

SUMO-1 共价修饰 ataxin-3*

汤建光^{1,2)**} 沈璐^{1)**} 唐北沙^{1)***} 张玉虎¹⁾ 江泓¹⁾

廖书胜¹⁾ 张海南²⁾ 王春喻²⁾ 夏昆³⁾ 潘乾³⁾

(¹⁾中南大学湘雅医院神经内科, 长沙 410008; ²⁾中南大学湘雅二医院神经内科, 长沙 410011;

³⁾中国医学遗传学国家重点实验室, 长沙 410078)

摘要 为了探讨 ataxin-3 的正常生理功能以及脊髓小脑型共济失调 III 型 / 马查多 - 约瑟夫病的发病机理, 采用酵母双杂交技术, 选择 polyQ 扩展突变型 ataxin-3 全长构建诱饵质粒, 筛选成人脑 cDNA 文库, 寻找与之相互作用的蛋白质, 筛选到互作蛋白 small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). 进一步运用免疫共沉淀技术证实, SUMO-1 在哺乳动物细胞中共价修饰野生型和 polyQ 扩展突变型 ataxin-3. 免疫荧光共定位实验发现, polyQ 扩展突变型 ataxin-3 形成的核内蛋白聚合体与 SUMO-1 共定位. 研究提示, ataxin-3 的正常生理功能可能受 SUMO-1 的调节, SUMO-1 可能参与了脊髓小脑型共济失调 III 型 / 马查多 - 约瑟夫病的发病机制.

关键词 脊髓小脑型共济失调 III 型 / 马查多 - 约瑟夫病, ataxin-3, SUMO-1, 酵母双杂交, 免疫共沉淀, 免疫荧光

学科分类号 R394.3, R741.02

脊髓小脑型共济失调 III 型 / 马查多 - 约瑟夫病 (spinocerebellar ataxia type 3 and Machado-Joseph disease, SCA3/MJD) 是一种常见的呈常染色体显性遗传的神经系统遗传病, 其临床表现以小脑性共济失调、锥体系和锥体外系受损以及眼外肌麻痹等为主. SCA3/MJD 的疾病基因 *MJD1* 于 1994 年被克隆^[1], *MJD1* 编码区的 3'端含一段 CAG 三核苷酸重复序列, 基因编码产物——ataxin-3 的羧基端相应地含一段多聚谷氨酰胺 (polyglutamine, polyQ) 肽链, 正常个体其 *MJD1* 的 CAG 三核苷酸重复约 13~36 次, 而 SCA3/MJD 患者其 *MJD1* 的 CAG 三核苷酸重复次数扩展到 62~82 次^[1]. ataxin-3 的正常生理功能以及 SCA3/MJD 的发病机制目前并未完全阐明. 在体内和体外实验中, polyQ 扩展突变型 ataxin-3 可在细胞核内形成包涵体 (或蛋白聚合体) 并导致细胞死亡^[2,3], 说明 polyQ 扩展突变型 ataxin-3 获得细胞毒性可能是 SCA3/MJD 发病的最基本原因, 但 polyQ 扩展突变导致 ataxin-3 获得毒性的具体机制目前并不完全清楚. 为进一步阐明 ataxin-3 的正常生理功能及其调节机制以及突变型 ataxin-3 的致病机制, 本研究采用酵母双杂交技术, 选择 polyQ 扩展突变型 ataxin-3 全长构建诱饵质

粒, 筛选成人脑 cDNA 文库, 筛选到互作蛋白苏素 -1 (small ubiquitin-like modifier 1, SUMO-1). 免疫共沉淀证实, SUMO-1 在哺乳动物细胞中共价修饰野生型和 polyQ 扩展突变型 ataxin-3; 免疫荧光发现, polyQ 扩展突变型 ataxin-3 形成的核内蛋白聚合体与 SUMO-1 共定位.

1 材料与方法

1.1 材料

含 ataxin-3 全长编码序列的酵母表达质粒 pAS2-1-MJD20Q (CAG 拷贝数为 20 次) 和 pAS2-1-MJD68Q (CAG 拷贝数为 68 次) (日本东京大学 Nukina 教授和王光辉博士赠送); 酵母双杂交系统 -MATCHMEKER GAL4 Two-hybrid System 3 (Clontech 公司); 质粒 pCDNA3.1-Myc-His (-)B、

*国家自然科学基金资助项目(30070273, 30470619)、国家高新技术研究发展计划(863)资助项目(2001AA227011, 2004AA227040)和国家“十五”科技攻关计划项目(2004BA720A03).

