

AUF1 在胞质 DNA 抑制细胞葡萄糖代谢中的作用研究

谢琳娜^{1*} 卜静静² 郑敏²

(1 福建生物工程职业技术学院 福州 350003 2 福建医科大学 福州 350108)

摘要 目的:探讨 AUF1 在胞质 DNA 引起的细胞葡萄糖代谢应答中的作用及其机制。方法:(1)用核质分离技术分离细胞核与细胞质,并通过生物素-亲和素亲和层析技术分离细胞质中与胞质 DNA(ISC)结合的蛋白质,然后通过“银染-质谱”和“复合物-质谱”技术鉴定出差异常蛋白——AUF1。再利用体外结合实验验证 AUF1 与胞质 DNA 的相互作用。(2)在胞质 DNA 刺激后,通过 ATP 检测试剂盒和 CCK8 细胞氧化还原活力检测试剂,比较野生型细胞和基于 CRISPR/Cas9 技术的 *AUF1* 基因敲除细胞中葡萄糖代谢应答情况。(3)通过半定量 PCR 技术,在野生型、基因敲除 *AUF1*、基因敲除后回补 *AUF1* 或空载体的四类细胞中检测葡萄糖转运蛋白 GLUTs 以及葡萄糖代谢相关酶的 mRNA 表达情况,筛选出与细胞糖代谢相关的 AUF1 下游效应分子——GLUT3。进而用实时荧光定量 PCR 进行验证。(4)通过半定量和荧光定量 PCR 分析胞质 DNA 刺激下 *GLUT3* 的 mRNA 变化情况,分析胞质 DNA 的刺激是否影响 *GLUT3* 的 mRNA 表达。结果:(1)两次质谱分析均发现 AUF1 能与 ISC 结合。体外结合实验也证实,不论是原核表达的 GST-AUF1 还是真核细胞表达的 GFP-AUF1 均能与单链和双链的 ISC 相结合。(2)基因敲除 *AUF1* 后的 HEK293 细胞在用胞质 DNA 刺激后,胞内的 ATP 水平和对 CCK8 的还原能力都明显高于野生型细胞。提示 *AUF1* 基因敲除细胞内的葡萄糖代谢不受胞质 DNA 刺激所抑制,说明 AUF1 很可能参与了胞质 DNA 对细胞糖代谢的调节。(3)半定量 PCR 技术检测发现在 *AUF1* 敲除的细胞中 *GLUT3* 的 mRNA 明显减少,而其他的 GLUT 家族成员和代谢酶则没有显著差异。实时荧光定量 PCR 证实上述现象,提示 AUF1 很可能通过稳定 *GLUT3* 的 mRNA 参与葡萄糖代谢的调节。(4)无论是单链还是双链 ISC 刺激后的细胞中,*GLUT3* 的 mRNA 均减少,说明 *GLUT3* 可能是胞质 DNA 对糖代谢的调节过程中的一个下游效应分子。结论:AUF1 能与胞质 DNA 结合,很可能通过调节下游 *GLUT3* 的 mRNA 稳定性参与胞质 DNA 引起的糖代谢应答反应。

关键词 AUF1 胞质 DNA 葡萄糖代谢 GLUT3

中图分类号 R34

在正常细胞中,脱氧核糖核酸(DNA)主要分布于细胞核和线粒体中。但当病原微生物感染细胞^[1]或细胞发生损伤^[1]时,DNA 会进入到细胞质中。这两种情况下产生的 DNA 被分别称为病原相关分子(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)和损伤相关分子

(danger-associated molecular pattern, DAMP),而这些细胞质中的 DNA 对于细胞来说是一个危险信号,它们均可以被细胞先天性免疫系统识别,并引起细胞的自我保护机制,产生先天性免疫应答,防止细胞或机体受到进一步危害。例如,诱导一型干扰素——IFN- β 和促炎症因子 IL-6 的表达和分泌,进而诱导周围其他细胞表达干扰素激活基因(interferon stimulated genes, ISG)来抵御病毒和病菌^[2]。

收稿日期:2019-04-28 修回日期:2019-07-11

* 通讯作者,电子邮箱:bunnylinda@qq.com

研究细胞质 DNA 引起的免疫应答反应的一种简单的细胞实验模型便是将一段特异序列的 DNA 通过脂质体转染到成纤维细胞内, 4 ~ 10h 之后就能检测到干扰素 IFN- β 和白介素 IL-6 被诱导表达^[3]。这一 DNA 被称为诱导干扰素 IFN- β 表达的 DNA (IFN- β stimulating DNA, ISD)。利用该模型, 陈志坚教授引领的研究团队发现并鉴定出 cGAS (环-GMP-AMP 合成酶) 是胞质 DNA 受体^[4], 催化第二信使 cGAMP [环-GMP-AMP: Cyclic G(2'-5')pA(3'-5')p] 的产生^[5], 后者结合到干扰素基因的激活蛋白 STING 上^[6], 最终引起一型干扰素的诱导表达。

