

姜宁, 程昶, 尹德琦, 等. 弓形虫组蛋白乙酰转移酶 MYST-A 对虫体蛋白质翻译后修饰的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2024, 55(3): 257-266.

JIANG Ning, CHENG Chang, YIN Deqi, et al. Effect of the histone lysine acetyltransferase MYST-A on the protein post-translational modifications of *Toxoplasma gondii*[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2024, 55(3): 257-266.

弓形虫组蛋白乙酰转移酶 MYST-A 对虫体蛋白质翻译后修饰的影响

姜宁, 程昶, 尹德琦, 张义伟, 桑晓宇, 冯颖, 陈冉

(沈阳农业大学 动物科学与医学学院, 沈阳 110161)

摘要: 为了探究弓形虫组蛋白乙酰转移酶 MYST-A 对弓形虫蛋白质翻译后修饰的影响, 在弓形虫 ToxoDB 数据库获取基因全长序列, 构建表达载体, 大量纯化 His 标签重组蛋白质, 免疫实验动物, 制备多克隆抗体并纯化。利用间接免疫荧光实验对其进行亚细胞定位分析, 用不同浓度的抗体作用于弓形虫并提取全虫蛋白, 进行 Western-blot 验证, 分析其是否对虫体蛋白质翻译后修饰产生影响。ALP2a 蛋白质是组成组蛋白乙酰转移酶复合物的的重要组成部分, MYST-A 与 ALP2a 可能形成组蛋白乙酰转移酶复合物共同参与组蛋白的翻译后修饰, 拟通过分子互作实验验证两者是否发生相互作用。结果表明: 成功构建重组表达载体并纯化重组蛋白质 His-MYST-A。His-MYST-A 免疫小鼠以及兔子, 并获得了特异性多克隆抗体。IFA 分析结果表明: 在细胞内的虫体和游离速殖子中, 弓形虫 MYST-A 均在虫体细胞质内广泛分布。MYST-A 对弓形虫蛋白质翻译后修饰影响结果表明, 随着抗体浓度的增加, 泛素化、单甲基/二甲基化、丙二酰化、琥珀酰化的修饰水平均增强 (尤其是 55 kDa 处), 说明该蛋白质起负调控作用。分子互作实验验证 MYST-A 与 ALP2a 两者发生相互作用。研究进一步揭示了弓形虫组蛋白乙酰转移酶 MYST-A 对蛋白质翻译后修饰的重要调控作用, 为深入研究其生物学功能奠定了基础。蛋白质翻译后修饰的研究对了解弓形虫的致病机制及其与宿主的相互作用、致病机制有重要意义, 同时也为新型弓形虫疫苗研制及药物靶标的筛选提供一定的参考价值和理论依据。

关键词: 弓形虫; MYST-A; 原核表达; 多克隆抗体; 蛋白质翻译后修饰

中图分类号: S852.7

文章编号: 1000-1700(2024)03-0257-10

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Effect of the Histone Lysine Acetyltransferase MYST-A on the Protein Post-translational Modifications of *Toxoplasma gondii*

JIANG Ning, CHENG Chang, YIN Deqi, ZHANG Yiwei,

SANG Xiaoyu, FENG Ying, CHEN Ran

(College of Animal Science and Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of the histone lysine acetyltransferase MYST-A on the protein post-translational modifications of *Toxoplasma gondii*. The full-length gene sequence was obtained from ToxoDB database of *Toxoplasma gondii*, the expression vector was constructed, the recombinant protein of His tag was purified in large quantities, and the experimental animals were immunized, polyclonal antibodies were prepared and purified. The subcellular localization of *Toxoplasma gondii* was analyzed by indirect immunofluorescence assay, and different concentrations of antibodies were used to act on *Toxoplasma gondii* and the whole parasite protein was extracted for

收稿日期: 2024-02-10

基金项目: “十四五”国家重点研发计划项目(2022YFD1800200)

第一作者: 姜宁(1969-), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事人兽共患寄生虫病学研究, E-mail: jiangning@syau.edu.cn

Western-blot verification to analyze whether it had an effect on the protein post-translational modifications of *Toxoplasma gondii*. ALP2a protein is an important component of histone acetyltransferase complex. MYST-A and ALP2a may form a histone acetyltransferase complex to participate in post-translational modifications of histones. This study intends to verify whether they interact with each other through molecular interaction experiments. The results showed that the recombinant expression vector was successfully constructed, and the recombinant protein His-MYST-A were purified. His-MYST-A immunized mice and rabbits and produced specific polyclonal antibodies. The results of IFA analysis showed that MYST-A was widely distributed in the cytoplasm of *Toxoplasma gondii* both in the vacuoles and in the tachyzoites. The effect of MYST-A on the protein post-translational modifications of *Toxoplasma gondii* showed that with the increase of antibody concentration, the levels of ubiquitination, monomethyl/dimethylation, malonylation and succinylation increase (especially at 55 kDa), indicating that the protein played a negative regulatory role in them. The interaction between MYST-A and ALP2a was verified by molecular interaction experiment. This study further revealed that the histone lysine acetyltransferase MYST-A of *Toxoplasma gondii* plays an important role in the regulation of protein post-translational modifications, which lays a foundation for further study of its biological functions. The study of protein post-translational modifications is great significance to understand the pathogenic mechanism of *Toxoplasma gondii* and its interaction with the host. It also provides some reference value and theoretical basis for the development of novel *Toxoplasma gondii* vaccines and the screening of drug targets.

