

丙型肝炎病毒与PKR信号转导系统

杨倩, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 党晓燕, 张树林

杨倩, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 党晓燕, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-24 接受日期: 2003-07-16

杨倩, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 党晓燕, 张树林. 丙型肝炎病毒与PKR信号转导系统. 世界华人消化杂志 2004;12(1):149-151

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/149.asp>

0 引言

在病毒感染真核细胞的过程中, 干扰素(IFN)诱导细胞的抗病毒机制是机体防御感染的第一道防线. 在病毒感染过程中, 分泌的干扰素主要用于保护邻近细胞免受感染, 限制病毒扩散^[1]. I型IFN由IFN- α 、IFN- β 两种亚型组成, IFN- α 主要由白细胞分泌产生, IFN- β 主要由成纤维细胞、上皮细胞产生. I型IFN与相应的受体结合, 激活信号级联反应, 从而调节至少30个基因的转录翻译水平, 其中包括双链RNA激活的蛋白激酶(double-stranded RNA-activated protein kinase, PKR)和2'-5'寡聚腺苷酸合成酶(2'-5' oligoadenylates synthesis), 这两种酶的激活均需要病毒复制过程中产生的双链RNA^[2, 3]. PKR参与机体的抗病毒机制, 与细胞凋亡密切相关, 从而受到越来越多的关注.

1 PKR的结构与生物学特点

PKR是经典的IFN诱导产物, 参与IFN的抗病毒机制. PKR又称为DAI或p68, 由551个氨基酸残基组成, 其N端为调节区(1-265 aa), 具有两个与dsRNA结合的部位, 分别位于55-75 aa及145-166 aa区域内, 其中前一个区域是必需的; 其C端(266-551 aa)为催化部位. PKR分子量为68 kDa, 属于保守双链RNA结合分子家族, 该家族还包括大肠杆菌RNA酶III等^[4]. Jiménez-García et al^[5]通过比较腺病毒2感染和未感染的HeLa细胞发现, 在未感染的细胞中PKR分布在细胞质, 同时也发现PKR在核浆中也有散在分布, 感染细胞与未感染细胞有相似的细胞分布. 研究表明低浓度的dsRNA具有激活作用, 然而高浓度的dsRNA却阻止该活化作用. 目前认为dsRNA对PKR的激活与双链RNA长度有关, 而与序列结构无关, 激活PKR最少需要30 bp dsRNA, 随着dsRNA的延长激活能力逐渐增强. 但有学者发现含有双链长度不超过20 bp的单链Tm1-3RNA亦能激活PKR, 提示PKR的激活可能存在多种形式. PKR与dsRNA结合后, 形成二聚体, 随后进入自主磷酸化和随后的不依赖dsRNA的底物磷酸化,

PKR的N端有两个保守的dsRNA结合基序(motif), 第一个基序含有与dsRNA结合的高度保守性氨基酸序列; C端为催化活性结构域, 但这一活性在dsRNA结合前是封闭的, 当N端基序上结合dsRNA后, 可能通过蛋白质构型的改变, 使C端的酶活性表现出来^[6-10].

活化的PKR能够识别蛋白质合成的起始因子真核翻译起始因子-2(eukaryotic initiation factor-2, eIF-2), 并使eIF-2的 α 亚基51位丝氨酸磷酸化. 异源二聚体的eIF-2能够结合GTP和tRNA, 形成三元复合物. 该复合物与40S核糖体亚单位结合形成一个43S的复合物^[11]. 43S的聚合物参与识别mRNA起始密码子, 结合60S核糖体亚单位同时伴随GTP的水解转变为GDP. 在下一个同样的循环开始前, 与eIF-2结合的GDP在eIF-2B催化作用下由GTP替代. eIF-2 α 亚基51位丝氨酸磷酸化将大大提高GDP对eIF-2的亲合性, 使GDP与GTP的交换受到阻滞. 虽然eIF-2-GDP与eIF-2B能够形成稳定复合物, 但由于在细胞中eIF-2的含量远远高于eIF-2B, 因此比例较少的eIF-2磷酸化即可阻断细胞中eIF-2B的催化作用. PKR催化eIF-2 α 51位苏氨酸磷酸化, 改变eIF2功能, 阻止eIF2B发挥作用, 从而降低eIF2-GTP的水平, 使蛋白合成和病毒复制水平下降^[12-15].

