

PITX2 R62H 突变导致 角膜环状皮样瘤的分子基础*

刘小平^{1)**} 朱飞舟^{1,2)**} 王 果¹⁾ 邓启盼¹⁾ 张 静¹⁾ 李 琼¹⁾ 凌 捷¹⁾ 郭玲仟¹⁾
梁德生¹⁾ 潘 乾¹⁾ 龙志高¹⁾ 龚惠勇¹⁾ 夏家辉¹⁾ 张灼华¹⁾ 夏 昆^{1,2)***}

(¹⁾中南大学医学遗传学国家重点实验室, 长沙 410078; (²⁾中南大学生物科学与技术学院, 长沙 410013)

摘要 角膜环状皮样瘤(RDC)是一种呈常染色体显性遗传的角膜良性肿瘤, 前期研究证明, PITX2 基因的 G185A 突变(R62H)是导致 RDC 发生的原因. 为了进一步探讨 R62H 导致 RDC 的分子基础, 将 PITX2 构建至原核表达载体, 诱导表达后纯化融合蛋白进行 EMSA 实验, 显示 R62H 与 DNA 的结合能力并未明显下降. 筛选稳定表达 PITX2 WT 和 R62H 的 HeLa 细胞克隆, 用流式细胞仪分析细胞周期, 并用 Quantitative Real-time PCR 来检测细胞克隆的 β -catenin 和 Cyclin D1 的表达水平, 结果发现稳定表达 PITX2 R62H 的 HeLa 细胞的增殖活性低于 PITX2 WT, 且 β -catenin 和 Cyclin D1 的 mRNA 水平均比 PITX2 WT 明显下降. 由此推测, R62H 突变使 Wnt/ β -catenin→PITX2 信号途径发生改变, 促使基因表达异常, 导致细胞异常增生和角膜环状皮样瘤的形成.

关键词 角膜环状皮样瘤(RDC), PITX2, 转录因子, β -catenin, Cyclin D1

学科分类号 Q189

角膜环状皮样瘤(ring dermoid of cornea, RDC, OMIM180550)是一种非常特殊的角膜良性肿瘤, 呈常染色体显性遗传. 出生时即可见双眼角膜缘处环形淡黄色或灰白色实性肿物, 一般侵及角膜实质浅层, 随着年龄的增长肿块也会增大, 但很少恶变. 该病不仅影响美观, 而且影响患者视力, 可出现散光、斜视和弱视, 甚至失明, 严重妨碍患者的学习和生活, 给患者和家庭带来了很大的痛苦. 肿瘤由不同比例的外胚层组织, 如角化上皮、毛发、皮脂腺, 和中胚层组织, 如纤维组织、脂肪和血管组成^[1]. 我们前期研究定位并克隆了 RDC 家系的疾病基因 PITX2, 发现该家系的 PITX2 基因发生了 R62H(精氨酸→组氨酸)的改变^[2].

PITX2 的全称为 paired-like homeodomain transcription factor 2, 最先在 Axenfeld-Rieger 综合征家系中通过定位克隆策略鉴定得到^[3], 其编码蛋白是 Bicoid 同源盒基因家族成员. 同源盒基因家族成员在个体发育过程中发挥诸如决定细胞分化方向等遗传调控作用^[4~6], 其结构中都含有能够识别特异 DNA 序列的 homeodomain 结构域. PITX2 蛋白的 homeodomain 结构域的第 50 位氨基酸残基为

赖氨酸, 这是 Bicoid 家族转录因子的特征^[7]. 人 PITX2 蛋白有 3 种剪切型(a, b 和 c 型). 氨基酸序列比较表明, 3 种剪切型含有序列完全相同的同源异型结构域和 C 端, 差别集中在蛋白质的 N 端^[8].

PITX2 蛋白在小鼠的多种组织有表达^[9,10]. 它影响肌肉、眼、心、垂体等多器官的正常发育, 是心、肺等器官左右不对称发育的信号分子^[11~13]. 还有研究表明, PITX2 对下丘脑核和中脑的正常发育是必需的^[14]. PITX2 敲除小鼠不能形成正常的胚胎, 并在胚胎期死亡^[12]. 信号传导途径方面的研究表明, Wnt/ β -catenin 信号途径可快速诱导 PITX2 mRNA 的转录, 也可稳定 PITX2 mRNA 的水平, Cyclin D1、Cyclin D2、c-myc 等细胞周期调控基因是 PITX2 的靶基因^[15~17].

PITX2 基因发生突变可导致多种遗传性疾病,

* 国家自然科学基金资助项目(305002601)和国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2004CB518800).

** 并列第一作者.

*** 通讯联系人. Tel: 0731-4805357, E-mail: nlmglcy@xysm.net

收稿日期: 2007-06-26, 接受日期: 2007-07-22

如 Rieger 综合征(RIEG)^[3]、iridogoniodysgenesis 综合征(IGDS)^[18]、Peters 异常^[19], RDC 等. 我们对导致 RDC 的 R62H 突变体的前期研究表明, R62H 突变体定位未改变, 仍位于细胞核, 与 PITX2 野生型相比, 真核表达的 PITX2 R62H 突变体与 DNA 的结合能力改变不大, 但转录激活的能力略为降低^[20]. 由于真核表达的 PITX2 蛋白未进行纯化, 为了进一步验证其 DNA 结合能力, 我们构建了原核表达载体, 并取纯化得到的 WT、R62H、T68P(导致 RIEG) GST-PITX2 融合蛋白进行 EMSA 反应, 检测 DNA 结合能力. 另外, 从 Wnt/ β -catenin $\rightarrow$ PITX2 信号传导途径出发, 我们获得了稳定表达外源 PITX2 WT 和 R62H 的 HeLa 细胞系, 用流式细胞仪来分析细胞周期的改变, 并利用 Real-time PCR 技术检测 β -catenin、Cyclin D1 的转录水平, 探讨 PITX2 R62H 对 Wnt/ β -catenin $\rightarrow$ PITX2 信号传导途径的影响.

