

文章编号: 1674-8085(2019)04-0023-06

斑马鱼 PKR 的 dsRBM1 和 dsRBM3 重组 及体外功能分析

柳铭山, 周细根, 欧湘滢, 高宗泽, 李婷婷, 冯 敏, 何 康, *胡有生

(井冈山大学医学部基础医学与药学院, 江西, 吉安 343009;)

摘 要: 为了重组斑马鱼 (*Danio rerio*) 双链 RNA 依赖的蛋白激酶(DrPKR)的双链 RNA 结合模体 1 (*dsRBM1*) 和双链 RNA 结合模体 3 (*dsRBM3*) 基因, 并对重组基因表达的蛋白进行鉴定和功能分析, 设计定向删除引物, 应用 PCR 技术扩增 DrPKR 的 *dsRBM1* 和 *dsRBM3* 的基因片段, 通过重叠 PCR 技术将 *dsRBM1* 和 *dsRBM3* 基因重组在一起得到 *dsRBM13* 基因, 再将 *dsRBM13* 构建到原核表达质粒 pET32a 上并表达和纯化蛋白; 通过表达蛋白的二聚化实验和 pull down 实验对重组蛋白 dsRBM13 进行体外功能分析。结果: DrPKR 的 dsRBM1 和 dsRBM3 重组的蛋白 dsRBM13 可以进行二聚化和多聚化, 且能结合 Poly I:C (人工合成的 dsRNA)。因此, 重组 DrPKR 蛋白模体 dsRBM13 仍然具有二聚化和 dsRNA 结合活性, 提示串联了三个 dsRBM 的 DrPKR 激活过程中, 串联两个 dsRBM 对 DrPKR 激活是必需的, 并且在 DrPKR 结合 dsRNA 的激活过程中, 因 dsRNA 的长短和空间结构的多样性, 含有三个 dsRBM 的 DrPKR 可能存在更强和更多的结合方式, 因此具有更强的抗病毒免疫反应功能。

关键词: DrPKR; dsRBM13; 二聚化; Poly I:C pull-down; 重组

中图分类号: Q784

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2019.04.005

IN VITRO FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE RECOMBINANT DSRBM1 AND DSRBM3 FROM ZEBRA FISH (*DANIO RERIO*) PKR

LIU Ming-shan, ZHOU Xi-gen, OU Xiang-ying, GAO Zong-ze, LI Ting-ting, FENG Min,
HE Kang, *HU You-sheng

(School of Basic Medicine and Pharmacy, Medical College, Jinggangshan University, Ji'an, Jiangxi 343009, China)

Abstract: To recombine the gene of *dsRBM1* and *dsRBM3* of double-stranded RNA dependent PKR (DrPKR) in zebra fish (*Danio rerio*), identify and analyze the function of the expressed protein *in vitro*, directional deletion primers were designed to amplify the gene segment of *dsRBM1* and *dsRBM3* of DrPKR, which were recombined to obtain *dsRBM13* by overlapping PCR, then *dsRBM13* was transferred to pET32a to express and purify the recombined protein; the dimerization assay and Poly I:C pull-down assay were introduced to test the function of the protein *in vitro*. The results showed that *dsRBM13* could dimerize and multimerize, which also bind to poly I:C (synthetical dsRNA). Thus, the recombinant dsRBM13 could dimerize and bind to poly I:C, which implied

收稿日期: 2019-03-16; 修改日期: 2019-05-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560595); 江西省教育厅科技计划项目(GJJ170630); 井冈山大学第六批大学生创新创业训练计划项目(65)

作者简介: 柳铭山(1997-), 男, 江西萍乡人, 井冈山大学医学部临床医学专业 2015 级本科生(E-mail:1415115224@qq.com);

周细根(1972-), 男, 江西吉水人, 副教授, 主要从事药理学, 临床药理学和毒理学研究(E-mail:xgzhou1972@163.com);

欧湘滢(1998-), 女, 广东云浮人, 井冈山大学医学部预防医学专业 2017 级本科生(E-mail:2430229130@qq.com);

高宗泽(1997-), 男, 甘肃合水人, 井冈山大学医学部药学专业 2017 级本科生(E-mail:2224078748@qq.com);

李婷婷(1998-), 女, 甘肃岷县人, 井冈山大学医学部药学专业 2017 级本科生(E-mail:2633515108@qq.com);

冯 敏(1997-), 女, 甘肃定西人, 井冈山大学医学部药学专业 2016 级本科生(E-mail:1572816255@qq.com);

何 康(1998-), 男, 甘肃嘉峪关人, 井冈山大学医学部药学专业 2015 级本科生(E-mail: 512482332@qq.com);

*胡有生(1968-), 男, 江西吉水人, 副教授, 博士, 主要从事分子免疫学研究(E-mail: huyousheng68@163.com).

that it was essential for two dsRBM in tandem to activate DrPKR; Furthermore, because of the diversity of length and spatial structure of dsRNA, DrPKR with three dsRBM could bind to dsRNA more powerful and with more binding pattern, hence, it might have a stronger function for antiviral immunity.

