

研究简讯

调控蛋白 PrfA 的单个氨基酸突变对单核细胞增生李斯特菌毒力基因转录水平的影响^{*}

罗勤^{**} 周青春 冯莹颖 张晓莉

华中师范大学生命科学学院, 遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室, 武汉 430079

摘要 PrfA 是单核细胞增生李斯特菌(*L. monocytogenes*)中迄今为止发现的唯一一个调控绝大多数毒力基因转录表达的蛋白因子。为了深入研究 PrfA 结构和功能的关系, 模拟一株自然界分离得到的 PrfA 组成型突变株 P14A(血清型 4b), 将标准野生株 EGDe(血清型 1/2a)的 PrfA 第 145 位甘氨酸突变为丝氨酸(简称 PrfA^{*}), 分别构建野生型 PrfA 和突变型 PrfA^{*}表达融合载体, 提取并纯化相应蛋白用于体外转录, 直接检测依赖于 PrfA 的毒力基因 *plcA*, *hly* 和 *actA* 启动子的转录活性; 同时, 将携带 *prfA* 和 *prfA*^{*}的载体分别电转化入 *prfA* 基因缺失菌株中, 应用实时 RT-PCR 检测 *plcA*, *hly* 和 *actA* 体内转录水平。实验结果显示: 突变型 PrfA^{*}蛋白明显增强了 *plcA*, *hly* 和 *actA* 启动子的体外转录活性; 依赖于 PrfA 的毒力基因在携带突变型 PrfA^{*}蛋白的菌株中的体内转录水平远远高于携带野生型 PrfA 蛋白的菌株, 说明 PrfA 第 145 位甘氨酸突变为丝氨酸后增强了 PrfA 蛋白与其靶基因的结合能力, 从而提高其表达水平。

关键词 单核细胞增生李斯特菌 PrfA 蛋白 单个氨基酸突变 体外转录

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, 以下简称 LM)是一种短小的革兰氏阳性无芽胞兼性厌氧杆菌, 属于李斯特菌属(*Listeria*), 是人畜共患传染病李斯特菌病(listeriosis)的主要病原菌, 能引起人和动物脑膜炎、败血症、流产和单核细胞增多等症状^[1]。LM 可直接进入巨噬细胞或通过内化素介导进入吞噬囊泡, 并能溶解宿主细胞吞噬泡膜, 逃离巨噬体, 进入胞浆, 在胞浆中复制繁殖以及在细胞间传递^[2]。这些决定 LM 致病性的重要过程都有不同的毒力因子参与。绝大多数毒力因子的转录表达受 PrfA 蛋白调控, 其中包括编码与胞内寄生生活循环有关的主要毒力因子^[3]: 溶血素 O(简称 LLO, 能溶解宿主细胞吞噬泡膜)、磷脂酶 PlcA 和 PlcB(参与溶解宿主

细胞吞噬泡膜和在细胞间运动)、金属蛋白酶 Mpl(参与 PlcB 的成熟)和 ActA 蛋白(负责 LM 在宿主细胞内定向运动以及细胞间传递)。编码它们的基因分别为 *hly*, *plcA*, *plcB*, *mpl* 和 *actA*, 并与编码 PrfA 蛋白的 *prfA* 基因共同组成 LM 染色体上一个 9kb 长的基因簇, 又称为毒力岛。此外, 内化素基因 *inlA-inlB* 操纵子、*inlC*(编码产物功能未知)以及毒力基因 *hpt*(编码产物与 LM 在胞内有效复制有关)的转录激活也受到 PrfA 的调控。

PrfA(positive regulatory factor A)蛋白是由 LM 毒力岛中的 *prfA* 基因编码, 分子量为 27 ku。PrfA 能特异性识别并结合到靶启动子转录起始点上游约 40bp 处的一段 14bp 长的对称序列(TTAACANNT-

2008-01-04 收稿, 2008-01-29 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 30500025)、教育部留学回国人员科研启动基金和教育部“二一”重点学科项目资助

