密 级:	学校住	弋码: 10075
分类号:	学	号:20131132

理学硕士学位论文

家蝇 MdSirt1 和 MdSirt4 基因的克隆

及功能分析

学位申请人: 顾冀海

指导教师: 柳峰松 教授

张玉明 讲师

学 位 类 别 : 理学硕士

学 科 专 业 : 生物化学与分子生物学

授 予 单 位 : 河北大学

答辩日期:二〇一六年五月

NO.: 20131132

A Dissertation for the Degree of M. Science

Molecular cloning, characterization of *MdSirt1* and *MdSirt4*, in *Musca domestica*

Candidate: Jihai Gu

Professor Fengsong Liu Supervisor:

Lecturer Yuming Zhang

Academic Degree Applied for: Master of Science

Specialty: Biochemistry and Molecular Biology

University: Hebei University

Date of Oral Examination: May 2016

摘要

随着对 Sirtuins 家族蛋白研究的不断深入,关于其功能的报道也越来越广泛。 通过转录组和数字表达谱分析,我们发现家蝇在受到细菌刺激后体内 Sirt1 和 Sirt4 基因表达水平发生显著变化,提示它们可能参与家蝇免疫应答过程。本文 基于此,本工作以此为出发点对家蝇应激过程中 Sirt1 和 Sirt4 基因表达的变化规 律及其可能存在的调控机制进行了研究。主要内容包括:

- 1、克隆了家蝇 Sirt1 和 Sirt4 基因 cDNA 序列,分别命名为 MdSirt1 和 MdSirt4, 并对其进行了生物信息学分析。两条基因所编码的蛋白 MdSIRT 和 MdSIRT4 各具有一段保守的 SIR2 保守结构域,两者氨基酸序列与其它物种中的同源蛋 白之间均具有较高的同源性。
- 2、利用实时荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹方法对 MdSirt1 和 MdSirt4 在家蝇不同发育时期、不同组织和应激过程中的表达量变化进行了分析。MdSirt1 和 MdSirt4 在家蝇受到细菌刺激时分别上调和下调,同时检测到 MdSIRT4 在蛋白水平也发生了相似的变化。
- 3、*MdSirt1* 和 *MdSirt4* 在家蝇受到热激处理时 mRNA 表达量分别上调和下调, 同时检测到 MdSIRT4 在蛋白水平也发生了相似的变化。
- 4、*MdSirt1* 和 *MdSirt4* 在家蝇受到重金属影响后 mRNA 表达量均上调,同时检测到 MdSIRT4 在蛋白水平也发生了相似的变化。
- 5、在对 *MdSirt1* 干扰后我们发现家蝇幼虫应对细菌刺激的能力下降;而对 *MdSirt4* 进行了干扰后,我们发现家蝇核转录因子 *MdNF-κB* 表达量上升,同 时检测到家蝇抗菌肽的表达量上调。

关键词 家蝇 MdSirt1 MdSirt4 免疫

Abstract

With the deepening of the research on Sirtuins family proteins, reports on their functions has become increasingly widespread. Transcriptom data of *Musca domestica* indicates that both *MdSirt1* and *Mdsirt4* play an vital role in the immune response of *Musca domestica*. From this point, the molucular mechanism of *MdSirt1* and *Mdsirt4* in response to stress is studied in this work.

The main content are as follows:

- Sirt1 and Sirt4 in Musca domestica are cloned and named as MdSirt1 and MdSirt4.Bioinformatic data shows that both of MdSIRT1 and MdSIRT4 share a conserved SIR2 domain, their core amino acid sequences are conservative in different species.
- 2. qRT-RT PCR method is employed to quantitative the expression level of M dSirt1 and MdSirt4 in different development stages and tissues in Muscado mestica. regulatory manners of MdSirt1 and MdSirt4 during immune response in Musca domesticaI is also determined.WB results of MdSIRT4 was consistent with qRT-RT PCR results.
- 3、 MdSirt1 and MdSirt4 exhibits contradict regulatory manners during heat sho ck in Musca domestica, MdSirt1 gene expression level is enhanced in res ponse to bacterial chanllenge while MdSirt4 expression level drop in the s ame condition.
- 4. Both of the genes are up regulated in response to cadmium hazard.
- 5. Death ratio of *MdSirt1* konckdown group is higher than control group whe n challenged by bacteria. Inhibition of MdSIRT4 might contribute to theact ivation of *MdNF-\kappa B*, consequently, AMPs expression increase drasticly.

Key words Musca domestica MdSirt1 MdSirt4 immunology

目	录

摘要	I
Abstract	II
第1章 文献综述	1
1.1 Sirtuins 家族蛋白的研究概况	1
1.2 SIRT1 的研究进展	1
1.3 SIRT2 的研究进展	3
1.4 SIRT3 的研究进展	4
1.5 SIRT4 的研究进展	6
1.5.1 SIRT4 与谷氨酸盐代谢的调控	6
1.5.2 SIRT4 与胰岛素的分泌	8
1.5.3 SIRT4 与衰老	9
1.5.4 SIRT4 与炎症、凋亡	9
1.6 SIRT5 的研究进展	
1.7 SIRT6 的研究进展	
1.8 SIRT7的研究进展	12
1.9 无脊椎动物 Sirtuins 的研究进展	13
1.10 无脊椎动物先天免疫的研究进展	14
1.11 本研究的意义	
第2章 实验材料与方法	17
2.1 实验材料	17
2.2 实验方法与试剂	17
2.2.1 家蝇的饲养	17
2.2.2 MdSirt1 和 MdSirt4 基因的序列分析方法	17
2.2.3 MdSIRT1 和 MdSIRT4 的原核表达,蛋白纯化及抗体制备	17
2.2.4 MdSirt1 和 MdSirt4 基因在不同条件下的表达分析	
2.2.5 总 RNA 的提取、qPCR 及 Western Blot 实验方法	
2.2.6 MdSIRT4 蛋白的亚细胞定位	19

2.2.7 MdSirt1 和 MdSirt4 基因的干扰及干扰后基因的功能的分析实验19
2.2.8 数据统计与分析方法20
2.3 实验仪器
2.4 引物列表
第3章 实验结果与分析24
3.1 MdSirt1 和 MdSirt4 的生物信息学分析
3.1.1 Sirtuins 家族蛋白系统发育树的建立24
3.1.2 MdSirt1 与 MdSirt4 核酸序列分析25
3.1.3 MdSIRT1 和 MdSIRT4 氨基酸组成分析与保守结构域的预测
3.1.4 SIRT1、SIRT4 氨基酸序列的比对
3.2 MdSIRT1 和 MdSIRT4 重组蛋白的表达与纯化
3.3 MdSIRT4 蛋白的亚细胞定位结果31
3.4 MdSirt1、MdSirt4 的发育定量和组织定量结果的分析31
3.5 MdSirt1、MdSirt4 在细菌感染后表达模式的分析
3.6 MdSirt1、MdSirt4 在氯化镉影响和热激后不同时间点表达量变化的分析
3.7 MdSirt1 和 MdSirt4 干扰敲低后的功能分析
3.7.1 MdSirt1 在干扰之后细菌刺激条件下幼虫的存活率的分析
3.7.2 MdSirt4 干扰后家蝇核转录因子 MdNF-κB 及四种抗菌肽表达量变化的分析.36
第4章 讨论
第5章结果与展望41
5.1 结果
5.2 展望41
参考文献43
致谢60
研究生期间论文发表情况

第1章 文献综述

1.1 Sirtuins 家族蛋白的研究概况

Sir2 蛋白最初发现于啤酒酵母,主要功能是具有依赖于 NAD⁺的去乙酰化酶 作用,后因发现其表达的上升能够促进酵母寿命的增长而受到了关注。此后将其 它物种中与 Sir2 蛋白同源的蛋白统称为 Sirtuins 家族蛋白。

Sirtuins 家族蛋白属于 III 类去乙酰化酶,其特点是以 NAD⁺作为其催化的辅 底物(Imai et al., 2000)并且其活性不受曲古菌素 A 和聚 4-甲基戊烯的抑制。在 从酵母到哺乳动物的大量真核生物中,Sirtuins 家族蛋白一直被认为与机体的抗 衰老相关(Guarente, 2013)。在对哺乳动物 Sirtuins 蛋白的研究发现,Sirtuins 家族 蛋白的激活能够阻止包括神经退行性疾病、糖尿病、心血管疾病、癌症等多种与 衰老相关的疾病的发生(Guarente, 2011)。人 Sirtuins 家族有 7 个成员(分别命名为 SIRT1-SIRT7),其家族成员均具有保守的 NAD⁺ 结合结构域却具有不同的催化活 性位点,也具有不同的催化底物和生理功能(Frye, 2000)。

Sirtuins 家族蛋白在细胞的各种代谢中均起到重要的调控作用。现有的报道 关注的重点是 Sirtuins 蛋白与癌症发生的联系。癌细胞与正常细胞在生长和分裂 过程中存在很大的差异,比如癌细胞在缺氧条件下更多依靠糖酵解进行能量供应, 此外癌细胞较正常细胞摄入更多的谷氨酸(Ward and Thompson, 2012)。Sirtuins 能够相应地抑制癌细胞糖酵解过程的发生及其对谷氨酸的过量摄取,进而抑制细 胞的无限增值(Hanahan and Weinberg, 2011)。同样,在恶性癌细胞当中常伴随 着 DNA 损伤修复能力的下降和抗凋亡现象的增加,这导致了变异的积累和基因 组的稳定性降低,进而促进癌细胞的增殖和对其他组织的侵染。Sirtuins 能够通 过影响细胞周期、DNA 修复、细胞凋亡等过程对染色体不稳定造成的损伤进行 应答(Chalkiadaki and Guarente, 2015)。

1.2 SIRT1 的研究进展

SIRT1 在大多数哺乳动物组织当中均能找到同源蛋白,其主要存在于细胞核当中。在卡路里摄入限制(CR)条件下,SIRT1 能够被激活并催化多种底物进

行去乙酰化催化。这些底物包括组蛋白、转录因子、DNA 损伤修复因子和信号 转导蛋白。SIRT1 通过调节这些蛋白的乙酰化程度,进而调节它们在代谢活动当 中的功能活性(Chalkiadaki and Guarente, 2012; Chang and Guarente, 2014)。研 究人员使用特定的激活剂(Baur et al., 2006; Lagouge et al., 2006; Milne et al., 2007; Feige et al., 2008)或者转基因方法过表达 SIRT1 蛋白(Luo et al., 2001; Bordone et al., 2007; Pfluger et al., 2008; Herranz et al., 2010), 发现实验动 物的表型与 CR 条件下实验动物的表型十分相似(Luo et al., 2001)。同时, SIRT 1蛋白表达增加的实验动物具有较对照组更强的抗氧化损伤能力,其癌症发病率 较低并且寿命得到延长。而在另一方面,研究者也发现 SIRT1 与癌症的发生存在 一定关联,最初的线索是观察到 SIRT1 能够催化癌症抑制因子 p53 去乙酰化从而 抑制其活性。SIRT1 的过表达减弱了由 p53 介导的细胞的调亡(Vaziri et al., 20 01)。与此相对应的是缺乏 SIRT1 表达的胸腺细胞对离子辐射的敏感度增加(Che ng et al., 2003)。而另外一个癌症抑制因子 E2F1 也能够被 SIRT1 抑制(Wang et al., 2006)。这些现象说明了 SIRT1 在一些情况下具有致癌因子的作用。癌细胞 在细胞周期与 DNA 修复过程与正常细胞不同, 随着研究的深入, 研究人员发现 SIRT1 蛋白能够间接调控细胞周期、DNA 修复和癌细胞迁移,最终促进了癌症 的发生,起到致癌基因的作用。

总结 SIRT1 的作用,一方面 SIRT1 似乎在抑制癌症方面起到的作用更为突 出,从对结肠癌的研究表明:在患结肠癌的小鼠细胞中,SIRT1 能够将 β-连环蛋 白去乙酰化,从而抑制其促细胞分裂的能力(Firestein et al., 2008)。之后的研究 也表明,SIRT1 能够抑制原发性肿瘤的发生,也能够抑制有高脂饮食引发的肝癌 的发生(Herranz et al., 2010)。与前面的实验结果相一致的是:在多种类型的癌 症当中,包括结肠癌、恶性胶质细胞瘤、卵巢癌等种类的癌细胞中 SIRT1 的表达 均显著下降(Firestein et al., 2008; Wang et al., 2008; Chen et al., 2014a)。而在 另一方面,在另外一些种类的癌症当中,如白血病、淋巴癌、恶性间页肿瘤等种 类的癌症中,SIRT1 的表达量增高(Jang et al., 2012; Li et al., 2012; Menssen e t al., 2012; Chen et al., 2014b; Li et al., 2014)。另外也有一些证据支持 SIRT1 的高表达促进了癌症的发生。转基因过表达 SIRT1 蛋白的小鼠患白血病和胃癌的 几率大大增加。可见对于在癌症发生中 SIRT1 起到的作用还需进一步研究。除此

之外,研究者们还发现一些癌症抑制因子对 SIRT1 的表达水平和酶活起到负调控 作用,这些癌症抑制因子包括包括 HIC1、DBC1、p53。对这种矛盾现象可能的 解释之一是: SIRT1 蛋白在癌症初发阶段能够促进 DNA 损伤的修复和染色体的 稳定,这对于癌症的抑制起到了积极的作用;同时其能够抑制 p53 因子从而提高 损伤细胞的存活率,这在一定程度上,至少是在某些种类已经发生癌变的细胞会 起到促进癌症进一步恶化的作用(Wales et al., 1995; Nemoto et al., 2004; Chen et al., 2005; Chang et al., 2007; Welch et al., 2007; Kim et al., 2008)。

1.3 SIRT2 的研究进展

与 SIRT1 相似, SIRT2 也以 NAD⁺作为其具有酶活的辅底物。SIRT2 最初被 报道的功能是其具有微管蛋白去乙酰化功能,但是随后的发现表明除了能够将组 蛋白去乙酰化。SIRT2 还能与多种类型的其它蛋白相互作用,调节包括细胞周期、 能量代谢、炎症反应等多方面的生理反应(Houtkooper et al., 2012)。

研究表明 SIRT2 在细胞的表达中受到细胞内能量水平的影响,在卡路里摄入 较多的情况下 SIRT2 的表达量降低;反之,在卡路里摄入较少的情况下,SIRT2 的表达升高。有实验结果表明,在 CR 条件下喂养 18 个月的小鼠的白色脂肪组 织和肾脏中 SIRT2 蛋白表达量较对照组高,但在肝脏和脑中却不存在这种差异(W ang et al., 2007);也有报道表明在 24 h 的短期禁食之后,禁食组小鼠的白色脂 肪组织中 SIRT2 的蛋白和 mRNA 表达量均有明显提高(Wang and Tong, 2009); 在对人的研究中,体重超重的实验对象在进行 8 周的低热量饮食摄入实验后,对 其外周血单核细胞进行检测,发现实验组体内该种细胞中 SIRT2 蛋白的表达量较 正常饲养小鼠显著增加(Crujeiras et al., 2008)。这些研究结果均预示 SIRT2 具有 感受细胞内能量水平并根据能量代谢水平调节自身表达量和蛋白活性的能量代 谢调控分子的功能。之后的研究也证明了 SIRT2 具有多个下游调控靶标,其与多 种下游受调控蛋白共同作用以平衡细胞的能量代谢。

而从另一个侧面,在包括乳腺癌、肝癌、肾癌和胃癌等类型的癌症中,SIR T2 的表达量均下降(Kim et al., 2011)。在有丝分裂过程中,当细胞核膜降解之 后,SIRT2 能够与染色质接触,并将 H4K16 去乙酰化,这一反应可能会在有丝 分裂过程中的染色质聚集、细胞退出细胞周期和染色体的重建过程中起到关键作 用(Vaquero et al., 2006)。SIRT2 能够将细胞中的后期促进复合物/细胞周期体复合物(APC/C)去乙酰化,进而增加染色体的稳定。实验也证明了 Sirt2 敲除的小鼠表现出基因组不稳定,同时 APC/C 活性的降低,癌症的发生概率也有所增加(Kim et al., 2011)。SIRT2 能够将组蛋白甲基转移酶 PRSET7 去乙酰化并能够调节其在染色体上的定位和 H4K20 在细胞周期中的甲基化水平。在氧化应激情况下,SIRT2 和 PRSET7 在 G2/M 期的表达量上调,这与 H4K20 氨基酸甲基化积累后导致有丝分裂阻滞进而激活有丝分裂检查的发生相符。而 SIRT2 激活的细胞有丝分裂阻滞是否足以抑制癌症的发生还需要进一步的验证(Serrano et al., 2 013)。

也存在与之相悖的报道,通过药物抑制 SIRT1 和 SIRT2 的表达能够激活 p5 3 从而延缓肿瘤的生长。而对人不同类型和不同发展时期的癌症组织样本中 SIR T2 表达量的研究结果也存在着诸多矛盾(Lain et al., 2008; Chen et al., 2013)。 这些存在的问题均需要进一步细致的研究才能说明 SIRT2 在癌症中起到的作用。

除了与癌症的相关的报道, SIRT2 在神经退行性疾病的发生也可能存在关 联。与 Sirtuins 家族其它成员不同的是, SIRT2 的表达抑制能够缓解神经退行性 疾病的发展(Outeiro et al., 2007; Luthi-Carter et al., 2010; Donmez and Outeir o, 2013)。在最近的研究当中,研究人员对患有亨廷顿综合症的模型小鼠使用能 够渗透入脑的 SIRT2 抑制性药物,结果表明患病小鼠的病情得到了显著改善(Ch opra et al., 2012)。但令人困惑的是, SIRT2 的完全缺失并不会对亨廷顿综合症 的病情有所缓解。这不禁让人疑惑, SIRT2 的表达是否能够降低神经退行性疾病 的发生? 还是只在某些特定情况下 SIRT2 的表达才具有缓解神经退行性疾病的 作用? 这一问题还需进一步研究才能解答(Bobrowska et al., 2012)。

可以说, SIRT2 蛋白在人体正常情况下和病理情况下的表达差异具有很明显的组织特异性,但其具体的作用是有利于健康还是损害健康,则还需要更深入的研究才能阐明。且还有更多的 SIRT2 的反应底物亟待发现,其底物的特征也需要进一步总结,这对日后 SIRT2 的功能研究及对其作用的探明至关重要。

1.4 SIRT3 的研究进展

SIRT3 是目前研究较为深入的一个 Sirtuins 家族蛋白,其定位于线粒体,已

发现多个互作底物,其在 CR 情况下表达量上升,对于线粒体中能量代谢的调节 起到重要作用(Hirschey et al., 2010)。

在 CR 条件下 SIRT3 能够促进使用脂肪作为乙酰辅酶 A 的来源,其原理是 S IRT3 能够激活脂肪酸 β 氧化中的关键酶 VLACD。缺乏 SIRT3 表达的小鼠体内 积累大量的脂肪酸 β 氧化前体和中间代谢产物,不能将其完全分解。SIRT3 同 时也能够通过其自身的去乙酰化功能对酮体的代谢、乙酰辅酶 A 的生成等代谢 过程起到调节(Hirschey et al., 2010)。综合来看 SIRT3 在脂质代谢中的主要作用 是在 CR 情况下促进脂肪酸的氧化代谢,次要功能是促进脂肪代谢产物的使用。