Key words: DrPKR; dsRBM13; dimerization; Poly I:C pull-down; recombination

双链 RNA 依赖的蛋白激酶 R(double-stranded RNA-dependent protein kinase R, PKR)是干扰素诱导的、环腺苷酸非依赖性的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在脊椎动物各组织细胞中均有组成性表达^[1]。PKR 结构包括两部分: N 端的双链 RNA 结合结构域(double-stranded RNA Binding Domain, dsRBD)和 C 端的激酶结构域(Kinase Domain, KD)^[2]。前者也称为激酶活性调节结构域,是 PKR 结合 dsRNA 后引起 PKR 单体二聚化激活的结构^[3]。PKR 的 dsRBD 往往串联两个(哺乳动物)或三个(少数鱼类)的 dsRNA 结合模体(double-stranded RNA Binding Motifs, dsRBMs),在进化上相对保守^[3]。Nanduri 等的研究表明哺乳动物 PKR 结构呈哑铃状,两个 dsRBM 都为 α - β - β - α 结构,有助于与 dsRNA 结合^[3]。PKR 的 KD 为激酶催化功能区,被激活后能磷酸化真核翻译起始因子 2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α , eIF2 α),从而引起蛋白质翻译的抑制^[4]。

PKR 属于 eIF2 α 激酶家族,在正常机体中,PKR 表达很低,处于无活性状态^[3]。但当病毒感染时,PKR 表达显著上调,通过 N 端 dsRBD 与病毒 dsRNA 相结合而引起整个 PKR 分子的二聚化;二聚化后的激酶结构域发生自磷酸化而活化;活化的 PKR 磷酸化 eIF2 α ^[5-6]。eIF2 α 磷酸化一方面可以阻止病毒蛋白的翻译,抑制病毒增殖;另一方面,也可抑制宿主蛋白的合成,导致感染病毒细胞的凋亡;因此可有效控制病毒的繁殖和扩散^[4,7,11,13-14]。

病毒 dsRNA 激活 PKR 的机制尚在探索之中,有研究提出了 PKR 的自抑制学说,即自然条件下 PKR 自身 N 端 dsRBD 与 C 端 KD 相互作用,使得 PKR 呈无活性状态,当病毒 dsRNA 与 N 端 dsRBD 结合时, C 端 KD 得以暴露从而发挥催化活性^[8]。最近的核磁共振和原子力显微镜证实,溶液条件下的 PKR 结构较为伸展,dsRBD 并不与 KD 相互作用^[9],因此 PKR 的激活机制仍然需要进一步研究。

然而,有学者认为某些病毒的 dsRNA 能抑制

PKR 的激活,这可能与 dsRNA 的长短^[10]和特殊空间结构等^[12]密切相关。García 等研究发现 dsRNA 长度少于 30 bp 时不能激活 PKR^[15],当 dsRNA 的线性结构变为凸出的环状结构时也不能使 PKR 有效活化^[1,16],其具体作用机制仍需进一步研究。

除了参与抗病毒免疫外,有研究表明 PKR 的活化与过度营养引起的肥胖、神经退行性疾病如阿尔茨海默病^[13,17]、糖尿病^[18-19]、心脑血管疾病^[20-21]、肿瘤^[22-23]的发生发展密切相关,但具体机制仍不清楚。因此进一步研究 PKR 的结构与功能的联系,将会有助于研究这些相关疾病的发病机理^[4,24]。

近年来,对不同鱼类 PKR 的研究显示,绿色斑点河豚、斑马鱼和万安玻璃红鲤鱼等鱼类 PKR 的 N 端 dsRBMs 存在种类和数量的多态性,与 dsRNA 的作用强弱、结合保守序列的保守性及结合后的效应也存在差异,如有研究表明草鱼 PKR (CiPKR) N 端有 3 个 dsRBM,其中 dsRBM2 和 dsRBM3 与哺乳动物 PKR 的 dsRBM1 和 dsRBM2 类似,而 dsRBM1 是少数鱼类所特有的。通过构建含不同数量 dsRBM 的 PKR 突变体并原核表达二聚化和 Poly I:C 结合实验显示,仅含 dsRBM1 或 dsRBM2 的 PKR 既能同二聚化又能同多聚化,而仅含 dsRBM3 的 PKR 只能同二聚化不能多聚化,研究还证明 PKR 结合 Poly I:C 至少需要含有两个 dsRBM^[25]。