** E-mail: qinluo@mail.cnu.edu.cn

©1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

GTAA, N 代表 TCGA 中任一碱基, 即所谓的 PrfA-box), 从而诱发依赖于 PrfA 的毒力基因转录^[3]. 除此以外, 很多证据表明, PrfA 还能通过其他尚不清楚的复杂方式调节毒力基因的表达^[1]. 1996 年, Ripio 等从自然界分离得到一株 PrfA 组成突变株 P14A(血清型 4b), 发现该 PrfA 的第 145 位甘氨酸突变成丝氨酸是造成组成型突变的主要原因^[4, 5]. 本实验在此基础上, 将 LM 标准株 EGDe(血清型 1/2a)的 PrfA 蛋白第 145 位甘氨酸突变为丝氨酸, 应用实时 RT-PCR 和体外转录实验方法分析依赖于 PrfA 的毒力基因的体内和体外转录水平. 实验结果表明: PrfA 的第 145 位甘氨酸突变成丝氨酸能够增强 PrfA 蛋白与其靶基因的结合能力, 从而提高依赖于 PrfA 的毒力基因的转录表达. 同时, 由于 PrfA 与大肠杆菌转录调控因子 Crp 在高级结构和功能上具有同源性, 而且 Crp 上第 144 位的丙氨酸突变为苏氨酸后, 也能导致 Crp 的组成性合成^[6], 暗示 PrfA 可能采取与 Crp 类似的小分子物质(如 cAMP)介导的活性构象变化机制调控毒力基因的表达.

1 材料与方 法

1.1 菌株、质粒与 RNA 聚合酶

LM 标准株 EGDe(全基因组序列已测序完毕^[7]), *prfA* 基因等位缺失突变株 A42, LM 穿梭载体 pERL3 及 LM RNA 聚合酶均为德国维尔茨堡大学生物中心微生物系 Werner Goebel 教授惠赠. 表达载体 pQE30(带有 6xHis 标签及多克隆位点等元件)及宿主菌 M15 购自 QIAGEN 公司.

1.2 突变 PrfA^{*}(第 145 位甘氨酸突变成丝氨酸)和野生型 PrfA 蛋白表达载体的构建

首先以 EGDe 全基因组 DNA 为模板, 以 PrfA-1F: 5'-GGGAGCTCACATATATTATTCCT-3' 和 PrfA-1R: 5'-CTGTCGACGCAATCGTACGC-3' 为引物扩增野生型 *prfA* 基因, 扩增片段经 *Sac* I 和 *Sal* I 酶切后连接到 pUC18 载体, 形成 pUC18-*prfA*; 然后, 以带有突变碱基的 PrfA^{*}-2F: 5'-GGCTCTATTTGCaGTCAACTTTTAAATC-3' 和 PrfA^{*}-2R: 5'-GATTAAAAGTTGACtGCAAATAGAGCC-3' 为引物(小写字母为突变碱基), 用高保真的 *Pfu* 酶扩增整个 pUC18-*prfA*. PCR 产物经

Dpn I 消化剩余模板后, 转化到大肠杆菌 DH5 α 中. 突变转化子经 DNA 测序检测正确无误后, 再酶切连接到载体 pERL3 及表达载体 QE30 上, 形成突变表达载体 pQE30-PrfA^{*} 和 pERL3-PrfA^{*}. 同时, 直接将 PCR 扩增得到的野生型 *prfA* 基因分别连接到 pERL3 和 pQE30 上, 得到野生型 PrfA 蛋白的表达载体 pERL3-PrfA 和 pQE30-PrfA.

1.3 PrfA 及 PrfA^{*} 蛋白的提取及纯化

重组表达质粒 pQE30-PrfA 和 pQE30-PrfA^{*} 分别转化到宿主细菌 M15 中, 22 $^{\circ}$ C 过夜培养并加入 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导 PrfA 及 PrfA^{*} 蛋白表达. 收获菌液, 离心将沉淀重悬于 Tris 缓冲液中(50 mmol/L Tris-Cl pH 8, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Imidazole, Roth 公司), 然后加入蛋白酶抑制剂和核酸抑制剂 benzonase (Roche 公司). 用 French Press (SLM Instrument) 破碎细胞后, 离心弃沉淀, 上清用 AKTA prime 蛋白纯化分析仪分别经 HiTrap chelating 5 mL 柱(Amersham 公司)初步提纯、阳离子交换色谱(MonoS, Amersham 公司)再次纯化和凝胶过滤层析(Superdex 75HR 16/60 column, Amersham 公司)后得到纯化的 PrfA 及 PrfA^{*} 蛋白. 提纯的蛋白用 SDS-PAGE 检测蛋白纯度, 用蛋白浓度测定试剂盒(Bio-Rad 公司)确定蛋白含量.

