

## 领域前沿 · 中国



江陆斌, 中国科学院上海巴斯德研究所研究员。2003年7月毕业于中国科学院上海植物生理生态研究所, 获得博士学位; 博士期间主要从事口蹄疫疫苗的研究开发工作。2003年11月至2011年11月在美国国立卫生研究院从事博士后研究; 研究集中于恶性疟原虫致病及抗药机制、寄生虫表观遗传学、疟疾疫苗开发等领域。发现了表观遗传机制对恶性疟原虫感染红细胞初期阶段的调控作用及一类可应用于疟疾多价疫苗开发的抗原蛋白(PNAS, 2010; PNAS, 2011), 获2010年度美国国立卫生研究院年度成就奖。2012年2月起担任中国科学院上海巴斯德研究所研究员和课题组长, 继续从事恶性疟原虫致病基因表观遗传调控机制的研究。发现组蛋白修饰H3K36me3是导致恶性疟原虫*var*基因家族转录沉默的关键因子(Jiang L, *et al.* Nature, 2013)。

## 探秘恶性疟原虫免疫逃逸的表观遗传调控机制

景庆庆 程 秀 江陆斌\*

(中国科学院上海巴斯德研究所, 中科院分子病毒与免疫重点实验室, 上海 200031)

疟疾作为当前人类三大传染病之一, 是人类疾病防治领域的一大难题和挑战, 特别是疟原虫复杂的生活史和多变的病原相关基因表达调控方式使得对其的防治任务更加艰巨。这其中重要的制约因素是目前对调控疟原虫基因表达的表观遗传机制缺乏透彻的了解<sup>[1]</sup>。在可以感染人类的五类疟原虫当中, 最严重的恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)每年在全世界范围内感染3亿以上人口, 并造成超过100万的死亡病例(其中, 儿童占95%以上)<sup>[2]</sup>。在我国, 疟疾虽然在建国初期得到了有效控制, 但随着我国与非洲、亚洲和南美洲等发展中国家逐步建立起广泛的国际间合作, 近年来我国的劳务输入、输出人口激增, 输入性疟疾在华中、华南地区, 尤其是一些热带省份呈显著上升趋势<sup>[2]</sup>。目前, 在我国已有上千个行政县报道有疟疾感染病例, 既给人民生活带来了沉重的经济负担, 亦导致我国政府在预防和治疗疟疾中的政府财政压力不断增加。而当前并无有效的疟疾疫苗, 治疗疟疾最有效的手段是以我国科学家发现的青蒿素为主的复合抗疟药治疗。但近年来

在我国云南以及柬埔寨、泰国等地已出现了具有青蒿素潜在抗性的恶性疟原虫<sup>[3]</sup>。因此研制开发疟疾疫苗和新型抗疟药刻不容缓, 并具有重大的社会和经济意义。显然, 疟疾疫苗和抗疟药的研发成功将得益于对恶性疟原虫关键性致病基因表达调控机制的了解。

大量致病病原体包括细菌、真菌以及寄生虫都可利用抗原蛋白相互排斥性表达策略, 在人体内成功地实现免疫逃逸并建立长期稳定的感染<sup>[1]</sup>。由于目前对这类表达调控的分子机制尚不清楚, 因而严重阻碍了对病原体在人体内关键性免疫逃逸机制的研究。越来越多的证据表明, 表观遗传机制在这类基因的表达调控过程当中起到了关键性作用<sup>[4]</sup>。恶性疟原虫感染人体过程中最重要的时期是其寄生在人体红细胞中的无性繁殖时期(红内期), 疟疾患者在该时期出现临床症状甚至死亡。红内期恶性疟原虫表达的一类最主要的抗原蛋白PfEMP1(*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1)可结合人体内皮受体, 并介导两大严重的疟疾并发症(脑型疟疾和黑热尿), 并导致死亡<sup>[5]</sup>。研究表明, 针对PfEMP1的抗体可导致恶性疟原虫无法结合血管内皮, 从而在随血液流经脾脏时被巨噬细胞清除<sup>[6]</sup>。恶