最近研究还发现在肿瘤坏死因子- α 、dsRNA、病毒感染等刺激下, 激活的PKR可以诱发凋亡. 这一发现提示PKR除了阻断病毒蛋白合成外, 还可以通过诱发凋亡发挥抗病毒作用. PKR诱发凋亡机制与其磷酸化eIF-2 α 、激活NF- κ B和p53有关^[16-18]. 实验发现: 表达51 aa发生丝氨酸 \rightarrow 丙氨酸替换的eIF-2 α 变异体的NIH3T3细胞可以抵抗血清缺失和肿瘤坏死因子- α 诱导的凋亡^[19]; 在HeLa细胞中同样变异体的表达亦可保护细胞由PKR大量表达诱发的凋亡^[20]; 51 aa发生丝氨酸 \rightarrow 天冬氨酸替换的eIF-2 α 变异体功能与磷酸化eIF-2 α 相似, 表达该变异体的COS-1细胞可以诱导凋亡发生^[21]. 这些研究结果显示eIF-2 α 可以直接诱发凋亡产生. 机制可能与磷酸化eIF-2 α 诱导一些与凋亡相关的mRNA优先表达相应蛋白有关, 这与酿酒酵母氨基酸缺乏反应相似, Bcl-2家族中的Bax的表达可能与此有关^[22]. 此外, PKR还可以激活与炎症、凋亡密切相关的NF- κ B、p53及IRF1. NF- κ B异源二聚体与I κ B结合时处于无活性状态, 当与激活因子发生反应时, 磷酸化I κ B发生遍在蛋白依赖的蛋白酶体降解, 使得NF- κ B转位核内. PKR在细胞内促使I κ B磷酸化和激活NF- κ B, 目前认为是通过直接磷酸化I κ B磷酸激酶复合物而发挥作用, 缺乏PKR的细胞不能对dsRNA产生抑制^[23-25].

PKR可以激活p53, 具体机制尚不明确, PKR磷酸化p53蛋白392位丝氨酸可能与其调节p53功能有关, 在缺乏PKR的细胞p53的功能受到损伤.

2 PKR与丙型肝炎的关系

在病毒感染机体的过程中, 病毒常常发生变异抵抗

PKR 介导的抗病毒机制, 主要表现为以下几种方式: (1)产生拮抗 dsRNA 的 RNA 或蛋白, 阻止 PKR 的活性; (2)产生 dsRNA 结合蛋白, 隔离与 PKR 结合; (3)产生蛋白阻止 PKR 二聚体化; (4)产生蛋白干扰 PKR 与 eIF2 的结合; (5)激活磷酸酶使 PKR 和 eIF2 去磷酸化; (6)阻止 PKR 的表达或诱导 PKR 降解^[26-28]。

