

鸡钙离子结合分子伴侣 Calreticulin 的结构与功能 预测及组织表达特性

王丽丽, 李楠, 曹嫦妤, 龚都强, 于东, 王伟, 李金龙

(东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 【目的】揭示鸡组织细胞内质网(endoplasmic reticulum, ER)中关键 Ca^{2+} 结合分子伴侣钙网蛋白(calreticulin, CRT)的结构与功能及组织表达特性。【方法】应用 Laser Gene 软件, 通过比对 Gene bank 已登录的 12 种脊椎动物 CRT 核苷酸及氨基酸序列以分析其进化关系, 利用生物信息学方法预测鸡 CRT 蛋白的结构与功能, 并采用荧光定量 RT-PCR 方法检测 CRT 在鸡 30 个不同组织中的表达特性。【结果】同源性分析结果显示: 鸡与其他 11 个物种 CRT 基因核苷酸序列中, 鸡与兔核苷酸序列同源性最高, 为 78.7%, 与虹鳟的同源性最低, 为 70.5%; 氨基酸序列中, 鸡与蛇的亲缘关系最近, 为 85.0%, 与虹鳟的亲缘关系最远, 为 69.0%, 与鼠、猕猴、人、兔、猪、牛和非洲爪蟾的亲缘关系也相对较近, 并均在 80.1%及以上。蛋白结构与功能预测结果为: 鸡 CRT 由 404 个氨基酸组成, 相对分子质量 46.8802 kD, 理论等电点为 4.41, 负电荷氨基酸残基数为 102, 正电荷氨基酸残基数为 53, 分子式为 $\text{C}_{2074}\text{H}_{3107}\text{N}_{543}\text{O}_{684}\text{S}_9$, 鸡 CRT 具有 22 个疏水区域, 其 C 端与 N 端具有很高的疏水性, 而 C 端的亲水性要强于 N 端, 且形成 $\alpha_1(7-17)-\alpha_2(22-25)-\beta_1(26)-\beta_2(38-41)-\beta_3(50-54)-\beta_4(69-70)-\beta_5(75-82)-\beta_6(92-99)-\beta_7(110-114)-\beta_8(129-133)-\beta_9(144-151)-\beta_{10}(171-178)-\beta_{11}(183-187)-\beta_{12}(314-322)-\beta_{13}(326-332)-\alpha_3(337-348)-\alpha_4(350-375)-\alpha_5(377-379)-\alpha_6(395-401)$ 的二级结构。CRT 蛋白属于跨膜蛋白, 存在信号肽, 且为分泌蛋白, 酶分类属于 EC 3.2.1.55 或 EC 3.4.24.68。组织表达检测结果表明: CRT 基因在鸡各组织中广泛表达, 其中在回肠、腺胃和十二指肠等组织中表达量较高, 且高出肾脏(对照)20 倍以上。【结论】鸡 CRT 核苷酸及氨基酸序列在 12 种脊椎动物物种中具有相对保守性, 鸡 CRT 为跨膜分泌蛋白, 为酸性蛋白, 属于 α -N-阿拉伯糖苷酶或 Tentoxilysin, 催化 α -L-阿拉伯糖苷内的终端非还原性 α -L-阿拉伯呋喃糖苷残基的水解, 作用于 α -L-阿拉伯呋喃糖苷、含 (1,3) 和/或 (1,5) 糖苷键的阿拉伯聚糖、阿拉伯木聚糖和阿拉伯半乳聚糖, 能与糖类分子及 Ca^{2+} 特异性结合, 可监控糖蛋白组装折叠及 Ca^{2+} 调控, 且在消化系统中发挥重要作用。

关键词: 鸡; Calreticulin; 结构与功能; 组织表达特性; 进化关系

Structures and Functions Prediction and Expression Profiles of Calreticulin as Calcium Binding Chaperones in Chicken

WANG Li-li, LI Nan, CAO Chang-yu, GONG Du-qiang, YU Dong, WANG Wei, LI Jin-long

(College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract: 【Objective】 The aim of the current study is to reveal the evolutionary relationships, and investigate the protein structure and functions and the expression profiles of calreticulin (CRT) as a key Ca^{2+} binding molecular chaperone within the endoplasmic reticulum (ER) of chicken. 【Method】 The nucleotides and amino acids of CRT in 12 species of vertebrates recorded in Gene bank were analyzed for evolutionary relationships by Laser Gene, and the structures and functions of CRT protein in chicken

收稿日期: 2013-07-08; 接受日期: 2014-07-16

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (30901088)、教育部新世纪优秀人才培养计划 (NECT-1207-02)、黑龙江省普通高等学校新世纪优秀人才培养计划 (1252-NCET-009)、中国博士后科学基金 (2012T50301 和 20110491021)、黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (12511031)

联系方式: 王丽丽, Tel: 0451-55190407; Fax: 0451-55190263; E-mail: iamwanglili1003@163.com。通信作者李金龙, Tel: 0451-55190407; Fax: 0451-55190263; E-mail: jinlongli@neau.edu.cn

were predicted by bioinformatics, and the expression profiles of CRT in 30 organizations of chicken was analyzed by real-time PCR.