通过促进脂肪的氧化分解, SIRT3 间接地抑制细胞对糖类的使用。与之相关的是,癌细胞更倾向于使用糖类作为能量的供应来源,这一现象叫做 Warburg e ffect(Warburg, 1956)。癌细胞经常表现出 SIRT3 表达的减少并且摄入更多的糖,这一特点导致了癌细胞中出现更多的活性氧(ROS),这会诱导 HIF-1α 的表达,进一步刺激糖类的摄入。在缺乏 SIRT3 的情况下,线粒体外膜上的己糖激酶 II 会被激活,促进葡萄糖-6-磷酸的生成(Qiu et al., 2010)。

由上述研究可以得知, ROS 是 SIRT3 调控线粒体中氧化磷酸化过程中的副 产物。在这一过程中, SIRT3 首先催化异柠檬酸脱氢酶 II 去乙酰化, 该酶能够催 化补充线粒体中 NADPH。NADPH 被谷胱甘肽还原酶利用以维持其底物谷胱甘 肽为还原态。其次, SIRT3 也能够乙酰化并激活 ROS 清除酶—锰型超氧化物歧 化酶, 依赖于此功能清除产生的 ROS。而与之紧密相关的是, SIRT3 能够促进线 粒体氧化呼吸复合物活性的提高, 其作用对象包括复合物 I 和复合物 II。缺乏 S IRT3 表达的小鼠摄入的氧气量较对照组减少 10%, ATP 产量最多减少 50%(Qi u et al., 2010; Tao et al., 2010; Chen et al., 2011)。

由 SIRT3 表达缺乏导致的相关蛋白乙酰化程度提高与很多代谢综合症有着 紧密的联系。给野生型小鼠喂食高脂肪食物会导致小鼠发生肥胖、高血脂、II 型糖尿病等病症的发生,而给 SIRT3 缺陷型小鼠投喂同样的高脂肪食物会导致 上述病症发生的加速(Jeong et al., 2015)。除此之外,缺乏 SIRT3 还会导致前细 胞炎症因子表达水平的提高,这种现象通常是代谢综合症的典型表现。而另外一 些研究也表明 SIRT3 的缺失会导致肝细胞癌变率的增加。

在胁迫条件下, 敲除 Sirt3 基因的细胞染色体稳定性降低, 并显示出一定的

癌变倾向(Kim et al., 2010)。与 SIRT3 作为抑癌因子作用作用相一致的是, Sirt 3 敲除的小鼠发展出激素受体阳性的乳腺癌。在人体乳腺癌发病患者组织当中, 40% 的患者组织当中 SIRT3 蛋白缺失, 而在另外一些诸如卵巢癌、肺癌患者的 组织当中 SIRT3 蛋白也有一定比例的缺失(Kim et al., 2010; Finley et al., 2011), 并且在大部分种类的癌症患者组织中, SIRT3 蛋白的表达量都存在一定程度 的降低。而在一些特殊种类的具有遗传性的癌症当中, SIRT3 也显示出了致癌基 因的性质(Jeong et al., 2015)。

1.5 SIRT4 的研究进展

SIRT4 是一个定位于线粒体的 Sirtuins 蛋白家族成员,与其它同家族蛋白成员不同的是,虽然 SIRT4 具有保守的 NAD⁺结合位点,但是其却缺乏依赖 NAD⁺的去乙酰化酶活性(也有最新报道 SIRT4 具有微弱的去乙酰化酶活性)。取而代之的是,SIRT4 具有很强的 ADP-核糖转移酶活性(Haigis et al., 2006)。到目前为止,对于 SIRT4 的研究仍然处在起步阶段,在已经报道的文献当中,对 SIRT4 功能的报道主要集中在其对能量代谢,尤其是谷氨酸盐代谢的调控上。对其功能的报道主要集中在癌症、糖尿病相关领域,近期也有少量 SIRT4 与炎症相关的报道。

1.5.1 SIRT4 与谷氨酸盐代谢的调控

因为整个 Sirtuins 家族成员最常见的功能是在细胞代谢和应激反应当中起到 调节作用,故对于 SIRT4 的相关研究最初也起始于这个领域。而最先确定的受到 SIRT4 调控的蛋白就是谷氨酸脱氢酶 (GDH)。而 SIRT4 对于 GDH 的抑制也成 为了日后对其在各种调控中功能研究的起点。

谷氨酸/谷氨酰胺是人体内含量最高的氨基酸,在细胞的生长和分裂当中均 起到重要作用。SIRT4 对于 GDH 作用的报道最初见于 Haigis 研究小组的工作(H aigis et al., 2006)。在线粒体中,GDH 能通过一步被称为谷氨酸回补的两步脱氨 基反应,将谷氨酸催化成为 α-同戊二酸(αKG),αKG 是 TCA 循环中一种重要 的中间产物,其也是一种重要的合成多种基本生物组分,是包括核苷酸、脂肪、 氨基酸的前体物质(DeBerardinis et al., 2007; DeBerardinis et al., 2008)。该反应 的第一步是由谷氨酰胺酶 (GLS) 将谷氨酰胺催化脱氨基成为谷氨酸,第二步的 反应是将谷氨酸经 GDH 或氨基转移酶催化成为 αKG。SIRT4 能够将 GDH ADP -核糖基化,这一修饰能够抑制 GDH 的催化活性,作为谷氨酸代谢的限速酶,G DH 活性的抑制影响谷氨酸的代谢和细胞的能量代谢(DeBerardinis et al., 2007)。 而 Sebastia'n 等人基于此结论进一步研究发现,SIRT4 可能参与到由 DNA 损伤 引发的对谷氨酸的吸收和回补的抑制。这也引发了对于 SIRT4 对染色体稳定性调 节的关注。

关于 SIRT4 一个十分有意思的发现是,在 DNA 损伤后其 mRNA 表达量的 显著提高,其上调幅度甚至高于之前被认为参与到 DNA 损伤修复的 Sirtuins 成 员 SIRT1 和 SIRT3 的上调幅度。而 SIRT4 抑制谷氨酸的摄入和回补对于 DNA 损伤后细胞进入细胞周期阻滞是必须的。在缺乏 SIRT4 的细胞中,DNA 损伤后 细胞不能进入细胞周期阻滞,导致 DNA 修复的延迟和染色体非整倍几率的增 加。而缺乏 SIRT4 的原纤维母细胞也显示出了异常的多倍性,这表明 SIRT4 不 仅在对外界伤害引发的 DNA 损伤修复中起到作用,其也能阻止细胞内原发的 D NA 损伤,保护免受细胞中自发的 DNA 损伤带来的伤害(Csibi et al., 2013; Jeo ng et al., 2013)。而以上关于 SIRT4 表达能够抑制谷氨酸/谷氨酰胺摄入和转化 的报道也将我们引向了另一话题,即 SIRT4 是否在癌症的发生或抑制当中起到调 节作用?

根据报道 SIRT4 也是一个线粒体中具有抑癌能力的 Sirtuins 家族成员。与其 具有抑癌能力一致的发现有,缺乏 SIRT4 的成纤维细胞的生长速度高于对应的野 生型对照组;而已经癌化的成纤维细胞的葡萄糖的摄入量减少,且其形成的同种 异型移植瘤的体积较正常表达 SIRT4 的成纤维细胞形成的同种异型移植瘤体积 更大。而这种在缺乏 SIRT4 情况下产生的这种癌症发生加快的表型能够在加入特 异性抑制 GLS1 或 GDH 的抑制剂后得到缓解。年老的 Sirt4 敲除型小鼠患肺癌 的几率上升,在敲除了 Sirt4 基因的小鼠的肺组织液中也同时检测到了较高的 G DH 活性。此外,离子辐射能够降低野生型小鼠体内 GDH 的活性而在而在 Sirt 4 基因敲除小鼠中却不能检测到这种现象的发生(Jeong et al., 2013)。在敲除了 S irt4 的 Burkitt 淋巴瘤模型小鼠上进行的实验发现, Sirt4 敲除型小鼠的淋巴瘤 生长速度较野生型更快,且 Sirt4 敲除型小鼠的寿命大大缩短。与之相对应的是, 在过表达 SIRT4 的 Burkitt 淋巴瘤模型小鼠中,过表达的 SIRT4 能够抑制谷氨酸

的摄入从而抑制依赖于谷氨酸的细胞分裂,进而诱导细胞的死亡。在人体中,S IRT4 蛋白的表达量会在一些种类癌症的情况下降低,其中包括小细胞肺癌、白 血病、膀胱癌和乳腺癌,这些研究结果均表明SIRT4 是一种抑癌因(Jeong et al., 2014)子。

之后的研究表明,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物1(mTORC1)对SIRT4 起到调控作用。mTORC1 的激活能够促进 E3 连接酶 βTrCP 结合到 cAMP 应答 元件结合蛋白2(CREB2)上,促进了CREB2的降解。CREB2结合SIRT4转录 启动子促进SIRT4 mRNA 的转录,CREB2的降解则会从转录层面降低SIRT4 的表达,进而促进了GDH活性的提高,增加了谷氨酸的利用(Frank et al., 2010)。



图 1-1: mTORC1 通过 SIRT4 调控谷氨酸代谢的通路(Frank et al., 2010)

Figure 1-1: Regulation of SIRT4 and the regulation of Glu metabolism by mTORC1

当然,还有一些问题悬而未决。关于 SIRT4 在 DNA 情况下是通过怎样的通路调控 DNA 的修复,这其中的相互作用因子还有待发现。而关于 SIRT4 在细胞周期阻滞当中的作用的调控通路也不明确。

1.5.2 SIRT4 与胰岛素的分泌

与其它种类的 Sirtuins 家族成员不同的是, SIRT4 并不会在 CR 条件下被激 活。在正常饮食情况下,β胰岛细胞中的 SIRT4 通过抑制 GDH 的活性进而抑制

了胰岛素分泌。而在卡路里摄入限制条件下,SIRT4 表达量显著下调,促进了GDH活性的提高,导致胰岛素分泌的增强。对这一现象的一种解释是,由于卡路里摄入限制导致NAD⁺/NADH比例的降低,而较低的NAD⁺/NADH比例会导致SIRT4活性的降低,进而解除对GDH的抑制(Haigis et al., 2006)。SIRT4 对胰岛素分泌的调节与已知的SIRT1 对胰岛素分泌的调节作用相反。在短期CR条件下,SIRT1对于UCP-2的抑制减轻,从而抑制胰岛素的分泌,而在长期的CR条件下,SIRT4 能够通过激活GDH的活性激活胰岛素和糖异生。从整体来看,SIRT1和SIRT4共同调节胰岛素的分泌,在不同程度的能量摄入限制情况下发挥调控功能(Bordone et al., 2006)。

1.5.3 SIRT4 与衰老

白藜芦醇作为一种新型保健品,近些年来在抗衰老、抗炎症、抗癌、治疗心 血管疾病等诸多领域均有十分广泛的关注。Helena 等人报道在白藜芦醇的作用下 SIRT4 的表达量降低,而也有报道中得到了白藜芦醇能够促进 SIRT4 表达的结 论。关于白藜芦醇是否能够激活 SIRT4 的表达还存在争议,现有的关于白藜芦醇 能够影响 SIRT4 的理论是白藜芦醇能够影响 NAMPT 的表达量,进而导致 NAD ⁺/NADH 比例的改变,最终影响 SIRT4 的活性(Schirmer et al., 2012)。但这些假 设也还存在诸多争议,还需要大量的细致的验证工作。

1.5.4 SIRT4 与炎症、凋亡

除了上述功能之外,SIRT4 在炎症方面的调控作用也有了相关报道。Chen Yongfeng 和 Yu Tao 分别报道了脐静脉血管内皮细胞和肺微血管内皮细胞在炎症 情况下 SIRT4 表达量降低的现象(Chen et al., 2014c; Tao et al., 2015)。其提出 的调控通路是,SIRT4 能够抑制核转录因子 NF-кB 的活性,从而抑制炎症反应 的发生。而在外界刺激下,SIRT4 表达量的降低则能够解除其对 NF-кB 的抑制, 促进炎症反应的进行。而 Ramatchandirin B 等人报道在炎症反应中 SIRT4 表达 量的下调是受到 JNK 的抑制(Ramatchandirin et al., 2016)。Liu Ban 研究小组的 工作表明,在缺氧诱导的心肌细胞凋亡过程中 SIRT4 表达量下降,其表达量的变 化影响前 caspase9/caspase9 或者是前 caspase3/caspase3 的比例,也能够影响到 B ax 的转座,从而促进细胞的凋亡(Liu et al., 2013)。

虽然 SIRT4 在炎症当中的调控作用已经有了相关报道,但是结论并不统一,

至今没有确凿的证据证明 SIRT4 能够与上述任意一个调控或受到调控的蛋白因 子有着直接的作用,关于 SIRT4 与炎症相关的调控通路需要更多验证。

1.6 SIRT5 的研究进展

SIRT5 也是一种定位于线粒体的 Sirtuins 家族蛋白,目前对其研究较为清楚 地是其在氨的解毒方面的功能。目前发现 SIRT5 的主要功能是催化氨基甲酰磷酸 合成酶 1 (CPS1) 去乙酰化。CPS1 是尿素循环的限速酶,SIRT 5 的增加能够 提高血氨的清除效率(Nakagawa et al., 2009)。同时,CPS1 也受到去琥珀酰化和 去戊二酰化的调控,而 SIRT5 去琥珀酰化和去戊二酰化的催化能力,相关研究也 正在深入当中(Du et al., 2011; Tan et al., 2014)。

其它发现的与 SIRT5 相关或受 SIRT5 调控靶蛋白还有 SOD1 和线粒体尿酸 氧化酶(Nakamura et al., 2012; Lin et al., 2013)。而最近报道的发现 SIRT5 能够 将脂肪酸代谢中关键的脂肪酸氧化酶去琥珀酰酰化从而促进了脂肪酸的氧化。但 其是否是脂肪酸氧化代谢调控中的主要调控方式还有待进一步的研究(Zhang et al., 2015)。对 SIRT5 在癌症方面的研究目前还较为粗浅,其主要功能还需要更 多的研究。最近有证据表明 SIRT5 具有致癌功能,其在人非小细胞肺癌当中过表 达(Lu et al., 2014)。

1.7 SIRT6 的研究进展

SIRT6 具有 ADP 核糖基化、去乙酰化、去豆蔻酰化等催化活性。近期的研 究表明, 过表达 SIRT6 的雄性小鼠的寿命较对照组显著延长。除了在寿命延长方 面起到作用之外, SIRT6 还参与了转录调控、代谢调控、DNA 损伤修复和染色 体稳定的维持、细胞分裂与分化和癌症等很多方面的生理生化反应。这其中有多 种原因, 最近的报道称 SIRT6 与染色质紧密结合,其能够将组蛋白氨基酸 H3K9 和 H3K56 去乙酰化, SIRT6 的缺陷型细胞表现出整体 H3K9 氨基酸的高乙酰化(M ichishita et al., 2008; Michishita et al., 2009)。此外 SIRT6 还能稳定染色体端粒 处的 WRN 蛋白, 从而抑制复制相关的端粒的缺失。而对 H3K56 去乙酰化作用 的研究则表明, SIRT6 的缺失导致的 H3K56 氨基酸的过度乙酰化会导致小鼠染 色体碎片化和中心粒的解离(El-Khamisy et al., 2003; Yuan et al., 2009)。由此 可以看出, SIRT6 对于染色体的稳定起到了促进作用。

同样引人关注的是: SIRT6 也参与到了对衰老的调节过程中。从卡路里能量 摄入限制的角度来看,卡路里摄入限制能诱导 SIRT6 蛋白表达水平的升高,其 中的原因是因为卡路里摄入限制最终导致了 SIRT6 蛋白的稳定性增高,降低了 其分解速率(Kanfi et al., 2008)。随后,在 *Sirt6* 缺陷型小鼠上进行的实验表明, 降低该缺陷型小鼠 NF-κB 的表达,结果发现与对照组相比,降低了 NF-κB 表达 的小鼠寿命延长了 3 个月(Kawahara et al., 2009)。NF-κB 是一种调控凋亡、细 胞衰老、免疫和炎症的核心调控因子。SIRT6 能够与 NF-κB 的 RelA 亚基相互作 用, RelA 亚基能够将 SIRT6 召集至受 NF-κB 调控的基因启动子处,进而抑制 了这些基因的表达。这一功能是通过 SIRT6 将 NF-κB 目的基因启动子处的 H3K 9 氨基酸去乙酰化,降低 NF-κB 对这些启动子的结合能力来实现的(Hayden and Ghosh, 2004; Adler et al., 2007; Chambers et al., 2007; Adler et al., 2008)。

此外 SIRT6 还能够调控缺氧诱导调控因子 (HIF-1α), SIRT6 具备负调控 HI F-1α 的能力,在对 SIRT6 缺陷型小鼠的检测中,发现其代谢中糖酵解水平显著 提高,并且细胞摄入葡萄糖的量增加,这与 HIF-1α 过表达引发的葡萄糖摄入增 加现象相一致。而敲除了 *Sirt6* 基因的细胞内也确实检测到了 HIF-1α 表达量和 蛋白稳定性的提高(Zhong et al., 2010)。而后来也有研究者提出正是由于 SIRT6 表达降低导致葡萄糖摄入过多而引发的低血糖是引发寿命缩短的主要原因(Xiao et al., 2010)。从上面的多方面研究可以体会到, SIRT6 在很多方面具有重要的 调控功能。

这种功能的繁多预示了 SIRT6 与癌症的发生有着多方面的关联。通过对癌症和肿瘤基因组数据库的数据进行分析,结果表明在约 20%的癌症种类当中,癌症 组织当中 SIRT6 的表达消失或者降低(Sebastian et al., 2012)。在小鼠的肝癌模型 当中,FOS 的抑制导致 SIRT6 蛋白表达量的降低,结果导致细胞 H3K9 氨基酸 的乙酰化,从而在细胞中高表达抗凋亡因子 survivin(Min et al., 2012)。肝癌患 者肝组织中 SIRT6 的表达量显著降低。但是,在另外一些种类的癌症中,如乳腺 癌,SIRT6 通过其诱导增强 DNA 损伤修复的能力导致了癌细胞抗化疗能力的增 强(Khongkow et al., 2013);而在胰腺癌细胞中,SIRT6 促进了细胞因子的生成 和转移,从而增强了炎症反应、癌症组织血管的生成和癌细胞的转移(Bauer et al., 2012)。

1.8 SIRT7 的研究进展

与其它同家族的蛋白相同的是, SIRT7 需要 NAD⁺作为共底物去参与到其对 组蛋白的催化当中。但是在一般情况下, SIRT7 对于常见的底物并不表现出特别 高的催化活性。SIRT7 的敲除并不改变核仁或者核蛋白整体的乙酰化水平, 这表 明 SIRT7 的去乙酰化催化功能可能只是针对有限种类的蛋白。而有研究也, 表明 一些与 SIRT7 有相互作用的蛋白, 如 mTOR 和 GTF3C1 并没有被其去乙酰化, 表明去乙酰化酶活性可能只是 SIRT7 功能的一部分, SIRT7 同样具有一些非催 化功能 (Tsai et al., 2014)。与其它 Sirtuins 家族蛋白不同, 现今发现的能与 SI RT7 相互作用的蛋白十分有限, 其中能够确定能被 SIRT7 去乙酰化的蛋白目前只 有 p53、H3K18、PAF53、NPM1 和 GABP-β1(Lee et al., 2014; Ryu et al., 2014; Tsai et al., 2014)。

