

学校编码: 10384
学号: 21720061152219

分类号__密级__
UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

流感病毒 NS1 和 p85 β 复合物的结构学研究

Structural study of the interaction between NS1
(Influenza A Viruses) and p85 β (PI3K)

黄建峰

指导教师姓名: 教授教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2009 年 月

论文答辩时间: 2009 年 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: _
评 阅 人: _

2009 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。
2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要	I
Abstract.....	II
1 前言	1
1.1 流感病毒.....	1
1.2.1 非结构蛋白 NS1A	2
1.2.2 NS1A 的 N 端结构域	4
1.2.3 NS1A 的 C 端结构域	6
1.3.1 PI3K/Akt 信号通路的概述	7
1.3.2 PI3K/Akt 信号通路的激活	7
1.3.3 PI3K/Akt 信号通路与 NS1A	8
1.4.1 结构生物学研究概况	9
1.4.2.1 蛋白质结构研究的方法	10
1.4.2.2 X—射线晶体学	10
1.4.2.3 核磁共振波谱学	12
1.4.2.4 电镜技术	12
1.4.2.5 动态光散射技术 (DLS)	13
1.4.2.6 质谱技术.....	13
1.4.3 结构基因组学	16
1.4.4 生物信息学	17
1.4.5 X—射线晶体学解析蛋白质结构的流程	17
1.5 本课题的研究目的及方法.....	18
1.5.1 研究内容.....	18

1.5.2 研究方法.....	18
1.5.3 研究目的及意义	19
2 材料与方法	20
2.1 材料.....	20
2.2 试验方法	24
3 结果	33
3.1 PCR 扩增和重组质粒的构建	33
3.2 重组融合蛋白的表达, 纯化.....	39
4 分析和讨论	50
5 小结	54
参考文献:	55
附录 1 略缩词	59
附录 2 SDS 电泳配方	60
致谢	61

Catalog

Astract in Chinese	I
Abstract in English	II
1 Introduction.....	1
1.1 Influenza viruses.....	1
1.2.1 NS1A	2
1.2.2 NS1A N-terminal domain.....	4
1.2.3 NS1A C-terminal domain	6
1.3.1 An overview of the PI3K/Akt signaling pathway	7
1.3.2 PI3K/Akt signaling pathway activation.....	7
1.3.3 PI3K/Akt signaling pathway with the NS1A	8
1.4.1 Structural Biology Research.....	9
1.4.2.1 Method of protein structure research.....	10
1.4.2.2 X-ray crystallography.....	10
1.4.2.3 NMR spectroscopy	12
1.4.2.4 Electron microscopy	12
1.4.2.5 Dynamic light scattering (DLS)	13
1.4.2.6 Mass Spectrometry	13
1.4.3 Structural Genomics.....	16
1.4.4 Bioinformatics	17
1.4.5 The process of X-ray crystallography analysis of protein structure	17
1.5 Content and purpose of the research.....	18
1.5.1 Content of the research.....	18

1.5.2 Methods of the research	18
1.5.3 purpose of the research.....	19
2 Materials and methods	20
2.1 Materials.....	20
2.2 Methods	24
3 Results	33
3.1 PCR amplification and recombinant plasmid	33
3.2 Recombinant fusion protein expression, purification.....	39
4 Discussion.....	50
5 Conclusion	54
References:	55
Appendix 1 : abbreviation.....	59
Appendix 2 SDS-PAGE Formula	60
Acknowledgement	61

摘 要

流感病毒(*Influenza viruses*),属正粘病毒科, 是一种RNA病毒, 它在感染人, 动物后能引起一种急性呼吸道传染病—流感, 严重时可导致死亡。NS1 (non-structural protein), 是A型流感病毒的非结构蛋白,它通过与受感染细胞内的相关蛋白受体的相互作用来调节流感病毒的致病性及毒力, 在破坏被感染细胞的过程中扮演着一个关键的角色。与 p85 β 的iSH2结构域的结合就是NS1影响人体内磷酸肌醇23激酶/蛋白激酶B(phosphoinositide 32 kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)信号通路的基础, 后者是体内重要的信号转导通路之一, 在细胞代谢、细胞周期调控、血管生成等方面发挥重要作用。

