

在 Yunnanese ($A\gamma\delta\beta$)⁰-地贫 3' 缺失端点下游 鉴别到两个增强子样顺序*

黄小东 张俊武**

(中国医学科学院 基础医学研究所, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)
(中国协和医科大学)

摘要 利用荧光酶报告基因系统搜索了 Yunnanese ($A\gamma\delta\beta$)⁰-地中海贫血缺失 3' 端点下游 11.5 kb 区域内的调控顺序. 确定缺失 3' 端点立即下游区 1.7 kb 片段, 在人红白血病细胞 K562 及鼠红白血病细胞 MELGM979 中, 可使 γ -珠蛋白基因启动子驱动的荧光酶基因表达增加 3.8~4.0 倍, 而在 HeLa 细胞中仅增加 1.5 倍. 位于缺失 3' 端点约 10 kb 的一个长 1.4 kb 片段在 K562 和 MELGM979 中, 可使 γ -基因启动子驱动的荧光酶基因表达增加 2.4~2.9 倍, 而在 HeLa 细胞中无增加. 结果说明这两段顺序均有增强子活性, 并且这种活性具有一定的红细胞特异性. 进一步证明 1.7 kb 片段内包含多个转录调节蛋白结合模体的 430 bp 片段包含了 1.7 kb 片段的大部分增强子活性. 这些结果为缺失导致增强子样顺序并入到接近 $G\gamma$ 基因, 是 Yunnanese ($A\gamma\delta\beta$)⁰-地贫缺失突变体中胎儿 $G\gamma$ -珠蛋白基因, 在成人期持续活跃表达原因的假设提供了实验证据.

关键词 $G\gamma$ -珠蛋白基因, ($A\gamma\delta\beta$)⁰-地中海贫血, 增强子样顺序

学科分类号 Q512.7, R596.2

人胎儿 γ -珠蛋白基因主要在胎儿期红细胞中表达, 出生前后发生 $\gamma \rightarrow \beta$ 珠蛋白基因表达的转换 (或称开关), 正常人出生一年后红细胞中胎儿血红蛋白 (HbF, $\alpha_2\gamma_2$) 少于成人血红蛋白 (HbA, $\alpha_2\beta_2$) 的 2%. 但在某些天然发生的 β 珠蛋白基因簇内的缺失突变或 γ 珠蛋白基因启动子上的点突变, 可能导致胎儿 γ 珠蛋白基因在成人期持续活跃表达^[1]. 这些天然突变体提供了研究珠蛋白基因表达调控和开关机制的很好模型.

我们先前发现了与胎儿 $G\gamma$ 珠蛋白基因在成人期活跃表达相关的 Yunnanese ($A\gamma\delta\beta$)⁰-地贫缺失, 除去了从 $A\gamma$ 基因到 β 基因下游共约 90 kb DNA, 其杂合子的 HbF 为 9%~17%, 不表现贫血症状, 纯合子的 HbF 为 100%, 仅表现轻微的贫血症状^[2]. 我们假设缺失导致增强子样顺序被带到接近 $G\gamma$ 珠蛋白基因, 是其在成人期持续活跃表达的原因. 为验证这一假设, 我们已经克隆分离了包含 $G\gamma$ 珠蛋白基因及 3' 并入顺序的缺失桥片段^[3], 本文进一步用报告基因系统从 3' 并入顺序中鉴别到两个增强子样顺序, 并对缺失端点立即下游区的一个增强子样顺序作了较为详细的研究.

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

pGL3-Basic 载体、pSV- β -gal 质粒、限制性内

切酶、T4DNA 连接酶、DNA 聚合酶 I Klenow 片段、荧光素酶 (luc) 和 β 半乳糖苷酶 (β -gal) 测定试剂盒均为 Promega 公司产品. 血红素 (hemin) 和二甲基亚砜 (DMSO) 为 Sigma 公司产品. DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基和胎牛血清为 GIBCO-BRL 公司产品. K562、MELGM979 和 HeLa 细胞均为本室保存.