【Result】 Results of homology analysis showed that compared with the other 11 species of nucleotide sequences of CRT gene in chicken, *gallus gallus* and *oryctolagus cuniculus* had the highest nucleotide sequence homology, which was 78.7%, in addition, *gallus gallus* and *oncorhynchus mykiss* had the lowest homology, which was 70.5%. In the homology of amino acid sequences, the relationship between *gallus gallus* and *crotalus adamanteus cadam* is the closest by 85.0%, and the furthest relationships with *gallus gallus* is *oncorhynchus mykiss* which was 69.0% in amino acid sequence, besides, the homology of *gallus gallus* with *cricketulus griseus*, *macaca mulatta*, *homo sapiens*, *oryctolagus cuniculus*, *sus scrofa*, *bos taurus*, and *xenopus (silurana) tropicalis* relatively close to almost above 80.1%. The protein structure and function prediction revealed that the CRT of chicken was constitute with 404 amino acids, and had a relative molecular mass of 46.8802 kD and a theoretical isoelectric point of 4.41, moreover, the negative charge is 102 amino acid residues and the positive charge amino acid residues is 53. The molecular formula of the CRT was $C_{2074}H_{3107}N_{543}O_{684}S_9$. The CRT of chicken had 22 hydrophobic regions, which of the C end and the N end had a high hydrophobic, while the hydrophilic of C end is stronger than that of N, and the protein formed a secondary structure as $\alpha_{1(7-17)}-\alpha_{2(22-25)}-\beta_{1(26)}-\beta_{2(38-41)}-\beta_{3(50-54)}-\beta_{4(69-70)}-\beta_{5(75-82)}-\beta_{6(92-99)}-\beta_{7(110-114)}-\beta_{8(129-133)}-\beta_{9(144-151)}-\beta_{10(171-178)}-\beta_{11(183-187)}-\beta_{12(314-322)}-\beta_{13(326-332)}-\alpha_{3(337-348)}-\alpha_{4(350-375)}-\alpha_{5(377-379)}-\alpha_{6(395-401)}$. CRT belongs to the transmembrane proteins and secreted protein, has signal peptides. The enzyme classification of CRT was EC 3.2.1.55 or EC 3.4.24.68. Tissue expression assay indicated that the gene of CRT expressed widely in chicken tissues, in which the lleum, glandular stomach and duodenum were highly more than the kidney (control) by 20 times. **【Conclusion】** The sequence of nucleotide and amino acid in chicken CRT is relatively conserved in 12 vertebrate species. CRT is a transmembrane secretion protein and acidic protein. It belongs to the alpha-N-Arabia-glucosidase or Tentoxilysin, which catalyzed the hydrolysis of the end non-reducing α -L-arabinofuranosidase residues in the terminal of α -L-arabinoside, which effected the α -L-arabinofuranosidase, Arabic glycans containing (1,3) and/or (1,5) glucosidic bond, Arab xylan and arabinogalactan. CRT combined specifically with the carbohydrate molecules and Ca^{2+} , which could monitor glycoprotein assembly and folding and Ca^{2+} regulation, and plays an important role in the digestive system.

Key words: chicken; Calreticulin; structure and functions; expression profiles; evolutionary relationship

0 引言

【研究意义】 Ca^{2+} 结合分子伴侣钙网蛋白 (calreticulin, CRT) 作为内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 分子伴侣参与蛋白质折叠^[1], 并通过调节 ER Ca^{2+} 贮存而影响细胞浆游离 Ca^{2+} 水平^[2-5], 调节细胞多种生理功能: 包括作为分子伴侣、维持细胞 Ca^{2+} 稳态、协助新生蛋白质加工与正确折叠、调节细胞凋亡、黏附、类固醇敏感性基因表达、增强抗原递呈、调节免疫原性及抑制血管生成等^[6-11]。**【前人研究进展】**自 Ostwald 和 MacLennan^[12]最初从兔骨骼肌中分离纯化获得 CRT, Smith 等^[13]1989 年在小鼠肝脏中首次克隆了 CRT 的 cDNA 序列以来, 其 cDNA 序列均在多种灵长类、啮齿类、偶蹄类、爬行类、两栖类、禽类及鱼类等中相继获得, 其分子结构及相关功能的研究也陆续展开。近年来研究发现, CRT 除具有以上多种生理功能外, 同时也参与多种疾病的发生和进展过程, 如心肌梗大、心力衰竭以及肿瘤发生等诸多过程^[6-11]。**【本研究切入点】**虽然目前关于各种生物 CRT 的生化性质、蛋白功能及基因表达等方面有相关的研究报道, 但是关于禽类 CRT 结构和功能的研究还未见报道。

【拟解决的关键问题】通过研究鸡 CRT 的结构与功能、组织表达特性及与其他物种的同源分析, 为后续对 CRT 的生物学功能及相关效应机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料和试剂

试验用鸡购自于哈尔滨市先锋种鸡场 1 日龄海兰白雏鸡, 2013 年 5 月常规饲养于东北农业大学动物饲养房, 自由采食和饮水。35 日龄时颈静脉放血处死, 采集大脑、丘脑、小脑、脑干、脊髓、垂体、坐骨神经、食道、嗦囊、腺胃、肌胃、十二指肠、回肠、盲肠、直肠、胰腺、肝脏、胸肌、翅肌、腿肌、心肌、胸腺、法氏囊、脾脏、睾丸、卵巢、动脉、静脉、肾脏、肺脏等 30 个组织, 经过 RNA locker 处理, 然后保存于 -80°C , 用于组织表达特性分析。

RNAase 固相清除剂、RNA locker 购自于北京天恩泽基因科技有限公司。DEPC 购自于 Sigma 公司。TRIzol 购自于 Invitrogen 公司, M-MLV 反转录试剂购自于 TransGen Biotech 公司。GoTaq® qPCR Master Mix 购自于 Promega 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 鸡 CRT 进化关系分析方法 应用 Laser Gene 软件对 12 种动物 CRT 基因核苷酸及氨基酸序列进行同源性比对, 构建 CRT 基因序列的进化关系树, 分析不同物种之间的序列差异, 12 种动物 CRT 基因序列信息来源分别为鸡 (序列号: XM_418262.3)、人 (序列号: NM_004343.3)、猕猴 (序列号: NM_001261131.1)、鼠 (序列号: NM_001244122.1)、牛 (序列号: BC140582.1)、猪 (序列号: NM_001174133.1)、兔 (序列号: NM_001082235.1)、蛇 (序列号: JUI74061.1)、非洲爪蟾 (序列号: NM_001001253.1)、虹鳟 (序列号: NM_001124478.1)、斑马鱼 (序列号: BC164724.1)、斑点叉尾鲷 (序列号: NM_001200182.1)。

