

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.09.002

文章编号: 1005-8982 (2020) 09-0008-05

PolyQ 重复变异对 *ATXN1* 基因转录的影响 *

陆盈¹, 孙顺昌²

(1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院 检验科, 上海 200025; 2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院北院 检验科, 上海 201801)

摘要: **目的** 探讨 *ATXN1* 基因内 PolyQ 重复变异对 *ATXN1* 基因自身转录的影响。**方法** 通过分子克隆构建正常 *ATXN1* 基因 (PolyQ 重复数为 29) 和突变 *ATXN1* 基因 (PolyQ 重复数为 61), 将其分别插入慢病毒载体 pLVX-Puro-3xflag-C 中构建表达载体, 然后将携带正常和突变 *ATXN1* 基因的慢病毒表达载体分别感染人胚肾细胞 (293T 细胞), 通过实时荧光定量 PCR 检测正常和突变 *ATXN1* mRNA 的表达水平。**结果** 293T 细胞内正常和突变 *ATXN1* mRNA 的相对表达量分别为 (661.9 ± 17.7) 和 (381.0 ± 20.5) , 正常 *ATXN1* mRNA 的相对表达量高于突变 *ATXN1* mRNA 的相对表达量 ($P < 0.05$)。**结论** *ATXN1* 基因内 PolyQ 重复变异可抑制 *ATXN1* 基因自身转录, 对基因转录影响可能是 PolyQ 重复变异引起 I 型脊髓小脑型共济失调的病理机制之一。

关键词: I 型脊髓小脑型共济失调; *ATXN1* 基因; PolyQ 重复; 转录

中图分类号: R741.02

文献标识码: A

A variable polyglutamine repeat affects the transcription of the *ATXN1* gene*

Ying Lu¹, Shun-chang Sun²

(1. Department of Clinical Laboratory, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Ruijin Hospital North, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201801, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of a variable polyglutamine repeat on the *ATXN1* gene transcription. **Methods** Wild-type *ATXN1* (29Q) and mutant *ATXN1* (61Q) genes were constructed by molecular cloning. The expression vectors were generated by inserting wild-type and mutant *ATXN1* genes into the pLVX-Puro-3xflag-C vector. Lentiviruses were generated by infecting the expression vectors into human embryonic kidney 293T cells. The expression levels of wild-type and mutant *ATXN1* mRNA in 293T cells were detected by a real-time RT-polymerase chain reaction. **Results** The relative levels were (661.9 ± 17.7) and (381.0 ± 20.5) for wild-type and mutant *ATXN1* mRNA in 293T cells, respectively. The relative level of wild-type *ATXN1* mRNA was higher than that of mutant *ATXN1* mRNA ($P < 0.05$). **Conclusion** The variable polyglutamine repeat in the *ATXN1* gene can inhibit the *ATXN1* gene transcription, thus may contribute to spinocerebellar ataxia type 1.

Keywords: spinocerebellar ataxia; *ATXN1* gene; polyglutamine repeat; transcription; genetic

脊髓小脑型共济失调 (spinocerebellar ataxia, SCA) 是一组临床和遗传均具异质性的遗传性神经系统退行

性疾病, 主要临床表现为小脑性共济失调, 可伴有构音障碍、意向性震颤、眼球运动障碍等症状^[1]。SCA 遗

收稿日期: 2019-10-08

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 31571294)