1.2 质粒的构建和制备

首先以 pGL3-Basic 为基础构建了由人 $G\gamma$ 珠蛋白基因启动子 (-382 → +14) 驱动的荧光素酶报告基因表达载体 pG γ Luc. 用适当的限制性内切酶酶切含 $G\gamma$ 基因及 3' 并入顺序的重组噬菌体 λ YBg DNA^[3], 获得 7 个连续的 DNA 片段, 分别插入到 pG γ Luc 表达载体中荧光素酶基因下游. 利用 PCR 方法 (上游引物为: 5'-ATTCCAATCAATAGAAAA-AGAGG-3', 下游引物为: 5'-TGTGGGTTTGTTCAT-AGATAGC-3'), 获得了缺失 3' 缺失端点下游 430 bp 的 DNA, 并将此片段按不同方向插入到 pG γ Luc 的荧光素酶基因下游. 对经鉴定正确的克隆, 扩增后用氯化铯-溴化乙锭密度梯度离心法制备超螺旋质粒 DNA^[4], 用于瞬时转染实验.

* 国家自然科学基金资助项目 (39370160 及 39893320).

** 通讯联系人. Tel: 010-65296423

E-mail: junwuzhang@263.net 或 junwu_zhang@hotmail.com

收稿日期: 2001-04-24, 接受日期: 2001-05-24

1.3 细胞培养

所有细胞均在 37℃、5% CO₂ 和 100% 湿度条件下培养。K562 和 HeLa 细胞以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, MELGM979 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养。在瞬时转染实验中, 转染后的 K562 细胞有时在含 25mmol/L 氯高铁素 (hemin) 的培养基中培养 2 天诱导细胞分化, MELGM979 细胞有时在含 2% 二甲亚砜 (DMSO) 的培养基中培养诱导分化。

1.4 瞬时转染实验

用电穿孔法转染 K562 和 MELGM979 细胞^[5]。每次使用 40 μg DNA 混合物 (含 1.5 pmol 的质粒 DNA、2 μg pSV-β-Gal 和一定量鲑精 DNA)。导入 2×10^7 细胞。用磷酸钙共沉淀法转染 HeLa 细胞^[6]。每次使用 20 μg DNA 混合液 (1.5 pmol 质粒 DNA、2 μg pSV-β-Gal 和一定量鲑精 DNA), 转染 5×10^5 细胞。pSV-β-Gal 作为内对照以校正转染效率。转染的细胞培养 48 h 后, 按试剂盒操作说明进行 β-Gal 及 Luc 活性测定。每次做三次平行转染, 以 pGyLuc 转染细胞的 Luc 活性做为基准, 将其他质粒转染细胞的 Luc 活性与之比较, 求出相对比值。

1.5 统计学处理

实验数据以均值 ± 标准差表示, 组间显著性差异比较采用 *t* 检验。

2 结 果

2.1 DNA 片段在荧光素酶报告基因载体上的克隆

为了在 Yunnanese (Aγδβ)⁰-地贫缺失 3' 并入的 DNA 中搜寻增强子样顺序, 首先以 pGL3-Basic 载体为基础构建了由 Gγ-珠蛋白基因启动子 (-382 → +14) 驱动的荧光素酶报告基因表达载体 pGyLuc。然后以适当的限制性内切酶酶切重组噬菌体 λYBg DNA, 获得 7 个具有部分顺序交迭的 DNA 片段, 覆盖了 Yunnanese (Aγδβ)⁰-地贫 3' 缺失端点下游 11.5 kb (图 1), 经过中间载体 pBSTK 的过渡, 克隆到 pGyLuc 表达载体中荧光素酶基因下游, 最终获得了含有这些片段的真核表达质粒, 即 pGyLucNA、pGyLucXH、pGyLucAA、pGyLucHE、pGyLucEE、pGyLucXX 和 pGyLucEA。图 1 示意了这些表达质粒的构建过程, 图 2 显示这些质粒酶切电泳鉴定。

