

学校编码: 10384  
学号: 20520101151539

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_  
UDC\_\_\_\_\_

# 厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

## 两种重要蛋白(结核分枝杆菌TPP和人源RKIP) 的生化性质及其与配体的相互作用

**Biochemical Characterization and Ligand-binding  
Properties of Two Important Proteins (*Mycobacterium  
Tuberculosis* TPP and Human RKIP)**

石立娜

指导教师姓名: 林东海 教授

专业名称: 化学生物学

论文提交日期: 2013年 月 日

论文答辩时间: 2013年 月 日

学位授予日期: 2013年 月 日

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评阅人: \_\_\_\_\_

2013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

### 第一部分 结核分枝杆菌 TPP 蛋白的生化性质及其与配体的相互作用

摘 要.....	1
Abstract.....	2
1 前言.....	3
1.1 结核病概况.....	3
1.1.1 结核分枝杆菌的生物学特性.....	3
1.1.2 结核病疫情现状.....	3
1.2 海藻糖.....	4
1.2.1 海藻糖的分布及生物学特性.....	4
1.2.2 海藻糖与结核病.....	5
1.2.3 海藻糖合成途径.....	5
1.3 6-磷酸海藻糖磷酸酶.....	6
1.4 本课题的研究目的与意义.....	6
2 材料与方法.....	7
2.1 实验材料.....	7
2.1.1 主要试剂及耗材.....	7
2.1.2 主要仪器.....	7
2.1.3 主要试剂配制.....	8
2.1.4 菌株和质粒.....	9
2.2 实验方法.....	9
2.2.1 重组蛋白表达条件的摸索.....	9
2.2.2 TPP 融合蛋白的大量表达及纯化.....	10
2.2.3 蛋白质浓度的测定.....	11
2.2.4 蛋白质的质谱分析.....	11
2.2.5 TPP 蛋白的酶活测定方法.....	11
2.2.6 TPP 蛋白的圆二色谱分析.....	12
2.2.6.1 二级结构分析.....	12
2.2.6.2 结构稳定性分析.....	12
2.2.7 用 ITC 研究 TPP 蛋白与 6-磷酸海藻糖的相互作用.....	12
2.2.8 TPP 蛋白晶体制备.....	12
2.2.9 C 端结构域的制备.....	13

2.2.9.1 二级结构预测	13
2.2.9.2 目的片段的扩增	14
2.2.9.3 载体和插入片段的双酶切	15
2.2.9.4 连接反应	15
2.2.9.5 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 和 BL21 (DE3) 感受态细胞的制备	15
2.2.9.6 重组质粒的转化	16
2.2.9.7 单克隆挑取及鉴定	16
2.2.9.8 重组蛋白的小量表达	16
2.2.9.9 重组蛋白的大量制备	17
2.2.10 TPP 蛋白的结构模拟及结合位点预测	17
2.2.10.1 TPP 蛋白的结构模拟	17
2.2.10.2 TPP ( <i>otsB2/Rv3372</i> ) 与 TPP (PDB ID 1U02) 序列比对	17
2.2.10.3 TPP 蛋白与 6-磷酸海藻糖的分子对接	17
2.2.11 突变体 TPP (D147A)、TPP (D149A)、TPP (G186A)、TPP (R187A)、 TPP (R291A)、TPP (E295A)、TPP (D330A) 的构建	18
2.2.11.1 基因定点突变	18
2.2.11.2 TPP 突变体的小量表达和测序鉴定	19
2.2.11.3 融合蛋白的大量表达及纯化	19
<b>3 结果与讨论</b>	<b>20</b>
3.1 TPP 蛋白的表达纯化	20
3.1.1 TPP 蛋白表达条件的摸索	20
3.1.2 TPP 蛋白的大量制备	20
3.2 不同浓度 $Mg^{2+}$ 对 TPP 活性的影响	22
3.3 TPP 的二级结构表征	23
3.4 TPP 蛋白的结构稳定性分析	24
3.5 TPP 蛋白与底物 6-磷酸海藻糖相互作用	24
3.6 TPP 蛋白的晶体制备	26
3.7 C 端结构域的制备	26
3.7.1 二级结构预测	26
3.7.2 不同 C 端结构域片段的构建	28
3.7.3 不同 C 端结构域片段的表达及纯化	28
3.8 TPP 蛋白的结构模拟及结合位点预测	31
3.9 突变体 TPP (D147A)、TPP (D149A)、TPP (G186A)、TPP (R187A)、 TPP (R291A)、TPP (E295A)、TPP (D330A) 的构建及功能考察	33
3.9.1 TPP 突变体的制备	33
3.9.2 TPP 突变体的酶活性	37
3.9.3 $Mg^{2+}$ 对 TPP (D147A)、TPP (D149A)、TPP (D330A) 二级结构的影响	37
<b>4 总结</b>	<b>39</b>
<b>参考文献</b>	<b>40</b>