本论文拟采用结构生物学方法解析NS1与p85 β 的iSH2结构域相互作用的蛋白质结构, 以期能够从结构生物学角度阐释NS1在影响人体内PI3K/Akt信号通路所起作用的分子机制, 为其其它生物学功能的研究奠定结构生物学基础。

本文研究的内容包括:运用基因工程技术克隆蛋白H1NS1 (1-73), H5NS1 (1-73), H5NS1 (74-215), H1NS1 (74-230), P110 α -abd基因至pET28a, pGEX-4T-1表达载体;运用原核表达系统表达大量可溶性的上述蛋白及蛋白复合物;运用亲和层析、离子交换、分子排阻凝胶层析等手段纯化蛋白;通过坐滴气相扩散法筛选蛋白晶体;通过条件梯度方法优化晶体;数据收集, 解析结构。

最终, 通过构建的NS1 (74-215), P110 α -abd和p85 β iSH2的pET28a重组蛋白, 利用各种纯化方法, 纯化了NS1 (74-215) & p85 β iSH2, P110 α -abd和p85 β iSH2两者复合物, NS1 (74-215) & p85 β iSH2 & P110 α -abd三者复合物, 并进行了初步晶体生长条件的摸索, 为后续得到NS1& p85 β iSH2 & P110 α -abd三者复合物晶体, 结构解析打下基础。

关键词: 流感病毒; NS1; p85 β iSH2;

Abstract

Influenza viruses were named Orthomyxoviridae because of their ability to bind to mucus and to distinguish them from another family of enveloped negative-stranded RNA virus. It can infect a wide variety of avian species, humans and several other mammalian species, including swine and horse. It causes acute respiratory disease even death. NS1, that is a non-structural protein, plays an important role in the infection, contributing to the pathogenesis and virulence during infection. All of these functions of NS1 rely on its ability to participate in a multiple protein-protein and protein-RNA interactions. For example, binding to iSH2 domain of p85 β stimulates the PI3K/Akt signaling pathway.

In this research, we work to solve the complex structure of NS1/p85 β iSH2 domain through structure biology methods to clarify the functional mechanism of NS1/ p85 β iSH2 domain which participates in PI3K/Akt signaling pathway.

In this dissertation, we cloned the genes of NS1 (1-73), NS1 (74-215), P110 α -abd & p85 β iSH2 into pET28a plasmid and then 6HIS-tagged NS1 (74-215), P110 α -abd & p85 β iSH2 were expressed in *E.coli*. Recombinant protein was Ni²⁺ affinity column. Further purification of complex was carried out by Ion Change Chromatography and Molecular Exclusion Chromatography. Crystals were grown by the sitting vapor diffusion method.

Key Words: Influenza viruses ; NS1; p85 β iSH2

1 前言

1.1 流感病毒

流感病毒(*Influenza viruses*), 属正粘病毒科 (*Orthomyxoviridae*), 是 RNA病毒的一种, 分节段的单负链 RNA构成其基因组, 每个节段编码 1~2蛋白。根据病毒抗原特性及其基因特性的不同, 流感病毒分为A, B, C三种不同类型, A, B型流感病毒由8个节段组成, C型流感病毒仅7个RNA节段。病毒粒子呈中等大小, 囊膜上有含血凝素 (HA) 和神经氨酸酶活性的糖蛋白纤突(NA)。根据HA和NA的抗原特性又可将A型流感病毒分成亚型。

流感病毒具有极强的传染力, 可以迅速造成全球数十亿人感染甚至死亡。该病毒能感染可感染多种动物, 包括人, 猪、马、各种海洋动物及禽类, 引起一种急性呼吸道传染病—流感。

