

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.14.011

## 嗜吞噬无形体 Msp2 蛋白与宿主互作靶蛋白筛选及生物信息分析\*

郑 炜<sup>1</sup> 马忠臣<sup>1</sup> 张 辉<sup>1</sup> 张丽娟<sup>2</sup> 陈创夫<sup>1</sup> 王 勇<sup>1Δ</sup>

(1 石河子大学动物科技学院 新疆 石河子 832003; 2 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 北京 102206)

**摘要** 目的:筛选与嗜吞噬无形体 Msp2 蛋白互作的 THP-1 细胞靶蛋白,有助于理解病原体侵袭宿主的分子机理。方法:PCR 获得无形体 msp2 基因克隆到 pGBKT7 载体上构建诱饵质粒并转化酵母菌株 Y2HGOLD,营养缺陷培养基及蓝白斑实验验证诱饵质粒是否有自激活、毒性;抽提 THP-1 总 RNA,经反转录、Long-distance PCR、同源重组等构建到 pGADT7-Rec 载体上并转化酵母菌株 Y187,鉴定 cDNA 文库质量;酵母双杂交筛选与无形体 Msp2 互作的宿主细胞靶蛋白,生物信息学分析蛋白互作可能导致的信号通路变化。**结果**:成功构建诱饵质粒;cDNA 文库容量达  $4 \times 10^6$  克隆,插入片段大小 100-3000 bp,且无污染;酵母双杂交获得宿主靶蛋白 7 个,分别是 NADH 脱氢酶(泛醌)1 $\alpha$  亚体 13(NDUFA13)、锌指蛋白 36, C3H 样 2(ZFP36L2)、核糖体蛋白 11(RPL11)、前胸腺素  $\alpha$ (PTMA)、C19orf10、组织蛋白酶 G(CTSG)、核糖体蛋白 S25(RPS25);生物信息学分析,互作的宿主靶蛋白主要参与细胞增殖、细胞凋亡、溶酶体成熟及其它一些信号通路等生物学过程。**结论**:应用酵母双杂交系统初步筛选出与嗜吞噬细胞无形体表面蛋白 Msp2 互作的宿主细胞靶蛋白,并利用生物信息学初步分析了其参与的生物学过程,为进一步研究病原菌胞内生存分子机制奠定了基础。

**关键词**:嗜吞噬无形体;Msp2;酵母双杂交;THP-1;生物信息分析

**中图分类号**:R33 **文献标识码**:A **文章编号**:1673-6273(2019)14-2657-05

## Screening and Bioinformatic Analysis of THP-1 Target Protein(s) Interacted with Msp2 of *Anaplasma phagocytophilum*\*

ZHENG Wei<sup>1</sup>, MA Zhong-chen<sup>1</sup>, ZHANG Hui<sup>1</sup>, ZHANG Li-juan<sup>2</sup>, CHEN Chuang-fu<sup>1</sup>, WANG Yong<sup>1Δ</sup>

(1 College of Animal Science &amp; Technology, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang, 832003, China; 2 National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing, 102206, China)

**ABSTRACT Objective**: To screen target proteins from THP-1 interaction with Msp2 protein from *Anaplasma phagocytophilum*, and contribute to understanding pathogenic molecular mechanism. **Methods**: Bait msp2 cloned into vector pGBKT7 was transformed into yeast Y2HGOLD, and tested bait for autoactivation and toxicity. Generating cDNA library with SMARTTM technology were constructed into vector pGADT7-Rec by homologous recombination, which was transformed into yeast Y187, and assessed the library. To screen targets from THP-1 interaction with *Anaplasma phagocytophilum* protein Msp2 by yeast two-hybrid system (YTH). Biology processes of THP-1 targets were analysed by bioinformatics. **Results**: Bait were successfully constructed, content of cDNA library were  $4 \times 10^6$  clones, inserts size of the library were 100-3000bp. Seven proteins interaction with Msp2 protein included Homo sapiens NADH dehydrogenase (ubiquinone)1 alpha subcomplex 13 (NDUFA13), Homo sapiens ZFP36 ring finger protein-like 2 (ZFP36L2), Homo sapiens ribosomal protein L11 (RPL11), Homo sapiens prothymosin, alpha (PTMA), Homo sapiens chromosome 19 open reading frame 10 (C19orf10), Homo sapiens cathepsin G (CTSG), Homo sapiens ribosomal protein S25 (RPS25). According to bioinformatic analysis, the targets interaction with Msp2 participated in biological processes including cell proliferation, apoptosis, lysosomes mature, and some signal pathways etc. **Conclusions**: Some host proteins which may interact with *A. phagocytophilum* Msp2 have been screened out by YTH, the screened proteins may participate in biological processes by bioinformatics. These results provides important basis for further investigating intracellular pathogen survival mechanism.

