

真核基因表达调节的新进展

付四清 季文琴

(上海医科大学病理生理学教研室、上海)

提 要

真核细胞基因的表达受顺式作用的 DNA 区域(启动子和增强子)和反式作用因子(又称转录活性因子)两方面的调控。诱导性因素可以通过特异性的转录活性因子的产生而发挥作用。转录活性因子与启动子、增强子的 DNA 核心顺序之间的特异性结合是真核基因表达的组织特异性和发育阶段性的决定性因素。本文综述了近年来真核基因表达调节的新进展,对启动子、增强子和转录活性因子的作用和性质进行了讨论。

现代真核细胞的分子生物学的深入研究必然要涉及真核基因表达的诱导性、组织特异性和发育阶段性。在研究真核克隆基因的诱发突变和表达效应时发现真核细胞基因表达的调节需要有顺式作用的 DNA 区域(cis-acting element)和反式作用的 DNA 区域(trans-acting element)。所谓顺式作用的 DNA 区域是指在基因调控区域中不需要通过其编码产物而直接控制基因表达的 DNA 片段,如启动子、增强子等。而反式作用的 DNA 区域则是通过编码的反式作用因子(又称转录活性因子)来发挥控制基因表达作用的 DNA 片段。顺式作用的 DNA 区域和转录活性因子相互作用,改变真核基因表达的水平,影响真核细胞生长分化等多种生物学过程^[1]。

一、启动子决定基因表达的起始

真核细胞基因转录的起始是由启动子所决定的。启动子大都位于 RNA 转录起始点上游区,长度约为 100 bp,是基因精确和有效地进行转录所必需的结构^[2]。典型的启动子包括一个 TATA 盒和一个或几个上游启动子区段(UPE, upstream promoter element)。TATA

盒又称 Goloberg-Hogness 盒,距转录起始点约-30 bp 处,决定基因转录的精确起始。以前称为 CAT 盒和 GC 盒的 DNA 区段都是 UPEs 的组成部分。UPEs 决定基因转录的水平。UPEs 和 TATA 盒连接的方向与 UPEs 的功能无关,但在 UPEs 和 TATA 盒之间插入一段 DNA 片段可以降低基因转录的水平。如 Hela 细胞的 β -珠蛋白基因的启动子包括一个 TATA 盒和二个 UPEs (图 1)。这三个区段中任何一个核苷酸发生突变均可引起 β -珠蛋白基因的转录水平降低 5—10 倍,而启动子的其他区域的核苷酸发生突变都不会影响 β -珠蛋白基因的转录水平。值得注意的是在 CAT 盒的 DNA 顺序中置换两个不同的核苷酸残基,有利于特异性转录活性因子和 CAT 盒结合,引起 β -珠蛋白基因的转录水平增加 3—3.5 倍。

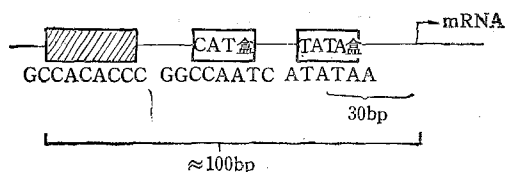


图 1 β -珠蛋白基因的启动子

二、增强子促进基因的转录水平

增强子存在于多种真核细胞基因组中,具有促进启动子的转录起始活性,是基因有效表达所必需的结构之一。增强子的活性不依赖于增强子所在的位置和方向。它具有长距效应,但只作用于同一条 DNA 分子中的启动子;它可位于基因的上游区、下游区或基因的内含子之中。通过 DNA 重组技术还发现增强子可以促进异源性基因的转录水平,但具有相对的种属特异性^[3]。根据增强子作用的类型可将增强子分为受外界因素影响的诱导性增强子和与组织特异性、发育阶段性有关的组织特异性增强子,它们分别促进诱导蛋白和结构蛋白基因的转录水平。

(一) 诱导性增强子

目前知道的诱导性增强子有热休克基因、抗重金属蛋白质基因, β -干扰素, c-fos 基因的增强子以及存在于小鼠乳腺肿瘤病毒和小鼠肉瘤病毒的长末端重复顺序和某些细胞基因组中的类固醇反应性增强子。诱导性增强子中有一段较短的核心顺序是基因转录调控所必需的结构之一。如人抗重金属蛋白质基因增强子中有一段 12 bp 的核心顺序,具有促进不同启动子的转录起始水平。诱导性增强子核心顺序的拷贝数与诱导因子的诱导活性之间的关系在不同细胞类型中变化较大。这主要是由于这些细胞中的转录活性因子的水平和种类不同所致。所以,诱导因子主要是通过诱导转录活性因子的产生,再通过后者来促进诱导性增强子的生物活性。