20世纪全球共发生过4次流感大暴发: 1918年“西班牙流感(H1N1型)”, 1957年“亚洲流感(H2N2型)”, 1968年“香港流感(H3N2型)”以及1977年“俄罗斯流感(H1N1型)”, 其中1918年的流感灾难造成大约2-4千万人死亡, 同时, 全球每年仍有大量人群因流感而死亡。此外, 流感病毒引发禽类流感, 导致的大量动物死亡还造成人类的经济上的巨大损失。研究表明, 流感病毒存在种属特异性, 因此人们曾认为人类不能感染禽流感病毒, 直到1997年以后, 人们才意识到, 高致病性禽流感(HPAI)病毒H5N1亚型也具有人畜共患的能力。目前, 已报告的人禽流感病毒H5N1感染病例的死亡率(CFR)约为60%(WHO, 2007)。H5N1已经导致超过2亿只家禽被扑杀或淘汰(FAO, 2006)。由于禽流感病毒的致病性与多变性以及发生人传人的可能性, 使得流感病毒的研究, 备受广大人民和各国政府的高度关注。

流感病毒缺乏一种校正和修复复制错误的机制, 遗传物质容易发生变化, 在感染过程中原来的病毒株就会被新的抗原变异株取代; 当不同亚型同时在人类和动物机体中复制, 如果突变的幅度加大, 病毒之间产生基因重组, 新的亚型产生, 则出现抗原转移, 导致完全不同于亲代的新的病毒亚型^[1]。本文实验流感病毒相关基因

数据来源于A型流感病毒。

1.2.1 非结构蛋白 NS1A

A型流感病毒(influenza A virus)基因组的第 8 节段编码 2 种蛋白,即非结构蛋白(non-structural protein,NS蛋白)1和 2 (图1-1)。近来, NS2(NEP)蛋白已经被发现在病毒粒子中存在^[2,3]。NS1蛋白大约为26Kd, 含有202-237个氨基酸, 包括 2 个功能区(图1-1): RNA结合区(RNA-Binding domain) 和受体蛋白结合区(effort domain)^[4], 在不同亚型流感病毒中存在大小和结构差异。在病毒感染早期, NS1A 蛋白合成于细胞质中, 之后迅速转移至胞核, 发生聚集, 感染后期在核仁中形成致密的晶体样的包涵体^[5]。在感染晚期的细胞浆中也能发现NS1A蛋白, 推测其可能起刺激机体产生抗 NS1A蛋白的抗体作用^[6]。NS1蛋白含有2个核定位区, 34位~38位氨基酸残基和203位~230位氨基酸残基处, 其中前一信号区高度保守, 排列顺序为Asp-Arg-Leu-Arg-Arg。

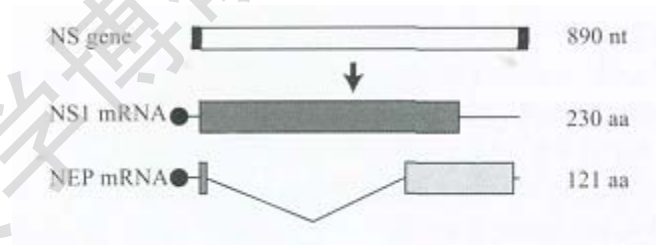


图1-1 A型流感病毒NS1与NEP基因的mRNA

Fig. 1-1 Arrangement of the NS1 and nuclear export protein(NEP) mRNAs of the influenza A virus

作为非结构蛋白, NS1A可能在在破坏被感染细胞的过程中扮演着一个关键的角色,对流感病毒的毒性起非常重要的作用。它是一种多功能的调节蛋白(图1-2), 在调节流感病毒的致病性及毒力两个方面发挥着重要的作用, 能从宿主和病毒这两个方面来调节病毒的毒力和致病性。在病毒方面, NS1A蛋白可通过增强病毒mRNA的翻译来提高病毒的复制, 抵抗宿主抗病毒能力; 在宿主方面, NS1蛋白可通过抑制宿主细胞蛋白的合成、诱导细胞凋亡以及拮抗干扰素的产生等方式来调节机体的

