

# 过量表达蛋白激酶 YPK1 使酵母细胞对高盐胁迫的高度敏感依赖于雷帕霉素靶蛋白

曹红平<sup>1</sup>, 王一慧<sup>1</sup>, 钟彦<sup>1</sup>, 刘昕<sup>1</sup>, 苗敏<sup>1</sup>, Wei Duan<sup>2\*</sup>, 刘科<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 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)

(<sup>2</sup> School of Medicine, Deakin University, Pigdons Road, Waurn Ponds, Vic. 3217, Australia)

**摘要:** YPK1 是酵母中和哺乳动物蛋白激酶 SGK 同源的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 生理调节中有重要的作用, 和酵母细胞壁的完整性、细胞骨架中肌动蛋白极性、细胞内吞作用、细胞在氮源缺乏和营养条件调节下细胞内部的翻译情况密切相关。【目的】为了深入研究 YPK1 蛋白激酶的细胞功能以及在细胞信号传导中的作用【方法】我们构建了过量表达 YPK1 的高拷贝质粒, 研究了过量表达 YPK1 的酵母细胞在盐胁迫条件下的生长情况【结果】发现过量表达 YPK1 会导致酵母细胞对盐胁迫高度敏感, 并且这种敏感性依赖于 TOR1 的存在。【结论】我们的研究结果首次初步揭示 YPK1 与细胞盐胁迫应答的关系, 并初步证明 YPK1 的功能充分发挥需要 TOR1 的参与。

**关键词:** 酵母; YPK1; 雷帕霉素靶蛋白(target of rapamycin, TOR1); 蛋白激酶; 盐胁迫

**中图分类号:** Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)08-1069-06

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是研究真核细胞信号传导的最常用的模式生物之一。酵母细胞与人类细胞共有多种高度保守的蛋白激酶及其相关细胞信号传导通路。与人类血清和糖皮质激素调节蛋白激酶(SGK)同源的酵母蛋白激酶 YPK1 的在酵母基因组中的系统命名是 YKL126W, 蛋白分子量大小 76 kDa, 也是一种 AGC 型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是酵母中鞘脂介导的信号传导途径的重要组成<sup>[1]</sup>。YPK1 和 YPK2 的功能相互交叉, 但是 YPK1 起的作用比 YPK2 更为重要<sup>[2]</sup>。YPK1 与酵母细胞壁的完整性<sup>[2]</sup>、细胞骨架中肌动蛋白的极性<sup>[3]</sup>、细胞的内吞作用<sup>[4]</sup>、氧化胁迫、氮源缺乏和营养条件调节下细胞内部的翻译等细胞功能密切相关<sup>[5]</sup>。在信号通路中 YPK1 为 PKH1 和 PKH2 的下游蛋白, 被 PKH1 和

PKH2 磷酸化, 磷酸化后 YPK1 的活性增强, 进而调控酵母细胞的一些生理功能<sup>[6]</sup>。PKH1 和 PKH2 与哺乳动物细胞磷酸肌醇 3 激酶信号途径中重要的组分 PDK1 高度同源, 而 YPK1 则与 PDK1 的下游激酶 SGK 高度同源<sup>[1]</sup>。

所有真核细胞都具有 2 个调控细胞生长的重要蛋白复合物 TORC1 和 TORC2。TORC1 和 TORC2 都含有一个大分子量的雷帕霉素靶蛋白(target of rapamycin, TOR)作为催化亚基。在哺乳动物细胞中, TOR 蛋白由一个基因编码。而在酵母细胞中, 有两个同源基因编码 TOR 蛋白, 分别是 TOR1 和 TOR2。TOR1 或 TOR2 与 LST8, TCO89 和 KOG1 构成了 TORC1, TORC1 可与雷帕霉素结合并受其抑制。TOR2 与 Avo1, Avo2, Avo3, Bit61 和 Lst8 构成了

基金项目: 国家自然科学基金(30671181), 教育部春晖计划启动基金(Z2007-1-61005)

\* 通信作者。Tel: +86-31-52272945, E-mail: wduan@deakin.edu.au (Wei Duan); Tel: +86-28-85415008, E-mail: kliu@scu.edu.cn (刘科)