**Key words**: *Anaplasma phagocytophilum*; Msp2; Yeast two-hybrid; THP-1; Bioinformatic analysis

**Chinese Library Classification(CLC)**: R33 **Document code**: A

**Article ID**: 1673-6273(2019)14-2657-05

### 前言

人粒细胞无形体病(HGA)是由嗜吞噬细胞无形体(*A. phagocytophilum*)感染引起的一种蜱传人兽共患病<sup>[1]</sup>。嗜吞噬细

\* 基金项目:石河子大学科研项目(Nos. 2014ZRKXYQ02, RCZX201402, CZ0203);

国家重点基础研究发展项目(973 计划)(2010CB530200(2010CB530206))

作者简介:郑炜(1989-),硕士研究生,主要研究方向:免疫遗传与抗病机理,E-mail: ZHENGWEI890801@shzu.edu.cn

Δ 通讯作者:王勇(1981-),主要研究方向:免疫遗传与抗病机理,E-mail: yongwang@shzu.edu.cn,电话:0993-2057971

(收稿日期:2018-12-22 接受日期:2019-01-17)

胞无形体进化出多种适应宿主细胞环境的机制,如在白细胞(如粒细胞、单核细胞)中形成包涵体、下调氧化反应和/或炎症反应、扰乱破坏宿主细胞凋亡和/或自噬,从而有利于胞内存存<sup>[23]</sup>。嗜吞噬细胞无形体感染常导致宿主细胞多种生物过程发生改变如细胞分化与增殖、免疫应答、溶酶体融合、信号转导等<sup>[45]</sup>,然而,嗜吞噬细胞无形体侵染宿主细胞的分子致病机制仍待深入研究。

研究报告,嗜吞噬细胞无形体 Msp2 蛋白作为病原毒力因子,在调控病原入侵、胞内存增殖以及宿主细胞生物过程等方面起重要作用<sup>[6,9]</sup>。嗜吞噬细胞无形体表面蛋白 Msp2(也称 P44)具有许多同系物,可以通过基因转换机制进行基因重组,进而发生遗传信息转换,导致 Msp2 抗原变异<sup>[3,6,10]</sup>。Msp2 可以作为一种粘附素促使嗜吞噬细胞无形体黏附到宿主细胞表面<sup>[11]</sup>。另外,不同嗜吞噬细胞无形体分离株的 Msp2 结构也存在差异,这可能跟病原适应不同宿主细胞恶劣环境有关<sup>[12,13]</sup>。

为了解中国人源嗜吞噬细胞无形体分离株分子致病机理,本研究利用酵母双杂交技术鉴定出与 Msp2 蛋白互作的宿主细胞靶蛋白,并分析了这些宿主细胞靶蛋白在病原感染过程中可能发挥的调控作用,为深入了解嗜吞噬细胞无形体致病机理奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

2009年-2010年间于中国山东莱州湾地区无形体病人分离到的2株人源致病菌(LZ-HGA-agent-3 and LZ-HGA-agent-4),以及从长角血蜱(*H. longicornis*)分离到的1株蜱源无形体分离株(LZ-HGA-agent-T1),3株中国无形体分离株通过HL60细胞培养并由本室保藏<sup>[14,15]</sup>。

### 1.2 引物设计与合成

根据NCBI网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上公布的嗜吞噬细胞无形体 webster 株 mps2 基因(AI164491)序列,使用Primer Premier 5.0软件设计一对特异性引物,上游引物加上Nde I、下游引物加BamH I位点,引物合成交由北京擎科新业生物技术有限公司完成。