1.2.2 鸡 CRT 结构与功能预测方法 用 ExPASy-ProtParam Tool 工具对鸡 CRT 蛋白基本理化性质进行包括氨基酸组成、元素组成、等电点、分子量等预测, 应用 ProtScale 的网络版本对鸡 CRT 蛋白进行疏水区域预测, 应用 TMPRED 在线软件分析鸡 CRT 蛋白的跨膜区, 应用 SignalP 在线软件进行鸡 CRT 的信号肽分析, 应用 PHD 在线软件进行鸡 CRT 的二级结构进行预测, 应用 InterProScan 在线软件对鸡 CRT 蛋白结构域进行预测, 应用 RASMOL 软件对鸡 CRT 蛋白的空间结构进行预测, 应用 I-TASSER 在线软件预测该蛋白功能结构。

1.2.3 鸡 CRT 基因组织表达特性检测 Trizol 法提取总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 含量, 取等量各组织总 RNA 进行反转录反应, 反转录具体过程参照 TransGen 说明书。反转录体系为 40 μL, 其中总 RNA 10 μg。组织总 RNA 提取样品的 A 260/A 280 比值均在 1.9—2.1 范围内, 即 RNA 纯度较高, 符合要求。

以 GADPH 作为内参照, 参考鸡 CRT mRNA, 利用 Oligo 7.22 软件, 按照引物设计的基本要求设计 GADPH 与 CRT 荧光定量 PCR 引物, 并由北京六合华大基因科技公司合成, 引物序列及特征见表 1。

以合成的 cDNA 第一条链为模板, qRT-PCR 反应

采用 BRYT Green dye 荧光染料法, 按照试剂盒使用手册进行, 采用 20 μL 反应体系, qPCR 反应体系: GoTaq® qPCR Master Mix, 2×10 μL, 上下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 0.4 μL, cDNA 模板 2.0 μL, Nuclease-Free Water 7.2 μL。反应在 ABI 7500 Real Time PCR System 上进行。反应条件: 95℃ 预变性 2 min, 随后 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40 个循环。反应结束后进行熔解曲线分析。在测定组织中 CRT mRNA 表达水平变化时, 以肾脏的 Ct 值为 control 参照进行计算。以 GADPH 为参照进行 CRT mRNA 表达水平相对定量分析。计算采用 Pfaffl 法, 计算公式如下:

Ratio= (E_{target})^{ΔCt_{target}} (对照组-样品组) / (E_{GADPH})^{ΔCt_{GADPH}} (对照组-样品组)

其中 E=10^{-1/slope}。

2 结果

2.1 物种间 CRT 进化关系分析

将鸡 CRT 基因的 CDS 编码区序列与其他 11 个物种 CRT 基因的相应序列进行比对, 结果见图 1, 可知该序列在鸡与其他物种间的同源性有所不同, 按同源性由高到低依次为: 兔 (78.7%)、猕猴 (77.6%)、人 (77.1%)、蛇 (76.8%)、鼠 (76.7%)、牛和猪 (76.4%)、非洲爪蟾 (75.8%)、斑马鱼 (71.9%)、斑点叉尾鲷 (71.8%)、虹鳟 (70.5%), 可见, 该序列, 鸡与兔的同源性最高 (78.7%), 与虹鳟的同源性最低 (70.5%)。

根据 Genebank 登录信息可知, 鸡 CRT 基因序列 CDS 编码区为 1 260 bp, 编码的 CRT 为 404 个氨基酸; 人、鼠、猕猴、牛和猪的 CDS 编码区为 1 254 bp, 编码 417 个氨基酸; 兔的 CDS 编码区为 1 257 bp, 编码 418 个氨基酸; 斑马鱼和虹鳟的 CDS 编码区为 1 260 bp, 编码 419 个氨基酸; 斑点叉尾鲷的 CDS 编码区为 1 272 bp, 编码 423 个氨基酸; 非洲爪蟾的 CDS 编码区为 1 251 bp, 编码 416 个氨基酸。根据氨基酸同源性构建了 12 种脊椎动物 CRT 蛋白的系统发育树 (图 2), 从进化树上可以看出, 与鸡亲缘关系由近及远依

表 1 鸡 CRT 基因荧光定量 PCR 分析用引物序列及反应条件

基因名称 Gene name	序列号 Acc. number	引物序列 (5'-3') Primer sequence	产物长度 Length of product (bp)
CRT	XM_418262.3	F-GAAGAACGTGCTCATCAACAAGG	202
		R-GTCAATCTTGGCACGTTTCATCC	
GADPH	K01458	F-AGAACATCATCCACGCGT	182
		R-AGCCTTCACTACCCTCTTG	