抗病毒反应，间接增强病毒致病性。（图1-3）

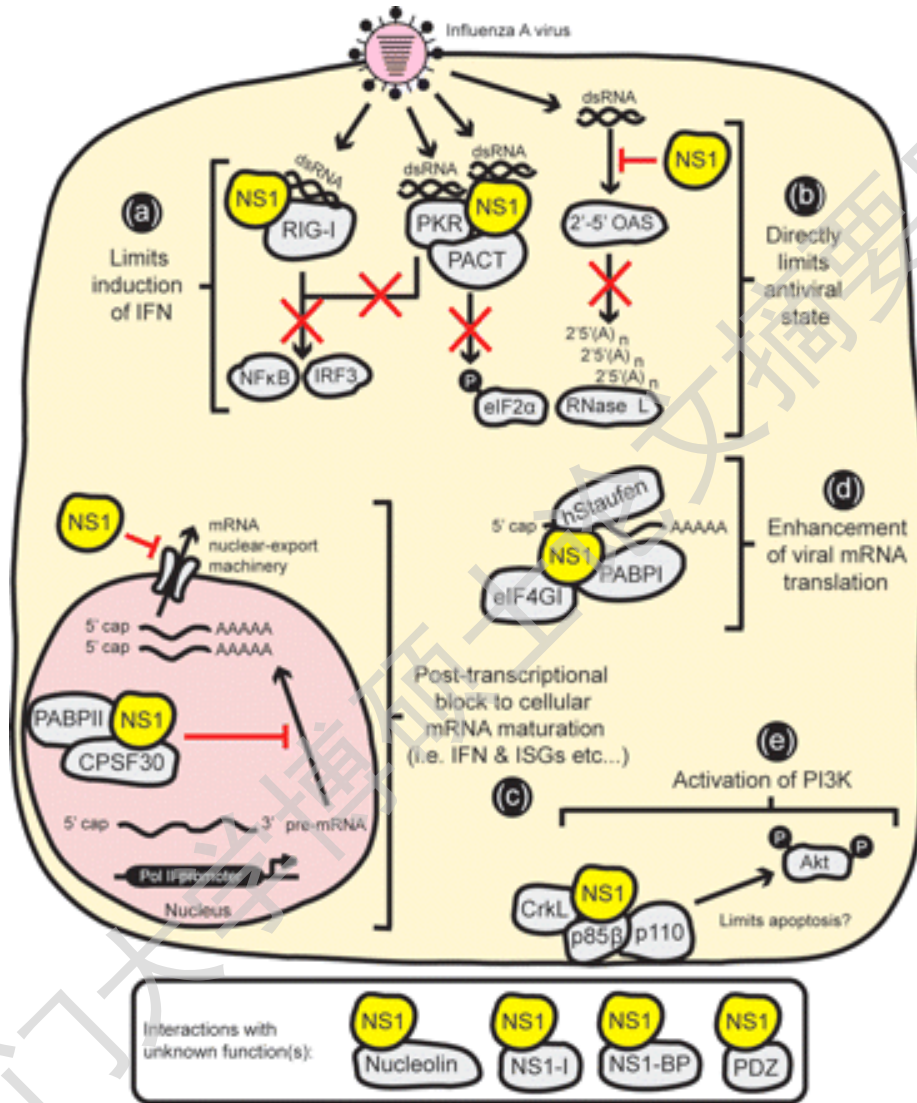


图1-2 A型流感病毒NS1在受感染细胞内的作用（引自文献^[48]）

Fig1-2 Schematic diagram of the multiple functions of NS1 within infected cells

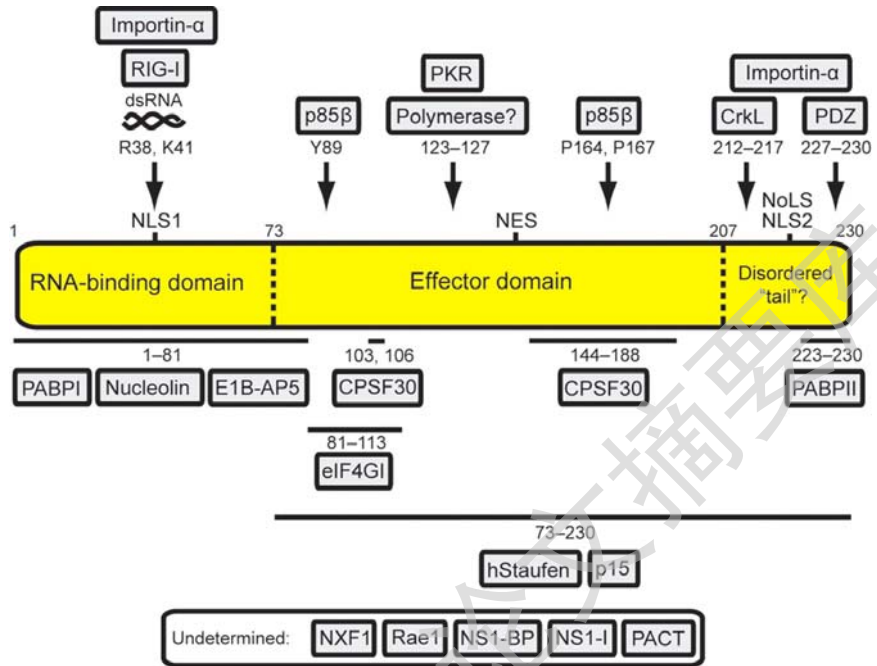


图1-3 A型流感病毒NS1的胞内蛋白结合位点（引自文献^[48]）

Fig1-3 Binding sites of cellular proteins on the domains of the NS1A protein

1.2.2 NS1A 的 N 端结构域

A型流感病毒的非结构蛋白1（NS1A）N端的前73个氨基酸构成RNA结合结构域，能够控制全长NS1A的dsRNA结合活性。