1.4 体外转录 *plcA*, *actA* 和 *hly* 启动子

方法如文献[8, 9]所述, 利用提纯的 LM 聚合酶(每个反应 5 ng)、适量的 PrfA 蛋白、启动子 DNA(每个反应 750 ng)和 4 种核苷酸(其中一种为 ³²P 标记, 3000 Ci mmol⁻¹; Amersham Biosciences 公司; 其余 3 种不带有放射性, 购自 Pharmacia 公司)体外模拟基因转录. 转录产物用含有 7 mol/L 尿素的 6% 聚丙烯酰胺变性凝胶电泳后进行放射自显影, 并用 Typhoon phosphorimaging 系统软件(Molecular Dynamics 公司)定量分析转录产物的放射强度.

1.5 实时 RT-PCR 检测毒力基因 *plcA*, *actA* 和 *hly* 的表达

将 pERL3-PrfA^{*} 和 pERL3-PrfA 分别电转化入 A42 (*prfA* 基因等位缺失突变株)中. 用 Trizol Reagent (Invitrogen 公司)提取相应菌株的总 mRNA, 按照 Superscript II 逆转录试剂盒 (Invitrogen 公司)

的操作得到 cDNA. 实时 RT-PCR 按照 ABsolute QPCR SYBR Green 试剂盒(ABgene 公司)提供的步骤进行. 看家基因 *rpoB* 作为内参, 同时以已知含量的看家基因 *rpoB* 制作标准曲线. *rpoB* 以及所检测毒力基因 *plcA*, *actA* 和 *hly* 的引物分别是: *rpoB*-qRT-F: CACCCTGAAGCTCCATTTGT 和 *rpoB*-qRT-R: ACACGACGAACCCAGATTTC; *plcA*-qRT-F: CGAGCAAAACAGCAACGATA 和 *plcA*-qRT-R: CCGCGGACATCTTTTAATGT; *actA*-qRT-F: ATAGCGCAGCGGAAATTAAA 和 *actA*-qRT-R: AAGCATCCGCAACTGACTCT; *hly*-qRT-F: CCGCCAA-GAAAAGGTTACAA 和 *hly*-qRT-R: TCGCTTTTAC-GAGAGCACCT.

2 结果

2.1 PrfA 及 PrfA* (PrfA 第 145 位甘氨酸突变成丝氨酸)蛋白的纯化

PrfA 及 PrfA* 蛋白分别经过 HiT rap chelating 初步提纯(第 1 和 2 泳道)、阳离子交换色谱再次纯化(第 3 和 4 泳道)和凝胶过滤层析(第 5 和 6 泳道)后, 得到的产物用 SDS-PAGE 电泳并银染检测. 结果表明蛋白经 3 次纯化后的纯度较高, 且分子质量大小符合理论预期值(27ku)(图 1). 从 2 L 过夜细菌培养物中可以提取到大约 30 mg 纯化的蛋白, 能够满足实验所需.

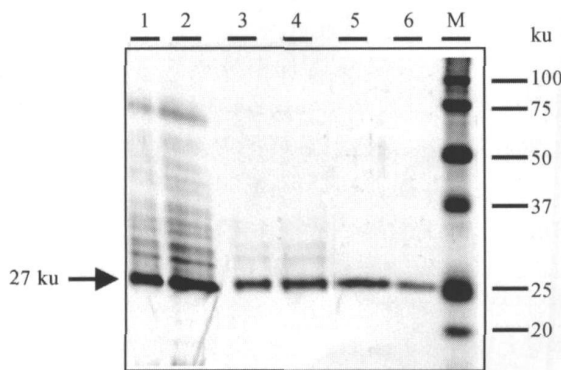


图 1 SDS-PAGE 分析提纯的 PrfA 和 PrfA* 蛋白

1 和 2 分别为 HiT rap chelating 初步纯化的 PrfA 和 PrfA*; 3 和 4 分别为阳离子交换色谱再次纯化后的 PrfA 和 PrfA*; 5 和 6 分别为凝胶过滤层析最后纯化的 PrfA 和 PrfA*; M, 蛋白分子质量标准; 箭头所指表示 PrfA 和 PrfA* 蛋白的电泳位置和大小