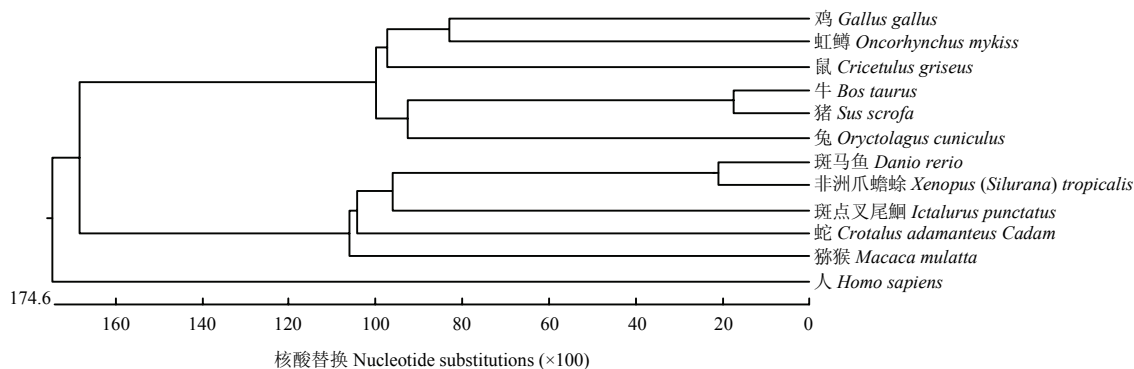


图 1 CRT 基因核苷酸进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of nucleotide from CRT gene of different species

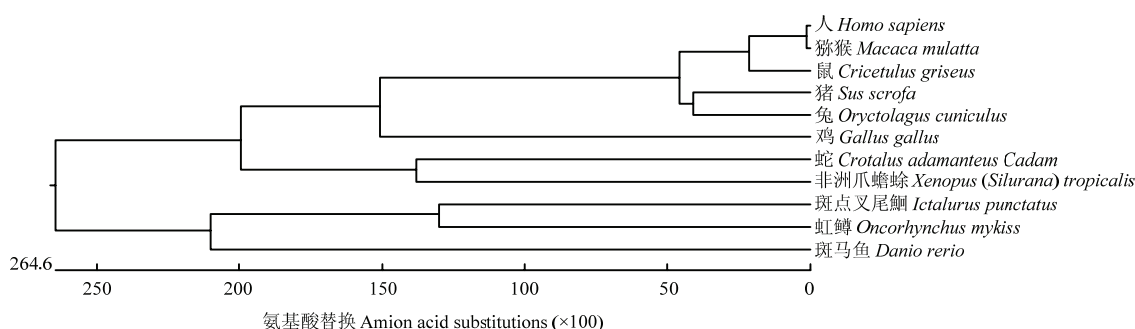


图 2 CRT 基因氨基酸进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of amino acid from CRT gene of different species

次为: 蛇 (85.0%)、鼠 (83.8%)、猕猴 (83.6%)、人 (83.3%)、兔 (82.8%)、猪 (82.1%)、牛 (80.6%)、非洲爪蟾 (80.1%)、斑马鱼 (76.4%)、斑点叉尾鲷 (73.6%)、虹鳉 (69.0%)。

2.2 鸡 CRT 蛋白结构的预测

经氨基酸组成及理化性质的预测分析, 可知鸡 CRT 基因编码 404 个氨基酸, 蛋白相对分子质量 46.8802 kD; 理论等电点为 4.41, 推测该蛋白为酸性蛋白; 负电荷氨基酸残基数为 102, 正电荷氨基酸残基数为 53; 分子式为 $C_{2074}H_{3107}N_{543}O_{684}S_9$, 原子总数为 6 417; 消光系数为 112 215, 不稳定系数为 45.17, 脂肪系数为 55.02, 总平均亲水系数为-1.150。

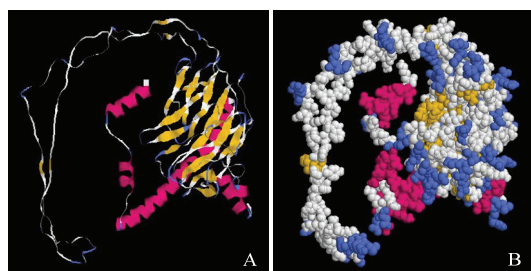
由蛋白质疏水区域预测可以看出, 鸡 CRT 具有 22 个疏水区域, 其 C 端与 N 端具有很高的疏水性, 而 C 端的亲水性要强于 N 端。跨膜螺旋预测结果显示, 鸡 CRT 中有 1 个跨膜区域, 属于跨膜蛋白。利用神经网络算法和隐马尔可夫算法分析可知鸡 CRT 存在信号肽, 为分泌蛋白。二级结构预测结果显示, 鸡 CRT

蛋白的 404 个氨基酸中, 74 个氨基酸可能形成 α 螺旋, 68 个氨基酸可能形成 β 折叠, 262 个可能形成无规则卷曲, 且形成 $\alpha_1(7-17)-\alpha_2(22-25)-\beta_1(26)-\beta_2(38-41)-\beta_3(50-54)-\beta_4(69-70)-\beta_5(75-82)-\beta_6(92-99)-\beta_7(110-114)-\beta_8(129-133)-\beta_9(144-151)-\beta_{10}(171-178)-\beta_{11}(183-187)-\beta_{12}(314-322)-\beta_{13}(326-332)-\alpha_3(337-348)-\alpha_4(350-375)-\alpha_5(377-379)-\alpha_6(395-401)$ 的二级结构。如图 3, 鸡 CRT 高级结构预测中, 呈现一臂回弯式结构。

2.3 鸡 CRT 功能的预测

鸡 CRT 蛋白的功能预测结果表明, 该蛋白很可能属于 EC 3.2.1.55 (活性位点残基: 56) 或 EC 3.4.24.68 (活性位点残基: 320)。

鸡 CRT 蛋白的空间结合分子预测结果 (图 4) 表明, CRT 可与糖类和 Ca^{2+} 特异性结合, 结合位点残基位置分别在 76、107、108、109、111、113、126、130、133、137、139、147、319、320、321 和 28、64、65、66、330。糖基化后的蛋白, 在内质网腔中, 通过 CRT 结合的膜蛋白或钙联结蛋白 (Calnexin, CNX) 进行