Key words: *Toxoplasma gondii*; MYST-A; prokaryotic expression; polyclonal antibody; protein post-translational modifications

弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是寄生在细胞内的一种顶复门原虫^[1]。弓形虫能够感染几乎所有的温血动物,随着血液流动在身体中散播。它能够进入宿主中枢神经系统建立持续感染并影响其生理功能^[2]。在日常生活中,人类和温血动物通常会通过食用被包囊或卵囊污染的食物或水而感染^[3]。在感染弓形虫后,免疫力正常的人会产生轻度症状或者无临床症状^[4],但胎儿和免疫功能低下的人会发生严重的疾病,甚至可能危及生命^[5]。目前弓形虫病存在于世界上大多数国家,且没有针对治疗弓形虫病的特效药,其对人类的危害日益加重,对畜牧业的经济也产生极大的阻碍^[6]。

蛋白质翻译后修饰(protein post-translational modifications, PTMs)是指将共价修饰附着于已经合成的多肽链上,通过影响修饰残基或邻近多肽区域的化学性质,从而影响蛋白质的功能,是蛋白质功能调节的重要方式^[7]。弓形虫在不同的发育时期所表达的蛋白数量是不同的,但是仅靠蛋白质数量的变化并不足以满足其复杂的生命活动^[8],而PTMs可以发生在弓形虫生命周期的任何时刻,改变蛋白质的定位以及蛋白质-蛋白质间相互作用等,在细胞表达过程中发挥重要的作用^[9]。已有研究证明组蛋白乙酰转移酶MYST-A是乙酰化修饰转移酶中的重要成员^[10-11],能够对乙酰化修饰进行调控,从而调节转录调控、染色质重建、DNA损伤修复等多方面的生物学过程^[12]。越来越多的研究发现,除组蛋白外,一些修饰调控酶对非组蛋白的蛋白质翻译后修饰也发挥重要的作用。组蛋白乙酰转移酶已被证明参与合成许多蛋白质组成的复合物,这些复合物在组蛋白乙酰转移酶的活性和靶点特异性中发挥作用^[13],找到关键的抑制剂可能对药物靶标的筛选具有重要意义。因此,本研究原核表达并纯化His-MYST-A重组蛋白质,鉴定免疫后抗体特异性并进行纯化,通过抗体抑制实验验证该蛋白对非组蛋白的泛素化、丙二酰化、琥珀酰化、单甲基/二甲基化修饰产生的负调控作用,并通过分子互作实验验证MYST-A和ALP2a发生相互作用,两者可能形成复合物。以期通过MYST-A对虫体蛋白质翻译后修饰影响的研究,为确定新的抗弓形虫感染的药物靶标及疫苗候选抗原提供一定的参考价值 and 理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 虫株、细胞、载体和实验动物 供试刚地弓形虫(RH株)、Vero细胞(非洲绿猴肾细胞)、pET-28a载体均由本实验室保存。SPF级BALB/c小鼠均购自辽宁长生生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase、限制性内切酶 BamH I 和 Not I 均购自TaKaRa公司。质粒小提试剂盒和胶回收试剂盒均购自天根生化科技有限公司。His-Tag Mouse Monoclonal

Antibody购自碧云天公司。蛋白质修饰泛抗体Anti-L-Lactyl Lysine Rabbit mAb、Anti-Mono/Di-Methyllysine Rabbit pAb、Anti-Malonyllysine Mouse mAb、Anti-Succinyllysine Mouse mAb和Anti-Ubiquitin Rabbit mAb均购自杭州景杰生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 从ToxoDB网站上检索TGME49_318330后直接下载histone lysine acetyltransferase MYST-A基因全长序列,利用primer5.0软件设计带有酶切位点的特异性引物,上游引物MYST-A-F为5'-CGGGATCC (BamH I) ATGAAGAGACTCTCGGGAGCG-3',下游引物MYST-A-R为5'-TAAAGCGGCCG (Not I) TTAGGCTTGAGGACTGTACTCAAAGG-3',引物交由上海生工生物公司进行合成。

1.2.2 MYST-A目的基因的克隆 利用设计的特异性引物,以cDNA为模板,PCR扩增MYST-A基因,反应体系:12.5 μL PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase, 1.5 μL MYST-A-F, 1.5 μL MYST-A-R, 2 μL cDNA, 7.5 μL ddH₂O;退火温度62 $^{\circ}\text{C}$ 。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定后胶回收,将目的片段与克隆载体连接并转化到Trans1-T1克隆感受态细胞,挑取单克隆菌株,进行菌落PCR验证并送测序。

1.2.3 重组原核表达质粒的构建 将表达载体pET-28a以及测序正确的重组克隆质粒分别进行双酶切(BamH I和Not I),胶回收,T4连接酶16 $^{\circ}\text{C}$ 连接2 h,把连接产物转化到Trans1-T1克隆感受态细胞,筛选阳性单克隆菌落并测序。将测序正确的质粒转化至大肠杆菌BL21 (DE3)感受态细胞中,获得原核表达菌,菌液进行质粒DNA小量提取,对测序正确的质粒进行双酶切验证。

1.2.4 重组蛋白质的表达与纯化 将原核表达菌pET-28a-MYST-A划线培养,挑取单克隆菌株扩大再培养后进行诱导表达,加入终浓度为0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的IPTG,在22 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜诱导菌体表达His标签重组蛋白。将诱导表达的菌体高压破碎后收集上清,用His-Tag亲和层析法纯化His标签重组蛋白质。使用1 \times PBS透析,浓缩后进行SDS-PAGE和Western blot验证。

1.2.5 多克隆抗体的制备 将纯化的His标签重组蛋白质免疫小鼠,首免加入等量的弗氏完全佐剂,二免、三免和四免加入等量的弗氏不完全佐剂,其中四免的免疫量加倍。通过均质乳化仪乳化完全后,背部皮下多点注射。每次免疫间隔2周,四免后的第7天采血,分离血清。用间接ELISA法检测抗体效价,酶标仪测定每孔OD_{450nm}值,判定其血清效价。

