

- 1996, 45 (1): 160~ 166
- 13 Jurgen Zapf. Physiological roles of IGF binding proteins. *European Journal of Endocrinology*, 1995, 132 (6): 645 ~ 654
- 14 Kevin M K, Youngman O, Sharron E *et al.* Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Int J Biochem Cell Biol*, 1996, 28 (6): 619~ 637
- 15 Robert C B, Marvin L B, Margaret A C. Structural determinants for binary and ternary complex formation between IGF-1 and IGF binding protein 3. *J Biol Chem*, 1992, 267 (1): 60~ 65
- 16 David R C, Marlin L D, Walker H B *et al.* Competition for binding to IGF binding protein 2, 3, 4 and 5 by the IGFs and IGF Analogs. *Endocrinology*, 1992, 131 (3): 890~ 895
- 17 Linda O N, Qing X H, Tsutomu A *et al.* Role of native disulfide bonds in the structure and activity of insulin-like growth factor 1: Genetic models of protein-folding intermediates. *Biochemistry*, 1993, 32 (19): 5214~ 5221
- 18 James A M, Linda O N, Qing X H *et al.* Oxidative refolding of IGF1 yields two products of similar thermodynamic stability: A bifurcating protein folding pathway. *Biochemistry*, 1993, 32 (19): 5203~ 5213

Progress in the Studies of Structure and Function of Insulin-like Growth Factor 1. LIU Bao-ying, WANG Huì-xin (*Institute of Beijing Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract Insulin-like growth factor 1 is a multifunctional cell regulating factor. It has been demonstrated that structural characteristics of IGF1 provide clues for its growth promoting and anabolic effect. It is concentrated on the three dimensional structure of human IGF1, and the combining regions between IGF1 and relative receptors and binding proteins. It also shows the important role of disulfide bonds in the protein folding.

Key words insulin-like growth factor 1, structure, function, receptor, binding proteins

神经系统遗传病与三核苷酸重复

王德安 夏家辉

(湖南医科大学医学遗传学国家重点实验室, 长沙 410076)

摘要 三核苷酸重复与神经系统遗传病的关系引起了许多科研工作者的关注, 介绍了近年来与三核苷酸重复相关的神经系统遗传病致病基因克隆的研究进展, 并对其可能的致病机理作了综述.

关键词 三核苷酸重复, 不稳定扩增, 遗传早发

学科分类号 Q75

自 1991 年至今, 十二种与三核苷酸重复相关的神经系统遗传病致病基因已被克隆, 从而证实了一种新的遗传突变方式, 即由于异常的不稳定的三核苷酸重复扩增导致基因突变. 它们的作用机制有许多相似之处: 患者的发病年龄与三核苷酸重复扩增数成反比例关系; 通过父系遗传的三核苷酸重复扩增数比通过母系遗传的多; 具有遗传早发现象 (anticipation), 即发病年龄逐代减小, 发病程度逐代加重等.

1 十二种相关的神经系统遗传病基因

1.1 三核苷酸重复位于基因的编码区

现在已知 7 种神经系统遗传病基因在它们的编码区内含有高拷贝数的三核苷酸重复, 并且发现位于编码区的三核苷酸重复只有一种即 $(CAG)_n^{[1]}$, 这 7 种遗传病中 6 种为常染色体显性遗传, 一种呈 X 连锁隐性遗传.

收稿日期: 1997-05-08, 修回日期: 1997-07-28

1.1.1 X 连锁脊髓球肌萎缩症 (X-linked spinal and bulbar muscular atrophy)^[2]: 本病又称肯尼迪氏病 (Kennedy, KD), 是一种 X 连锁隐性遗传病. 基因定位于 Xq11~12, 它编码一种雄激素受体. 在该基因第一个外显子靠近 5' 端处含 CAG 三核苷酸重复, 正常人重复 12~34 次, 患者重复 40~62 次, 且病情越严重, 重复次数越多.

1.1.2 亨廷顿舞蹈病 (Huntington, HD): HD 是以慢性进行性舞蹈样动作及痴呆为主要临床特征, 病理上以基底节及大脑皮质变性为主的常染色体显性遗传病. 1993 年, 由 Gusella 等^[3]经定位克隆结合外显子捕获技术在 4p16.3 上克隆了 HD 基因. 在该基因编码序列的 5' 端含有 (CAG)_n, 正常人重复 11~30 次, 病人重复 36~121 次.