斑马鱼 PKR 基因首次克隆后,系统进化分析发现,其双链 RNA 结合结构域具有三个双链 RNA 结合模体,但一直缺乏对其进一步的鉴定和功能分析。本研究通过构建斑马鱼 DrPKR 的 dsRBM13 的重组体,并进一步原核表达其重组蛋白,体外分析其二聚化和 dsRNA 结合功能的差异,并分析 DrPKR 的 dsRBM1 和 dsRBM3 及 dsRBM13 的功能差异,以推测含有三个 dsRBM 的 DrPKR 激活的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

斑马鱼购于中国科学院水生生物研究所斑马鱼资源中心，在井冈山大学发育生物学实验室繁殖；大肠杆菌(*E.coli.*)DH5α 和 BL21、质粒 pET32a 为本实验室保存；T4 DNA 连接酶，限制性内切酶(*Xho* I，*Eco* I)、dNTP、DL2000 Marker，PCR 产物纯化试剂盒(PCR Product Purification Kit)，质粒小提试剂盒(EZ-10 吸附柱 Mini-Preps Kit)均购自 TaKaRa 公司；总 RNA 提取试剂盒(RNA simple Total RNA Kit)购自天根生化科技有限公司；180 Kda 小分子蛋白质 Marker 购自 Solarbio 公司；PEG20000: Biotopped 公司；poly I:C 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 *DrPKR* 基因结构分析与引物设计

根据斑马鱼 *PKR* 基因 (GenBank 序列号: AM421527.1) 序列和氨基酸序列，通过在线系统 SMART 预测 *DrPKR* 蛋白 N 端 3 个 dsRBM 的氨基酸序列及其位置，后根据 3 个 dsRBM 的核苷酸序列设计定向删除和重叠 PCR 引物。

1.2.2 PCR 扩增目的基因

利用 RNA 提取试剂盒及反转录试剂盒，提取斑马鱼肾脏细胞总 RNA，琼脂糖电泳检测后，反转录成 cDNA，以反转录得到的 cDNA 为模板，利用设计的引物 (表 1)，用 Primestar 高保真 DNA 聚合酶 PCR 扩增 *PKR* 各目的片段。反应条件为: 98 ℃ 10 min，98 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 2 min，共 30 个循环，72 ℃ 10 min。扩增产物进行琼脂糖电泳检测，利用 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒纯化产物后保存于 4℃ 备用。

表 1 研究用到的引物

Table 1 Primers applicated in this study

引物名称	引物序列 (5'→3')	引物作用
ZPOEF	GCGAATTCatggagtctctgcaggaaat	构建
ZPNXR	CGCTCGAGTtgggattgtgagaatgcgcc	<i>dsRBM123</i>
ZPOEF	GCGAATTCatggagtctctgcaggaaat	构建
ZPM1XR	CGCTCGAGgttttcaacgggtgaaggtgt	<i>dsRBM1</i>
ZPM3EF	GCGAATTCgcagatgattctcgaagcagc	构建
ZPNXR	CGCTCGAGTtgggattgtgagaatgcgcc	<i>dsRBM3</i>
ZPM13F	agaatcatctcgcttttcaacgggtgaaggtgt	构建
ZPM13R	cccgttgaaaacgcagatgattctcgaagcagc	<i>dsRBM13</i>

1.2.3 重组质粒载体构建

将纯化 PCR 产物与 pET32a 载体分别经 *Xho* I 和 *Eco* I 双酶切，酶切产物纯化后经 T4 DNA 连接

酶，4℃ 连接过夜。连接产物转化大肠杆菌 DH5α，氨苄青霉素抗性平板筛选阳性克隆。经测序确定构建成功的克隆，命名质粒 *PPM1*，*PPM3*，*PPM13*，*PPM123*。

1.2.4 重组蛋白小量诱导表达

提取构建成功克隆细菌的质粒，转化大肠杆菌 BL21。氨苄青霉素抗性平板筛选阳性克隆。先进行蛋白小量表达检测构建蛋白的 IPTG 诱导效应和分子量大小。取活化后的阳性克隆细菌 200 μL 加入 20 mL 培养基中，37 ℃，220 rpm 培养 4 h，取 1.0 mL 做诱导前对照，剩余菌液加入 IPTG (1:100) 诱导。与对照组一起 37 ℃、220 rpm 培养 4 h，离心去上清，加入 50 μL 蛋白上样缓冲液混匀，100 ℃ 金属浴 5 min，进行 SDS-PAG 蛋白电泳分析。

