

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620060153292

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

IFN 诱导的 GTP 酶基因的起源与进化及其在文昌鱼中的功能分析

Evolution and origin of IFN-inducible GTPase genes and functional analysis of amphioxus IFN-inducible GTPase genes

李 光

指导教师姓名: 王义权 教授

专业名称: 动 物 学

论文提交日期: 2010 年 4 月

论文答辩日期: 2010 年 5 月

学位授予日期: 2010 年 月

答辩委员会主席: 陈良标

评 阅 人: _____

2010 年 6 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

中文摘要	V
英文摘要	VI
第一章 文献综述	1
一 干扰素研究概况	1
1 <i>IFN</i> 基因在脊椎动物中的进化	1
2 <i>IFNR</i> 基因在脊椎动物中的进化	2
3 <i>IFN</i> 表达的激活	3
4 <i>Jak-STAT</i> 信号通路	5
二 干扰素诱导 GTP 酶 (GTPase) 的研究进展	6
1 <i>Mx</i> 基因家族的研究背景	7
2 <i>GBP</i> 基因家族的研究背景	9
3 <i>IRG</i> 基因家族的研究背景	12
4 <i>VLIG</i> 基因家族的研究背景	17
三 文昌鱼的进化地位及其免疫学研究进展	17
四 论文的选题和目的	20
第二章 脊椎动物 <i>IFN</i> 诱导 GTP 酶的起源与进化	22
一 材料与方法	23
1 <i>IFN</i> 诱导 GTP 酶在具有代表性物种中的鉴定	23
2 新注释基因的命名及其外显子/内含子基因结构的确定	24
3 <i>IFN</i> 转录复合体结合 DNA 元件的鉴定	24
4 进化分析	25
5 斑马鱼 PolyI:C 处理及 <i>Mxa</i> 基因表达的 Real time-PCR 分析	25
二 结果	26
1 <i>MX</i> 基因家族	26
2 <i>GBP</i> 基因家族	32
3 <i>VLIG</i> 基因家族	40
4 <i>IRG</i> 基因家族	46
三 讨论	48
第三章 文昌鱼 <i>IFN</i> 诱导 GTP 酶基因的表达分析	54

一 材料与方法	54
1 材料	54
2 方法	55
二 结果	59
1 日本文昌鱼 GTP 酶基因克隆	59
2 日本文昌鱼 GTP 酶基因的表达分析	59
2.1 日本文昌鱼 GTP 酶基因的组织表达分析	59
2.2 日本文昌鱼 GTP 酶基因在刺激物免疫前后肠道中表达变化的分析	61
三 讨论	64
第四章 头索动物 GFP 蛋白进化和功能上的多样性分析	65
一 材料与方法	66
1 材料和试剂	66
2 方法	68
2.1 3 种鳃口文昌鱼属 (Branchiostoma) GFP 基因的鉴定、克隆	68
2.2 佛罗里达文昌鱼 EST 数据处理	68
2.3 佛罗里达文昌鱼 GFP 基因非编码区分析	69
2.4 进化分析	69
2.5 日本文昌鱼 GFP1、GFP7 和 GFP9 的原核表达和纯化	70
二 结果与讨论	73
1 三种鳃口文昌鱼 GFP 基因的鉴定或克隆	73
2 头索动物 GFP 基因的进化	75
3 头索动物 GFP 基因表达的多样性	81
4 文昌鱼 GFP 蛋白荧光光谱学多态性	85
三 结论	87
总结与展望	88
参考文献	90
附件	102
博士期间发表论文	122
致谢	123

Content

Abstract in Chinese	V
Abstract in English	VI
Chapter 1 introduction	1
一 IFN research background	1
1 Evolution of <i>IFN</i> genes in vertebrates.....	1
2 Evolution of <i>IFNR</i> genes in vertebrates	2
3 Activation of <i>IFN</i> gene expression.....	3
4 Jak-STAT signaling pathway	5
二 Research background on IFN-inducible GTPase genes	6
1 Research background on <i>MX</i> gene family	7
2 Research background on <i>GBP</i> gene family	9
3 Research background on <i>VLIG</i> gene family.....	12
4 Research background on <i>IRG</i> gene family	17
三 Phylogenetic position of amphioxus and research advance on its immune system	17
四 Goal of our research	20
Chapter 2 Origin and evolution of IFN-inducible GTPase genes	22
一 Materials and methods	23
1 Identification of IFN-inducible GTPase genes from eighteen representative animals	23
2 Nomenclature and exon/intron structure determination of newly-identified IFN-inducible GTPase genes.....	24
3 Identification of transcription factor binding sites	24
4 Evolutionary analysis.....	25
5 Zebrafish treatment with PolyI:C and Real time-PCR analysis of <i>MXa</i> expression	25
二 Results	26
1 <i>MX</i> gene family	26
2 <i>GBP</i> gene family	32
3 <i>VLIG</i> gene family	40
4 <i>IRG</i> gene family	46
三 Discussion	48
Chapter 3 Expression profiles of amphioxus IFN-inducible GTPase genes	54
一 Materials and methods	54