诱导性增强子可以促进不同启动子的转录活性,其机制包括诱导因子诱导产生或激活正性转录活性因子或/和抑制负性转录活性因子。 β -干扰素基因的诱导性增强子位于基因转录起始点上游的-65 bp 至-109 bp 之间,具有负性调节位点和与之交叉重叠的正性调节位点。经干扰素诱导剂作用细胞后,原先结合于负性调节位点的负性转录活性因子解离,细胞内正性转录活性因子与正性调节位点相互结合,

促进 β -干扰素基因的表达水平。负性调节位点的缺失或将多个串联的正性调节位点的核心顺序 (5'-AAGTGA-3') 插入到启动子的上游区,可以观察到基因转录发生低水平的诱导效应^[4]。热休克转录活性因子经热诱导后与热休克基因的诱导性增强子中热休克反应区段的结合力增强。当第一个热休克转录活性因子与具有双侧对称结构的热休克反应区段结合后, DNA 结构发生改变,有利于热休克转录活性因子进一步结合,从而促进热休克基因的转录水平^[5]。

在无类固醇受体的细胞中引进含有类固醇依赖性增强子的表达质粒,用类固醇诱导时质粒的表达水平无变化。但再引进一个可表达类固醇受体的质粒后,用类固醇诱导时质粒的表达水平大幅度上升。故类固醇-受体复合物与诱导性增强子的结合位点是类固醇依赖性基因表达的调节区域^[6]。以前认为类固醇是在细胞质中与其受体结合,移动到核内发挥作用。但现已发现无配体结合的类固醇受体可存在于细胞质和细胞核内,分别与胞质蛋白质和类固醇依赖的 DNA 调节区域结合。当类固醇存在时类固醇受体复合物释放胞质蛋白质,类固醇-受体复合物进入核内发挥作用;或者类固醇与预先作用于增强子的类固醇受体结合,引起蛋白质-DNA 的构象发生改变,促进基因的转录。

(二) 组织特异性增强子

免疫球蛋白 (Ig) 基因的表达具有明显的组织特异性和发育阶段性。B 细胞 Ig 基因表达的调节至少需要三种不同的 DNA 区域: 特异性 Ig 基因的增强子,启动子和与细胞特异性转录后加工有关的基因内顺序^[7]。

Ig 基因的特异性增强子位于重链和 κ 轻链基因的内含子中,含有多个核心顺序。单个核心顺序中若发生碱基置换或缺失时对整个基因的转录水平影响较小。重链基因的特异性增强子有四个核心顺序和一个只存在于重链基因的高度保守的八聚体区域。四个核心顺序均为 5'-ATTTGCAT-3',可与转录活性因子 NF-A1 和 NF-A2 结合,其中 NF-A2 只存在于 B 细

胞中,决定重链基因转录的组织特异性。 κ 轻链增强子有三个核心顺序和一个只存在于 κ 轻链基因的 DNA 区域。转录活性因子 NF- κ A 无组织特异性,与三个核心顺序结合,决定 κ 轻链基因转录的水平。而转录活性因子 NF- κ B 只存在于成熟的 B 细胞中,与 κ 轻链基因增强子的特异性 DNA 区域结合,促进 κ 轻链基因的组织特异性表达^[8]。

白蛋白基因的表达有明显的组织特异性。实验发现白蛋白基因的组织特异性增强子至少需要与四种正性转录活性因子结合才能促进白蛋白基因的组织特异性表达。在不表达白蛋白基因的细胞中发现有明显抑制作用的负性转录活性因子与白蛋白基因的调节区域结合,抑制白蛋白基因的转录^[9]。因此,组织特异性增强子决定基因的特异性表达与细胞内特异性转录活性因子的种类和水平有关。

