位点氨基酸由 K 变成 R)模拟组蛋白 H4K5 位点去乙酰化状态,探讨氯化镍胁迫下 H4K5 位点去乙酰化对酿酒酵母 CWI 途径的调控作用。如图 7 所示,当重金属污染物氯化镍刺激酿酒酵母,细胞通过细胞壁感受器 WSC1、WSC2、WSC3、MID2 和 MTL1 将信号传导至细胞内,再通过 CWI 途径将信号传导至细胞核内,在 NiCl<sub>2</sub> 浓度达到 5.0 mmol/L 时,野生型菌株磷酸化转录因子 SLT2 激活 CWI 途径,调控相应下游效应分子,响应镍胁迫。然而定点突变型菌株在 7.5 mmol/L NiCl<sub>2</sub> 胁迫下磷酸化转录因子 SLT2, 激活 CWI 途径。采用 qRT-PCR 检测 CWI 途径中部分基因,发现感受器基因 *Wsc2*、*Mid2* 在两菌株中表达模式不同,下游效应分子 *Mnn9*、*Fks1*、*Chs3* 的表达水平也有差异。在镍胁迫下,野生株 BY4741 与突变株 H4K5R 中  $\beta$ -葡聚糖、甘露聚糖含量均升高,但突变株升高程度低于野生株,且甘露聚糖含量变化并不显著,几丁质含量均下降,说明在 5.0mmol/L NiCl<sub>2</sub> 胁迫下,点突变型菌株 H4K5 位点的去乙酰化调控 CWI 途径,改变细胞壁组分,但其细胞壁组分与镍耐受性之间的关系需要进一步研究。

## 参考文献

- [1] DUMALA N, MANGALAMPALLI B, KALYAN KAMAL SS, GROVER P. Repeated oral dose toxicity study of nickel oxide nanoparticles in Wistar rats: a histological and biochemical perspective[J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2019, 39(7): 1012-1029.
- [2] SALNIKOW K, ZHITKOVICH A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2008, 21(1): 28-44.
- [3] ARITA A, COSTA M. Epigenetics in metal carcinogenesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium[J]. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 2009, 1(3): 222-228.
- [4] HERSCOVICS A, ORLEAN P. Glycoprotein biosynthesis in yeast[J]. *The FASEB Journal*, 1993, 7(6): 540-550.
- [5] KLIS FM, BOORSMA A, de GROOT PWJ. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*, 2006, 23(3): 185-202.
- [6] SMITH AE, ZHANG Z, THOMAS CR, MOXHAM KE, MIDDELBERG AP. The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(18): 9871-9874.
- [7] CABIB E, ROH DH, SCHMIDT M, CROTTI LB, VARMA A. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(23): 19679-19682.
- [8] INOUE SB, QADOTA H, ARISAWA M, ANRAKU Y, WATANABE T, OHYA Y. Signaling toward yeast 1,3- $\beta$ -glucan synthesis[J]. *Cell Structure and Function*, 1996, 21(5): 395-402.
- [9] VALDIVIA RH, SCHEKMAN R. The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(18): 10287-10292.
- [10] LEVIN DE. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway[J]. *Genetics*, 2011, 189(4): 1145-1175.
- [11] KIM KY, LEVIN DE. Mpk1 MAPK association with the Paf1 complex blocks Sen1-mediated premature transcription termination[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 745-756.
- [12] JAMES E, FERRELL J. Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1996, 21(12): 460-466.
- [13] CHI YF, HUANG, JAMES E, FERRELL JR. Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(19): 10078-10083.
- [14] KIM KY, TRUMAN AW, CAESAR S, SCHLENSTEDT G, LEVIN DE. Yeast Mpk1 cell wall integrity mitogen-activated protein kinase regulates