1 Materials	54
2 Methods	55
二 Results.....	59
1 Cloning of <i>B. japonicum</i> IFN-inducible GTPase genes	59
2 Expression profiles of <i>B. japonicum</i> IFN-inducible GTPase genes	59
2.1 Expression profiles of <i>B. japonicum</i> IFN-inducible GTPase genes in normal tissues.....	59
2.2 Expression differences of <i>B. japonicum</i> IFN-inducible GTPase genes in intestines from PBS- and stimulators-treated animals.....	61
三 Discussion	64
Chapter 4 Evolutionary and functional diversity of green fluorescent proteins in cephalochordates	65
一 Materials and methods	66
1 Materials and reagents	66
2 Methods	68
2.1 Characterization of GFP genes from three species of genus <i>Branchiostoma</i>	68
2.2 <i>B. floridae</i> GFP EST data treatment.....	68
2.3 Analysis of <i>B. floridae</i> GFP genome sequences by mVISTA	69
2.4 Evolutionary analysis	69
2.5 Expression and purification of recombinant Bj-GFP1, Bj-GFP7 and Bj-GFP9.....	70
二 Results and discussion	73
1 Characterization of GFP genes from three <i>Branchiostoma</i> species.....	73
2 Evolution of GFP genes in Cephalochordates	75
3 Diversity of amphioxus GFP gene expression pattern.....	81
4 Different fluorescent spectra of GFP proteins in <i>B. japonicum</i>	85
三 Conclusions	87
Summary and prospects	88
References.....	90
Supplementary materials.....	102
Publications in PhD studing period.....	122
Acknowledgements.....	123

IFN 诱导的 GTP 酶基因的起源与进化及其在文昌鱼中的功能分析

中文摘要

脊椎动物干扰素(interferon, 缩写为 IFN)分子可分为 3 种类型: I 型 (IFN- α/β 和其它一些分子)、II 型 (IFN- γ) 和 III 型 (IFN- λ), 它们在病毒和其它病原微生物免疫过程中具有非常重要的功能。研究发现, IFN 可通过 Jak-STAT (Janus tyrosine kinases-Signal Transducers and Activators of Transcription) 信号通路对大约 1500 个基因进行诱导。这些被诱导的分子相互协作, 共同组成脊椎动物对抗病毒和其它病原微生物的复杂而有效的网络结构。然而, 在这个网络中只有为数不多的几个成员得到了很好的研究。在剩下的功能研究不太深入的分子中至少包括 4 种不同的 GTP 酶, 它们分别是 *MX* (myxovirus resistant protein) 蛋白家族、*GBP* (guanylate-binding protein) 蛋白家族、*IRG* (immunity-related GTPase) 蛋白家族和 *VLIG* (very large inducible GTPases) 蛋白家族。

尽管先前人们对这四种蛋白做了不少研究, 但这些数据主要来自于人和小鼠, 而对于它们在其他脊椎动物情况以及它们的进化起源问题都缺乏了解。通过对 18 种具有代表性物种进行比较分析, 我们发现: 1) *Mx*、*GBP* 和 *IRG* 家族早在脊索动物分化之前即已经出现, 而 *VLIG* 家族只在脊椎动物中才有; 2) *IRG*、*GBP* 和 *VLIG* 家族在进化中经历了较快频率的基因得失, 甚至有些基因家族在某些物种中完全丢失, 比如 *Neoteleostei* 类硬骨鱼丢失了 *GBP* 基因, 灵长类和食肉类丢失了 *VLIG* 基因; 3) 尽管在鱼类中 *VLIG* 蛋白丢失了前 870 氨基酸序列, 这四个家族基因在脊椎动物中都高度保守地受到干扰素的调控; 4) 虽然在文昌鱼的基因组中尚未发现干扰素及其受体基因, 但文昌鱼中受干扰素诱导的 GTP 酶基因在诸如鳃裂、肝盲囊、肠等一些免疫相关器官中高表达, 经 PolyI:C 和病原体刺激表达量可进一步上调。基于以上结果, 我们认为 1) IFN 诱导 GTP 酶不仅在脊椎动物具有保守的免疫功能, 并且在头索动物中可能也发挥着类似的功能; 2) 头索动物可能通过另外的 (非 IFN/IFNR) 配体/受体组合来活化 Jak-STAT 信号通路, 进而达到诱导 IFN 诱导 GTP 酶基因的表达。