1.2.6 多克隆抗体特异性检测 用细胞超声破碎仪将虫体破碎完全后离心,留上清制样,进行SDS-PAGE电泳,湿转法转印至PVDF膜,进行Western blot验证。5%脱脂乳37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭1 h,一抗使用重组蛋白质免疫实验动物后制得的多克隆抗体血清,稀释倍数为1:1 000倍,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育;二抗使用HRP(辣根过氧化物酶)标记的山羊抗小鼠IgG,稀释倍数1:1 000,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,充分洗涤后ECL显色。

1.2.7 亲和层析法纯化IgG 预处理Protein G Sepharose,将血清与磷酸钠按体积1:1混合,混合液与处理后的Protein G Sepharose混合加入2 mL离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 感作3 h。用Binding buffer洗涤,Elution Buffer洗脱,洗脱液立即用pH 9.0的Tris-HCl调节pH至7.0。测得浓度后制样,进行SDS-PAGE验证。

1.2.8 弓形虫MYST-A在细胞中的亚细胞定位 将12孔板内接种弓形虫速殖子的爬片取出,用PBS洗涤,多聚甲醛固定,TritonX-100透化,加入3%BSA在37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中封闭30 min,一抗为小鼠抗性血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,二抗为Alexa Fluor 488山羊抗小鼠IgG,37 $^{\circ}\text{C}$,避光孵育30 min,DAPI复染细胞核后,加入抗荧光猝灭剂,用指甲油封片。用荧光显微镜观察蛋白的定位情况。

1.2.9 弓形虫MYST-A在游离速殖子中的亚细胞定位 用组化笔在干净的载玻片上画一个圆圈,将纯化并稀释后的虫体滴加在玻片上,风干后用PBS洗涤,具体步骤同1.2.8,封片后用荧光显微镜观察蛋白在弓形虫体内的分布情况。

1.2.10 MYST-A对弓形虫蛋白质翻译后修饰的影响 将Vero细胞接种于6孔板内,待细胞长至80%接种弓形虫速殖子,5%CO₂,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱培养。待细胞开始破裂,虫体逸出时,在各个孔中按照0,5,10,25,50,100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度加入MYST-A IgG,在另一个六孔板中按照同样的条件加入阴性小鼠血清IgG作为阴性对照。直至虫体全部逸出,收集虫体,加入PMSF进行超声破碎,测得破碎后的浓度,制样后进行Western blot验证。调整蛋白质上样量用内参蛋白质抗体识别,使其蛋白量保持一致。用泛素化修饰酶抗体、丙二酰化修饰酶抗体、琥珀酰化修饰酶抗体、单甲基/二甲基化修饰酶抗体进行特异

性识别分析,显色后观察条带变化,判断不同浓度MYST-A抗体作用下对虫体PTMs的影响。

1.2.11 分子互作实验 用ALP2a-GST标签重组蛋白质作为分析物并测定浓度,用PBS将其分别稀释为0.1,0.2,0.4,0.8 μmol·L⁻¹。用MYST-A-His标签重组蛋白质作为固定物并测定浓度,用PBS稀释到30 μg·mL⁻¹。用GST蛋白质作为阴性分析物并用PBS将GST蛋白质分别稀释为0.1,0.2,0.4,0.8 μmol·L⁻¹,使用PBS作为空白对照,通过分子互作实验验证MYST-A与ALP2a是否发生相互作用。

2 结果与分析

2.1 MYST-A目的基因的克隆及重组原核表达质粒的构建

利用设计的MYST-A基因的特异性引物,以弓形虫RH株总RNA反转录合成的cDNA为模板,PCR扩增MYST-A基因片段。1%琼脂凝胶电泳结果可见特异性单一条带(图1A),片段大小为1 416 bp,与预期片段大小相符。将目的基因片段与表达载体连接后转化到BL21(DE3)中,提取质粒进行双酶切鉴定。电泳结果表明,与对照组(未进行酶切的完整质粒)相比,双酶切组有2条清晰的条带(图1B),大小与预期一致。

2.2 重组蛋白质的表达与纯化

利用IPTG诱导表达重组蛋白His-MYST-A,纯化后的重组蛋白质经SDS-PAGE和Western blot验证,蛋白纯度较高(图2),可用于后续实验。

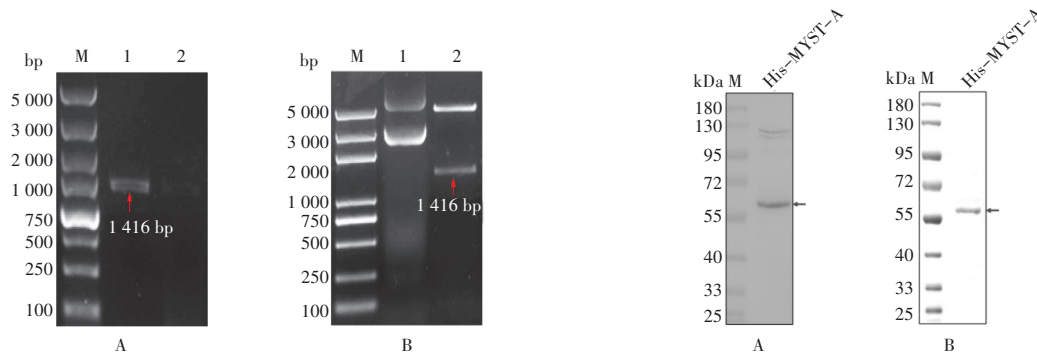


图1 MYST-A基因扩增(A)及重组原核表达质粒的双酶切验证(B)

Figure 1 MYST-A gene amplification(A) and double enzyme digestion of recombinant prokaryotic expression plasmid(B)