2.2 PrfA 蛋白及 PrfA* 蛋白介导的 LM 毒力基因启动子 *PplcA*, *Phly* 和 *PactA* 体外转录实验结果

毒力基因 *plcA*, *hly* 和 *actA* 启动子上均有一个 PrfA 蛋白结合位点(PrfA-box, TTAACANN-TGTTAA), 其转录表达被证明是严格依赖 PrfA 蛋白的调控³. 如图 2 所示: 当 PrfA 蛋白(和 PrfA* 蛋白)的浓度增加时, *plcA*, *hly* 和 *actA* 的转录产物量也随之升高; 但 PrfA* 蛋白诱发的转录产物的量几乎是 PrfA 蛋白的两倍, 说明在同样蛋白浓度条件下, PrfA* 蛋白与靶 DNA (*PplcA*, *Phly* 和 *PactA*)的亲合力比 PrfA 蛋白高, PrfA 第 145 位甘氨酸突变成丝氨酸后增强了 PrfA 蛋白与其靶基因的结合能力, 从而提高了所调控毒力基因的转录表达水平.

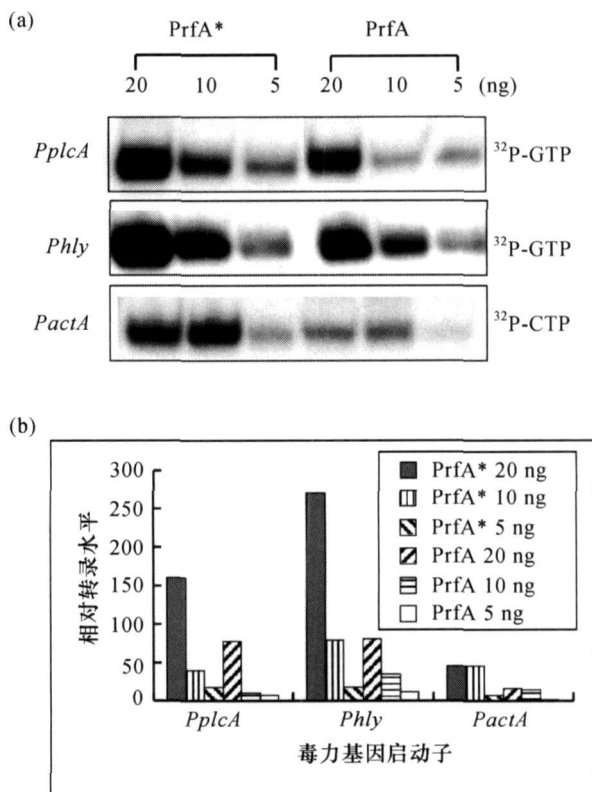


图 2 PrfA 及 PrfA* 蛋白介导的 LM 毒力基因启动子 *PplcA*, *Phly* 和 *PactA* 的体外转录

(a) 体外转录结果. 所用 PrfA 及 PrfA* 蛋白含量和标记放射性核苷酸如图所示; (b) 转录产物的放射强度定量分析. 将最低转录产物的放射强度数值设定为 1, 换算得到相对转

2.3 PrfA 及 PrfA* 蛋白介导的 LM 毒力基因 *plcA*, *hly* 和 *actA* 体内转录实验结果

分别将携带有 PrfA 及 PrfA* 蛋白编码基因的载体 (pERL3-PrfA 和 pERL3-PrfA*) 电转化入 *prfA* 基因等位缺失突变株 A42 中, 应用实时 RT-PCR 检测 LM 毒力基因在相应菌株中的转录水平。如图 3 所示: 毒力基因 *plcA*, *hly* 和 *actA* 在携带有 PrfA* 菌株中的转录水平明显高于在野生 PrfA 蛋白菌株中的转录水平, 再一次证明: PrfA 第 145 位甘氨酸突变成丝氨酸后显著增强了 PrfA 蛋白的活性, 从而提高了所调控毒力基因的转录表达水平。