作者简介: 曹红平(1983-)女, 河南安阳人, 硕士研究生, 主要从事分子生物学研究。E-mail: chp802800@sina.com

收稿日期: 2009-01-21; 修回日期: 2009-04-10

TORC2, TORC2 不与雷帕霉素结合并不受其抑制。最近的研究发现人类和果蝇的 Rictor-TOR 复合物都可直接磷酸化 AGC 型蛋白激酶 AKT 的疏水区磷酸化,从而增强 AKT 的活性,调控 AKT 的功能<sup>[7]</sup>。在酵母细胞中,也发现 TORC1 可直接磷酸化 AGC 型蛋白激酶 SCH9 C 端多个丝氨酸/苏氨酸残基位点<sup>[8]</sup>。TOR2 可通过直接磷酸化 YPK1 和 YPK2 调控肌动蛋白的极化<sup>[3]</sup>。目前还没有相关的实验证据表明 TOR1 能否调控 YPK1 的活性。本研究中,我们在野生型和 *tor1* 缺失突变体中对 YPK1 蛋白激酶进行了过表达,比较了细胞在高盐胁迫下的生长情况。我们的研究发现在 *tor1* 缺失条件下,过表达 YPK1

可使细胞对高盐胁迫更加敏感。我们的研究首次表明 YPK1 与 TOR1 相互作用参与细胞对盐胁迫的应答调控。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒** 大肠杆菌菌株 (*Escherichia coli*) JM109 与酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 野生型菌株 BY4741 为本实验室保存菌株, *tor1* 突变型菌株 SH221 为美国肯塔基大学 R Dickson 教授赠送,菌种情况见表 1。质粒载体 PYES2/NTA 购自上海 Invitrogen 生物技术有限公司。

表 1 所用菌种

Table 1 Strains Used in This Study

Strain	Genotype
BY4741	MATa :his3-delta1 leu2-delta0 met15-delta0 ura3-delta0
SH221	JK10-3da <i>tor1</i> delta : :HIS3-3 <i>tor2</i> : :ADE2-3 YCplac11[ <i>tor2-2Its</i> ]

**1.1.2 主要试剂和仪器** :Taq DNA 聚合酶、T4 Ligase、限制性内切酶 *Kpn* I、*Xba* I 购自宝生物工程(大连)公司;DNA 胶回收试剂盒购自上海 Invitrogen 生物技术有限公司;ECL 化学发光溶液购自美国 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。PCR 扩增仪为德国 Eppendorf 公司设备;凝胶成像系统及蛋白电泳仪均为美国 Bio-Rad 公司设备。

**1.1.3 培养基** :LB 液体培养基,YPD 培养基,SC 培养基,参见 Ausubel<sup>[9]</sup>,YP-Gal/Suc 培养基(10 g/L 酵母提取物,20 g/L 蛋白胨,20 g/L 半乳糖,20 g/L 蔗糖)。

### 1.2 重组真核表达质粒 PYES2/NTA-Ypk1 的构建

**1.2.1 DNA 提取** :按 Charles S Hoffman 的方法<sup>[10]</sup>,提取和纯化酿酒酵母野生型菌株 BY4741 基因组 DNA。

**1.2.2 PCR 扩增** :根据 *Saccharomyces Genome Database*(SGD)中的 *Saccharomyces cerevisiae* 基因全序列设计并合成含 *Kpn* I 位点的上游引物 5'-CACGTGGTACCTATGTATTCTTGGAAAGTCAAAGTTTA 与含 *Xba* I 的下游引物 5'-CCATCTAGACTATCTAATGCTTCTACCTTGCAC。以提取的酿酒酵母野生株 BY4741 基因组 DNA 作为模版进行 PCR 扩增,反应条件:94℃ 5 min,94℃ 1 min,56℃ 2 min,72℃ 2 min,30 个循环;72℃ 8 min。

**1.2.3 重组质粒的构建** :PCR 产物和 PYES2/NTA 均以 *Kpn* I 和 *Xba* I 进行双酶切后进行连接;连接产

物 PYES2/NTA-Ypk1 转化 *E. coli* JM109,接种转化成功的单克隆于含  $1 \times 10^{-4}$  g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基,37℃ 培养过夜,次日提取质粒,进行 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定<sup>[11]</sup>。