**并列第一作者.

*** 通讯联系人. Tel: 0731-4327398, Fax: 0731-4327332

E-mail: bstang7398@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-05-22, 接受日期: 2006-07-04

pCDNA3.1/Hygro(-)(Invitrogen 公司); PCR 产物纯化试剂盒(Roche 公司); c-Myc 单克隆抗体和兔抗人 SUMO-1 多抗(Santa Cruz 公司); SUMO-1 单克隆抗体(Zymed 公司); 辣根过氧化物酶标记的抗小鼠二抗(Sigma 公司); cy2 偶联的山羊抗鼠 IgG、cy3 偶联的山羊抗兔 IgG 以及 Protein G-Agarose (KPL 公司); ECL 试剂盒(Pharmacia 公司); 激光共聚焦显微镜(Bio-Rad 公司).

1.2 载体构建

1.2.1 Bait 质粒. *Bam*H I /*Sal* I 双酶切 pAS2-1-MJD68 和 BD 质粒 pGBKT7, 电泳回收目的基因和载体后用 T4 连接酶连接, 构建重组质粒 pGBKT7-MJD68, 酶切和测序鉴定重组质粒.

1.2.2 ataxin-3 和 SUMO-1 真核表达质粒. 分别以 pAS2-1-MJD20 和 pAS2-1-MJD68 为模板 PCR 扩增野生型和 polyQ 扩展突变型 ataxin-3 的全长编码序列, PCR 产物的上下游分别引入 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点; 以人胎脑 cDNA 文库为模板 PCR 扩增 SUMO-1 的全长编码序列, PCR 产物的上下游也分别引入 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点. 质粒以及纯化后的 PCR 产物经 *Bam*H I /*Hind* III 双酶切, 电泳回收酶切产物, 用 T4 连接酶连接, 以构建重组质粒 pCDNA3.1-Myc-His(-) B-MJD20Q、pCDNA3.1-Myc-His(-) B-MJD68Q 和 pCDNA3.1/Hygro(-)-SUMO-1, 酶切和测序鉴定重组质粒.

1.3 酵母双杂交筛选成人脑 cDNA 文库

以 pGBKT7-MJD68 作为筛库 Bait 质粒, 采用 PEG/LiAc 法转化酵母菌 AH109, 进行自激活鉴定及 3-AT 最佳抑制浓度测定, 再根据 MATCHMEKER GAL4 Two-hybrid System 3 说明书进行大规模文库转化, 转化后的 AH109 在 SD-Leu/Trp/His + 3-AT 皿中 30°C 培养 3~5 天后, 挑取 His⁺克隆. 然后在 SD-Ade/Leu/Trp/His⁺ 3-AT + X- α -gal 皿中 30°C 培养 5~7 天, 挑取蓝色的 His⁺、Ade⁺、Mel⁺ 克隆在 SD-Leu/Trp + 3-AT + X- α -gal 皿中, 反复传代 3 次以保证每个单克隆仅含 1 个 AD-Y 质粒. PCR 扩增阳性 AD-Y 质粒中的插入片段, *Hae* III 酶切 PCR 产物, 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物及酶切产物以消除重复 AD-Y 质粒克隆. 共转化 pGBKT7 与 AD-Y 质粒至 AH109, 铺 SD-Ade/Leu/Trp/His⁺ 3-AT + X- α -gal 皿消除假阳性克隆. 共转化 Bait 质粒与 AD-Y 质粒至 AH109, 铺 SD-Ade/Leu/Trp/His⁺ 3-AT + X- α -gal 皿重建互作. 最后将阳性 AD-Y 质粒测序, 将测序结果在

GenBank 数据库中作 BLAST 比较. 应用 GCG 软件分析可能的阅读框, 确定是否与 GAL4 AD 载体序列正确融合.

1.4 细胞培养以及转染

SH-SY5Y 细胞采用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 1640 培养液, 置于 37°C 的 CO₂ 培养箱中培养. 质粒转染按照 Lipofectamine2000 操作说明书进行.

1.5 免疫共沉淀

于转染 24 h 后进行, 每个 10 cm 培养皿加 1 ml 4°C 保存的改良 RIPA (150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 5 mmol/L EDTA, 0.1% SDS, 0.5% 脱氧胆酸钠, 20 mmol/L N-ethylmaleimide, 加入 1:100 的 cocktail) 于冰上裂解 30 min. 裂解液 4°C 12 000 g 离心 30 min 后收集上清. 留 20 μ l 上清, 加入同体积 2 \times SDS 样品缓冲液混匀, 100°C 煮沸 10 min, 4°C 保存以备蛋白质印迹用, 其余上清全部用于下一步免疫沉淀. 每 1 ml 上清中加入 50 μ l Protein G Agarose, 4°C 转鼓 1 h, 4°C 12 000 g 离心 20 s 收集上清. 每 1 ml 经预吸附的上清中加入相应的单克隆抗体 4 μ g (沉淀 ataxin-3 用 c-Myc 单抗, 沉淀 SUMO-1 用 SUMO-1 单抗, 以加入 4 μ g 正常小鼠 IgG 作为阴性对照) 4°C 转鼓 30 min, 再加入 50 μ l Protein G Agarose, 4°C 转鼓 2 h. 离心收集沉淀, RIPA (不含 cocktail) 洗涤沉淀 3 次, 去上清, 加入 20 μ l 2 \times SDS 样品缓冲液, 100°C 煮沸 10 min. 离心取上清行蛋白质印迹. 蛋白质印迹具体操作为: 取 10 μ l 上清行 10% SDS-PAGE, 并将蛋白质转至 PVDF 膜, 将 PVDF 膜封闭 1 h 后, 加入相应的一抗 (抗 c-Myc 单抗检测 ataxin-3, SUMO-1 单抗检测 SUMO-1), 室温下孵育 1 h, 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠抗体, 室温下孵育 45 min, 洗膜后用 ECL 试剂盒显影.