而我们先前的研究利用上述系统发现: 在人胚胎肾细胞 HEK293 中, 外源 DNA 的入侵会导致细胞糖代谢的减弱, 表现为细胞对葡萄糖的利用率和乳酸的产生量下降^[7]。而葡萄糖是大多数细胞主要的能源物质。葡萄糖通过 GLUTs (葡萄糖转运蛋白) 进入细胞后^[8], 产生 ATP 和 NAD(P)H 或 FADH₂ 等还原力。相应地, 外源 DNA 入侵宿主细胞后, 也会导致细胞内 ATP 水平和氧还活力下降^[7]。

有趣的是, 我们发现在 cGAS 和 STING 敲除的小鼠成纤维细胞 L929 中, 胞质 DNA 引起的细胞固有免疫应答被阻断, 但上述胞质 DNA 引起的细胞糖代谢应答和能量应激反应仍照常发挥作用^[7]。这表明胞质 DNA 的入侵不仅可以引发细胞的代谢应答和能量应激反应, 而且其并不依赖于细胞免疫应答。但胞质 DNA 诱导细胞代谢应答的受体和机制目前仍不明了, 而识别引起该反应的胞质 DNA 的蛋白质受体是阐明胞质 DNA 诱导细胞代谢应答反应机制的关键所在。

为了解析其中的分子机制, 我们通过生物素亲和素纯化系统, 分离细胞质中与 ISD 相结合的蛋白质, 并通过质谱方法进行鉴定, 发现 AUF1 是潜在的 ISD 结合蛋白。AUF1 又称为 hnRNP D, 是第一个被鉴定出能与富含 AU 序列元件 (AU-rich element, ARE) 的 mRNA 相结合的蛋白质 (AUBPs)^[9]。其氨基酸和 mRNA 序列在人和小鼠中都高度同源。AUF1 家族有四个成员 (p37、p40、p42 和 p45), 是不同剪切方式的产物^[10]。其中, p42 和 p45 主要位于细胞核内, 而 p37 和 p40 则穿梭于细胞核与细胞质之间^[11]。AUF1 通过与带有 ARE 的 mRNA 相结合, 调节其稳定性。也有研究表明 AUF1 能与端粒上的单链 DNA 结合^[12], 调节端粒酶的活性^[13], 在维持端粒长度中发挥着重要的作用^[14]。从结构域上看, AUF1 含有两个 RNA 识别模体 (RRM) 和一个 Q 结

构域。AUF1 作为 AUBP, 其重要的生理功能是调节 mRNA 的稳定性。本研究围绕 AUF1 在胞质 DNA 抑制细胞葡萄糖代谢中的作用及其机制展开研究。

1 材料与方法

1.1 病毒表达载体的构建与感染

将基因编码序列克隆到基于 HIV 慢病毒改造而成的 pBye 载体中。将病毒表达载体 (pBye)、包装质粒 (pMDL/pRRE、pVSVG 和 pRSV-Rev) 以 3: 1: 1: 1 的比例通过磷酸钙转染到 HEK293FT 细胞中。转染 8 ~ 12h 后换新鲜培养液。转染 48 ~ 72h 后, 收取细胞培养液, 用 0.45 μ m 的一次性滤器进行过滤去除培养液中残留的 293FT 细胞。过滤后的培养液即为病毒液。感染前 12h 消化待感染的靶细胞, 以 1×10^5 个细胞的密度铺入 12 孔板中。将病毒液与新鲜培养液混匀, 加入 polybrene (人源细胞: 4 μ g/ml)。感染 48 ~ 72h 后的细胞可以用来检测外源蛋白质的表达效率。

1.2 基于 CRISPR/Cas9 细胞水平的基因敲除^[15]

将靶基因的序列 (多为第 1 外显子前后) 输入到张峰教授 (Broad institute) 的 Cas9 设计程序 (<http://crispr.mit.edu>) 中设计 guide RNA (sgRNA)。优先考虑 ATG 附近的位点。将上述引物退火后, 连接到同时带有 Cas9 和 sgRNA 表达框的载体 pGL3-U6-XsgRNA-ccdB-EF1a-Cas9ZF-IRES-Puro 中。将上述质粒通过脂质体转入 HEK293 细胞中。48h 后用 Puromycin 筛选, 再过 48h 后, 以每 100 μ l 0.5 个细胞的密度分到 96 孔板中挑取单克隆。通过基因测序, 以及 Western blot 检测基因敲除情况。

1.3 胞质 DNA 刺激实验^[7]