最近关于 SIRT7 在细胞应激反应当中的的报道中,在多种不利因素下,如缺氧、内质网应激、染色体损伤和营养缺乏等, SIRT7 均表现出了一定的抗逆作用。 而 SIRT7 对于 rRNA 和蛋白合成的调控也为其在抗逆过程中发挥功能奠定了基础(Tsai et al., 2014)。

SIRT7 与疾病的相关性同样引人注目,在 Vakhrusheva 等人的实验中,敲除 Sirt7 的小鼠显示出了退行性心肌肥大,但是这种心肌肥大在小鼠初生三个月内 并不显现。同样,缺陷型小鼠的心肌细胞的调往率上升也表明了心肌细胞出现了 退行性病变(Vakhrusheva et al., 2008)。在对另外一个品系的 Sirt7 敲除品系小鼠 的研究中发现,敲除型小鼠的血液中乳糖含量较对照组明显升高,表现出较差的 体力,这一现象被归因于心肌机能不全,而血液中较高的乳糖含量可能是因为心 肌细胞不能够获得足够的氧(Ryu et al., 2014)。在对 SIRT7 另外的研究中,两个 独立的研究小组对 Sirt7 敲除型小鼠进行了检测,发现 SIRT7 的敲除导致小鼠肝 脏内积累过多的脂肪,而将 Sirt7 重新转入 SIRT7 缺陷型肝细胞中,肝细胞积累 的脂肪就会减少,脂肪肝病症减轻。对这一现象的原因可能是因为 SIRT7 的缺失 导致了细胞内持续的未折叠蛋白反应,这表明 SIRT7 在内质网应激的缓解当中起 到重要作用(Shin et al., 2013; Yoshizawa et al., 2014)。

SIRT7 在一些癌症组织中高表达, Barber 经过研究将 SIRT7 归类为癌症基

因是因为 SIRT7 的表达对于癌症症状的保持非常重要。这是由于 SIRT7 对于一 癌基因启动子处 H3K18 氨基酸的持续去乙酰化能够导致抑癌基因表达的降低, 从而增加细胞癌变的几率,同时,H3K18 的持续去乙酰化能够增加癌细胞的转 移并且增加癌症病人的死亡率(Barber et al., 2012)。与之相一致的是,将当在小 鼠皮下注射缺乏 SIRT7 表达的人星形胶质细胞瘤后,观察到 SIRT7 缺陷型肿瘤 与注射普通人星形胶质细胞瘤的体积相比,SIRT7 缺陷型的肿瘤体积明显较小, 这从另外一方面能够说明 SIRT7 的存在对于细胞癌变的发生和及癌细胞活力的 保持具有促进作用(Barber et al., 2012)。类似的报道也见诸于对原发性肝癌、结 肠癌、卵巢癌的报道中。而也有一些报道指出,SIRT7 的高表达本身可能并不能 强烈地诱发细胞癌变的发生,这可以从单独 SIRT7 的高表达并不能引发正常的成 纤维细胞癌变加以佐证。但是应该如何解释 SIRT7 在癌细胞内的高表达的原因? 其中一种可能性可能是因为癌细胞由于分裂和代谢过快,需要大量的 rRNA 和 核糖体蛋白的生成,而 SIRT7 的高表达正能够迎合这一需求(Shin et al., 2013)。

整体来看,综合目前的研究报道,SIRT7可能是一个潜在的致癌因子。

1.9 无脊椎动物 Sirtuins 的研究进展

无脊椎动物,尤其是昆虫 Sirtuins 的研究主要集中在果蝇中,其研究的重点 方向是 Sirtuins 对果蝇寿命延长的作用。Whitaker 等人培育了 dSirt1 转基因果蝇, 实验结果发现转基因果蝇 dSirt1 表达量较对照组表达量高 2~5 倍时,实验组果蝇 寿命较对照组显著增长,但是更高的 dSirt1 表达量反而会缩短果蝇的寿命,这是 因为 dSirt1 的过表达会引发细胞毒性,引发 JNK 调控通路(Whitaker et al., 2013)。 而 Rahman 等人对果蝇 dSirt2 则认为 dSirt2 编码蛋白与人 SIRT3 单边功能相似, dSirt2 缺失的小鼠体内赖氨酸残基的乙酰化程度显著提高,而参与到氧化呼吸作 用的 ATP 合成酶 β 蛋白中赖氨酸残基的乙酰化程度提高尤为明显。dSirt2 的缺乏 也同样能够导致线粒体中复合物 V 活性的降低,而过表达 dSirt2 使复合物 V 的 活性则得到了显著的提高。由此其得出结论: dSirt2 是果蝇体内重要的线粒体能 量调控蛋白参与到多方面的代谢调控中。此外,该研究还初步发现了一条神经酰 胲-NAD⁺-dSirt2 代谢调控通路,神经酰胺造成细胞应激反应后会降低果蝇细胞内 NAD⁺的浓度,而 NAD⁺浓度的降低则会导致 dSirt2 催化活性的下降,最终导致 果蝇细胞内蛋白整体乙酰化水平的提高,引发一系列生理调控反应(Rahman et a l, 2014)。

可以说,无脊椎动物 Sirtuins 的研究正处于起步阶段,无脊椎动物 Sirtuins 蛋白的功能与特点在很多方面与以人为代表的脊椎动物 Sirtuins 蛋白存在着明显的差异,其重要功能同样值得进行深入研究。

1.10 无脊椎动物先天免疫的研究进展

1972 年, Hans Boman 及其同事在 Drosophila melanogaster 中发现了一种 可被诱导的抗细菌免疫反应,这个发现引入了一个研究先天性免疫的新的模式生 物(Boman et al., 1972)。而这又直接导致了抗菌肽(AMPs)的发现,抗菌肽不 仅序列保守性强,且其受到核调控因子 NF-κB 调控(Strominger, 2009)。同时, 研究者还发现了 Toll 通路, 这是一个在抗真菌免疫应答中的关键应答元件。这是 一个在先天免疫研究当中具有里程碑意义的发现,其与哺乳动物中 MYD-88 依 赖的 Toll 样受体(TLR) 具有很高的相似性(Lemaitre et al., 1997; Lemaitre et al., 2012)。D.melanogaster 中体内编码 9 个 Toll 蛋白, 虽然大部分 Toll 蛋白都 只是作为分泌型细胞因子 Spätzle 间接地参与到病原体的识别当中, Toll-7 却能 够直接识别病毒糖蛋白,这一点与哺乳动物 TLR 很相似(Shelly et al., 2009; Na kamoto et al., 2012)。而在呼吸系统上皮细胞中表达的 Toll-8 能够负调控 NF-κ B 的表达(Venken and Bellen, 2014)。Spätzle 是一个具有胱氨酸结构模体的细胞 因子,其结构与哺乳动物白细胞介素-17 相似。其以不具有活性的前体形式分泌, 在机体外部遭受感染或者是内部遭受细胞损伤时,细胞通过丝氨酸蛋白酶级联反 应激活 Spätzle 加工酶 (SPE), 使 Spätzle 被切割成为活性形式。如在外部感染 发生的过程中,循环系统中的丝氨酸蛋白酶 Persephone 能够感应毒性相关的蛋 白酶随之激活 SPE,这一过程被称作效应物诱导的免疫激活。而由细胞坏死诱导 的免疫过程同样也依靠 Persephone 引发应答反应(Hymowitz et al., 2001; Gottar et al., 2006; El Chamy et al., 2008; Ming et al., 2014).



图 1-2: D.melanogaster 对微生物的免疫识别(Buchon et al., 2014)

Figure 1-2: Recogniton mechanism of D.melanogaster immune system

黑腹果蝇体内存在两条经典的信号通路: Toll 通路和 Imd 通路。这两条通路 调控着 D.melanogaster 体内由细菌或真菌诱导的免疫应答。Toll 通路主要在脂肪 体中激活,其与 Imd 通路一起控制着 D.melanogaster 体内抗菌肽(AMPs)的表 达。Imd 通路主要在包括肠道上皮等上皮结构中表达,其能够与活性氧(ROS) 生成酶(如 Duox)等一同发挥抗菌作用。而这些通路的激活均是以微生物细胞 壁成分被识别为基础的。PGRP-LC 和 PGRP-LE 能够识别革兰氏阴性细菌和特定 种类的革兰氏阳性细菌细胞壁上的二氨基庚二酸(DAP)型肽聚糖,从而激活 I md 通路。PGRP-SA 和 GNBP1 能够识别革兰氏阳性细菌细胞壁上的赖氨酸型肽 聚糖,而 GNBP3 能够识别酵母等真菌细胞壁上的 β-葡聚糖,其均能激活 Toll 通 路。Toll 通路的激活最终导致了 NF-κB 转录因子 Dif 的磷酸化,继而引发 NF-κ B 的转录,最终导致诸如抗真菌肽 Drosomycin 及其他相关基因的激活。而 Imd 通路的激活则导致了另外一种 NF-κB 转录因子 Relish 的磷酸化从而引发 NF-κB 角色,与ROS相关的蛋白是 Duox,尿嘧啶是一种细菌的代谢产物,其能够激活 一种未经确认的G蛋白偶联受体(GPCR)并且能够促进内质网中 Ca²⁺的释放, 这最终激活了 Duox。此外,Imd 通路和 GPCR 通路均能够通过一种磷脂酶 Cβ 依赖途径导致 p38 MAPK 的激活,这能够在机体受到细菌感染时维持 Duox 的 表达。

除此之外,Spätzle 也能够被微生物细胞壁成分激活引发其切割。如真菌和 革兰氏阳性细菌可以分别被 GNBP3 和 GNBP1 识别(Gobert et al., 2003; Gottar et al., 2006)。这两类受体均能够识别 modSP 并将之激活。激活的 modSP 能够进 一步激活 SPE 并最终使 Spätzle 切割具备活性(Buchon et al., 2009)。

而果蝇体内第二条免疫通路是免疫缺陷(Imd)通路。Imd 通路是在机体识 别二氨基庚二酸(DAP)型肽聚糖后被触发的。负责识别这类这类肽聚糖的受体 可以是膜受体 PGRP-LC 或者是胞质受体 PGRP-LE。这一通路的激活最终能够引 发 NF-κB 信号通路被激活。除了引发 NF-κB 信号通路的激活之外, PGRP-LE 还能够引发抗菌自噬反应,这对于机体控制细胞内的病原体,如李斯特菌属的病 原微生物具有至关重要的作用(Chang et al., 2006; Kaneko et al., 2006; Lim et al., 2006; Yano et al., 2008)。尽管目前 Toll 通路和 Imd 通路均已经被阐明, 但是更多关于这两个同路的分子机制上的细节仍然值得我们去挖掘。站在整个生 物体的角度将这些通路有关的信息整合在一起,有助于我们进一步理解在疾病导 致的代谢紊乱情况下机体恢复自身平衡的机制(Buchon et al., 2014)。

1.11 本研究的意义

Sirtuins 家族蛋白作为一类重要的组蛋白去乙酰化酶,在机体的多项生理活动中均起到关键的调控作用。近年来发现除了组蛋白去乙酰化酶活性外,Sirtuins 家族蛋白还可以对多种蛋白以非去乙酰化催化作用方式进行调控,这又进一步拓宽了 Sirtuins 家族蛋白在生理上的研究广度。

本工作主要探究了两个家蝇 Sirtuins 家族蛋白基因 MdSirt1 和 MdSirt4 在家 蝇抗逆过程中表达量的变化,初步探索了一条与 MdSirt4 相关的免疫调控通路, 拓展了无脊椎动物中 Sirtuins 家族蛋白的研究,也为今后深入工作的开展打下了 基础。

第2章 实验材料与方法

2.1 实验材料

本实验室所使用的实验动物 Musca domestica 为中国科学院动物所何凤琴老师惠赠并在本实验室成功饲养。

2.2 实验方法与试剂

2.2.1 家蝇的饲养

家蝇生活史简单,易于饲养,是本实验的理想材料。

成蝇饲养于 50 cm×50 cm×50 cm 的纱笼中,置于恒温培养箱中培养,光照 采用 12 h/12 h,温度恒温 28℃,湿度 70%;每日按照 3:1 的质量比投喂红糖 和全脂奶粉共4 g,每日更换清水。

2.2.2 MdSirt1 和 MdSirt4 基因的序列分析方法

家蝇转录组数据为本实验室自测(PRJNA227793)(Tang et al., 2014),人S irt1-Sirt7序列下载自 NCBI 数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)。本工作以人S irt1-Sirt7序列作为种子序列,使用本地 Blast 方法在家蝇转录组中搜索家蝇 Sirtu ins 家族同源序列。本工作使用在线预测工具 ORF finder (http://www.ncbi.nlm.ni h.gov/gorf/gorf.htmL)对核苷酸序列进行 ORF 的预测;使用生物信息分析软件 D NAMAN 构建序列氨基酸推导图;使用序列分析软件 BioEdit 对氨基酸序列的中的氨基酸组成情况进行分析;使用 SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/) 在线预测工具对氨基酸序列进行保守结构域的分析;使用序列分析软件 CLC Ma inWorkbench 5 对不同物种氨基酸序列进行比对;使用 MEGA5.0 软件,采用 NJ 法进行系统发育树的建立。

2.2.3 MdSIRT1 和 MdSIRT4 的原核表达,蛋白纯化及抗体制备

本工作根据 *MdSirt1* 和 *MdSirt4* 基因 ORF 序列设计表达引物,分别以 pET3 0-a 和 pET-DsbA 为表达载体,使用 BL21 (DE3) 为表达宿主进行重组蛋白的原 核表达。实验使用的引物为 Md-sirt1-exF、Md-sirt1-exR、MdSIRT4-exF、MdSIR T4-exR。

表达的重组蛋白使用 Ni-NTA 柱进行纯化,制备的蛋白进行 10% SDS-PAG E,考马斯亮蓝染色检测。

本工作中种多克隆抗体的制备及抗体效价的检测参照《精编免疫学实验指 南》(J.E.科利根等, 2009)进行。

2.2.4 MdSirt1 和 MdSirt4 基因在不同条件下的表达分析

2.2.4.1 家蝇不同发育阶段及幼虫不同组织的样品处理方法

本工作中检测不同发育阶段基因表达量的工作选取家蝇卵、1 龄幼虫、2 龄 幼虫、3 龄幼虫、蛹、成虫共6个发育阶段的样品进行。家蝇的组织定量实验以 3 龄幼虫为实验材料,取全虫并分离表皮、肠道、脂肪体、血淋巴4种组织进行 实验。

2.2.4.2 家蝇幼虫细菌感染实验

本工作采用注射方法进行家蝇幼虫的细菌感染实验。在不同浓度梯度的细菌 感染试验中,分别选取革兰氏阴性细菌 *Escherichia coli* 和革兰氏阳性细菌 *Staphyloccocus aureus*,以1×10⁸ CFU 为基准使用 0.9%生理盐水按照 10 倍梯度稀 释至 1×10⁷ CFU、1×10⁶ CFU、1×10⁵ CFU 四个浓度进行注射,以注射 0.9%生理 盐水组为对照组。家蝇细菌感染后不同时间点实验中,采用 1×10⁶ CFU 为工作浓 进行注射,检测 *MdSirt1* 的实验中采用了将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌混合进行 注射的方法,而检测 *MdSirt4* 的实验中则采用了分别注射两种细菌的方法。在实 验第 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h进行取样。实验动物选取 2 龄幼虫,每头幼虫 注射量为 0.1 μl。

2.2.4.3 家蝇幼虫 CdCl2 刺激,热激处理

在家蝇幼虫 CdCl₂刺激实验中,本工作首先用 0, 2, 5, 10, 25, 50, 100 mM 浓度的 CdCl₂水溶液代替水拌麸皮饲养幼虫,检测不同浓度 CdCl₂刺激下家蝇幼 虫的死亡率,最终选取 25 mM 为本实验的工作浓度。使用上述方法对家蝇幼虫 进行 Cd²⁺处理,并选取 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h 进行取样。

在家蝇热激处理实验中,本工作选取2龄幼虫置于42℃培养箱中,分别于0 h、15 min、30 min、1h取样,之后将幼虫置于28℃条件下进行恢复处理,并于 恢复第2h、4h进行取样。

2.2.5 总 RNA 的提取、qPCR 及 Western Blot 实验方法

2.2.5.1 总 RNA 的提取和反转录

本工作使用 Takara 公司 RNAiso Plus 提取家蝇幼虫总 RNA,操作步骤按照 试剂说明书进行。通过凝胶电泳检测提取 RNA 完整度,用紫外分光光度计测定 RNA 浓度;使用紫外分光光度计检测 RNA 的浓度。取 1 µg 总 RNA,使用 AO LP 引物进行反转录(Liu et al., 2005)。

2.2.5.2 qPCR

本工作采用实时荧光定量 PCR 方法对目的基因的表达量进行检测。其中 *MdSirt1* 的定量引物为 MD-real-SIRT1F、MD-real-SIRT1R, *MdSirt4* 的定量引物 为 MD-real-SIRT4F、MD-real-SIRT4R,内参基因选取 *MdGAPDH*,定量引物为 Md-GAPDH-RtF1 、Md-GAPDH-RtR1。

qPCR 采用 TransGen Biotech 公司 TransStart Green qPCR SuperMix 试剂盒, 具体方法参考高一夫等人论文(Gao et al., 2015)。

2.2.5.3 Western Blot

本工作对选取的家蝇幼虫样品进行蛋白印迹检测,实验主要过程方法参照 《生物化学实验原理与技术》(武金霞等,2005),具体步骤略。

2.2.6 MdSIRT4 蛋白的亚细胞定位

Hela 细胞的培养、传代、冻存、均按照常规方法进行。将 MdSIRT4 ORF 全长构建到细胞表达载体 pEGFP-N1 中,经测序验证无误,以 pEGFP-N1 空载质 粒为对照进行转染,转染实验和免疫荧光实验均按照常规方法进行。转染实验使 用北京博奥龙公司 Quick Shuttle Basic 转染试剂。免疫荧光实验中 AK4 蛋白兔 抗人单克隆抗体购自北京义翘神州生物技术有限公司。免疫荧光实验样品使用 1 X81 型激光共聚焦显微镜进行观察。

2.2.7 MdSirt1 和 MdSirt4 基因的干扰及干扰后基因的功能的分析实验

2.2.7.1 MdSirt1 和 MdSirt4 基因 dsRNA 诱导、合成及干扰敲低实验

MdSirt1 干扰 dsRNA 的制备采用诱导生成的方法,本工作以 *MdSirt1* 序列片 段为模板设计引物扩增,根据 pEGFP-N1 质粒(GenBank 登录号: U55762)为 模板扩增 GFP 片段,使用 L4440 为 dsRNA 表达载体,使用 HT115 为表达宿主 进行了 dsRNA 的诱导表达。使用引物 MD-GR-SIRT1F、MD-GR-SIRT1R、GFP-F、GFP-R。*MdSirt4* 干扰 dsRNA 的制备使用了 TransGen Biotech 公司 T7 High