1.1.3 脊髓小脑型共济失调 (spinocerebellar ataxia, SCA): SCA 是指一类以小脑、脑干、脊髓等中枢神经系统变性改变为主要特征的常染色体显性遗传病. SCA 存在遗传异质性, 经连锁分析定位 SCA₁ (6p22-23)、SCA₂ (12q23-24.1)、SCA₃/MJD (14q24.3-32.2)、SCA₄ (16q24-qter)、SCA₅ (11q13). 现在将齿状核红核苍白球路易体萎缩 (DRPLA, 12p12-ter)、带有色素斑营养不良的小脑共济失调 (SCA₇, 3p12-p21.1) 均归类于 SCA 型. SCA₁ 基因定位于 6p22~23, Orr 等^[4]1993 年定位克隆了该基因, 在该基因的编码区 5' 端含 (CAG)_n, 正常人 CAG 重复 19~36 次, 患者重复 40~81 次, 同 HD 相似, 通过父代遗传, 此序列重复增多更明显. Pulst 等^[5]1996 年将 SCA₂ 基因定位于微卫星标记 D₁₂S₁₃₂₈ 和 D₁₂S₁₃₃₃ 间 1-cM 区域, 并在这个区域建立了 BAC_s 和 PAC_s 两种 Contig, 用 (CAG)₁₀ 筛选这两种 Contig, 对阳性克隆再亚克隆测序, 发现一个带二个 CAA 插入含 22 个 CAG 重复的片段, 与筛人脑 cDNA 文库得到的 cDNA 片段比较发现这个 CAG 重复位于一个靠近 5' 端的长的阅读框架中, PCR 检测经连锁定位的

SCA₂ 家系发现正常人为纯合子, 患者为杂合子, 有一条明显的扩增带. 92% 正常的西方人含 22 个 CAG 重复, 其余 8% 的含 23 个, 而病人 CAG 重复 36~52 次. SCA₃/MJD 基因定位于 14q32.1, 在微卫星标记 D₁₄S₅₃ 和 D₁₄S₄₅ 之间 29 cM 间距内. Kawaguchi 等^[6]通过用 (CAG)₁₀ 筛人脑 cDNA 文库, 得到阳性克隆, 测序了其中 30 个克隆, 其中一个克隆含 CAG 重复 22 个, 经 FISH 重定位于 14q32.1, 设计 PCR 引物检测经连锁定位的 SCA₃/MJD 家系, 患者重复 66~80 次, 正常人重复 14~31 次, 带有明显痉挛及肌张力障碍的早发患者, CAG 重复次数最多. 齿状核红核苍白球路易体萎缩 (DRPLA) 该基因定位于 12p12-ter. Koide 等^[7]应用候选基因的策略, 用已经报道定位于 12 号染色体含 CAG 重复的基因检测经连锁定位的 DRPLA 家系, 发现正常人 CAG 重复 7~23 次, 患者重复 53~88 次. 最近 Zhu Chen Ko 等克隆了 SCA₆ 基因^[8], 他们用 (CAG)₇ 筛人脑 cDNA 文库, 对得到的 387 个阳性克隆逐一测序, 其中一个编号为 S-5 克隆含 CAG 重复 13 个, 且是在被测序的 387 个克隆中唯一发生重组的. 数据比较发现 S-5 克隆序列推断出的肽链氨基酸序列与兔子脑、鼠脑 α_{1A} Ca²⁺ 通道蛋白 BF-1 异构体 (isoform) 高度同源 (90%), 而已报道的人类一部分 cDNA 序列与兔子、鼠 α_{1A} Ca²⁺ 通道蛋白基因序列也高度同源 (92%), 这些数据表明他们已分离到了人类的 α_{1A} Ca²⁺ 通道蛋白的基因, 并 FISH 定位于 19p13. 对 S-5 克隆序列及兔子的该基因序列进行比较, 发现 CAG 重复是保守的, 并且位于 3' 非翻译区. 然后这两个序列的高度同源 (700 个核苷酸中有 84% 相同), 提示这样一种可能性, 即有另外一种剪切本 (splice variants) 的存在, 在这种剪切本里包含一个 CAG 被翻译的阅读框架, 因此他们再用 S-5 作探针重筛人类胎脑 cDNA 文库, 得到 17 个阳性克隆, 其中 5 个在终止密码子 TAG 前插入一个 5 bp GGCAG 核苷酸序列, 这样终止密码子被移码了, 阅读框架得到了延长,

CAG 重复重新被翻译. 该基因正常人 CAG 重复 4~16 次, 患者重复 21~27 次.