[通信作者] 孙顺昌, E-mail: bayyyz@aliyun.com

传模式有常染色体显性遗传、常染色体隐性遗传及 X-连锁隐性遗传等模式,以常染色体显性遗传为主^[2]。目前临床已发现 30 多型 SCA, 其中大部分型 SCA 的致病基因已被确定^[3]。研究发现, SCA1、SCA2、SCA3、SCA6、SCA7、SCA12、SCA17 和齿状核红核苍白球路易体萎缩症 (dentatorubral-pallidoluyian atrophy, DRPLA) 等亚型是由基因编码区 CAG 三核苷酸重复序列的拷贝数增加所致, 而 CAG 编码的氨基酸为谷氨酰胺, 因此该亚型 SCA 又称为多聚谷氨酰胺病, 即 PolyQ 病^[4]。SCA1 致病机制仍不完全清楚, 有研究显示 SCA1 发病与突变产物的堆积有关, 也有研究显示 SCA1 发病与正常失调蛋白 (Ataxin-1) 的功能缺失有关, Ataxin-1 是 *ATXN1* 基因的表达产物^[5]。本研究通过构建正常和突变的 *ATXN1* 基因, 采用实时荧光定量 PCR 检测正常和突变 *ATXN1* mRNA 的水平, 分析 *ATXN1* 基因内 PolyQ 重复数的增加对基因自身转录的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

SW-CJ-1D 型超净工作台和 BHC-1300IIA/B3 型生物安全柜 (苏州江苏苏静集团), 3111 型二氧化碳培养箱和 ST16R 型低温冷冻离心机 (美国赛默飞公司), MF51 型倒置显微镜 (广州明美光电公司), ABI7500 荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 扩增仪 (美国 Life technology 公司), SMA4000 型超微量分光光度计 (北京 Merinton 公司), Bestar 逆转录试剂盒和 qRT-PCR 扩增试剂盒 (德国 DBI 公司), 引物由 Life technology 公司合成, 人胚肾细胞 (293T 细胞) 和大肠杆菌 *Sib13* (广州辉骏生物科技有限公司), DMEM 细胞培养液、胎牛血清及 0.25% 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司), BC117125.1 克隆质粒和 pLVX-Puro-3xflag-C、pMD2.G 及 psPAX2 载体 (广州辉骏生物科技有限公司), *ATXN1*-MUT 基因由广州辉骏生物科技有限公司合成。

1.2 pLVX-Puro-3xflag-ATXN1 表达载体构建及鉴定

以 BC117125.1 克隆质粒为模板扩增正常 *ATXN1* 基因 (*ATXN1*-WT), 突变 *ATXN1* 基因 (*ATXN1*-MUT) 通过化学合成。*ATXN1*-WT 和 *ATXN1*-MUT 用核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Xba* I 进行双酶切, 再用 T4 DNA 连接酶接到 pLVX-Puro-3xflag-C 载体上构建 pLVX-Puro-3xflag-*ATXN1*-WT (野生) 和 pLVX-Puro-3xflag-

ATXN1-MUT (突变) 表达载体。同时以 pLVX-Puro-3xflag-C 空载体为载体对照。将构建的野生型和突变型表达载体, 以及载体对照分别导入感受态大肠杆菌 *Sib13* 中进行克隆, 收集菌液并抽提质粒。通过核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切及测序鉴定构建的野生型和突变型 *ATXN1* 表达载体。

1.3 ATXN1 稳转细胞株的筛选及鉴定

将包装质粒和上述经鉴定构建正确的 pLVX-Puro-3xflag-*ATXN1*-WT 或 pLVX-Puro-3xflag-*ATXN1*-MUT 表达载体质粒及载体对照分别共转染 293T 细胞, 产生重组慢病毒颗粒, 并用超速离心法进行纯化。在 Polybrene 介导下, 用重组慢病毒颗粒感染 293T 细胞, 用 Puromycin 筛选稳定表达野生和突变 Ataxin-1 蛋白的细胞株, 通过 Western blotting 鉴定表达的野生和突变 Ataxin-1 蛋白。将稳定表达野生和突变 Ataxin-1 蛋白的细胞株和携带载体对照的 293T 细胞继续培养, 通过实时荧光定量 PCR 检测 *ATXN1* mRNA 的表达水平。