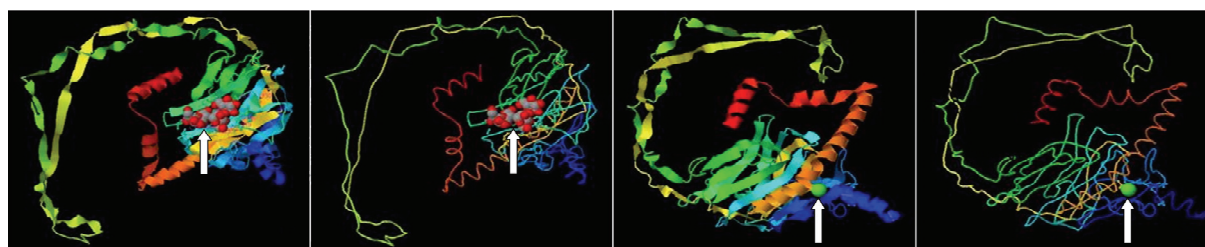


红色为 α 螺旋区, 黄色为 β 折叠区, 淡蓝色为转角, 白色为其他结构。
(A) 鸡 CRT 高级结构预测 (带状); (B) 鸡 CRT 高级结构预测 (球状)

Red means alpha helices; Yellow means beta sheet; Pale blue means turns; White means others. (A) The senior structure prediction of chicken CRT (ribbon); (B) The senior structure prediction of chicken CRT (spherical)

图 3 鸡 CRT 高级结构预测

Fig. 3 The senior structure prediction of chicken CRT



每一条链, 从蓝色、绿色、黄色、橙色到红色。红色为 CRT 的 N 端; 蓝色为 CRT 的 C 端。其他未从蓝色显示到红色的为一条链含有大量异种分子与之相连。(A) CRT 糖结合位点 (卡通式); (B) CRT 糖结合位点 (迹线式); (C) CRT 钙结合位点 (卡通式); (D) CRT 钙结合位点 (迹线式)

Each strand, blue, green, yellow, orange to red. Red is the N-terminus of the protein; blue is the C-terminus of the protein. Not from blue to red for a chain contains a large number of heterogeneous molecules associated. (A) Carbohydrate recognition sites by CRT (Cartoon); (B) Carbohydrate recognition sites by CRT (wireframe); (C) Calcium recognition sites by CRT (Cartoon); (D) Calcium recognition sites by CRT (wireframe)

图 4 鸡 CRT 结合分子预测

Fig. 4 The predicted binding molecules of chicken CRT

3 讨论

CRT 是一种可溶性 Ca^{2+} 结合蛋白, 存在于高等生物除红细胞以外的所有细胞中, 同 CNX 组成 CNX/CRT 循环, 共同负责糖蛋白折叠质量的重要监控, 参与糖蛋白有效、快速的折叠, 监督糖蛋白在内质网中空间构象的正确折叠, 促进未完全折叠糖蛋白再折叠^[1,14]。内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 反应过强、时间过长而引起内质网功能障碍时, CNX/CRT 循环发生异常, 错误折叠的糖蛋白在内质网堆积会导致细胞功能失调甚至某些疾病的发生^[15-17]。

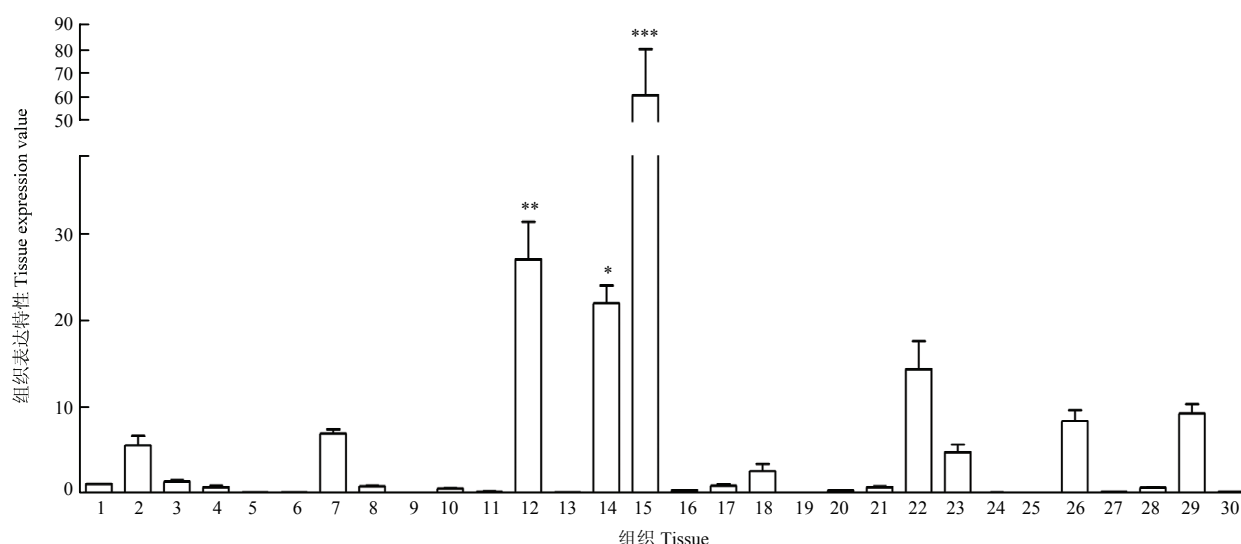
编码 CRT 的基因序列已经从多种脊椎动物、无脊

折叠周期, 在此周期中, 新生多肽链通过此循环完成折叠和装配过程^[14-15]。

2.4 鸡 CRT 组织表达特性分析

对于各组织样本的目的及内参基因检测结果显示, 获得溶解峰单一的溶解曲线, 说明该方法具有良好的特异性。结果表明, 该基因在已检 30 个组织中均有所表达, 但不同组织表达量存在差异: 回肠 > 腺胃 > 十二指肠 > 法氏囊 > 睾丸 > 翅肌 > 垂体 > 大脑 > 动脉 > 胰脏 > 小脑 > 肾脏 (对照) > 直肠 > 坐骨神经 > 丘脑 > 胸腺 > 心肌 > 食道 > 盲肠 > 脾脏 > 喉囊 > 腿肌 > 卵巢 > 肌胃 > 脑干 > 脊髓 > 胸肌 > 静脉 > 肝脏 > 肺脏 (图 5)。和肾脏相比, 回肠、腺胃和十二指肠表达量分别是它的 61.0274、27.0254 和 21.8828 倍 ($P < 0.05$)。