Efficiency Transcription Kit 进行合成,使用引物为 MD-GR-SIRT4F、MD-GR-S IRT4R、T7。

本工作采用显微注射 dsRNA 的方法对特定基因进行干扰。具体方法为:

(1) 将家收获的家蝇卵用镊子摆放在贴有双面胶的载玻片上

(2) 在卵表面滴加少量的石蜡油

(3) 使用日本成茂(Narishige)显微操作系统显微注射系统在显微镜下进行注射

(4) 将注射后的卵收集如拌好的麸皮中培养

在本工作中,采用对刚孵化的1 龄幼虫进行注射的方式干扰,注射的 dsRN A 的浓度为 50 ng/μl,每头幼虫的注射体积为 0.01 μl。

2.2.7.2 MdSirt1 敲低之后家蝇幼虫在细菌刺激后存活率检测的检测

为了检测在 *MdSirt1* 表达量降低的情况下家蝇幼虫在细菌刺激后成活率情况。本工作选取 100 只敲低 *MdSirt1* 基因的 2 龄幼虫进行细菌刺激,对照组采用注射 dsGFP 的同批 2 龄幼虫,进行同样处理。细菌刺激后,检验细菌刺激后不同组别 0 h、3 h、6 h、24 h、36 h家蝇幼虫的成活情况,统计成活率。

2.2.7.3 MdSirt4 敲低之后家蝇幼虫核转录因子和抗菌肽表达变化的检测

所以本工作采取了注射 dsRNA 干扰的方法降低了家蝇幼虫体内 *MdSirt4* 的 表达量,之后使用 qPCR 的方法检测了干扰 *MdSirt4* 之后家蝇体内 *MdNF-κB*mR NA 表达量的变化及四种家蝇抗菌肽表达量的变化,本实验中使用的引物包括 M D-real-SIRT4F、MD-real-SIRT4R、atta-F、atta-R、dip-F、dip-R、muscin-F、mus cin-R、cecropin-F、cecropin-R、NF-kappa-B real F、NF-kappa-B real R、Md-G APDH-RtF1、Md-GAPDH-RtR1。

2.2.8 数据统计与分析方法

采用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行统计分析,组间差异采用单因素方差分 析和 Tukey 氏检验方法,两组比较采用 Student *t*-test 进行分析。

2.3 实验仪器

本工作中使用的实验仪器见表 2-3:

表 2-3 本工作中使用的仪器

Tbble 2-3 Labotoratory Instruments

仪器名称	仪器作用	仪器品牌
AB Applied Biosystem Veriti 96 well Thermal	PCR 反应	Gene company limited
真空浓缩机	化学物质的蒸发干燥	Eppendorf new brunswick
G:BOX 型紫外凝胶成像仪	PCR 产物的检测	YNGENE
Centrifuge 5430R 型离心机	高速离心	Eppendorf new brunswick
超净工作台	无菌操作	AIRTECH
DYCP-32B型水平核酸电泳仪	核酸电泳	北京六一
紫外分光光度计	核酸浓度及质量的测定	Biodrop
制冰机	制冰	SANYO
IS-RDS3 型摇床	细菌培养	CRYSTAL
Light Cycler 96	实时荧光定量 PCR	Roche
FluorChemE 型成像仪	化学发光显色	Protein Simple
SMART Ultra-purewater system	超纯水的制备	Heal Force
Mini Protean Tetra System	蛋白质凝胶电泳及 Western	BIO-RAD
SCIENTZ 型超声破碎仪	细菌及组织细胞的超声破碎	SCIENTZ
CIMO QHX-400BS-III 型人工 气候箱	家蝇饲养	新苗
MODEL P97 型拉针仪	纤维注射针的拉制	Narishige
MF-9型断针仪	显微注射针的塑形	Narishige
IM-9B型显微注射器	显微注射	Narishige
1X151 型显微镜及显微操作 系统	显微注射	01ympus
1X81 型激光共聚焦显微镜	免疫荧光	01ympus

2.4 引物列表

本工作中所使用的引物见表 2-4:

表 2-4 引物

Table 2-4 Primers

	引物名称	引物序列 (5'-3')	酶切位点
干扰引物	MD-GR-SIRT1F	GCGAATTCAAGTCCGACCAGT	EcoR I
	MD-GR-SIRT1R	GCAAGCTTGAAACGCAGTCAT	Hind III
	MD-GR-SIRT4F	GCGAATTCCACCCATTATTCTT	Nde I
	MD-GR-SIRT4R	GCAAGCTTCAAACTGGAACCC	Hind III
	GFP-F	CGGAATTCATGGTGAGCAAGG	EcoR I
	GFP-R	CGCTCGAGCTTGTACAGCTCG	XhoI
重组蛋白表达引物	pEGFP-Mdsirt4F	CGGGGTACCATGCGTTTTACA	KpnI
	pEGFP-Mdsirt4R	TCCCCCGGGTTTGTTCTTAAAA	SmaI
	Md-sirt1-exF	CGAGCTC	SacI
	Md-sirt1-exR	CCCTCGAGTTATATGGAAACG	XhoI
	MdSIRT4-exF	CGGGATCCATGCGTTTTACACA	BamHI
	MdSIRT4-exR	CCCAAGCTTTCATTTGTTCTTA	HindIII
	MD-real-SIRT1F	AAGTCCGACCAGTAGCAT	
	MD-real-SIRT1R	ACATCACCATCTCCCAAC	
	MD-real-SIRT4F	GTTGGGTTCCAGTTTGTT	
	MD-real-SIRT4R	AATGATCGGCTCTTGTCT	
	atta-F	CCACGGGTCACAGCGATTC	
	atta-R	TCCATTTCAGCGAGCCAC	
	dip-F	TGGTTGCCGACGATAAGT	
	dip-R	CTGTGGCATCAAACGAAT	
	muscin-F	ATACTCGTGGTGCTGCTAAT	
	muscin-R	ATCGCAAATCCTCTGGTCTA	
定量引物	cecropin-F	TCGTTGCCTTAGTCTTGG	
	cecropin-R	ATTGTAGCATCGCGGGTA	

	NF-kappa-B real F	CTGGTAGGCATGGGCATTG
	NF-kappa-B real R	TTGTCGTAGGCGGCGTGT
	Md-GAPDH-RtF1	AACGGTAAACTCACTGGTATG
	Md-GAPDH-RtR1	CATCGGTGTAGCCCAAGATA
反转录引物	AOLP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T
体外转录引物	Τ7	TAATACGACTCACTATAGGG

第3章 实验结果与分析

3.1 MdSirt1 和 MdSirt4 的生物信息学分析

3.1.1 Sirtuins 家族蛋白系统发育树的建立

本工作选取不同物种的 Sirtuins 蛋白氨基酸序列与转录组中预测的五条家蝇 Sirtuins 家族蛋白氨基酸序列共同建立系统发育树。结果发现转录组中预测的 MdSIRT1 与 MdSIRT4 序列分别于其他物种的 SIRT1 和 SIRT4 序列聚在一起。



图 3-1: Sirtuins 家族蛋白氨基酸序列系统发育树的建立

Figure 3-1: An NJ phylogenetic of Sirtuins from various species

中国知网 https://www.cnki.net

智人 Homo sapiens; 黑猩猩 Pan troglodytes; 家牛 Bos taurus; 小鼠 Mus musculus; 斑马鱼 Danio rerio; 白斑狗鱼 Esox lucius; 黑腹果蝇 Drosophila melanogaster; 地中海实蝇 Ceratitis capitata; 意大利蜜蜂 Apis mellifera; 家蝇 Musca domestica; 厩螫蝇 Stomoxys calcitrans; 非洲鸵鸟 Struthio camelus; 原鸡 Gallus gallus; 秀丽隐杆线虫 Caenorhabditis elegans; 酿酒 酵母 Saccharomyces cerevisiae

3.1.2 MdSirt1 与 MdSirt4 核酸序列分析

为了更全面地了解 *MdSirt1* 与 *MdSirt4* 的基因功能,本工作首先对 *MdSirt1* (GenBank 登录号: XP_005182634)与 *MdSirt4*(GeneBank 编号: XP_005180474.1) 的全长序列进行了分析,分析结果显示: *MdSirt1* 序列 ORF 全长 2667 bp,共编码 888 个氨基酸; *MdSirt4* ORF 全长 930 bp,编码 309 个氨基酸。

¹ ACCCTAATATAGTTGGTGAATGGACGGACTCAATCGTCGCCATCTTATTGCTGTGTGTTTTGAAGAGAAATGATGAAAAAAAGAGTAA 91 181 271 361 TGCTTTCGTATTTAGTTAGCAAGGATTTGGGCTGTGGTAGTTTCGAGACTGAGCCACTAGAAATGATGAACAACTATGAACAGGCGAGAT MMNN YE OAR 451 TGCCCACAGAGCGTTTGAAGGATATCCGCCGATATTCATCAGATAAACTTTCCCGAGGAGTCAGTATTTGAACATGTCGATGTAAAAAACAC ERLKDIGDIHQINFPEES VFEHVDVK 541 AAAATTTTAATTTTGGCGCCAATATTATAAGCACAACAACAATGTCATCGTCTGCACTTATTTCGACCAGCGAAGAGGGAGATCAAAACAA NFGANTT STT т MS S SAL T S NF т S E E E 631 ACTCAATGAAAGAAATACAAACAATAACATTACCGCCCAACGCTTTCCACAGAAGATTTAGAAATAGTTGGTTCTTCAATCGCAGACACTC MKE IQTITLPP TLSTEDLEI V G S IAD S S CTCCAGTAAGCGTAGATGAGAGAGACAAGACTCGGAGGAGAGTGCACAGAAGGAGAGTTGTCGGTGGAAGATGTTTTCCACGGCGCATCAAAAC 721 V S V D E R Q D S E E C T E G E L S V E D V F H G 811 H TEDI THSEQS SQGG TELNT S S V N D N D 901 ATG ATG AAG AAG ACGCAGA TG ACG ACG AAG AT TCGG ATG ATTCTTCCTCAG ACTCGG ACTACTCCG ATTTAAG TGG TCTG TCAG ATA D D EED A D D D D E D S D D S S SDSD Y S D L G L 991 ${\tt TGTCCGGCAAGGAGTGGAAACCGATTAGTCGCCCATTGAACTGGGTCCAGAAGCAAATACATTCGGGGGGCAAATCCTCGGGAAATTTTGT$ NPR K E W K P SRPLNWVQ KQ H S 1081 K F L P T S A Q R I S P E L T D M T L W R I L A S M M A E 1171 RRKKLS YVNTFDDV IDLLHK K N 1261 GTGCCGGTGTTTCAGTATCTTGTGGTATACCTGATTTTAGATCCTCAGATGGTATATATTCTCGATTGGCCAAAGATTTCCCCAACTTAC A G V S V S C G I P D F R S S D G I Y S R L A K D F PNI. CCGATCCGCAGGCCATGTTTGATATCAATTATTTTTCCCGAGATCCGAGACCGTTTTACAAATTTGCCCGCGAAATTTATCCGGGACAGT 1351 P D P Q A M F D I N Y F S R D P R P F Y K F A R E I Y P G Q