三、启动子和增强子的调节

启动子和增强子不仅结构相似,而且有一些 DNA 区域可以相互通用。它们的功能在某些程度上相似。 β -珠蛋白基因启动子的 UPEs 缺失后, β -珠蛋白基因的转录停止。但将猴空泡病毒 SV 40 早期基因的增强子重组到紧邻缺失的启动子前时, β -珠蛋白基因的转录活性恢复。这种现象在其他启动子和增强子之间也可发现。启动子和增强子的作用不同是它们的核心顺序的重组排列和拷贝数不同的结果,而不是这些核心顺序本身的作用不同所致。单个热休克基因的启动子不能长距离地发挥促进基因转录的作用,但两个这种启动子串联在一起时具有增强子的活性。不过,启动子中的 CAT 盒的多拷贝 DNA 片段没有增强子活性。

启动子和增强子的活性受细胞内转录活性因子调节。实验发现细胞内同一种转录活性因子可以作用于同一或不同的启动子和增强子的不同调节区域,不同的转录活性因子可以作用于同一的启动子和增强子的相同调节区域,从多方面影响细胞基因的转录水平^[10,11]。 α -FP 基因组织特异性表达取决于转录活性因子,如

raf 和 Rif 基因产物。raf 基因产物只作用于 α -FP 的增强子,对白蛋白基因、 γ -谷氨酰转肽酶等基因的增强子无作用,决定 α -FP 基因的基础分泌和特异性表达。Rif 基因产物的作用需要 raf 基因产物的存在,具有促进 α -FP 基因转录水平的作用^[12]。

总之,基因表达的调节与启动子、增强子和转录活性因子之间的相互作用有关。启动子和增强子的 DNase I 高敏感区域是转录活性因子的作用位点。当正性的或负性的转录活性因子与启动子和增强子中的正性的或负性的调节区域作用时,可改变 DNA 的空间构象,在局部形成 Z-DNA,影响基因的表达水平^[13]。

四、转录活性因子

转录活性因子是由反式作用的 DNA 区域所编码的蛋白质因子,它们能通过与顺式作用的 DNA 区域(启动子和增强子)结合,改变 DNA 的构象,影响基因转录的水平。转录活性因子可分为存在于多种细胞内的非特异性的转录活性因子和只存在于某种细胞内的特异性的转录活性因子。非特异性的转录活性因子可以作用于多种不同的启动子和增强子,促进多种基因的转录水平,决定基因转录的诱导性。特异性的转录活性因子只与启动子和增强子的某种特异性 DNA 区域结合,决定基因转录的组织特异性和发育阶段性。另外,根据作用效应可将转录活性因子分为正性转录活性因子和负性转录活性因子。正性转录活性因子作用于启动子和增强子的正性调节区域,促进基因的转录;负性转录活性因子作用于启动子和增强子的负性调节区域,抑制基因的转录^[14,15]。转录活性因子的 DNA 结合位点和促进基因转录活性的效应位点是分开存在的,两者之间具有别构效应。如类固醇受体具有与类固醇结合的位点,与特异性 DNA 顺序结合的位点以及促进基因转录活性的位点等三个功能性区域。如果将孕酮受体的 DNA 结合位点用糖皮质激素受体的相应区域取代,这种杂交蛋白质可以特异性促进糖皮质激素调节的基因的转录水平,但它依赖孕酮

的激活^[16]。

目前认为,半胱氨酸-锌-DNA 结合指形区存在于大多数转录活性因子中,是转录活性因子与特异性的 DNA 顺序结合的区域。其基本结构是锌离子结合在两对半胱氨酸残基之间所形成的指形区(图 2)。当半胱氨酸-锌-DNA 结合指形区域与特异性 DNA 顺序结合时,影响邻近的 DNA 构象和转录活性因子的促进基因