图2 重组蛋白质的SDS-PAGE和Western blot分析
A.SDS-PAGE analysis of His-MYST-A; B.Western blot analysis of His-MYST-A

Figure 2 SDS-PAGE and Western blot analysis of recombinant protein

2.3 免疫小鼠血清抗体效价检测结果

四免7 d后,分离小鼠血清,用间接ELISA法检测抗体效价(图3),酶标仪测定结果显示(待测血清OD_{450nm}-空白组OD_{450nm})/(阴性血清OD_{450nm}-空白组OD_{450nm})≥2.1,符合预期标准,即特异性抗性血清可用于后续实验。

2.4 抗体特异性检测结果

以破碎后的全虫蛋白质作为样品,用免疫后获得的血清作为一抗孵育,结果如图4,有特异性目的条带,证明免疫所得抗体的特异性良好,未出现非特异性结合,抗体可以用于后续实验。

2.5 纯化IgG的检测结果

通过Protein G Sepharose亲和层析法纯化多抗血清,透析后用SDS-PAGE检测纯化结果(图5A)。IgG的重链(50~60 kDa)和轻链(25 kDa)均很清晰,用纯化后的抗体识别全虫蛋白质,有特异性目的条带(图5B),证明抗体纯度较高。

2.6 亚细胞定位结果

间接免疫荧光实验观察MYST-A在弓形虫速殖子中的定位(图6)和在细胞内虫体中的定位(图7),发现MYST-A在虫体的细胞质内广泛分布。

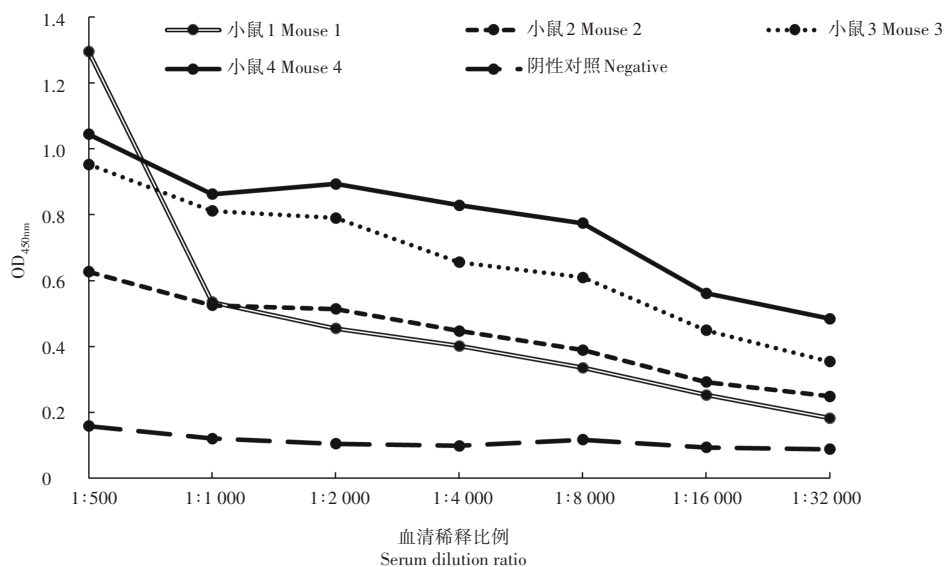


图3 小鼠血清抗体效价检测结果
Figure 3 Results of serum antibody titer detection in mice

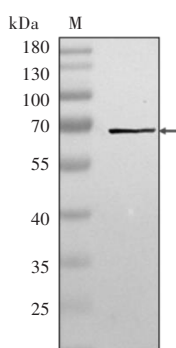


图4 MYST-A多克隆抗体特异性的检测
Figure 4 Detection of MYST-A polyclonal antibody specificity

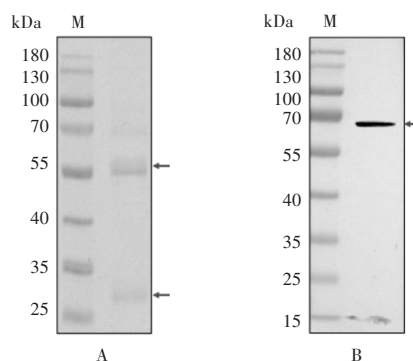


图5 纯化IgG的SDS-PAGE分析(A)及全虫蛋白验证(B)
Figure 5 SDS-PAGE analysis of purified IgG(A) and validation of whole parasite protein(B)

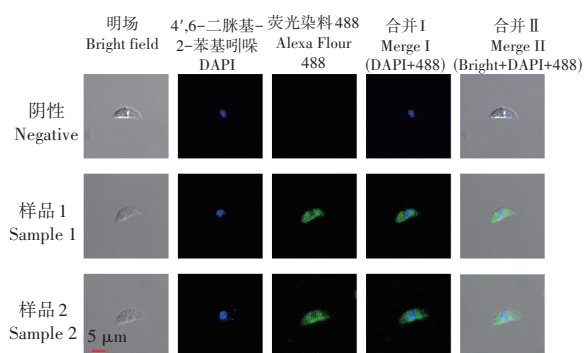


图6 MYST-A在RH株游离速殖子中的定位
Figure 6 Location of MYST-A in free tachyzoites of RH strain

