

RNA 干扰在原生动物中的应用

曾 红^{1,2} 沈 洁¹ 顾福康^{1*}

(¹华东师范大学生命科学学院, 上海 200062; ²福建师范大学生命科学学院, 福州 350007)

摘要 RNA 干扰 (RNAi), 即由双链 RNA 介导的转录后基因沉默的现象, 已成为分析原生动物基因功能的有效手段。现对应用 RNAi 研究原生动物微管蛋白的功能和基体组装、纤毛虫大核基因组重排、纤毛虫刺丝泡的发生和作用、端粒酶及细胞周期蛋白的功能等方面进行综述。

关键词 原生动物; RNA 干扰; 双链 RNA; 基因功能

1998 年, Fire 等^[1]将双链 RNA (dsRNA) 注射到秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中, 导致了特定序列的基因沉默, 并且发现 dsRNA 对靶基因表达的抑制效果比用单一的有义 RNA 或反义 RNA 显著增强, 这一现象被称为 dsRNA 介导的干扰 (dsRNA mediated interference) 作用, 简称 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)。实际上, RNAi 是 dsRNA 诱导细胞内同源的 mRNA 特异性降解, 使特定基因的表达受到抑制而导致转录后基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS) 的现象。

在包括原生动物在内的许多生物中, RNAi 普遍存在。由于原生动物与人的进化距离比酵母与人的进化距离更远, 它们不仅适应于不同的生活方式, 而且还有限制外来基因表达的基本策略, 其发生的 PTGS 现象不仅可由 dsRNA 引起, 还可通过转座子引起, 因此成为应用 RNAi 研究其细胞结构和功能的理想材料。近年来, 在原生动物中主要通过显微注射法、喂食法、浸润法和电穿孔法等使细胞发生 RNAi, 应用 RNAi 在微管蛋白的功能和基体组装等多个方面的研究中已取得了显著的进展。

1 微管蛋白的功能及基体组装

在原生动物微管蛋白的结构和功能研究中, 继 α 、 β 和 γ 微管蛋白之后, δ 、 ϵ 、 ζ 和 η 微管蛋白等微管蛋白家族的新成员相继被发现^[2]。其中, 通过 RNAi 的方法诱导出各种突变型, 再结合免疫抗体标记、免疫电镜、RT-PCR 等技术, 从宏观的表型分析一直深入到分子水平, 使各种微管蛋白在微管装配中的作用也不断得到阐明。

Ngo 等^[3]用电穿孔法将表达 α 微管蛋白 5' 未翻译区域 (UTR) 的 dsRNA 的 pGFPAT 质粒导入鞭毛虫布

氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*), 导致了 α 微管蛋白表达下降, 胞质分裂受阻, 形成肥大的 FAT 细胞; 用人工合成的 α 微管蛋白编码区长为 115 nt 的 dsRNA 或 β 微管蛋白的 5' UTR 长为 59 nt 的 dsRNA 转染锥虫, 都导致了 RNAi, 所得结果表明 α 微管蛋白或 β 微管蛋白基因对锥虫在细胞分裂及细胞形态构建中相关微管胞器的装配是至关重要的。

Ruiz 等^[4]用显微注射法将 PCR 扩增的 γ 微管蛋白基因的编码序列注射到野生型草履虫 (*Paramecium*) 的大核中, 经特异性抗体标记显示, 转化细胞中 γ 微管蛋白含量显著下降, 细胞变小、变圆, 转化细胞的基体数目平均为对照细胞的一半, 分裂 2~3 次后便停止分裂和生长, 最终细胞死亡; Shang 等^[5]使嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 编码 γ 微管蛋白的基因 *gtu1* 沉默后观察到, 其营养细胞中 4 种主要的微管组织中心都受到影响, 而对基体的影响最为显著。其中 γ 微管蛋白缺失后, 基体中的中心蛋白和谷氨酰化的微管蛋白随后缺失, 基体逐步瓦解。由草履虫、四膜虫的结果认为, γ 微管蛋白是纤毛基体中轴纤丝的组装和基体的形成所必需的, 新的基体的形成和成熟基体正常结构的维持都需要 γ 微管蛋白。另一方面, McKean 等^[6]应用 RNAi 抑制布氏锥虫 γ 微管蛋白的表达后, 观察到新的鞭毛虽可形成但不能运动, 而老的鞭毛不受影响。超微结构显示 γ 微管蛋白沉默后新形成的鞭毛轴纤丝结构为 9+0; Vayssié 等^[7]采用浸润法将化学合成的小分子 RNA (siRNA) 加入到痢疾内变形虫 (*Entamoeba*

收稿日期: 2005-07-11 接受日期: 2005-12-13

国家自然科学基金资助项目 (No. 30470201)