1.2.5 重组蛋白大量表达和纯化

取小量表达正常的细菌进行大量表达，活化后取 2.0 mL 加入 200 mL 培养基，诱导步骤同小量表达。诱导完成后 200 mL 分装 4 个 50 mL 离心管，12000 rpm 离心 30 min。弃上清后加入 5.0 mL Binding Buffer，混合吹匀取出，再加入 3.0 mL Binding Buffer 洗涤离心管，收集洗涤产物，用超声波破碎仪破碎 30 min。离心取上清，上清过镍柱纯化，然后置于透析袋中透析过夜。次日用 PEG 20000 浓缩蛋白至 1.0 mL，并进行 SDS-PAG 电泳检测。

1.2.6 原核表达蛋白的二聚化实验

原核表达 dsRBM 蛋白的二聚化实验。含 3 个 dsRBM 的蛋白 dsRBM123 和含 2 个 dsRBM 的重组蛋白 dsRBM13 的二聚化实验，反应体系参照文献[25]。

反应体系加完以后，短暂离心混匀，冰上放置 1.0 h，加入无 SDS 含溴酚蓝的 DNA 电泳 loading buffer 2.0 μL，进行非变性 SDS-PAG 电泳，电泳缓冲液为含 1% SDS 的 1×Tris-Gly 溶液。

1.2.7 原核表达蛋白的 PolyI:C pull-down 实验

利用人工合成的 dsRNA PolyI:C 与 3 种不同的 dsRBM 蛋白进行体外结合实验。在含有 1 个 dsRBM，2 个 dsRBM 的原核表达纯化蛋白中加入 PolyI:C，并通过非变性的 PAG 电泳来检测是否与 PolyI:C 结合而使蛋白电泳迁移距离减慢，同时对比分析结合 dsRNA 能力的差异。

2 结果

2.1 重组蛋白 dsRBM13 的生物信息学分析

在 NCBI 基因数据库中检索到斑马鱼 PKR 的 mRNA 的完整 cDNA 核苷酸序列及其编码的氨基酸序列(NCBI Reference Sequence: NP_001108586.1)。将其氨基酸序列输入 SMART 进行结构域的预测。预测结构显示 斑马鱼 PKR 的 N 端的 dsRBD 含有 3 个 dsRBM (图 1), dsRBM1 由第 8 位氨基酸残基到第 74 位氨基酸残基组成, 共含 67 个 AA; dsRBM2 由第 100 位到第 169 位氨基酸残基组成, 共含 70 个 aa; dsRBM3 由第 213 到第 279 位氨基酸残基组成, 共含 67 个 AA。



图 1 斑马鱼 PKR 蛋白结构示意图

Fig.1 Structure diagram of DrPKR

应用重叠 PCR 引物 ZPM13F 和 ZPM13R 构建重组基因 *dsRBM13* 并将构建结果进行测序, 应用 DNAMAN 软件翻译为氨基酸序列导入 SMART 进行结构域的预测, 同时和斑马鱼 PKR 蛋白氨基酸序列进行比对, 其预测结果(图 2)显示第一个 dsRBM1 由 67 个 AA 组成, 第二个 dsRBM3 由 67 个 AA 组成, 氨基酸序列比对(图 3)显示重组基因表达蛋白 dsRBM13 恰好比 DrPKR 少了 dsRBM2 的氨基酸序列, 以上结果说明重组基因 *dsRBM13* 构建成功。