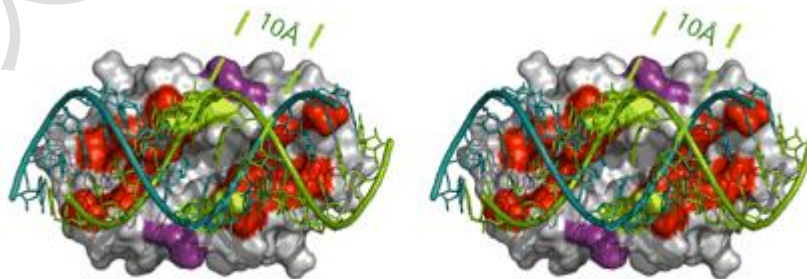


图1-4 NS1A (1 - 73)与dsRNA的复合物结构（引自文献^[49]）

Fig1-4. Model of the NS1A (1 - 73)-dsRNA complex

通过形成NS1A-dsRNA复合物(图1-4)，流感病毒首先能够抑制依赖于双链RNA的蛋白激酶PKR (Double-stranded RNA-dependent protein kinase)活化：用NS1基因突

变株或基因缺失病毒株去感染细胞能导致被感染细胞的PKR激活^[7],其原因可能是NS1蛋白可以特异地与双链 RNA(dsRNA)结合,使活化的 PKR与dsRNA分离;或是直接与RNA依赖性蛋白激酶(PKR)结合,从而阻止了PKR的磷酸化,抑制了PKR的活性,进而抑制细胞蛋白表达合成^[8],促进病毒的复制和繁殖;同时,由于PKR能通过活化IRF-1和NF- κ B通路激活I型干扰素的合成,NS1蛋白起到了抑制IFN- α/β 的合成。