* 通讯作者。Tel: 021-62232715; Fax: 021-62233754, E-mail:

fkgu@bio.ecnu.edu.cn

histolytica)的培养基中,使之渗透进寄生虫的细胞质,导致 γ 微管蛋白基因沉默后,原高度有序的微管排列消失。所述结果不仅证明 γ 微管蛋白是微管集结(nucleation)必需的,并且很可能说明 γ 微管蛋白作为微管组织中心的组成成分在微管组装和基体形成中的重要作用。

Garreau de Loubresse 等^[8]向草履虫大核注射大量 δ 微管蛋白基因的编码序列,观察到,尽管草履虫分裂过程中纤毛的发生不受影响,但所产生的子细胞其纤毛基体则缺失了C微管。分析认为, δ 微管蛋白可能参与三联体微管中C微管的组装,其缺失虽不直接影响草履虫基体的形成,但可使皮层细胞骨架的结构发生紊乱,最终导致基体的错误定位甚至缺失,并改变细胞的形状和大小。

Dupuis-Williams 等^[9]分别采用注射法和喂食法,使草履虫 ϵ 微管蛋白基因沉默且出现相同的RNAi的表现型,此时细胞基体的发生受阻,在3~4次分裂后(预期发生沉默的时间),转化的细胞比对照细胞形状更圆且游泳异常。免疫荧光标记显示 ϵ 微管蛋白定位于基体和中心粒上,根据 ϵ 微管蛋白的定位和以上结果推测, ϵ 微管蛋白也是中心体微管的组装和锚定所必需的,并且还可能与基体内聚力的形成有关。

2 纤毛虫大核原基发育过程中基因组的重排

纤毛虫的大核是由接合生殖中合子核分裂产物之一分化发育而来的。初期大核原基的染色体DNA与小核相似,此后在大核发育中部分染色体DNA被破坏或完全消除,大核基因组经历了内序列消除(IES)和断裂序列消除(BES)的过程^[10]。最近的研究表明,大核IES和BES序列的消除和基因组的重排都与RNAi有关。

Mochizuki 等^[11]曾提出“ScanRNA模型”来解释siRNA是如何介导大核基因组中IES和BES的消除,该模型涉及的dsRNA及长约28 nt的ScanRNA分子,与RNAi过程中产生的dsRNA极其相似;此后,Mochizuki 等^[12]进一步确定,四膜虫细胞大核发育中DNA的消除与siRNA有关,其中消除序列上发生的组蛋白H₃第9位赖氨酸的甲基化及染色体结构域蛋白的积聚是由RNAi产生的siRNA决定的,因此这一由RNAi介导的过程改变了DNA序列的结构并导致四膜虫大核基因组的重排。此外,Paschka

等^[13]在纤毛虫棘尾虫(*Stylonychia lemnae*)中发现,利用RNAi抑制细胞大核发育蛋白1(MDP1)基因的表达,结果使进入大核分化期细胞的大核原基重新被吸收,新大核不能形成,而趋于被细胞吸收的老大核则发生逆转。由于*mdp1*和*piwi*同源,而*piwi*编码的蛋白质与许多生物的幼体分化过程及RNAi的形成有关^[14],这也就表明纤毛虫大核原基的发育过程也涉及到RNAi的作用。

3 纤毛虫刺丝泡的发生和作用机制

许多纤毛虫的表膜下布满了垂直排列的刺丝泡。刺丝泡是一种由膜性结构围着的细胞器,内含的刺丝在受到刺激时可以向外发射,对细胞可能起保护和渗透调节的作用^[15]。多年来刺丝泡的发生和作用机制受到密切关注。分析认为,草履虫的刺丝泡呈典型的榴弹形,这一形状由刺丝晶核的组装决定。刺丝晶核必须正确组装,而且刺丝泡必须定位在表膜特定的胞吐位点,刺丝泡才能发射刺丝,行使正常功能^[16]。目前,有关研究也利用RNAi对其机制开展了探讨。

在草履虫中刺丝泡的晶核是由许多密切相关的多肽构成的,单拷贝基因*nd7*与胞吐作用的膜融合和刺丝泡的外排作用有关^[17],刺丝泡基质蛋白(trichocyst matrix protein, TMP)是由*tmp*多基因家族编码的,在刺丝泡发生的特定时期一起组装刺丝泡的晶核,突变的刺丝泡由于不能黏附在表膜的胞吐位点而不能外排^[18]。Ruiz 等^[19]通过显微注射法使草履虫*nd7*和*tmp*沉默,得到相应的RNAi突变型。其中,*tmp*多基因家族中的*t1*或*t4*基因沉默后,细胞中刺丝泡形态异常且游离在细胞质中(不能正确定位在胞吐位点),不能外排;*nd7*沉默后刺丝泡形态正常并能正确定位在胞吐位点,但外排能力完全或部分丧失。Vayssié 等^[20]将草履虫不同的*tmp*基因沉默后获得特定刺丝泡的突变体。特定的*tmp*基因沉默后,含有特定TMP的那一层结构以及之后组装的所有部分都受到影响,不再显示出有序的组装途径。Galvani 等^[21]将目标基因的编码区插入含有两个T7启动子的质粒(L4440)中,用质粒转化*E. coli*,以含有重组质粒的*E. coli*喂食草履虫,使细胞发生RNAi,此后对*tmp4a*、*nd7*、*nsf*等基因的RNAi表型分析表明:*tmp4a*沉默后导致形成有缺陷的胞吐颗粒;*nd7*是调节特定胞吐作用的膜融合因子,沉默后导致胞吐缺陷;*nsf*是普通的膜融合因子,沉默后细