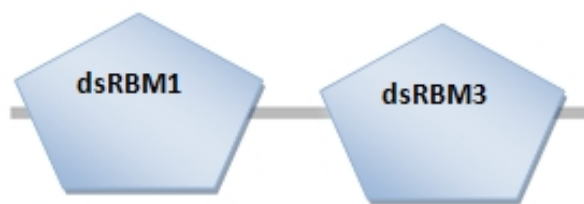


图 2 重组基因表达蛋白 dsRBM13 结构示意图

Fig.2 Structure diagram of recombinant gene expression protein dsRBM13

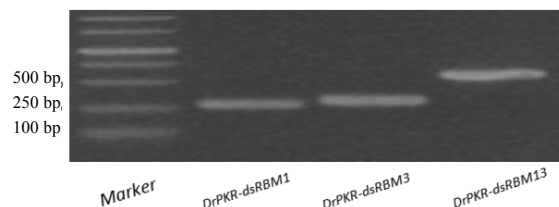
ZPKRdsRBM123	MESLSGNYTSLLENYQQKTQCTVEFEEGPTDGP SHNKRFTMRAIVNGQKFPDG	dsRBM1
ZPKRdsRBM13	MESLSGNYTSLLENYQQKTQCTVEFEEGPTDGP SHNKRFTMRAIVNGQKFPDG	
ZPKRdsRBM123	TGKTKEAKQNAAKNALEGLKSTHSDEPTSPVENISVSKIASHPNYTCWLNE	
ZPKRdsRBM13	TGKTKEAKQNAAKNALEGLKSTHSDEPTSPVEN-----	
ZPKRdsRBM123	HSQKSRLMFKACESTKMDPGNLRLCTYVCKYVCDDEKFPEGYGKNKKEAKEA	dsRBM2
ZPKRdsRBM13	-----	
ZPKRdsRBM123	AALQVYEELNRTPTNTEVLDENSHRAQRSETTSYSLDRSSAADDSSRSTPDNN	
ZPKRdsRBM13	-----ADDSRSSTPDNN	
ZPKRdsRBM123	YIAYLNNYCQKKRVYDFKLVDRI GPPHNPIFVYKVMDGKEYPEAQGRNAKE	dsRBM3
ZPKRdsRBM13	YIAYLNNYCQKKRVYDFKLVDRI GPPHNPIFVYKVMDGKEYPEAQGRNAKE	
ZPKRdsRBM123	AKQNAAQHAWSEIRDQSGWTTPSSEDGAFSQSQ	
ZPKRdsRBM13	AKQNAAQHAWSEIRDQSGWTTPSSEDGAFSQSQ	

图 3 重组基因表达蛋白 dsRBM13 与 DrPKR 的 N 端氨基酸序列比对

Fig.3 Sequence alignment of N-terminal amino acid between dsRBM13 and DrPKR

2.2 *DrPKR* 基因片段 *dsRBM1*, *dsRBM3* 的重叠 PCR

斑马鱼组织提取的 RNA, 反转录合成 cDNA 作为模板, 应用引物 ZPOEF 与 ZPM1XR、ZPM3EF 与 ZPNXR、ZPM13F 与 ZPM13R, 使用高保真 DNA 聚合酶 Primestart, 通过 PCR 对斑马鱼 PKR 基因片段 *dsRBM1*, *dsRBM3*, *dsRBM13* 进行扩增, *dsRBM13* 片段长度理论上应为 *dsRBM1* 片段与 *dsRBM3* 片段长度之和, 琼脂糖凝胶电泳结果(图 4)符合进一步说明重组基因 *dsRBM13* 构建成功。

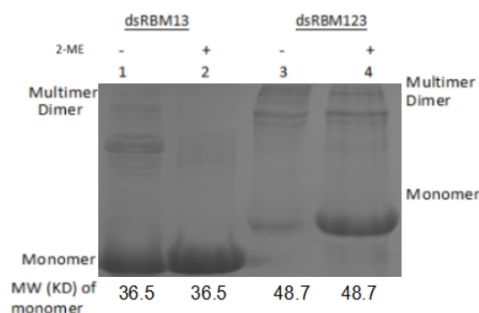


Marker 所示大小从上而下依次为 2000,1000,750,500,250,100 bp。道 1 所示为 *dsRBM1*, 大小为 204 bp; 道 2 所示为 *dsRBM3*, 大小为 213 bp, 道 3 所示为 *dsRBM123* 通过定向删除 *dsRBM2* 之后获得的 *dsRBM13*, 大小 513 bp

图 4 斑马鱼 PKR 基因扩增的 DNA 片段的琼脂糖电泳
Fig.4 Agarose electrophoresis of the amplified DNA fragments from DrPKR

2.3 重组蛋白 dsRBM13 的原核表达二聚化实验

实验结果表明 dsRBM13, dsRBM123 不仅能二聚化, 同时还存在多聚化。



道 1 为 dsRBM13 的对照组, 道 2 为 dsRBM13 的实验组, 道 3 为 dsRBM123 的对照组, 道 4 为 dsRBM123 的实验组, 图中的单体、二聚体以及多聚体标注在左右两边, 单体的分子质量标注在图下方, 其中 β -ME 代表 β -巯基乙醇