\*通讯作者。Tel: 021-54923072, E-mail: lbjiang@ips.ac.cn

\*Corresponding author. Tel: +86-21-54923072, E-mail: lbjiang@ips.ac.cn

网络出版时间: 2013-08-29 09:36

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130829.0936.002.html>

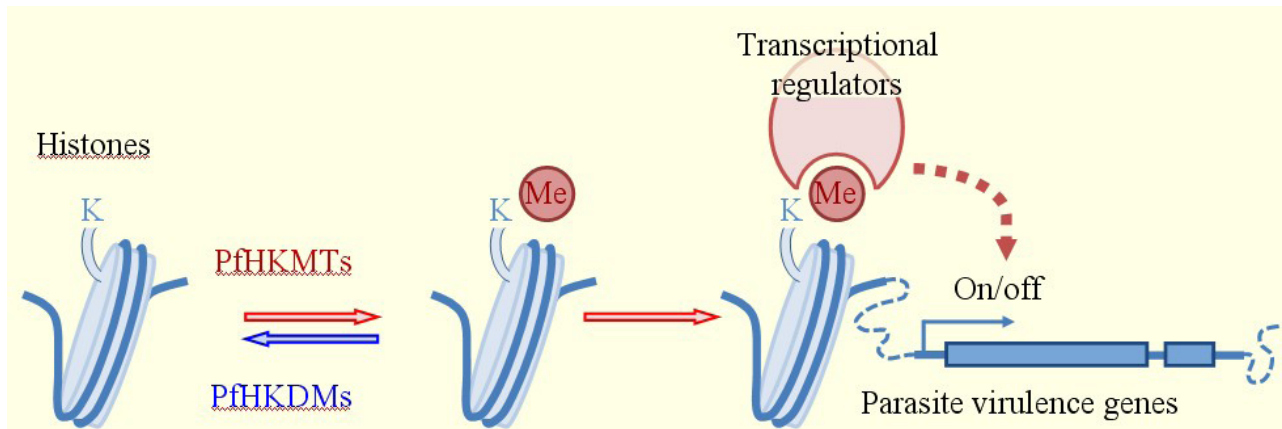
性疟原虫基因组含有约60个编码PfEMP1的基因(*var*基因家族),但每个单独的疟原虫在红内期只能转录一个*var*基因<sup>[4]</sup>。这种由表观遗传机制调控的抗原蛋白相互排斥性表达策略可以帮助恶性疟原虫轻易地逃避人体针对单一PfEMP1产生的免疫反应<sup>[1]</sup>。虽然恶性疟原虫属于单细胞真核生物,但由于不具有DNA甲基化和RNAi机制<sup>[7]</sup>,组蛋白修饰和lncRNA是其主要的表观遗传调控因子。在恶性疟原虫红内期总共48 h的三个生长阶段中(环状体、滋养体和裂殖体),*var*基因只在环状体阶段表达。生物信息学分析发现,恶性疟原虫共编码9个组蛋白赖氨酸甲基化酶(PfHKMT)和3个去甲基化酶(PfHKDM)<sup>[8]</sup>。然而,这些组蛋白修饰酶中对*var*基因转录起关键作用的调控因子及其作用的分子机制之前尚不清楚。我们的最新研究发现,*var*基因的转录沉默与一个约280 kDa大小的组蛋白赖氨酸甲基化酶(PfSET2vs)及其修饰的组蛋白H3K36me3有关;而*var*基因的转录激活则与*var*基因内含子区启动子转录的一个负链长片段非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)有关<sup>[9]</sup>。