此外, 在本文的第四章, 我们还对文昌鱼 *GFP* 进化和功能上的多样性进行了分析和讨论。

关键词: IFN、GTP 酶、免疫、脊椎动物、文昌鱼、进化、GFP

Evolution and origin of IFN-inducible GTPase genes and functional analysis of amphioxus IFN-inducible GTPase genes

Abstract

Vertebrate interferon (IFN) proteins, mainly comprising type I (IFN- α/β and some others), type-II (IFN- γ) and type III (IFN- λ s) interferons, play an essential role in defense against viral and microbial invasions by activating the expression of about 1500 genes through the JAK-STAT pathway. Among these IFN-inducible proteins, only a fraction have been extensively studied. The remainders, whose functions have not been well characterized, include at least four GTPase protein families: the myxovirus resistant proteins (Mx), the guanylate binding proteins (GBPs), the immunity-related GTPase (IRG) proteins and the very large inducible GTPases (VLIGs).

Although these four GTPase protein families have been well studied in mice and humans, they remain poorly characterized in other vertebrate species; furthermore, their evolutionary origins are still largely obscure. In this study, we performed comparative genomic analysis of the four families in eighteen representative animals which yielded several unexpected results. Firstly, we found that Mx, GBP and IRG protein families arose before the divergence of chordate subphyla, but VLIG emerged solely in vertebrates. Secondly, *IRG*, *GBP* and *VLIG* families have experienced a high rate of gene gain and loss during the evolution, with the *GBP* family being lost entirely in *Neoteleostei* and *VLIG* family lost in primates and carnivores. Thirdly, the regulation of these genes by IFNs is highly conserved throughout vertebrates although the VLIG protein sequences in fish have lost the first 870 amino acid residues. Finally, amphioxus IFN-inducible GTPase genes are all highly expressed in immune-related organs such as gill, liver and intestine, and are up-regulated after challenge with PolyI:C and pathogens, although no IFNs or their receptors (IFNRs) were detected in the current amphioxus genome database. These results suggest that 1) IFN-inducible GTPase genes play conserved immune functions not only in vertebrates but also in cephalochordates; 2) Cephalochordate may activate Jak-STAT and further IFN-inducible GTPase genes through other ligand/receptor complex but IFN/IFNR.

In addition, we analysed and discussed the evolutionary and functional diversity of *GFP* genes in amphioxus in the Chapter 4.

Key words: IFN-inducible GTPase genes; immune function; vertebrates; amphioxus; evolution; GFP

第一章 文献综述

一. 干扰素研究概况

IFN 属于分泌型蛋白, 其前体由 185 到 190 个氨基酸组成, 最初的 23 到 30 个氨基酸为信号肽, 具有分泌功能。IFN 是细胞因子(cytokine)大家族的一员, 其第一次发现并命名是在 53 年前。当时, Isaacs 和 Lindenmann 发现, 鸡卵细胞在受到热失活的流感病毒处理后能分泌出一种抗病毒的物质, 他们将该物质命名干扰素(Isaacs and Lindenmann, 1957)。随后的研究发现, IFN 在脊椎动物病毒防御、细胞生长调控和免疫反应激活过程中发挥重要功能(Goodbourn et al., 2000)。

1. *IFN* 基因在脊椎动物中的进化

尽管人们很早就已经在实验中发现了 IFN 的存在(Isaacs and Lindenmann, 1957), 但对于 *IFN* 基因的成功克隆却进展的非常缓慢。直到 1980 年, Taniguchi 等才成功克隆到人的 *IFN- α* 和 *IFN- β* (Taniguchi et al., 1980a; Taniguchi et al., 1980b)。14 年后(1994 年), Sekellick 等才从 IFN 的最初发现物种鸡中克隆到鸡的 *IFN* 基因(Sekellick et al., 1994a)。同样, 人们早在 1965 年就发现在硬骨鱼中也存在类似 IFN 的抗病毒活性物质(Gravell and Malsberger, 1965), 但直到 2003 年, 人们才从斑马鱼、大马哈鱼和河豚鱼中克隆到 *IFN* 基因(Altmann et al., 2003; Lutfalla et al., 2003; Robertsen et al., 2003)。IFN 在不同物种中的同源性较低是克隆其基因序列的进展缓慢的重要原因。