河北大学理学硕士论文

1441	${\tt TTAAGCCGTCACCGTGCCATCGATTTATAAAAATGCTAGAACAAAAACAAAAGTTGTTAAGGAACTACACCCCAGAATATAGACACACTAGACAAAATGCTAGAAAAAAAA$
	F K P S P C H R F I K M L E Q K Q K L L R N Y T Q N I D T L
1531	ARCAGE TIGGCC GGCATAAAAAA TGTCATIGAG TGTCACGGCTCCTTTTCGACAGC TGCTGCACCAAATGCAA
1621	
1021	E S T R A D T F A O R T P V C P R C O P N V E O S V D A S O
1711	CGGTATCTGAAAGTGGACTACGACAGCTTGTGGAGAACGGCATAATGAAACCCGACATAGTCTTCTTTGGAGAAGGATTACCAGAAGAAT
	P V S E S G L R Q L V E N G I M K P D I V F F G E G L P E E
1801	TCCACACTGTCATGGCAAGTGACAAAGATAAATGCGATCTACTGATTGTTATGGGTTCATCACTTAAAGTCCGACCAGTAGCATTGATTC
	F H T V M A S D K D K C D L L I V M G S S L K V R P V A L I
1891	CCAGCTCAATACCGAATAATGTACCACAGATCTTGATTAATCGCGAACAACTACACCACCTGGAGTTCGATGTTGAACTGTTGGGAGATG
1001	P S S I P N N V P Q I L I N K E Q L H H L E F D V E L L G D
1981	
2071	AATTAATGGCATTGAATGATGACGAAGGGGATTGTGAAAGCAGTATGAAAGGAACACATCGCCAAGGATAACGACTGCGTTTCCATAA
2011	ELMALNDDEGDCESSMKGTHPPTDNDCVSI
2161	AATCCAGCCAATCCAATGATTTAATGTTGCAGTCTGGCACAAATTATTCCGATTCCGGCTTTGAAACTTCATCAACATCATCCATAAAGC
	K S S Q S N D L M L Q S G T N Y S D S G F E T S S T S S I K
2251	GAGACGGAGAATTTCTCTGCCCCCGATTATCTAGATGAACCTCTTGAGTCCACAGATTTTGGTGGTTCTTGTGATTATCGTCACCTGTCTA
	R D G E F L C P D Y L D E P L E S T D F G G S C D Y R H L S
2341	TCGACTCATCAAAAGATAGTGGTATTTTTAGGCGATGCCTCCAAATTCGGCGACGACTCCTGTCTTCAAAAGTGGGGTTTTCTGAAAACAGGCG
2431	
2451	THE TRADAMAGE TO AN INCLUSION CONTRACT AND A STATE AND
2521	CAGTAGCGGCTACAGATGATGAATCCAAAGATGGCGAAAAAAGTATCCGTAAAAAGCAAAAACGTCAAAGTGCTGCTGCTGAGAGGTTGTACA
	T V A A T D D E S K D G E K S I R K K Q K R Q S A A E R L Y
2611	AAGGTACATATTACGCACATGATGTTTCTTCGTCCTATGTATTTCCTGGTGCCCAAGTATCGTGGTGTTCAGACTCCGAAGAGGAGGAGGATG
	* ^ T V V & U D V C C C V V E D C & O V C W C C D C E E E D
	K G I I I A H D V S S S I V F F G A Q V S W C S D S E E E D
	KalliyUn appoint Lave appeen
0701	
2701	AGGATGAGGAAGACGATGATGAAGATTGTGCTAATTCTAAGGATACTAAGGAGACAAATTCCGGCGATGTTCAGGCAGATGAAACTGCAA
2701	AGGATGAGGAAGACGATGATGAAGATTGTGCTAATTCTAAGATTACTAAGGAGACAAATTCCGGCGATGTTCAGGCAGATGAAACTGCAA E D E E D D D E D C A N S K I T K E T N S G D V Q A D E T A
2701 2791	AGGATGAGGAAGACGATGATGATGATGAGATTGTGCTAATTCTAAGATTACTAAGGAGACAAATTCCGGCGATGTTCAGGCAGATGAAACTGCAA E D E E D D D E D C A N S K I T K E T N S G D V Q A D E T A ATTCTGCAACGTCAACGTCAATGATGAGAACGTCAGCCCAAAGTGAAACGACTACCTTTACTAATATTATTACAATCAACCAGCGGGGGG
2701 2791	AGGATGAGGAAGACGATGATGAGATTGTGCTAATTCTAAGATTACTAAGGAGACAAATTCCGGCGATGTTCAGGCAGATGAAACTGCAA E D E E D D D E D C A N S K I T K E T N S G D V Q A D E T A ATTCTGCAACGTCAACGTCAATGATGAGACAGCTCAGCCCAAAGTGAAACGACTACCTTACTAATATTATTACAATCAACCAGCCGCGGG N S A T S T S M M T T S A Q S E T T T F T N I I T I N P A A
2701 2791 2881	AGGATGAGGAAGACGATGATGAAGATTGTGCTAATTCTAAGGATTACTAAGGAGACAAATTCCCGGCGATGTTCAGGCAGATGAAACTGCAA E D E E D D D E D C A N S K I T K E T N S G D V Q A D E T A ATTCTGCAACGTCAACGTCAATGATGACAACGTCAGCCCAAAGTGAAACGACTACCTTTACTAATATTATTACAATCCAACCGCGGCGG N S A T S T S M M T T S A Q S E T T T F T N I I T I N P A A AACAACAGGAAAAAGAGGACATTCCAACGTCAGCCCGGCGGAAATCCCCTCTCAAGATGGCGATAATCCAACCATCAACATCCGTTA
2701 2791 2881	AGGATGAGGAAGACGATGATGAAGATTGTGCTAATTCTAAGATTACTAAGGAGACAAATTCCGGCGATGTTCAGGCAGATGAAACTGCAA E D E E D D D E D C A N S K I T K E T N S G D V Q A D E T A ATTCTGCAACGTCAACGTCAATGATGACAACGTCAGCCCAAGGTGAAACGGACTACCTTACTAATATTATTACAATCCAACCAGCAGCGGG N S A T S T S M M T T S A Q S E T T T F T N I I T I N P A A AACAACAGAAAAAGAGAGACATTCAACGGATAGCCCGGCAGAAATCTCCTACAAAGAGGGGATAATCCAACCACCAGCAGCAGCAGTA E Q Q K K R H S T D S P A E I S Y N T E D G D N P T S T S V
2701 2791 2881 2971	AGGATGAGGAAGACGATGATGAAGATTGTGCTAATTCTAAGATTACTAAGGAGACAAATTCCGGCGATGTTCAGGCAGATGAAACTGCAA E D E E D D D E D C A N S K I T K E T N S G D V Q A D E T A ATTCTGCAACGTCAACGTCAATGATGACAACGTCAGCCCAAAGTGAAACGACCAGCCTTACTAATATTATCAATCA
2701 2791 2881 2971	AGGATGAGGAAGACGATGATGAAGATTGTGCTAATTCTAAGATTACTAAGGAGACAAATTCCGGCGATGTTCAGGCAGATGAAACTGCAA E D E E D D D E D C A N S K I T K E T N S G D V Q A D E T A ATTCTGCAACGTCAACGTCAATGATGACAACGTCAGCCCAAAGTGAAACGACTACCTTTACTAATATTATTACAATCAACCACCACCACGGG N S A T S T S M M T T S A Q S E T T T F T N I I T I N P A A AACAACAGGAAAAAGAGGACATTCAACGGATGGCCGAGAAATCCCACCACAGGAGATGGCGATAATCCAACATCAACCACCAGTCA E Q Q K K R H S T D S P A E I S Y N T E D G D N P T S T S V GCCCGCATGTCCACCTCCACCAGAGGACGGACGAGGAGTCCGCCCACCCCTCGTCACCCACAGGTCCTTCCT
2701 2791 2881 2971 3061	AGGATGAGGAAGACGATGATGATGAGGATGGTGCTAATTCTAAGGATTACTAAGGAGACAAATTCCCGGCGATGTTCAGGCAGATGAAACTGCAA E D E E D D D E D C A N S K I T K E T N S G D V Q A D E T A ATTCTGCAACGTCAACGTCAATGATGACGACGTCAGCCCAAAGTGAAACGACTACCTTTACTAATATTATTACAATCAACCACGAGCGGG N S A T S T S M M T T S A Q S E T T T F T N I I T I N P A A AACAACAGGAAAAAGAGGACATTCAACGGATAGCCCGGCGGGAGAATCCCCACCACGAGAGAGA
2701 2791 2881 2971 3061	AGGATGAGGAAGAGAGATGATGAGATTGTGCTAATTCTAAGATTACTAAGGAGACAAATTCCGGCGATGTTCAGGCAGATGAAACTGCAA E D E E D D E D C A N S K I T K E T N S G D V Q A D E T A ATTCTGCAACGTCAACGTCAATGATGACGACGACGTCAGCCCAAAGTGAAACGACTACCTTACTAATATTATTACAATCCAACCCAGCAGCGGG N S A T S T S M M T T S A Q S E T T T F T N I I T I N P A A AACCAACAGGAAAAAGAGGACATTCAACCGATAGCCCGGCGGAAATTCCCACACACA
2701 2791 2881 2971 3061 3151	AGGATGAGGAAGACGATGATGAAGATTGTGCTAATTCTAAGATTACTAAGGAGACAAATTCCGGCGATGTTCAGGCAGATGAAACTGCAA E D E E D D D E D C A N S K I T K E T N S G D V Q A D E T A ATTCTGCAACGTCAACGTCAATGATGACAACGTCAGCCCAAGGTGAAACGGACTACCTTACTAATATTATTACAATCCAACCCAGCAGCGG N S A T S T S M M T T S A Q S E T T T F T N I I I I N P A A AACAACAGAAAAAGAGACATTCAACGGATAGCCCGGCGAGAAATCTCCCTACAAGATGGCGATAATCCAACACCAGCAGCGGCG N S A T S T S M M T T S A Q S E T T T F T N I I I N P A A AACAACAGGAAAAAGAGACATTCAACCGATAGCCCGGCGAGAAATCTCCCTACAAACACAGAGAGAG
2701 2791 2881 2971 3061 3151 3241	AGGATGAGGAAGACGATGATGAAGATTGTGCTAATTCTAAGATTACTAAGGAGACAAATTCCGGCGATGTTCAGGCAGATGAAACTGCAA E D E E D D D E D C A N S K I T K E T N S G D V Q A D E T A ATTCTGCAACGTCAACGTCAATGATGAGACGGCCAAGGTGAAACGACTACCTTTACTATATTATTATACAATCAACCACCAGCAGGG N S A T S T S M M T T S A Q S E T T T F T N I I T I N P A A AACAACAGAAAAAGAGACATTCAACCGATAGCCCGGCAGAAATCCCTCACACACA
2701 2791 2881 2971 3061 3151 3241 3331	AGGATGAGGAAGACGATGATGAGGATTGTGCTAATTCTAAGGATTACTAAGGAGACAAATTCCCGGCGATGTTCAGGCAGATGAAACTGCAA E D E E D D D E D C A N S K I T K E T N S G D V Q A D E T A ATTCTGCAACGTCAACGTCAAGTGAGACAGCGTCAGCCCAAAGTGAAACGACTACCTTTACTAATATTATAACAACCAGCAGCAGCGGG N S A T S T S M M T T S A Q S E T T T F T N I I T I N P A A AACAACAGGAAAAAGAGGACATTCAACCGATAGCCCGGCGGCAGAAATCCCCTCACACACA
2701 2791 2881 2971 3061 3151 3241 3331 3421	AGGATGAGGAAGACGATGATGAGAATTGTGCTAATTCTAAGATTACTAAGGAGACAAATTCCGGCGATGTTCAGGCAGATGAAACTGCAA E D E E D D D E D C A N S K I T K E T N S G D V Q A D E T A ATTCTGCAACGTCAACGTCAATGATGACGACGACGTCAGCCCAAAGTGAAACGACTACCTTACTAATATTATTACAATCCAACCGGCGGCGG N S A T S T S M M T T S A Q S E T T T F T N I I T I N P A A AACCAACAGGAAAAAGAGGACATTCAACCGATAGCCCGGCGGCAGAAATCCCCACAGAGAGAG
2701 2791 2881 2971 3061 3151 3241 3331 3421 3511	AGGATGAGGAAGACGATGATGAAGATTGTGCTAATTCTAAGATTACTAAGGAGACAAATTCCGGCGATGTTCAGGCAGATGAAACTGCAA E D E E D D D E D C A N S K I T K E T N S G D V Q A D E T A ATTCTGCAACGTCAACGTCAATGATGACAACGTCAGCCCAAGGTGAAACGACTACCTTACTAATATTATTACAATCCAACCAGCAGCAGCGG N S A T S T S M M T T S A Q S E T T T F T N I I T I N P A A AACAACAGGAAAAAGAGGACATTCAACCGATAGCCCGGCGGCAGAAATCCCCTCTACAACAATCCAACCACCAGCAGCGGCG N S A T S T S M M T T S A Q S E T T T F T N I I T I N P A A AACAACAGGAAAAAGAGGACATTCAACCGATAGCCCGGCGGCAGAAATCCCCACCAGGAGAGGGGGGATAATCCAACCATCCAACCATCCAACCATCCAACCATCCAACCATCCAACCATCCAACCATCCAACCATCCAACCATCCAACCATCCAACCATCCAACCATCCGACCATCCGCCAACCCCCCTGTCACCAACAGTCCCCTGCAACCTCTGAACTCCGTTA E Q Q K K R H S T D S P A E I S Y N T E D G D N P T S T S V GCCCGCGATAGTCCACCTGCGACCAGGAGGACGACGACGACGACCCCCCTGTCACCAACAGTCCTCTTGCAACCTGTAAATACTT S P H S P P P H K R R R D S A N T P S S P T V S L Q P V N T TTAATCGTGGGCCTGTCGTCGTCGTCATCGTAAGGCCACTAATTTCCAATTATTAAAATTCTTAATTTTAAAAATATTTTAAAATATTTTTT
2701 2791 2881 2971 3061 3151 3241 3331 3421 3511 3501	AGGATGAGGAAGACGATGATGAAGATTGTGCTAATTCTAAGATTACCTAAGGAGACAAATTCCGGCGATGTTCAGGCAGATGAAACTGCAA E D E E D D D E D C A N S K I T K E T N S G D V Q A D E T A ATTCTGCAACGTCAACGTCAATGATGAGAAGGTCAGCCCAAGGAGAAAGGACTACCTTTACTATATTATTATCAATCA
2701 2791 2881 2971 3061 3151 3241 3331 3421 3511 3601 3601	AGGATGAGGAAGAGACAGATATAAGGCATGTGCTCAATTCTAAGGATTACTAAGGAGAGAAAATTCCCGGCGATGTTCAGGCAGATGAAACTGCAA E D E E D D D E D C A N S K I T K E T N S G D V Q A D E T A ATTCTGCAACGTCAACGTCAAGTGAGAGAGAGAGAGGACGACGACGACGACGACGACGACGAC
2701 2791 2881 2971 3061 3151 3241 3331 3421 3511 3601 3691 3791	AGGATGAGGAAGAGACATGATGATGATGTGCTAATTGTAAGATTACTAAGGAGACAAATTCCGGCGATGTTCAGGCAGATGAAACTGCAA E D E E D D D E D C A N S K I T K E T N S G D V Q A D E T A ATTCTGCAACGTCAACGTCAATGATGAGACGACGTCAGCCCAAAGTGAAACGACTACCTTACTAATATTATTACAATCCAACCAGCAGCGG N S A T S T S M M T T S A Q S E T T T F T N I I T I N P A A AACAACAGGAAAAAGAGAGACATTCAACCGATAGCCCGGCGGCAGAAATCCCCCCCC
2701 2791 2881 2971 3061 3151 3241 3331 3421 3511 3601 3691 3781 2971	AGGATGAGGAAGACAACAAACAAACAAACAAACTACTAAGAAAAAAAA
2701 2791 2881 2971 3061 3151 3241 3331 3421 3511 3691 3691 3781 3871 2921	AGGATGAGGAAGACGATGATGAAGATTGTGCTAATTCTAAGATTACTAAGGAGACAAATTCCGGCGATGTTCAGGCAGATGAAACTGCAA E D E E D D D E D C A N S K I T K E T N S G D V Q A D E T A ATTCTGCAACGTCAACGTCAATGAGAAGGTCAGCCAAAGTGAAACGACTACCTTTACTAATATTATTACAACCAAC
2701 2791 2881 2971 3061 3151 3241 3331 3421 3511 3691 3691 3781 3781 3781	AGGATGAGGAAGAGACGATGATGAAGATTGTGCTAATTCTAAGGATTACTAAGGAGAGAAAATTCCCGGCGATGTTCAGGCAGATGAAACTGCAA E D E E D D D E D C A N S K I T K E T N S G D V Q A D E T A ATTCTGCAACGTCAACGTCAAGTGACGACGTCGGCCCGAAGTGAAACGACTACCTTTACTAATATTATTACAAACCACCGGCGGGG N S A T S T S M M T T S A Q S E T T T F T N I I T I N P A A AACCAACAGAAAAAGAGACATTCAACCGATAGCCCGGCAGAAATCCCCTCACACACA

图 3-2: MdSirt1 cDNA 序列及其推到氨基酸序列

Figure 3-2: The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of MdSirt1

ATG: 起始密码子; TAA: 终止密码子; AATAA: 加尾信号

1	TTTT	TTT	AGT	TTG	TGO	TGG	CAA	TAT	TGC	AAT	ATT	TAG	TTT	TTG	TTA	TGI	GAG	TGA	TTG	AGA	ACT	TCG	GGG	ACC	AAA	ACA	AAG	TGA	AAC	AA
91	AATG	CGT	TTT	ACA	CAA	GTT	TTG	CGT	TTG	CGG	ATC	AAA	TGC	CCA	GAA	TTA	ACT	GCC	GCT	AAA	CAA	CAA	TAT	GTG	CCT	AAA	CAT	CAA	CCA	GC
	М	R	F	Т	2	V	L	R	L	R	I	K	С	P	Ε	L	Т	A	A	K	2	2	Y	v	P	K	H	2	P	A
181	AGTG	GAA	AAG	GAC	ATT	AAG	AAA	TTG	GAA	GAC	TTC	CTA	ATG	GAC	AAA	CCG	AAA	ATA	GTT	GTG	CTG	ACG	GGA	GCG	GGC	ATA	TCA	ACA	GAA'	тс
	v	Ε	K	D	I	K	K	L	Ε	D	F	L	М	D	K	P	K	I	v	v	I	8	H	М	Ε	F	v	R	s	P
271	AGGI	ATA	CCA	GAC	TAT	CGI	TCI	GAA	GGC	GTT	GGT	CTA	TAT	GCC	CGA	AGT	TAAT	CAC	AAA	CCT	ATT	CAG	CAT	ATG	GAA	TTT	GTA	CGT	TCG	cc
	L	Т	G	A	G	I	S	Т	Ε	S	G	I	P	D	Y	R	S	Ε	G	v	G	L	Y	Α	R	S	N	H	K	P
361	AAGT	GIG	CGA	CAA	CGC	TAT	TGG	GCT	AGA	AAT	TTT	GTA	GGT	TGG	CCA	AAA	TTT	TCI	TCC	ACT	GAA	CCG	AAT	TCC	ACC	CAT	TAT	TCT	TTA	GC
	S	V	R	8	R	Y	W	A	R	N	F	v	G	W	P	K	F	S	S	Т	Ε	P	N	S	Т	H	Y	S	L	A
451	CCGC	TTC	GAA	CGA	GAG	GGI	CGC	CTT	CAA	TGT	GTA	GTI	ACA	CAA	AAT	GTI	GAT	CGI	TTG	CAT	ACC	AAA	GCG	GGA	AGC	GAA	AAT	GTT	ATA	GA
	R	F	Ε	R	Ε	G	R	L	8	С	v	v	Т	8	N	v	D	R	L	H	Т	K	A	G	S	Ε	N	V	I	Ε
541	ACTT	CAT	GGT	TCG	GGI	TAT	GTI	GTG	AAA	TGT	CTC	TCA	TGT	GAC	TAT	AAA	ATC	GAT	CGC	CAT	GAG	TTT	CAG	CAT	ATT	TTA	AAC	GAT	TTG	AA
	L	H	G	S	G	Y	v	V	K	С	L	S	С	D	Y	K	I	D	R	H	Ε	F	8	H	I	L	N	D	L	N
631	TCCA	GAA	TTT	AAA	GAI	GCI	CCC	GAT	ATG	ATA	CGT	CCA	GAT	GGT	GAT	GTI	GAG	ATT	CCC	CAA	GAA	TAC	ATC	GAC	AAT	TTC	CGT	ATT	CCC	AA
	P	Ε	F	K	D	A	P	D	М	I	R	P	D	G	D	v	Ε	I	P	8	Ε	Y	I	D	N	F	R	I	P	N
721	TTGC	CCG	CAG	TGT	GAI	GAT	AAT	CGT	TTG	AAA	CCA	GAA	ATT	GTA	TTT	TTT	GGI	GAT	AAT	GIG	CCC	AAG	ACA	CGA	GTC	AAT	AGT	ATA	GCT(GA
	С	P	8	С	D	D	N	R	L	K	P	Ξ	I	v	F	F	G	D	N	V	P	K	Т	R	V	N	S	I	A	Ε
811	AATG	ATT	TAT	GCC	GGA	GAT	GGI	CTG	TTA	GTG	TTG	GGI	TCC	AGT	TTG	TTG	GIG	TTC	TCC	GGA	TAT	CGT	ATG	GTA	TTG	CAG	GCA	AAG	GAC	СТ
	М	I	Y	A	G	D	G	L	L	V	L	G	S	S	L	L	V	F	S	G	Y	R	М	v	L	8	A	K	D	L
901	AAAT	TTG	CCA	GTG	GCG	ATT	GTA	AAT	ATT	GGC	GAG	ACA	AGA	GCC	GAT	CAT	TTG	GCG	GAT	CTA	AAG	TTA	TCA	GCA	AAA	TGT	GGA	GAT	GTT	AT
	N	L	P	V	A	I	v	N	I	G	Ε	Т	R	A	D	H	L	A	D	L	K	L	S	A	K	С	G	D	v	I
991	ACCG	AAG	TTG	TTT	AAT	TTT	AAG	AAC	AAA	TGA	IGI	TTT	GTT	GIG	AAT	TTA	GTA	TAA	TTT	GAT	TAC	TGT	AGA	GAA	AAA	TAA	TAG	AAC	AAA	TΤ
	P	K	L	F	N	F	K	N	K	*																				
1081	GTTA	ATA	AGT	TTA	TTI	TGI	AAT	AAA	AGT	GGG	CAA	CGA	AAG	CGT	TTA	CAT	AAG	AAG	TAC	ATT	GTA	TAA	AAT	С						

图 3-3: MdSirt4 的 cDNA 和氨基酸序列

Figure 3-3: The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of MdSirt4

ATG: 起始密码子; TAA: 终止密码子; AATAA: 加尾信号

3.1.3 MdSIRT1 和 MdSIRT4 氨基酸组成分析与保守结构域的预测

为了了解 MdSIRT1 和 MdSIRT4 氨基酸序列的组成情况,本工作对 MdSIRT1 和 MdSIRT4 氨基酸序列的中的氨基酸组成情况进行了分析,之后对两者的氨基 酸序列的保守结构域进行了预测。分析结果发现: MdSIRT1 氨基酸序列中丝氨 酸的含量最高,含量较高的氨基酸种类还有苏氨酸、天冬氨酸和谷氨酸; MdSIRT4 氨基酸序列中亮氨酸的含量最高,含量较高的氨基酸种类还有苏氨酸、天冬氨酸和谷氨酸、天冬氨酸 和赖氨酸。



MdSIRT1 序列第 280-485 位氨基酸组成 SIR2 保守结构域;而 MdSIRT4 氨基酸序列在 53-259 位同样具有一段保守的 SIR2 保守结构域。



图 3-4: MdSIRT1、MdSIRT4 蛋白质氨基酸组成分析及其保守结构域的预测

Figure 3-4: The analysis of MdSIRT1, MdSIRT4 amino acid sequence and their conservative

domain

A: MdSIRT1蛋白质氨基酸组成分析 The composition of MdSIRT1 amino acid sequenc e; B: 预测得到的 MdSIRT1 的保守结构域 Conservative domain of MdSIRT1; C: MdSI RT4蛋白质氨基酸组成分析 The composition of MdSIRT4 amino acid sequence; D:预测 得到的 MdSIRT4 的保守结构域 Conservative domain of MdSIRT4

3.1.4 SIRT1、SIRT4 氨基酸序列的比对

本工作分别对包括家蝇在内的不同物种的 SIRT1 和 SIRT4 氨基酸序列进行 了比对,结果显示不同物种间 SIRT1 及 SIRT4 氨基酸序列的保守性较高。



第3章 实验结果与分析

图 3-5: SIRT1 和 SIRT4 氨基酸序列的比对

A: SIRT1 氨基酸序列的比对 Alignment of SIRT4amino acid sequence; B: SIRT4 氨基 酸序列的比对 Alignment of SIRT4amino acid sequence; 小家蚁 Monomorium; 阿根廷蚂 蚁 Linepithema; 蜜蜂 Apis; 灰翅麦茎蜂 Cephus; 叶峰 Neodiprion; 侧沟茧蜂 Microplitis; 果实蝇 Bactrocera; 地中海实蝇 Ceratitis; 黑腹果蝇 Drosophilia; 库蚊 Culex; 按蚊 Anoph eles; 家蚕 Bombyx; 拟谷盗 Tribolium; 家蝇 Musca

3.2 MdSIRT1 和 MdSIRT4 重组蛋白的表达与纯化

本实验根据 MdSirt1 保守结构域部分序列构建了 pET-30a-MdSIRT1 重组表达载体。经检测, pET-30a-MdSIRT1 重组蛋白主要在包涵体当中表达,纯化重组蛋白大小 49 ku,条带大小与预测值相符;而 MdSIRT4 重组蛋白同样主要在包涵体当中表达。纯化的重组蛋白大小 59 ku,条带大小与预测值相符。



图 3-6:MdSIRT1、MdSIRT4 重组蛋白凝胶示意图

Figure 3-6:SDS-PAGE analysis of the recombinant protein pET-30a-MdSIRT1 and

pET-DsbA --MdSIRT4

A: pET-DsbA -MdSIRT4; B: pET-30a-MdSIRT1; 1: 未诱导 Non-induced protein; 2: 诱导 Induced protein; 3: 诱导的上清 Soluble fraction of sonication lysate after IPTG i nduction; 4: 诱导的包涵体 Precipitate fraction of sonication lysate after IPTG inducti on; 5: 纯化后的重组蛋白 Purified recombinant protein; 6: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker

3.3 MdSIRT4 蛋白的亚细胞定位结果

为了探究 MdSIRT4 在细胞当中的定位,本工作构建了人源细胞转染重组质 粒 pEGFP N1-MdSIRT4 并在 Hela 细胞中进行了亚细胞定位实验。实验结果表明 MdSIRT4 定位在线粒体上。



图 3-7: MdSIRT4 的亚细胞定位

Figure 3-7: Identification of MdSIRT4 subcellular location

A: Merged; B: DAPI; C: pEGFP-N1-MdSIRT4; D: HG3C-AK4

3.4 MdSirt1、MdSirt4不同发育阶段定量和组织定量结果的分析

本工作运用 qPCR 方法我们对 MdSirt1、MdSirt4 在家蝇不同发育阶段及不同 组织中的表达量进行了检测。检测结果表明: MdSirt1 在蛹期表达量最高,而在 幼虫阶段和成虫阶段的表达量偏低; MdSirt4 在卵中表达量最高,其次为成虫时 期,而在幼虫时期表达量较低,但是 MdSirt4 在幼虫时期表达量变化不大。MdS irt1 在脂肪体重表达量最高,在其余几种组织当中 MdSirt1 的表达量均较低; Md Sirt4 在脂肪体中表达量最高,而在表皮中表达量最低, MdSirt4 的表达量具有显





图 3-8: 家蝇不同发育阶段及不同组织 MdSirt1、MdSirt4 的表达量

Figure 3-8: Relative expression level of *MdSirt1,MdSirt4* in different development stages and

tissues in Musca domestica

A: MdSirt1 在家蝇不同发育阶段的表达分析; B: MdSirt1 家蝇不同组织中的表达分析; C: MdSirt4 在家蝇不同发育阶段的表达分析; D: MdSirt4 家蝇不同组织中的表达分析; 卵: eggs; 1 龄幼虫: 1st instar larvae; 2 龄幼虫: 2nd instar larvae; 3 龄幼虫: 3rd ins tar larvae; 蛹: pupae; 成虫: adults; 全虫: whole body; 血淋巴: hemocyte; 表皮: c uticula; 肠道: gut; 脂肪体: fat body。本实验中中数据由 6 次平行实验结果综合得出; 字母 a-d 代表差异显著性(Duncan's 多组样本间差异显著性分析, P<0.05)。Data in this e xperiment come from 6 replicates;Letters a-d indicate significant difference(Duncan's s ignificant difference between multiple sets of sample,P<0.05).