在探寻控制*var*基因家族表达沉默关键因子的过程中,我们首先尝试了利用双同源重组技术在恶性疟原虫地理株系3D7中敲除所有12个组蛋白赖氨酸甲基化修饰酶基因。最终我们成功地在恶性疟原虫体内分别敲除了4个含有SET功能域的PfHKMT基因以及3个PfHKDM基因,并获得了相应的单克隆虫株。通过对这些基因敲除疟原虫的全基因组表达谱进行表达芯片并结合定量PCR分析,我们发现在敲除了PfSETvs基因(PfSETvsΔ)的恶性疟原虫(3D7SETvsΔ)群体中,几乎全部的*var*基因在环状体阶段都得到了表达。而敲除其他任意一个PfSET基因以及PfHKDM基因都不会改变*var*基因的表达情况。而且,与*var*基因家族类似的其他多变基因家族(*rifin*和*stevor*)中的部分成员在3D7SETvsΔ中表达水平同样得到了上调。同时,我们在不同于3D7的另一个恶性疟原虫地理株系Dd2中敲除PfSETvs基因后,也发现了同样的表型,这一结果提示PfSETvs可能广泛参与了*var*基因家族的转录沉默<sup>[9]</sup>。

PfSETvsΔ是否能导致在单个恶性疟原虫中同时转录多个*var*基因并表达不同的PfEMP1在被感染红细胞的表面呢?为了证实此猜想,我们首先采用RNA荧光原位杂交技术(RNA-FISH)来检测不同类型的*var*基因是否在单个3D7SETvsΔ中都得

到了转录。结果发现,不同类型的*var*基因家族在3D7SETvsΔ细胞核内能够共同表达。有意思的是,我们还发现所有*var*基因的转录都发生在疟原虫核外周的某一特定位置,说明所有*var*基因共同拥有一个特定的转录激活位点。在进一步的活细胞免疫荧光分析中,我们也证实了多个不同的PfEMP1蛋白能够在同一个被3D7SETvsΔ感染的红细胞膜表面表达<sup>[9]</sup>。

生物信息学分析发现, PfSETvs与果蝇中控制组蛋白H3第36位赖氨酸三甲基化修饰(H3K36me3)的ASH1蛋白同源<sup>[10]</sup>。但组蛋白修饰H3K36me3一直被研究者相信只存在于活性转录基因的3'末端,并通过与RNA多聚酶II相互作用,调节基因的转录延伸<sup>[11]</sup>。对于PfSETvs控制的H3K36me3是否真正具有抑制*var*基因家族转录的功能?恶性疟原虫中是否存在两类功能截然相反的H3K36me3?带着这些问题,我们首先利用染色质免疫共沉淀结合二代测序(ChIP-seq)技术研究了H3K36me3在野生型和3D7SETvsΔ疟原虫中的染色体分布情况。我们的结果显示, PfSETvsΔ导致所有60个*var*基因编码区内的H3K36me3分布显著减少。更重要的是,ChIP-qPCR分析发现,该组蛋白修饰在每类*var*基因的转录起始位点区域也显著减少。通过将分子标记肽HA与PfSETvs融合表达,我们进一步揭示PfSETvs也在沉默的*var*基因中的这些区域内分布。我们的结果表明, PfSETvs通过催化*var*基因转录起始位点区域中H3K36me3的形成,抑制了*var*基因的表达。H3K36me3已被证实可以在其他真核生物基因中可以通过结合组蛋白去乙酰化酶,从而在活性转录的基因内部抑制内源错配转录的产生<sup>[11]</sup>。在恶性疟原虫体内, PfSETvs控制的H3K36me3可能采用相同的机制,在*var*基因的转录起始位点区域抑制该基因mRNA的转录。同时,我们也证实在其他恶性疟原虫基因中,不受PfSETvs催化的H3K36me3也同样存在于活性转录基因的3'末端,并和其他真核生物中的H3K36me3行使相同的功能。值得注意的是, *var*基因的内含子启动子能转录产生一段负链lncRNA<sup>[12]</sup>。我们发现, PfSETvsΔ不但激活了所有*var*基因的转录,也同时激活了由*var*基因内含子介导的这类负链lncRNA的转录。当PfSETvs及其催化的H3K36me3在*var*基因的转录起始位点和内含子启动子区域大量分布的时候, *var*基因和相对应的负链lncRNA同时