1 材料与方法

1.1 载体构建

分别以 pcDNA3.1-PITX2 WT、pcDNA3.1-PITX2 R62H 和 pcDNA3.1-PITX2 T68P^[20]为模板, PCR 扩增 PITX2 CDS 序列, 扩增引物参见表 1. 为了表达检测的方便, 我们在 c-myc 表位的下游设计反向引物, 故扩增片段为 PITX2 CDS 和 c-myc 表位的重组产物. PCR 扩增条件为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 30 个循环; 72℃延伸 10 min, 4℃贮存. 扩增产物首先连入 pGEM-T 载体(Promega 公司), 再进行 *Sal* I /*Not* I (Takara 公司)双酶切、低熔点琼脂糖凝胶电泳回收, 随后将目的片段与同样用 *Sal* I /*Not* I 双酶切消化的 pGEX-6p-2 载体(Amersham 公司)进行连接. 将重组质粒分别命名为 G6p-WT、G6p-R62H 和 G6p-T68P, 经 *Sal* I /*Not* I 双酶切鉴定和测序验证.

Table 1 The primers for cloning

Primer name	Sequence(5'~3')	Note
GEX-F	tagtgcactatggagaccaactgccgc	underlined section is the site of <i>Sal</i> I
GEX-myc-R	aggcgccgctcaattcagatcctctctgagat	underlined section is the site of <i>Not</i> I
IAF	ctttccagaggaaccgctacccggacatg	for sequencing PITX2 cds
IAR	catgtccgggtagcggttcctctggaag	for sequencing PITX2 cds
S	tgaacaacctgagtagcc	for sequencing PITX2 cds

1.2 GST-PITX2 融合蛋白的表达、纯化和鉴定

将重组质粒 G6p-WT、G6p-R62H 和 G6p-T68P 和空载体 pGEX-6p-2 分别转化 BL21. 各挑取单克隆, 接种至 2~3 ml Amp⁺ LB(氨苄青霉素的浓度为 100 mg/L, 下同)液体培养基中, 37℃, 280 r/min, 振荡过夜. 次日, 吸取含有重组质粒的 BL21 初级菌液, 1:50~1:100 接种至 Amp⁺ LB 液体培养基中, 37℃、280 r/min, 振荡扩繁. 当细菌生长至对数生长期($A_{600}=0.6\sim1.0$)时, 加 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 28℃、280 r/min, 继续振荡 3 h. 诱导完后, 离心沉淀细菌, 加 1×PBS 重悬细菌. 冰上超声裂解细菌, 每次 15 s, 间隔 45 s, 直至菌液呈半透明. 随后, 往细菌裂解液中加 Triton X-100 至终浓度为 1%, β -巯基乙醇至终浓度为 0.1%, 并加入 Protease Inhibitor Cocktail(Sigma 公司). 冰上, 100 r/min, 轻混 10 min. 离心, 转上清, 往上清液中加入适量的 50% Glutathione Sepharose 4B (Amersham 公司), 冰上, 100 r/min, 结合 30~60 min. 离心, 用 0.1% Triton X-100/1×PBS 洗涤

Beads. 最后, 用 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽(华美公司)、50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)洗脱 GST 和 GST 融合蛋白. 取纯化的蛋白质样品, 10%SDS-PAGE 凝胶电泳进行检测.

取变性后的蛋白质样品, 10%SDS-PAGE 凝胶电泳, 然后转移至 PVDF 膜(Amersham 公司). 用 anti-myc 小鼠单克隆抗体 (Invitrogen 公司) 或 anti-GST 兔多克隆抗体(本室自制)作为一抗(1:5 000)分别进行检测, 二抗(1:10 000)为 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 多克隆抗体或 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体(KPL 公司). 最后用 ECL 试剂盒(Amersham 公司)进行荧光反应.

1.3 EMSA 检测 PITX2 的 DNA 结合能力

参照文献报道合成了正反 2 条 CE-3 寡核苷酸单链, 正向链为 5' gatctaccaggatgctaagcctctgtca 3', 反向链为 5' gatctgacagaggcttagcatcctggta 3', 序列中包含 PITX1 的识别和结合位点(上述序列中的黑体部分)^[21], 该位点也被文献报道可以被 PITX2 识别并结合^[22]. 将 CE-3 正向链和反向链退火形成互

补双链后,在末端标记上 ^{32}P . 用 DC protein assay 试剂盒(Bio-Rad 公司)测定纯化的 PITX2 野生型和突变体蛋白质浓度. 利用 Gel Shift Assay 试剂盒(Promega)、 ^{32}P 标记的 CE-3 寡核苷酸双链探针和等量的 PITX2 野生型或突变体蛋白进行体外结合反应. 竞争分析时,在加入标记探针前往结合体系中加入未标记的 CE-3 寡核苷酸双链作为特异性竞争探针,或者加入未标记的 AP2 寡核苷酸双链作为非特异性竞争探针. 蛋白质-DNA 结合体系上样到 4%聚丙烯酰胺凝胶,在 $1\times\text{TBE}$ 和 200 V 电压条件下电泳 20 min. 下胶,压 X 光片, -70°C 放射自显影 12~24 h. EMSA 试验用 2 个不同批次制备的原核表达和纯化的蛋白质样品重复检测 2 次.

1.4 筛选和鉴定稳定表达 PITX2 WT 和 R62H 的细胞克隆

HeLa 细胞采用含 10%胎牛血清的 DMEM (Sigma 公司)培养液,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养. 将 PITX2 WT 和 R62H 分别构建至 pcDNA3.1/myc-his(-)B 载体后,转染 HeLa 细胞,质粒转染的具体操作按 lipofectamine2000(Invitrogen 公司)说明书进行,并用 600 mg/L G418 进行筛选. 扩大培养阳性单克隆细胞后,抽提 gDNA 进行 PCR 鉴定和测序,抽提蛋白质进行 Western blot 检测,并抽提 RNA 进行 RT-PCR 检测.