ISD 的正向序列为 5'-TACAGATCTACTAGTGATCTATGACTGATCTGTACATGATCT ACA-3', poly (dA) 和 poly (dT) 为 45 个脱氧核糖腺苷 (dA) 或脱氧核糖胸苷 (dT) 的多聚物。相同摩尔数的 ISD 正向链和反向链在退火缓冲液 (Annealing buffer: 10mmol/L Tris、pH7.5, 50mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA) 中进行退火, 形成双链。通过脂质体 2000 或 Turbofect 将上述双链 DNA 或单链 DNA, 以每毫升培养液 20 μ g DNA 进行转染刺激。6h 后, 收集样本。

1.4 核质分离实验^[11]

细胞用预冷的 PBS 洗涤一次后, 用低渗缓冲液 (含 10mmol/L HEPES、pH8.0, 10mmol/L KCl, 3mmol/L MgCl₂, 0.5mmol/L DTT 和蛋白酶抑制剂) 重悬, 冰上放

置 10min, 加入 0.3% 的 Triton X-100。在冷冻离心机中, 以 500g 离心 5min。收集上清, 为细胞质组分。用低渗缓冲液洗涤沉淀两次, 再用 RIPA 缓冲液 (含 100mmol/L Tris、pH8.0, 1% Triton X-100, 100mmol/L NaCl, 0.5mmol/L EDTA 和蛋白酶抑制剂) 裂解。在冷冻离心机中, 以 13 200g 离心 30min。上清即为细胞核组分。

1.5 DNA 体外结合实验^[16]

用生物素 (Biotin) 共价偶联 ssDNA。将互补配对的 Bio-ssDNA 经 95℃ 退火 15min 后, 使之自然冷却至室温 (1~2h), 即为生物素标记的 dsDNA。将生物素标记的 dsDNA 或 ssDNA 与 GST-AUF1 或 GFP-AUF1 在试管中混匀, 加入 Streptavidin 偶联的磁珠置于 4℃ 孵育 1h。用细胞裂解液洗三遍。通过离心收集与 DNA 相结合的 GST-AUF1 或 GFP-AUF1。

1.6 ATP 水平检测^[7]

按照 Promega 公司的 Luminescent Cell Viability Assay Kit 的说明书, 将等体积的检测试剂加入到待测细胞的培养液中。用 Microplate Luminometer Orion-L2 (BERTHORD, Germany) 进行检测。

1.7 细胞氧还能力检测^[7]

将 10μl CCK-8 加入到 90μl 待测细胞的培养液中。将细胞在 37℃ 和 5% CO₂ 的培养箱中培养 1h。用 Thermo Scientific 的 Multiscan GO 在 450nm 下测量样品吸光度。

1.8 实时荧光定量 PCR^[17]

参照 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂说明书提取 RNA。用 Promega 公司的 Go Script 对 mRNA 进行逆转录。参照 Roche 公司的 FastStart Universal Sybr Green Master 的说明书, 在 Applied Biosystems 公司的 QuantStudio 6 Flex 仪器上进行实时荧光定量 PCR。

2 结果

2.1 AUF1 结合单链和双链 ISD

为了阐明胞质 DNA 诱导细胞代谢应答的分子机制, 我们首先要解决的问题是“介导细胞代谢应答的胞质 DNA 受体是什么?” 为了解决这一问题, 首先我们通过核质分离技术分离细胞质中的蛋白质 (图 1a)。然后以未加生物素标记的 DNA 和生物素标记的 poly (dA) 为对照样本, 以加入生物素标记的 ISD 为实验样本, 寻找三者之间的差异蛋白, 以“银染-质谱”分析鉴定 (图 1b), 并用“复合物-质谱”验证 (结果未附)。有趣的是,

在两次质谱分析中, 均鉴定出 AUF1。为了进一步验证 AUF1 与 ISD 的相互作用, 我们构建了 p45 AUF1 原核和真核表达载体, 分别获得 GST-AUF1 和 GFP-AUF1。利用基于生物素-亲和素的体外结合实验证实, 不论是原核表达的 GST-AUF1 还是真核细胞表达的 GFP-AUF1 均能与单链和双链的 ISD 结合 (图 1c)。这些结果证实 AUF1 是潜在的 DNA 结合蛋白, 具备了胞质 DNA 受体结合 DNA 这一基本属性。

2.2 AUF1 参与胞质 DNA 诱导的细胞能量代谢应答

我们假定“AUF1 是介导细胞代谢应答的胞质 DNA 受体”, 那么敲除 AUF1 应能够阻断胞质 DNA 引起的细胞代谢应答。我们首先在 HEK293 细胞中, 成功地利用 CRISPR/Cas9 技术对 *AUF1* 进行敲除 (图 2a)。接着我们分别通过 ATP 和 CCK8 活力检测, 比较野生型细胞和基因敲除细胞中胞质 DNA 诱导的细胞代谢应答情况。结果显示, 在 *AUF1* 基因敲除细胞中胞质 DNA 诱导的 ATP 和 CCK8 还原活力降低被显著抑制 (图 2b、c)。这表明 AUF1 很可能是我们所要寻找的胞质 DNA 受体或是参与受体复合物, 介导细胞代谢应答。