1.6 免疫荧光共定位

转染 24 h 后, 将孔板中盖玻片上的细胞用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 3 次, 固定液 (3.7% 多聚甲醛 -2% 蔗糖 -PBS) 室温孵育 15 min, PBS 洗 4 次, 封闭液 (5% BSA-0.1% Triton X-100-PBS) 室温孵育 30 min, c-Myc 单抗和 SUMO-1 多抗室温下共孵育 60 min, PBS 洗 5 次, 封闭液室温孵育 30 min, cy3 偶联的抗兔 IgG 和 cy2 偶联的抗鼠 IgG 室温下共孵育 40 min (避光), Hoechst33258 染核 1 h, 最后用 PBS 洗 4 次 (避光), 用水溶性封片剂封片. 用

激光共聚焦显微镜观察。

2 结 果

2.1 酵母双杂交

消除重复克隆和假阳性克隆后, 共获得 5 个真阳性克隆. 阳性克隆测序结果经网上 BLAST 后显示: 其中一个阳性克隆的文库质粒中插入的 cDNA 序列与人 SUMO-1 的 3' 端编码序列的 219 个核苷酸 100% 相似, 并且 SUMO-1 的阅读框与 GAL4 AD 载体序列正确融合。

2.2 免疫共沉淀

2.2.1 SUMO-1 修饰野生型 ataxin-3. 无论 SUMO-1 是内源性表达还是过表达, 转染了 pCDNA3.1-Myc-His(-)B-MJD20Q 的 2 组细胞的全细胞裂解液中, 用 c-Myc 抗体免疫印迹检测到了分子质量大小约 50 ku 的 ataxin-3-20Q-cMyc 融合蛋白(图 1 中 * 处), 另外还检测到 2 条弱的高分子质量蛋白质带, 其中一条分子质量约为 67 ku (图 1 中 ** 处), 2 组细胞的细胞裂解液经抗 SUMO-1 单抗免疫沉淀后, 用抗 c-Myc 单抗免疫印迹同样检测到了 1 条大小约 67 ku 的蛋白质带(图 1 中 ** 处); 2 组细胞的全细胞裂解液中用抗 SUMO-1 单抗检测到一条约 67 ku 的蛋白质条带(图 2 中 ** 处), 2 组细胞的细胞裂解液经抗 c-Myc 单抗免疫沉淀后, 用抗 SUMO-1 单抗免疫印迹同样检测到了一条大小约 67 ku 的蛋白质带(图 2 中 ** 处). 空质粒组和单转 SUMO-1 组两对照组的细胞裂解液用抗 SUMO-1 单抗免疫沉淀后, 再用 c-Myc 单抗免疫印迹未检测

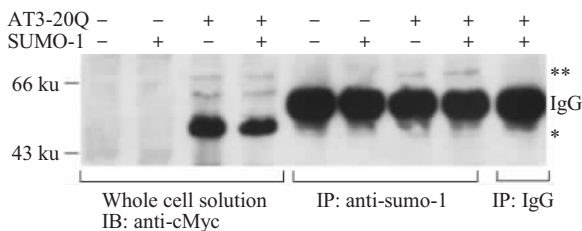


Fig. 1 Covalent modification of ataxin-3-20Q by SUMO-1 SH-SY5Y cells were transfected with c-Myc-tagged full-length ataxin-3-20Q in the presence or absence of exogenous SUMO-1, cells with SUMO-1 (exogenous or endogenous) alone were used as control. Five percent of the cell extracts were immunoblotted with monoclonal c-Myc antibody and the rest were subjected to immunoprecipitation with monoclonal SUMO-1 antibody, the normal mouse IgG was used as the control antibody. The immunoprecipitates were immunoblotted with monoclonal c-Myc antibody. Immunoblotting with c-Myc antibody detected the high molecular sumoylated ataxin-3-20Q (double asterisk) in the cell extracts of ataxin-3-20Q-expressing cells and in the corresponding immunoprecipitates but not in the control groups.