丙型肝炎病毒(HCV)属黄病毒属家族, 可引起机体的持续性感染, 导致慢性肝炎和肝硬化, 并与肝细胞癌、淋巴细胞增生紊乱密切相关。目前惟一有效的治疗途径是运用干扰素, 但是大多数患者对治疗无明显反应^[29-31]。其中病毒发生变异逃避 PKR 抗病毒作用, 是其抵抗干扰素治疗的主要机制之一。NS5A 和 E2 两种蛋白参与调节机体对 dsRNA 的反应, 研究表明这两种蛋白能够与 PKR 结合, 并阻止其发挥抗病毒作用。同时分子流行病学研究发现 NS5A 或 E2 序列, 特别是与 PKR 结合的区域, 与病毒的持续感染、对干扰素治疗的反应有紧密的联系^[32]。这些发现表明病毒的持续感染机制之一, 可能与 NS5A 和 E2 阻止激活的 PKR 引发的抗病毒作用有关。E2 是病毒的包膜蛋白, 参与病毒与靶细胞的结合, 在丙肝病毒不同株之间 E2 具有高变的特点, Taylor et al^[33]研究 E2 在干扰素抵抗中的作用发现, 来自不同病毒分离株 E2 均含有一个 12 氨基酸的序列, 该序列与 PKR 自磷酸化位点、eIF2 磷酸化位点相似, 该序列在不同株之间高度保守。实验证实 PKR 与 E2 能够在体外结合, 体内、外实验均证实 E2 可以阻断 PKR 的活性; Pflugheber et al^[34]构建包含 HCV 复制子的 Huh7 细胞系, 将其中一个命名为 10A, 包含的病毒复制子编码氨基酸(aa)序列中于 2 040 位插入赖氨酸, 该位点靠近的氨基末端; 另一个命名为 H27, 包含的病毒复制子于 2 198 位发生亮氨酸(L)与丝氨酸(S)的替换, 该位点邻近 PKR 结合区域; 细胞培养结果表明 10A 复制水平超过 H27 的 5 倍。为了进一步明确病毒复制水平与 NS5A、PKR 之间的关系, Pflugheber et al 利用免疫共沉淀技术发现与 Huh7 细胞相比, H27 细胞产生的 PKR 水平升高显著; 当在这两种细胞系中加入 dsRNA 后, PKR 的活性明显升高; 而在 10A 细胞系中 PKR 呈现出低度的活性, 对 dsRNA 刺激无明显反应, 当加入 NS5A 抗体后 PKR 活性恢复。PKR 与 NS5A 在 10A 细胞中的亚细胞定位相互重叠, 而在 H27 细胞中却无此现象出现。由此研究者认为由 10A 细胞病毒复制子编码的 NS5A 能够与 PKR 结合并且抑制其活性。同时研究者也注意到在两种不同的病毒复制子中都包含有 64 个 aa 组成的 PKR 结合域, 但发生 L2198S 替换或其他紧邻 PKR 结合区域的 aa 替换, 可能会改变 NS5A 对 PKR 结合、调节。

PKR 的激活在不同的病毒、不同的宿主之间将产生截然不同的结果。进一步对 PKR 作用机制及其信号传导通路的研究, 明确其抗病毒的具体机制, 为发展新的治疗策略提供新的方向。