1.4 ATXN1 转录检测方法的建立

依据 Trizol RNA 分离试剂盒说明书抽提细胞内总 RNA, 并溶解于无 RNA 酶的灭菌水中, 紫外分光光度计检测 RNA 浓度和纯度。将 RNA 溶液加入到 gDNA 吸附柱, 室温 13 200 r/min 离心 1 min, 过柱, 收集的滤液即为去除基因组 DNA 的 RNA 溶液。依据 Bestar 逆转录试剂盒说明书合成 cDNA 备用。依据 *ATXN1* 序列 (NM_001128164) 和 *GAPDH* 序列 (NM_002046.3), 使用 Primer 3 在线软件 (<http://primer3.ut.ee/>), 分别设计扩增 *ATXN1* 和 *GAPDH* cDNA 的引物 (见表 1), 分别扩增目的基因 *ATXN1* 和内参基因 *GAPDH*, 表达野生和突变 Ataxin-1 的细胞株分设 3 份, 293T 细胞和携带载体对照的 293T 细胞也分设 3 份, 4 组同时进行扩增, 依据试剂盒说明书推荐的扩增体系配置扩增反应液。扩增程序为 95℃ 预变性 2 min, 共 45 个循环, 每一循环包括 95℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 34 s (采集荧光信号), 72℃ 延伸 30 s, 循环结束后从 60℃ 升温到 98℃ 获取熔解曲线。以 *GAPDH* 扩增 Ct 值 (荧

表 1 PCR 扩增所用引物

基因	引物序列	长度 /bp
<i>ATXN1</i>	正向: 5'-GATCGACTCCAGCACCGTAG-3'	150
	反向: 5'-GATGACCAGCCCTGTCCAAA-3'	
<i>GAPDH</i>	正向: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	87
	反向: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'	

光信号到达设定阈值时所经历的循环数)为参考,计算 *ATXN1* 基因表达的相对量 ($-\Delta Ct$)= $ATXN1$ 基因 Ct 值均值 $-GAPDH$ 基因 Ct 值均值。野生型和突变型 *ATXN1* 表达量差异 ($-\Delta \Delta Ct$)= $-\Delta Ct$ 野生型 $-(-\Delta Ct$ 突变型)。

1.5 *ATXN1* 转录检测方法的评价

通过慢病毒载体介导,本研究将野生 *ATXN1* 和突变 *ATXN1* 表达载体导入 293T 细胞,通过 qRT-PCR 检测正常 *ATXN1* 和突变 *ATXN1* 的 mRNA 水平。通过扩增曲线判断 *ATXN1* 和 *GAPDH* 基因是否成功扩增,通过扩增后熔解曲线分析判断 *ATXN1* 和 *GAPDH* 基因扩增是否为特异扩增。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 23.0 统计软件。细胞内野生型和突变型 *ATXN1* 相对表达量以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *ATXN1* 转录水平检测方法建立成功

ATXN1 和 *GAPDH* 基因的扩增曲线呈 S 形,显示扩增方法成功(见图 1),扩增后熔解曲线分析显示 *ATXN1* 和 *GAPDH* 基因的熔解曲线峰值分别在 X 轴同一位点,说明扩增产物分别为均一性产物,即扩增为特异性扩增(见图 2)。因此本研究的扩增方法可用于对 *ATXN1*