### 1.3 目的基因 PCR 扩增、测序及分析

使用DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN)试剂盒提取3株中国嗜吞噬细胞无形体分离株基因组DNA(gDNA)做模板,操作步骤按照DNeasy Blood & Tissue Handbook (QIAGEN)说明进行。使用上游引物 msp2-F:CATATGGCTGAAGTGAG-GAGACGAAGA(下划线序列为Nde I位点),下游引物 msp2-R:GGATCCAATAGGAACGGTCACGGAGT(下划线序列为BamH I位点)PCR扩增 msp2 基因序列,产物预期大小约1492 bp; msp2 基因分子克隆过程参考文献<sup>[14]</sup>,最后将阳性重组质粒 pEASY-msp2 送北京擎科新业生物技术有限公司测序。将测序的 msp2 基因序列输入到NCBI网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的nucleotide blast模块中进行比对分析。采用DNASTAR Lasergene v7.1.0软件中的EditSeq程序编辑 msp2 核酸及其氨基酸序列、利用MegAlign对 msp2 核酸及氨基酸序列与嗜吞噬细胞无形体 webster 株 mps2 基因(AI164491)序列进行比对分析。基因 msp2 的GenBank登录号、在线软件和/

或程序对 Msp2 蛋白结构进行分析,具体信息参考文献<sup>[14]</sup>。

### 1.4 诱饵载体构建及其自激活、毒性检测

空载体 pGBKT7 DNA-BD、重组质粒 pEASY-msp2 经过Nde I /BamH I (NEB)双酶切后,回收的pGBKT7大片段、msp2 进行连接并转化大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞,最后涂布LB/Kan+平板,37℃倒置过夜培养。经PCR、酶切及测序分析鉴定阳性重组质粒 pGBKT7-msp2 转化酵母菌 Y2HGold 感受态细胞,步骤参考Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2(Clontech)说明书。酵母转化子涂布于SD/-Trp/Kan+平板培养后经PCR及测序方鉴定阳性重组质粒。酿酒酵母转化子Y2HGold(pGBKT7-msp2)涂布SD/-Trp、SD/-Trp/X-α-Gal平板30℃培养4-5天,观察菌落生长及颜色等判断是否有自激活作用;从SD/-Trp平板上挑选最大菌落接种到SD/-Trp/Kan+液体培养基,30℃,250转/分钟,震荡培养(16-24小时),测量菌液OD值,进行毒性检测。以Y2HGold(pGBKT7 DNA-BD)为试验对照。

### 1.5 人单核细胞白血病细胞(THP-1)cDNA文库的构建及分析

用RNeasy Mini Kit(QIAGEN)抽提THP-1细胞总RNA,测定总RNA纯度及浓度。利用Clontech公司Make Your Own "Mate & Plate" Library System进行cDNA合成及纯化。根据Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2说明书进行pGADT7-Rec和cDNA共转化酵母菌株Y187,酵母转化液涂布SD/-Leu平板;同时转化pGADT7-Rec、pGADT7-Rec+SV40 large T至Y187做为阴、阳性对照,对照转化酵母菌涂布SD/-Leu平板;所有转化酵母菌于30℃培养3-5天。收集SD/-Leu平板上Y187酵母转化子,-70℃冻存cDNA文库。取适量Y187(pGADT7-cDNA)冻存液涂布SD/-Leu平板培养并观察是否有杂菌生长。Y187(pGADT7-cDNA)冻存液按10<sup>-2</sup>,10<sup>-3</sup>,10<sup>-4</sup>比例稀释后分别涂布于SD/-Leu平板培养并计算SD/-Leu板上菌落数及库容量。提取Y187(pGADT7-cDNA)冻存液酵母质粒pGADT7-cDNA并转化Trans1 T1感受态细胞,并进行菌液PCR扩增、电泳分析,评估cDNA文库插入片段长度。

### 1.6 Msp2 蛋白与 THP-1 细胞靶蛋白互作鉴定与分析

构建好的Y2HGold(pGBKT7-msp2)与Y187(pGADT7-cDNA)文库进行酵母双杂交实验,同时分别进行Y2HGold(pGBKT7-53)与Y187(pGADT7-T)杂交、Y2HGold(pGBKT7-Lam)与Y187(pGADT7-T)杂交做阳、阴性对照实验,操作按Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System(Clontech)说明书进行。酵母菌液涂布于SD/-Leu/-Trp(DDO)、SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp(QDO)、SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal(QDO/X)营养缺陷培养基筛选阳性菌落,然后经PCR扩增、基因片段测序、生物信息学分析等确定捕获靶蛋白的生物信息。