随着研究的进一步深入, 越来越多的 *IFN* 基因被从脊椎动物的各个类群中克隆出来。根据序列同源性、在染色体上的分布以及表达上的特性, 人们将哺乳动物的 *IFN* 分为三种类型: I 型、II 型和 III 型(Lutfalla et al., 2003)。I 型 IFN 为多基因家族, 又包括至少 8 个亚种类: *IFN- α* 、*IFN- β* 、*IFN- δ* 、*IFN- ϵ* 、*IFN- κ* 、*IFN- τ* 、*IFN- ω* 和 *IFN- ζ* (又叫 limitin)(Pestka et al., 2004b)。I 型 IFN 都由单个外显子基因编码, 其受体均为由 *IFN- α* 受体 1(IFNAR1)和 *IFN- α* 受体 2(IFNAR2)组成的异源二聚体。人的 20 多 I 型 *IFN* 基因串连分布在 9 号染色体上, 其中 *IFN- β* , *IFN- ϵ* , *IFN- κ* 和 *IFN- ω* 以单个基因形式出现, 而 *IFN- α* 由 13 个功能基因和几个假基因组成。其他哺乳动物 I 型 IFN 与人的类似, 在染色体上也成簇分布。不同哺乳动物的 *IFN- α* 基因在系统树上各自成簇, 说明其在物种分化后发生了不同程度的倍增或重组(gene conversion)(Woelk et al., 2007)。鸡有两种不同的 I 型 IFN 分子, 一种包括 10 个不同成员, 另一种以单基因形式存在(Sekellick et al., 1994b; Sick et al., 1996; Lowenthal et

al., 2001), 但它们都由一个外显子编码。鸡的 I 型 IFN 分子在树图上也自成一簇, 因此它们不属于以上任何哺乳动物类 I 型 IFN 分子。硬骨鱼比较不同, 它们都只有一个 I 型 IFN 基因, 它序列上像 I 型 IFN、但基因结构上却像 III 型 IFN 基因(Pestka et al., 2004b)。因此, 关于它的归属, 目前还存在争议(Lutfalla et al., 2003; Zou et al., 2007)。III 型 IFN 发现较迟, 由 3 个 (*IFN- λ 1*、*IFN- λ 2* 和 *IFN- λ 3*) 串连分布在 19 号染色体上的成员组成 (Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003)。与上述鱼类的 IFN 相同, 它们都含有 5 个外显子。因此, 如果我们将鱼类的 IFN 划分为 III 型 IFN 分子, 那么鸟类和哺乳类 I 型 IFN 很可能是在羊膜类动物分化前, 由 III 型 IFN 基因的一次反转座插入而来(Lutfalla et al., 2003)。

与 I 型、III 型 IFN 不同, II 型 IFN 只有一个成员 *IFN- γ* 组成, 并且其在脊椎动物各类群中比较稳定, 没有发生基因倍增, 说明其受到的选择压力较强(Pestka et al., 2004b; Robertsen, 2006)。但与前两者相似的是, 不同物种的 *IFN- γ* 基因同源性也较低, 以致人们在很长一段时间都认为, *IFN- γ* 是四足动物特有的(Pestka et al., 2004b)。直到 2004 年, Zou 等人才基于同源性分析、3D 结构建模和基因组的同线形(syteny)比较将河豚鱼的 *IFN- γ* 给鉴定出来。来自脊椎动物不同类群生物的 *IFN- γ* 都有 4 个外显子和 3 个内含子构成。

2. *IFNR* 基因在脊椎动物中的进化

IFN 是一种配体分子, 其只有在结合到相应的受体上时才能行使其生物学功能。不同的 IFN 结合不同的配体组合, I 型分子的受体为 IFNAR1 和 IFNAR2 (Samuel, 2001; Pestka et al., 2004a; Pestka et al., 2004b), II 型 IFN- γ 的受体为 IFNGR1 和 IFNGR2(Samuel, 2001; Pestka et al., 2004a; Pestka et al., 2004b), 而 III 型的受体则是 IFNLR1 和 IL-10R2 组合(Kotenko et al., 2003)。系统分析发现, 它们当中只有 IFNGR1 存在于脊椎动物各类群中, 而 IFNAR1、IFNAR2 和 IL-10R2 直系同源基因只发现于陆生四足动物、IFNGR2 直系同源基因则只能在哺乳动物中找到(Stein et al., 2007; Gao et al., 2009)。关于 III 型 IFN 受体 IFN- λ R1 的进化文献中没见报道, 但 ENSEMBL 数据库中 (<http://www.ensembl.org/index.html>) *IFNLR1* 基因树图显示 (ID: ENSG00000185436), *IFNLR1* 基因的起源可追述到羊膜动物分化之前。值得提出的是, *IFNAR1*、*IFNGR2* 和 *IL-10R2* 在哺乳动物的染色体上紧密连锁, 且相互的同源性较高。借助连锁分析, Stein 等在斑马鱼和两种河豚鱼中找到了与上述三个基因位