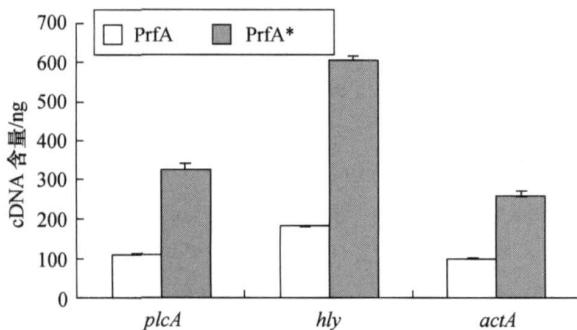


图 3 PrfA 及 PrfA* 蛋白介导的 LM 毒力基因 *plcA*, *hly* 和 *actA* 的体内转录

毒力基因转录表达的 cDNA 浓度用已知含量的看家基因 *rpoB* 制作的标准曲线定量

3 讨论

P14A 是从自然界分离得到的 PrfA 蛋白组成突变变异株, 属于血清型 4b, 大多数人群流行性李斯特菌病是由该血清型引起的^[10]。研究发现 PrfA 的第 145 位甘氨酸突变成丝氨酸是造成 P14A 组成突变的主要原因^[4, 5]。本实验所采用的标准株 EGDe 属于血清型 1/2a, 其基因组全序列已于 2001 年测序完毕^[7], 该血清型主要引起一些散发性李斯特菌病^[10]。无论在以血清型为基础的传统分型, 还是以脉冲场凝胶电泳、毒力基因等位分析以及核糖体分型等为基础的分子亚分型中, 血清型 4b 和血清型 1/2a 都被分到不同的两个遗传谱系^[10], 其致病能力和基因组碱基序列等略有不同。例如, 组成 PrfA 蛋白的氨基酸一级序列上至少有 16 个位置的编码

子存在差异。本文利用定点突变的方法, 将标准株 EGDe 编码 PrfA 蛋白的第 145 位的甘氨酸突变为丝氨酸, 用体外转录和实时 RT-PCR 实验表明了: PrfA 蛋白的第 145 位的甘氨酸突变为丝氨酸能够增强 PrfA 蛋白与其靶基因的亲和能力, 从而提高所调控毒力基因的转录表达水平。第 145 位的甘氨酸所在的结构域是不同遗传谱系的 PrfA 蛋白与靶 DNA 相结合的关键区域, 当甘氨酸突变成丝氨酸后可能诱发组成该结构域的氨基酸残基间氢键的断裂和重组, 从而使 PrfA 蛋白的活性增强。

PrfA 在功能和高级结构上与大肠杆菌 cAMP 的受体蛋白 Crp 非常相似, 均属于 Crp/Fnr 转录调控因子家族的成员^[1]。PrfA 和 Crp 具有一些共同的重要结构区域, 包括 (1) N 末端的 β -环结构和 C 末端的螺旋-转角-螺旋基序 (HTH motif), 二者在 Crp 中是 Crp 与辅因子 cAMP 结合形成 Crp-cAMP 复合物的结构区域; (2) RNA 聚合酶结合的活性区, 且都位于氨基酸残基 156—164 区域; (3) PrfA 具有与 Crp 相同的 α 螺旋组成的 D 结构 (由位于第 138—155 位氨基酸残基组成)。该结构在 Crp 中引导与辅因子 cAMP 结合, 并引起 Crp 立体异构体的变化。例如, 将 Crp 上第 141 位甘氨酸突变成丝氨酸, 或者第 144 位的丙氨酸突变为苏氨酸后, 导致 Crp 的组成性合成, 且不受 cAMP 浓度的影响。相应的, PrfA 蛋白第 145 位氨基酸的突变 (包括自然突变得到的 P14A 和我们人工定点突变产生的 PrfA*) 也能造成 PrfA 类似组成性变化。最近 Velge 等^[11] 从 LM 弱毒株中分离到一个新的 PrfA 蛋白自发突变 (血清型 1/2a); 位于 C 末端螺旋-转角-螺旋基序上的第 220 位的赖氨酸被苏氨酸所取代。该突变降低了 PrfA 与靶 DNA 形成转录复合物的能力, 从而抑制了依赖于 PrfA 的毒力基因的表达, 造成菌株毒性减弱, 说明 PrfA 的 C 末端 HTH motif 可能具有稳定 PrfA 与靶 DNA 相结合的功能, 这与大肠杆菌 Crp HTH motif 的功能类似。以上分析表明, 尽管有实验证明 cAMP 浓度的变化并不影响 PrfA 的活性 (因为决定 cAMP 结合的几个氨基酸在 PrfA 中并不保守^[6]), 但仍有理由相信 PrfA 可能采取与 Crp 类似的方式, 即通过与环境信号小分子或辅因子相互作用, 使 PrfA 蛋白构象在活性和非活性之间转变, 从而调控依赖于 PrfA 的毒力基