其次,该结构域还参与抑制诸如:TNF- α ,IL6,趋化因子配体3(CCL3),MIP- α ,IL1 β and IL18等细胞致炎因子前体。NS1A的N端和c端都参与调节受感染的巨噬细胞内的细胞致炎因子前体的生成的过程。其中,N端结构域似乎对抑制IL1 β and IL18的都是必须的,而在A型流感病毒感染人巨噬细胞的过程中,IFN- α/β ,TNF- α ,IL6,MIP- α 的生成抑制则离不开NS1A的c端的作用^[9]。结果,由病毒诱导的编程性细胞死亡被推迟,只是这机制的具体过程还了解的不是很清楚。

此外,依靠N端结构域,NS1A还能与小核RNA结合,阻断前mRNA的剪接过程。它可以结合到与mRNA剪接有关的重要分子—U6小核RNA(small nuclear RNA,snRNA)的特定茎环结构上,从而抑制U6 RNA snRNA参与的mRNA剪接功能^[10]。其可能机制为,U6小核RNA的特定茎环结构构成A字样的,类似溶解的dsRNA的结构,从而特异地与NS1A的N端结构域上,形成与NS1A(1-73)结合16bp的dsRNA片段后类似的复合物。研究也显示^[11],NS1A在该抑制过程中,并不干扰mRNA前体与剪接体的结合,但对包括U6 snRNA、U2snRNA、U4 snRNA和其他蛋白分子等的结合有一定的抑制作用,结果表现为mRNA前体与失活的剪接体结合,进而抑制了mRNA前体的剪接,从而影响了向细胞质内的转运和翻译过程。

NS1蛋白还能够诱导MDCK细胞和HeLa细胞凋亡,且该蛋白的RNA结合区在诱导细胞凋亡中起了关键的作用^[12]。Zhironov等的研究发现,流感病毒NS1A蛋白可以下调被感染细胞的细胞凋亡,NS1蛋白下调细胞凋亡具有IFN依赖性^[13]。他们通过对野生型流感病毒及其NS1基因缺失突变株对诱导细胞凋亡作用的比较发现,NS1基因缺失的突变株对能合成干扰素(IFN)的细胞(如MDCK细胞和鸡成纤维细胞)诱导的凋亡更为迅速和严重;而对于不能合成IFN的细胞(如Vero细胞),则两者无明显差异。NS1蛋白可能是通过抑制PKR和IRF-3来抑制NF- κ B的活化,这样NS1蛋白通过上调

“凋亡阈值”来延迟被感染细胞启动的程序性细胞死亡。

最近的研究显示，尽管流感病毒NS1A不同亚型的在阻碍dsRNA的信号传导方面的能力非常相似，但在抑制IFN反应的机制及效率上仍存在病毒亚型上的特异性。而且不同亚型的NS 1A在细胞内的定位也有极大差异。这些差异是否与NS 1A的N端结构域的结构或是功能有关，以及具体作用机制如何，这些都有待未来的继续研究。

1.2.3 NS1A 的 C 端结构域

A型流感病毒的非结构蛋白1（NS1A）C端主要存在：eIF4GI，胞内切割和聚腺苷酸化特异性因子(CPSF) 30kd的一个亚基CPSF30和poly(A)多聚酶和核内的poly(A)-结合蛋白(PAB II)的结合功能区（图1-3）。结构学研究^[14]显示，NS1A 的C端结构域能形成可溶性的二聚体。每个单体包括7个 β 折叠和3个 α 螺旋。（图1-5）