- nucleocytoplasmic shuttling of the Swi6 transcriptional regulator[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2010, 21(9): 1609-1619.
- [15] KANG JH, ZHANG YT, CHEN J, CHEN HF, LIN CJ, WANG Q, OU YX. Nickel-induced histone hypoacetylation: the role of reactive oxygen species[J]. *Toxicological Sciences*, 2003, 74(2): 279-286.
- [16] SMITH BC, DENU JM. Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1789(1): 45-57.
- [17] DAI JB, HYLAND EM, YUAN DS, HUANG HL, BADER JS, BOEKE JD. Probing nucleosome function: a highly versatile library of synthetic histone H3 and H4 mutants[J]. *Cell*, 2008, 134(6): 1066-1078.
- [18] 李维维, 顿宝庆, 王智, 曲娟娟. 一种改良的热酚法高效快速提取酿酒酵母总 RNA[J]. *生物技术通报*, 2012(12): 163-166.
- LI WW, DUN BQ, WANG Z, QU JJ. A modified method for the efficient and fast extraction of total RNA from *Saccharomyces cerevisiae* with hot-phenol[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2012(12): 163-166 (in Chinese).
- [19] 边金, 郭艳飞, 张治, 张淑慧, 赵秀娟. 组蛋白修饰对酿酒酵母复制起始相关蛋白基因表达的调控[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(6): 2596-2602.
- BIAN J, GUO YF, ZHANG Z, ZHANG SH, ZHAO XJ. The regulation of histone modifications on DNA replication initiation proteins of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(6): 2596-2602 (in Chinese).
- [20] 赵风光. 细胞壁干扰剂作用下的酿酒酵母的化学基因组学响应机制研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2020.
- ZHAO FG. Chemogenomic response mechanism of *Saccharomyces cerevisiae* to cell wall antagonists[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China University of Technology, 2020 (in Chinese).
- [21] ZORODDU MA, SCHINOCCA L, KOWALIK-JANKOWSKA T, KOZLOWSKI H, SALNIKOW K, COSTA M. Molecular mechanisms in nickel carcinogenesis: modeling Ni(II) binding site in histone H4[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2002, 110(Suppl 5): 719-723.
- [22] KASPRZAK KS, JR SUNDERMAN FW, SALNIKOW K. Nickel carcinogenesis[J]. *Mutation Research*, 2003, 533(1-2): 67-97.
- [23] BRODAY L, PENG W, KUO MH, SALNIKOW K, ZORODDU M, COSTA M. Nickel compounds are novel inhibitors of histone H4 acetylation[J]. *Cancer Research*, 2000, 60(2): 238-241.
- [24] KARACZYN AA, GOLEBIEWSKI F, KASPRZAK KS. Truncation, deamidation, and oxidation of histone H2B in cells cultured with nickel(II)[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2005, 18(12): 1934-1942.
- [25] CHERVONA Y, ARITA A, COSTA M. Carcinogenic metals and the epigenome: understanding the effect of nickel, arsenic, and chromium[J]. *Metallomics*, 2012, 4(7):619-627.
- [26] KARACZYN AA, GOLEBIEWSKI F, KASPRZAK KS. Ni(II) affects ubiquitination of core histones H2B and H2A[J]. *Experimental Cell Research*, 2006, 312(17): 3252-3259.
- [27] FRAGOU D, FRAGOU A, KOUIDOU S, NJAU S, KOVATSI L. Epigenetic mechanisms in metal toxicity[J]. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2011, 21(4): 343-352.
- [28] 郭艳飞, 黄勇霖, 张苗苗, 蔡禄, 赵秀娟. 高浓度氯化镍胁迫下酿酒酵母组蛋白 H4K5 去乙酰化调控金属硫蛋白基因的表达[J]. *应用与环境生物学报*, 2020, 26(3): 551-557.
- GUO YF, HUANG YL, ZHANG MM, CAI L, ZHAO XJ. Deacetylation of histone H4K5 regulates the expression of metallothionein genes under high concentration of nickel chloride in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2020, 26(3): 551-557 (in Chinese).
- [29] ZORODDU MA, PEANA M, MEDICI S, CASELLA L, MONZANI E, COSTA M. Nickel binding to histone H4[J]. *Dalton Transactions*, 2010, 39(3): 787-793.
- [30] LENARDON MD, SOOD P, DORFMUELLER HC, BROWN AJP, GOW NAR. Scalar nanostructure of the *Candida albicans* cell wall: a molecular, cellular and ultrastructural analysis and interpretation[J]. *The Cell Surface*, 2020, 6: 100047.
- [31] GOW NAR, LATGE JP, MUNRO CA. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function[J]. *Microbiology Spectrum*, 2017, 5(3): 1-25.
- [32] KOLLÁR R, PETRÁKOVÁ E, ASHWELL G, ROBBINS PW, CABIB E. Architecture of the yeast cell wall[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(3): 1170-1178.
- [33] BALLOU L, COHEN RE, BALLOU CE. *Saccharomyces cerevisiae* mutants that make mannoproteins with a truncated carbohydrate outer

- chain[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1980, 255(12): 5986-5991.
- [34] HASHIMOTO H, YODA K. Novel membrane protein complexes for protein glycosylation in the yeast Golgi apparatus[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 241(3): 682-686.
- [35] KOJIMA H, HASHIMOTO H, YODA K. Interaction among the subunits of Golgi membrane mannosyltransferase complexes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1999, 63(11): 1970-1976.
- [36] HERNANDEZ LM, BALLOU L, ALVARADO E, TSAI PK, BALLOU CE. Structure of the phosphorylated N-linked oligosaccharides from the *mnn9* and *mnn10* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(23): 13648-13659.
- [37] JUNGSMANN J, MUNRO S. Multi-protein complexes in the *cis* Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with  $\alpha$ -1,6-mannosyltransferase activity[J]. The EMBO Journal, 1998, 17(2): 423-434.
- [38] JUNGSMANN J, RAYNER JC, MUNRO S. The *Saccharomyces cerevisiae* protein Mnn10p/Bed1p is a subunit of a Golgi mannosyltransferase complex[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(10): 6579-6585.
- [39] RAYNER JC, MUNRO S. Identification of the *MNN2* and *MNN5* mannosyltransferases required for forming and extending the mannose branches of the outer chain mannans of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(41): 26836-26843.
- [40] LUSSIER M, SDICU AM, BUSSEY H. The KTR and MNN1 mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1999, 1426(2): 323-334.
- [41] KETELA T, GREEN R, BUSSEY H. *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(11): 3330-3340.
- [42] AELST LV, D'SOUZA-SCHOREY C. Rho GTPases and signaling networks[J]. Genes & Development, 1997, 11(18): 2295-2322.
- [43] HALL A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton[J]. Science, 1998, 279(5350): 509-514.
- [44] SCHMIDT A, HALL MN. Signaling to the actin cytoskeleton[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 1998, 14: 305-338.