RT-PCR 的步骤如下:参照 Trizol 试剂盒 (Amresco 公司)说明书制备总 RNA. 以提取的总 RNA 为模板,按照逆转录试剂盒(Promega)说明书进行逆转录反应. 随后以制备的 cDNA 为模板进行 PCR 反应,扩增 PITX2 引物为:正向引物, 5' gtgtcggcgtgtgtgcaattagagaaag 3'; 反向引物, 5' ggctcacacgggcccgtccactgc 3'. 反应程序: 95°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 72°C 延伸 20 min, 4°C 贮存.

1.5 流式细胞术分析细胞周期

各转染组 HeLa 细胞用无血清 DMEM 培养基培养 24 h,使细胞周期同步化. 然后,换成含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,继续培养 24 h. 细胞按照常规方法消化、离心,重悬于 $20\ \mu\text{l}$ PBS 中,加入 $200\ \mu\text{l}$ 冰预冷的 70%乙醇,放置 4°C , 30 min. 4°C 、300 g 离心 5~10 min,沉淀细胞. 用预冷 PBS 洗涤细胞 2 次,最后用 $400\ \mu\text{l}$ PBS 重悬细胞沉淀. 加 $50\ \mu\text{l}$ 100mg/L 的 RNase I 于 37°C 孵育 30 min,将 RNA 消化掉,最后加 $50\ \mu\text{l}$ 500 mg/L 的 PI 于 4°C 避光孵育 30min. 打开流式细胞仪(BD

FACSVantageSE),按照说明上样检测. 将荧光信号转换为数字信号后,经过 CellQuest 软件进行处理,使用 ModFit 软件分析结果,设定参数后由软件自动分析各个时期细胞所占百分比例.

1.6 定时定量 PCR 检测 β -Catenin 和 Cyclin D1 的 mRNA 表达水平

在 NCBI 数据库中查询 β -actin、 β -Catenin 和 CyclinD1 的 cDNA 序列,序列编号分别为: NM_001101、NM_001904、NM_053056,应用 Perkin-Elmer Applied Biosystems 提供的 Primer Express software 设计引物与探针(表 2). 以制备的细胞克隆的 cDNA 为模板,利用表 2 的引物和探针,分别扩增 β -actin、 β -Catenin 和 CyclinD1. 反应条件: 50°C 2 min, 95°C 2 min, 95°C 15 s 和 60°C 45 s,循环 45 次. 配好反应体系后,将各个样品逐一加入 96 孔板中,每个样品设置 3 个复孔. Real-time PCR 反应在 AB 公司的实时定量 PCR 系统上进行. 重复 3 次.

采用 AB 公司推荐的方法进行相对定量,数据分析的具体方法参见 AB 公司的说明书. 取 3 次 Real-time PCR 结果的平均值,Excel 绘制出转录水平的直方图,Photoshop 编辑图片.

Table 2 Primer or probe sequence for Real-time PCR

Name of primer or probe	Sequence(5'~3')
HACTIN-F	5' ggtcatcaccattggcaatg 3'
HACTIN-R	5' cgtacaggtctttgcggatgt 3'
HACTIN-PROBE	TET-5' cggctccgctgccctgagge 3'-TAMRA
HCYCLIND1-F	5' cgcggagagaagctgtgcat 3'
HCYCLIND1-R	5' ctccagttgcgatcatcga 3'
HCYCLIND1-PROBE	FAM-5' tacaccgacaactccatcaagcctcagg 3'-TAMRA
HCATENIN-F	5' tgctgatcttggaacttgatattgg 3'
HCATENIN-R	5' cctggccatattccaccagagt 3'
HCATENIN-PROBE	FAM-5' cccaggagagaaccccttgatcatcg 3'-TAMRA

2 结 果

2.1 GST-PITX2 融合蛋白的纯化与鉴定

以 pcDNA3.1-PITX2 WT、pcDNA3.1-PITX2 R62H 和 pcDNA3.1-PITX2 T68P 为模板, GEX-F 和 GEX-myc-R 为引物,进行 PCR 反应,扩增得到 PITX2-myc、PITX2-myc R62H、PITX2-myc T68P 的 CDS 目的片段. 随后,将目的片段导入 pGEX-6p-2,得到重组质粒 G6p-WT、G6p-R62H 和 G6p-T68P(图 1c). 重组质粒经 *Sal* I /*Not* I 双酶切后,可以见到 5 kb 的载体片段和 876 bp 的目的片段(图 1b). 测序结果证实导入重组质粒的 PITX2-myc、PITX2 R62H-myc、PITX2 T68P-myc 的 CDS

序列正确, 且与 GST 基因阅读框架一致(图 1a). 将重组质粒导入大肠杆菌 BL21, 然后用 IPTG 进行诱导, 结果表明, G6p-WT/BL21、G6p-R62H/BL21、G6p-T68P/BL21 诱导后的样品有 GST-PITX2 融合蛋白表达, 但诱导前样品没有(图 2a). 诱导样品经 Glutathione Sepharose 4B 纯化后, 得到纯化的 GST-PITX2 融合蛋白, 但同时也产生了较多 GST-PITX2 融合蛋白的 C 端截短蛋白(图 2c). 以上结果分别由 anti-myc 抗体或 anti-GST 抗体进行 Western blot 予以证实(图 2b, d).