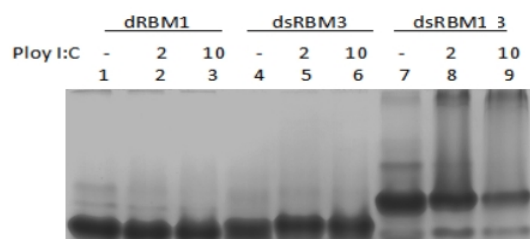
图 5 原核表达的 dsRBM13, dsRBM123 的同二聚化

Fig.5 Syndimerization of dsRBM13 and dsRBM123 expressed in prokaryotic cells

2.4 重组蛋白 dsRBM13 的 Poly I:C pull-down 实验

在该实验条件下, 斑马鱼 PKR 的 dsRBM1 和 dsRBM3 在不加 Poly I:C, 加 Poly I:C 以及加 10 倍量的 Poly I:C 时, 各 dsRBM 蛋白的非变性 PAGE 迁移距离尚无明显差异, 说明单独 1 个 dsRBM 结合 dsRNA 的作用并不明显(图 3.9)。

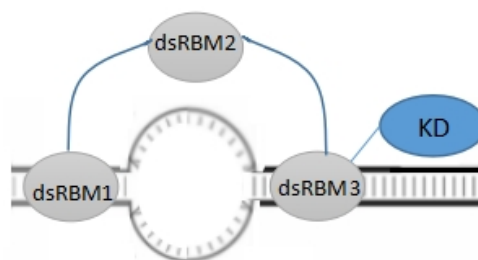
在同样条件下, 重组基因表达蛋白 dsRBM13 中加 PolyI:C 比不加 PolyI:C 具有明显电泳迁移的阻滞作用; 并且在加 10 倍的 Poly I:C 比加 1 倍的 Poly I:C 有更多的蛋白被阻滞。结果显示, 在本实验条件下, 2 个 dsRBM 具有明显的结合 dsRNA 的作用。或者说两个 dsRBM 比 1 个 dsRBM 明显具有更强与 dsRNA 结合作用(图 6)。



道 1 为 dsRBM1 的对照组, 道 2 为 dsRBM1 的 1 倍剂量组, 道 3 为 dsRBM1 的 10 倍剂量组, 道 4 为 dsRBM2 的对照组, 道 5 为 dsRBM2 的 1 倍剂量组, 道 6 为 dsRBM2 的 10 倍剂量组, 道 7 为 dsRBM13 的对照组, 道 8 为 dsRBM13 的 1 倍剂量组, 道 9 为 dsRBM13 的 10 倍剂量组

图 6 dsRBM1, dsRBM3 和 dsRBM 13 的 Poly I:C pull-down 实验

Fig.6 Poly I:C pull-down experiment of dsRBM1, dsRBM3 and dsRBM 13



DrPKR 的 N 端 dsRBM1 跨过 dsRBM2 协同 dsRBM3 以 dsRBM13 的形式结合 dsRNA 并激活

图 7 dsRBM13 结合 dsRNA

Fig.7 dsRBM13 binding dsRNA

3 讨论

细胞内或细胞外来源的 dsRNA 能通过与 PKR 的 N 端 dsRBD 结合并激活 PKR^[2], 因此, PKR 的活性受 N 端的 dsRBD 调控。所以, PKR-N 端的 dsRBD 对细胞抗病毒免疫反应有着重要作用^[26-27]。2 个 dsRBM 串联是 PKR 的 dsRBD 常见的结构, 但有研究发现, 少数鱼类 PKR 的 N 端 dsRBD 存在 3 个 dsRBM, 如斑马鱼, 草鱼, 绿色斑点河鲀, 鲫鱼等鱼类 PKR^[28-29]。三个 dsRBM 对其功能的影响, 目前仍知之甚少^[30]。

Hu 等 (2016) 鉴定了草鱼 PKR 含 3 个 dsRBM, 分析其功能发现, 只含有单个 dsRBM 不能明显的与 dsRNA 结合, 两个或两个以上的 dsRBM 才能有效地结合 dsRNA^[25]。斑马鱼 PKR 被鉴定有 3 个 dsRBM, 但对其功能的研究还需进一步深入。斑马鱼 PKR dsRBM 的功能是否具有更强的抗病毒免疫功能? 含有三个 dsRBM 的斑马鱼 PKR 是否存在由 dsRBM1 跨过 dsRBM2 与 dsRBM3 结合 dsRNA 而激活 PKR 的分子机制呢? 比如 dsRNA 线性分子上存在部分二级结构, 刚好占据 dsRBM2 的情况, 在这种情况下仅靠 dsRBM1 和 dsRBM3 是否能激活 PKR?