## 2 结果

### 2.1 msp2 PCR 扩增及序列生物信息分析结果

A. *phagocytophilum* LZ-HGA-Agent msp2 基因扩增及序列分析、Msp2 蛋白质结构及表位预测信息见参考文献<sup>[14]</sup>。

### 2.2 酵母转化子 Y2HGold(pGBKT7-msp2)自激活、毒性检测

涂布Y2HGold(pGBKT7-msp2)的SD/-Trp、SD/-Trp/X-α-Gal

营养缺陷型培养基平板上均长出酵母菌落且菌落直径大于 2 mm,而 SD/-Trp/X- $\alpha$ -Gal 营养缺陷型培养基平板上的酵母菌落未变蓝。这说明酵母转化子 Y2HGold(pGBKT7-msp2)无自激活现象。

培养 24 小时后的酵母转化子 Y2HGold(pGBKT7-msp2)菌液的 OD 值均大于 1.0(判断标准 OD > 0.8 为无毒性),酵母转化子 Y2HGold(pGBKT7-msp2)生长情况与 Y2HGold(pGBKT7 DNA-BD 空载体)基本一致。这说明酵母转化子 Y2HGold(pGBKT7-msp2)也无毒性。

### 2.3 THP-1 cDNA 文库评价

**2.3.1 Y187(pGADT7-cDNA)文库克隆数、转化效率及污染检测** 150  $\mu$ L 菌液(稀释倍数  $10^2$ )涂布 SD/-Leu 平板,平均每个平板克隆数为 400,则 15 mL 重悬液克隆数(库容量)=( $400 \div 0.15$ ) $\times 100 \times 15=4 \times 10^6$  克隆,达到建库要求。转化效率 = ( $400 \times 15$ ) $\div (0.15 \times 3.94) \times 100=1.02 \times 10^6$  cfu/ $\mu$ g。涂布 Y187(pGADT7-cDNA)冻存液的 SD/-Leu 平板上没有出现污染物,

说明文库未被杂菌污染。

**2.3.2 cDNA 文库插入片段评价** 共挑取 51 个单菌 PCR 扩增证实 cDNA 文库插入片段在 100-3000 bp 之间,片段集中于 500-2000 bp 间,由菌落 PCR 推算得知重组率为 95.6%。(见图 1)

### 2.4 酵母双杂交实验及分析

Y2HGold(pGBKT7-msp2)与 Y187(pGADT7-cDNA)进行酵母双杂交后涂布于 QDO 营养缺陷培养基平板上,经培养平板上长出酵母单菌落。将这些单菌落转移至 QDO/X 营养缺陷培养基平板上,部分酵母菌落变蓝。(见图 2)。

### 2.5 Msp2 蛋白与 THP-1 细胞互作蛋白鉴定与分析

与 Msp2 蛋白互作的捕获蛋白基因 PCR 产物序列测序分析,捕获蛋白基因序列输入到 Nucleotide BLAST 中 Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行比对分析,EBI Search(<http://www.ebi.ac.uk/ebisearch/overview.ebi/about>)进行蛋白分析等,综合分析结果最终获得 7 个阳性捕获靶蛋白。(见表 1)。