胞死亡。实验结果表明, 草履虫刺丝泡的组装和定位是由 *tmp* 多基因家族决定的, 单拷贝基因 *nd7* 通过调节胞吐作用使刺丝外排, 两者协同作用才能保证刺丝泡正常行使功能。

4 端粒酶的亚单位及端粒酶结合蛋白的功能

端粒酶最早发现于四膜虫中, 此后在游仆虫 (*Euplotes*)、棘尾虫 (*Stylonychia*) 和尖毛虫 (*Oxytricha*) 等纤毛虫中端粒和端粒酶的结构相继被确定^[22~24]。由于纤毛虫大核端粒的浓度很高, 且这类生物的端粒复制机制较为简单, 目前已成为研究端粒结构及其复制的模式生物。

Paschka 等^[13]利用 RNAi 抑制游仆虫端粒酶的接触反应亚单位 (TERT) 和端粒酶结合蛋白 p43 在营养细胞中的表达, 转化细胞便停止分裂, 无复制带出现。对端粒、端粒酶和 p43 的进一步定位分析表明端粒酶联合蛋白 p43 与端粒酶在复制带上的锚定有关。由此证明端粒酶结合蛋白 p43 的主要功能是参与大核 DNA 复制时端粒酶在复制带上的锚定; 抑制端粒酶结合蛋白的 2 个亚单位在棘尾虫和尖毛虫营养细胞中的表达, 大核形态便出现明显变化, 球状核结构逐渐瓦解最终变成碎片被吸收, 接着细胞死亡, 所得结果揭示端粒酶的亚单位对大核的形态构建可能起重要作用。

5 细胞周期蛋白的功能

锥虫和其他真核细胞一样, 细胞周期都经历了一系列跨越时空的形态发生过程。应用 RNAi 研究揭示, 锥虫在不同生理周期下对细胞周期和胞质分裂的调节存在巨大差异。其中, 在前循环期布氏锥虫 7 个不同的周期蛋白基因 (*cyc*) 中, *cyc2* 调节 G₁/S 的转换, *cyc6* 调节 G₂/M 的转换, 其余 5 个周期蛋白沉默, 都不产生可检测到的细胞周期的缺陷^[25]。此后进一步肯定, *cyc6* 沉默后都会导致前循环期和血流期的锥虫有丝分裂受阻和生长停滞, 但在前循环期和血流期其功能存在显著差异: 在前循环期, *cyc6* 沉默后细胞无细胞核且只有单个动基体 (kinetoplast), 而在血流期的锥虫中, 沉默后的细胞有一个核和多个动基体; 荧光激活细胞分类分析表明, 血流期锥虫在结束有丝分裂时仍可重新进入 S 期, 而前循环期的锥虫则不能^[26]。由此可见在锥虫的细胞周期中周期蛋白基因 *cyc2* 和 *cyc6* 具有更重

要的功能, 这对锥虫病的防治具有重要的指导意义。

6 展望

随着后基因组学时代的到来, RNAi 作为有效、经济的分析基因功能的技术, 已逐渐成为分析包括原生动物在内的所有生物基因功能的有力工具。其主要的一个优点是逆基因分析, 即已知特定的基因序列, 通过抑制这一特异基因的表达而出现功能或个体表型的改变, 进而得到基因与其功能的相对应联系^[27]。由于能得到显著的 RNAi 表现型, 可以快速、高效地揭示基因的功能, 从根本上改变了先前因缺少可应用的遗传系统 (如不易获得遗传突变型、有效的转染系统或基因剔除突变体) 以致很难在原生动物中开展分子生物学研究的状况。目前已有有人以 RNAi 为基础创建锥虫的基因文库 (RNAi 文库), 可望十分便利地开展更多的遗传学研究^[28], 这就意味着将有越来越多基因的功能被揭示, 可望进行高通量的基因功能分析。