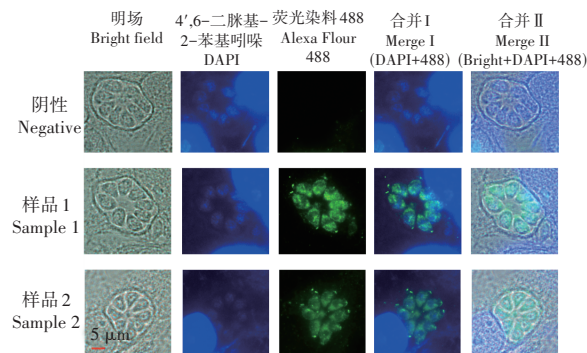
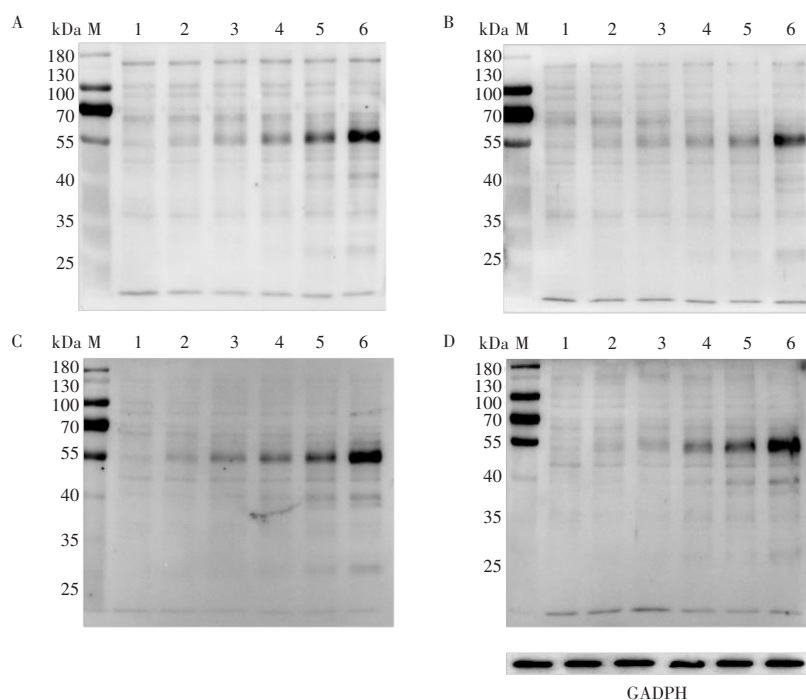


图7 MYST-A在RH株细胞内虫体中的定位
Figure 7 Location of MYST-A in intracellular of RH strain



A. 琥珀酰化; B. 单甲基/二甲基化; C. 泛素化; D. 丙二酰化; M. 蛋白标准质量; 泳道 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 泳道 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 泳道 3.10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 泳道 4.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 泳道 5.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 泳道 6.100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

A. Succinylation; B. Mono/Di-methylation; C. Ubiquitylation; D. Malonylation; M. Marker; Lane 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Lane 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Lane 3.10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Lane 4.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Lane 5.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Lane 6.100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

图8 MYST-A对弓形虫蛋白质翻译后修饰的影响

Figure 8 Effects of MYST-A on protein post-translational modifications of *Toxoplasma gondii*

2.7 MYST-A对弓形虫蛋白质翻译后修饰的影响

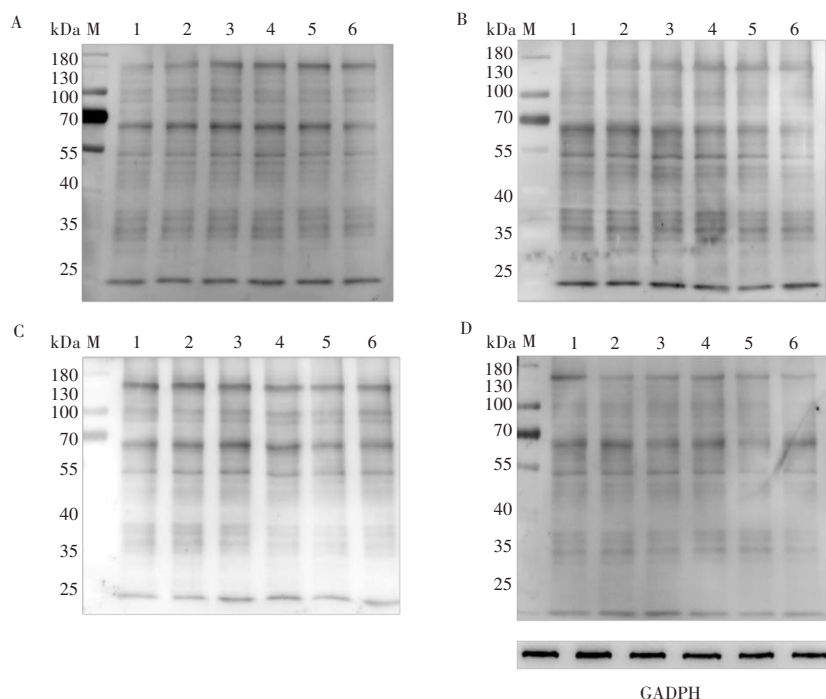
将内参蛋白GADPH调整一致后,保持上样量不变,用泛素化修饰酶抗体、丙二酰化修饰酶抗体、琥珀酰化修饰酶抗体、单甲基/二甲基化修饰酶抗体分别孵育,显色后发现,随着Anti-MYST-A IgG浓度的增加,泛素化、丙二酰化、琥珀酰化、单甲基/二甲基化修饰的总体水平(特别是55 KDa处)也显著增加,表明该蛋白质对刚地弓形虫蛋白质的泛素化、丙二酰化、琥珀酰化、单甲基/二甲基化修饰具有负调控作用(图8)。阴性对照无明显变化(图9)。