2.3 GLUT3 受到 AUF1 的调控

AUF1 是第一个被鉴定出来与富含 AU 序列 (ARE) 的 mRNA 结合的蛋白质, 在 mRNA 稳定性调控方面发挥重要的生物学功能。为了探讨 AUF1 调控细胞代谢的分子机制。我们提出一个假设, AUF1 很可能调控着细胞糖代谢关键酶的 mRNA 稳定性。我们在 *AUF1* 基因敲除细胞中通过慢病毒系统对 *AUF1* 进行回补, 获得 AUF1 野生型细胞、基因敲除细胞、基因敲除后回补载体的细胞和基因敲除后回补 *AUF1* 的细胞 (图 3a)。在这些细胞中, 对葡萄糖转运蛋白 GLUTs 和葡萄糖代谢相关酶的 mRNA 通过半定量 PCR 技术进行检测。意外的是, 我们发现在 *AUF1* 敲除的细胞中 *GLUT3* 的 mRNA 明显减少 (图 3b), 其他的 GLUT 家族成员和代谢酶则没有显著差异。值得特别指出的是, PCR 所设计的引物是针对所有基因编码序列的全长。因而 PCR 出来的条带是跨越内含子序列的。PCR 扩增出来的条带大小与 NCBI 上记录的大小均相一致, 增加了实验数据的可靠性。进而, 我们通过实时荧光定量 PCR 验证了该结果 (图 3c)。因而, 我们认为 AUF1 下游与细胞糖代谢相关的效应分子很可能是 GLUT3。此外这一结果提示 AUF1 很可能起到了稳定 *GLUT3* mRNA 的作用。

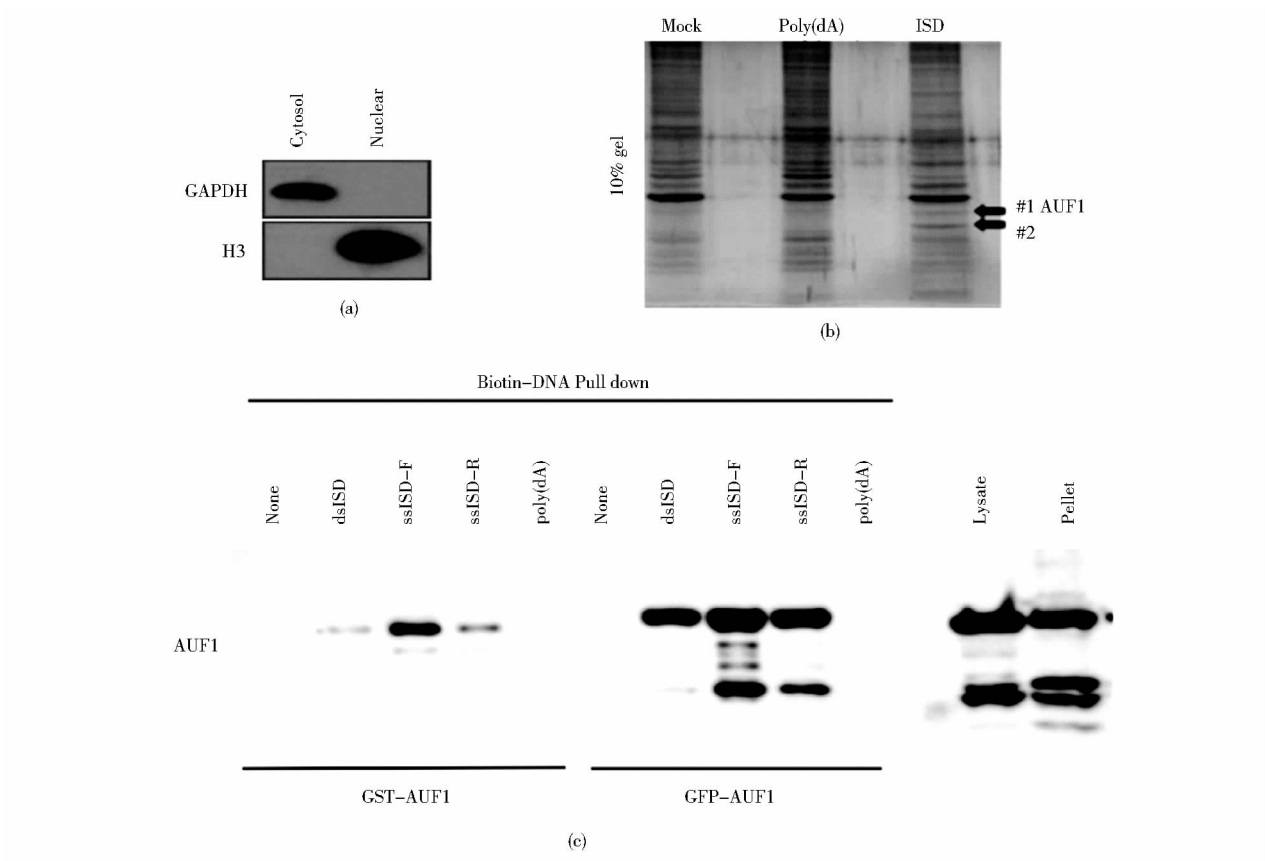


图 1 质谱技术和体外结合实验证实 AUF1 结合单链和双链 ISD

Fig.1 Mass spectrometry and *in vitro* pull-down assay identified AUF1 as a single/double stranded ISD binding protein