实验结果证实, DrPKR 的 dsRBM1 和 dsRBM3 的重组蛋白 dsRBM13 不仅能进行同二聚化, 还能进行同多聚化。同时 Poly I:C pull-down 实验结果显示, 只含一个 dsRBM (只含 dsRBM1 或 dsRBM3) 的斑马鱼 PKR 突变体结合 Poly I:C 的作用不明显, 而含两个 dsRBM 的重组蛋白 dsRBM13 可以有效地结合 Poly I:C, 这与 Hu 等的研究草鱼 PKR 的结果一致。而含有三个 dsRBM 的 DrPKR 的 N 端具有更

强的二聚化作用,这种更强的作用可能使斑马鱼 PKR 与病毒 dsRNA 结合后更强地激活 PKR,引起更强的抗病毒免疫反应。同时,重组的 dsRBM13 具有功能,可能提示在斑马鱼抗病毒免疫中,或许存在 PKR 的 N 端 dsRBM1 跨过 dsRBM2 协同 dsRBM3 以 dsRBM13 的形式结合 dsRNA 并激活的分子机制(图 8)。含有三个 dsRBM 的 PKR 具有更强的结合 dsRNA 能力,并且可能具有结合某些含有二级结构的 dsRNA 的能力,因此具有更强的激活效果和更多的激活形式,从而赋予含有三个 dsRBM 的 PKR 更强的抗病毒免疫反应功能^[31]。

参考文献:

- [1] Heinicke L A, Nallagatla S R, Hull C M, et al. RNA helical imperfections regulate activation of the protein kinase PKR: Effects of bulge position, size, and geometry[J]. RNA, 2011, 17(5):957.
- [2] Barber G N, Edelhoff S, Katze M G, et al. Chromosomal assignment of the interferon-inducible double-stranded RNA-Dependent protein kinase (PKR) to Human Chromosome 2p21-p22 and Mouse Chromosome 17 E2[J]. Genomics, 1993, 16(3):0-767.
- [3] 夏君,谢炯,张萍. 抗病毒蛋白 PKR 的结构和功能[J]. 中国免疫学杂志,2013,29(2):205-209.
- [4] Watanabe T, Imamura T, Hiasa Y. Roles of protein kinase R in cancer: Potential as a therapeutic target[J]. Cancer Science, 2018, 109(4):919-925.
- [5] Lee S B, Esteban M. The Interferon-induced Double-stranded RNA-activated protein kinase induces apoptosis[J]. Virology, 1994, 199(2):491-496.
- [6] Der S D, Yang Y L, Weissmann C, et al. A double-stranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997, 94(7):3279-3283.
- [7] Koromilas A E. Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible dsRNA-dependent protein kinase[J]. Science, 1992, 257(5077):1685-1689.
- [8] Williams, Bryan R G. PKR; a sentinel kinase for cellular stress[J]. Oncogene, 1999, 18(45):6112-6120.
- [9] Li S, Peters G A, Ding K, et al. Molecular basis for PKR activation by PACT or dsRNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(26):10005-10010.
- [10] Dauber B, Wolff T. Activation of the Antiviral Kinase PKR and Viral Countermeasures[J]. Viruses, 2009, 1(3):523-544.
- [11] 白卫君,王小中,曾建明,等. 靶向激活蛋白激酶 PKR 诱导白血病 K562 细胞凋亡[J]. 肿瘤, 2009, 29(1):35-41.
- [12] Chelsea M. Hull, Philip C. Bevilacqua. discriminating self and non-self by RNA: Roles for RNA structure, misfolding, and modification in regulating the innate immune sensor PKR[J]. Accounts of Chemical Research, 2016: A-H.
- [13] 关振宏,李影,张茂林,等. 双链 RNA 依赖的蛋白激酶 (PKR) 的真核表达、纯化及鉴定[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(28):13521-13523.
- [14] 贾因棠,魏来,蒋栋,等. 双链 RNA 激活的蛋白激酶 (PKR) 的克隆表达及其对丙型肝炎病毒蛋白合成的抑制作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22(1):24-30.
- [15] García MA, Gil J, Ventoso I, et al. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2006, 70(4): 1032-1060.
- [16] Zheng X, Bevilacqua P C. Activation of the protein kinase PKR by short doublestranded RNAs with singlestranded tails[J]. RNA, 2004, 10(12): 1934-1945.
- [17] François Mouton-Liger, Paquet C, Dumurgier J, et al. Increased cerebrospinal fluid levels of double-stranded RNA-dependant protein kinase in Alzheimer's disease[J]. Alzheimers & Dementia the Journal of the Alzheimers Association, 2012, 8(4):265-266.
- [18] 陈珊珊,王怡,顾丽泽,等. PKR 抑制胰岛 β 细胞生长的机制研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2012, 32(9):1187-1191.
- [19] 陈珊珊. 综述 PKR 与胰岛素抵抗[J]. 科技视界, 2013, 34(329):406-408.
- [20] 朱锐,吴校林,刘文卫. NLRP3 炎性小体与 TLR3 和 PKR 的关系及在动脉粥样硬化中的研究进展[J]. 医学综述, 2016, 22(4):685-687.
- [21] Eric C. Freundt, Melissa Drappier, et al. Innate Immune detection of cardioviruses and viral disruption of interferon signaling [J]. Frontiers in Aging Neuroscience, 2018, 9(2448):1-12. (参考文献[22]–[32]转第 45 页)