### 1.3 Ypk1 转化进入酵母菌株 SH221、BY4741

空载和重组质粒用乙酸锂转化法转入酵母菌株 SH221 和 BY4741<sup>[9]</sup>,取 100  $\mu$ L 转化体系均匀的涂布于 SC-URA 固体平板上,30℃ 培养 3~4 d,获得阳性克隆。

### 1.4 蛋白表达和纯化

转入质粒的酵母细胞在 SC-URA 液体培养基中 30℃ 培养至  $OD_{600} = 0.8$ ,加半乳糖,终浓度为 2%,30℃ 培养 8~10 h 诱导蛋白过表达。在预冷的离心机中收集细胞,用预冷的蒸馏水水洗两次,然后加二倍于细胞体积的裂解液(50 mmol/L Tris/HCl pH 7.5,5 mmol/L EDTA,3 mmol/L DTT,1 mmol/L PMSF)。加入一半混合液体积的预冷的玻璃珠,震荡 20 s,冰上放置 1 min,反复至少 10 次。裂解液高速离心(20000  $\times$  g),上清液经  $Ni^{2+}$ -NTA-Sepharose 柱吸附后,用清洗液(2 mmol/L 咪唑,50 mmol/L Tris/HCl pH 7.5)洗涤除杂蛋白,再用洗脱液(250 mmol/L 咪唑,50 mmol/L Tris/HCl pH 7.5)洗脱,分步收集洗脱下来的溶液。

### 1.5 蛋白的免疫分析

采用 10% 的胶浓度进行 SDS-PAGE 电泳,200 mA 转移到硝酸纤维素膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1~2 h,用 1:2000 稀释的 anti-His 结合 1 h,再用 1:

2000 稀释的二抗结合 1 h ,ECL 显影。

## 1.6 蛋白自磷酸化反应

100  $\mu$ L 磷酸化反应体系中含 100  $\mu$ mol/L ATP , 50 mmol/L MOPS PH7.5 ,1 mmol/L DTT ,10 mmol/L 醋酸镁 ,根据样品浓度加适量蛋白 ,30 $^{\circ}$ C 水浴 1 h ,SDS-PAGE 电泳 ,转膜并进行免疫印迹分析<sup>[6]</sup>。

## 1.7 盐胁迫对酵母细胞生长的影响

酵母细胞分别在 SC-URA medium 和 Ageing medium 培养基中培养至平台期 ,取 1 mL 细胞离心 (2000  $\times$  g ,5min) ,用无菌水洗 2 次 ,稀释至  $OD_{600} = 0.1$  开始 5 倍稀释 ,取 5  $\mu$ L 在相应平板上点样 ,30 $^{\circ}$ C 培养一定时间后拍照。

# 2 结果

## 2.1 Ypk1 重组质粒的鉴定

Ypk1 的编码序列为 2040 bp ,重组高拷贝质粒 PYES2/NTA-Ypk1 经 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切 ,得到一约 2000 bp 的目的片段 ,与预期相符 ,见图 1 对重组质粒测序 ,其序列与 Ypk1 序列完全吻合。

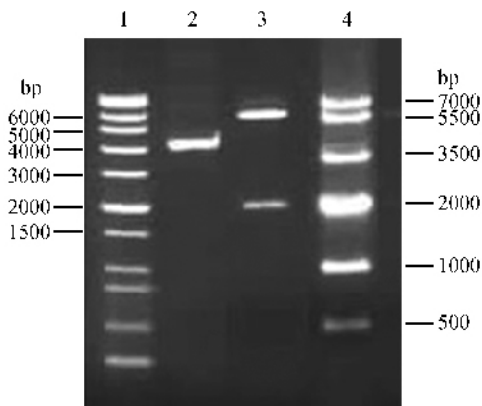


Fig.1 重组质粒 PYES2/NTA-Ypk1 酶切鉴定

Fig.1 The restriction endonuclease digestion of constructed PYES2/NTA-Ypk1 plasmid. 1 :Marker ;2 :PYES2/NTA-Ypk1 plasmid without digestion ;3 :Digestion products of plasmid pYES2/NTA-Ypk1 by *Kpn* I and *Xba* I .