2.8 分子互作实验验证TgMYST-A与TgALP2a相互作用

纯化出ALP2a-GST重组蛋白质,将其稀释成0.1, 0.2, 0.4, 0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度以捕获结合到传感器的MYST-A-His重组蛋白质,并用GST蛋白质做阴性对照(图10和图11)。结果显示MYST-A-His重组蛋白质与ALP2a-GST重组蛋白质间 K_D 值是 1.54×10^{-7} ,而GST蛋白质与MYST-A-His重组蛋白质间的 K_D 值 $<1.0\times 10^{-12}$ (表1),表明ALP2a-GST重组蛋白质与MYST-A-His重组蛋白质间的亲和力比阴性对照GST蛋白质的结合力更强,两者发生相互作用。

3 讨论与结论

近年来,关于弓形虫蛋白质翻译后修饰方面的研究越来越多。PTMs在蛋白质加工和成熟过程中发挥着重要作用,可以改变蛋白质的理化性质,影响蛋白质的空间构象和稳定性^[14],它可以改变蛋白质的功能,不同的修饰类型或者相同的修饰类型作用于不同氨基酸上都会产生不同的功能变化。赖氨酸乳酸化修饰已经在多种生物的组蛋白和非组蛋白上被发现,它与糖酵解和线粒体氧化代谢密切相关^[15],参与调控肿瘤增殖、代谢、炎症以及组织损伤修复等重要生物学过程^[16-17];赖氨酸琥珀酰化修饰广泛参与代谢调控,比如线粒体代谢^[18],许多代谢酶都存在琥珀酰化修饰,它与炎症、癌症等疾病密切相关^[19];赖氨酸巴豆酰化修饰在各种生物体中普遍存在,已被揭示参与RNA加工、核苷酸代谢、染色质重组、蛋白质活性调节和蛋白质定位等生理过程,与急性肾损伤(AKI)^[20]、免疫球蛋白A(IgA)肾



A.琥珀酰化;B.单甲基/二甲甲基化;C.泛素化;D.丙二酰化;M.蛋白标准质量;泳道1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;泳道2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;泳道3.10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;泳道4.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;泳道5.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;泳道6.100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
 A.Succinylation; B.Mono/Di-methylation; C.Ubiqitylation; D.Malonylation; M.Marker; Lane 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Lane 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Lane 3.10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Lane 4.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Lane 5.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Lane 6.100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

图9 阴性对照

Figure 9 Negative control

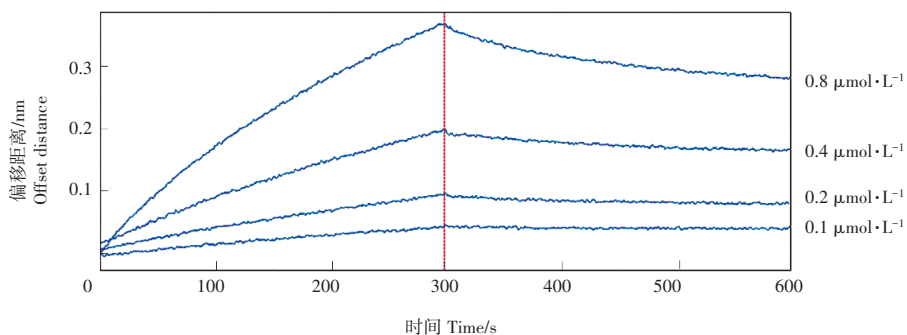


图10 MYST-A-His与 ALP2a-GST 相互作用结果

Figure 10 The result of MYST-A-His interacts with ALP2a-GST

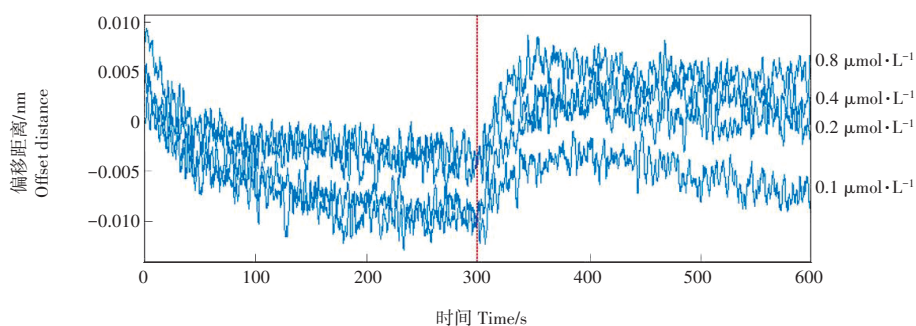


图11 MYST-A-His与GST蛋白质相互作用结果

Figure 11 The result of MYST-A-His interacts with GST protein

表1 MYST-A-His与 ALP2a-GST蛋白质结合动力学检测

Table 1 Binding kinetics of MYST-A-His to ALP2a-GST

变量 Variant	亲和力常数/(mol·L ⁻¹) K _D	结合速率常数/(L·mol ⁻¹ ·s ⁻¹) k _{on}	解离速率常数/s ⁻¹ k _{off}	拟合系数 Full R ²
ALP2a-GST	1.54×10 ⁻⁷	5.42×10 ³	5.38×10 ⁻⁴	0.993 0
GST-tag	<1.0×10 ⁻¹²	2.01×10 ²	<1.0×10 ⁻⁷	0.670 5