## 第二部分 人源 RKIP 及突变体 RKIP (S153E) 的生化性质及其与配体的相互作用

摘要.....	43
Abstract.....	44
1 前言.....	45
1.1 PEBP 家族蛋白.....	45
1.2 人 RKIP 基因和表达定位.....	45
1.3 RKIP 蛋白的结构特点.....	46
1.4 RKIP 蛋白与信号通路.....	47
1.4.1 RKIP 调控 MAPK (Ras/Raf1/MEK/ERK) 信号通路.....	47
1.4.2 RKIP 调控 GPCR (G-protein coupled receptor) 信号通路.....	48
1.4.3 RKIP 调控 NF- $\kappa$ B 信号通路.....	49
1.5 RKIP 蛋白与疾病.....	50
1.5.1 RKIP 与阿尔茨海默氏症 (Alzheimer's disease, AD).....	50
1.5.2 RKIP 与雄性生育.....	50
1.5.3 RKIP 与肿瘤转移.....	51
1.5.4 RKIP 与糖尿病肾病.....	52
1.5.5 RKIP 的其他生物学功能.....	52
1.6 本课题的研究目的与意义.....	53
2 材料与方法.....	55
2.1 实验材料.....	55
2.1.1 实验所用的主要试剂、耗材、仪器.....	55
2.1.2 试剂配制.....	55
2.1.3 菌株和质粒.....	56
2.2 实验方法.....	56
2.2.1 融合蛋白的大量制备.....	56
2.2.1.1 RKIP 及 RKIP (S153E) 的表达纯化.....	56
2.2.1.2 GRK2 (1-185) 的表达纯化.....	56
2.2.1.3 Raf1 (1-147) 的表达纯化.....	57
2.2.1.4 GST 蛋白的表达和纯化.....	57
2.2.2 RKIP 及 RKIP (S153E) 的圆二色谱分析.....	57
2.2.2.1 二级结构分析.....	57
2.2.2.2 热稳定性分析.....	57
2.2.2.3 脲稳定性分析.....	58
2.2.3 同位素标记样品的制备.....	58
2.2.4 NMR 实验与数据处理.....	58
2.2.5 荧光滴定实验.....	58

2.2.6 蛋白质相互作用 .....	59
2.2.7 突变体 RKIP (D70A)、RKIP (D72A)、RKIP (E83A)、RKIP (Y120A)、 RKIP (Y181A) 的构建 .....	59
2.2.7.1 基因定点突变 .....	59
2.2.7.2 融合蛋白的小量表达和测序鉴定 .....	61
2.2.7.3 融合蛋白的大量表达及纯化 .....	61
<b>3 结果与讨论 .....</b>	<b>62</b>
3.1 RKIP 及 RKIP (S153E) 的表达纯化 .....	62
3.2 RKIP 及 RKIP (S153E) 的二级结构表征 .....	63
3.3 RKIP 及 RKIP (S153E) 的稳定性分析 .....	64
3.4 RKIP 与 RKIP (S153E) 的三级结构差异 .....	65
3.5 RKIP 及 RKIP (S153E) 蛋白与配体 PE 的相互作用 .....	66
3.6 S153E 突变对 RKIP 与 Raf1、GRK2 作用的影响 .....	67
3.7 突变体 RKIP (D70A)、RKIP (D72A)、RKIP (E83A)、RKIP (Y120A)、 RKIP (Y181A) 的构建 .....	68
<b>4 总结 .....</b>	<b>72</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>73</b>
<b>在学期间发表的论文 .....</b>	<b>81</b>
<b>致谢 .....</b>	<b>82</b>