置对等且序列极为相似的四个基因：*CRFB3-CRFB6*，从而暗示了这些基因起源于一个共同的祖先(Stein et al., 2007)。利用同样的分析方法，他们还证明了四足动物 *IFNAR2* 与硬骨鱼 *CRFB1* 和 *CRFB2* 的对等关系。

脊索动物包括三大类群：头索动物、尾索动物和脊椎动物。因此，头索动物和尾索动物是目前与脊椎动物进化关系上最接近的类群(Delsuc et al., 2006a; Putnam et al., 2008a)。为追述脊椎动物干扰素及其受体分子的起源，黄盛丰和 Azumi 等分别对头索动物和尾索动物的代表物种(文昌鱼和海鞘)的基因组进行分析，但在两个物种中都未能找到干扰素及其编码它们受体的基因(Azumi et al., 2003; Huang et al., 2008b)。Hibino 等对棘皮动物海胆的基因组分析也得到了相同的结果(Hibino et al., 2006)。因此，一般认为 IFN 基因如同获得性免疫系统一样，是脊椎动物所特有的。当然我们也不能排除，目前基于同源性搜索的工具可能会因为不够灵敏，而不能检索出进化速度如此之快的免疫分子。

3. *IFN* 基因表达的激活

脊椎动物对病原微生物的防御主要由先天性免疫系统和获得性免疫系统组成。I 型 IFN 主要在物种的先天性免疫中被激活，而 IFN- γ 则在两种系统中都可被激活。I 型 IFN 可通过 Toll-like 受体(TLR)或 RIG-I-like 受体(RLR)介导的信号通路激活(图 1 和图 2)。这两个受体系统在病原体(或由病原体产生的分子)识别上存在一定分工。TLR3、TLR7 和 TLR9 铆钉在内涵体(endosome)膜上，识别由病毒释放或合成的 ssRNA、dsRNA、dsDNA 分子；TLR4 为细胞膜受体，识别由细菌、假丝酵母等释放 LPS、甘露聚糖(mannan)等(Kumar et al., 2009)；RLR 分布于细胞质中，也可识别 dsRNA 病毒(Garcia-Sastre and Biron, 2006)。这些受体分子的下游作用元件也存在差异。如 TLR3 通过 TRIF (Toll/IL-1R 接头蛋白)、TRAF、TBK1/IKK1 等分子活化 IFN 调节因子(IRF)3 和 IRF7，促使后两者从胞质中转移到核内，并结合到 I 型 IFN 的启动子上，从而激活 I 型 IFN 的转录(Kumar et al., 2009)；TLR7 和 TLR9 通过 MyD88、TRAF3 和 IRAK4, 1 等激活 IRF3 和 IRF7 的核转移，从而开启 I 型 IFN 的转录(Kumar et al., 2009)；而 RLR 与 dsRNA 结合后，首先激活 MAVS、IPS-1、VISA 和 CARDIF，再激活 IKK- ϵ 和 TBK1，进而再激活 NF- κ B、AP1 和 IRF3，从而达到激活 I 型 IFN 转录的目的(Garcia-Sastre and Biron, 2006)。

