

## RELATIONSHIP BETWEEN NUCLEAR $Ca^{2+}$ REGULATION AND CALMODULIN IMPORT TO RAT'S MYOCARDIAL NUCLEI\*

WANG Pei Yong LIU Jian\*\* TANG Chao Shu\*\*\*

(Department of Pathophysiology, Third Medical University, Chongqing 400038

\*\* Department of Cardiology, Xinqiao hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037

\*\*\* The Institute of Cardiovascular Disease, The First Hospital, Beijing University, 100035)

### ABSTRACT

The intracellular  $Ca^{2+}$  receptor calmodulin(CaM) coordinates responses to extracellular stimuli by modulating the activities of its various binding proteins. Recent reports suggest that, in addition to its familiar functions in the cytoplasm, CaM may be directly involved in rapid signaling between cytoplasm and nucleus. Here the relationship between  $[Ca^{2+}]$  and nuclear accumulation of CaM was studied in rat myocardial nuclei in vitro. Velocity and isopycnic gradient centrifugation was employed to fractionate rat myocardial nuclei. Alexa Fluor™ 488 conjugated CaM was used as fluorescent probes to determine CaM import to nuclei. The results shown the  $Ca^{2+}$  stimulated nuclear translocation of CaM in a concentration-dependent way, and CaM nuclear translocation was down regulated significantly by ryanodine receptor antagonist Ruthenium red and cADP ribose receptor antagonist 8-Br cADPribose (by 20% and 18% respectively,  $P < 0.05$ ), and more significantly by  $Ca^{2+}$  ATPase inhibitor thapsigargin and  $IP_3$  receptor antagonist heparin (by 90% and 89% respectively,  $P < 0.001$ ). These data suggest that CaM didn't diffuse freely through nuclear pores and the import of CaM to myocardial nuclei was mediated by the elevation of free  $Ca^{2+}$  and may be regulated by nuclear calcium transport systems.

**Key words:** Myocardium Cell nucleus Calmodulin Translocation

\* Supported by NSFC(No. 39870347 and No. 39870392)

## WEB2 基因参与酿酒酵母 S 期检查点调控

李新鸣 孙黎光\* 宣忠信\* 宋今丹\*\*

(中国医科大学病原生物学教研室 沈阳 110001)

WEB2(Wants E1A badly2)基因是一个 4500 多碱基对的大基因,等同于 Dna2 基因,定位于酿酒酵母 8 号染色体右臂,目前已明确其编码产物具有 3' 到 5' 的 DNA 解链酶活性,在 DNA 复制中发挥作用<sup>[1]</sup>。考虑到 WEB2 蛋白为一个 17.5 万 dal 的蛋白大分子,应具有除了解链酶外多种功能。而 Elledge 等又提出一个推测性的酿酒酵母 S 期检查点调控通路<sup>[2]</sup>,所以本实验利用一个 WEB2 突变株,根据其对 DNA 合成阻断剂 Hydroxyurea(HU)的敏感性,来判断其是否丧失 S 期检查点调控功能,从而证实 WEB2 基因是否参与 S 期检查点调控,即工作在该检查点通路上。由此可加深对真核细胞检查点控制通路的了解,为探索肿瘤的发生机制提供线索。

### 材料与方 法

#### 1. 材料

酵母菌 ymw2(野生株,配对型为 a),WEB2-46(WEB2

突变株,配对型为 a),美国德克萨斯州西南医学中心惠赠。培养基 YPD 培养,YPGal 培养基:将 YPD 培养基中葡萄糖替换成半乳糖。试剂  $\alpha$  因子、HU、Lyticase、mouse anti-tubulin antibody、FITC-sheep anti mouse antibody, Sigma 产品。

#### 2. 方法

(1)  $\alpha$  因子处理酵母细胞同步化在  $G_1$  期 用 YPD 液体培养基培养酵母菌,其  $OD=0.2-0.5$  ( $0.1OD=2 \times 10^6$  个细胞/ml);用含  $5\mu g/ml$   $\alpha$  因子的 YPGal (ph = 4.0) 重悬起细胞,培养 3-4hr,调整  $OD=0.2$ 。

(2) HU 处理细胞阻滞在 S 期 将同步于  $G_1$  期的酵母菌接种于含 HU(200mol/L)的 YPGal 培养基,培养 8hrs。

(3) FACS 测定细胞 DNA 含量 从更换到 HU 培养基开始,间隔 1 小时收集酵母细胞,数目为  $5 \times 10^6$  个;用 0.9% NaCl 洗涤后用 70% 乙醇悬起,充分混匀后 4℃ 放置过夜;离心沉淀并洗涤细胞,然后将细胞重悬于  $2.5\mu g/ml$