到特异的蛋白质条带(图 1), 而反过来用 c-Myc 单抗免疫沉淀后再用抗 SUMO-1 单抗免疫印迹同样未检测到特异的蛋白质条带(图 2), 说明实验组 Co-IP 的阳性结果不是由抗 SUMO-1 单抗或抗 c-Myc 单抗在 IP 过程中的非特异性反应所致; pCDNA3.1/Hygro (-)-SUMO-1 和 pCDNA3.1-Myc-His(-)B-MJD20Q 共转组细胞裂解液, 用正常小鼠 IgG 免疫沉淀后, 用 c-Myc 单抗(图 1)或 SUMO-1 单抗(图 2)免疫印迹均未检测到任何特异的蛋白质带, 说明实验组 Co-IP 的阳性结果不是由小鼠 IgG 的非特异性反应所致. 上述结果说明, SUMO-1 修饰野生型 ataxin-3, 这种修饰作用使野生型 ataxin-3 的表观分子质量增加了 17 ku.

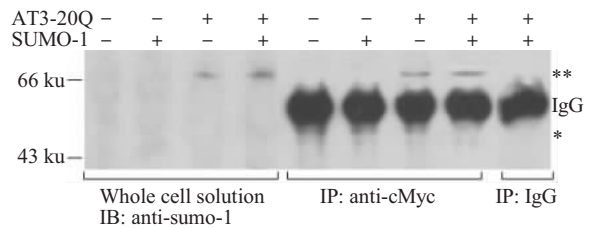


Fig. 2 Covalent modification of ataxin-3-20Q by SUMO-1 SH-SY5Y cells were transfected with c-Myc-tagged full-length ataxin-3-20Q in the presence or absence of exogenous SUMO-1, cells with SUMO-1 (exogenous or endogenous) alone were used as control. Five percent of the cell extracts were immunoblotted with monoclonal SUMO-1 antibody and the rest were subjected to immunoprecipitation with monoclonal c-Myc antibody, the normal mouse IgG was used as the control antibody. The immunoprecipitates were immunoblotted with monoclonal SUMO-1 antibody. Immunoblotting with c-Myc antibody detected the high molecular sumoylated ataxin-3-20Q (double asterisk) in the cell extracts of ataxin-3-20Q-expressing cells and in the corresponding immunoprecipitates but not in the control groups.

2.2.2 SUMO-1 修饰 polyQ 扩展突变型 ataxin-3. 无论 SUMO-1 是内源性表达还是过表达, 转染了 pCDNA3.1-Myc-His(-)B-MJD68Q 2 组细胞的全细胞裂解液中, 用 c-Myc 抗体免疫印迹检测到了分子质量大小约 60 ku 的 ataxin-3-20Q-cMyc 融合蛋白(图 3 中 * 处), 另外还检测到 2 条弱的高分子质量蛋白质带, 其中一条分子质量约为 77 ku (图 3 中 ** 处), 2 组细胞的细胞裂解液经抗 SUMO-1 单抗免疫沉淀后, 用抗 c-Myc 单抗免疫印迹同样检测到了 1 条大小约 77 ku 的蛋白质带(图 3 中 ** 处); 2 组细胞的全细胞裂解液中用抗 SUMO-1 单抗检测到一条约 77 ku 的蛋白质条带(图 4 中 ** 处), 2 组细胞的细胞裂解液经抗 c-Myc 单抗免疫沉淀后, 用抗 SUMO-1 单抗免疫印迹同样检测到

了一条大小约 77 ku 的蛋白质带(图 4 中 ** 处). 空质粒组和单转 SUMO-1 组两对照组的细胞裂解液用抗 SUMO-1 单抗免疫沉淀后, 再用 c-Myc 单抗免疫印迹未检测到特异的蛋白质条带(图 3), 而反过来用 c-Myc 单抗免疫沉淀后再用抗 SUMO-1 单抗免疫印迹同样未检测到特异的蛋白质条带(图 4), 说明实验组 Co-IP 的阳性结果不是由抗 SUMO-1 单抗或抗 c-Myc 单抗在 IP 过程中的非特异性反应所致; pCDNA3.1/Hygro (-)-SUMO-1 和 pCDNA3.1-