## 2.2 YPK1 的表达纯化与活性鉴定

为了验证重组高拷贝质粒 PYES2/NTA-Ypk1 在酵母细胞中的表达情况 ,我们在转化后的酵母细胞 BY4741 中过量表达 YPK1 蛋白 ,并纯化 ,样品经 SDS-PAGE 电泳 ,利用 YPK1 所带 His6 标签进行免疫印迹检测 ,结果见图 2。在分子量约 85 kDa 处可见一主要条带。YPK1 蛋白的原始分子量是 76 kDa ,蛋白标签部分大约为 4 kDa。我们得到的 YPK1 蛋白电泳迁移率比理论值略高 ,这可能是由于 YPK1 蛋白翻译后修饰造成。

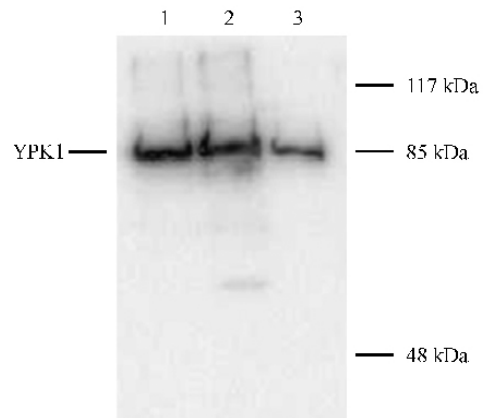


Fig.2 His6-Ypk1 纯化样品的免疫印迹鉴定

Fig.2 Western blot analysis of the purification of His6-Ypk1. 1 ,2 ,3 : First three fractions eluted from  $Ni^{2+}$ -NTA-Sepharose column by elution buffer .

YPK1 为丝氨酸/苏氨酸型蛋白质激酶 ,能利用 ATP 对底物蛋白的丝氨酸或苏氨酸残基进行磷酸化修饰。在确定 PYES2/NTA-Ypk1 质粒能够表达分子量正确的蛋白后 ,我们通过体外磷酸化反应进一步验证了过表达 YPK1 蛋白的激酶活性。经纯化后的 YPK1 蛋白在磷酸化体系中 30 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后 ,所得样品经 SDS-PAGE 电泳 ,免疫印迹之后结果见图 3。经过磷酸化反应后 ,免疫印迹出现一条较低迁移率的条带。由于 YPK1 高度磷酸化后其电泳迁移率会降低<sup>[6]</sup> ,因此该条带应为 YPK1 被磷酸化后的条带。这表明过量表达的蛋白激酶 YPK1 具有蛋白激酶活性 ,且能够发生自身磷酸化。因此 ,在过量表达 YPK1 的酵母细胞中 ,一方面通过酶含量提高 ,YPK1 的活性增加 ,另一方面有可能通过自身磷酸化增强了酶活性。

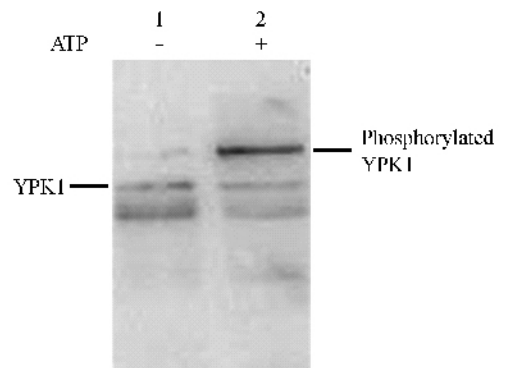


Fig.3 YPK1 蛋白在体外可以发生自磷酸化反应

Fig.3 *in vitro* autophosphorylation of YPK1. 1 :Control reaction without adding ATP ;2 :Autophosphorylation reaction .