1.2 三核苷酸重复位于基因的非编码区

现在已知五种神经系统遗传病基因, 在它们的 5' 端、3' 端非翻译区或者内含子中含有高拷贝数的三核苷酸重复. 这些三核苷酸重复单元包括三种: CGG、GAA、CTG. 这五种遗传病遗传方式多样, 既有常染色体显性遗传, 也有常染色体隐性遗传, 同时还有 X 连锁的隐性遗传.

1.2.1 脆性 X 综合征 (fragile x syndrome, FXS)^[9]: FXS 是除 21 三体综合征 (Down) 外最常见的遗传性 X 连锁精神迟滞症, FXS 有三种基因型, 基因分别位于 Xq27.3 (FRAXA)、Xq28 (FRAXE)、Xq27.3~q28 (FRAXF) 上. 三型表型类似, 有早现遗传现象, 母亲患者的子女患病危险性增加. 三型的遗传学基础都是由于在基因内 5' 非翻译区中存在不稳定扩增的 CGG 三核苷酸重复.

1.2.2 弗里德赖希共济失调 (Friedreich): Friedreich 共济失调是在所有的共济失调中发病率最高的, 估计有 1/50 000, 该致病基因定位于 9q13~q21.1, 是一种常染色体隐性遗传病, 患者呈现进行性步态共济失调, 反射消失, 位置感觉损伤, 构音障碍等临床症状. 1996 年, Campuzano 等^[10]克隆了 Friedreich 共济失调致病基因, 它含 5 个外显子跨 40 kb, 编码一个含 210 氨基酸的蛋白质——Frataxin. 这个基因在正常人的中枢神经系统中高度表达, 但在病人中表达量极低. 他们发现在 74 个病人中有 71 个病人这个致病基因的 第一个内含子中含 GAA 重复纯合子的扩增, 扩增 200~900 次, 而正常人仅 7~22 次, 其余病人这个基因呈杂合子; 一个等位基因内含子中有 GAA 重复扩增, 另一个呈点突变.

1.2.3 强直性肌营养不良 (myotonic dystrophy, DM)^[16]: DM 是以肌强直和进行性肌无力、萎缩为特征的常染色体显性遗传病, 基因定位于 19q13.2, 它编码一种周期性依赖 ATP 丝氨酸、苏氨酸蛋白激酶. 在该基因的 3' 端

非翻译区含 CTG 三核苷酸重复, 正常人此序列高度多态, 含重复 5~27 次. 而 DM 患者此序列重复 50 次以上.

2 三核苷酸重复扩增可能的致病机制

许多正常基因含三核苷酸重复; 12% 的果蝇基因, 1%~7% 的人类、老鼠, 酵母基因含三核苷酸重复, 但尚未发现含三核苷酸重复的细菌基因, 在果蝇中枢神经系统发育过程中许多这类基因发挥着重要作用, 并且半数的人类与老鼠这类基因是同源的.

重复氨基酸序列, 特别是谷氨酰胺重复序列在许多转录因子中存在. 人类 TATA 连结蛋白 N 端区存在有连续 8 个谷氨酰胺残基; 对转录起重要作用的转录因子 Spl 也有一段富含谷氨酰胺区域; 对神经系统特异表达的基因起重要调节作用的神经系统特有的八聚体结合因子 (N-OCT3) 含 21 个谷氨酰胺残基.

然而三核苷酸重复异常扩增引起的神经系统退行性病变的准确分子机制尚不明确. 常染色体隐性遗传的 Friedreich 共济失调, 因为 GAA 重复位于内含子里面, 所以它不能直接干扰内含子外显子剪切. 但正如 Campuzano 等推测, 这种突变可能干扰了 RNA 的成熟前剪切加工. 由于在内含子中存在 GAA 重复扩增及点突变, 这样就使得内含子套索不能正常形成, 剪接复合体不能行使功能, 内含子没被剪除, 形成缺陷的 mRNA, 翻译成异常的蛋白质. (GAA 重复扩增及点突变对剪切的可能影响见图 1).