CPSF具有细胞内的切割和聚腺苷酸化作用，其可与mRNA前体特异性结合，切割上游10~30核苷酸之间的AAUAAA序列,然后与细胞内其他蛋白一道共同进行mRNA分子的前体裂解反应。PAB II则能在胞内裂解后的mRNA前体的3'端10~12个A后加上A，并继续延伸。NS1A的C端结构域与CPSF30，PAB II的结合，抑制了宿主细胞mRNA的核输出。其可能机制为：NS1A蛋白特异性地与感染细胞内的CPSF30亚基结合，干扰其对mRNA特定序列的切割^[15]；而NS1A蛋白与PAB II蛋白的结合,影响poly(A)的延伸,造成mRNA多是以10~12个A为其尾部结构的现象,并使形成的mRNA停留在细胞核内^[16]。同时，病毒的帽依赖性内切酶能从细胞内前体mRNA上将多聚腺苷酸帽子切下来并用来作为合成病毒mRNA的引物，所以细胞前体mRNA在细胞核内的积累有利于病毒mRNA的合成。研究表明，NS1A蛋白可以加强某些病毒基因的转录，有助于病毒蛋白的表达^[17]。

利用NS1A 的D92E突变体作的细胞因子抗性对比显示，该位点的突变能够增加NS1A与dsRNA结合亲和性^[18]。asp92接近二聚体的相对面，该位点的突变可能改变RBD的稳定性或是方向，从而影响其与dsRNA的结合。同时，该位点的变化也降低了NS1A的磷酸化水平，由于NS1A的磷酸化水平对于诱导编程性细胞死亡是必须的，而后者能使病毒的核糖核蛋白从核内释放出来。这样，该突变就延长了病毒生命周期^[19]。研究显示，NS1A 80-84的缺失能增加H5N1的细胞因子的抗性。

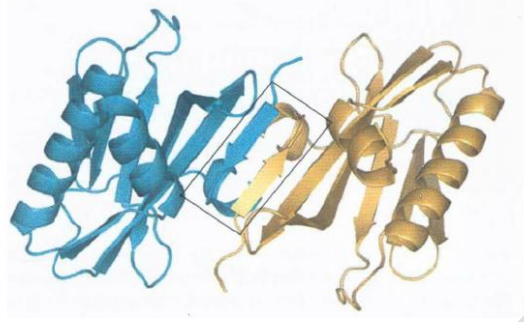


图1-5 NSIA的C端结构域（引自文献^[20]）

Fig1-5 Model of the effector domain dimer of NSIA protein

1.3.1 PI3K/Akt 信号通路的概述

磷酸肌醇 23 激酶/蛋白激酶 B(phosphoinositide 32 kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)信号通路是体内重要的信号转导通路之一，在细胞代谢、细胞周期调控、血管生成等方面发挥重要作用^[21,22,23]。

PI3K家族是一类特异性地催化磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol,PI)3-位羟基磷酸化,产生具有第二信使作用的肌醇脂类物质的激酶，包括 I、II、III三类。其中 I 类激酶在结构上由两种亚基组成,分别是分子量大小为110KD的催化亚基p110 $\alpha/\beta/\delta$ 和分子量为85KD的P85，两者能形成异二聚体。P85亚基是许多胞浆和受体酪氨酸激酶的磷脂蛋白底物,对PI3K起着抑制作用。

1.3.2 PI3K/Akt 信号通路的激活

PI3K/Akt通路的激活起始于受体酪氨酸激酶,如胰岛素样生长因子等,在其相应配体的刺激下发生寡聚化和自身磷酸化,暴露出供包括PI3K调控亚基在内的很多含有SH2结构域分子锚定位点。各个亚基锚定在膜上,受体酪氨酸激酶的活化,使P110和P85复合体的构象发生改变,P85的抑制作用解除,PI3K得以活化。而PI3K的催化产物：3,4-二磷酸磷脂酰肌醇和3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇，作为细胞内一类重要的第二信使分子与胞浆中的磷酸肌醇依赖性蛋白激酶(PDK)和蛋白激酶B(PKB/Akt)的pH结构域结合,使其集中于胞膜附近，后者进一步磷酸化后Akt。Akt是PI3K信号转导途径中一个重要的下游靶激酶,其活后可使信号进一步转导。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库