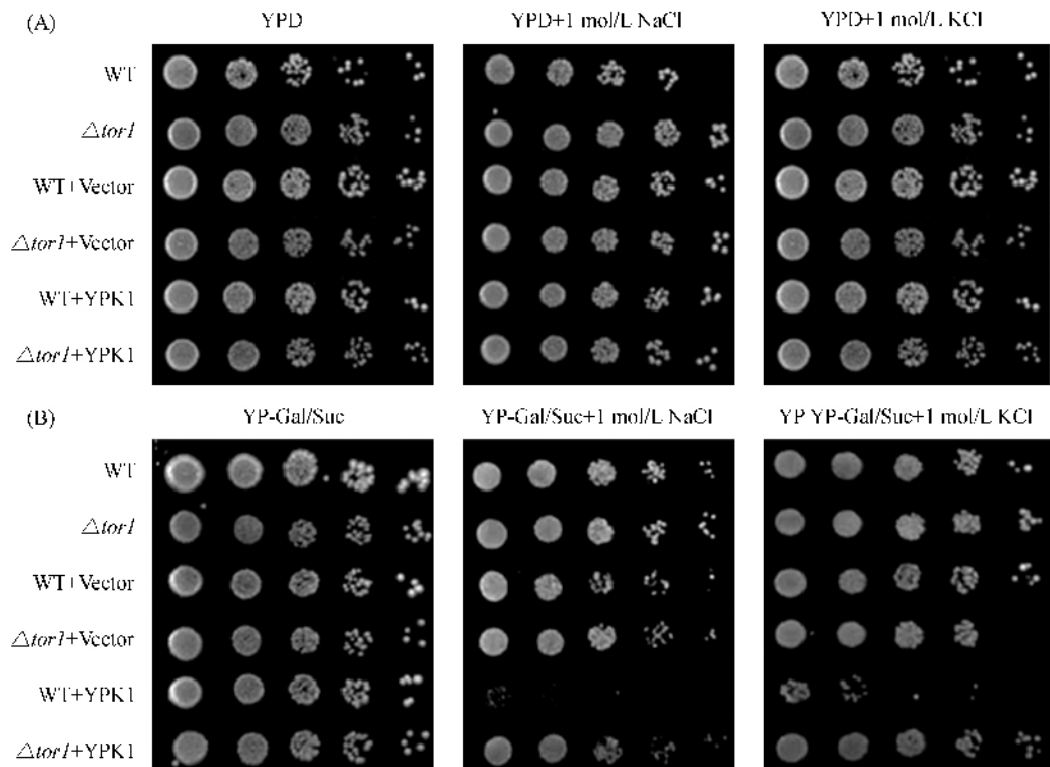
## 2.3 过量表达 YPK1 的酵母细胞对盐胁迫的耐受性

在 SC-URA 液体培养基中培养到平台期的细

胞稀释到  $OD_{600} = 0.1$  开始 5 倍稀释,取  $5 \mu\text{L}$  点平板。如图 5 所示,在不诱导 YPK1 过量表达的 YPD 培养基里,转入 PYES2/NTA-Ypk1 质粒的酵母细胞与野生型细胞一样对  $1 \text{ mol/L}$  KCl 和  $1 \text{ mol/L}$  NaCl 具有较强的耐受能力。而当转入 PYES2/NTA-Ypk1 质粒的酵母细胞在含有半乳糖的培养基中生长从而诱导 YPK1 过量表达时,其生长被  $1 \text{ mol/L}$  KCl 和  $1 \text{ mol/L}$  NaCl 显著抑制。这表明在野生型细胞中过量表达 YPK1 会导致酵母细胞对盐胁迫高度敏感。

有研究表明 YPK1 的活性受 TOR2 的调控,而与

YPK1 相似的蛋白激酶 SCH9 受 TOR1 的调控,因此 YPK1 的活性很可能也受 TOR1 调控。为了验证 YPK1 与 TOR1 的相互作用,我们检测了过量表达 YPK1 的 *tor1* 缺失细胞对盐胁迫的耐受性。图 4 中的结果表明,与过量表达 YPK1 的野生型细胞对盐胁迫的高度敏感不同,*tor1* 缺失细胞中过量表达 YPK1 不会导致细胞对盐胁迫耐受降低。这表明高 YPK1 活性引起的盐胁迫敏感性是需要 TOR1 参与的。我们的研究结果首次表明在酵母细胞中 YPK1 可能与 TOR1 相互作用。