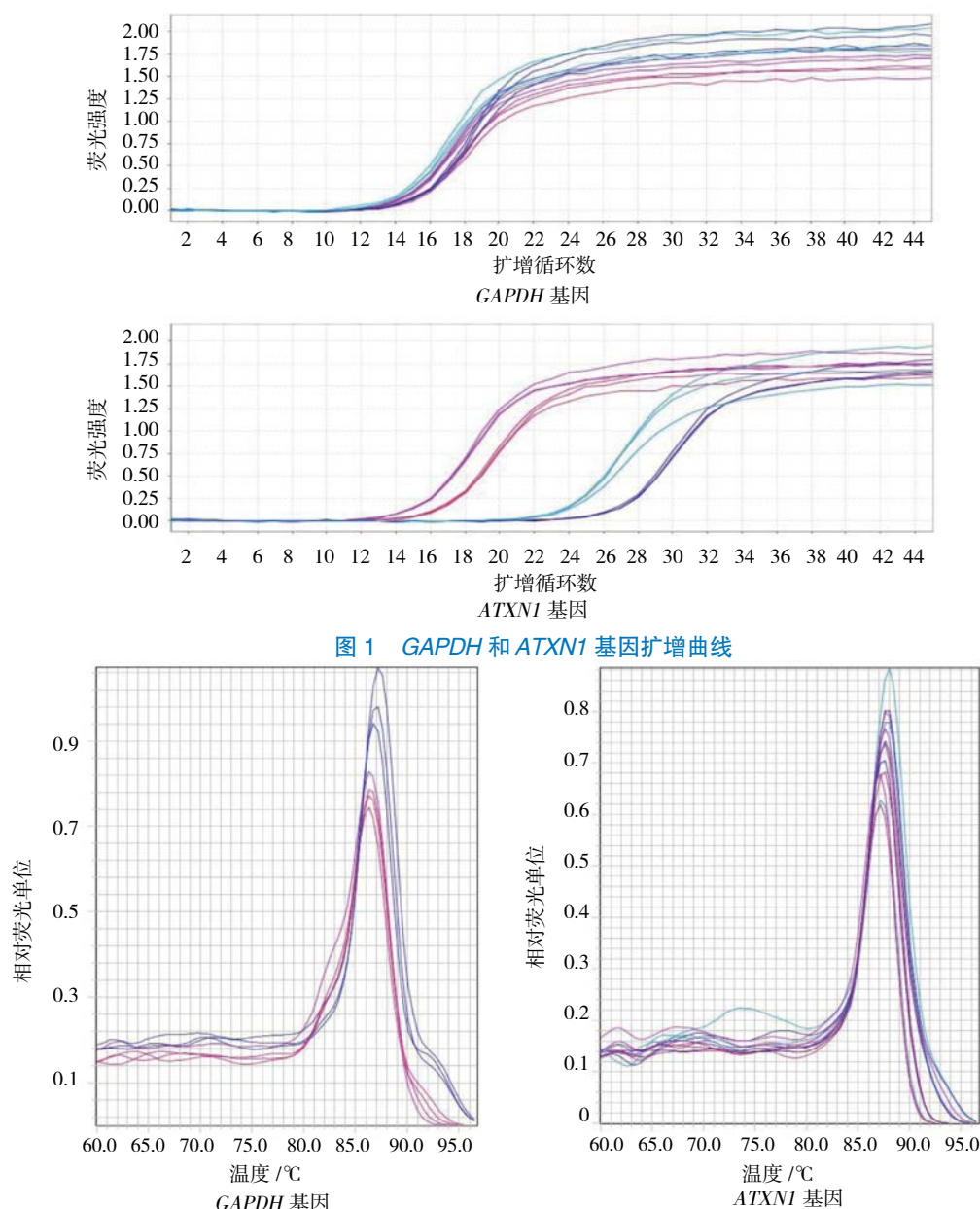


图 1 *GAPDH* 和 *ATXN1* 基因扩增曲线

图 2 *GAPDH* 和 *ATXN1* 基因的熔解曲线

mRNA 进行相对定量。

2.2 *ATXN1* 基因内 PolyQ 重复变异对基因自身转录的影响

通过实时荧光定量 PCR 扩增发现 293T 细胞内正常 *ATXN1* mRNA 的相对表达量为 (661.9 ± 17.7) , 而突变 *ATXN1* mRNA 的相对表达量为 (381.0 ± 20.5) , 两者比较, 差异有统计学意义 ($t = 17.950$, $P = 0.006$), 正常 *ATXN1* mRNA 的相对表达量高于突变 *ATXN1* mRNA, 正常 293T 细胞和仅转染载体对照的 293T 细胞中 *ATXN1* mRNA 的相对表达量分别为 (1.0 ± 0.1) 和 (0.3 ± 0.0) 。