## Contents

### Part 1 Biochemical Characterization and Ligand-binding Properties of Trehalose-6-phosphate Phosphatase from *Mycobacterium Tuberculosis*

<b>Abstract .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Introduction.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Overview of Tuberculosis .....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Biological characteristics of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	3
1.1.2 Tuberculosis epidemic .....	3
<b>1.2 Trehalose .....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Distribution and biological characteristics of trehalose.....	4
1.2.2 Relations of trehalose and tuberculosis .....	5
1.2.3 Syntyetic approaches of trehalose.....	5
<b>1.3 Trehalose-6-phosphate phosphatase.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Purpose and significance of the research.....</b>	<b>6</b>
<b>2 Materials and methods .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Materials .....</b>	<b>7</b>
2.1.1 Main reagents and supplies.....	7
2.1.2 Main instruments .....	7
2.1.3 Preparation for solutions.....	8
2.1.4 Strains and vectors .....	9
<b>2.2 Methods .....</b>	<b>9</b>
2.2.1 Exploration of the expression conditions.....	9
2.2.2 Large scale protein expression and purification .....	10
2.2.3 Measurement of the protein concentration .....	11
2.2.4 Mass spectrometry analysis of the protein.....	11
2.2.5 Method for determinating enzyme activity.....	11
2.2.6 Circular Dichroism analysis of TPP .....	12
2.2.6.1 Secondary structure analysis.....	12
2.2.6.2 Urea-induced unfolding transition experiments.....	12
2.2.7 ITC study of interaction between TPP and trehalose-6-P.....	12
2.2.8 Crystallization of the TPP protein.....	12
2.2.9 Preparation of the C-terminal domain.....	13
2.2.9.1 Secondary structure prediction .....	13
2.2.9.2 PCR.....	14



2.2.9.3 Double enzyme digestion.....	15
2.2.9.4 Ligation.....	15
2.2.9.5 Preparation of the competent cell.....	15
2.2.9.6 Transformation.....	16
2.2.9.7 Monoclonal selection and sequencing.....	16
2.2.9.8 Small scale protein expression.....	16
2.2.9.9 Large scale protein preparation.....	17
2.2.10 Structure modeling and binding site prediction.....	17
2.2.10.1 Structure modeling.....	17
2.2.10.2 Sequence alignment of TPP ( <i>otsB2/Rv3372</i> ) and TPP (PDB ID 1U02).....	17
2.2.10.3 Molecular docking of TPP and trehalose-6-P.....	17
2.2.11 Preparation of TPP(D147A), TPP(D149A), TPP(G186A), TPP(R187A), TPP(R291A), TPP(E295A) and TPP(D330A).....	18
2.2.11.1 Site-directed mutation.....	18
2.2.11.2 Small scale expression and sequencing.....	19
2.2.11.3 Large scale expression and purification.....	19
<b>3 Results and discussion .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Expression and purification of TPP .....</b>	<b>20</b>
3.1.1 Expression conditions exploration.....	20
3.1.1 Preparation of TPP.....	20
<b>3.2 Influence of Mg<sup>2+</sup> on the enzyme activity of TPP.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3 Secondary structure of TPP .....</b>	<b>23</b>
<b>3.4 Structural stability of TPP against urea-induced unfolding .....</b>	<b>24</b>
<b>3.5 Interaction between TPP and trehalose-6-P .....</b>	<b>24</b>
<b>3.6 Crystallization of TPP .....</b>	<b>26</b>
<b>3.7 Preparation of C-terminal domain.....</b>	<b>26</b>
3.7.1 Secondary structure predicted.....	26
3.7.2 PCR of fragments in C-terminal domain.....	28
3.7.3 Expression and purification of fragments in C-terminal domain.....	28
<b>3.8 Structural model of TPP and binding site prediction .....</b>	<b>31</b>
<b>3.9 Preparation and function investigation of TPP(D147A), TPP(D149A), TPP(G186A), TPP(R187A), TPP(R291A), TPP(E295A) and TPP(D330A) .....</b>	<b>33</b>
3.9.1 Preparation.....	33
3.9.2 Enzyme activity.....	37
3.9.3 Influence of Mg <sup>2+</sup> on the secondary structure of TPP(D147A), TPP(D149A) and TPP(D330A).....	37
<b>4 Summary.....</b>	<b>39</b>
<b>References.....</b>	<b>40</b>