病^[21]、抑郁症^[22]和癌症^[23]密切相关,近几年成为生命科学领域研究热点;赖氨酸2-羟基异丁基酰化修饰与丙酮酸代谢、糖酵解等密切相关^[24-25],参与调节免疫球蛋白A肾病(IgAN)^[26]、生殖细胞分化等过程;赖氨酸丙二酰化修饰影响能量代谢、线粒体功能和脂肪酸合成等生物学过程^[27],在弓形虫毒力的调节中发挥着重要作用^[28],并且能够修饰组蛋白^[29],最近发现其与内皮细胞的血管生成相关^[30];泛素化修饰可以介导蛋白质降解^[31],调控蛋白质翻译过程^[32],调节宿主-病原体的相互作用^[33],参与调控细胞凋亡、细胞周期和信号转导等过程^[34];赖氨酸乙酰化修饰是一种丰富的翻译后修饰,它发生在多个细胞区室中数千种具有不同功能的蛋白质上^[35],可以影响染色质形态和基因表达,参与调控细胞周期^[36]、肿瘤发生、信号转导^[37]等生物学过程;目前关于单甲基/二甲基化修饰的相关研究较少,在弓形虫领域还未有报道,赖氨酸单甲基/二甲基化组蛋白与PcG结合,参与控制发育基因转录抑制的建立和维持^[38]。本课题组已发表的研究表明, Anti-MYST-A IgG减少了蛋白质乳酸化和乙酰化的总体水平,表明它对弓形虫蛋白质的乳酸化和乙酰化是正向调节的。值得注意的是,当 Anti-MYST-A IgG的浓度大于10 μg·mL⁻¹时,非组蛋白的2-羟基异丁基酰化和巴豆酰化修饰水平显著增加,这是值得深入探讨的问题。

本研究基于前期的研究结果,继续探索 MYST-A对弓形虫泛素化、琥珀酰化、丙二酰化、单甲基/二甲基化修饰的影响。通过抗体抑制翻译后修饰实验发现随着 Anti-MYST-A IgG浓度的增加,弓形虫非组蛋白的泛素化、琥珀酰化、单甲基/二甲基化、丙二酰化修饰总体水平显著增强(特别是55 kDa位置)。此结果表明,MYST-A蛋白质对刚地弓形虫非组蛋白的泛素化、琥珀酰化、单甲基/二甲基化、丙二酰化修饰具有负调控作用,这种调控可能是直接的也可能是间接的。

MYST家族在所有真核生物中广泛保守,乙酰转移酶结构域是其标志性特征,该结构域是由几种不同的多蛋白复合物组成。已有研究证明 MYST家族中 MYST-B可以进入弓形虫的核并乙酰化组蛋白,促进 ATM 激酶介导的弓形虫 DNA 损伤反应^[12]。组蛋白 H3 和 H4 的乙酰化伴随着弓形虫中特定阶段的基因激活^[39],MYST-A、MYST-B等酶复合物可能参与介导该阶段活动^[11]。顶端复合体含有大量的肌动蛋白样蛋白,它们是肌动蛋白超家族的成员,已有研究提出肌动蛋白是作为细胞核中染色质重塑和组蛋白乙酰转移酶(HAT)复合物的的重要组成部分^[40]。Actin like protein ALP2a是一种肌动蛋白样蛋白,本课题组未发表的结果显示该蛋白可能对弓形虫入侵、黏附、识别宿主细胞以及虫体发育繁殖产生影响。本研究通过分子互作实验验证蛋白质 MYST-A与 ALP2a相互作用,ALP2a作为肌动蛋白的一员,极有可能与蛋白质 MYST-A形成组蛋白乙酰转移酶(HAT)复合物,共同参与组蛋白的翻译后修饰,这还需要进一步探究。

本研究表明,弓形虫组蛋白乙酰转移酶 MYST-A对刚地弓形虫蛋白质的泛素化、琥珀酰化、单甲基/二甲基化、丙二酰化修饰具有负调控作用,且当 Anti-MYST-A IgG的浓度大于10 μg·mL⁻¹时,调控作用最为显著。发现 MYST-A与 ALP2a相互作用,可能通过形成组蛋白乙酰转移酶(HAT)复合物,共同参与组蛋白的翻译后修饰。研究结果为新型弓形虫疫苗研制及药物靶标的筛选提供一定的参考价值 and 理论依据。

参考文献:

- [1] BLACK M W, BOOTHROYD J C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 2000, 64(3): 607-623.
- [2] MENDEZ O A, KOSHY A A. *Toxoplasma gondii*: Entry, association, and physiological influence on the central nervous system[J]. PLoS Pathogens, 2017, 13(7): e1006351.
- [3] SMITH N C, GOULART C, HAYWARD J A, et al. Control of human toxoplasmosis[J]. International Journal for Parasitology, 2021, 51(2/3): 95-121.