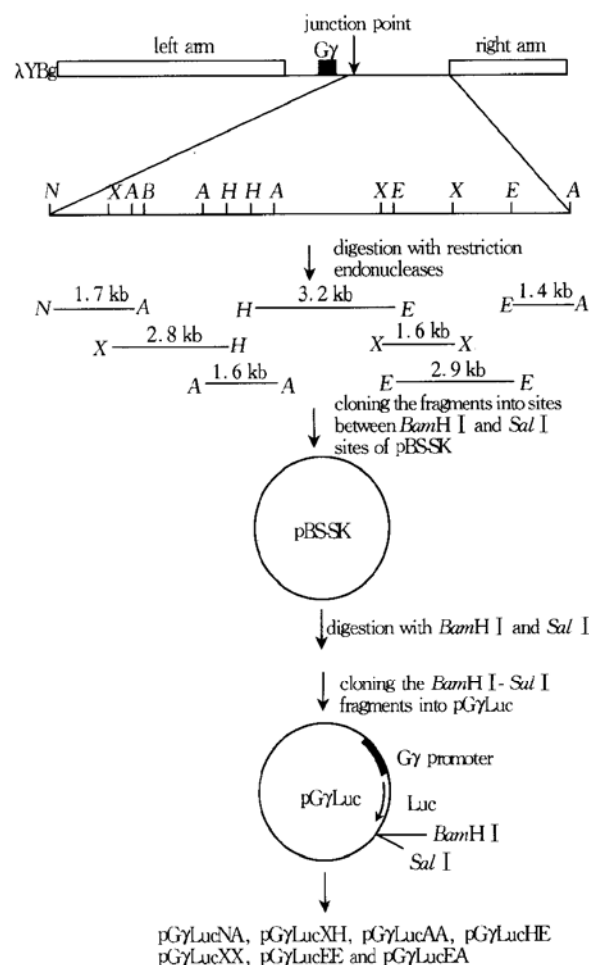


Fig 1 Construction of recombination expression plasmids by inserting the fragments derived from the juxtaposed region into luciferase expression plasmid pGyLuc driven by Gγ-globin gene promoter

A: Acc I; B: BamHI; E: EcoRI; H: Hind III; N: Nco I;
X: Xba I.

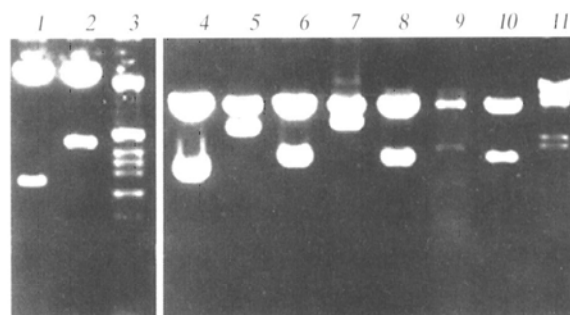


Fig 2 Identification of recombination expression plasmids by digestion with restriction endonucleases

1: pGyLuc/Apa I + Hind III; 2: pGyLuc/Kpn I + Hind III; 3: pBR322/Hinf I marker; 4: pGyLucEA/Bam H I + Sal I; 5: pGyLucEE/Bam H I + Sal I; 6: pGyLucXX/Bam H I + Sal I; 7: pGyLucHE/Bam H I + Sal I; 8: pGyLucAA/Bam H I + Sal I; 9: pGyLucXH/Bam H I + Sal I; 10: pGyLucNA/Bam H I + Sal I; 11: λDNA/Hind III marker.

2.2 在 3' 缺失端点下游鉴别到两个增强子样顺序

用表达质粒 pG γ LucNA、pG γ LucXH、pG γ LucAA、pG γ LucHE、pG γ LucEE、pG γ LucXX和 pG γ LucEA 分别转染不诱导和 hemin 诱导的人红白血病细胞 K562、不诱导和 DMSO 诱导的小鼠红白血病细胞 MELGM979 以及非红系的 HeLa 细胞, 以与这些质粒一起转染的 pSV- β -gal 质粒作为内对照. 测定 β 半乳糖苷酶活性校正转染效率. 结果发现位于 3' 缺失端点立即下游区的 1.7 kb *Nco* I /

Acc I 片段使 G γ -启动子驱动的荧光酶基因表达在未诱导的 K562 细胞中增加 4.0 ± 0.4 倍 ($P < 0.01$), 在 hemin 诱导的 K562 细胞中增加 3.8 ± 0.3 倍 ($P < 0.01$), 在未诱导的 MELGM979 细胞中增加 3.8 ± 0.3 倍 ($P < 0.01$), 在 DMSO 诱导的 MELGM979 细胞中增加 3.8 ± 0.5 倍 ($P < 0.01$), 在 HeLa 细胞中虽然增加 1.5 ± 0.6 倍, 但经统计学分析无显著性差异. 还发现位于 3' 缺失端点下游 10 kb 的 1.4 kb *Eco*RI-*Acc*I 片段使荧光酶基因表达在未经诱导的 K562 细胞中增加 2.8 ± 0.2 倍 ($P < 0.01$), 在 hemin 诱导的 K562 细胞中增加 2.6 ± 0.6 倍 ($P < 0.01$), 在未经诱导的 MELGM979 细胞中增加 2.9 ± 0.2 倍 ($P < 0.01$), 在 DMSO 诱导的 MELGM979 细胞中增加 2.4 ± 0.3 倍 ($P < 0.01$), 在 HeLa 细胞中无增加. 这些结果说明上述两个 DNA 片段具有增强子样活性, 而且表现出一定的红系组织特异性. 其余 5 个 DNA 片段基本不影响 G γ -启动子驱动的荧光酶基因表达. 7 个 DNA 片段对 G γ -启动子驱动的荧光酶基因表达的影响总结于图 3 中.