## Part 2 Biochemical Characterization and Ligand-binding

### Properties of human RKIP and RKIP(S153E)

<b>Abstract .....</b>	<b>43</b>
<b>1 Introduction.....</b>	<b>45</b>
<b>1.1 PEBP family proteins.....</b>	<b>45</b>
<b>1.2 Expression and localization of human RKIPgene.....</b>	<b>45</b>
<b>1.3 Structural characteristics of RKIP.....</b>	<b>46</b>
<b>1.4 Relations between RKIP and signalling pathways.....</b>	<b>47</b>
1.4.1 MAPK(Ras/Raf1/MEK/ERK) pathway.....	47
1.4.2 GPCR(G-protein coupled receptor) pathway.....	48
1.4.3 NF- $\kappa$ B pathway.....	49
<b>1.5 Relations between RKIP and diseases.....</b>	<b>50</b>
1.5.1 Alzheimer's disease (AD).....	50
1.5.2 Male fertility .....	50
1.5.3 Tumor metastasis .....	51
1.5.4 Diabetic Nephropathy .....	52
1.5.5 Other biological functions.....	52
<b>1.6 Purpose and significance of the research.....</b>	<b>53</b>
<b>2 Materials and methods .....</b>	<b>55</b>
<b>2.1 Materials .....</b>	<b>55</b>
2.1.1 Reagents, supplies and instruments .....	55
2.1.2 Preparation for solutions .....	55
2.1.3 Strains and vectors .....	56
<b>2.2 Methods .....</b>	<b>56</b>
2.2.1 Preparation of the recombinant proteins.....	56
2.2.1.1 Expression and purification of RKIP and RKIP(S153E).....	56
2.2.1.2 Expression and purification of GRK2(1-185) .....	56
2.2.1.3 Expression and purification of Raf1(1-147).....	57
2.2.1.4 Expression and purification of GST .....	57
2.2.2 Circular Dichroism analysis of RKIP and RKIP(S153E).....	57
2.2.2.1 Secondary structure analysis.....	57
2.2.2.2 Thermal-induced unfolding transition experiments.....	57
2.2.2.3 Urea-induced unfolding transition experiments.....	58
2.2.3 Preparation for $^{15}\text{N}$ labelled protein samples.....	58
2.2.4 NMR experiments and data processing .....	58
2.2.5 Fluorescence titration experiments .....	58
2.2.6 Protein interactions .....	59
2.2.7 Preparation of RKIP(D70A), RKIP(D72A), RKIP(E83A), RKIP(Y120A) and RKIP(Y181A).....	59

2.2.7.1 Site-directed mutation.....	59
2.2.7.2 Small scale expression and sequencing.....	61
2.2.7.3 Large scale expression and purification.....	61
<b>3 Results and discussion .....</b>	<b>62</b>
3.1 Expression and purification of RKIP and RKIP(S153E).....	62
3.2 Secondary structures of RKIP and RKIP(S153E).....	63
3.3 Structural stabilities of RKIP and RKIP(S153E).....	64
3.4 Tertiary structure difference between RKIP and RKIP(S153E).....	65
3.5 PE- binding affinity comparison of RKIP and RKIP(S153E).....	66
3.6 Influences of S153E mutation on the interactions of RKIP with Raf1 and GRK2.....	67
3.7 Preparation of RKIP(D70A), RKIP(D72A), RKIP(E83A), RKIP(Y120A) and RKIP(Y181A).....	68
<b>4 Summary.....</b>	<b>72</b>
<b>References.....</b>	<b>73</b>
<b>Publications during graduate study.....</b>	<b>81</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>82</b>