- [4] LIMA T S, LODOEN M B. Mechanisms of human innate immune evasion by *Toxoplasma gondii*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9:103.
- [5] ALMERIA S, DUBEY J P. Foodborne transmission of *Toxoplasma gondii* infection in the last decade. An overview[J]. *Research in Veterinary Science*, 2021, 135:371–385.
- [6] FERNÁNDEZ-ESCOBAR M, SCHARES G, MAKSIMOV P, et al. *Toxoplasma gondii* genotyping: A closer look into Europe [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12:842595.
- [7] MACEK B, FORCHHAMMER K, HARDOUIN J, et al. Protein post-translational modifications in bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(11):651–664.
- [8] 尹德琦, 魏子巍, 张义伟, 等. 弓形虫蛋白质翻译后修饰研究进展[J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52(11):2995–3005.
- [9] YAKUBU R R, WEISS L M, SILMON DE MONERRI N C. Post-translational modifications as key regulators of api complexan biology: insights from proteome-wide studies[J]. *Molecular Microbiology*, 2018, 107(1):1–23.
- [10] YANG X J. The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(3):959–976.
- [11] SMITH A T, TUCKER-SAMARAS S D, FAIRLAMB A H, et al. MYST family histone acetyltransferases in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2005, 4(12):2057–2065.
- [12] VONLAUFEN N, NAGULESWARAN A, COPPENS I, et al. MYST family lysine acetyltransferase facilitates ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase-mediated DNA damage response in *Toxoplasma gondii*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(15):11154–11161.
- [13] WAPENAAR H, DEKKER F J. Histone acetyltransferases: challenges in targeting bi-substrate enzymes[J]. *Clinical Epigenetics*, 2016, 8:59.
- [14] WITZE E S, OLD W M, RESING K A, et al. Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry[J]. *Nature Methods*, 2007, 4(10):798–806.
- [15] BROOKS G A. Lactate shuttles in nature[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2002, 30(2):258–264.
- [16] ZHANG D, TANG Z Y, HUANG H, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation[J]. *Nature*, 2019, 574(7779):575–580.
- [17] WANG J Z, YANG P L, YU T Y, et al. Lactylation of PKM2 suppresses inflammatory metabolic adaptation in pro-inflammatory macrophages[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2022, 18(16):6210–6225.
- [18] RARDIN M J, HE W J, NISHIDA Y, et al. SIRT5 regulates the mitochondrial lysine succinylome and metabolic networks[J]. *Cell Metabolism*, 2013, 18(6):920–933.
- [19] WANG F, WANG K, XU W, et al. SIRT5 desuccinylates and activates pyruvate kinase M2 to block macrophage IL-1 β production and to prevent DSS-induced colitis in mice[J]. *Cell Reports*, 2017, 19(11):2331–2344.
- [20] RUIZ-ANDRES O, SANCHEZ- NIÑO M D, CANNATA-ORTIZ P, et al. Histone lysine-crotonylation during acute kidney injury in mice[J]. *Disease Models & Mechanisms*, 2016, 9(6):633–645.
- [21] LIN H, TANG D E, XU Y, et al. Quantitative analysis of protein crotonylation identifies its association with immunoglobulin A nephropathy[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2020, 21(3):1242–1250.
- [22] LIU Y Q, LI M H, FAN M H, et al. Chromodomain Y-like protein-mediated histone crotonylation regulates stress-induced depressive behaviors[J]. *Biological Psychiatry*, 2019, 85(8):635–649.
- [23] WAN J H, LIU H Y, MING L. Lysine crotonylation is involved in hepatocellular carcinoma progression[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 111:976–982.
- [24] HUANG H, TANG S, JI M, et al. EP300-mediated lysine 2-hydroxyisobutyrylation regulates glycolysis[J]. *Molecular Cell*, 2018, 70(4):663–678.
- [25] NI J Y, ZHANG H, WANG X D, et al. Rg3 regulates myocardial pyruvate metabolism via P300-mediated dihydrolipoamide dehydrogenase 2-hydroxyisobutyrylation in TAC-induced cardiac hypertrophy[J]. *Cell Death & Disease*, 2022, 13(12):1073.
- [26] HUANG S Y, ZHENG F P, LIN H, et al. Quantitative proteomics analysis of lysine 2-hydroxyisobutyrylation in IgA nephropathy[J]. *Clinical Proteomics*, 2021, 18(1):7.
- [27] COLAK G, POUGOVKINA O, DAI L Z, et al. Proteomic and biochemical studies of lysine malonylation suggest its malonic aciduria-associated regulatory role in mitochondrial function and fatty acid oxidation[J]. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 2015, 14(11):3056–3071.
- [28] NIE L B, LIANG Q L, WANG M, et al. Global profiling of protein lysine malonylation in *Toxoplasma gondii* strains of differ-

- ent virulence and genetic backgrounds[J].*PLoS Neglected Tropical Diseases*,2022,16(5):e0010431.
- [29] NIE L T,SHUAI L,ZHU M R,et al.The landscape of histone modifications in a high-fat diet-induced obese (DIO) mouse model[J].*Molecular & Cellular Proteomics:MCP*,2017,16(7):1324-1334.
- [30] BRUNING U,MORALES-RODRIGUEZ F,KALUCKA J,et al.Impairment of angiogenesis by fatty acid synthase inhibition involves mTOR malonylation[J].*Cell Metabolism*,2018,28(6):866-880.
- [31] AKUTSU M,DIKIC I,BREMM A.Ubiquitin chain diversity at a glance[J].*Journal of Cell Science*,2016,129(5):875-880.
- [32] MARTÍNEZ-FÉRRIZ A,FERRANDO A,FATHINAJAFABADI A,et al.Ubiquitin-mediated mechanisms of translational control[J].*Seminars in Cell & Developmental Biology*,2022,132:146-154.
- [33] MUKHERJEE R,DIKIC I.Regulation of host-pathogen interactions via the ubiquitin system[J].*Annual Review of Microbiology*,2022,76:211-233.
- [34] TRUJILLO M.Ubiquitin signalling:controlling the message of surface immune receptors[J].*New Phytologist*,2021,231(1):47-53.
- [35] RAO R S P,THELEN J J,MIERNYK J A.Is Lys-Nε-acetylation the next big thing in post-translational modifications?[J].*Trends in Plant Science*,2014,19(9):550-553.
- [36] ALONSO V L,CARLONI M E, GONÇALVES C S,et al.Alpha-tubulin acetylation in *Trypanosoma cruzi*:A dynamic instability of microtubules is required for replication and cell cycle progression[J].*Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*,2021,11:642271.
- [37] YANG X J.Lysine acetylation and the bromodomain:a new partnership for signaling[J].*BioEssays:News and Reviews in Molecular,Cellular and Developmental Biology*,2004,26(10):1076-1087.
- [38] ERYILMAZ J,PAN P,AMAYA M F,et al.Structural studies of a four-MBT repeat protein MBTD1[J].*PLoS One*,2009,4(10):e7274.
- [39] SAKSOUK N,BHATTI M M,KIEFFER S,et al.Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*[J].*Molecular and Cellular Biology*,2005,25(23):10301-10314.
- [40] OLAVE I A,RECK-PETERSON S L,CRABTREE G R.Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling [J].*Annual Review of Biochemistry*,2002,71:755-781.

[责任编辑 马迎杰]