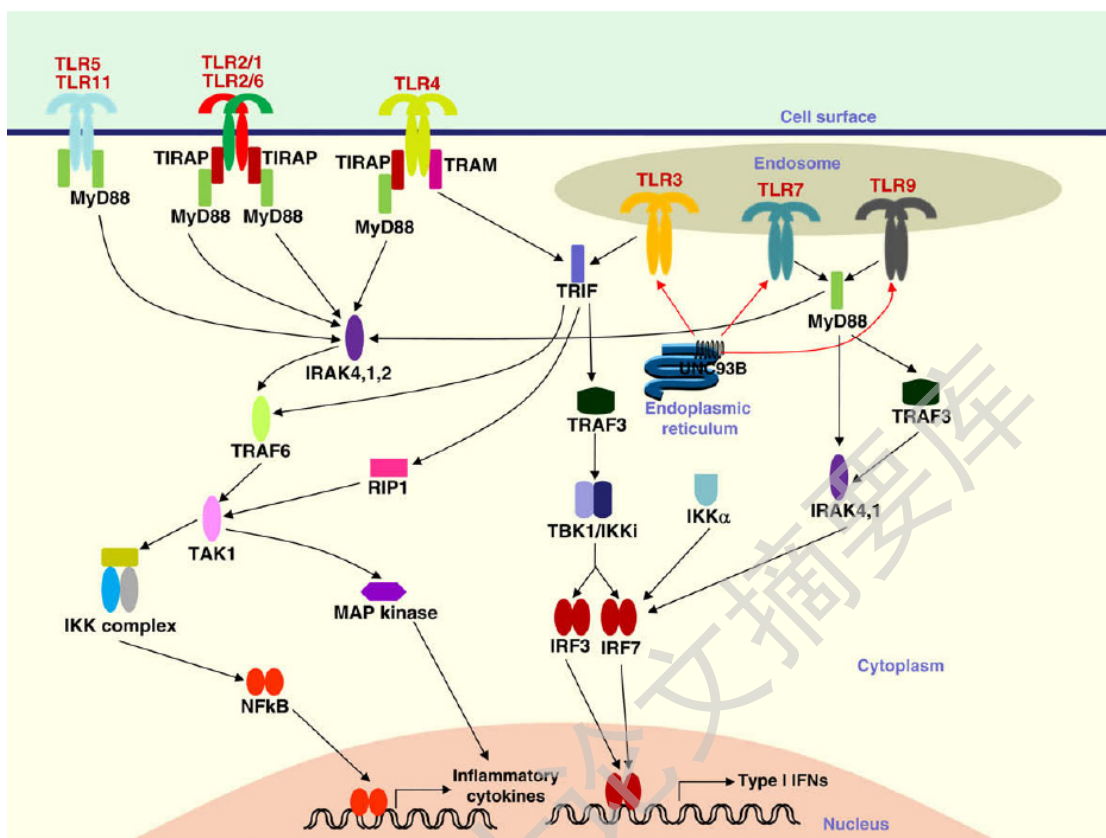


图 1-1 TLR 介导的 I 型 IFN 激活信号通路(Kumar *et al.* , 2009)

Fig. 1-1 Activation of Type I IFNs through TLR signaling pathway (Kumar *et al.* , 2009)

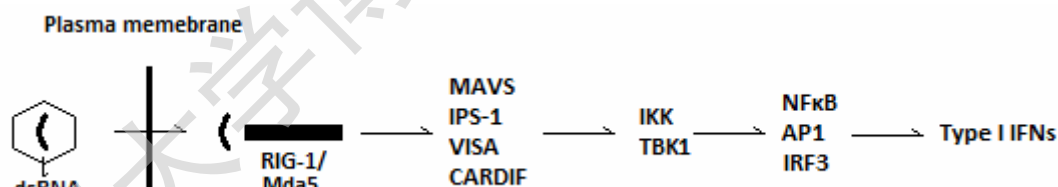


图 1-2 RLR 介导的 I 型 IFN 激活信号通路(修改于 Garcia-Sastre *et al.* , 2006)

Fig. 1-2 Activation of Type I IFNs through RLR signaling pathway (according to Garcia-Sastre *et al.* , 2006)

IFN- γ 引导的免疫反应较 I 型 IFN 来的迟，建立在早期先天性免疫的基础之上。有机体在经过先天性免疫之后，树突状细胞(dendritic cells)会产生大量的炎症因子，从而刺激自然杀伤淋巴细胞(natural killer lymphocyte, 缩写为 NKL)和效应 T 细胞合成并分泌 IFN- γ (Trinchieri and Sher, 2007)。另外，在有机体受到病原微生物攻击后的 5 到 7 天后，获得性免疫反应已基本上被激活。树突状细胞细胞表面的 MHC(Major histocompatibility complex) I 类分子，会将来自病原微生物的多肽递呈到 T-helper