3.5 MdSirt1、MdSirt4 在细菌感染后表达模式的分析

实验结果表明:(1)与对照组相比,随着注射细菌浓度的提高,24 h后 Md

Sirt1 的表达量逐步上调;而随着注射细菌浓度的提高,与对照组和注射生理盐水组相比,24 h 后 MdSirt4 的表达量逐步下调。(2)在细菌刺激之后,3 h、6 h、12 h MdSirt1 的表达量均显著上升,随后表达量缓慢回落至初始水平;而 M dSirt4 在细菌刺激之后 3 h、6 h、12 h 的表达量均略有上升,随后表达量迅速下调至基本水平的 30%左右,随着时间的推移 MdSirt4 表达量并未显示出明显的向上恢复的趋势。(3)对 MdSIRT4 进行的 Western 检测也得到了与 qPCR 类似的结果。



图 3-9: MdSirt1、MdSirt4 在不同细菌浓度刺激下及细菌刺激后不同时间点表达量变化

的定量 Figure 3-9: Relative expression level of *MdSirt1*,*MdSirt4* post bacterial challenge A: 不同浓度细菌刺激后 *MdSirt1* 的表达量 Relative expression level of *MdSirt1* post bac terial challenge by different concentration; B: 细菌刺激后不同时间点 *MdSirt1* 的表达量 Relative expression level of *MdSirt1* post bacterial challenge; C: 不同浓度细菌刺激后 *MdSirt4* 的表达量 Relative expression level of *MdSirt4* post bacterial challenge by diffe rent concentration; D: 细菌刺激后不同时间点 *MdSirt4* 的表达量 Relative expression level of *MdSirt4* 的表达量 Relative expression level of *MdSirt4* post bacterial challenge by diffe rent concentration; D: 细菌刺激后不同时间点 *MdSirt4* 的表达量 Relative expression level of *MdSirt4* post bacterial challenge; E: 不同浓度大肠杆菌菌液刺激后 MdSIRT4 蛋 白表达量变化 Relative expression level of MdSIRT4 after *Escherichia coli* challenge b y different concentration; F: 不同浓度金黄色葡萄球菌菌菌液刺激后 MdSIRT4 蛋白表 达量变化 Relative expression level of MdSIRT4 after *Staphyloccocus aureus* challenge b y different concentration; G: *MdSirt4* 在细菌刺激后不同时间点 *MdSirt4* 表达量的变化 Relative expression level of *MdSirt4* after *Staphyloccocus aureus* challenge b y different concentration; G: *MdSirt4* 在细菌刺激后不同时间点 *MdSirt4* 表达量的变化 Relative expression level of *MdSirt4* after *Staphyloccocus aureus* challenge b y different concentration; G: *MdSirt4* 在细菌刺激后不同时间点 *MdSirt4* 表达量的变化 Relative expression level of *MdSirt4* 在细菌刺激后不同时间点 *MdSirt4* 表达量的变化 resulting expansion level of *MdSirt4* 在细菌刺激后不同时间点 *MdSirt4* 表达量的变化 potentian concentration; G: *MdSirt4* 在细菌刺激后不同时间点 *MdSirt4* 表达量的变化 potentian concentration; Difference acrossblank group(CK) potentian this e represent come from 3 replicates, ;Difference acrossblank group(CK) potentian the potentian concentration; Difference acrossblank group(CK) potentian concentian concentration; Difference acrossblank group(CK) p

3.6 MdSirt1、MdSirt4 在氯化镉影响和热激后不同时间点表达量变化的分析

实验结果表明: (1) 在重金属镉影响过程中, *MdSirt1* 的表达量随着时间的 推移逐步升高; *MdSirt4* 的表达在前期上调,后期略有回落。(2) 在热激过程 中, *MdSirt1* 的表达量逐步上调,在热激 30 min 时 *MdSirt1* 的表达量达到最高。 在热激之后的恢复过程中, *MdSirt1* 的表达量逐步回调至正常水平; 而随着热激 时间的延长, *MdSirt4* 的表达量逐步下调,在之后的恢复过程中, *MdSirt4* 的表达 量逐渐上调。(3) 对 MdSIRT4 进行的 Western 检测也得到了与 qPCR 类似的结 果。



图 3-10: *MdSirt1、MdSirt4* 在氯化镉影响和热激处理后不同时间点表达量的变化 Figure 3-10: Relative expression level of *MdSirt1,MdSirt4* post CdCl₂ challenge and heat shock

A: *MdSirt1* 在氯化镉后不同时间点表达量的变化 Relative expression level of *MdSirt1* post CdCl₂ challenge; B: *MdSirt1* 在 42℃ 热激后不同时间点表达量变化 Relative expression level of *MdSirt1* post heat shock; C: *MdSirt4* 在氯化镉影响后 mRNA 表达量的变化 Relative expression level of *MdSirt4* post CdCl₂ challenge.; D: MdSIRT4 在氯化镉影响后蛋白表达 量的变化 Relative expression level of MdSIRT4 post CdCl₂ challenge; E:*MdSirt4* 在 42℃热激后 *MdSirt4* 表达量的变化 Relative expression level of *MdSirt4* 表达量的变化 Relative expression level of *MdSirt4* 表达量的变化 Relative expression level of *MdSirt4* post CdCl₂ challenge; E:*MdSirt4* 在 42℃热激后 *MdSirt4* 表达量的变化 Relative expression level of *MdSirt4* post heat shock; F: MdSIRT4 在 42℃热激后蛋白表达量的变化 Relative expression level of MdSIRT4 post heat shock; F: MdSIRT4 在 42℃热激后蛋白表达量的变化 Relative expression level of MdSIRT4 post heat shock; F: MdSIRT4 在 42℃热激后蛋白表达量的变化 Relative expression level of MdSIRT4 post heat shock; F: MdSIRT4 在 42℃热激后蛋白表达量的变化 Relative expression level of MdSIRT4 post heat shock; F: MdSIRT4 在 42℃热激后蛋白表达量的变化 Relative expression level of MdSIRT4 post heat shock; F: MdSIRT4 在 42℃热激后蛋白表达量的变化 Relative expression level of MdSIRT4 post heat shock; F: MdSIRT4 在 42℃热激后蛋白表达量的变化 Relative expression level of MdSIRT4 post heat shock 热激: 0h; H15 min: 热激 15 min; H30 min: 热激 30 min; R1 h: 恢复 1 h; R4 h: 恢复 4 h.本实验中的结果由 6 次平行实验得出,实验组与对照组的差异用*代表,*代表 P<0.05,**代表 P<0.01。Data in this experiment is the result from 6 replicates, ;Difference across blank group(CK) is indicated with*(P< 0.05)or** (P<0.01).

3.7 MdSirt1 和 MdSirt4 干扰敲低后的功能分析

3.7.1 MdSirt1 在干扰之后细菌刺激条件下幼虫的存活率的分析

实验结果表明:本工作成功诱导出 dsSirt1 RNA,在对家蝇幼虫 MdSirt1进行干扰之后,MdSirt1干扰组的成活率较对照组显著降低。



图 3-11: MdSirt1 的干扰实验 Figure 3-11: RNAi of MdSirt1

A: dsRNA 诱导后凝胶电泳检测 Electrophoresis analysis of dsRNA.1: dsGFP 诱导后 R NA 的提取 Induced HT115-L4440-GFP dsRNA; 2: dsGFP 未诱导时 RNA 的提取 Nonnduced HT115-L4440-GFP dsRNA; 3: dsSirt1 诱导后 RNA 的提取 Induced HT115-L44 40-SIRT dsRNA; 4: dsSirt1 未诱导时 RNA 的提取 non-induced HT115-L4440-SIRT ds RNA; B: *MdSirt1* 在干扰之后细菌刺激幼虫的存活率 Survival rate of *Musca domestica* challenged by bacteira after RNAi.实验中结果由 3 次平行实验结果得出。Data are given as mean±SE from 3 replicates.

3.7.2 MdSirt4 干扰后家蝇核转录因子 MdNF-кB 及四种抗菌肽表达量变化的分析 实验结果显示:

在将 *MdSirt4* 表达量降低之后, *MdNF-κB* 的表达量较对照组提高, 而家蝇体内四种抗菌肽的表达量较对照组也有所上升。



图 3-12: MdSirt4 干扰后转录调控因子及抗菌肽表达量的变化

Figure 3-12: RNAi of *MdSirt4* and analysis of anti-bacterial factors in *Musca domestica* A:dsRNA 的体外转录合成 Synthesis of dsRNA using transcription kit;1、体外转录得到的 dsGFP Synthesis of dsGFP using transcription kit;2、体外转录得到的 dsSirt4 Synthesis of dsGFP synthesis of dsGFP using transcription kit;2、体外转录得到的 dsSirt4 Synthesis of dsGFP dsSirt4 = transcription kit;2、体外转录得到的 dsSirt4 expression level of *MdSirt4* after RNAi; Blank: 空白对照组、dsGFP: 注射 dsGFP 对照组、dsSirt4: 注射 dsSirt4 实验组; D: 干扰 *MdSirt4* 后 *MdNF-κB* 表达量的变化 Relative expression of *MdNF-κB* after konck down of *MdSirt4* Blank: 空白对照组、 dsGFP: 注射 dsGFP 对照 组、dsSirt4: 注射 dsSirt4 实验组; E: 干扰 *MdSirt4* 后四种家蝇抗菌肽表达量的变化 Relative expression level of 4 AMPs after konck down of *MdSirt4* attacin: 攻击素、*diptericin*: 双翅 肽、*cecropin*: 天蚕素、*muscin*: 本实验室发现的一中抗菌肽。本实验中的结果由 3 次平行 实验得出, 实验组与对照组的差异用*代表,*代表 P<0.05,**代表 P<0.01。Data in this

experiment is the result from 6 replicates; Difference across blank group(CK) is indicated with (P < 0.05) or ** (P<0.01).

第4章 讨论

本工作通过系统发育树的建立与比对,将 XP_005182634 与 XP_005180474. 1 这两条序列命名为 *MdSirt1* 和 *MdSirt4*。SIR2 结构域包含 NAD⁺结合位点和底 物结合位点(Cao et al., 2015)。通过保守结构域预测,我们发现 MdSIRT1 氨基 酸序列包含一段 206 AA 的 SIR2 保守结构域,而 MdSIRT4 也包含一个 207AA 的 SIR2 保守结构域。这一结果与 Davenport 等对人 SIRT1 晶体结构进行的分析 结果相一致(Davenport et al., 2014)。

Liu 和 Yang 等人的工作认为 SIRT1 的表达能够抑制机体抗炎症反应的过度 进行,防止机体自身损伤(Liu-Bryan and Terkeltaub, 2015; Yang et al., 2015), 而另外的工作也有报道 SIRT1 的低表达能够降低其对关键炎症因子的去乙酰化 作用从而促进细胞的炎症反应的发生(Liu et al., 2015)。Pusalkar 等人的工作则 表明在受到外界刺激时人 SIRT4 的表达持续降低(Pusalkar et al., 2016)。本工作 对家蝇不同发育时期 *MdSirt1* 和 *MdSirt4* 的表达情况结果显示,*MdSirt1* 在蛹期的 表达最高;而 *MdSirt4* 在卵期和成虫时期表达量最高,在蛹期表达量最低。这可 能是因为家蝇在蛹期最易遭受细菌等病原体的侵染,而 *MdSirt1* 和 *MdSirt4* 可能 参与了家蝇在蛹期抵抗抗病原体的调控过程。脂肪体是家蝇最重要的参免疫等抗 逆反应的组织, *MdSirt1* 和 *MdSirt4* 在家蝇幼虫脂肪体中表达量最高也与其可能 存在的免疫应答功能相吻合。

在家蝇幼虫细菌感染实验中,我们首先证明了 MdSirt1 和 MdSirt4 的调控模 式是依赖感染的细菌浓度的。随着感染细菌浓度的提高,MdSirt1 和 MdSirt4 的 表达量分别呈梯度升高和降低,MdSirt4 表达量降低这一结果这与 Chen 和 Tao 等人的工作结果一致 (Chen et al., 2014c; Tao et al., 2015),说明 MdSirt1 和 M dSirt4 的确主动参与到了家蝇的免疫调控过程当中。而随后检测的家蝇感染后不 同时间点 MdSirt1 和 MdSirt4 表达变化的实验结果中,MdSirt1 在感染初期表达量 即上调达到了最高,随后缓慢回落,似乎暗示其对于家蝇抗细菌侵染及炎症起到 了促进作用,这一推测与 Liu 等人的结果存在分歧,原因可能是因为我们对 SIR T1 所调控靶标并未完全了解,可能在不同物种或者不同条件下,既存在 SIRT1 促进细胞免疫炎症作用发生的调控,也存在 SIRT1 抑制炎症过度进行的保护机

制。因此本工作进一步对 MdSirt1 进行了干扰实验,由 MdSirt1 敲低组家蝇幼虫 较对照组家蝇幼虫在受到细菌感染后一段时间内死亡率明显较高这一现象,我们 认为 MdSirt1 对于家蝇抗细菌感染及炎症的发生起到促进作用,但是具体促进作 用的方式本工作并未能够阐明。而 MdSirt4 在细菌刺激后表达量下调的现象十分 明显,这与 Ramatchandirin 等在人睾丸细胞受刺激发生炎症时 SIRT4 表达量下 调的情况吻合 (Ramatchandirin et al., 2016)。而本工作进一步采用干扰手段敲低 家蝇幼虫体内 MdSirt4 基因的表达,由 MdSirt4 敲低组 MdNF-κB 及四种家蝇抗菌 肽表达量较对照组高这一结果我们有理由认为: MdSIRT4 参与到了家蝇在受到 细菌感染后的免疫应答过程中,其表达量的下调可能直接或者间接促进了家蝇体 内抗菌效应分子的表达。另外本工作确认了 MdSIRT4 蛋白定位在线粒体当中, 而 Coqswell 等人的工作结果认为线粒体中存在 NF-κB 蛋白(Cogswell et al., 200 3)。这些都支持 MdSIRT4 能够抑制 MdNF-κB 这一观点。

Pi 等人蹭报道过人 HepG2 细胞在 Cd 刺激后 SIRT3 表达量降低,并提出了 一条 SIRT3-SOD2-mROS 调控通路,随着 SIRT3 表达量的降低,SOD2 乙酰化程 度提高导致 SOD2 清除自由基活性的提高(Pi et al., 2015)。本工作中,检测到家 蝇幼虫受到重金属 Cd 刺激后,*MdSirt1* 和 *MdSirt4* 表达量均显著上调,MdSIRT 4 蛋白表达量也有相同的表达模式。这一表达模式与报道中的 SIRT3 的表达模式 相反,其具体机理还需进一步研究,推测 *MdSirt1* 和 *MdSirt4* 的上调可能促进了 机体内抗氧化防御机制的启动,提升家蝇幼虫在重金属条件下的生存能力。

关于 Sirtuins 家族蛋白与热激或氧化应激的报道均提出 Sirtuins 家族蛋白在 热激抗氧化过程中发挥一定作用(Marfe et al., 2010; Tomita et al., 2015; Karvi nen et al., 2016)。本工作结果显示 *MdSirt1* 基因在热激条件下上调,而 *MdSirt4* 基因和 MdSIRT4 蛋白在热激条件下均下调,变化模式与已报道的 SIRT1 和 SIR T4 蛋白在热激条件下变化模式一致。其中,*MdSirt1* 的高表达可能能够促进热激 蛋白的表达,从而缓解热激导致的蛋白错误折叠等伤害(Tomita et al., 2015)。而 MdSIRT4 表达的下调可能促进了线粒体中超氧化物歧化酶与底物的结合,从而 减少因热激增加的 ROS(Luo et al., 2016)。

第5章 结果与展望

5.1 结果

- 1、MdSIRT1 和 MdSIRT4 各具有一段保守的 SIR2 保守结构域,两者氨基酸序列 与其它物种中的同源蛋白之间均具有较高的同源性。
- 2、MdSirt1 和 MdSirt4 在家蝇的卵、1 龄幼虫、2 龄幼虫、3 龄幼虫、蛹、成虫这 几个发育时期和血淋巴、表皮、肠道、脂肪体等主要组织器官当中均有表达。 其中两个基因在脂肪体中均表达量最高表明其均可能在家蝇免疫中发挥调控 作用。
- 3、MdSirt1和 MdSirt4参与到了应对重金属刺激后表达量上调,在热激处理时 M dSirt1表达上调而 MdSirt4表达量下调,说明 MdSirt1和 MdSirt4均可能参与 到了家蝇幼虫应对重金属刺激和热激的调控当中。
- 4、在 MdSirtl 表达量降低时家蝇在受到细菌刺激时的死亡率提高。
- 5、存在一条关于 MdSIRT4 的调控通路,当 MdSIRT4 表达量下调时,使 MdNFκB 表达的上调, MdNF-κB 的上调进一步促进了下游抗菌肽表达的上调,从 而使家蝇更好地抵御外界病原微生物。
- 6、MdSIRT4 定位在线粒体上。