恶性疟原虫组蛋白赖氨酸甲基化酶(PfHKMTs)和去甲基化酶(PfHKDMs)通过催化组蛋白不同位点的赖氨酸甲基化,可调控致病基因如*var*、*DBL*、*RH*基因家族的转录活性,进而控制恶性疟原虫感染人体过程中的免疫逃逸反应及其对红细胞的不同感染途径。

Lysine methylation/demethylation of histones is catalyzed by a group of proteins called histone lysine methyltransferases (HKMTs)/histone lysine demethylases (HKDMs) in many eukaryotes including *P. falciparum*. It has been shown that these histone modifications are epigenetic factors in controlling expression of some parasite virulence genes including *var*, *DBL*, *RH* gene families used during immune evasion to avoid human antibody responses and various invasion pathways of the human erythrocyte by parasites.

图1 组蛋白赖氨酸甲基化修饰对恶性疟原虫致病基因转录的调控模型

Fig.1 Schematic of histone methylation/demethylation signaling in regulating *P. falciparum* virulence genes

都被抑制<sup>[9]</sup>。

最近的研究表明, PfEMP1是体液免疫的关键靶点<sup>[13]</sup>,但由于编码PfEMP1的*var*基因家族相互排斥性表达机制的存在,因此只有通过常年反复被恶性疟原虫感染,人体的免疫系统才能够识别足够多的PfEMP1,从而缓慢地获得针对恶性疟原虫的免疫保护<sup>[13]</sup>。我们研究中构建的转基因恶性疟原虫克隆因为能够同时表达大多数PfEMP1,其对于多价疟疾疫苗的开发将具有显著的应用潜力<sup>[14]</sup>。同时,对于关键性组蛋白赖氨酸甲基化修饰酶的进一步研究也将为研发新型抗疟药提供全新的靶位点<sup>[14]</sup>。

我们的工作证明了在恶性疟原虫中, H3K36me3对基因的表现遗传学调控功能至少可以分为两类不同机制:一类是依赖于PfSETvs的对基因转录的抑制作用;另一类则是与RNA多聚酶II相互作用,调节基因的转录延伸,并且能够抑制活性转录基因内部对乙酰化组蛋白的结合<sup>[15]</sup>,从而抑制内源错配转录起始<sup>[11]</sup>。根据已有报道,在与PfSETvs同源的其它真核生物SET蛋白中,线虫的MES-4<sup>[16]</sup>及果蝇的ASH1<sup>[17]</sup>可能具有与PfSETvs类似的作用机制。这个机制也有可能解释为什么在斑马鱼精子中发现的部分基因沉默现象<sup>[18]</sup>以及小鼠胚胎干细胞和纤维原细胞着丝粒的异染色质化<sup>[19]</sup>都与H3K36me3有关。而且,在这一研究中新发现的*var*基因负链lncRNA

也可能通过与PfSETvs相互作用<sup>[20]</sup>,共同参与对*var*基因的相互排斥性表达机制的调控。我们的工作首次在真核生物中发现, H3K36me3对基因转录的抑制作用并系统阐明其在*var*基因家族转录沉默中的分子作用机制,对于完整理解表现遗传机制在疟原虫乃至其他真核生物基因转录调控中的功能具有重大意义。但同时,关于抗原蛋白相互排斥性表达的另一大核心问题:为什么只有单一的抗原基因能够获得表达?目前,仍然所知甚少。在前期研究中,我们发现每200个恶性疟原虫克隆Dd2中只有1个能够表达一个介导了疟原虫感染红细胞的关键性受体蛋白RH4,而表现遗传机制也参与了对该蛋白表达的调控<sup>[21]</sup>。与*var*基因相关的PfSETvs也许可能采取了类似的调控机制(图1)。相信后续围绕PfSETvs及*var*基因负链lncRNA展开的进一步研究将能够对解答上述问题提供重要的理论依据。

## 参考文献 (References)

- 1 Deitsch KW, Lukehart SA, Stringer JR. Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal and protozoan pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7(7): 493-503.
- 2 Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, *et al*. Global malaria mortality between 1980 and 2010: A systematic analysis. *Lancet* 2012; 379(9814): 413-31.
- 3 Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, Lwin KM, *et al*. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*