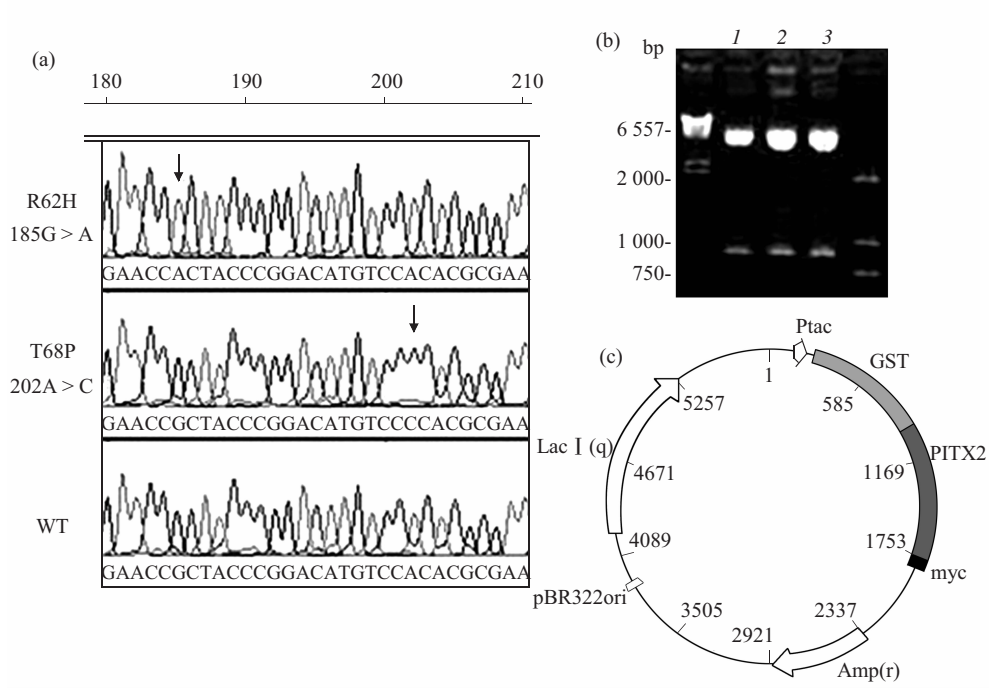


Fig. 1 Construction of the PITX2 prokaryotic expression vectors
(a) The partial sequencing results of the recombinant plasmids. The arrow indicated the mutation site. (b) Identifying the recombinant plasmids by *Not* I + *Sal* I . Cut by *Not* I / *Sal* I , the recombinant plasmid was divided into two fragments, pGEX-6p-2 (≈ 5 kb) and PITX2 (≈ 870 bp). 1: WT; 2: R62H; 3: T68P. (c) The map of the recombinant plasmid. The recombinant plasmid was made up of GST, PITX2 and c-myc epitope.

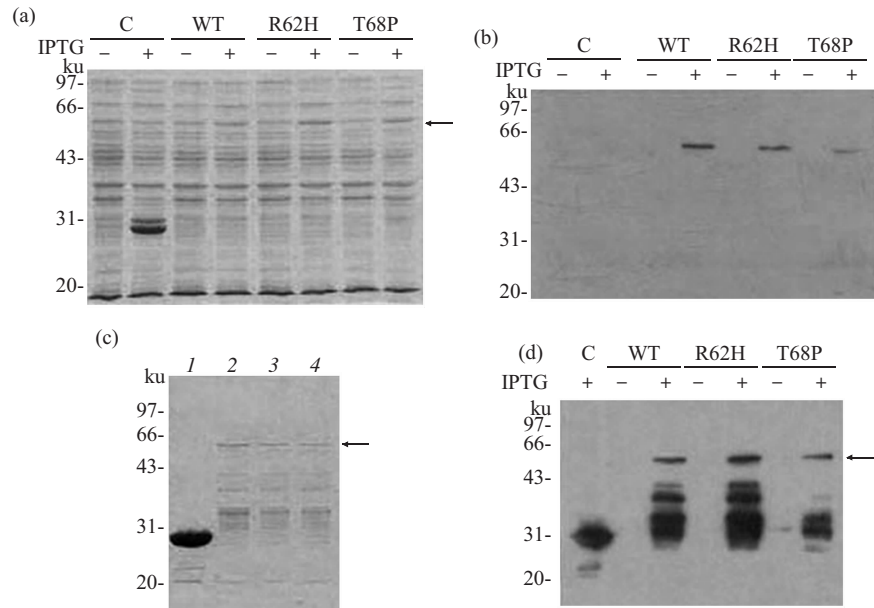


Fig. 2 The expression, purification and identification of the GST-PITX2 fusion protein
Induced by IPTG, the BL21 bacteria transformed by the PITX2 prokaryotic expression vectors can express GST-PITX2 fusion protein (a), and this result was confirmed by Western blotting with anti-myc antibody (b). The PITX2 fusion protein can be purified from the BL21 bacteria expressing PITX2(c), and this result was confirmed by Western blotting with anti-GST antibody (d). C (Control) was the BL21 bacteria with pGEX-6p-2 empty vector. The band pointed by arrowhead was the GST-PITX2 fusion protein. 1: C; 2: WT; 3: R62H; 4: T68P.

2.2 PITX2 R62H 与 DNA 的结合能力与 WT 相近

取人工合成的 CE-3 寡核苷酸单链正向链和反向链, 退火形成互补的 CE-3 寡核苷酸双链(图 3a). 将 CE-3 寡核苷酸双链的末端标记上 ^{32}P 后, 与纯化的 PITX2 WT、PITX2 R62H、PITX2 T68P 进行体外结合和 EMSA 实验. 为证实 PITX2 与 CE-3 结合的特异性, 在结合反应中还设置了非标记 CE3 探针和非竞争性 AP2 探针作为对照, 而且非标记 CE3 探针和 AP2 探针与标记 CE3 探针的摩尔比为

50 : 1. EMSA 的结果表明(图 3b), PITX2 R62H 和 T68P 与 CE3 仍然具有一定的结合能力, 且与 WT 相比差别不明显. 在 CE3 的结合体系中加入非标记 CE3 探针后, 结合条带消失. 但是, 往 PITX2 WT 与 CE3 的结合体系中加入非标记的 AP2 探针后, 对 PITX2 WT 与 CE3 的结合没有影响. 这说明 PITX2 WT、PITX2 R62H、PITX2 T68P 与 CE3 的结合是特异的. 由此可见, 虽然 PITX2 R62H 导致 RDC, 但是它与 DNA 的结合能力并没有明显下降.