4 不同酵母细胞对盐胁迫的耐受性

Fig. 4 Salt stress sensitivity of yeast cells. From left to right, cells were diluted five times with starting  $OD_{600} = 0.1$ . WT (wild type strain BY4741),  $\Delta tor1$  (*tor1* mutant strain SH221), WT + vector (BY4741 strain transformed with empty PYES2/NTA vector),  $\Delta tor1$  + vector (SH221 strain transformed with empty pYES2/NTA vector), WT + YPK1 (BY4741 strain transformed with pYES2/NTA-Ypk1),  $\Delta tor1$  + YPK1 (SH221 strain transformed with pYES2/NTA-Ypk1).

A: Cells grown in YPD plates without induction; B: Cells grown in YP-Gal/Suc plates with induction.

### 3 讨论

YPK1 是 AGC 蛋白激酶家族中重要的一员,与哺乳动物蛋白激酶 SGK 同源,表现出与蛋白激酶 PKB 相似的底物特异性<sup>[12]</sup>,参与调节细胞壁完整性、细胞骨架中肌动蛋白的极性等信号途径,并且在维持细胞高效的内吞作用中起着重要作用。蛋白的磷酸化(由激酶催化)和去磷酸化(由磷酸酶催化)是控制细胞周期的关键。细胞周期调控途径由一系列激酶和磷酸酶组成,它们通过将途径的下一个底物

磷酸化和去磷酸化而对外来信号和检验点做出反应。PKH1 是 YPK1 的上游激酶,通过磷酸化 YPK1 的 PDK1 位点使它的活性增强<sup>[13]</sup>。除了 PDK1 位点,包括 YPK1 疏水区丝氨酸/苏氨酸在内的多个磷酸化位点的磷酸化也可增强 YPK1 活性。本文中我们首先通过体外实验证明了 YPK1 蛋白可以发生自身磷酸化。因此当 YPK1 在体内过表达时,其磷酸化程度有可能也相应提高。于是过量表达 YPK1 使得 YPK1 蛋白的量和磷酸化程度分别得以提高,从而增强 YPK1 的总体活性。我们的实验数据表明,

在野生型细胞中过表达 YPK1 可导致细胞对盐胁迫高度敏感。酵母细胞对盐胁迫应答主要是通过提高离子泵,如 ENA1 蛋白的表达<sup>[14]</sup>。因此,过表达 YPK1 对盐胁迫敏感性增强可能是由于 YPK1 抑制了 ENA1 等蛋白的表达。但由于 YPK1 是调控细胞内吞作用的关键激酶<sup>[4]</sup>,我们更倾向于认为过表达 YPK1 促进了细胞的内吞作用,从而使盐胁迫的抑制增强。YPK1 过表达对细胞内吞作用的影响还需进一步实验验证。

我们的研究还发现在 *tor1* 缺失的细胞中过表达 YPK1 对高盐胁迫没有影响,这表明 TOR1 对 YPK1 功能的充分发挥有密切的关系。酵母细胞的生长情况受多种信号通路的调节,其中 TOR 在调节细胞生长过程中的作用已经被广泛研究。TOR(雷帕霉素靶蛋白)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,它调控细胞对营养条件作出应答,并根据环境条件调控细胞生长分化<sup>[15]</sup>。从低等到高等真核生物中,TOR 的结构和功能都高度保守,在调节其生理活动的过程中起着重要的作用<sup>[16]</sup>。酵母细胞通过调控基因的表达以及表达后调控等途径形成了一套比较精确的机制以调节它自身的代谢及生长状况来应对生长环境中酸度、渗透压、温度、营养条件的改变<sup>[17]</sup>。近年来的研究表明 TOR 与 AGC 蛋白激酶疏水区的磷酸化有密切的关系。在动物细胞中,TOR/Rictor 复合物可以磷酸化 AKT/PKB 的疏水区<sup>[7]</sup>。在酵母细胞中,TORC1 可以磷酸化 SCH9 C 末端多个丝氨酸/苏氨酸位点<sup>[8]</sup>,而 TOR2 则参与了 YPK1 和 YPK2 的激活<sup>[3]</sup>。因此,TOR1 也很可能通过磷酸化 YPK1 来调控其活性与功能,从而使 *tor1* 缺失突变细胞中过表达的 YPK1 活性无法显著提高,进而使细胞对盐胁迫不敏感。另外一种可能的情况是 TOR1 处于 YPK1 的下游,其活性或表达受 YPK1 调控,*tor1* 缺失则导致高活性的 YPK1 无法将信号进一步传递,从而使过表达 YPK1 引起的细胞盐胁迫敏感性消失。上述两种 YPK1 与 TOR1 相互作用的方式都可能存在,因此需要进一步的研究以确定这两个蛋白激酶相互作用调控盐胁迫应答的分子机理。