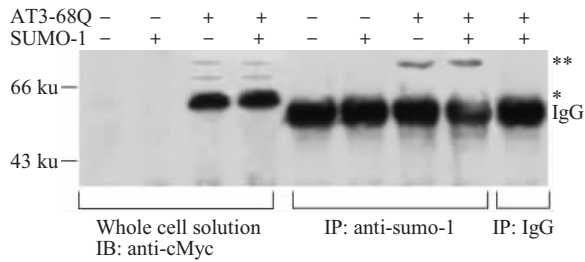


Fig. 3 Covalent modification of ataxin-3-68Q by SUMO-1

SH-SY5Y cells were transfected with c-Myc-tagged full-length ataxin-3-68Q in the presence or absence of exogenous SUMO-1, cells with SUMO-1(exogenous or endogenous) alone were used as control. Five percent of the cell extracts were immunoblotted with monoclonal c-Myc antibody and the rest were subjected to immunoprecipitation with monoclonal SUMO-1 antibody, the normal mouse IgG was used as the control antibody. The immunoprecipitates were immunoblotted with monoclonal c-Myc antibody. Immunoblotting with c-Myc antibody detected the high molecular sumoylated ataxin-3-68Q (double asterisk) in the cell extracts of ataxin-3-68Q-expressing cells and in the corresponding immunoprecipitates but not in the control groups.

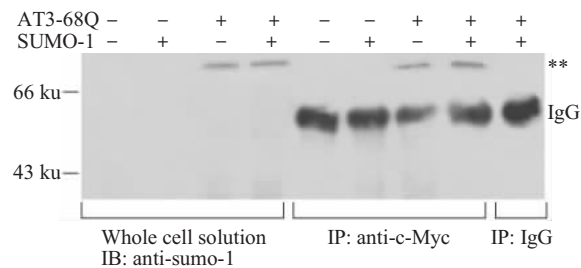


Fig. 4 Covalent modification of ataxin-3-68Q by SUMO-1

SH-SY5Y cells were transfected with c-Myc-tagged full-length ataxin-3-68Q in the presence or absence of exogenous SUMO-1, cells with SUMO-1(exogenous or endogenous) alone were used as control. Five percent of the cell extracts were immunoblotted with monoclonal SUMO-1 antibody and the rest were subjected to immunoprecipitation with monoclonal c-Myc antibody, the normal mouse IgG was used as the control antibody. The immunoprecipitates were immunoblotted with monoclonal SUMO-1 antibody. Immunoblotting with c-Myc antibody detected the high molecular sumoylated ataxin-3-68Q (double asterisk) in the cell extracts of ataxin-3-68Q-expressing cells and in the corresponding immunoprecipitates but not in the control groups.

Myc-His(-)B -MJD68Q 共转组细胞裂解液, 用正常小鼠 IgG 免疫沉淀后用 c-Myc 单抗(图 3)或 SUMO-1 单抗(图 4)免疫印迹均未检测到任何特异的蛋白质带, 说明实验组 Co-IP 的阳性结果不是由小鼠 IgG 的非特异性反应所致. 上述结果说明, SUMO-1 修饰 polyQ 扩展突变型 ataxin-3, 这种修饰作用使 polyQ 扩展突变型 ataxin-3 的表观分子量增加了 17 ku.

2.3 免疫荧光共定位

图 5a 中的细胞单转了 pCDNA3.1-Myc-his(-)B-MJD, 而 SUMO-1 为内源性表达, 图 5b 中的细胞共转了 pCDNA3.1-Myc-his (-)B-MJD 和 pCDNA3.1/Hygro(-)- SUMO-1, 故 SUMO-1 为过表达. 可见: 野生型(20Q)ataxin-3 均匀分布于胞浆和胞核(图 5B, 5J), 而 polyQ 扩展突变型(68Q) ataxin-3 可在胞核内形成蛋白聚合体(图 5F, 5N); 内源性和过表达的 SUMO-1 均主要呈点状分布于细胞核内(图 5C, 5G, 5K, 5O); 内源性 SUMO-1 与突变 ataxin-3 形成的核内蛋白聚合体以及野生型 ataxin-3 均明显重叠(黄色信号, 图 5D, 5H); 过表达的 SUMO-1 也与突变 ataxin-3 形成的核内蛋白聚合体以及野生型 ataxin-3 明显重叠(黄色信号, 图 5L, 5P).

3 讨 论

截至目前, 已发现的由致病基因编码区 CAG 三核苷酸重复扩展突变所致的疾病至少已有 9 种, 它们分别是 SCA1、2、3、6、7、17 型、亨廷顿舞蹈病、齿状核红核苍白球路易氏体萎缩症、延脊肌萎缩症^[4]. 由于 CAG 三核苷酸重复序列编码多聚谷氨酰胺(polyglutamine, polyQ)肽链, 所以这类疾病统称 polyQ 疾病, 由相应的致病基因所编码的蛋白质则统称 polyQ 蛋白. 虽然目前的研究已经肯定 polyQ 扩展突变导致 polyQ 蛋白获得细胞毒性是 polyQ 疾病发生的始动因素^[4,5], 但扩展突变型 polyQ 蛋白产生细胞毒性的具体机制目前并未完全阐明.