(a) Fractionation of nucleus and cytosol (b) Cytosolic DNA binding proteins were identified using biotin-avidin affinity chromatography and SDS-PAGE followed by silver staining and mass spectrum. AUF1 was found in #1 band (c) Pull-down assay verified that ISD interacts with AUF1 expressed in either prokaryotic or eukaryotic cells Ds:Double stranded; ss:Single stranded

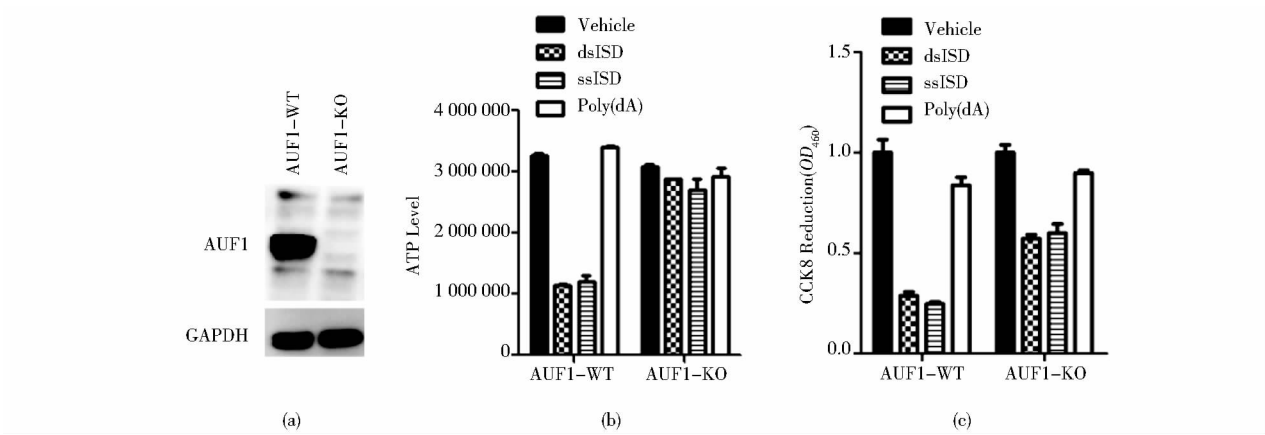
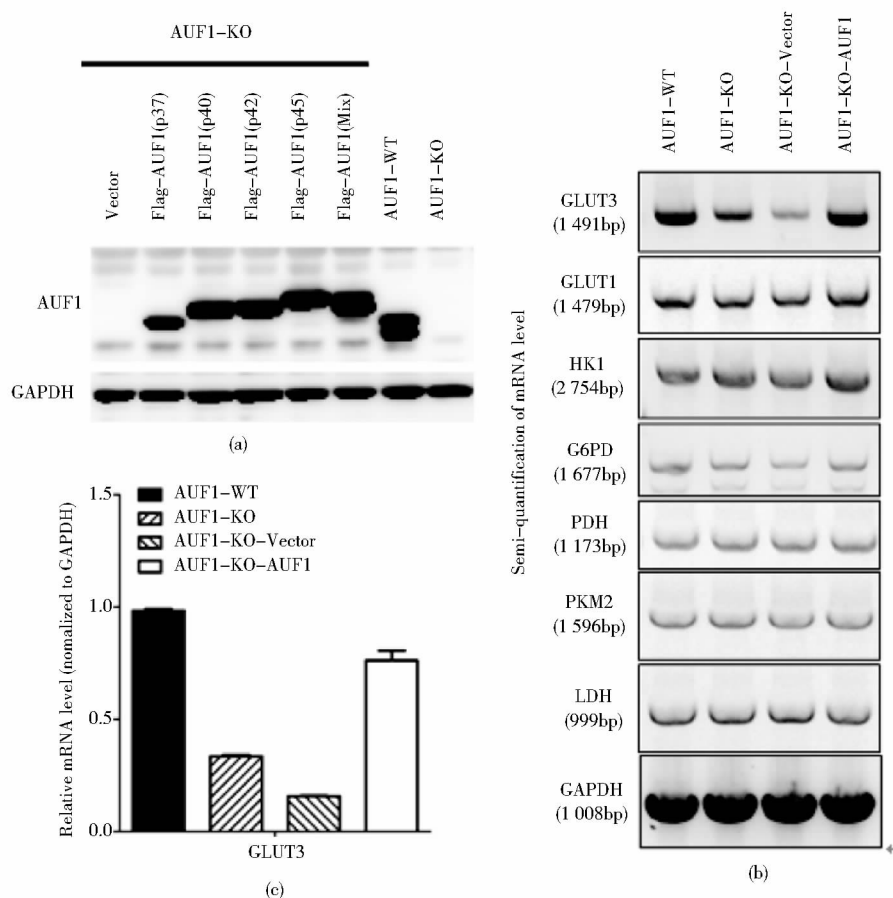