细胞表面，由 T 细胞受体(TCR)识别，从而激活其合成并分泌 IFN- γ (Trinchieri and Sher, 2007)。

4. Jak-STAT 信号通路

I 型 IFN 在合成并分泌后，随着血液被运输到机体的每个角落，在那里它们以单体形式(Ortaldo et al., 1983)结合在存在于任何细胞表面的由 IRNAR1-IRNAR2 形成的二聚体上(Samuel, 2001; Pestka et al., 2004a; Pestka et al., 2004b)。这一结合诱导了 IRNAR2 结合 STAT2 (Signal Transducers and Activators of Transcription)并进而结合 STAT1 的能力。活化后的 JAK1/TYK2 (Janus tyrosine kinases/tyrosine kinase2)对 STAT1/STAT2 复合体磷酸化，从而使 STAT1/STAT2 从上述复合体上脱离。游离并磷酸化的 STAT1/STAT2 与 IRF9 结合形成新的复合体 ISGF3(IFN-stimulated transcription factor)。ISGF3 转移到核内，并结合到 ISRE (interferon (IFN)-stimulated response element)核酸元件上，从而开启受 I 型 IFN 诱导的基因的表达(Darnell et al., 1994)(图 1-3)。III 型干扰素使用于上述相同的信号通路调控下游基因的表达。IFN- γ 主要由激活的 T 淋巴细胞表达，经血液运输分布机体全身后，以二聚体的形式结合到表达于各种细胞表面的由两个 IFNGR1-IFNGR2 组成的四聚复合体上。这一结合诱导 JAK1 和 JAK2 的相互磷酸化，从而也活化了这两个激酶。活化后的 JAK1/TYK2 磷酸化 IFNGR1，使后者产生了捕获 STAT1 的能力。JAK1/JAK2 进而对捕获的 STAT1 磷酸化，从而使 STAT1 从上述复合体上脱离(Krause et al., 2002)。如此反复，两个游离并磷酸化的 STAT1 形成二聚体 GAF (gamma-interferon activation factor)。GAF 转移到核内，并结合到 GAS (gamma-interferon activation site)核酸元件上，从而开启受 IFN- γ 诱导的基因的表达(图 1-3)。据估计，单单受 IFN- γ 调控的基因就有上千个(Boehm et al., 1997; Ehrt et al., 2001)，因此可见 IFN- γ 在机体免疫中的有效性和重要性。

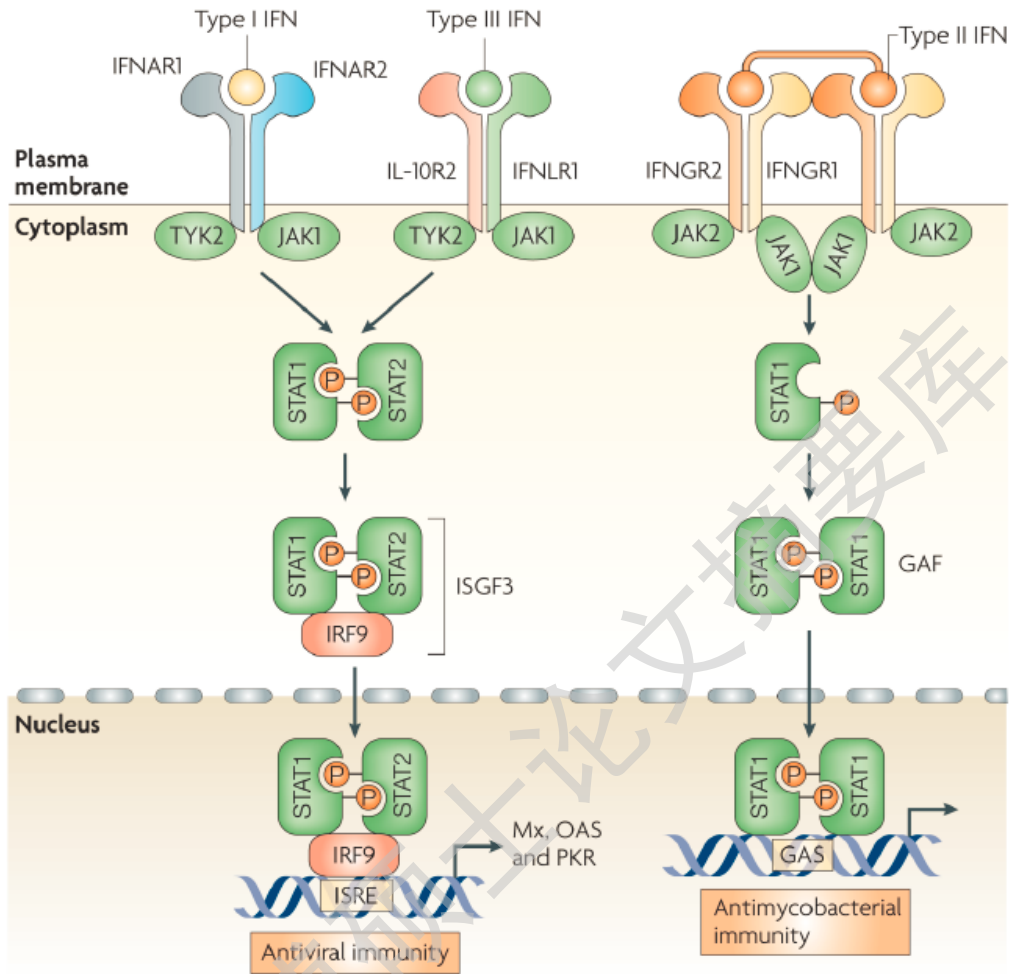


图 1-3 Jak-STAT 信号通路(Sadler and Williams, 2008a)