因的转录表达, 这部分的内容将是我们今后研究工作的重点.

近年来研究发现, LM 具有显著的激发 CD⁴⁺, CD⁸⁺ T 细胞的免疫反应和较弱的体液反应的能力, 利用减毒 LM 突变株可以靶向性地呈递外源表达抗体或者构建肿瘤疫苗^[12]. 因此, 深入探讨 LM 与宿主细胞相互作用的关系, 尤其是 PrfA 调控毒力蛋白表达的分子机制, 不仅可以加深对 LM 致病机理的认识, 预防和治疗李斯特菌病, 而且对于重组 LM 疫苗的临床应用有着重要理论指导意义. 本文的实验结果将为后续研究 PrfA 调控机制的工作提供基础.

致谢 本文的部分工作得到了德国维尔茨堡大学生物中心微生物系 Werner Goebel 教授的大力支持和指导, 在此表示衷心感谢.

参 考 文 献

- 1 Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 2001, 14(3): 584—640
- 2 Cossart P, Pizarro-Cerda J, Lecuit M. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: Functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol* 2003, 13(1): 23—31
- 3 Krefl J, Vazquez-Boland JA. Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int J Med Microbiol* 2001, 291(2): 145—157
- 4 Ripio MT, Domínguez-Bernal G, Lara M, et al. A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*, 1997, 179(5): 1533—1540
- 5 Vega Y, Dickneite C, Ripio MT, et al. Functional similarities between the *Listeria monocytogenes* virulence regulator PrfA and cyclic AMP receptor protein: The PrfA* (Gly145Ser) mutation increases binding affinity for target DNA. *J Bacteriol* 1998, 180(24): 6655—6660
- 6 Vega Y, Rauch M, Banfield M.J. New *Listeria monocytogenes* *prfA** mutants: transcriptional properties of PrfA* proteins and structure-function of the virulence regulator PrfA. *Mol Microbiol* 2004, 52(6): 1553—1565
- 7 Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, et al. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*, 2001, 294: 849—852
- 8 Luo Q, Rauch M, Marr AK, et al. *In vitro* transcription of the *Listeria monocytogenes* virulence genes *inlC* and *mpl* reveals overlapping PrfA-dependent and -independent promoters that are differentially activated by GTP. *Mol Microbiol*, 2004, 52: 39—52
- 9 Luo Q, Zhou QC, Deng LF, et al. *In vitro* transcription of two groups of newly identified and putatively *in vivo* PrfA-regulated genes of *Listeria monocytogenes*. *J Medical Molecular Biology*, 2006, 3(5): 331—338
- 10 周晓辉, 焦新安. 单核细胞增生症李斯特菌的分子亚分型法及其应用. *动物医学进展*, 2003, 24(3): 44—47
- 11 Velge P, Herler M, Johansson J, et al. A naturally occurring mutation K220T in the pleiotropic activator PrfA of *Listeria monocytogenes* results in a loss of virulence due to decreasing DNA-binding affinity. *Microbiology*, 2007, 153: 995—1005
- 12 Brockstedt DG, Giedlin MA, Leong ML et al. *Listeria*-based cancer vaccines that segregate immunogenicity from toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(38): 13832—13837