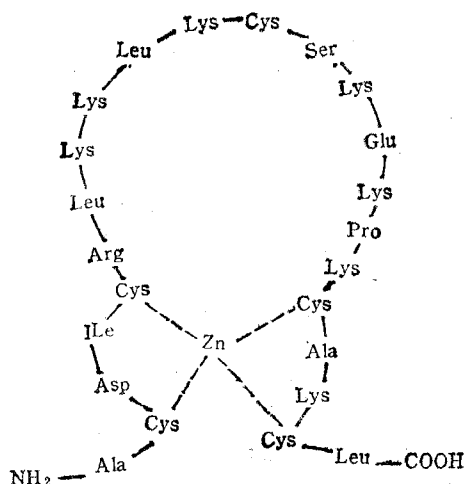


图 2 半胱氨酸-锌-DNA 结合指形区域

转录活性的效应位点的构象,进而改变基因的转录水平^[17]。

随着分子生物学新技术的发展和完善,我们可以深入认识真核细胞基因表达的组织特异性,发育阶段性和诱导性的机理,从而从基因水平上揭开生物生长、发育和进化的奥秘。

参 考 文 献

- [1] Maniatis, T. et al.: *Science*, 1987, 236, 1237.
- [2] Struhl, K.: *Cell*, 1987, 49, 195.
- [3] Schorm, S. et al.: *Genes Dev.*, 1987, 1, 65.
- [4] Fujita, T. et al.: *Cell*, 1987, 49, 357.
- [5] Kingston, R. E. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 1987, 7, 1530.
- [6] Celander, D. et al.: *J. Virol.*, 1987, 61, 269.
- [7] Gerster, J. et al.: *EMBO J.*, 1987, 6, 1323.
- [8] Lenardo, M. et al.: *Science*, 1987, 236, 1573.
- [9] Cergehni, S. et al.: *Cell*, 1981, 50, 627.
- [10] Kovesdo, I. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 2180.
- [11] Speck, N. A. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 1987, 7, 1101.
- [12] Vogt, T. F. et al.: *Science*, 1987, 236, 301.
- [13] Gross, D. S. et al.: *TIBS*, 1987, 12, 293.
- [14] Stein, R. W. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 1987, 7, 1164.
- [15] Wight, P. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 5959.
- [16] Green, S. et al.: *Nature*, 1987, 325, 75.
- [17] Johnston, M.: *Nature*, 1987, 328, 353.

[本文于 1987 年 11 月 28 日收到]

(上接第 106 页)

到 0.2~0.5 fmol 水平^[21]。② 提高分析速度: 主要以改善色谱条件入手,例如色谱柱的改进、流动相的配比及淋洗程序等。③ 分析过程的自动化: 目前一个广泛引起注意的问题是,如何使样品的预处理及衍生过程自动化。

参 考 文 献

- [1] Ogden, G. et al.: *LC-GC*, 1986, 5, 28.
- [2] Pfeiffer, R. F. et al.: *Adv. Chromatogr.*, 1983, 22, 37.
- [3] Roth, M.: *Anal. Chem.*, 1971, 43, 880.
- [4] Švedas, V. J. K. et al.: *Anal. Biochem.*, 1980, 101, 188.
- [5] Simons, S. Z. et al.: *Anal. Biochem.*, 1979, 82, 250.
- [6] Böhlen, P. et al.: *Anal. Biochem.*, 1979, 94, 313.
- [7] Einarsson, S. et al.: *J. Chromatogr.*, 1983, 282, 609.

- [8] Betßer, I. et al.: *Chromatographia*, 1986, 22, 381.
- [9] Knoop, D. R. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 8472.
- [10] Bayer, E. et al.: *Anal. Chem.*, 1976, 48, 1106.
- [11] Rnecht, R. et al.: *Advanced Methods in Protein Microsequence Analysis* (Ed. by Wittmann-Liebold, B. et al.), Springer-Verlag, Berlin, 1986, p. 56—61.
- [12] Jones, B. N.: *J. Liq. Chromatogr.*, 1981, 4, 565.
- [13] Bidlingmeyer, B. A. et al.: *J. Chromatogr.*, 1984, 336, 93.
- [14] Työppönen, J. T.: *J. Chromatogr.*, 1987, 413, 25.
- [15] Chang, J. Y.: *Methods in Enzymology*, Vol. 91 (C. H. W. Hirs et al. ed.) Academic Press, New York, 1983, p. 43.
- [16] Lottspeich, F.: *J. Chromatogr.*, 1985, 326, 321.
- [17] Sista, H. S.: *J. Chromatogr.*, 1986, 359, 231.
- [18] Lindroth, P. et al.: *Anal. Chem.*, 1979, 51, 1667.
- [19] 姚志建等:《色谱》, 1986, 4, 364.
- [20] Chang, J. Y. et al.: *Biochem. J.*, 1981, 199, 547.
- [21] Roach, M. C. et al.: *Anal. Chem.*, 1987, 59, 411.

[本文于 1987 年 10 月 28 日收到]