- malaria. *New Engl J Med* 2009; 361(5): 455-67.
- 4 Scherf A, Lopez-Rubio JJ, Riviere L. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol* 2008; 62: 445-70.
- 5 Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002; 415(6872): 673-9.
- 6 Pierce SK, Miller LH. World Malaria Day 2009: What malaria knows about the immune system that immunologists still do not. *J Immunol* 2009; 182(9): 5171-7.
- 7 Baum J, Papenfuss AT, Mair GR, Janse CJ, Vlachou D, Waters AP, *et al.* Molecular genetics and comparative genomics reveal RNAi is not functional in malaria parasites. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(11): 3788-98.
- 8 Cui L, Fan Q, Miao J. Histone lysine methyltransferases and demethylases in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* 2008; 38(10): 1083-97.
- 9 Jiang L, Mu J, Zhang Q, Ni T, Srinivasan P, Rayavara K, *et al.* PfSETvs methylation of histone H3K36 represses virulence genes in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2013; 499(7457): 223-7.
- 10 Aravind L, Abhiman S, Iyer LM. Natural history of the eukaryotic chromatin protein methylation system. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2011; 101: 105-76.
- 11 Carrozza MJ, Li B, Florens L, Sugauma T, Swanson SK, Lee KK, *et al.* Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* 2005; 123(4): 581-92.
- 12 Epp C, Li F, Howitt CA, Chookajorn T, Deitsch KW. Chromatin associated sense and antisense noncoding RNAs are transcribed from the var gene family of virulence genes of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *RNA* 2009; 15(1): 116-27.
- 13 Chan JA, Howell KB, Reiling L, Ataide R, Mackintosh CL, Fowkes FJ, *et al.* Targets of antibodies against *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in malaria immunity. *J Clin Invest* 2012; 122(9): 3227-38.
- 14 Venkatesh S, Workman JL, Wahlgren M, Bejarano MT. Malaria: Molecular secrets of a parasite. *Nature* 2013; 499(7457): 156-7.
- 15 Venkatesh S, Smolle M, Li H, Gogol MM, Saint M, Kumar S, *et al.* Set2 methylation of histone H3 lysine 36 suppresses histone exchange on transcribed genes. *Nature* 2012; 489(7416): 452-5.
- 16 Rechtsteiner A, Ercan S, Takasaki T, Phippen TM, Egelhofer TA, Wang W, *et al.* The histone H3K36 methyltransferase MES-4 acts epigenetically to transmit the memory of germline gene expression to progeny. *PLoS Genet* 2010; 6(9): e1001091.
- 17 Tanaka Y, Kawahashi K, Katagiri Z, Nakayama Y, Mahajan M, Kioussis D. Dual function of histone H3 lysine 36 methyltransferase ASH1 in regulation of Hox gene expression. *PLoS One* 2011; 6(11): e28171.
- 18 Wu SF, Zhang H, Cairns BR. Genes for embryo development are packaged in blocks of multivalent chromatin in zebrafish sperm. *Genome Res* 2011; 21(4): 578-89.
- 19 Chantalat S, Depaux A, Héry P, Barral S, Thuret JY, Dimitrov S, *et al.* Histone H3 trimethylation at lysine 36 is associated with constitutive and facultative heterochromatin. *Genome Res* 2011; 21(9): 1426-37.
- 20 van Werven FJ, Neuert G, Hendrick N, Lardenois A, Buratowski S, van Oudenaarden A, *et al.* Transcription of two long noncoding RNAs mediates mating-type control of gametogenesis in budding yeast. *Cell* 2012; 150(6): 1170-81.
- 21 Jiang L, López-Barragán MJ, Jiang H, Mu J, Gaur D, Zhao K, *et al.* Epigenetic control of the variable expression of a *Plasmodium falciparum* receptor protein for erythrocyte invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(5): 2224-9.