RNAi 也提供了基因治疗的新策略。筛选出寄生原虫与致病、感染、存活、繁殖等方面相关的基因以及药物作用的靶基因后再对其进行 RNAi, 给寄生原虫病的基因治疗、新药开发和生物医学等应用研究领域带来新的变革。

由于对 RNAi 分子机制的了解尚不十分明确, 目前对 dsRNA 和 siRNA 的设计还属于经验性过程, 实验设计尚需进一步完善。现有的研究主要集中在草履虫、四膜虫和锥虫等少数种类中, 许多种类尚缺少有效的表达 dsRNA 的载体, 是否所有基因的表达都能用 RNAi 来抑制尚不确定。此外, 将 dsRNA 加工成 siRNA 的类似 Dicer 的核酸酶^[29]也尚未在原生动物的基因库里找到。这些都将是今后的研究方向。

作为在进化早期分支出来的真核细胞, 原生动物也许具有相对简单的 RNAi 机制, 因此它也可用于研究 RNAi 的机制及进化。原生动物作为研究材料具有许多无可比拟的优点, 利用 RNAi 技术来开展相关方面的研究具有非常重要的理论意义和应用价值。

参考文献 (References)

- [1] Fire A et al. *Nature*, 1998, **391**: 806
- [2] Gull K. *Curr Opin Microbiol*, 2001, **4**: 427
- [3] Ngo H et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 14687
- [4] Ruiz F et al. *Curr Biol*, 1999, **9**: 43

- [5] Shang Y *et al. J Cell Biol*, 2002, **158**: 1195
- [6] McKean PG *et al. Curr Biol*, 2003, **13**: 598
- [7] Vayssié L *et al. Mol Biochem Parasitol*, 2004, **138**: 21
- [8] Garreau de Loubresse N *et al. BMC Cell Biol*, 2001, **2**: 4
- [9] Dupuis-Williams P *et al. J Cell Biol*, 2002, **158**: 1183
- [10] Klobutcher LA *et al. In: Gall GJ (ed.) The Molecular Biology of Ciliated Protozoa*, Orlando: Academic Press, 1986, 111
- [11] Mochizuki K *et al. Cell*, 2002, **110**: 689
- [12] Mochizuki K *et al. Curr Opin Genet Dev*, 2004, **14**: 181
- [13] Paschka AG *et al. Eur J Protistol*, 2003, **39**: 449
- [14] Fetzner CP *et al. Nucleic Acids Res*, 2002, **30**: 4380
- [15] 顾福康. *原生动物学概论*, 北京: 高等教育出版社, 1991, 65
- [16] Madeddu L *et al. Mol Biol Cell*, 1995, **6**: 649
- [17] Skouri F *et al. Mol Biol Cell*, 1997, **8**: 1063
- [18] Gautier MC *et al. J Biol Chem*, 1996, **271**: 10247
- [19] Ruiz F *et al. Mol Biol Cell*, 1998, **9**: 931
- [20] Vayssié L *et al. J Cell Sci*, 2001, **114**: 875
- [21] Galvani A *et al. Trends Genet*, 2002, **18**: 11
- [22] Lingner J *et al. Genes Dev*, 1994, **8**: 1984
- [23] Lingner J *et al. Science*, 1997, **276**: 561
- [24] Jonsson F *et al. In: Krupp G et al. (eds.) Telomerases, Telomeres and Cancer*, Georgetown: Kluwer Academic Publishers, 2002, 205
- [25] Li Z *et al. J Biol Chem* 2003, **278**: 20652
- [26] Hammarton TC *et al. J Biol Chem* 2003, **278**: 22877
- [27] Fraser AG *et al. Nature*, 2000, **408**: 325
- [28] Motyka SA *et al. Curr Opin Microbiol*, 2004, **7**: 362
- [29] Hannon GJ. *Nature*, 2002, **418**: 244

The Application of RNA Interference to Protozoa

Hong Zeng^{1,2}, Jie Shen¹, Fu-Kang Gu^{1*}

¹*School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China;*

²*College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)*

Abstract RNA interference (RNAi), triggered by double stranded RNA (dsRNA), was the post-transcriptional gene silencing (PTGS) based on sequence-specific degradation of mRNA. It had been proved to be an efficient method for analyzing gene functions in protozoa. In this paper, we reviewed the RNAi methods and their main research progress in cell and molecular biology of protozoa which focused on the assembly of base body and functions of tubulins, cyclins and telomerase, gene rearrangement and exocytosis of the trichocyst of the ciliated protozoa.

Key words RNA interference; double stranded RNA; protozoa; gene function

Received: July 11, 2005 Accepted: December 13, 2005

This work was supported by the National Nature Science Foundation of China (No.30470201)

*Corresponding author. Tel: 86-21-62232715, Fax: 86-21-62233745, E-mail: fkgu@bio.ecnu.edu.cn