## 第一部分 结核分枝杆菌 TPP 蛋白的生化性质及其与配体的相互作用

### 摘要

6-磷酸海藻糖磷酸酶 (trehalose-6-phosphate phosphatase, TPP) 是结核分枝杆菌生长的必需蛋白, 可做为高通量筛选抗结核药物的潜在药靶。本部分成功制备了结核分枝杆菌的 TPP (*otsB2/Rv3372*) 蛋白。远紫外 CD 光谱实验表明 TPP 的二级结构由 54.92%  $\alpha$ -helix、8.61%  $\beta$ -sheet 和 36.47% coil 构成, 且结构稳定性较低 ( $C_m = 2.099 \pm 0.134$  M)。ITC 实验发现, 在  $Mg^{2+}$  存在下, TPP 可以与底物 6-磷酸海藻糖以摩尔比 1:1 发生中等相互作用 ( $K_d = 39.52 \pm 1.78$   $\mu$ M)。因为尚未得到 TPP 蛋白或片段的晶体, 我们通过软件 I-TASSER 模拟了 TPP 的三维结构。TPP 蛋白由水解酶结构域、帽型结构域和 N 端结构域组成。此外, 一个  $Mg^{2+}$  通过与 Asp147、Asp149、Asp330 成键, 存在于结构模型中。进一步利用 MOE 软件的 Simulations/Dock 工具进行分子对接, 结果表明水解酶结构域与帽形结构域表面形成的空腔即为 TPP 与  $Mg^{2+}$  及 6-磷酸海藻糖作用的配体结合口袋。Asp149、Gly186、Arg187、Arg291、Glu295 可能是 TPP 结合底物的关键氨基酸。通过基因定点突变, 我们验证了这七个残基都是 TPP 结合  $Mg^{2+}$  或 6-磷酸海藻糖的关键位点。本部分为进一步研究 TPP 的结构、功能及相关的药物开发奠定了基础。

**关键词:** TPP; 6-磷酸海藻糖; CD; ITC; 结构模拟

## Abstract

Trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP) is an enzyme essential for the growth of mycobacteria, which has been identified to be a target for potential antituberculosis drug. In the present work, we expressed the recombinant TPP protein from *Mycobacterium tuberculosis* (*otsB2/Rv3372*). Far-UV CD experiments indicated that the secondary structure of TPP was composed of 54.92%  $\alpha$ -helix, 8.61%  $\beta$ -sheet and 36.47% coil, with a lower structural stability ( $C_m = 2.099 \pm 0.134$  M). Ligand binding assay by ITC demonstrated that the recombinant TPP protein could bind with trehalose-6-P in the presence of  $Mg^{2+}$  ( $K_d = 39.52 \pm 1.78$   $\mu$ M) with a molar ratio of 1:1. As we have not obtained the crystal of either the whole TPP protein or the fragments of the TPP protein, we modeled the 3D structure of TPP by I-TASSER, which indicates that the TPP protein was composed of a hydrolase domain, a cap domain and an N-terminal domain. In addition, there was an  $Mg^{2+}$  in the model, coordinated by three conserved residues, Asp147, Asp149 and Asp330. Flexible docking was further conducted by using the Simulations/Dock module of the MOE software. The binding pocket of TPP for both trehalose-6-P and  $Mg^{2+}$  was determined, which was located on the interface between the hydrolase and the cap domains. Residues including Asp149, Gly186, Arg187, Arg291, Glu295, were identified to be the key residues for TPP binding with trehalose-6-P. All the seven crucial residues binding with trehalose-6-P or  $Mg^{2+}$  were further verified by site-directed mutagenesis. This work may lay the basis for further structural and functional studies of TPP and development of TPP-related vaccine.