椎动物和高等植物中分离获得, 但酵母和原核生物基因组中未发现 CRT 编码基因, 表明该蛋白在进化过程中可能出现较晚^[9]。本研究结果表明: 鸡与其他 11 个物种 CRT 基因核苷酸序列中, 鸡与兔核苷酸序列同源性最高, 为 78.7%, 与虹鳟的同源性最低, 为 70.5%, 鸡与猕猴、人、蛇、鼠、牛、猪、非洲爪蟾、斑马鱼及斑点叉尾鲷的 CRT 基因核苷酸序列同源性也相对较高, 均在 71.8% 及以上, 且相差较小。可见, 12 个物种 CRT 基因核苷酸序列同源性差异不明显; 氨基酸序列中, 鸡与蛇的亲缘关系最近, 为 85.0%, 与虹鳟的亲缘关系最远, 为 69.0%, 与鼠、猕猴、人、兔、猪、牛和非洲爪蟾的亲缘关系也相对较近, 并均在 80.1% 及以上。



1: 肾脏 Kidney; 2: 大脑 Cerebrum; 3: 小脑 Cerebellum; 4: 丘脑 Thalamus; 5: 脑干 Brain-stem; 6: 脊髓 Spinal marrow; 7: 垂体 Pituitary; 8: 坐骨神经 Sciatic nerve; 9: 肺脏 Lung; 10: 食管 Esophageal; 11: 嗦囊 Crop; 12: 腺胃 Glandular stomach; 13: 肌胃 Muscular stomach; 14: 十二指肠 Duodenum; 15: 回肠 Ileum; 16: 盲肠 Cecum; 17: 直肠 Rectum; 18: 胰脏 Pancreas; 19: 肝 Liver; 20: 脾 Spleen; 21: 胸腺 Thymus; 22: 法氏囊 Bursa of fabricius; 23: 动脉 Artery; 24: 静脉 Vein; 25: 胸肌 Pectoralis; 26: 翅肌 Flight muscle; 27: 腿肌 Crureus; 28: 心肌 Myocardium; 29: 睾丸 Testis; 30: 卵巢 Ovary. 柱状图中上标*表示组织 CRT 表达量之间存在显著差异 ($P<0.05$), **表示组织 CRT 表达量之间存在极显著差异 ($P<0.01$), ***表示组织 CRT 表达量之间存在超级显著差异 ($P<0.001$)

Standard deviation is denoted with lower case letters above each bar. * is significant ($P<0.05$) among the relative mRNA expression level of CRT in chicken different tissues, ** is significant ($P<0.01$), *** is significant ($P<0.001$)

图 5 CRT 在鸡各组织中 mRNA 相对表达量

Fig.5 The relative mRNA expression level of CRT in chicken different tissues

生物信息学分析表明鸡 CRT 基因编码 404 个氨基酸, 蛋白分子式为 $C_{2074}H_{3107}N_{543}O_{684}S_9$, 理论等电点为 4.41, 预测 CRT 为酸性不稳定、具有 22 个疏水区域的跨膜分泌蛋白。鸡 CRT 蛋白结构中 74 个氨基酸形成 α 螺旋, 68 个氨基酸形成 β 折叠, 262 个氨基酸形成无规则卷曲, 高级结构呈现一臂回弯式结构。本课题组关于 CNX 研究结果(已发表)表明, CRT 与 CNX 的各项生物信息学预测结果相同或相近, 这与 Leach 等^[1]的研究相吻合。

功能预测结果显示鸡 CRT 蛋白酶分类属于 EC 3.2.1.55 或 EC 3.4.24.68 (活性位点残基: 320)。EC 3.2.1.55 属于 α -N-阿拉伯糖苷酶 (Alpha-N-arabinofuranosidase), 催化 α -L-阿拉伯糖苷内的终端非还原性 α -L-阿拉伯呋喃糖苷残基的水解, 作用于 α -L-阿拉伯呋喃糖苷、含 (1, 3) 和/或 (1, 5) 糖苷键的阿拉伯聚糖、阿拉伯木聚糖和阿拉伯半乳聚糖^[18], 这和本课题组关于 CNX 的酶同源性预测分析结果(已发表)相同, 说明 CNX 和 CRT 结构和功能高度同源, 且再次证实 Leach 等^[1]的研究结果; EC 3.4.24.68 属于 Tentoxilysin, 催化突触囊泡相关膜蛋白