本文 2001 年 8 月 2 日收到,2002 年 1 月 3 日接受。  
国家自然科学基金资助项目,39870384。

\* 通讯作者:中国医科大学生物化学与分子生物学教研室

\*\* 中国医科大学卫生部细胞生物学重点实验室

propidium iodide 溶液染色, 0.9% NaCl 洗涤并重悬细胞沉淀, FACScan(Becton Dickinson, CA, USA)测定 DNA 含量。

(4) 纺锤体微管免疫荧光染色 从更替到 HU 培养基开始, 间隔 1 小时收集酵母细胞, 数目为  $5 \times 10^6$  个; 加入甲醛溶液固定; 离心沉淀细胞并重悬于磷酸甲醛缓冲液, lyticase 溶解细胞壁; 用溶液 A 洗涤并重悬细胞; 取细胞悬液滴于聚赖氨酸处理过的载玻片上; 空气干燥后 -20℃ 乙醇及丙酮固定细胞; 间接免疫荧光染色纺锤体微管。具体方法参考《酵母遗传学方法实验指南》<sup>[3]</sup>。

(5) 酵母细胞存活率测定 从更替到 HU 培养基开始, 间隔 1 小时收集等体积酵母细胞悬液, 血球计数板计数细胞数目, 以 0 小时细胞存活率为 100%, 计算存活率。

### 结 果

#### 1. WEB2 突变株 HU 处理后成活情况

在含 HU 培养基中生长时, S 期检查点缺失的酿酒酵母细胞, 会由于携带未复制的 DNA 进入有丝分裂而迅速死亡。图 1 所示为野生株和 WEB2

基因突变株细胞在 HU 培养基中的存活率曲线。野生株在 HU 培养基中始终保持很高的存活率, 约为 100%; 而 WEB2 基因突变株则在 HU 培养基中迅速死亡, 并且随着 HU 处理时间增加存活率下降越显著。

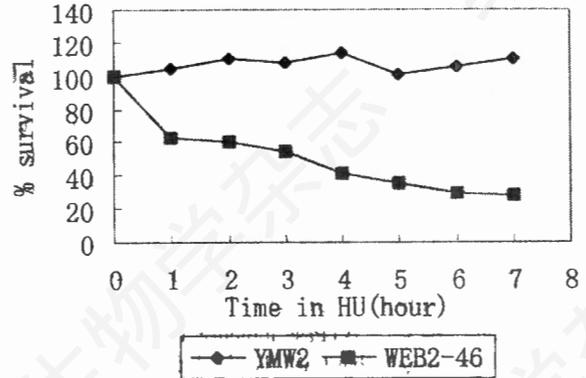
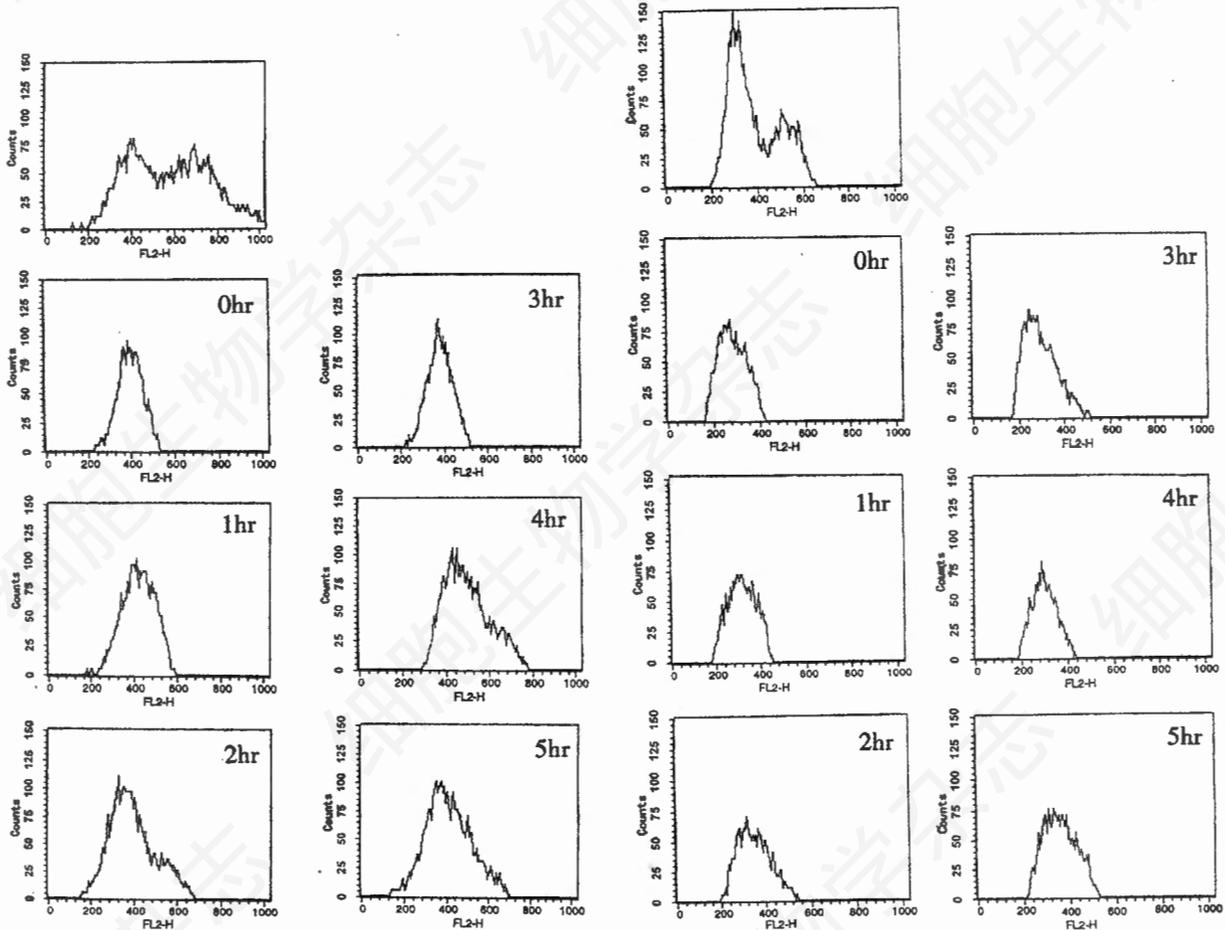