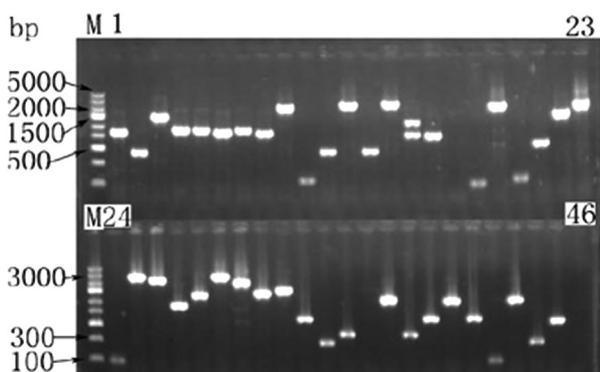


图 1 PCR 鉴定 cDNA 文库插入片段大小

Fig.1 PCR analysis of cDNA inserts size

M: DNA Marker 5000; 1-45: cDNA inserts; 46: Negative control

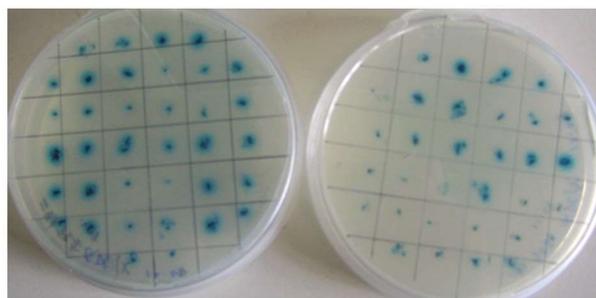


图 2 Y2HGold(pGBKT7-msp2)与 Y187(pGADT7-cDNA)杂交结果

Fig.2 The result of mating Y2HGold(pGBKT7-msp2) with Y187(pGADT7-cDNA) mating

表 1 THP-1 细胞捕获靶蛋白及其生物信息分析

Table 1 Bioinformatic analysis of THP-1 target proteins interaction with Msp2 protein

靶蛋白名称	亚细胞定位分析		GO 分析	
		分子功能	细胞组分	生物学过程
NADH 脱氢酶(泛醌)1 $\alpha$ 亚基 13(NDUFA13)	线粒体内膜	NADH 脱氢酶(泛醌)活性; ATP 结合性	线粒体膜;胞质;细胞核等	细胞凋亡;呼吸链;电子传递;细胞生长调控;活性氧簇代谢等
锌指蛋白 36, C3H 样 2 (ZFP36L2)	胞质、细胞核	DNA/RNA 结合;金属离子结合;转录因子	胞质;胞液;细胞核等	细胞增殖调控;胞内应答;造血作用;mRNA 稳态调控等
核糖体蛋白 L11 (RPL11)	胞质、细胞核	RNA/rRNA 结合;核糖体组分	胞质;胞浆;核糖体大亚基等	蛋白质定位 / 靶向 / 降解作用;核糖体亚基生物合成;翻译作用等
前胸腺素 $\alpha$ (PTMA)	细胞核	激活转录因子结合作用;组蛋白结合	胞液;核质;细胞核等	组蛋白改变;转录过程
骨髓源生长因子 (C19orf10)	分泌、内质网 - 高尔基体中间体	-	内质网 - 高尔基体中间体;内质网腔;胞外分泌体等	血管再生;细胞凋亡及一些信号通路调控等
组织蛋白酶 G(CTSG)	细胞表面	肝素结合;肽酶活性;肽链内切酶活性	细胞表面;胞质应激颗粒;胞外分泌体等	血管紧张素成熟;抗菌体液反应;免疫应答;蛋白加工修饰;中性粒细胞脱粒等
核糖体蛋白 S25(RPS25)	胞质、细胞核	RNA 结合	胞液;小核糖体亚单位;核质;核仁;细胞核等	mRNA 分解过程;rRNA 加工过程;翻译过程等

### 3 讨论

人粒细胞无形体病(HGA)的临床和实验室表现有发烧、头痛和肌肉有疼痛感、白血球和血小板数量下降、血清氨基转移酶活力上升等<sup>[1]</sup>,常使用强力霉素治疗该病。在欧洲、美洲、亚洲等国家和地区,HGA 病例、细菌血清或核酸检测阳性数量一直在增加,且存在一定的死亡率<sup>[6]</sup>。美国中西部地区 HGA 病例死亡率约 0.7%,该病死亡率升高与患者的高龄、免疫力低、延迟治疗有关<sup>[17]</sup>,在中国,该病是新发传染病,死亡率有待调查统计。2006 年我国安徽省某县首次发现了人粒细胞无形体病病例,也是首次人粒细胞无形体病院内传播感染病例<sup>[6]</sup>。同期在新疆、内蒙古和黑龙江等地的全沟硬蜱中检测到了嗜吞噬无形体核酸。张丽娟等开展的实验室回顾性调查,发现山东省沂源地区人群中,嗜吞噬无形体 IgG 抗体阳性率高达 26.7%<sup>[18]</sup>,对天津市 8 区县的农民、牧民和兽医等人群进行血清流行病学调查,结果显示该地区无形体血清抗体阳性率为 8.8%<sup>[19]</sup>。通过对媒介蜱及宿主动物的监测,发现媒介蜱和啮齿动物携带无形体病原的现象在我国很多地区已经相当普遍<sup>[20]</sup>。