图 2 基于 CRISPR/Cas9 技术基因敲除 AUF1 并证实 AUF1 参与胞质 DNA 诱导的细胞能量应答

Fig.2 AUF1 is involved in cytosolic DNA induced cellular energy response

(a) *AUF1* knockout HEK293 cells were generated by CRISPR/Cas9 technology, and verified by Western blot (b) Intracellular ATP levels were examined in cells stimulated as indicated (c) CCK8 assays were performed in cells treated as indicated

图3 证实 *GLUT3* 受到 *AUF1* 的调控Fig.3 *GLUT3* is regulated by *AUF1*

(a) Reconstitution of *AUF1* in *AUF1* knockout HEK293 cells (b) After RNA extraction and reverse transcription, primers were designed using full-length gene sequences as templates, and the expression of each gene was analyzed by semi-quantitative PCR (c) Using SybrGreen as a probe, the expression of *GLUT3* was detected by real-time PCR

2.4 胞质 DNA 刺激下调 *GLUT3* mRNA 的表达

根据上述数据显示,胞质 DNA 结合 *AUF1*,*AUF1* 调节 *GLUT3* 的 mRNA 稳定性。那么胞质 DNA 刺激是否引起 *GLUT3* 的 mRNA 稳定性变化?带着这个问题,我们对胞质 DNA 刺激下 *GLUT3* 的 mRNA 的表达分别进行半定量检测(图 4a)和荧光定量 PCR 分析(图 4b)。结果显示,在转入单链和双链 ISD 的细胞中,*GLUT3* 的 mRNA 减少。这与 *AUF1* 基因敲除所引起的 *GLUT3* mRNA 下调一致。

3 讨论

传统观念认为病毒病菌感染细胞是通过其表面抗原(如 LPS)激活细胞免疫应答的。近年来,研究发现病毒病菌的基因组 DNA 进入细胞质中也能引起细胞的先天性免疫应答。这一现象成为近 5 年来的研究热

点。这一领域的研究帮助人们更好地认识病毒病菌感染人体产生免疫应答的分子机制,并为设计和研发 DNA 疫苗提供宝贵的信息和思路。

代谢重编程是病毒感染的一个标志性事件^[18]。一方面,病毒需要有利于生产病毒结构部件的代谢途径,便于病毒复制、成熟和传播^[19]。另一方面,如同抵御外敌入侵,宿主细胞感应并通过改变代谢途径抵抗病毒的感染^[20]。深入了解病毒与宿主细胞之间在细胞代谢方面的相互作用将有助于设计和研发针对细胞代谢的抗病毒治疗策略^[21]。由于病毒感染的复杂性,病毒与宿主细胞之间的相互作用可以进一步剖析为病毒核酸或蛋白质与宿主细胞之间的相互作用。DNA 病毒(如单纯疱疹病毒 HSV-1)感染细胞时,其基因组 DNA 会被释放到受体细胞的细胞质中^[22]。逆转录病毒或慢病毒(如 HIV)感染细胞时,病毒 RNA 在细胞质中逆转录