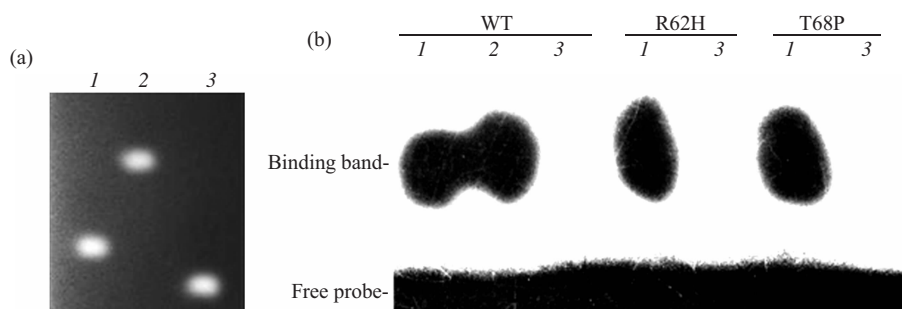


Fig. 3 Results of EMSA

(a) The annealing of CE3 double strand. 1: Forward strand; 2: Annealing strand; 3: Reverse strand. (b) EMSA. After the annealing CE3 double strand was labeled by ^{32}P , the EMSA was carried out with the labeled CE3 double strand and the purified GST-PITX2 fusion protein. 1: Un-competing probe; 2: 50×AP2; 3: 50×CE3. The results showed that compared with that of PITX2 WT, the CE3-binding ability of PITX2 R62H and T68P did not alter obviously. When unlabeled CE3 probe was added into the binding system, the binding band disappeared. However, the WT CE3-binding ability was not affected by AP2, a kind of un-competing probe.

2.3 PITX2 R62H 稳定表达细胞系的细胞周期分析

我们首先构建了稳定表达 PITX2 WT 的 HeLa 细胞系(WT/HeLa)和稳定表达 PITX2 R62H 的 HeLa 细胞系(R62H/HeLa), 并从 DNA、mRNA 和蛋白质水平进行了验证(mRNA 水平的鉴定结果见图 5c, DNA 和蛋白质水平的鉴定结果未显示), 然后用流式细胞仪进行细胞周期的分析. 与未经处理的

HeLa 细胞对照组相比, WT/HeLa 和 R62H/HeLa 的增殖活性都增高, 但整合了 pcDNA3.1/myc-his(-)B 空载体的单克隆 HeLa 细胞(Vector/HeLa)的增殖活性降低, R62H/HeLa 的增殖活性低于 WT/HeLa, R62H 突变延缓了细胞进入 S 期, 但是相对于野生型, 却可以促进细胞从 S 期→G2/M 期的转换(图 4).

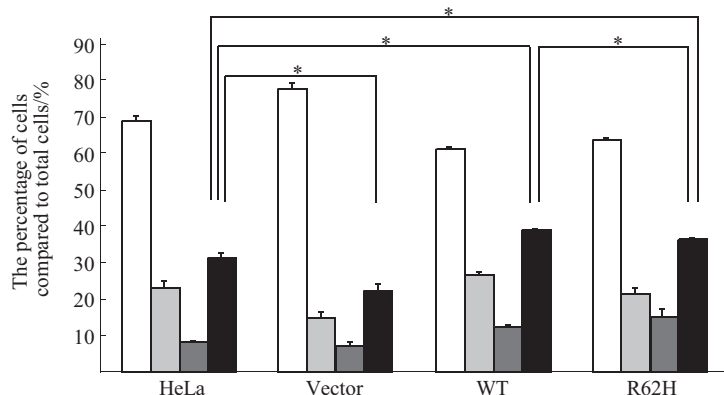


Fig. 4 The analysis of cell cycle

The cell cycle of HeLa, Vector/HeLa, WT/HeLa and R62H/HeLa were analyzed by flow cytometry. Ordinate indicated the percent of cells in a cell cycle stage. The experiment was repeated three times. Multi-comparison was carried out by LSD method of SPSS. “*” Indicated that the difference reached significant level, $P < 0.05$. G0/G1: Cells in G0 and G1 stages; S: Cells in S stage; G2/M: Cells in G2 and M stages; S+G2/M: Cells in S, G2 and M stages. □: G0/G1; ▒: S; ■: G2/M; ■: S+G2/M.

2.4 PITX2 R62H 对 Wnt/ β -catenin $\rightarrow$ PITX2 信号途径的影响

由于 Wnt/ β -catenin 信号途径可调控 PITX2 的表达, 而 PITX2 进一步调控下游基因 Cyclin D1 的表达, 这就形成了参与细胞周期调节的 Wnt/ β -catenin $\rightarrow$ PITX2 信号途径. 我们用 Real-time PCR 检测 WT/HeLa、R62H/HeLa 和未转染质粒的 HeLa 细胞系中 β -actin、 β -Catenin 和 Cyclin D1 的 mRNA 表达水平. 结果发现, 与 HeLa 相比,

WT/HeLa 和 R62H/HeLa 中 β -Catenin 表达水平均有所下降, 分别为 HeLa 的 84% 和 31% (图 5a). 但是, WT/HeLa 和 R62H/HeLa 中 Cyclin D1 的表达水平比 HeLa 均高, 且两者的增幅相差甚远, 分别为 HeLa 的 1355% 和 189% (图 5b). 由此可见, 在 HeLa 中表达 PITX2 WT 和 R62H 可以抑制 β -Catenin 的表达, 但激活 Cyclin D1 的表达, PITX2 R62H 激活 Cyclin D1 的能力远远低于 PITX2 WT.