嗜吞噬细胞无形体(*A. phagocytophilum*, APH)通过扰乱破坏人或动物机体免疫防御细胞(如人粒细胞和单核细胞)可能导致人类疾病发生<sup>[2]</sup>。尽管宿主免疫细胞可通过多种机制如活性氧产生、抗菌肽和酶的分泌等机制作用并清除病原菌<sup>[21,22]</sup>,但 APH 依然能在这些细胞中生存繁殖,其分子致病机理仍待深入研究。因此,本研究选用中国人源 APH 分离株 LZ-HGA-Agent 毒力蛋白 Msp2 和人单核细胞 THP-1 为研究对象,利用酵母双杂交技术筛选到与 Msp2 毒力蛋白互作的 THP-1 细胞的靶蛋白,这些靶蛋白主要与宿主细胞的生长分化、细胞凋亡、溶酶体融合、核酸转录、蛋白翻译等若干生物过程有关(见表 1)。下面就部分靶蛋白功能进行分析讨论。

NADH 脱氢酶(泛醌) $1\alpha$  亚基 13(NDUFA13)是呼吸链复合物 I 结构、组装、活性以及维持线粒体膜电势必不可少的一个亚单位。NDUFA13 突变致使患者肌纤维细胞中复合物 I 活性下降约 40%,骨骼肌细胞中减少 7%~14%<sup>[23]</sup>。He 和 Cao<sup>[24]</sup>研究发现,NDUFA13 在细胞生长调控、细胞凋亡和一些信号通路中起作用。Hu<sup>[25]</sup>等研究发现,在细胞中适当降低 NDUFA13 的表达水平,细胞凋亡标志物 caspase-3 和 caspase-9 下调而凋亡标志物 caspase-8 未下调;同时还引起胞质内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 局部生成量增加,由此生成的活性氧簇(ROS)可以作第二信使,促使 STAT3 二聚体形成,最终激活胞内抗凋亡信号通路,抑制超氧化物的产生。

一些研究显示,核糖体蛋白 L11 (RPL11)受到影响,会阻碍核糖体 60S 亚基和 40S 亚基的合成,进而阻碍核糖体生物合成,诱发“核糖体胁迫(ribosomal stress)”或者“核仁胁迫(nucleolar stress)”现象。核糖体 60S 大亚基合成受阻,大量游离的 RPL11 蛋白从细胞核中释放到细胞质,而核糖体 40S 小亚基合成受阻,RPL11 蛋白表达上调或者 RPL11 蛋白编码基因的 mRNA 转录水平上调,大量游离的 RPL11 蛋白存在于细胞质中,从而诱导激活 p53 信号途径,抑制细胞凋亡,调控细胞生长繁殖<sup>[26,27]</sup>。

前胸腺素  $\alpha$ (PTMA)是一个多肽,主要功能是在细胞核中

调节细胞周期,促进细胞增殖,在胞外主要起免疫调节作用,例如促使细胞释放细胞因子 TNF $\alpha$  和 IL-2,促进 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 和 NK 细胞的产生,增强淋巴细胞、中性粒细胞和成熟树突细胞功能<sup>[28]</sup>。RNAi 干扰前胸腺素  $\alpha$ (PTMA)表达可激活细胞凋亡<sup>[29]</sup>。