3 讨论

ATXN1 基因定位于 6p23, 基因全长约 450 kb, 含 9 个外显子, 表达产物为 Ataxin-1 蛋白。在 *ATXN1* 基因外显子 7 中存在一段 CAG 三核苷酸重复序列, 正常人群中重复数为 6 ~ 44, 且多被 1 ~ 4 个编码组氨酸的 CAT 序列隔开^[6]。SCA1 是 *ATXN1* 基因外显子 7 中的 CAG 重复序列拷贝数增加所致的退行性疾病, CAG 重复序列数越多, 患者的发病年龄越早, 疾病越严重。CAG 重复序列数增加致 SCA1 的机制目前尚不完全清楚^[7]。有研究发现, 小鼠被敲除 *ATXN1* 基因后并未出现共济失调症状或浦肯野细胞的病理改变; 另有研究发现在小鼠和果蝇体内过度表达 PolyQ 超出正常长度的 Ataxin-1 会导致神经退行性改变, 甚至在小鼠和果蝇体内过度表达正常的 Ataxin-1 蛋白也会导致神经元的退行性改变, 只是病变程度较突变 Ataxin-1 蛋白所致轻^[8]。因此, SCA1 发病的分子机制与突变产物毒性功能获得有关。在 *ATXN1* 基因杂合突变小鼠体内, 若再敲除另一拷贝的正常 *ATXN1* 基因, 小鼠的 SCA1 症状会进一步加重, 这显示正常 Ataxin-1 蛋白功能的丢失也可能与 SCA1 发病有关^[9]。现有研究结果显示, SCA1 发病机制较为复杂, 既有突变蛋白的毒性功能获得, 也有野生蛋白的功能缺失^[10]。此外, SCA1 的发病可能还与 Ataxin-1 蛋白的修饰有关, Ataxin-1 蛋白翻译后需经修饰才具有生物功能, 这些修饰有磷酸化、泛素化、类泛素化、转谷氨酰胺等, 这些修饰能改变 Ataxin-1 蛋白的稳定性或 Ataxin-1 蛋白对靶基因的调控能力, 导致 SCA1 病, 如 Ataxin-1 蛋白 776 位丝氨酸残基通过 Akt 激酶被磷酸化, 可与 14-3-3 蛋白作用形成包涵体, 使神经元发生退行性改变, Ataxin-1 分子中 PolyQ 长度越长, Ataxin-1 与 14-3-3 蛋白作用

愈强^[11]。

一般认为 Ataxin-1 蛋白为转录抑制因子, 参与其转录调控的分子有 Capicua、HDAC3、Gfi-1 等^[12]。*ATXN1* 基因外显子 7 中的 CAG 重复序列拷贝数增加会影响其调控的目标基因转录, 但对 *ATXN1* 基因自身转录是否产生影响, 目前未见报道。本研究发现, 突变 *ATXN1* 基因转录产物 mRNA 在细胞内的相对表达量低于正常 *ATXN1* 基因。以往研究显示, Ataxin-1 蛋白有 3 段氨基酸残基结构与 SCA1 发病密切相关, 它们分别是 PolyQ 结构段、AXH 结构段及近 C 端的 NLS 结构段^[13]。PolyQ 延伸是 SCA1 发病的基础, AXH 肽段结构中 570 ~ 689 位氨基酸对 Ataxin-1 蛋白聚集作用是 SCA1 发病的因素之一, NLS 结构段引导 Ataxin-1 蛋白进入胞核也是 SCA1 发病的一个因素^[14]。本研究显示, PolyQ 延伸同时导致 *ATXN1* 基因转录量减少, 推测 *ATXN1* 基因内 PolyQ 重复变异抑制 *ATXN1* 基因自身转录可能对 SCA1 发病产生影响, 突变的 Ataxin-1 量减少, 则进入胞核的突变 Ataxin-1 减少, 理论上可减轻 SCA1 发病。因此, 本研究认为 PolyQ 延伸可通过影响基因转录, 减轻 SCA1 发病。