-
- [5] Chun C L, Jia R K, Jyun Y C. An Integer Programming Approach and Visual Analysis for Detecting Hierarchical Community Structures in Social Networks[J]. Information Sciences, 2015, 299(3): 25-33.
- [6] Yi C, Xiao L W, Xin X, et al. Overlapping Community Detection in Weighted Networks Via a Bayesian Approach[J]. Physical A: Statistical Mechanics and its Applications, 2017, 468(12): 790-801.
- [7] Claudio M R. Effects of Multi-state Links in Network Community Detection[J]. Reliability Engineering and System Safety, 2017, 163(12): 46-56.
- [8] Wei Z, Xiao K Z, Zhao K. Analysis of Associtivity and Community Structure in Mobile Social Networks[J]. Procedia Computer Science, 2017, 107(6): 630-635.
- [9] Yang J L, Huang T, Song W M. Discover the Network Mechanisms Underlying the Connections Between Aging and Age-Related Diseases[J]. Scientific reports, 2016, 23(6): 32-56.
- [10] Guo J, Feng C. Implementation of Envelope Analysis on a Wireless Condition Monitoring System for Bearing Fault Diagnosis[J]. International Journal of Automation and Computing, 2015, 12(01): 14-24.
- [11] Tzy S W, Hui T L, Ping W. Weighted-Spectral Clustering Algorithm for Detecting Community Structures in Complex networks[J]. Artificial Intelligence Review, 2017, 47(4): 463-483.
- [12] Shu Y, Zhang L W, Liang L. Discovering Similar Chinese Characters in Online Handwriting with Deep Convolutional Neural Networks[J]. International Journal on Document Analysis and Recognition (IJDAR), 2016, 19(3): 237-252.
- [13] Ze X Z, Xia J, Richard N. Discovering Causal Interactions Using Bayesian Network Scoring and Information Gain[J]. BMC Bioinformatics, 2016, 17(1): 1021-1036.
-

(上接第 28 页)

- [22] 段玉坤,伍志强,韩为东,等. PKR 诱导细胞凋亡发生机制的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(9): 1863-1865.
- [23] 翟景波,高巍,王秋波,等. RNA 传感器蛋白催化酶 PKR 研究新进展[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(6): 93-97.
- [24] Nakamura T, Furuhashi M, Li P, et al. Double-stranded rna-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis[J]. Cell, 2010, 140(3): 0-348.
- [25] 胡有生. DsRBM 对草鱼 PKR 抑制蛋白翻译功能的影响研究[D]. 南昌:南昌大学, 2016.
- [26] Stéphanie Dabo, Eliane F. Meurs. dsRNA-dependent protein kinase pkr and its role in stress, signaling and HCV infection [J]. Viruses, 2012, 4: 2598-2635.
- [27] Hu Y, Fan L, Wu C, et al. Identification and function analysis of the three dsRBMs in the N terminal dsRBD of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) PKR[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 50: 91-100.
- [28] 李雯. 草鱼 PKR 基因的克隆、表达特性及功能分析[D]. 南昌:南昌大学, 2013.
- [29] Rothenburg S, Deigendesch N, Dey M, et al. Double-stranded RNA-activated protein kinase PKR of fishes and amphibians: Varying the number of double-stranded RNA binding domains and lineage-specific duplications[J]. Bmc Biology, 2008, 6(1): 1-19.
- [30] 石华,宋方洲. 双链 RNA 依赖性蛋白激酶的结构与作用[J]. 生命的化学, 2006, 26(1): 38-41.
- [31] Garcia-Ortega M B, Lopez G J, Jimenez G, et al. Clinical and therapeutic potential of protein kinase PKR in cancer and metabolism[J]. Expert Reviews in Molecular Medicine, 2017, 19: 9.
- [32] 梅雯,张成桂,自加吉,等. *MTERF1* 基因真核表达载体的构建及其在 C-33A 细胞中的表达研究[J]. 井冈山大学学报:自然科学版, 2017, 38(5): 29-34.