SCA3/MJD 在全球, 特别是在亚洲地区是 polyQ 疾病中的常见类型^[6,7]. 为深入阐明 ataxin-3 正常生理功能以及 SCA3/MJD 的发病机制, 我们在本研究中采用酵母双杂交技术, 以 polyQ 扩展突变型 ataxin-3 全长作为诱饵蛋白, 筛选成人脑 cDNA 文库, 筛到互作蛋白苏素 -1(SUMO-1). 我们进一步运用免疫共沉淀技术证实, SUMO-1 在哺乳动物细

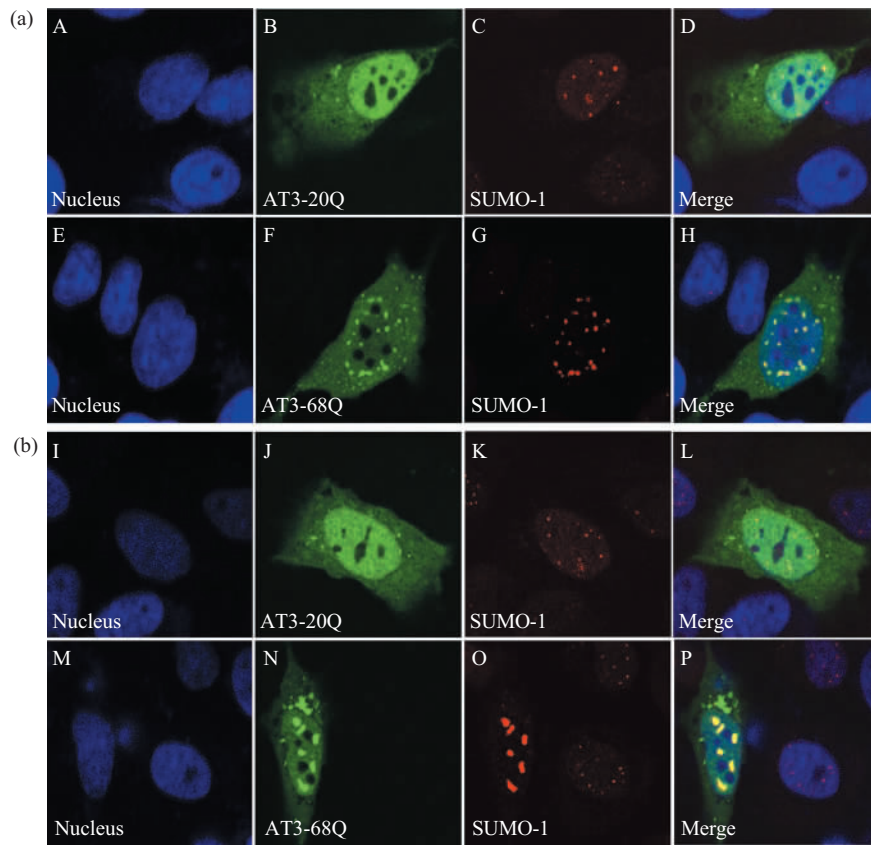


Fig. 5 Co-localization of SUMO-1 and ataxin-3

SH-SY5Y cells were transfected with c-Myc-tagged full-length ataxin-3 in the presence of exogenous SUMO-1 (b) or absence of exogenous SUMO-1 (a). Cells were incubated with monoclonal anti-c-Myc antibody and rabbit anti-SUMO-1 polyclonal antibody, and then were incubated with cy2-labeled anti-mouse IgG (green) and cy3-labeled anti-rabbit IgG (red). The blue fluorescence was the nuclear DNA staining by Hoechst 33258. ataxin-3-20Q showed diffuse cytoplasmic and nuclear distribution (B, J), while ataxin-3-68Q showed the formation of intranuclear aggregates (F, N); SUMO-1 showed punctated nuclear staining patterns (C, G, K, O); The merge picture showed co-localization of SUMO-1 and ataxin-3 in the nucleus of transfected cells (D, H, L and P, yellow fluorescence).

胞中共价修饰野生型和 polyQ 扩展突变型 ataxin-3. 免疫荧光发现, polyQ 扩展突变型 ataxin-3 形成的核内蛋白聚合体与 SUMO-1 共定位. SUMO-1 是一种与泛素同源的小分子修饰蛋白, 苏素化修饰主要参与调节底物蛋白质的亚细胞定位、蛋白质代谢、蛋白质-蛋白质相互作用、蛋白质生物功能活性等的调节^[8]. SUMO-1 对 ataxin-3 的共价修饰作用有可能通过以下几种途径参与 SCA3/MJD 的发病过程.