图 1 酵母细胞在含 HU 培养基中的存活率曲线



A. YMW2(野生株)

B. WEB2-46(WEB2 突变株)

图 2 FACS 测定同步于 G<sub>1</sub> 期酵母细胞 DNA 含量(第 1 行所示为非同步化酵母细胞; 其余所示为 a 因子处理后同步于 G<sub>1</sub> 期酵母细胞, 时间显示为转入含 HU 培养基后小时数)

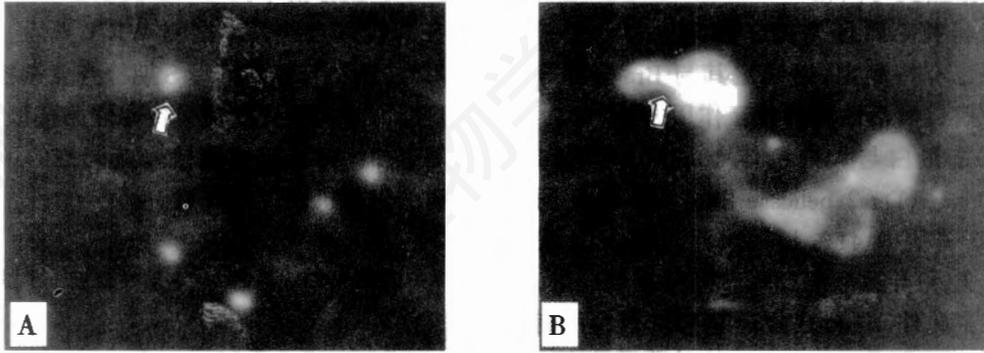


图3 间接免疫荧光显示酵母细胞纺锤体形态(目镜10×物镜100×箭头所指处为纺锤体)

## 2. WEB2 突变株 HU 处理后 DNA 含量测定

野生株和 WEB2 突变株细胞经  $\alpha$  因子处理后同步于  $G_1$  期, 释放到含 200mmol/L HU 的 YPGal 培养基后, 流式细胞仪检测 DNA 含量显示, DNA 量未倍增, DNA 复制被完全阻断(图 2)。