2.3 1.7 kb 片段中增强子活性的详细分析

利用 TRANSFAC 数据库 (Version 3.3) 对缺失 3' 端点立即下游区 1.7 kb 片段的核苷酸序列进行分析, 发现多个已知转录调节蛋白的结合模体集中分布于此片段的一个 430 bp 区域内 (图 4). 用 PCR 方法从 pG γ LucNA 质粒中扩增了这一片段并经测序验证. 将此片段以不同的方向克隆到 pG γ Luc 表达质粒中荧光素酶基因下游获得 pG γ LucF (正向) 和 pG γ LucR (反向), 分别用它们与 pSV- β -gal 质粒共转染不诱导的以及诱导分化的 K562 细胞和 MELGM979 细胞, 测定 β 半乳糖苷酶及 Luc 活性. 结果发现此 430 bp 片段能使 G γ -珠蛋白基因启动子活性在不诱导和 hemin 诱导的 K562 细胞中增加 2.4~2.5 倍 ($P < 0.01$), 在不诱导和 DMSO 诱导的 MELGM979 细胞中增加 2.5~3.2 倍 ($P < 0.01$) (图 5). 结果表明此 430 bp 片段包含了上述 1.7 kb 片段的大部分增强子活性.

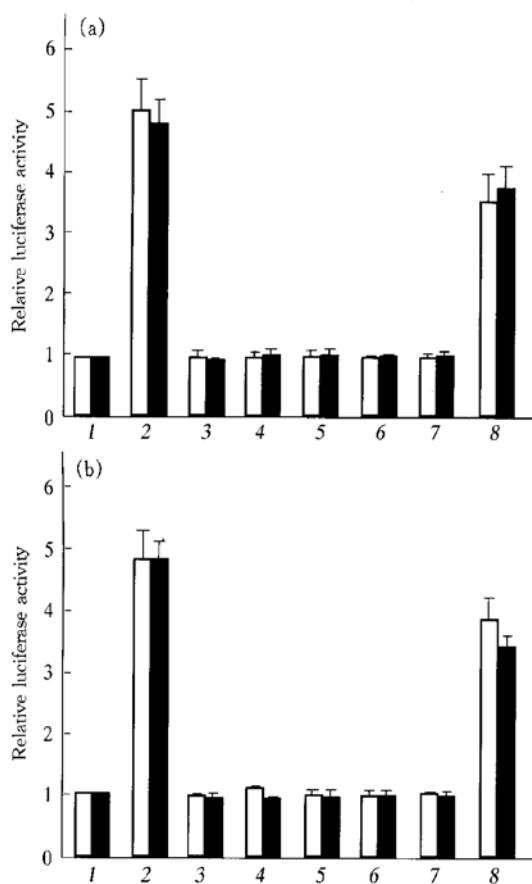


Fig. 3 Effect of the fragments immediately downstream from the 3' breakpoint on expression of luciferase gene driven by the G γ promoter in the transfected K562 cells (a) and MELGM979 cells (b)

(a) □ Hemir-induced, ■ Uninduced; (b) □ DMSO-induced, ■ Uninduced. 1: G γ -promoter; 2: G γ -promoter + NA; 3: G γ -promoter+ XH; 4: G γ -promoter+ AA; 5: G γ -promoter+ HE; 6: G γ -promoter+ XX; 7: G γ -promoter+ EE; 8: G γ -promoter+ EA.