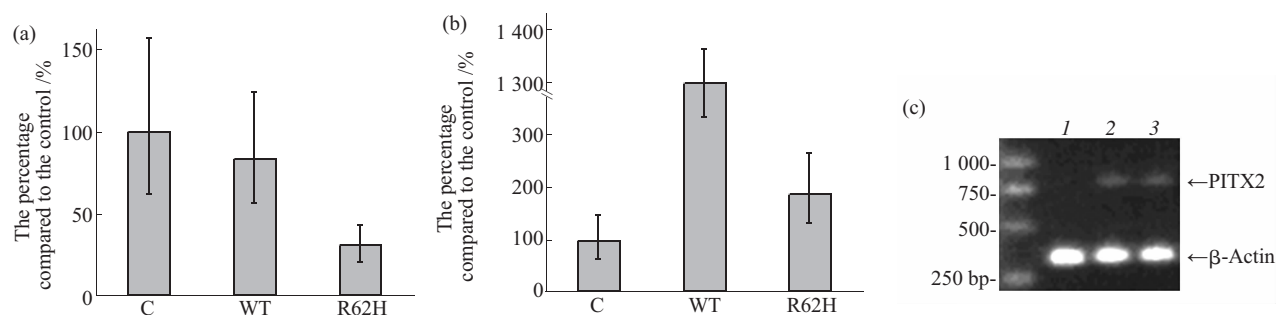


Fig. 5 Real-time PCR displayed that PITX2 can affect the mRNA level of β -Catenin and Cyclin D1 in HeLa cell clone

(a) mRNA level of β -Catenin. (b) mRNA level of Cyclin D1. β -Catenin and Cyclin D1 mRNA levels in HeLa, WT/HeLa and R62H/HeLa were screened by Real-time PCR, and difference existed among the three cell lines. β -Catenin or Cyclin D1 mRNA level in HeLa was supposed as 100%, and β -Catenin or Cyclin D1 mRNA level in other samples were compared with that of HeLa. The experiment was repeated three times. (c) PITX2 expression was detected by RT-PCR. PITX2 was expressed in WT/HeLa and R62H/HeLa, but not in HeLa. 1: HeLa; 2: WT; 3: R62H.

3 讨 论

PITX2 基因突变可导致如 RIEG、IGDS、Peters 异常和 RDC 等多种疾病. RIEG 常伴青年性青光眼, 为常染色体显性遗传, 眼部特征为双眼受累, Schwalbe 线突出和前移(角膜后胚胎环), 裂隙灯下近角膜缘处可见环状白线, 为本病的典型特征, 全身体征可有牙齿、上颌和心血管异常等^[23]. IGDS 属于常染色体显性遗传病, 表现为虹膜发育不全、前房角发育不全、早期青光眼^[24]. 散发 Peters 异常病例为先天性眼睛前房缺陷, 表现为角膜中央白斑、后角膜基质和 Descemet 膜缺乏, 虹膜和晶状体不同程度与后角膜的中央相连^[19]. RDC 的临床特征已经在前言中描述了. 比较它们的临床症状, 我们发现 RIEG 最重、IGDS 次之、RDC 最轻. 本研究和我们前期的研究结果^[20]表明, PITX2 R62H 和导致 RIEG 的 T68P 保留了与 PITX2 WT 相似的 DNA 结合能力.

由于 R62H 突变发生在 PITX2 与 DNA 结合的 Homeodomain 内, 因此 R62H 突变可能导致 PITX2 与 DNA 的结合能力下降. 但是, 本研究通过原核

表达系统纯化得到 PITX2 蛋白后, 然后进行 EMSA 实验, 发现 PITX2 R62H 保留了与 PITX2 WT 相似的 DNA 结合能力, 与真核表达蛋白结果一致. 一部分导致疾病的突变体 DNA 结合能力并没有下降, 如导致 RIEG 的 R84W、T68P^[25,26]; 另一部分导致疾病的突变体 DNA 结合能力有所下降, 或者丧失了与 DNA 的结合能力, 如导致 RIEG 的 V45L、7aaDup、K88E、L54Q 和导致 IGDS 的 R31H^[22,26~28]. 但是, 疾病突变的转录激活能力发生了较大变化, 要么大幅度下降, 如 R84W、T68P、7aaDup、K88E、L54Q、R31H^[22,25~28], 要么转录激活上升到野生型的 200%, 如 V45L^[27]. 而且, 在小鼠中过度表达 PITX2a, 可以导致小鼠产生类似 RIEG 的症状^[29]. 因此, 这些说明了两个问题: 第一, 突变导致疾病不仅在于 PITX2 的 DNA 结合能力下降, 而且在于转录激活能力改变; 第二, PITX2 突变导致疾病存在丧失功能和获得功能两种机制.

Wnt 家族信号分子诱导多种细胞反应, 包括细胞增殖、细胞命运决定和终末分化等^[30]. Wnt 配体与 7 次穿过细胞膜的 Frizzled 家族受体结合, 激活

细胞内的 Dishevelled (Dvl), 进而调控 GSK-3 β (serine-threonine protein kinase glycogen synthase kinase 3 β) 的活性. 在没有 Wnt 信号的情况下, β -catenin 与 APC (adenomatous polyposis coli)、axin、GSK-3 β 形成蛋白复合体, 促进 β -catenin 以泛素化途径降解. 激活的 Dvl 抑制蛋白复合体中 GSK-3 β 的活性, 促进细胞质中 β -catenin 保持稳定和积累. β -catenin 进入细胞核后, 通过与 TCF/LEF 家族转录因子相互作用, 影响受 TCF/LEF 家族调控的下游基因表达^[15,31].