3 参考文献

- 1 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因区结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 2 Krishna M, Kirk AS, Zhu SH, Wek RC. Inhibitory sequences in the N-terminus of the double-stranded-RNA-dependent protein kinase, PKR, are important for regulating phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2a (eIF2a). *Eur J Biochem* 2001;268:1143-1153
- 3 Polyak SJ, Tang N, Wambach M, Barber GN, Katze MG. The P58 Cellular Inhibitor Complexes with the Interferon-induced, Double-stranded RNA-dependent Protein Kinase, PKR, to Regulate Its Autophosphorylation and Activity. *J Biol Chem* 1996;271:1702-1707
- 4 James MC, Jeffreyl IW, Puijn GJ, Thijssen JP, Clemens MJ. Translational control by the La antigen Structure requirements for rescue of the double-stranded RNA-mediated inhibition of protein synthesis. *Eur J Biochem* 1999;266:151-162
- 5 Jiménez-García LF, Green SR, Mathews MB, Spector DL. Organization of the double-stranded RNA-activated protein kinase DAI and virus-associated VA RNAI in adenovirus-2-infected HeLa cells. *J Cell Sci* 1993;106:11-22
- 6 Vuyisich M, Spangord RJ, Beal PA. The binding site of the RNA-dependent protein kinase (PKR) on EBER1 RNA from Epstein-Barr virus. *EMBO Rep* 2002;3:622-627
- 7 Li S, Koromilas AE. Dominant negative function by an alternatively spliced form of the interferon-inducible protein kinase PKR. *J Biol Chem* 2001;276:13881-13890
- 8 Wong AH, Durbin JE, Li S, Dever TE, Decker T, Koromilas AE. Enhanced antiviral and antiproliferative properties of a STAT1 mutant unable to interact with the protein kinase PKR. *J Biol Chem* 2001;276:13727-13737
- 9 Spangord RJ, Beal PA. Selective binding by the RNA binding domain of PKR revealed by affinity cleavage. *Biochemistry* 2001;40:4272-4280
- 10 Tian B, Mathews MB. Functional characterization of and co-operation between the double-stranded RNA-binding motifs of the protein kinase PKR. *J Biol Chem* 2001;276:9936-9944
- 11 Baltzis D, Li S, Koromilas AE. Functional characterization of pkr gene products expressed in cells from mice with a targeted deletion of the N terminus or C terminus domain of PKR. *J Biol Chem* 2002;277:38364-38372
- 12 Ryman KD, White LJ, Johnston RE, Klimstra WB. Effects of PKR/RNase L-dependent and alternative antiviral pathways on alphavirus replication and pathogenesis. *Viral Immunol* 2002;15:53-76
- 13 Ben-Asouli Y, Banai Y, Pel-Or Y, Shir A, Kaempfer R. Human interferon-gamma mRNA autoregulates its translation through a pseudoknot that activates the interferon-inducible protein kinase PKR. *Cell* 2002;108:221-232
- 14 Vattem KM, Staschke KA, Wek RC. Mechanism of activation of the double-stranded-RNA-dependent protein kinase, PKR: role of dimerization and cellular localization in the stimulation of PKR phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 (eIF2). *Eur J Biochem* 2001;268:3674-3684
- 15 Vattem KM, Staschke KA, Zhu S, Wek RC. Inhibitory sequences in the N-terminus of the double-stranded-RNA-dependent protein kinase, PKR, are important for regulating phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2alpha (eIF2alpha). *Eur J Biochem* 2001;268:1143-1153
- 16 Zhang F, Romano PR, Nagamura-Inoue T, Tian B, Dever TE, Mathews MB, Ozato K, Hinnebusch AG. Binding of double-stranded RNA to protein kinase PKR is required for dimerization and promotes critical autophosphorylation events in the activation loop. *J Biol Chem* 2001;276:24946-24958
- 17 Gil J, Rullas J, Garcia MA, Alcamí J, Esteban M. The catalytic activity of dsRNA-dependent protein kinase, PKR, is required for NF-kappaB activation. *Oncogene* 2001;20:385-394
- 18 Ishii T, Kwon H, Hiscott J, Mosialos G, Koromilas AE. Activation of the I kappa B alpha kinase (IKK) complex by double-stranded RNA-binding defective and catalytic inactive mutants of the interferon-inducible protein kinase PKR. *Oncogene* 2001;20:1900-1912
- 19 Souquere-Besse S, Pichard E, Filhol O, Legrand V, Rosal-Calatrava M, Hovanessian AG, Cochet C, Puvion-Dutilleul F. Adenovirus infection targets the cellular protein kinase CK2

- and RNA-activated protein kinase (PKR) into viral inclusions of the cell nucleus. *Microsc Res Tech* 2002;56:465-478
- 21 Gil J, Rullas J, Alcamí J, Esteban M. MC159L protein from the poxvirus molluscum contagiosum virus inhibits NF-kappaB activation and apoptosis induced by PKR. *J Gen Virol* 2001; 82:3027-3034
 - 22 Saelens X, Kalai M, Vandenabeele P. Translation inhibition in apoptosis: caspase-dependent PKR activation and eIF2- α phosphorylation. *J Biol Chem* 2001;276:41620-41628
 - 23 Ung TL, Cao C, Lu J, Ozato K, Dever TE. Heterologous dimerization domains functionally substitute for the double-stranded RNA binding domains of the kinase PKR. *EMBO J* 2001;20:3728-3737
 - 24 Bonnet MC, Weil R, Dam E, Hovanessian AG, Meurs EF. PKR stimulates NF-kappaB irrespective of its kinase function by interacting with the IkappaB kinase complex. *Mol Cell Biol* 2000;20:4532-4542
 - 25 Gil J, Alcamí J, Esteban M. Activation of NF-kappa B by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR involves the I kappa B kinase complex. *Oncogene* 2000;19:1369-1378
 - 26 Francois C, Duverlie G, Rebouillat D, Khorsi H, Castelain S, Blum HE, Gatignon A, Wychowski C, Moradpour D, Meurs EF. Expression of hepatitis C virus proteins interferes with the antiviral action of interferon independently of PKR-mediated control of protein synthesis. *J Virol* 2000;74:5587-5596
 - 27 Langland JO, Jacobs BL. The role of the PKR-inhibitory genes, E3L and K3L, in determining vaccinia virus host range. *Virology* 2002;299:133-141
 - 28 Ward SV, Samuel CE. Regulation of the interferon-inducible PKR kinase gene: the KCS element is a constitutive promoter element that functions in concert with the interferon-stimulated response element. *Virology* 2002;296:136-146
 - 29 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因区结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
 - 30 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
 - 31 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒 NS2 基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:129-132
 - 32 Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999;285:107-110
 - 33 Taylor DR, Tian B, Romano PR, Hinnebusch AG, Lai MM, Mathews MB. Hepatitis C virus envelope protein E2 does not inhibit PKR by simple competition with autophosphorylation sites in the RNA-binding domain. *J Virol* 2001;75:1265-1273
 - 34 Pflugheber J, Fredericksen B, Sumpter R Jr, Wang CF, Ware F, Sodora DL, Gale M Jr. Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc. Natl Acad Sci U S A* 2002;99:4650-4655