## 参考文献

[ 1 ] Sun YD ,Taniguchi R ,Tanoue D ,et al. Sli2 ( Ypk1 ) ,a homologue of mammalian protein kinase SGK , is a downstream kinase in the sphingolipid-mediated signaling pathway of yeast. *Molecular and Cell Biology* ,2000 ,20 ( 12 ) :4411 - 4419 .

[ 2 ] Roelants FM ,Torrance PD ,Bezman N ,et al. Pkh1 and Pkh2 differentially phosphorylate and activate Ypk1 and Ykr2 and define protein kinase modules required for maintenance of cell wall integrity. *Molecular Biology of the Cell* 2002 ,13 :3005 - 3028 .

[ 3 ] Kamada Y ,Fujioka Y ,Suzuki NN ,et al. Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Molecular and Cellular biology* 2005 25( 16 ) : 7239 - 7248 .

[ 4 ] deHart AK ,Schnell JD ,Allen DA ,et al. The conserved Pkh-Ypk kinase cascade is required for endocytosis in yeast. *The Journal of Cell Biology* 2002 ,156( 2 ) :241 - 248 .

[ 5 ] Gelperin D ,Horton L ,DeChant A ,et al. Loss of Ypk1 function causes rapamycin sensitivity inhibition of translation initiation and synthetic lethality in 14-3-3-Deficient yeast. *Genetics Society of America* 2002 ,161 :1453 - 1464 .

[ 6 ] Liu K ,Zhang X ,Lester RL ,et al. The sphingoid long chain base phytosphingosine activates AGC-type protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae* including Ypk1 ,Ypk2 ,and Sch9. *The Journal of Biological Chemistry* ,2005 ,280( 24 ) :22679 - 22687 .

[ 7 ] Sarbassov DD ,Guertin DA ,Ali SM ,et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005 307( 5712 ) :1098 - 1101 .

[ 8 ] Urban J ,Soulard A ,Huber A ,et al. Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell* ,2007 , 26 :663 - 674 .

[ 9 ] Ausubel FM ,Kingsten RE ,Seidman JG ,等. 精编分子生物学实验指南. 马学军,舒跃龙,等译. 第四版. 北京:科学出版社,2005 .

[ 10 ] Brent R ,Kingston RE. Current protocols in molecular biology. USA :John Wiley & Sons ,Inc. 2002 .

[ 11 ] Sambrook J ,Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂,等译. 第三版. 北京:科学出版社,2002 .

[ 12 ] Casamayor A ,Torrance PD ,Kobayashi T ,et al. Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Current Biology* . 1999 9 :186 - 197 .

[ 13 ] Roelants FM ,Torrance PD ,Thorner J. Differential roles of PDK1- and PDK2-phosphorylation sites in the yeast AGC kinases Ypk1 ,Pkc1 and Sch9. *Microbiology* ,2004 ,150 : 3289 - 3304 .

[ 14 ] Ruiz A , Arino J. Function and regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ENA sodium ATPase system. *Eukaryot Cell* 2007 6 :2175 - 2183 .

[ 15 ] Cutler NS ,Pan XW ,Heitman J ,et al. The TOR signal transduction cascade controls cellular differentiation in response to nutrients. *Molecular Biology of the Cell* ,2001 , 12 :4103 - 4113 .