Fig. 1-3 Jak-STAT signaling pathway (Sadler and Williams, 2008a)

二. 干扰素诱导 GTP 酶 (GTPase) 的研究进展

至今，干扰素已经发现 50 多年了(Isaacs and Lindenmann, 1957)。在这 50 多年对它们的研究中，人们越来越发现它们在先天性免疫中和在抵抗病毒第一道防线中所扮演的重要角色。因此，也就不难理解干扰素是最早进入临床用于治疗多种病毒感染的药物之一(详见综述(Borden et al., 2007))。它们的重要性是通过它们所调控的上千个下游基因来体现的。I 型 IFN 可诱导 300 多个基因的表达(Der et al., 1998)，而受 IFN- γ 调控的基因有超过 1300 个(Boehm et al., 1997; Boehm et al., 1998; Ehrt et al., 2001; Gil et al., 2001a)。然而，在这些效应分子中只有很少一部分得到了很好的研究，这其中包括 Mx1、RNaseL (RNase L)、PKR、ISG15 (interferon-stimulated gene)、NOS2、phox、NRAMP1、PRK (RNA-dependent protein kinase)和 IDO (详见综述(MacMicking et al.,

1997; Skamene et al., 1998; Bach et al., 1999; Sadler and Williams, 2008b)。上述分子中，Mx1 属于 GTP 酶蛋白家族成员。而在那些没有得到充分研究的基因中，至少还包括另外 3 个 GTP 酶蛋白家族，它们分别为：GBP 蛋白家族、IRG 蛋白家族和 VLIG 蛋白家族(Boehm et al., 1998; Klamp et al., 2003a)。因此，目前总共有 4 个 GTP 酶基因家族受干扰素的调控，具有免疫功能。

所有的 GTP 酶蛋白都含有核酸结合区，来自不同 GTP 蛋白家族的核酸结合区(也叫 G 区)具有相似的空间结构，并且都由 5 个较为保守的小元件组成，它们依次为：G1-G5 (Leipe et al., 2002; Leipe et al., 2003)。5 个元件中，G1(GXGKS)、G3(DXXG)和 G4[N(T/Q)KXD]在不同蛋白家族中较为保守。

1. *MX* 基因家族的研究背景

1963年，Lindenmann及其同事发现，A2G品系小鼠具有抗流感病毒的特性(Lindenmann et al., 1963)，并且发现这一特性是由染色体上一个被命名为*Mx*的位点决定的(Lindenmann, 1964)。20多年后，Staeheli 等从小鼠中成功克隆*Mx1*基因，并用互补试验的方法进一步验证了*Mx1*在抵抗流感病毒中的作用(Staeheli et al., 1986)。MX 蛋白的分子量一般在70-80kDa，由3个结构域组成：N端的G区域、C端的GTP酶活性区(GED)及中间连接区 (CID)。其中GED含有一个MX特有的亮氨酸拉链和一个卷曲螺旋区(coiled coil domain)，它们在Mx与其它蛋白相互作用中起很重要的作用(Melen et al., 1992b)。CID和亮氨酸拉链区是识别病毒所必需的。MX属于Dynamin蛋白超家族，其核酸结合区内包含Dynamin蛋白家族特有的dynamin区域。这个区域在MX自我组装形成二聚体或多聚体过程中是必需的。另外，与MX一样，Dynamin也具有CID和GED区；与MX不同的是，Dynamin在N端没有额外的延伸(Martens and Howard, 2006b)。

人和小鼠 *MX* 基因只受 I 型 IFN (IFN- α/β 和 IFN- λ) 调控(Haller and Kochs, 2002b; Kotenko et al., 2003)，于此相符，人们在两者 *Mx* 基因的启动子区内都只发现了 I 型 IFN 所特异结合的 IERS 元件(Hug et al., 1988; Chang et al., 1991; Ronni et al., 1998b; Asano et al., 2003)。与哺乳类相似，鸡(Schumacher et al., 1994; Bernasconi et al., 1995)、斑马鱼(Altmann et al., 2004)、河豚鱼(Yap et al., 2003)和红鲱鱼(Collet and Secombes, 2001)的 *MX* 基因的启动子也只含有 ISRE 元件，因此也只受 I 型干扰素调控。不同的是，哺乳类和鱼类 *MX* 启动子具有 2-3 个 ISRE 元件，而鸡的只有一个。

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