5.2 展望

本工作对家蝇体内 Sirtuins 同源蛋白 MdSIRT1 和 MdSIRT4 进行了基础性的研究。

在对 *MdSirt1* 的研究中主要采用 qPCR 的方法对 *MdSirt1* 在各种刺激条件下的表达量变化情况进行了检测。遗憾的是,由于抗体制备的问题,未能够实现对 MdSIRT1 蛋白在刺激条件下表达量变化的研究。同时,我们现在只能够确认 *Md Sirt1* 参与到了家蝇的免疫应答、对重金属刺激的应答和对热激的应答过程中, 但是缺乏对于其靶标蛋白和其调控通路的认识。

在对 MdSirt4 的研究当中,我们确认了其在不同外界不良刺激条件下的表达 变化模式,也初步发现了一条 MdSIRT4 调控家蝇免疫反应的通路。但是, MdSI RT4 和 MdNF-κB 之间究竟存在怎样的作用关系,我们并不清楚。

基于以上对 MdSIRT1 和 MdSIRT4 的研究认识,本实验室已经继续开展了

关于 MdSIRT1 和 MdSIRT4 互作蛋白的筛选工作,希望通过这项工作初步筛选 出可能与 MdSIRT1 和 MdSIRT4 蛋白相互作用的关键调控蛋白,能够更深入地 揭示 MdSIRT1 和 MdSIRT4 是如何在家蝇的免疫反应和氧化应激过程中起到调 控作用。

参考文献

- Adler, A.S., Kawahara, T.L., Segal, E., and Chang, H.Y. (2008). Reversal of a ging by NFkappaB blockade. Cell cycle (Georgetown, Tex) 7, 556-559.
- Adler, A.S., Sinha, S., Kawahara, T.L., Zhang, J.Y., Segal, E., and Chang, H.Y. (2007). Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF -kappaB activity. Genes & development 21, 3244-3257.
- Barber, M.F., Michishita-Kioi, E., Xi, Y., Tasselli, L., Kioi, M., Moqtaderi, Z., Tennen, R.I., Paredes, S., Young, N.L., Chen, K., Struhl, K., Garcia, B.A., Gozani, O., Li, W., and Chua, K.F. (2012). SIRT7 links H3K18 deacetyla tion to maintenance of oncogenic transformation. Nature 487, 114-118.
- Bauer, I., Grozio, A., Lasiglie, D., Basile, G., Sturla, L., Magnone, M., Sociali, G., Soncini, D., Caffa, I., Poggi, A., Zoppoli, G., Cea, M., Feldmann, G., Mostoslavsky, R., Ballestrero, A., Patrone, F., Bruzzone, S., and Nenci oni, A. (2012). The NAD+-dependent histone deacetylase SIRT6 promotes cytokine production and migration in pancreatic cancer cells by regulating Ca2+ responses. The Journal of biological chemistry 287, 40924-40937.
- Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P.J., Poosala, S., Becker, K.G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbe in, K.W., Spencer, R.G., Lakatta, E.G., Le Couteur, D., Shaw, R.J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D.K., de Cabo, R., and Sinclair, D.A. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. N ature 444, 337-342.
- Bobrowska, A., Donmez, G., Weiss, A., Guarente, L., and Bates, G. (2012). SI RT2 ablation has no effect on tubulin acetylation in brain, cholesterol bios ynthesis or the progression of Huntington's disease phenotypes in vivo. Plo S one 7, e34805.

- Boman, H.G., Nilsson, I., and Rasmuson, B. (1972). Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. Nature 237, 232-235.
- Bordone, L., Cohen, D., Robinson, A., Motta, M.C., van Veen, E., Czopik, A., Steele, A.D., Crowe, H., Marmor, S., Luo, J., Gu, W., and Guarente, L. (2007). SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restricti on. Aging cell 6, 759-767.
- Bordone, L., Motta, M.C., Picard, F., Robinson, A., Jhala, U.S., Apfeld, J., Mc Donagh, T., Lemieux, M., McBurney, M., Szilvasi, A., Easlon, E.J., Lin, S.J., and Guarente, L. (2006). Sirt1 regulates insulin secretion by repressin g UCP2 in pancreatic beta cells. PLoS biology 4, e31.
- Buchon, N., Poidevin, M., Kwon, H.M., Guillou, A., Sottas, V., Lee, B.L., and Lemaitre, B. (2009). A single modular serine protease integrates signals f rom pattern-recognition receptors upstream of the *Drosophila* Toll pathway.
 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, 12442-12447.
- Buchon, N., Silverman, N., and Cherry, S. (2014). Immunity in Drosophila mel anogaster--from microbial recognition to whole-organism physiology. Nature reviews Immunology 14, 796-810.
- Chalkiadaki, A., and Guarente, L. (2012). Sirtuins mediate mammalian metaboli c responses to nutrient availability. Nature reviews Endocrinology 8, 287-2 96.
- Chalkiadaki, A., and Guarente, L. (2015). The multifaceted functions of sirtuins in cancer. Nature reviews Cancer 15, 608-624.
- Chambers, S.M., Shaw, C.A., Gatza, C., Fisk, C.J., Donehower, L.A., and Goo dell, M.A. (2007). Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. PLoS biology 5, e201.
- Chang, C.I., Chelliah, Y., Borek, D., Mengin-Lecreulx, D., and Deisenhofer, J. (2006). Structure of tracheal cytotoxin in complex with a heterodimeric pat tern-recognition receptor. Science (New York, NY) 311, 1761-1764.

- Chang, H.C., and Guarente, L. (2014). SIRT1 and other sirtuins in metabolism. Trends in endocrinology and metabolism: TEM 25, 138-145.
- Chang, T.C., Wentzel, E.A., Kent, O.A., Ramachandran, K., Mullendore, M., L ee, K.H., Feldmann, G., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Lowenstein, C.J., Ark ing, D.E., Beer, M.A., Maitra, A., and Mendell, J.T. (2007). Transactivatio n of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes ap optosis. Molecular cell 26, 745-752.
- Chen, I.C., Chiang, W.F., Huang, H.H., Chen, P.F., Shen, Y.Y., and Chiang, H.
 C. (2014a). Role of SIRT1 in regulation of epithelial-to-mesenchymal trans ition in oral squamous cell carcinoma metastasis. Molecular cancer 13, 25
 4.
- Chen, J., Chan, A.W., To, K.F., Chen, W., Zhang, Z., Ren, J., Song, C., Cheu ng, Y.S., Lai, P.B., Cheng, S.H., Ng, M.H., Huang, A., and Ko, B.C. (201
 3). SIRT2 overexpression in hepatocellular carcinoma mediates epithelial to mesenchymal transition by protein kinase B/glycogen synthase kinase-3bet a/beta-catenin signaling. Hepatology (Baltimore, Md) 57, 2287-2298.
- Chen, W.Y., Wang, D.H., Yen, R.C., Luo, J., Gu, W., and Baylin, S.B. (2005). Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-depend ent DNA-damage responses. Cell *123*, 437-448.
- Chen, X., Sun, K., Jiao, S., Cai, N., Zhao, X., Zou, H., Xie, Y., Wang, Z., Zh ong, M., and Wei, L. (2014b). High levels of SIRT1 expression enhance t umorigenesis and associate with a poor prognosis of colorectal carcinoma patients. Scientific reports 4, 7481.
- Chen, Y., Wang, H., Luo, G., and Dai, X. (2014c). SIRT4 inhibits cigarette sm oke extracts-induced mononuclear cell adhesion to human pulmonary micro vascular endothelial cells via regulating NF-kappaB activity. Toxicology lett ers 226, 320-327.

Chen, Y., Zhang, J., Lin, Y., Lei, Q., Guan, K.L., Zhao, S., and Xiong, Y. (20

11). Tumour suppressor SIRT3 deacetylates and activates manganese supero xide dismutase to scavenge ROS. EMBO reports *12*, 534-541.

- Cheng, H.L., Mostoslavsky, R., Saito, S., Manis, J.P., Gu, Y., Patel, P., Bronso n, R., Appella, E., Alt, F.W., and Chua, K.F. (2003). Developmental defect s and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. Procee dings of the National Academy of Sciences of the United States of Ameri ca 100, 10794-10799.
- Chopra, V., Quinti, L., Kim, J., Vollor, L., Narayanan, K.L., Edgerly, C., Cipic chio, P.M., Lauver, M.A., Choi, S.H., Silverman, R.B., Ferrante, R.J., Hers ch, S., and Kazantsev, A.G. (2012). The sirtuin 2 inhibitor AK-7 is neuro protective in Huntington's disease mouse models. Cell reports 2, 1492-149 7.
- Crujeiras, A.B., Parra, D., Goyenechea, E., and Martinez, J.A. (2008). Sirtuin g ene expression in human mononuclear cells is modulated by caloric restrict ion. European journal of clinical investigation *38*, 672-678.
- Csibi, A., Fendt, S.M., Li, C., Poulogiannis, G., Choo, A.Y., Chapski, D.J., Jeo ng, S.M., Dempsey, J.M., Parkhitko, A., Morrison, T., Henske, E.P., Haigi s, M.C., Cantley, L.C., Stephanopoulos, G., Yu, J., and Blenis, J. (2013). The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferati on by repressing SIRT4. Cell *153*, 840-854.
- DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). T he biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proli feration. Cell metabolism 7, 11-20.
- DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., and Thompson, C.B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed ce Ils can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for p rotein and nucleotide synthesis. Proceedings of the National Academy of S ciences of the United States of America 104, 19345-19350.

Donmez, G., and Outeiro, T.F. (2013). SIRT1 and SIRT2: emerging targets in

neurodegeneration. EMBO molecular medicine 5, 344-352.

- Du, J., Zhou, Y., Su, X., Yu, J.J., Khan, S., Jiang, H., Kim, J., Woo, J., Kim, J.H., Choi, B.H., He, B., Chen, W., Zhang, S., Cerione, R.A., Auwerx, J., Hao, Q., and Lin, H. (2011). Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. Science (New York, NY) 334, 806-809.
- El-Khamisy, S.F., Masutani, M., Suzuki, H., and Caldecott, K.W. (2003). A req uirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. Nucleic acids research *31*, 5526-5533.
- El Chamy, L., Leclerc, V., Caldelari, I., and Reichhart, J.M. (2008). Sensing of 'danger signals' and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways 'upstream' of Toll. Nature immunology 9, 1165-1170.
- Feige, J.N., Lagouge, M., Canto, C., Strehle, A., Houten, S.M., Milne, J.C., La mbert, P.D., Mataki, C., Elliott, P.J., and Auwerx, J. (2008). Specific SIRT 1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced me tabolic disorders by enhancing fat oxidation. Cell metabolism *8*, 347-358.
- Finley, L.W., Carracedo, A., Lee, J., Souza, A., Egia, A., Zhang, J., Teruya-Fel dstein, J., Moreira, P.I., Cardoso, S.M., Clish, C.B., Pandolfi, P.P., and Hai gis, M.C. (2011). SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1alpha destabilization. Cancer cell 19, 416-428.
- Firestein, R., Blander, G., Michan, S., Oberdoerffer, P., Ogino, S., Campbell, J., Bhimavarapu, A., Luikenhuis, S., de Cabo, R., Fuchs, C., Hahn, W.C., G uarente, L.P., and Sinclair, D.A. (2008). The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. PloS one 3, e2020.
- Frank, C.L., Ge, X., Xie, Z., Zhou, Y., and Tsai, L.H. (2010). Control of activ ating transcription factor 4 (ATF4) persistence by multisite phosphorylation impacts cell cycle progression and neurogenesis. The Journal of biological chemistry 285, 33324-33337.
- Frye, R.A. (2000). Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir

2-like proteins. Biochemical and biophysical research communications 273, 793-798.

- Gobert, V., Gottar, M., Matskevich, A.A., Rutschmann, S., Royet, J., Belvin, M., Hoffmann, J.A., and Ferrandon, D. (2003). Dual activation of the *Dro* sophila toll pathway by two pattern recognition receptors. Science (New Y ork, NY) 302, 2126-2130.
- Gottar, M., Gobert, V., Matskevich, A.A., Reichhart, J.M., Wang, C., Butt, T. M., Belvin, M., Hoffmann, J.A., and Ferrandon, D. (2006). Dual detection of fungal infections in Drosophila via recognition of glucans and sensing of virulence factors. Cell 127, 1425-1437.
- Guarente, L. (2011). Franklin H. Epstein Lecture: Sirtuins, aging, and medicine. The New England journal of medicine 364, 2235-2244.
- Guarente, L. (2013). Calorie restriction and sirtuins revisited. Genes & develop ment 27, 2072-2085.
- Haigis, M.C., Mostoslavsky, R., Haigis, K.M., Fahie, K., Christodoulou, D.C., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Karow, M., Blander, G., Wolberger, C., Prolla, T.A., Weindruch, R., Alt, F.W., and Guarente, L. (2006). SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects o f calorie restriction in pancreatic beta cells. Cell *126*, 941-954.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generat ion. Cell 144, 646-674.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. Genes & develo pment 18, 2195-2224.
- Herranz, D., Munoz-Martin, M., Canamero, M., Mulero, F., Martinez-Pastor, B., Fernandez-Capetillo, O., and Serrano, M. (2010). Sirt1 improves healthy a geing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. Nature com munications 1, 3.
- Hirschey, M.D., Shimazu, T., Goetzman, E., Jing, E., Schwer, B., Lombard, D. B., Grueter, C.A., Harris, C., Biddinger, S., Ilkayeva, O.R., Stevens, R.D.,

Li, Y., Saha, A.K., Ruderman, N.B., Bain, J.R., Newgard, C.B., Farese, R. V., Jr., Alt, F.W., Kahn, C.R., and Verdin, E. (2010). SIRT3 regulates mito chondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. Nature *4* 64, 121-125.

- Houtkooper, R.H., Pirinen, E., and Auwerx, J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. Nature reviews Molecular cell biology 13, 22 5-238.
- Hymowitz, S.G., Filvaroff, E.H., Yin, J.P., Lee, J., Cai, L., Risser, P., Maruoka, M., Mao, W., Foster, J., Kelley, R.F., Pan, G., Gurney, A.L., de Vos, A. M., and Starovasnik, M.A. (2001). IL-17s adopt a cystine knot fold: struct ure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. The EMBO journal 20, 5332-5341.
- Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M., and Guarente, L. (2000). Transcripti onal silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone dea cetylase. Nature 403, 795-800.
- Jang, K.Y., Noh, S.J., Lehwald, N., Tao, G.Z., Bellovin, D.I., Park, H.S., Moo n, W.S., Felsher, D.W., and Sylvester, K.G. (2012). SIRT1 and c-Myc pro mote liver tumor cell survival and predict poor survival of human hepatoc ellular carcinomas. PloS one 7, e45119.
- Jeong, S.M., Lee, A., Lee, J., and Haigis, M.C. (2014). SIRT4 protein suppress es tumor formation in genetic models of Myc-induced B cell lymphoma. The Journal of biological chemistry 289, 4135-4144.
- Jeong, S.M., Lee, J., Finley, L.W., Schmidt, P.J., Fleming, M.D., and Haigis, M.C. (2015). SIRT3 regulates cellular iron metabolism and cancer growth by repressing iron regulatory protein 1. Oncogene 34, 2115-2124.
- Jeong, S.M., Xiao, C., Finley, L.W., Lahusen, T., Souza, A.L., Pierce, K., Li, Y.H., Wang, X., Laurent, G., German, N.J., Xu, X., Li, C., Wang, R.H., L ee, J., Csibi, A., Cerione, R., Blenis, J., Clish, C.B., Kimmelman, A., Den

g, C.X., and Haigis, M.C. (2013). SIRT4 has tumor-suppressive activity an d regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism. Cancer cell *23*, 450-463.

- Kaneko, T., Yano, T., Aggarwal, K., Lim, J.H., Ueda, K., Oshima, Y., Peach, C., Erturk-Hasdemir, D., Goldman, W.E., Oh, B.H., Kurata, S., and Silver man, N. (2006). PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functi ons in the drosophila immune response to monomeric DAP-type peptidogly can. Nature immunology 7, 715-723.
- Kanfi, Y., Shalman, R., Peshti, V., Pilosof, S.N., Gozlan, Y.M., Pearson, K.J., Lerrer, B., Moazed, D., Marine, J.C., de Cabo, R., and Cohen, H.Y. (200 8). Regulation of SIRT6 protein levels by nutrient availability. FEBS letter s 582, 543-548.
- Karmakar, P., Piotrowski, J., Brosh, R.M., Jr., Sommers, J.A., Miller, S.P., Che ng, W.H., Snowden, C.M., Ramsden, D.A., and Bohr, V.A. (2002). Werner protein is a target of DNA-dependent protein kinase in vivo and in vitro, and its catalytic activities are regulated by phosphorylation. The Journal o f biological chemistry 277, 18291-18302.
- Kawahara, T.L., Michishita, E., Adler, A.S., Damian, M., Berber, E., Lin, M., McCord, R.A., Ongaigui, K.C., Boxer, L.D., Chang, H.Y., and Chua, K.F. (2009). SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-depen dent gene expression and organismal life span. Cell *136*, 62-74.
- Khongkow, M., Olmos, Y., Gong, C., Gomes, A.R., Monteiro, L.J., Yague, E., Cavaco, T.B., Khongkow, P., Man, E.P., Laohasinnarong, S., Koo, C.Y., Ha rada-Shoji, N., Tsang, J.W., Coombes, R.C., Schwer, B., Khoo, U.S., and Lam, E.W. (2013). SIRT6 modulates paclitaxel and epirubicin resistance an d survival in breast cancer. Carcinogenesis 34, 1476-1486.
- Kim, H.S., Patel, K., Muldoon-Jacobs, K., Bisht, K.S., Aykin-Burns, N., Pennin gton, J.D., van der Meer, R., Nguyen, P., Savage, J., Owens, K.M., Vassil opoulos, A., Ozden, O., Park, S.H., Singh, K.K., Abdulkadir, S.A., Spitz,

- D.R., Deng, C.X., and Gius, D. (2010). SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. Cancer cell *17*, 41-52.
- Kim, H.S., Vassilopoulos, A., Wang, R.H., Lahusen, T., Xiao, Z., Xu, X., Li, C., Veenstra, T.D., Li, B., Yu, H., Ji, J., Wang, X.W., Park, S.H., Cha, Y. I., Gius, D., and Deng, C.X. (2011). SIRT2 maintains genome integrity an d suppresses tumorigenesis through regulating APC/C activity. Cancer cell 20, 487-499.
- Kim, J.E., Chen, J., and Lou, Z. (2008). DBC1 is a negative regulator of SIR T1. Nature 451, 583-586.
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin,
 F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso,
 M., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2006). Resveratrol improves mitochond
 rial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 an
 d PGC-1alpha. Cell *127*, 1109-1122.
- Lain, S., Hollick, J.J., Campbell, J., Staples, O.D., Higgins, M., Aoubala, M., McCarthy, A., Appleyard, V., Murray, K.E., Baker, L., Thompson, A., Mat hers, J., Holland, S.J., Stark, M.J., Pass, G., Woods, J., Lane, D.P., and W estwood, N.J. (2008). Discovery, in vivo activity, and mechanism of action of a small-molecule p53 activator. Cancer cell 13, 454-463.
- Lee, N., Kim, D.K., Kim, E.S., Park, S.J., Kwon, J.H., Shin, J., Park, S.M., Moon, Y.H., Wang, H.J., Gho, Y.S., and Choi, K.Y. (2014). Comparative i nteractomes of SIRT6 and SIRT7: Implication of functional links to aging. Proteomics 14, 1610-1622.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (20 12). Pillars article: the dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cac tus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. Cell. 199 6. 86: 973-983. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) 188, 5210

-5220.