参 考 文 献:

- [1] 李松林, 翟小菊, 张璐, 等. 遗传性脊髓小脑共济失调的发病机制及临床表现 [J]. 河南大学学报 (医学版), 2018, 37(4): 295-300.
- [2] HIGUCHI Y, OKUNUSHI R, HARA T, et al. Mutations in COA7 cause spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy [J]. Brain, 2018, 141(6): 1622-1636.
- [3] RAMANI B, HARRIS G M, HUANG R, et al. A knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 3 exhibits prominent aggregate pathology and aberrant splicing of the disease gene transcript [J]. Hum Mol Genet, 2017, 26(16): 3232-3233.
- [4] 张依生, 宋峰亮, 王飞, 等. 遗传性脊髓小脑共济失调 7 型研究进展 [J]. 广东医学, 2015, 36(23): 3718-3723.
- [5] EDAMAKANTI C R, DO J, DIDONNA A, et al. Mutant ataxin1 disrupts cerebellar development in spinocerebellar ataxia type 1 [J]. J Clin Invest, 2018, 128(6): 2252-2265.
- [6] KEISER M S, MONTEYS A M, CORBAU R, et al. RNAi prevents and reverses phenotypes induced by mutant human ataxin-1 [J]. Ann Neurol, 2016, 80(5): 754-765.
- [7] CRESPO-BARRETO J, FRYER J D, SHAW C A, et al. Partial loss of ataxin-1 function contributes to transcriptional dysregulation in spinocerebellar ataxia type 1 pathogenesis [J]. PLoS Genet, 2010, 6(7): e1001021.
- [8] PARK J, AL RAMAHI I, TAN Q, et al. RAS-MAPK-MSK1

- pathway modulates ataxin 1 protein levels and toxicity in SCA1[J]. Nature, 2013, 498(7454): 325-331.
- [9] RIPOLONE M, LUCCHINI V, RONCHI D, et al. Purkinje cell COX deficiency and mtDNA depletion in an animal model of spinocerebellar ataxiatype 1[J]. J Neurosci Res, 2018, 96(9): 1576-1585.
- [10] VENKATRAMAN A, HU Y S, DIDONNA A, et al. The histone deacetylase HDAC3 is essential for Purkinje cell function, potentially complicating the use of HDAC inhibitors in SCA1[J]. Hum Mol Genet, 2014, 23(14): 3733-3745.
- [11] LAI S, O'CALLAGHAN B, ZOGHBI H Y, et al. 14-3-3 Binding to ataxin-1 (ATXN1) regulates its dephosphorylation at Ser-776 and transport to the nucleus[J]. J Biol Chem, 2011, 286(40): 34606-34616.
- [12] ROUSSEAUX M W C, TSCHUMPERLIN T, LU H C, et al. ATXN1-CIC complex is the primary driver of cerebellar pathology in spinocerebellar ataxia type 1 through a gain-of-function mechanism[J]. Neuron, 2018, 97(6): 1235-1243.
- [13] ZOGHBI H Y, ORR H T. Pathogenic mechanisms of a polyglutamine mediated neurodegenerative disease, spinocerebellar ataxia type 1[J]. J Biol Chem, 2009, 284(12): 7425-7429.
- [14] HU Y S, DO J, EDAMAKANTI C R, et al. Self-assembling vascular endothelial growth factor nanoparticles improve function in spinocerebellar ataxia type 1[J]. Brain, 2019, 142(2): 312-321.
- (王荣兵 编辑)
- 本文引用格式：**陆盈, 孙顺昌. PolyQ 重复变异对 *ATXN1* 基因转录的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(9): 8-12.