## 3. WEB2 突变株 HU 处理后纺锤体形态变化

间接免疫荧光显示纺锤体形态改变, 野生株细胞形成较大的芽(图 3A), 但纺锤体很短; WEB2 基因突变株则有细胞纺锤体明显伸长(图 3B), 呈现无 HU 作用时野生株细胞正常出芽生殖时纺锤体形态<sup>[4]</sup>, 因而不能正常阻滞在 S 期, 而是仍旧进入有丝分裂。

## 讨 论

多年来对于细胞周期检查点调控的研究发现, 细胞可以直接感知 DNA 复制进程, 并相应地协调细胞周期各事件间的过渡<sup>[5]</sup>。细胞检查点的损伤, 会增加遗传的不稳定性, 并且与肿瘤的发生密切相关。在哺乳动物中, 已确定了某些检查点基因, 如 P53 基因<sup>[6]</sup>。但是, 由于哺乳动物检查点调控是极为复杂的调控过程, 目前很难弄清其机制。而酵母菌遗传构成相对简单且具代表性, 是研究真核生物细胞周期调控简单而有效的模型, 目前仅美国几个课题小组在从事此方面的研究。Elledge 等所建立的酿酒酵母 S 期检查点调控通路, 还只是一个初步的通路模式, 即 pol2 以某种方式感知 DNA 损伤或复制阻断, 将信息传递给 Mec1, 其后活化 Rad53, 活化的 Rad53 将细胞阻滞在 S 期, 使其不能进入  $G_2/M$  期进行分裂, 同时诱导特异的转录反应<sup>[2]</sup>。但实际的检查点通路要更为复杂, 还涉及多基因、多因素参与, 本研究正是来探讨 WEB2 基因是否与该通路相关。

本实验使用的 WEB2 突变株, WEB2 基因上点

突变, 依赖所携带质粒的腺病毒 E1A 肿瘤基因表达来存活, 但是 E1A 并不是替代 WEB2 基因的功能<sup>[7]</sup>。根据该突变株对 DNA 合成阻断剂 HU 的敏感性, 可以判断其是否丧失 S 期检查点调控功能, 从而弄清楚 WEB2 基因是否工作在上述通路上。当 WEB2 突变株和野生株一样经  $\alpha$  因子处理 3.5 小时后, 由于  $\alpha$  因子可诱导 Far1 蛋白表达, Far1 可与 Cdc28-Cln 复合物结合, 抑制其 CDK 活性, 故细胞阻滞在  $G_1$  期, 呈现 Shmoo 态<sup>[8]</sup>。将同步于  $G_1$  期的酵母细胞转入含有 HU 的 YPGal 培养基, 细胞摆脱  $\alpha$  因子的作用, 开始进入 S 期进行 DNA 复制。但是, 由于 HU 阻断 DNA 合成, 所以正常的酿酒酵母细胞由于 S 期检查点的调控作用而阻滞于 S 期, 而 WEB2 突变株却无法阻滞在 S 期, 而是进入  $G_2/M$  期, 并开始细胞分裂, 其表现为: 流式细胞仪检测细胞 DNA 含量, WEB2 突变株同野生株一样 DNA 并未倍增, 虽然 HU 作用 5 小时, WEB2 突变株 DNA 含量略有增加, 但并未增加到 2 倍含量, DNA 合成被有效阻断, 即 DNA 未完成复制。间接免疫荧光染色纺锤体显示, WEB2 突变株于 HU 处理 3 小时后, 多数细胞纺锤体微管延长, 呈现酿酒酵母细胞正常分裂时的形态<sup>[4]</sup>。而野生株细胞虽然长出大芽, 但纺锤体并不延长, 未进行细胞分裂。这些结果提示, WEB2 突变株能够携带未完成复制的 DNA 进入细胞分裂期, 这是酿酒酵母 S 期检查点功能丧失的特征<sup>[4]</sup>。细胞存活率曲线显示, WEB2 突变株受 HU 作用时, 存活率明显下降, 对 HU 高度敏感。说明正是由于 WEB2 基因突变, 导致 S 期检查点功能丧失, 受 HU 作用时尽管 DNA 合成受抑制, 但是细胞却无法阻滞在 S 期, 而是进入  $G_2/M$  期进行异常分裂增殖, 最终导致细胞死亡。所以, WEB2 基因除了有解链酶作用, 还参与酿酒酵母 S 期检查点调控, 位于已建立的 S 期检查点通路上。但是, WEB2 在