**Key Words:** TPP; trehalose- 6-P; CD; ITC; structure modeling

# 1 前言

## 1.1 结核病概况

结核病是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 引起的一种传染病, 在世界范围广泛流行, 是当今世界上由单一致病菌感染引起的死亡率最高的疾病, 严重威胁着人类的健康, 被称为痨病和“白色瘟疫”。

### 1.1.1 结核分枝杆菌的生物学特性

结核分枝杆菌属放线菌目, 分枝杆菌科, 分枝杆菌属, 是一种细长杆状, 呈分枝状排列的原核微生物, 长 1~4  $\mu\text{m}$ , 宽 0.5  $\mu\text{m}$ , 形态稍弯曲, 常有分枝倾向。结核分枝杆菌为专性需氧菌, 营养要求很高, 且生长缓慢, 繁殖一代需要 15~20 h。结核分枝杆菌具有抗酸染色特性, 可被 Ziehl-Neelsen 抗酸染成红色, 而其它非抗酸性细菌及细胞浆质等则被染成蓝色。据此可从结核病人的痰液中经抗酸染色涂片发现, 并可与其他细菌相区分。结核分枝杆菌有四种, 即人型结核菌、牛型结核菌、非洲分枝杆菌和田鼠分枝杆菌。前三种能对人类致病, 第四种不能对人类致病<sup>[1, 2, 3]</sup>。

结核分枝杆菌可侵及多个脏器, 以往公认的结核病传播途径有呼吸道、消化道、皮肤和子宫, 但主要是通过消化道。由于在肠道中有大量正常菌群寄居, 结核分枝杆菌必须通过竞争才能生存并和易感细胞粘附。肺泡中无正常菌群, 结核分枝杆菌可通过飞沫或含菌尘埃的吸入的方式进入人体, 故肺结核较为多见。结核菌的毒力一般分为强、中、弱三个档次。结核菌的毒力强弱, 直接影响结核病的发病、流行和预防工作。我国结核菌大部分为中、强力菌株<sup>[2, 3]</sup>。

### 1.1.2 结核病疫情现状

结核病是一种古老的疾病, 在抗结核药物出现之前的漫长岁月里, 结核病一直被视为不治之症, 吞噬了无数人的生命。20世纪70年代到80年代, 随着抗结核药物的相继出现、人们生活水平的提高、卫生设施的改善, 全球结核病的发病率曾降到较低的水平, 以至于许多人乐观的认为结核病就会被消灭。然而随着耐药性结核杆菌的出现, 使得结核病在沉寂了一段时间后死灰复燃, 再度爆发。而且

结核杆菌可以和艾滋病病毒（HIV）并发感染，更加剧了其发病率和危害性。据世界卫生组织（WHO）的统计，由于耐药结核杆菌的流行，每年有880万人被感染，300万人死亡，而且80%以上的患者都是15~49岁的青壮年。迄今为止，全球有1/3的人口感染了潜伏状态的结核杆菌，其中5000万人感染的是耐药的结核杆菌。高耐药和耐多药菌株的不断扩散，给结核病的控制带来困难，结核病疫情险峻<sup>[4,5]</sup>。

中国是全球 22 个结核病高负担国家之一，据我国第四次全国结核病流行病学调查显示，中国的结核病疫情呈现患病率高、死亡率高、耐药率高、年递降率低的特点<sup>[6]</sup>。我国结核病防治工作的形势非常严峻，任务艰巨。解决日益严重的高耐药性和耐多药性结核病的有效途径是开发新作用机制的抗生素。

## 1.2 海藻糖

许多抗结核药物例如异烟肼、乙硫异烟胺、乙胺丁醇等都是靶向细胞壁合成的，因此，这一通路上的酶便成为药物靶位的首选<sup>[7]</sup>。此外，分枝杆菌表面的许多蛋白、脂类和糖是其特有的，与分枝杆菌的致病性相关，因此可以作为抗结核的候选药物靶标<sup>[8]</sup>。