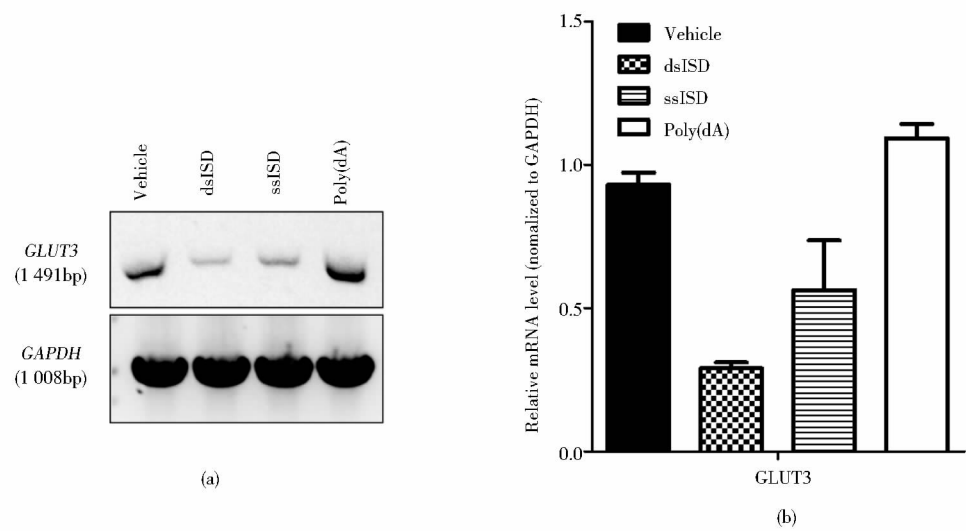


图 4 胞质 DNA 刺激下调 GLUT3 的 mRNA 表达

Fig. 4 Cytosolic DNA stimulation decreases GLUT3 mRNA expression

(a) HEK293 cells were stimulated as indicated, followed by RNA extraction and reverse transcription. Primers were designed using full-length GLUT3 gene sequence as a template, and the GLUT3 mRNA expression levels were analyzed by semi-quantitative PCR (b) Using SybrGreen as a probe, the expression of GLUT3 was examined using real-time PCR

成 cDNA,也会引入胞质 DNA^[23]。这些异常的细胞质 DNA 对于宿主细胞而言是种刺激。它们会被识别,并引起一系列的细胞应答。

在本研究中,我们以 ISD 作为“诱饵”,从胚胎成纤维细胞中“钓取”细胞质中 ISD 的结合蛋白。分别通过“复合物-质谱”(complex IP-MS)和“银染-质谱”(silver stain-MS)两种方法对差异蛋白进行鉴定。两次质谱分析都能检测出 AUF1。

体外 DNA 结合实验结果证实 AUF1 不仅能结合单链 DNA(ssDNA),也能结合双链 DNA(dsDNA)。进而,我们基于 CRISPR/Cas9 技术^[24]在 HEK293 细胞中对 AUF1 进行基因敲除。结果显示 AUF1 基因敲除的 HEK293 细胞中,胞质 DNA 无法引起胞内 ATP 的下降。这提示 AUF1 很可能作为新的胞质 DNA 受体,或是参与到该受体复合物中,介导胞质 DNA 的识别引起的细胞代谢应答。在对 AUF1 下游效应分子的筛选中,我们发现 GLUT3 的 mRNA 表达在 AUF1 基因敲除细胞中减少,在 AUF1 回补细胞中恢复。同时胞质 DNA 刺激也导致 GLUT3 mRNA 减少。这些结果提示 AUF1 很可能通过调控 GLUT3 等下游效应分子的 mRNA 表达来调节细胞代谢。

本研究首先通过生化的方法发现 AUF1 可结合胞质 DNA,并通过遗传学的方法(基因敲除和回补)发现

AUF1 可调控葡萄糖代谢相关基因 GLUT3,从而介导胞质 DNA 诱导的宿主细胞代谢应答,为设计与研发针对细胞代谢的抗病毒策略提供新思路。

致谢:感谢福建健康养老应用技术协同创新中心、福建省青年拔尖创新人才项目、健康平台运行及项目建设(2019CZ03-8)项目的资助。

参考文献

[1] Wiersinga W J, Leopold S J, Cranendonk D R, et al. Host innate immune responses to sepsis. Virulence, 2014, 5(1): 36-44.

[2] Gonzalez-Navajas J M, Lee J, David M, et al. Immunomodulatory functions of type I interferons. Nat Rev Immunol, 2012, 12(6): 125-135.

[3] Stetson D B, Medzhitov R. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. Immunity, 2006, 24(1): 93-103.

[4] Sun L, Wu J, Du F, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. Science, 2013, 339(6121): 786-791.

[5] Wu J, Sun L, Chen X, et al. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. Science, 2013, 339(6121): 826-830.

[6] Ablasser A, Goldeck M, Cavlar T, et al. cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. Nature, 2013, 498(7454): 380-384.