Kioussi 等^[15]研究发现, Wnt/ β -catenin 途径可快速诱导 PITX2 基因转录, 并通过 PITX2 进一步调控下游靶基因的表达. LEF1/HDAC1 复合物与 PITX2 基因启动子的结合抑制了 PITX2 的转录, 但 β -catenin 进入胞核后可取代 HDAC1 与 LEF1 结合, 激活 LEF1 启动 PITX2 表达. 在多种共激活因子参与下, PITX2 作用于靶基因启动子, 起始靶基因转录, 从而调控特定的细胞增殖.

PITX2 mRNA 在体内和体外都不稳定. 激活 Wnt/ β -catenin 途径可以稳定 PITX2 以及其他几种下游靶基因的 mRNA 水平, 如 c-jun、Cyclin D1 和 Cyclin D2. 对于 PITX2 mRNA 稳定性的调节主要是通过减少 3' UTR 与降低 RNA 稳定性的 ARE-BPs (AU-rich element binding proteins) 结合, 而增加 3' UTR 与提高 RNA 稳定性的 ARE-BPs 结合. PITX2 mRNA 稳定性既是受 Wnt/ β -catenin 途径的调控, 又直接影响 c-jun、Cyclin D1 和 Cyclin D2 等基因 mRNA 的稳定性^[16].

PITX2 对细胞增殖的调控作用可能发生在细胞周期的多个时期, 但是主要表现在 G1 期, Cyclin D1 是其调控的靶基因之一, 其他靶基因还有 Cyclin D2 和 c-myc 等^[15,17]. Cyclin D 的表达对细胞 G1→S 期的转换起着关键作用, 阻滞 Cyclin D 的表达使细胞不能从 G1 期进入 S 期, 过表达则可以使 G1 期缩短^[17]. PITX2 R62H 突变稍微延缓了细胞由 G0/G1 期进入 S 期, 促进细胞 S 期→G2/M 期的转换, 与突变体转录激活能力下降的改变在性质和程度上具有一致性, 推测突变造成了其调控的下游靶基因如 Cyclin D 和 c-myc 的表达下调, 进一步由于基因剂量效应导致细胞进入 S 期的延缓. PITX2 R62H 突变影响了细胞周期调控蛋白的表达, 从而导致细胞周期的变化.

我们对 Wnt/ β -catenin→PITX2 信号途径进行研究发现, 与 HeLa 相比, WT/HeLa 和 R62H/HeLa

中 β -Catenin 表达水平均有所下降. 一个可能的解释是细胞信号传导途径存在反馈抑制. 当 Wnt/ β -catenin 途径的下游基因 PITX2 表达增加时, 会抑制上游基因 β -Catenin 的表达. 另外, Cyclin D1 的表达水平由低到高的顺序为 HeLa、R62H/HeLa、WT/HeLa, 且 WT/HeLa 远远高于 R62H/HeLa. WT/HeLa 和 R62H/HeLa 中 Cyclin D1 的表达水平分别为 HeLa 的 1355% 和 189%. 由于 PITX2 可以促进 Cyclin D1 的转录^[15], 所以在 HeLa 细胞系中过量表达 PITX2 WT 会促使 Cyclin D1 高表达. 但是, PITX2 R62H 促进 Cyclin D1 表达的能力只有 PITX2 WT 的 1/7, 这说明突变导致 PITX2 转录激活 Cyclin D1 的能力大大降低. 细胞周期结果与 Cyclin D1 的表达水平结果具有一致性, 即稳定表达 PITX2 WT 和 R62H 促使细胞增殖活性增高, 但 R62H 促使细胞增殖的能力低于 WT. 由此可见, 细胞中的 Cyclin D1 表达水平与细胞增殖能力是正相关的. 因此, PITX2 R62H 突变影响 Wnt/ β -catenin 途径, 并使细胞增殖能力发生改变, 这可能是 RDC 病因学的一个重要基础. 另外, 这也是第一次从信号传导机制探讨 PITX2 突变导致疾病的原因.

参 考 文 献

- 1 Mattos J, Contreras F, O'Donnell F E Jr. Ring dermoid syndrome: A new syndrome of autosomal dominantly inherited, bilateral, annular limbal dermoids with corneal and conjunctival extension. Arch Ophthalmol, 1980, **98**(6): 1059~1061
- 2 Xia K, Wu L Q, Liu X P, *et al.* Mutation in PITX2 is associated with ring dermoid of the cornea. J Med Genet, 2004, **41**(12): e129
- 3 Semina E V, Reiter R, Leysens N J, *et al.* Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. Nat Genet, 1996, **14**(4): 392~399
- 4 McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. Cell, 1992, **68**(2): 283~302
- 5 Gehring W J, Qian Y Q, Billeter M, *et al.* Homeodomain-DNA recognition. Cell, 1994, **78**(2): 211~223
- 6 Kumar J, Moses K. Transcription factors in eye development: A gorgeous mosaic?. Genes Dev, 1997, **11**(16): 2023~2028
- 7 Hanes S D, Brent R. DNA specificity of the bicoid activator protein is determined by homeodomain recognition helix residue 9. Cell, 1989, **57**(7): 1275~1283
- 8 Arakawa H, Nakamura T, Zhadanov A B, *et al.* Identification and characterization of the ARP1 gene, a target for the human acute leukemia ALL1 gene. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, **95**(8): 4573~4578
- 9 Gage P J, Suh H, Camper S A. The bicoid-related Pitx gene family in