polyQ 蛋白的核浆转运过程参与了多种 polyQ 疾病的发病机制, 如扩展突变型 ataxin-1^[9], atrophin-1^[10] 的进核转运与它们的细胞毒性密切相关, polyQ 扩展突变可抑制 huntingtin 的出核转运^[11], 可见细胞核是许多 polyQ 蛋白行使其细胞毒性的主要场所, polyQ 蛋白的核浆转运对其细胞毒性可起到重要的调节作用. 苏素化恰好可调节底物

蛋白的核浆转运, 如苏素化可使腺病毒蛋白 E1B 的核转运增加, 而 E1B 的苏素化缺失突变体却滞留在胞浆^[8], 与其他多种 polyQ 蛋白一样, ataxin-3 有可能通过其进核转运在细胞核内发挥细胞毒性作用^[12]. SUMO-1 对 ataxin-3 的共价修饰作用有可能通过调节 ataxin-3 的进核转运过程而参与调节其细胞毒性.

在 polyQ 疾病中存在多种重要转录因子的转录活性下调, 而有些转录因子对于维持神经系统正常功能起了至关重要的作用, 这其中 CBP 是一个典型. CBP 基因敲除动物模型出现明显的神经变性, 充分展示了 CBP 对神经系统的重要性^[13], 突变型 huntingtin 和 atrophin-1 均可与 CBP 相互作用并下调其转录活性并进而产生细胞毒性^[14]. 有研究表明, ataxin-3 是一种组蛋白结合蛋白并具有协同转录抑

制作用, 而 polyQ 扩展突变可加重 ataxin-3 的转录抑制作用, 另外, ataxin-3 还可与 CBP 相互作用并下调 CBP 的转录活性^[15]. 可见, 由 polyQ 扩展突变型 ataxin-3 介导的 CBP 等转录因子的转录活性下调, 可能参与了 SCA3/MJD 的发病过程. SUMO-1 可直接调节多种转录因子的转录活性^[8], 也可通过调节转录因子与 DNA 的相互作用^[8]或转录因子的代谢间接调节其转录活性^[16]. 作为 SUMO-1 的底物蛋白, ataxin-3 所介导的转录活性完全有可能受 SUMO-1 的调节, 所以, SUMO-1 可能通过干预 ataxin-3 所介导的转录活性来参与 SCA3/MJD 的发病过程.

多数 polyQ 疾病患者病变受累神经元形成核内泛素阳性包涵体, 而相应的疾病细胞模型则形成核内蛋白聚集体^[5], 含 polyQ 扩展突变的 polyQ 蛋白难以被泛素蛋白酶体通路(UPP)降解^[17], 是导致蛋白质聚合体形成的始动因素. polyQ 扩展突变导致 polyQ 蛋白的降解代谢出现障碍是 polyQ 疾病的又一主要因素. 有研究表明, 过表达 UPP 的某些成员蛋白促进扩展突变型 polyQ 蛋白的降解可明显缓解其细胞毒性^[18]. 在蛋白质代谢方面, 苏素化也起了重要作用, 如 PCNA^[8]、IkB α ^[8]以及 Smad4^[19]等蛋白质的苏素化可抑制它们被 UPP 降解. 在 polyQ 蛋白中, huntingtin 已被证明是 SUMO-1 的底物蛋白^[20], 而且 SUMO-1 和泛素修饰 huntingtin 上的同一赖氨酸残基, 苏素化可增加 huntingtin 的蛋白质稳定性、增加其对转录的抑制作用、加剧亨廷顿舞蹈病果蝇模型的神经病理表现, 而 huntingtin 的泛素化可明显减轻果蝇模型的神经病理表现. SUMO-1 对 ataxin-3 的修饰作用可调节其代谢过程并由此而影响其形成蛋白质聚合体的趋势, 从而参与 SCA3/MJD 的发病过程.

总之, 我们已经明确 ataxin-3 是 SUMO-1 的底物蛋白, 进一步研究 ataxin-3、尤其是 polyQ 扩展突变 ataxin-3 苏素化的生物学意义, 对于阐明 ataxin-3 的正常生物学功能以及 SCA3/MJD 和其他 polyQ 疾病的发病机制都将起到重要作用.