- [7] Zheng M, Xie L N, Liang Y J, et al. Recognition of cytosolic DNA attenuates glucose metabolism and induces AMPK mediated energy stress response. *International Journal of Biological Sciences*, 2015, 11(5): 587-594.
- [8] Deng D, Sun P, Yan C, et al. Molecular basis of ligand recognition and transport by glucose transporters. *Nature*, 2015, 526(7573): 391-396.
- [9] Zhang W, Wagner B J, Ehrenman K, et al. Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, 13(12): 7652-7665.
- [10] Moore A E, Chenette D M, Larkin L C, et al. Physiological networks and disease functions of RNA-binding protein AUF1. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, 2014, 5(4): 549-564.
- [11] Gao X, Dong H, Lin C, et al. Reduction of AUF1-mediated follistatin mRNA decay during glucose starvation protects cells from apoptosis. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(16): 10720-10730.
- [12] Enokizono Y, Konishi Y, Nagata K, et al. Structure of hnRNP D complexed with single-stranded telomere DNA and unfolding of the quadruplex by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(19): 18862-18870.
- [13] Pont A R, Sadri N, Hsiao S J, et al. mRNA decay factor AUF1 maintains normal aging, telomere maintenance, and suppression of senescence by activation of telomerase transcription. *Molecular Cell*, 2012, 47(1): 5-15.
- [14] Chen L Y, Lingner J. AUF1/HnRNP D RNA binding protein functions in telomere maintenance. *Molecular Cell*, 2012, 47(1): 1-2.
- [15] Ran F A, Hsu P D, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocol*, 2013, 8(11): 2281-2308.
- [16] Yannai H, Ban T, Wang Z, et al. HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature*, 2009, 462(7269): 99-103.
- [17] Wang W, Xiao Z D, Li X, et al. AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *Nature Cell Biology*, 2015, 17(4): 490-499.
- [18] Levy P, Bartosch B. Metabolic reprogramming: a hallmark of viral oncogenesis. *Oncogene*, 2016, 35(32): 4155-4164.
- [19] Thai M, Graham N A, Braas D, et al. Adenovirus E4ORF1-induced MYC activation promotes host cell anabolic glucose metabolism and virus replication. *Cell Metabolism*, 2014, 19(4): 694-701.
- [20] Singaravelu R, O'Hara S, Jones D M, et al. MicroRNAs regulate the immunometabolic response to viral infection in the liver. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(12): 988-993.
- [21] Ikeda M, Kato N. Modulation of host metabolism as a target of new antivirals. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 59(12): 1277-1289.
- [22] Abe T, Harashima A, Xia T, et al. STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense. *Molecular Cell*, 2013, 50(1): 5-15.
- [23] Yan N, Regalado-Magdos A D, Stiggelbout B, et al. The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nature Immunology*, 2010, 11(11): 1005-1013.
- [24] Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.

The Role of AUF1 in Cytosolic DNA Induced Cellular Glucose Metabolic Response

XIE Lin-na¹ BU Jing-jing² ZHENG Min²

(1 Fujian Vocational College of Bioengineering, Fuzhou 350003, China)

(2 Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China)

Abstract Objective: The molecular mechanism of cytosolic DNA induced cellular glucose metabolic response was aimed to unravel. Methods: (1) The nucleus and cytoplasm were separated by fractionation, and the protein bound to cytosolic DNA (ISD) was isolated using biotin-avidin affinity chromatography. The differentially expressed protein, AUF1 was identified by silver staining followed by mass spectrometry analysis or directly by complex-mass spectrometry analysis. The interaction between AUF1 and ISD was verified by pull-

down assay. (2) ATP assay and CCK8 analysis were performed to evaluate the cytosolic DNA induced cellular glucose metabolic response in wildtype and *AUF1* knockout cells, which was generated by CRISPR/Cas9 technology. (3) The mRNA expression of glucose transporters GLUTs and key enzymes in the process of glucose metabolism were detected by semi-quantitative PCR in four types of cells: wild type HEK293 cells, *AUF1* knockout HEK293 cells, and *AUF1* knockout cells reconstituted with AUF1 or empty vector as controls. GLUT3 was identified as one of the downstream effectors of AUF1. Real-time PCR was also performed to verify the results. (4) *GLUT3* mRNA under the stimulation of cytosolic DNA was analyzed by semi-quantitative and real-time PCR. Results: (1) Both mass-spectrometry analyses showed that AUF1 could bind to ISD. *In vitro* binding assays also confirmed that both GST-AUF1 expressed in prokaryotic cells and GFP-AUF1 expressed in eukaryotic cells could bind to single-stranded and double-stranded ISDs. (2) Upon cytosolic DNA stimulation, intracellular ATP levels and reductive capabilities of *AUF1*^{-/-} HEK293 cells were higher than wild-type cells. It suggested that the glucose metabolism in *AUF1* knockout cells is not inhibited by cytosolic DNA stimulation, and AUF1 may be involved in cytosolic DNA induced cellular glucose metabolic response. (3) Semi-quantitative PCR analysis showed that *GLUT3* mRNA expression was significantly reduced in *AUF1* knockout cells, while there were no significant differences among other GLUT family members and metabolic enzymes. Real-time PCR also confirmed the above phenomena, suggesting that AUF1 may regulate glucose metabolism by stabilizing *GLUT3* mRNA. (4) Both single-stranded and double-stranded ISD stimulation lead to a decrease in *GLUT3* mRNA expression, suggested that GLUT3 might be a downstream effector in the regulation of glucose metabolism upon cytosolic DNA stimulation. Conclusions: AUF1 can bind to cytosolic DNA, and participate in the cytosolic DNA induced Glucose metabolic response, potentially through regulating the stability of *GLUT3* mRNA.

Key words AUF1 Cytosolic DNA Glucose metabolic response GLUT3