2 (synaptobrevin 2) 中 76-Gln-Phe-77 键的水解, 属于肽酶家族 M27^[19]。

错误折叠的糖蛋白在内质网中蓄积严重时可引起一些神经变性病和许多其他蛋白质错误折叠病, CRT 可与 CNX 和内质网依赖性激酶抑制蛋白 (ERp57) 形成 CNX/CRT 循环, 通过此循环新生多肽链完成折叠和装配过程^[1,14], 可使错误折叠的糖蛋白重新折叠^[20], 从而减轻一些神经变性病和许多其他蛋白质错误折叠病的严重程度^[15-17,21]。CRT 作为内质网内一类帮助糖蛋白折叠修饰的分子伴侣, 对保持糖蛋白的正确折叠进而减少错误折叠的糖蛋白在细胞中的堆积可能会起到十分重要的作用^[1,14,22]。本研究显示鸡 CRT 可与糖类特异性结合^[23-24], 佐证了 CNX/CRT 循环对新生多肽链折叠和装配等生物学功能。此外, CRT 和 CNX 特异性识别 monoglucosylated (Glc1 Man9 GlcNAc2) 的 Glc (1) Man (9) GlcNAc (2) 聚糖, 但这种特异性识别的结构性决定因素仍然未知^[25-26]。

已有研究显示哺乳动物 CRT 是内质网腔内游离的蛋白质, 由高度保守性的氨基端、富含脯氨酸的 P

区和羧基端构成^[27]。其中 P 区结合 Ca^{2+} ，氨基端结合 Zn^{2+} ，二者形成特殊结构帮助糖蛋白正确折叠；羧基端有较高的 Ca^{2+} 亲和力，是储存钙离子的重要“缓冲器”^[28]，发挥诸如细胞收缩、增殖、分泌（包括神经递质的分泌）、代谢、凋亡、神经元兴奋、酶活性等调节的多项生理功能。还起第二信使作用， Ca^{2+} 作为细胞内重要的第 2 信使分子，其浓度的改变可激活相应的途径参与各种细胞反应过程^[29-34]，进而会损伤细胞，甚至引起疾病，如高血压、胰腺炎、偏头痛、睡眠障碍、缺血/再灌注损伤、脑缺血后的脑血管痉挛、癫痫、糖尿病周围神经病、慢性神经性疼痛、阿尔茨海默病等^[35-42]。本研究显示 CRT 和 Ca^{2+} 特异性结合^[43]，这与 Michalak 等的研究^[44]相吻合，同时预示 CRT 作为 Ca^{2+} 结合分子伴侣在机体将发挥更为重要的生物功能。

CRT 存在于高等生物除红细胞以外的所有细胞中^[45]。本研究显示，鸡 CRT 在 30 个组织中均有不同程度的表达，表明在体内广泛表达，这与已有研究结果一致^[1, 45]。但在鸡体内 CRT mRNA 在回肠、腺胃和十二指肠等消化系统组织中表达量很高，这可能预示 CRT 会影响消化系统的某些生物学功能。课题组研究结果表明在鸡体内 CNX 在回肠、动脉和腺胃等组织中表达量很高，CRT 与 CNX 类似地均在一些消化系统组织的表达量很高，可能预示 CRT 和 CNX 在消化系统起着重要作用，这些均可为后续研究做出提示。

4 结论

鸡 CRT 相对保守，属于跨膜蛋白，存在信号肽，为分泌蛋白，酶分类为 EC 3.2.1.55 (α -N-阿拉伯糖苷酶) 或 EC 3.4.24.68 (Tentoxilysin)。鸡 CRT 能够与糖类分子及 Ca^{2+} 特异性结合，监控糖蛋白组装折叠及 Ca^{2+} 调控。鸡 CRT 基因在组织中广泛表达，其中在回肠、腺胃和十二指肠等组织中表达量很高，预示 CRT 可能在鸡消化系统中发挥更为重要作用。

References

- [1] Leach M R, Cohen-Doyle M F, Thomas D Y, Williams D B. Localization of the lectin, ERp57 binding, and polypeptide binding sites of calnexin and calreticulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(33):29686-29697.
- [2] Gelebart P, Opas M, Michalak M. Calreticulin, a Ca^{2+} -binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2005, 37(2):260-266.
- [3] Tufi R, Panaretakis T, Bianchi K, Criollo A, Fazi B, Di Sano F, Tesniere A, Kepp O, Paterlini-Brechot P, Zitvogel L, Piacentini M, Szabadkai G, Kroemer G. Reduction of endoplasmic reticulum Ca^{2+} levels favors plasma membrane surface exposure of calreticulin. *Cell Death and Differentiation*, 2008, 15(2):274-282.
- [4] Groenendyk J, Lynch J, Michalak M. Calreticulin, Ca^{2+} , and calcineurin-signaling from the endoplasmic reticulum. *Molecules and Cells*, 2004, 17(3):383-389.
- [5] Arnaudeau S, Frieden M, Nakamura K, Castelbou C, Michalak M, Demareux N. Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(48):46696-46705.
- [6] Galluzzi L, Kepp O, Morselli E, Vitale I, Senovilla L, Pinti M, Zitvogel L, Kroemer G. Viral strategies for the evasion of immunogenic cell death. *Journal of Internal Medicine*, 2010, 267(5):526-542.
- [7] Simmen T, Lynes E M, Gesson K, Thomas G. Oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum: tight links to the mitochondria associated membrane (MAM). *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1798(8):1465-1473.
- [8] Gold L I, Eggleton P, Sweetwyne M T, Van Duyn L B, Greives M R, Naylor S M, Michalak M, Murphy-Ullrich J E. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *The FASEB Journal*, 2010, 24(3):665-683.
- [9] Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold L I, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochemical Journal*, 2009, 417(3):651-666.
- [10] Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia G M, Apetoh L, Perfettini J L, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Métévier D, Larochette N, van Endert P, Ciccocanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nature Medicine*, 2007, 13(1):54-61.
- [11] Peng R Q, Chen Y B, Ding Y, Zhang R, Zhang X, Yu X J, Zhou Z W, Zeng Y X, Zhang X S. Expression of calreticulin is associated with infiltration of T-cells in stage IIIB colon cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 2010, 16(19):2428-2434.
- [12] Ostwald T J, MacLennan D H. Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 1974, 249(3):974-979.
- [13] Smith M J, Koch G L. Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. *The Embo Journal*, 1989, 8(12):3581-3586.