TATA盒结合蛋白与肝炎病毒的关系

王春花, 成军, 郎振为, 刘妍, 王建军, 纪冬, 党晓燕

王春花, 成军, 刘妍, 王建军, 纪冬, 党晓燕, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

郎振为, 首都医科大学佑安医院病理科 北京市 100054
国家自然科学基金项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目 No.98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-24 接受日期: 2003-07-16

王春花, 成军, 郎振为, 刘妍, 王建军, 纪冬, 党晓燕. TATA盒结合蛋白与肝炎病毒的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(1):151-155

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/151.asp>

0 引言

病毒性肝炎流行范围非常广泛, 就我国而言, 其发病率之高, 危害性之大, 堪称传染病之魁首. 以乙型肝炎为例, 全球约有3.5亿慢性病毒携带者, 其中至少20-30%患有不同程度的肝脏损害. 我国人群中乙型肝炎病毒(HBV)的感染率高达60%, 其中约1.2亿为HBsAg携带者. 此外, 慢性HBV和丙型肝炎病毒(HCV)也是引起肝硬化和肝细胞癌(HCC)的重要原因, 对人类健康造成极大危害, 至今缺乏有效的控制. 肝炎病毒在肝细胞中的长期存在、复制、扩散是肝炎病毒慢性感染的关键, 这两种病毒在体内感染的分子生物学机制一直是研究者们关注的重点, 许多研究越来越显示TATA盒结合蛋白(TBP, TATA box binding protein)与其关系密切, 本文简要介绍近年来在这方面的研究进展.

1 TATA结合蛋白的结构和功能

在细胞和生物体生长、分泌、细胞系定向等过程中, 基因表达的转录水平调控是非常重要的一个环节. 过去10a中, 对细胞特异性的转录因子与特定基因调节区(如启动子和/或增强子)的DNA元件(或称反应元件)结合, 抑制或刺激转录起始的研究, 取得了重大进展. 例如由DNA聚合II酶转录的基因, 由数个转录因子组成一个转录复合体, 其基本成分包括TBP和TBP相关因子(TBP-associated factor, TAF), 必需经聚合酶II正确定位于特定的DNA后方能启动转录. 有趣的是, 有些转录因子能直接与TBP作用, 刺激或抑制基因的转录.

1.1 TATA盒子 启动子是一段特定的直接与RNA聚合酶及其转录因子相结合、决定基因转录起始与否的DNA序列. 不同的启动子对RNA聚合酶的亲和力不同, 所结合的反式作用因子(trans-acting factors)也不同, 因此, 基因转录活性也很不相同. 真核生物有3类RNA聚合酶, 负责转录3类不同的启动子. (1)由RNA聚合酶I负责转录的rRNA基因, 启动子(I类)比较单一, 由转录起始位点附近的两部分序列构成. (2)由RNA聚合酶III负责转录的是5S rRNA、tRNA和某些核内小分子RNA(snRNA), 其启动子(III类)组成较复杂, 又可被分为三个亚类. 5S rRNA和tRNA基因的启动子是内部启动子(internal promoter), 位于转录起始位点的下游, 都由两部分组成. 第三亚类启动子由三个部分组成, 位于转录起始位点上游. (3)由RNA聚合酶II负责转录的II类基因包括所有蛋白质编码基因和部分snRNA基因, 后者的启动子结构与III类基因启动子中的第三种类型相似, 编码蛋白质的II类基因启动子在结构上有共同的保守序列. 以RNA聚合酶II的启动子结构为例, 人们