### 1.2.1 海藻糖的分布及生物学特性

海藻糖是 D-葡萄糖通过  $\alpha, \alpha$ -1, 1 糖苷键连接的二糖。最初是从生活在沙漠中的一种甲虫蛹里分离得到的，后来发现它被很多不同的生物体包括细菌、酵母、真菌、植物、昆虫及低等无脊椎动物合成利用。海藻糖表现出很多不同的功能。例如，在真菌和昆虫内，海藻糖可作为葡萄糖用来供能或作为孢子萌发所需要的碳源；在分枝杆菌和棒状杆菌中，海藻糖在结构上有一定作用，是细胞壁上与多种脂肪酸发生酰化反应的糖脂的关键组成部分<sup>[9,10]</sup>。此外，海藻糖可能让结核分枝杆菌潜伏在巨噬细胞中并且生存下去，或在胁迫环境下保护它们免受影响。海藻糖还具有独特的生物学特性：当生物细胞处于胁迫环境如高温、高渗透压、有毒环境、脱水等，海藻糖会在细胞胞浆内迅速聚集，对生物体细胞的膜结构、蛋白质、DNA 等发挥保护作用<sup>[11~15]</sup>。

### 1.2.2 海藻糖与结核病

在结核分枝杆菌中，海藻糖以 $\alpha, \alpha'$ -海藻糖二分支菌酸（TDM）的形式存在于细胞壁中。它是由海藻糖与分支菌酸结合生成的糖脂类化合物，是结核分枝杆菌细胞壁特有的，与细胞的致病性有很大关系，在结核病的发病机制中发挥着重要的作用，例如：TDM会诱导一系列免疫反应产生，例如趋化因子(MCP-1, MIP-1 alpha, IL-8)以及细胞因子(IL-12, IFN-gamma, TNF-alpha, IL-4, IL-6, IL-10)含量增多，参与免疫调节；作为非特异性刺激物和胸腺依赖性抗原，TDM可以诱导巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞聚集，形成异物性和超敏性肉芽；TDM刺激宿主体内的NAD酶的活性，使宿主体内NAD的水平处于一个较低水平，尤其是在肺、肝脏、脾脏组织内特别明显，降低了依赖NAD的微粒体酶的活性<sup>[15~21]</sup>。TDM的结构、类型和含量发生改变，都可以明显影响结核杆菌的毒力<sup>[22]</sup>。

### 1.2.3 海藻糖合成途径

分枝杆菌合成海藻糖的生化途径有三条。第一条合成途径是OtsA-OtsB途径（图1.1），首先海藻糖合成酶（trehalose-6-phosphate synthase (TPS), OtsA）催化UDP-葡萄糖转移葡萄糖基到6-磷酸葡萄糖生成6-磷酸海藻糖与UDP；之后在6-磷酸海藻糖磷酸酶（trehalose phosphate phosphatase (TPP), OtsB）的作用下脱去磷酸基团，生成终产物海藻糖。第二条合成途径是将糖原转化为海藻糖的TreY-TreZ通路，首先，麦芽糖寡聚海藻糖合成酶(TreY) 催化低聚麦芽糖的还原端重排，由 $\alpha$ -1,4-连接变成 $\alpha$ -1,1-连接；然后在低聚麦芽糖基海藻糖水解酶TreZ的催化下释放出游离的二糖——海藻糖。第三条合成途径是由海藻糖合成酶TreS催化麦芽糖分子内重排，由 $\alpha$ -1,4-糖苷键转变成 $\alpha$ -1,1-糖苷键连接的海藻糖<sup>[23]</sup>。

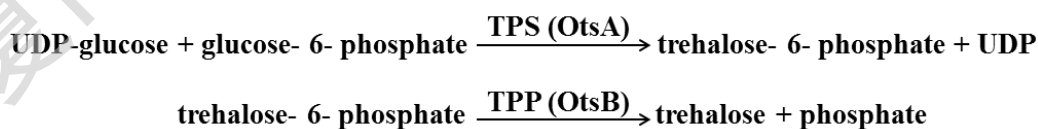


图 1.1 分枝杆菌内海藻糖合成的 OtsA-OtsB 途径

OtsA-OtsB合成途径是目前研究最多的通路，研究发现它是结核分枝杆菌体外生长及感染小鼠所必需的生化合成通路<sup>[24]</sup>。与野生型结核分枝杆菌相比，海藻糖合成酶OtsA缺失突变株对小鼠的毒力下降。结核分枝杆菌基因组中有两个可能编码6-磷酸海藻糖磷酸酶的开放阅读框：*otsB1(Rv2006)*和*otsB2(Rv3772)*。



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库