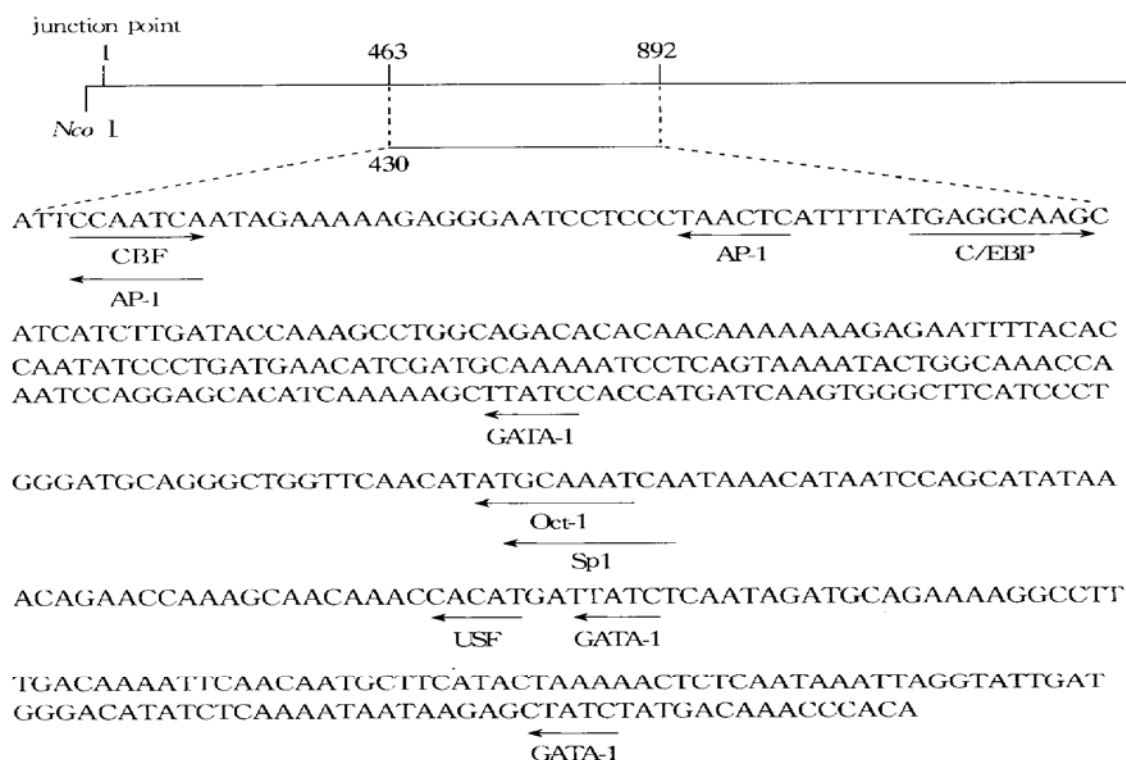


Fig. 4 The nucleotide sequences and the motifs for transcriptional factors binding within the 430 bp region of the 1.7 kb fragment

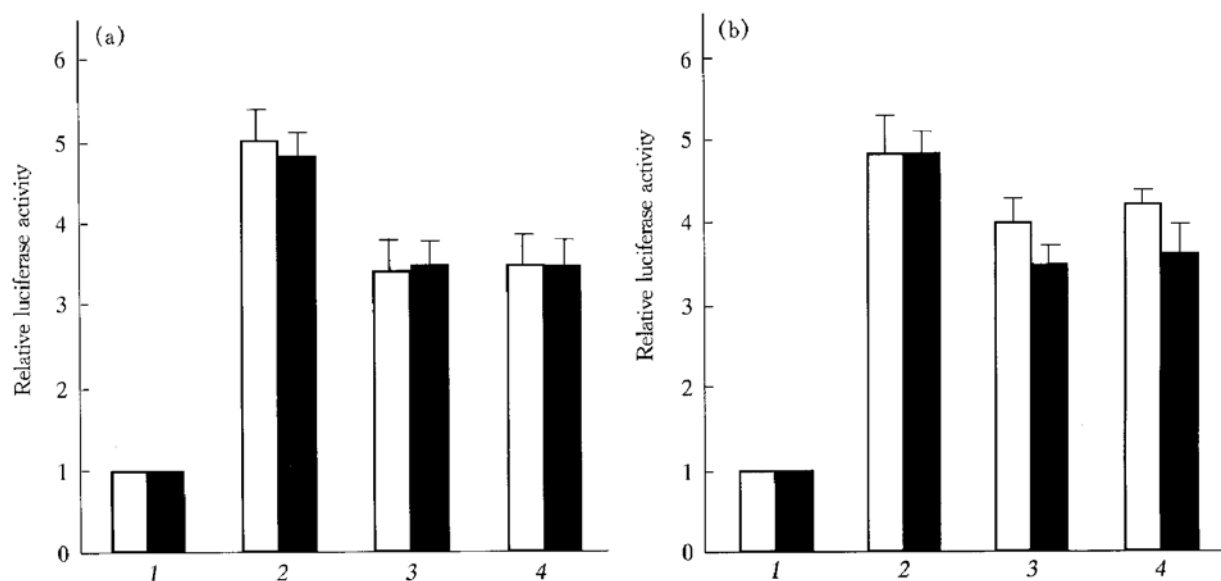


Fig. 5 A comparison of the enhancer activity of the 430 bp and 1.7 kb fragments

(a) K562 cells, □: hemir-induced, ■: uninduced; (b) MEL cells, □: DMSO-induced, ■: Uninduced.