- [ 16 ] Crespo JL , Hall MN. Elucidating TOR signaling and rapamycin action : lessons from *Saccharomyces cerevisiae* . *Microbiology and Molecular Biology Reviews* ,2002 ,66( 4 ) : 579 – 591 .
- [ 17 ] Gasch AP , Spellman PT , Kao CM , et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes . *Molecular Biology of the Cell* ,2000 ,11 :4241 – 4257 .

## YPK1 overexpression resulted salt stress hypersensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on TOR1

Hongping Cao<sup>1</sup> , Yihui Wang<sup>1</sup> , Yan Zhong<sup>1</sup> , Xin Liu<sup>1</sup> , Ming Miao<sup>1</sup> , Wei Duan<sup>2\*</sup> , Ke Liu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Bio-resource and Eco-environment , Ministry of Education , School of Life Science , Sichuan University , Chengdu 610064 , China )

(<sup>2</sup> School of Medicine , Deakin University , Pigdons Road , Waurn Ponds , Vic. 3217 , Australia )

**Abstract** Serine/threonine protein kinase YPK1 , a homologue of mammalian protein kinase serum and glucocorticoid-inducible kinase ( SGK ) , plays important physiological roles in *Saccharomyces cerevisiae* . It involves in cell wall maintenance , actin cytoskeleton dynamics , endocytosis , translation during nitrogen starvation and nutrient sensing . [ **Objective** ] In order to further explore the cellular function of YPK1 and the its transduction pathway . [ **Methods** ] We overexpressed YPK1 in wild type and *tor1* mutant cells and monitored the cell growth responding to salt stress . [ **Results** ] We found that YPK1 overexpression resulted salt stress hypersensitivity in wild type cells and this hypersensitivity was abolished by *tor1* mutant . [ **Conclusion** ] Our results indicate that YPK1 may interact with target of rapamycin ( TOR1 ) to regulate the salt stress response .

**Keywords** : *Saccharomyces cerevisiae* ; YPK1 ; TOR1 ; protein kinase ; salt stress

( 本文责编 : 王晋芳 )

Supported by the National Natural Science Foundation of China ( 30671181 ) and the Chunhui Project from Ministry of Education ( Z2007-1-61005 )

\* Corresponding authors . Wei Duan , Tel : + 61-3-52272945 , E-mail : wduan@deakin.edu.au , Ke Liu , Tel : + 86-28-85415008 , E-mail : kliu@scu.edu.cn

Received 21 January 2009 / Revised 10 April 2009

### 《微生物学报》答作者问——关于审稿

问 : 贵刊的审稿程序是怎样的 ? 一般多长时间可以知道稿件是否被录用 ?

答 : 我们的承诺是争取在 2 个月之内给予答复 , 5 ~ 7 个月之内刊出。

- ( 1 ) 收到来稿后 , 首先将请 2 位专家进行初审 , 再送主编进行最后的总审 , 这个过程一般不会超过 2 个月。如果初审的 2 位专家的意见分歧较大 , 编辑部将再请第 3 位专家进行初审 , 之后再送主编总审 , 那么此稿的审理时间可能会超过 2 个月。
- ( 2 ) 完成审稿后 ( 即主编给出总审意见 ) , 编辑会给作者发出 e-mail 告知修改意见 ( 包括学术上的和写作格式上的 ) , 作者在返回修改稿后经本刊审核合格后方可被录用。在此提醒作者不要在远程系统中看到初审意见时就急于修改稿件。

问 : 如我的投稿没有被贵刊录用 , 是否告知退稿原因 ? 对退稿有异议怎么办 ?

答 : 本着对每一篇投稿负责的原则 , 本刊一贯遵循三审制的制度 , 即 : 编辑部内审、专家初审、主编总审。所以无论录用和退稿 , 都会给作者一份比较全面的审稿意见。

- ( 1 ) 对于每一篇退稿 , 我们都会详细写明退稿原因 , 为您进一步修改论文提供帮助。
- ( 2 ) 如您对退稿意见有异议 , 可以给我们写信表明看法 , 本刊将请专家予以复审。

问 : 我可否指定审稿人 , 或言明请某审稿人回避 ?

答 : 您在投稿时可以附上您推荐的审稿人名单 , 或请予回避的审稿人名单 , 供编辑部参考 , 但编辑部是否采纳将视具体情况而定。