- development. Mamm Genome, 1999, **10**(2): 197~200
- 10 Shih H P, Gross M K, Kioussi C. Expression pattern of the homeodomain transcription factor Pitx2 during muscle development. Gene Expression Patterns, 2007, **7**(4): 441~451
 - 11 Shih H P, Gross M K, Kioussi C. Cranial muscle defects of Pitx2 mutants result from specification defects in the first branchial arch. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, **104** (14): 5907~5912
 - 12 Gage P J, Suh H, Camper S A. Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. Development, 1999, **126** (20): 4643~4651
 - 13 Ai D, Liu W, Ma L. Pitx2 regulates cardiac left-right asymmetry by patterning second cardiac lineage-derived myocardium. Developmental Biology, 2006, **296**(2): 437~449
 - 14 Martin D M, Skidmore J M, Philips S T. PITX2 is required for normal development of neurons in the mouse subthalamic nucleus and midbrain. Developmental Biology, 2004, **267**(1): 93~108
 - 15 Kioussi C, Briata P, Baek S H, *et al.* Identification of a Wnt/Dvl/ β -catenin $\rightarrow$ PITX2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. Cell, 2002, **111**(5): 673~685
 - 16 Briata P, Ilengo C, Corte G, *et al.* The Wnt/ β -catenin $\rightarrow$ PITX2 pathway controls the turnover of PITX2 and other unstable mRNAs. Mol Cell, 2003, **12**(5): 1201~1211
 - 17 Baek S H, Kioussi C, Briata P. Regulated subset of G1 growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, **100** (6): 3245~3250
 - 18 Kulak S C, Kozlowski K, Semina E V, *et al.* Mutation in the RIEG1 gene in patients with iridogoniodysgenesis syndrome. Hum Mol Genet, 1998, **7**(7): 1113~1117
 - 19 Doward W, Perveen R, Lloyd I C. A mutation in the RIEG1 gene associated with Peters' anomaly. J Med Genet, 1999, **36**(2): 152~155
 - 20 Wang G, Liu X, Pan Q, *et al.* Functional analysis of three genetic disorder related PITX2 mutants. Chinese Science Bulletin, 2006, **51** (2): 164~169
 - 21 Tremblay J J, Marcil A, Gauthier Y, *et al.* PTX1 regulates SF-1 activity by an interaction that mimics the role of the ligand-binding domain. EMBO J, 1999, **18**(12): 3431~3441
 - 22 Kozlowski K, Walter M A. Variation in residual PITX2 activity underlies the phenotypic spectrum of anterior segment developmental disorders. Hum Mol Genet, 2000, **9** (14): 2131 ~ 2139
 - 23 Lines M A, Kozlowski K, Walter M A. Molecular genetics of Axenfeld-Rieger malformations. Hum Mol Genet, 2002, **11** (10): 1177~1184
 - 24 Pearce W G, Wyatt H T, Boyd T A, *et al.* Autosomal dominant iridogoniodysgenesis: a genetic and clinical study. Birth Defects Orig Artic Ser, 1982, **18**(6): 561~569
 - 25 Espinoza H M, Cox C J, Semina E V, *et al.* A molecular basis for differential developmental anomalies in Axenfeld-Rieger syndrome. Hum Mol Genet, 2002, **11**(7): 743~753
 - 26 Amendt B A, Sutherland L B, Semina E V, *et al.* The molecular basis of Rieger syndrome. J Bio Chem, 1998, **273** (32): 20066 ~ 20072
 - 27 Priston M, Kozlowski K, Gill D, *et al.* Functional analyses of two newly identified PITX2 mutants reveal a novel molecular mechanism for Axenfeld-Rieger syndrome. Hum Mol Genet, 2001, **10**:1631~1638
 - 28 Saadi I, Semina E V, Amendt B A, *et al.* Identification of a dominant negative homeodomain mutation in Rieger syndrome. J Biol Chem, 2001, **276**(25): 23034~23041
 - 29 Holmberg J, Liu C Y, Hjalt T A. PITX2 gain-of-function in rieger syndrome eye model. AJP, 2004, **165**(5): 1633~1641
 - 30 Cadigan K M, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. Genes Dev, 1997, **11**(24): 3286~3305.
 - 31 Boutros M, Mlodzik M. Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways. Mech Dev, 1999, **83**(1~2): 27~37

Role of PITX2 R62H Mutation in Ring Dermoid of Cornea*

LIU Xiao-Ping^{1)**}, ZHU Fei-Zhou^{1,2)**}, WANG Guo¹⁾, DENG Qi-Pan¹⁾, ZHANG Jing¹⁾, LI Qiong¹⁾,
LING Jie¹⁾, WU Ling-Qian¹⁾, LIANG De-Sheng¹⁾, PAN Qian¹⁾, LONG Zhi-Gao¹⁾,
GONG Hui-Yong¹⁾, XIA Jia-Hui¹⁾, ZHANG Zhuo-Hua¹⁾, XIA Kun^{1,2)***}

¹⁾National Laboratory of Medical Genetics, Central South University, Changsha 410078, China;

²⁾School of Biological Science and Technology, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract Ring dermoid of cornea (RDC) is an autosomal dominant disorder of cornea. The previous study identified a G185A mutation of PITX2 gene in a Chinese family with RDC. To investigate the pathological mechanism of PITX2 R62H mutation, a PITX2 prokaryotic expression plasmid were constructed and GST-PITX2 fusion protein were purified. EMSA was further conducted. The DNA-banding ability of PITX2 R62H was similar to that of the wild type PITX2 were found. The cell lines stably expressed PITX2 was also generated, and cell cycle were analyzed by flow cytometry, and the expression of β -catenin and Cyclin D1 were detected by quantitative Real-time PCR. The results showed that proliferating ability of cells expressing PITX2 R62H was lower than that of cells expressing PITX2 WT, as well as β -catenin and Cyclin D1 mRNA level. These findings revealed that PITX2 R62H mutation affected the Wnt/ β -catenin→PITX2 pathway, promoted the genes expressing abnormally, and led to abnormal cell proliferation and the formation of RDC, which may play an important role in pathogenesis of RDC.

Key words ring dermoid of cornea (RDC), PITX2, transcription factor, β -catenin, Cyclin D1

*This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China(305002601)and National Basic Research Program of China (2004CB518800).

** These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author. Tel: 86-731-4805357, E-mail: nlmglcy@xysm.net

Received: June 26, 2007 Accepted: July 22, 2007