- Lemaitre, B., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1997). *Drosophila* host defe nse: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. Proceedings of the National Academy o f Sciences of the United States of America 94, 14614-14619.
- Li, L., Osdal, T., Ho, Y., Chun, S., McDonald, T., Agarwal, P., Lin, A., Chu, S., Qi, J., Li, L., Hsieh, Y.T., Dos Santos, C., Yuan, H., Ha, T.Q., Popa, M., Hovland, R., Bruserud, O., Gjertsen, B.T., Kuo, Y.H., Chen, W., Lain, S., McCormack, E., and Bhatia, R. (2014). SIRT1 activation by a c-MYC oncogenic network promotes the maintenance and drug resistance of hum an FLT3-ITD acute myeloid leukemia stem cells. Cell stem cell *15*, 431-4 46.
- Li, L., Wang, L., Li, L., Wang, Z., Ho, Y., McDonald, T., Holyoake, T.L., Ch en, W., and Bhatia, R. (2012). Activation of p53 by SIRT1 inhibition enh ances elimination of CML leukemia stem cells in combination with imatini b. Cancer cell 21, 266-281.
- Lim, J.H., Kim, M.S., Kim, H.E., Yano, T., Oshima, Y., Aggarwal, K., Goldma n, W.E., Silverman, N., Kurata, S., and Oh, B.H. (2006). Structural basis f or preferential recognition of diaminopimelic acid-type peptidoglycan by a subset of peptidoglycan recognition proteins. The Journal of biological che mistry 281, 8286-8295.
- Lin, Z.F., Xu, H.B., Wang, J.Y., Lin, Q., Ruan, Z., Liu, F.B., Jin, W., Huang, H.H., and Chen, X. (2013). SIRT5 desuccinylates and activates SOD1 to e liminate ROS. Biochemical and biophysical research communications 441, 191-195.
- Liu, B., Che, W., Xue, J., Zheng, C., Tang, K., Zhang, J., Wen, J., and Xu, Y. (2013). SIRT4 prevents hypoxia-induced apoptosis in H9c2 cardiomyobl ast cells. Cellular physiology and biochemistry : international journal of ex perimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology 32, 655-66

- 2.
- Lu, W., Zuo, Y., Feng, Y., and Zhang, M. (2014). SIRT5 facilitates cancer cell growth and drug resistance in non-small cell lung cancer. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine 35, 10699-10705.
- Luo, J., Nikolaev, A.Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., a nd Gu, W. (2001). Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell sur vival under stress. Cell 107, 137-148.
- Luthi-Carter, R., Taylor, D.M., Pallos, J., Lambert, E., Amore, A., Parker, A., Moffitt, H., Smith, D.L., Runne, H., Gokce, O., Kuhn, A., Xiang, Z., Max well, M.M., Reeves, S.A., Bates, G.P., Neri, C., Thompson, L.M., Marsh, J.L., and Kazantsev, A.G. (2010). SIRT2 inhibition achieves neuroprotectio n by decreasing sterol biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 7927-7932.
- Menssen, A., Hydbring, P., Kapelle, K., Vervoorts, J., Diebold, J., Luscher, B., Larsson, L.G., and Hermeking, H. (2012). The c-MYC oncoprotein, the NAMPT enzyme, the SIRT1-inhibitor DBC1, and the SIRT1 deacetylase fo rm a positive feedback loop. Proceedings of the National Academy of Sci ences of the United States of America 109, E187-196.
- Michishita, E., McCord, R.A., Berber, E., Kioi, M., Padilla-Nash, H., Damian, M., Cheung, P., Kusumoto, R., Kawahara, T.L., Barrett, J.C., Chang, H.Y., Bohr, V.A., Ried, T., Gozani, O., and Chua, K.F. (2008). SIRT6 is a hist one H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. Nature 45 2, 492-496.
- Michishita, E., McCord, R.A., Boxer, L.D., Barber, M.F., Hong, T., Gozani, O., and Chua, K.F. (2009). Cell cycle-dependent deacetylation of telomeric hi stone H3 lysine K56 by human SIRT6. Cell cycle (Georgetown, Tex) 8, 2 664-2666.

- Milne, J.C., Lambert, P.D., Schenk, S., Carney, D.P., Smith, J.J., Gagne, D.J., J in, L., Boss, O., Perni, R.B., Vu, C.B., Bemis, J.E., Xie, R., Disch, J.S., Ng, P.Y., Nunes, J.J., Lynch, A.V., Yang, H., Galonek, H., Israelian, K., C hoy, W., Iffland, A., Lavu, S., Medvedik, O., Sinclair, D.A., Olefsky, J.M., Jirousek, M.R., Elliott, P.J., and Westphal, C.H. (2007). Small molecule a ctivators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. Na ture 450, 712-716.
- Min, L., Ji, Y., Bakiri, L., Qiu, Z., Cen, J., Chen, X., Chen, L., Scheuch, H., Zheng, H., Qin, L., Zatloukal, K., Hui, L., and Wagner, E.F. (2012). Liver cancer initiation is controlled by AP-1 through SIRT6-dependent inhibition of survivin. Nature cell biology 14, 1203-1211.
- Ming, M., Obata, F., Kuranaga, E., and Miura, M. (2014). Persephone/Spatzle pathogen sensors mediate the activation of Toll receptor signaling in response to endogenous danger signals in apoptosis-deficient Drosophila. The Jo urnal of biological chemistry 289, 7558-7568.
- Nakagawa, T., Lomb, D.J., Haigis, M.C., and Guarente, L. (2009). SIRT5 Deac etylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. Ce 11 137, 560-570.
- Nakamoto, M., Moy, R.H., Xu, J., Bambina, S., Yasunaga, A., Shelly, S.S., Go ld, B., and Cherry, S. (2012). Virus recognition by Toll-7 activates antivira 1 autophagy in *Drosophila*. Immunity 36, 658-667.
- Nakamura, Y., Ogura, M., Ogura, K., Tanaka, D., and Inagaki, N. (2012). SIR T5 deacetylates and activates urate oxidase in liver mitochondria of mice. FEBS letters 586, 4076-4081.
- Nemoto, S., Fergusson, M.M., and Finkel, T. (2004). Nutrient availability regul ates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. Science (New York, N Y) 306, 2105-2108.
- Outeiro, T.F., Kontopoulos, E., Altmann, S.M., Kufareva, I., Strathearn, K.E., A more, A.M., Volk, C.B., Maxwell, M.M., Rochet, J.C., McLean, P.J., Youn

g, A.B., Abagyan, R., Feany, M.B., Hyman, B.T., and Kazantsev, A.G. (20
07). Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. Science (New York, NY) *317*, 516-519.

- Pfluger, P.T., Herranz, D., Velasco-Miguel, S., Serrano, M., and Tschop, M.H. (2008). Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. Proce edings of the National Academy of Sciences of the United States of Amer ica 105, 9793-9798.
- Qiu, X., Brown, K., Hirschey, M.D., Verdin, E., and Chen, D. (2010). Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. Ce ll metabolism 12, 662-667.
- Ramatchandirin, B., Sadasivam, M., Kannan, A., and Prahalathan, C. (2016). Si rtuin 4 Regulates Lipopolysaccharide Mediated Leydig Cell Dysfunction. Jo urnal of cellular biochemistry 117, 904-916.
- Ryu, D., Jo, Y.S., Lo Sasso, G., Stein, S., Zhang, H., Perino, A., Lee, J.U., Z eviani, M., Romand, R., Hottiger, M.O., Schoonjans, K., and Auwerx, J. (2014). A SIRT7-dependent acetylation switch of GABPbeta1 controls mito chondrial function. Cell metabolism 20, 856-869.
- Schirmer, H., Pereira, T.C., Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Bonan, C.D., Bogo, M.R., and Souto, A.A. (2012). Modulatory effect of resveratrol on SIRT1, SIRT3, SIRT4, PGC1alpha and NAMPT gene expression profiles in wildtype adult zebrafish liver. Molecular biology reports 39, 3281-3289.
- Sebastian, C., Zwaans, B.M., Silberman, D.M., Gymrek, M., Goren, A., Zhong, L., Ram, O., Truelove, J., Guimaraes, A.R., Toiber, D., Cosentino, C., Gr eenson, J.K., MacDonald, A.I., McGlynn, L., Maxwell, F., Edwards, J., Gi acosa, S., Guccione, E., Weissleder, R., Bernstein, B.E., Regev, A., Shiels, P.G., Lombard, D.B., and Mostoslavsky, R. (2012). The histone deacetylas e SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. Cell 151, 1185-1199.

- Serrano, L., Martinez-Redondo, P., Marazuela-Duque, A., Vazquez, B.N., Doole y, S.J., Voigt, P., Beck, D.B., Kane-Goldsmith, N., Tong, Q., Rabanal, R. M., Fondevila, D., Munoz, P., Kruger, M., Tischfield, J.A., and Vaquero, A. (2013). The tumor suppressor SirT2 regulates cell cycle progression an d genome stability by modulating the mitotic deposition of H4K20 methyl ation. Genes & development 27, 639-653.
- Shelly, S., Lukinova, N., Bambina, S., Berman, A., and Cherry, S. (2009). Aut ophagy is an essential component of *Drosophila* immunity against vesicula r stomatitis virus. Immunity 30, 588-598.
- Shin, J., He, M., Liu, Y., Paredes, S., Villanova, L., Brown, K., Qiu, X., Naba vi, N., Mohrin, M., Wojnoonski, K., Li, P., Cheng, H.L., Murphy, A.J., Va lenzuela, D.M., Luo, H., Kapahi, P., Krauss, R., Mostoslavsky, R., Yancop oulos, G.D., Alt, F.W., Chua, K.F., and Chen, D. (2013). SIRT7 represses Myc activity to suppress ER stress and prevent fatty liver disease. Cell re ports 5, 654-665.
- Strominger, J.L. (2009). Animal antimicrobial peptides: ancient players in innate immunity. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) 182, 6633-663
 4.
- Tan, M., Peng, C., Anderson, K.A., Chhoy, P., Xie, Z., Dai, L., Park, J., Chen, Y., Huang, H., Zhang, Y., Ro, J., Wagner, G.R., Green, M.F., Madsen, A.S., Schmiesing, J., Peterson, B.S., Xu, G., Ilkayeva, O.R., Muehlbauer, M.J., Braulke, T., Muhlhausen, C., Backos, D.S., Olsen, C.A., McGuire, P. J., Pletcher, S.D., Lombard, D.B., Hirschey, M.D., and Zhao, Y. (2014). L ysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5. Cell metabolism *19*, 605-617.
- Tao, R., Coleman, M.C., Pennington, J.D., Ozden, O., Park, S.H., Jiang, H., Ki m, H.S., Flynn, C.R., Hill, S., Hayes McDonald, W., Olivier, A.K., Spitz, D.R., and Gius, D. (2010). Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily c onserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. Molec

ular cell 40, 893-904.

- Tao, Y., Huang, C., Huang, Y., Hong, L., Wang, H., Zhou, Z., and Qiu, Y. (2 015). SIRT4 Suppresses Inflammatory Responses in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Cardiovascular toxicology 15, 217-223.
- Tsai, Y.C., Greco, T.M., and Cristea, I.M. (2014). Sirtuin 7 plays a role in rib osome biogenesis and protein synthesis. Molecular & cellular proteomics : MCP 13, 73-83.
- Vakhrusheva, O., Smolka, C., Gajawada, P., Kostin, S., Boettger, T., Kubin, T., Braun, T., and Bober, E. (2008). Sirt7 increases stress resistance of cardi omyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mic e. Circulation research 102, 703-710.
- Vaquero, A., Scher, M.B., Lee, D.H., Sutton, A., Cheng, H.L., Alt, F.W., Serra no, L., Sternglanz, R., and Reinberg, D. (2006). SirT2 is a histone deacet ylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. Genes & dev elopment 20, 1256-1261.
- Vaziri, H., Dessain, S.K., Ng Eaton, E., Imai, S.I., Frye, R.A., Pandita, T.K., Guarente, L., and Weinberg, R.A. (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an N AD-dependent p53 deacetylase. Cell 107, 149-159.
- Venken, K.J., and Bellen, H.J. (2014). Chemical mutagens, transposons, and tra nsgenes to interrogate gene function in *Drosophila melanogaster*. Methods (San Diego, Calif) 68, 15-28.
- Wales, M.M., Biel, M.A., el Deiry, W., Nelkin, B.D., Issa, J.P., Cavenee, W.K., Kuerbitz, S.J., and Baylin, S.B. (1995). p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. Nature medicine *1*, 570-577.
- Wang, C., Chen, L., Hou, X., Li, Z., Kabra, N., Ma, Y., Nemoto, S., Finkel, T., Gu, W., Cress, W.D., and Chen, J. (2006). Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. Nature cell biolog

y 8, 1025-1031.

- Wang, F., Nguyen, M., Qin, F.X., and Tong, Q. (2007). SIRT2 deacetylates FO XO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. Aging cell 6, 505-514.
- Wang, F., and Tong, Q. (2009). SIRT2 suppresses adipocyte differentiation by deacetylating FOXO1 and enhancing FOXO1's repressive interaction with P PARgamma. Molecular biology of the cell 20, 801-808.
- Wang, R.H., Sengupta, K., Li, C., Kim, H.S., Cao, L., Xiao, C., Kim, S., Xu, X., Zheng, Y., Chilton, B., Jia, R., Zheng, Z.M., Appella, E., Wang, X. W., Ried, T., and Deng, C.X. (2008). Impaired DNA damage response, ge nome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. Cancer cell 14, 312-323.
- Warburg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. Science (New York, NY) 124, 269-270.
- Ward, P.S., and Thompson, C.B. (2012). Metabolic reprogramming: a cancer ha llmark even warburg did not anticipate. Cancer cell *21*, 297-308.
- Welch, C., Chen, Y., and Stallings, R.L. (2007). MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. Oncogene 26, 5017-5022.
- Xiao, C., Kim, H.S., Lahusen, T., Wang, R.H., Xu, X., Gavrilova, O., Jou, W., Gius, D., and Deng, C.X. (2010). SIRT6 deficiency results in severe hyp oglycemia by enhancing both basal and insulin-stimulated glucose uptake i n mice. The Journal of biological chemistry 285, 36776-36784.
- Yano, T., Mita, S., Ohmori, H., Oshima, Y., Fujimoto, Y., Ueda, R., Takada, H., Goldman, W.E., Fukase, K., Silverman, N., Yoshimori, T., and Kurata, S. (2008). Autophagic control of listeria through intracellular innate immu ne recognition in *drosophila*. Nature immunology *9*, 908-916.
- Yoshizawa, T., Karim, M.F., Sato, Y., Senokuchi, T., Miyata, K., Fukuda, T., G o, C., Tasaki, M., Uchimura, K., Kadomatsu, T., Tian, Z., Smolka, C., Sa

wa, T., Takeya, M., Tomizawa, K., Ando, Y., Araki, E., Akaike, T., Brau n, T., Oike, Y., Bober, E., and Yamagata, K. (2014). SIRT7 controls hepat ic lipid metabolism by regulating the ubiquitin-proteasome pathway. Cell m etabolism *19*, 712-721.

- Yuan, J., Pu, M., Zhang, Z., and Lou, Z. (2009). Histone H3-K56 acetylation i s important for genomic stability in mammals. Cell cycle (Georgetown, Te x) 8, 1747-1753.
- Zhang, Y., Bharathi, S.S., Rardin, M.J., Uppala, R., Verdin, E., Gibson, B.W., and Goetzman, E.S. (2015). SIRT3 and SIRT5 regulate the enzyme activity and cardiolipin binding of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase. PloS one 10, e0122297.
- Zhong, L., D'Urso, A., Toiber, D., Sebastian, C., Henry, R.E., Vadysirisack, D. D., Guimaraes, A., Marinelli, B., Wikstrom, J.D., Nir, T., Clish, C.B., Vait heesvaran, B., Iliopoulos, O., Kurland, I., Dor, Y., Weissleder, R., Shirihai, O.S., Ellisen, L.W., Espinosa, J.M., and Mostoslavsky, R. (2010). The his tone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hiflalpha. Cell 14 0, 280-293.

致谢

时间如白驹过隙,转眼间我的研究生生活即将画上一个句号。这期间的酸甜 苦辣,历历在目。这一路之上,我得到的最大的收获并不是对实验方法的掌握, 也不是对于科学问题的思辨,而是对于在科研路上需要相互交流借鉴,需要拓宽 眼界的认识。我想,研究生的这三年,也是人生的一个缩影,尝试与收获,跌倒 再奋起,也许我的故事并不华丽,但我无愧于自己,也希望能不愧对曾经帮助过 我的人。

首先,我要感谢我的恩师柳峰松教授。身教胜于言传,每每想要松懈或退缩 的时候,我都会想一想老师身上忘我的工作热情,便少了一些借口,多了一些动 力。也许这三年的收获并不如预期的那样丰富多彩,但我想,只要将老师的这种 奋发的精神继承下去,我们们就能够在日后的工作和生活当中,收获属于自己的 硕果。

当然,我也不能够忘记唐婷老师对我的帮助,在唐老师身上,我切实体会到 了一个科研工作者的成就是来源于点点滴滴的积累,来源于对每个细节的把握和 严格要求,这对于像我这样处事毛躁的人来说,是一种示范,也是一种督促。我 还要感谢张玉明老师,张老师的细心和蔼,总能使我们能够在学习了知识之外体 会到对于实验和工作之外的关心,这其中的温暖必将铭记终生。

此外,我要特别感谢在我实验过程当中为我提出帮助的同学。我要感谢高一 夫师兄、张雨龙和吉聪聪同学在亚细胞定位实验当中给与我的帮助;我要感谢路 永鹏同学和师弟李文倩在显微注射实验中给与我的支持,我还要感谢我的女朋友 刘春美,感谢她在对我论文的修改提出了宝贵的意见。

最后,我还要衷心地感谢在我身边的每一个同学。人来源于集体,也必将回 归到集体中去,我们从相识到相知,彼此体会和借鉴,成为了彼此的后援,也正 是你们的包容,承载了我无处安放的青春。

道一声谢谢,道一声珍重!

研究生期间论文发表情况

Gao Y, Tang T, **Gu J**, Sun L, Gao X, Ma X, Wang X, Liu F, Wang J, 2015. Downregulation of the *Musca domestica* peptidoglycan recognition protein SC (PGRP-SC) leads to overexpression of antimicrobial peptides and tardy pupation. *Molecular immunology*, 67(2 Pt B): 465-474.