- [14] Vassilakos A, Michalak M, Lehrman M A, Williams D B. Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry*, 1998, 37(10): 3480-3490.
- [15] Qiu Y, Michalak M. Transcriptional control of the calreticulin gene in health and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2009, 41(3):531-538.
- [16] Tarr J M, Young P J, Morse R, Shaw D J, Haigh R, Petrov P G, Johnson S J, Winyard P G, Eggleton P. A mechanism of release of calreticulin from cells during apoptosis. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 401(5):799-812.
- [17] Korbelik M, Zhang W, Merchant S. Involvement of damage-associated molecular patterns in tumor response to photodynamic therapy: surface expression of calreticulin and high-mobility group box-1 release. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 2011, 60(10): 1431-1437.
- [18] Kozlov G, Pocanschi C L, Rosenauer A, Bastos-Aristizabal S, Gorelik A, Williams D B, Gehring K. Structural basis of carbohydrate recognition by calreticulin. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(49): 38612-38620.
- [19] Thammavongsa V, Mancino L, Raghavan M. Polypeptide substrate recognition by calnexin requires specific conformations of the calnexin protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(39): 33497-33505.
- [20] Ellgaard L, Frickel E M. Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2003, 39(3):223-247.
- [21] Totani K, Ihara Y, Matsuo I, Ito Y. Substrate specificity analysis of endoplasmic reticulum glucosidase II using synthetic high mannose-type glycans. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(42): 31502-31508.
- [22] Miyanaga A, Koseki T, Matsuzawa H, Wakagi T, Shoun H, Fushinobu S. Crystal structure of a family 54 α -L-arabinofuranosidase reveals a novel carbohydrate-binding module that can bind arabinose. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(43):44907-44914.
- [23] Jayaraman S, Eswaramoorthy S, Kumaran D, Swaminathan S. Common binding site for disialyllactose and tri-peptide in C-fragment of tetanus neurotoxin. *Proteins*, 2005, 61(2):288-295.
- [24] Hosokawa N, Tremblay L O, You Z, Herscovics A, Wada I, Nagata K. Enhancement of endoplasmic reticulum (ER) degradation of misfolded Null Hong Kong α 1-antitrypsin by human ER mannosidase I. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(28): 26287-26294.
- [25] Chaudhuri T K, Paul S. Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *The Febs Journal*, 2006, 273(7): 1331-1349.
- [26] Ma Y, Hendershot L M. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2004, 28(1/2): 51-65.
- [27] Helenius A, Aeby M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annual Review of Biochemistry*, 2004, 73:1019-1049.
- [28] Michalak M, Robert Parker J M, Opas M. Ca^{2+} signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium*, 2002, 32(5/6):269-278.
- [29] Guo L, Groenendyk J, Papp S, Dabrowska M, Knobloch B, Kay C, Parker J M, Opas M, Michalak M. Identification of an N-domain histidine essential for chaperone function in calreticulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(50):50645-50653.
- [30] Edlind T, Smith L, Henry K, Katiyar S, Nickels J. Antifungal activity in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by calcium signalling. *Molecular Microbiology*, 2002, 46(1):257- 268.
- [31] Kaur R, Castaño I, Cormack B P. Functional genomic analysis of fluconazole susceptibility in the pathogenic yeast *Candida glabrata*: roles of calcium signaling and mitochondria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(5):1600 -1613.
- [32] Patterson R L, Van Rossum D B, Gill D L. Store-operated Ca^{2+} entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell*, 1999, 98(4): 487-499.
- [33] Bonilla M, Cunningham K W. Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca^{2+} signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 2003, 14(10): 4296-4305.
- [34] Aramburu J, Heitman J, Crabtree G R. Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. *Embo Reports*, 2004, 5(4): 343-348.
- [35] Bonilla M, Nastase K K, Cunningham K W. Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *The Embo Journal*, 2002, 21 (10):2343-2353.
- [36] Nelson M T, Todorovic S M, Perez-Reyes E. The role of T-type calcium channels in epilepsy and pain. *Current Pharmaceutical Design*, 2006, 12(18):2189-2197.
- [37] Altier C, Zamponi G W. Targeting Ca^{2+} channels to treat pain: T-type versus N-type. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2004, 25(9): 465-470.
- [38] Zhang S L, Yu Y, Roos J, Kozak J A, Deerinck T J, Ellisman M H, Stauderman K A, Cahalan M D. STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma

- membrane. *Nature*, 2005, 437(7060):902-905.
- [39] Jr Putney J W. Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. *Journal of Cell Biology*, 2005, 169(3):381-382.
- [40] Roos J, DiGregorio P J, Yeromin A V, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak J A, Wagner S L, Cahalan M D, Velichelebi G, Stauderman K A. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function. *The Journal of Cell Biology*, 2005, 169(3):435-445.
- [41] Jr Putney J W, Broad L M, Braun F J, Lievreumont J P, Bird G S. Mechanisms of capacitative calcium entry. *Journal of Cell Science*, 2001, 114(12):2223-2229.
- [42] Bolotina V M, Csutora P. CIF and other mysteries of the store-operated Ca^{2+} -entry pathway. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2005, 30(7):378-387.
- [43] Pocanschi C L, Kozlov G, Brockmeier U, Brockmeier A, Williams D B, Gehring K. Structural and functional relationships between the lectin and arm domains of calreticulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(31): 227266-227277.
- [44] Michalak M, Corbett E F, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochemical Journal*, 1999, 344(2):281-292.
- [45] Krause K H, Michalak M. Calreticulin. *Cell*, 1997, 88(4):439-443.

(责任编辑 林鉴非)