人组织蛋白酶 G(CTSG)属于肽酶 S1 蛋白家族成员,于中性多形核白细胞中发现。该蛋白与胰凝乳蛋白酶 C(chymotrypsin C)有特异相似性,可能参与杀伤、消化细菌、结缔组织重构等生物过程。有研究表明,中性粒细胞产生的人组织蛋白酶 G(CTSG)可释放到宿主细胞外,结合到整合素(Integrins, 细胞膜上的一种蛋白)上,阻碍整合素重排<sup>[30]</sup>。整合素重排可以将细胞外信号传递到细胞内,改变细胞的功能如促使细胞释放炎症因子,引起机体的免疫和炎症反应。嗜吞噬细胞无形体进入胞内以包涵体的形式存在,研究发现无形体可以阻断包涵体与胞内溶酶体的融合,但具体的分子机制不清楚<sup>[3]</sup>。该实验结果暗示 CTSG 可能是溶酶体中的一种酸性水解酶,在包涵体与溶酶体融合过程中起阻断作用。Msp2 与 CTSG 蛋白互作可能使该酸性水解酶 CTSG 运输定位发生错误,致使溶酶体无法正常成熟,阻断了 APH 包涵体与溶酶体的融合,故宿主细胞无法清除病原,这可能是病原菌胞内寄生的分子致病机制之一。

人锌指蛋白 36, C3H 样 2 (zinc finger protein 36,C3H type-like 2; ZFP36L2)基因是早期应答基因 TIS11 家族成员。该家族成员可以被佛波酯(TPA)、多肽有丝分裂原(EGF)等多种激动剂诱导。ZFP36L2 是一个假定的蛋白转录因子,可能在调控细胞生长因子应答方面起作用。HGA 患者后期有贫血临床症状,其发生原因不明。Zhang 等<sup>[31]</sup>研究发现,糖皮质激素(主成分是皮质醇)刺激红细胞并促使其 ZFP36L2 蛋白转录因子表达量增加,ZFP36L2 可以结合到早期祖红细胞的 mRNA 上,促使早期祖红细胞更多地向后期祖红细胞,后期祖红细胞可大量形成红细胞。虽然嗜吞噬无形体可以感染红细胞,但具体分子机制仍待深入研究。本研究发现,中国 APH 分离株 Msp2 与 ZFP36L2 结合,致使 ZFP36L2 不能与早期祖红细胞的 mRNA 结合,阻碍红细胞增殖,这可能是引起 HGA 病人感染后期贫血症发生的原因之一。

综合上述研究结果以及本实验结果,据此分析,中国 APH 分离株蛋白 Msp2 与 NDUFA13、RPL11、PTMA 发生作用,可能影响了宿主细胞的生长增殖、细胞凋亡及其它一些信号通路等过程,从而导致病原逃逸宿主细胞的杀伤作用。总之,本研究从病原菌蛋白-宿主蛋白互作角度出发,对病原菌的分子致病机理、无形体病病因发生以及临床表现的可能影响进行了分析探讨。鉴于酵母双杂交技术的局限性,目前本研究团队正在进一步验证 Msp2 与靶蛋白互作,研究蛋白-蛋白互作对信号通路的影响,进而为揭示 HGA 发病机理/病原分子致病机理提供科学数据。

#### 参考文献 (References)

- [1] Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, et al. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum* [J]. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(12): 1828-1834
- [2] Rikihisa Y. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8