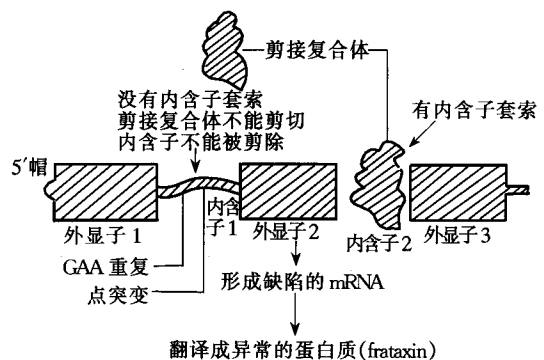


图 1 Friedreich 共济失调基因可能的异常表达

Friedreich 共济失调是一种带有某种功能丢失的常染色体隐性遗传病, 与此相反的是如 Huntington 病、SCA₁、SCA₂、DRPLA、MJD、SCA₆ 等是常染色体显性遗传病, CAG 重复位于外显子中, 表达成多聚谷氨酰胺。现认为这种多聚谷氨酰胺有毒害作用, 是一种获得性功能突变。Li 等^[12] 已经分离出一种新的 Huntington 相关蛋白, 它在 Huntington 病患者脑中表达, 并且能与扩增的 CAG 重复表达成的谷氨酰胺基团特异亲和, 能选择性的与这些相关蛋白作用。

Burke 等^[13] 认为在这样一类疾病中, 获得的毒害作用不仅在基因水平上, 更重要的是在蛋白质水平上, 是扩增的 CAG 重复表达成多聚谷氨酰胺残基上。这个研究小组已发现在 Huntington 和 DRPLA 病人中表达的这些病理蛋白, 通过其多聚谷氨酰胺残基能选择性地与磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 相互作用, 降低该酶的活性, 从而导致能量代谢的障碍, 选择性的神经元丢失。

现已认识到三核酸重复异常扩增是一种新的基因突变方式, 它使我们理解了一些复杂的神经系统疾病的分子机制, 并使我们能对这样一类神经系统遗传性疾病进行基因诊断、产前诊断、携带者检出及分子生物学上的分类, 并为基因治疗提供理论依据。

参 考 文 献

- 1 Editorl R. Neurologic disease and trinucleotide repeat. *N Engl J Med*, 1996, **335** (16): 1222~ 1225
- 2 Albert R, Elizabeth M, Dennis B *et al.* Androgen receptor gene mutation in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*, 1991, **352** (1): 77~ 80
- 3 Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on huntington's disease chromosomes. *Cell*, 1993, **72** (6): 971~ 979
- 4 Orr H T, Chung M, Banfis F *et al.* Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet*, 1993, **4**: 221~ 229

- 5 Stefan M P, Alex N, Tamilla N K *et al.* Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet*, 1996, **14** (3): 269~ 274
- 6 Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M *et al.* CAG expansion in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet*, 1994, **8** (3): 221~ 229
- 7 Koide K, Ikeuchi T, Onodera O *et al.* Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nat Genet*, 1994, **6** (1): 9~ 14
- 8 Olga Z, Jennifer B, Penelope B *et al.* Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA₆) associated with small polyglutamine expansions in the α_{1A} voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet*, 1997, **15** (1): 62~ 70
- 9 Verkerk A J M H, Pieretti M, Sutcliffe J S *et al.* Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a Breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile x syndrome. *Cell*, 1991, **65** (5): 905~ 914
- 10 Campuzano K, Aimee S, David L *et al.* Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*, 1996, **271** (8): 1423~ 1428
- 11 Brook J D, Ben A. Oostra, Stephen T. Warren *et al.* Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, 1992, **68** (3): 799~ 807
- 12 Li X-J, Tora L, Brice A *et al.* A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature*, 1995, **378** (3): 398~ 406
- 13 Burk J R, Coullin P, Steranin G *et al.* Huntington and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nat Med*, 1996, **2** (3): 347~ 352

Trinucleotide Repeats and Neurologic Disease.

WANG De-an, XIA Jia-hui (*National Medical Genetics Laboratory, Hunan Medical University, Changsha 410078, China*).

Abstract The relation between trinucleotide repeat and neurologic disease is paid close attention by many researchers. The development of gene cloning of neurologic diseases which are related to trinucleotide repeat is introduced. A fuller description is given on the possible pathogenesis of trinucleotide repeat expansion.

Key words trinucleotide repeat, unstable expansion, anticipation