参 考 文 献

- 1 Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, *et al.* CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet*, 1994, **8** (3): 221~228
- 2 Evert B O, Wullner U, Schulz J B, *et al.* High level expression of expanded full-length ataxin-3 *in vitro* causes cell death and formation of intranuclear inclusions in neuronal cells. *Hum Mol Genet*, 1999, **8** (7): 1169~1176
- 3 Warrick J M, Paulson H L, Gray-Board G L, *et al.* Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*. *Cell*, 1998, **93** (6): 939~949
- 4 Gatchel J R, Zoghbi H Y. Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet*, 2005, **6** (10): 743~755
- 5 Michalik A, Van Broeckhoven C. Pathogenesis of polyglutamine disorders: aggregation revisited. *Hum Mol Genet*, 2003, **12** (2): R173~186
- 6 Schols L, Amoiridis G, Buttner T, *et al.* Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes?. *Ann Neurol*, 1997, **42** (6): 924~932
- 7 Tang B, Liu C, Shen L, *et al.* Frequency of SCA1, SCA2, SCA3/MJD, SCA6, SCA7, and DRPLA CAG trinucleotide repeat expansion in patients with hereditary spinocerebellar ataxia from Chinese kindreds. *Arch Neurol*, 2000, **57** (4): 540~544
- 8 Johnson E S. Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem*, 2004, **73**: 355~382
- 9 Klement I A, Skinner P J, Kaytor M D, *et al.* Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell*, 1998, **95** (1): 41~53
- 10 Nucifora F C Jr, Ellerby L M, Wellington C L, *et al.* Nuclear localization of a non-caspase truncation product of atrophin-1, with an expanded polyglutamine repeat, increases cellular toxicity. *J Biol Chem*, 2003, **278** (15): 13047~13055
- 11 Cornett J, Cao F, Wang C E, *et al.* Polyglutamine expansion of huntingtin impairs its nuclear export. *Nat Genet*, 2005, **37** (2): 198~204
- 12 Tait D, Riccio M, Sittler A, *et al.* Ataxin-3 is transported into the nucleus and associates with the nuclear matrix. *Hum Mol Genet*, 1998, **7** (6): 991~997
- 13 Mantamadiotis T, Lemberger T, Bleckmann S C, *et al.* Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nat Genet*, 2002, **31** (1): 47~54
- 14 Nucifora F C Jr, Sasaki M, Peters M F, *et al.* Interference by huntingtin and atrophin-1 with CBP-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science*, 2001, **291** (5512): 2423~2428
- 15 Li F, Macfarlan T, Pittman R N, *et al.* Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *J Biol Chem*, 2002, **277** (47): 45004~45012
- 16 Pascual G, Fong A L, Ogawa S, *et al.* A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature*, 2005, **437** (7059): 759~763
- 17 Jana N R, Nukina N. Recent advances in understanding the pathogenesis of polyglutamine diseases: involvement of molecular chaperones and ubiquitin-proteasome pathway. *J Chem Neuroanat*, 2003, **26** (2): 95~101
- 18 Tsai Y C, Fishman P S, Thakor N V, *et al.* Parkin facilitates the elimination of expanded polyglutamine proteins and leads to preservation of proteasome function. *J Biol Chem*, 2003, **278** (24): 22044~22055.
- 19 Chang C C, Lin D Y, Fang H I, *et al.* Daxx mediates the SUMO-dependent transcriptional repression of Smad4. *J Biol Chem*, 2005, **280** (11): 10164~10173
- 20 Steffan J S, Agrawal N, Pallos J, *et al.* SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science*, 2004, **304** (5667): 100~104

Covalent Modification of Ataxin-3 by SUMO-1*

TANG Jian-Guang^{1,2)**}, SHEN Lu^{1)**}, TANG Bei-Sha^{1)***}, ZHANG Yu-Hu¹⁾, JIANG Hong¹⁾,
LIAO Shu-Sheng¹⁾, ZHANG Hai-Nan²⁾, WANG Chun-Yu²⁾, XIA Kun³⁾, PAN Qian³⁾

¹⁾Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

²⁾Department of Neurology, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China;

³⁾National Key Laboratory of Medical Genetics, Changsha 410078, China)

Abstract In order to get insight into the biological function of ataxin-3 and the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 and Machado-Joseph disease (SCA3/MJD), a yeast two-hybrid technology was carried out to screen the adult brain cDNA library using the full-length polyglutamine-expanded ataxin-3 as bait. Small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1) was identified as a novel ataxin-3-interacting protein. Subsequently, co-immunoprecipitation showed that both the wild-type ataxin-3 and the polyglutamine-expanded ataxin-3 were covalently modified by SUMO-1 in SH-SY5Y cell, immunofluorescence showed that the intranuclear aggregates formatted by the polyglutamine-expanded ataxin-3 co-localized with SUMO-1. Taken together, the data suggest that the biological function of ataxin-3 may be regulated by SUMO-1, and that SUMO-1 may participate in the pathogenesis of SCA3/MJD.

Key words spinocerebellar ataxia type 3 and Machado-Joseph disease (SCA3/MJD), ataxin-3, SUMO-1, yeast two-hybrid, co-immunoprecipitation, immunofluorescence

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30070273, 30470619), Hi-Tech Research Development Program of China (2001AA227011, 2004AA227040), and The Special Funds of Major State Basic Research of China (2004BA720A03).

**The first two authors contribute equally to this work.

***Corresponding author. Tel: 86-731-4327398, Fax: 86-731-4327332, E-mail: bstang7398@yahoo.com.cn

Received: May 22, 2006 Accepted: July 4, 2006