- (5): 328-339
- [3] Rikihisa Y. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum* [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2011, 24(3): 469-489
- [4] Rikihisa Y. Molecular events involved in cellular invasion by *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* [J]. *Vet Parasitol*, 2010, 167(2-4): 155-166
- [5] Dumler JS. The biological basis of severe outcomes in *Anaplasma phagocytophilum* infection[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2012, 64(1): 13-20
- [6] Dunning Hotopp JC, Lin M, Madupu R, et al. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents [J]. *PLoS Genet*, 2006, 2(2): e21
- [7] Scorpio DG, Leutenegger C, Berger J, et al. Sequential analysis of *Anaplasma phagocytophilum* msp2 transcription in murine and equine models of human granulocytic anaplasmosis [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15(3): 418-424
- [8] Wuritu, Gaowa, Kawamori F, et al. Characterization of p44/msp2 multigene family of *Anaplasma phagocytophilum* from two different tick species, *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ovatus*, in Japan [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2009, 62(2): 142-145
- [9] Niu H, Kozjak-Pavlovic V, Rudel T, et al. *Anaplasma phagocytophilum* Ats-1 is imported into host cell mitochondria and interferes with apoptosis induction[J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(2): e1000774
- [10] Lin Q, Zhang C, Rikihisa Y. Analysis of involvement of the RecF pathway in p44 recombination in *Anaplasma phagocytophilum* and in *Escherichia coli* by using a plasmid carrying the p44 expression and p44 donor loci[J]. *Infect Immun*, 2006, 74(4): 2052-2062
- [11] Reneer DV, Kearns SA, Yago T, et al. Characterization of a sialic acid- and P-selectin glycoprotein ligand-1-independent adhesin activity in the granulocytotropic bacterium *Anaplasma phagocytophilum*[J]. *Cell Microbiol*, 2006, 8(12): 1972-1984
- [12] Barbet AF, Lundgren AM, Alleman AR, et al. Structure of the expression site reveals global diversity in MSP2 (P44) variants in *Anaplasma phagocytophilum* [J]. *Infect Immun*, 2006, 74 (11): 6429-6437
- [13] Wuritu, Ozawa Y, Gaowa, et al. Structural analysis of a p44/msp2 expression site of *Anaplasma phagocytophilum* in naturally infected ticks in Japan[J]. *J Med Microbiol*, 2009, 58(Pt 12): 1638-1644
- [14] Wang Y, Chen C, Zhang L. Molecular characterization of Msp2/P44 of *Anaplasma phagocytophilum* isolated from infected patients and *Haemaphysalis longicornis* in Laizhou Bay, Shandong Province, China[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e78189
- [15] Zhang L, Wang G, Liu Q, et al. Molecular analysis of *Anaplasma phagocytophilum* isolated from patients with febrile diseases of unknown etiology in China[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57155
- [16] Zhang L, Liu Y, Ni D, et al. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. *JAMA*, 2008, 300(19): 2263-2270
- [17] Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, et al. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis*, 2007, 45(Suppl 1): S45-51
- [18] Lijuan Z, Feng C, Ling W, et al. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis* in Yiyuan county, Shandong. *Infect Dis Inform*, 2009, 2(1): 21-25
- [19] Zhang L, Shan A, Mathew B, et al. Rickettsial Seroepidemiology among farm workers, Tianjin, People's Republic of China. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(6): 938-940
- [20] Cao WC, Zhan L, He J, et al. Natural *Anaplasma phagocytophilum* infection of ticks and rodents from a forest area of Jilin Province, China [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2006, 75(4): 664-668
- [21] Carlyon JA, Fikrig E. Invasion and survival strategies of *Anaplasma phagocytophilum*[J]. *Cell Microbiol*, 2003, 5(11): 743-754
- [22] Severo MS, Stephens KD, Kotsyfakis M, et al. *Anaplasma phagocytophilum*: deceptively simple or simply deceptive?[J]. *Future Microbiol*, 2012, 7(6): 719-731
- [23] Angebault C, Charif M, Guegen N, et al. Mutation in NDUFA13/GRIM19 leads to early onset hypotonia, dyskinesia and sensorial deficiencies, and mitochondrial complex I instability [J]. *Hum Molec Genet*, 2015, 24: 3948-3955
- [24] He X, Cao X. Identification of alternatively spliced GRIM-19 mRNA in kidney cancer tissues[J]. *J Hum Genet*, 2010, 55: 507-511
- [25] Hengxun Hu, Jinliang Nan, Yong Sun, et al. Electron leak from ND-UFA13 within mitochondrial complex I attenuates ischemia-reperfusion injury via dimerized STAT3[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114 (45): 11908-11913
- [26] Dai M S, Shi D, Jin Y, et al. Regulation of the MDM2-p53 pathway by ribosomal protein L11 involves a post-ubiquitination mechanism [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 24304-24313
- [27] Fumagalli S, Di Cara A, Neb-Gulati A, et al. Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction [J]. *Nature Cell Biol*, 2009, 11: 501-508
- [28] Ioannou K, Samara P, Livaniou E, et al. Prothymosin alpha: a ubiquitous polypeptide with potential use in cancer diagnosis and therapy [J]. *Cancer Immunology Immunother*, 2012, 61(5): 599-614
- [29] Jiang X, Kim H E, Shu H, et al. Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway [J]. *Science*, 2003, 299: 223-226
- [30] Pham CT. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(7): 541-550
- [31] Zhang L, Prak L, Rayon-Estrada V, et al. ZFP36L2 is required for self-renewal of early burst-forming unit erythroid progenitors [J]. *Nature*, 2013, 499(7456): 92-96