该通路上的工作点及与其他基因的作用,还需在后续工作中进行研究。而且 WEB2 参与检查点控制机制的功能区也有待测定,以确定其与 Bragulia 等发表的 DNA2 解链酶活性区的相互作用关系<sup>[1]</sup>。

由于 WEB2 蛋白与人染色体 10q21.3 - 22.1 区编码产物 Dna2L(Dna2 helicase like)蛋白高度同源<sup>[9]</sup>,458 个氨基酸中 41% 相同。而本研究发现 WEB2 基因突变,可导致酿酒酵母 S 期检查点缺陷,细胞异常分裂。此外,Budd 还报道 WEB2 蛋白可能还具有 DNA 依赖的 ATP 酶活性及核酸酶活性<sup>[10]</sup>。因此,研究 WEB2 基因在酿酒酵母 S 期检查点调控中的作用,可以推知人类 Dna2L 蛋白的酶活性,从而加深对真核细胞检查点调控的了解,有利于揭示人类基因功能失调所导致的细胞异常增殖的原因,为探索肿瘤的发生提供依据。

### 摘 要

WEB2 基因编码产物为一种 DNA 解链酶。WEB2 突变株经 hydroxyurea 阻断 DNA 合成后,经流式细胞仪检测 DNA 含量、纺锤体微管间接免疫

荧光染色及存活率测定,结果显示 WEB2 突变株表现 S 期检查点缺失。推测 WEB2 除了具有解链酶作用外,还参与酿酒酵母 S 期检查点调控机制,位于已建立的 S 期检查点信号传导通路模型上。本研究有助于加深对真核细胞检查点调控的了解,为研究肿瘤的发生机制提供线索。

关键词:WEB2 基因 S 期检查点 酿酒酵母

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Bragulia D et al.,1998,*J Mol Biol*,**281**(4):631 - 649.
- [ 2 ] Elledge SJ,1996,*Science*,**274**:1664 - 1672.
- [ 3 ] 刘子铎译,2000,《酵母遗传学方法实验指南》,科学出版社,100 - 101.
- [ 4 ] Elledge SJ et al.,1995,*Cell*,**80**:29 - 39.
- [ 5 ] Sanyovanale D et al.,1998,*Science*,**395**:615 - 618.
- [ 6 ] Sherr CJ,1996,*Science*,**274**:1672 - 1677.
- [ 7 ] Fiorentino DF et al.,1997,*Mol Biol Cell*,**8**:2519 - 2537.
- [ 8 ] King RW et al.,1996,*Science*,**274**:1652 - 1659.
- [ 9 ] Eki T et al.,1996,*Genomics*,**37**(3):408 - 410.
- [ 10 ] Bud ME et al.,2000,*J Biol Chem*,**275**(22):16518 - 16529.

## A ROLE OF WEB2 GENE IN S PHASE CHECKPOINT REGULATION OF *S. CEREVISIAE*

LI Xin Ming SUN Li Guang XUAN Zhong Xin SONG Jin Dan  
(Department of pathogenic biology China Medical university, Shenyang 110001)

### ABSTRACT

WEB2 gene encodes a DNA helicase. A WEB2 mutant was treated with Hydroxyurea. Facs analysis, spindle microtubule staining by indirect immunofluorescence and % survial indicate that the mutant is defect in S phase checkpoint. We propose that WEB2 has not only helicase activity, but a role in S phase checkpoint regulation. And WEB2 gene locates in S phase checkpoint signal transduction pathway in *S. cerevisiae*. The study should shed light on eukaryotic cell checkpoint regulation and the origin of cancer.

Key words: WEB2 gene S phase checkpoint *S. cerevisiae*

## 一种中红侧沟茧蜂畸形细胞分泌的寄生特异蛋白\*

秦启联 丁翠 龚和 李馨 崔力

(中国科学院动物研究所农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室 北京 100080)

畸形细胞(teratocytes)是指某些内寄生蜂的卵在孵化时,包裹胚胎的浆膜层细胞同孵化的幼蜂一起掉落在寄主的血腔中,分散而成的单个细胞<sup>[1]</sup>。这种细胞不仅生长迅速,而且存在于幼蜂整个的寄生过程,协调着寄主的生理状态,使之利于寄生蜂的

本文 2001 年 1 月 18 日收到,6 月 7 日接受。

\* 国家自然科学基金项目(批准号:3987009 和 30000017)和农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室开放课题(课题号:9912)

致谢:文内照片由本所买国庆先生拍摄并冲洗,谨表谢意。