1: G γ -promoter; 2: G γ -promoter+ NA; 3: G γ -promoter+ 430F; 4: G γ -promoter+ 430R.

3 讨论

已提出若干假设解释 G γ A γ ($\delta\beta$)⁰-地中海贫血, 以及缺失型 HPFH 中 γ 珠蛋白基因在成人期持续活跃表达的机制。这些包括缺失导致抑制顺序

的除去^[7]; 缺失导致增强子样顺序接近 γ 基因^[8]; 缺失导致失去了 β 基因与 γ 基因竞争与 LCR 的相互作用^[9]; 缺失导致染色质构型改变^[10]。

已经获得了一些实验证据, 支持第二种假设。例如, German ($\delta\beta$)⁰-地贫及 Belgian ($\delta\beta$)⁰-地贫与

HPFH-3 及 HPFH-4 有着相当接近的 3' 缺失端点, 因此有人假设在这四种缺失突变体中, 可能有一个共同的增强子顺序并入到接近 γ 基因. 近来在瞬时转染细胞及转基因动物中均已证明在 HPFH-3 3' 缺失端点下游的一个 DNA 片段具有增强子样特征^[11]. 利用报告基因系统也已在 Thai ($\text{A}\gamma\delta\beta$)⁰-地贫缺失 3' 端点下游 1 kb 处鉴别到一个增强子样顺序, 为缺失导致增强子顺序并入到接近 G γ 基因, 是此突变体中 G γ 基因高水平表达的假设提供了实验依据^[12]. HPFH-1 和 HPFH-2 的 3' 缺失端点分别位于 β 珠蛋白基因下游 97 kb 和 92 kb. 对 HPFH-1 3' 缺失断点下游的一个 DNA 片段的研究发现具有以下有趣的特征: 在报告基因系统中显示增强子活性; 低甲基化; 含有一个红系细胞特异的 DNase I 高敏位点; 含有一个大的开放阅读框, 可以编码一个与 G 蛋白偶联受体超家族同源的蛋白质. 这些提示此段 DNA 可能在决定 HPFH-1 和 HPFH-2 的表型中起着一定的作用^[13]. 近来在带有 HPFH-1 和 HPFH-2 缺失桥片段 (含 G γ 、A γ 珠蛋白基因及 3' 并入顺序) 的转基因小鼠中, 鉴别到 γ -珠蛋白基因在成年期红细胞中的高水平表达并发现 γ -珠蛋白分布于全部红细胞中^[14].

Chinese ($\text{A}\gamma\delta\beta$)⁰-地贫与 Yunnanese ($\text{A}\gamma\delta\beta$)⁰-地贫具有接近的 5' 缺失端点, 但前者的 3' 缺失端点在后者的 3' 缺失端点下游~9 kb. 比较我们鉴别的 Chinese ($\text{A}\gamma\delta\beta$)⁰-地贫纯合子和 Yunnanese ($\text{A}\gamma\delta\beta$)⁰-地贫纯合子, 后者具有明显轻微的贫血症状^[2], 据此我们假设增强子样顺序可能存在于两种缺失的 3' 端点之间, 此顺序在前一缺失中被除去而在后一缺失中仍然保留, 因此 Yunnanese ($\text{A}\gamma\delta\beta$)⁰-地贫纯合子具有明显温和的贫血症状. 本文利用报告基因系统在 Yunnanese ($\text{A}\gamma\delta\beta$)⁰-地贫缺失 3' 端点下游区鉴别两个增强子样顺序, 为“缺失导致增强子样顺序被带到接近 G γ -基因是 Yunnanese ($\text{A}\gamma\delta\beta$)⁰-地贫突变体中 G γ 基因持续活跃表达主要原因”的假设提供了实验依据.

基因转录调控通过顺式作用元件与反式作用因子的相互作用实现. 对位于缺失 3' 端点立即下游的 1.7 kb 增强子样片段的顺序分析发现多个转录调节因子如 DATA-1、C/EBP、AP-1、CBF、Sp1 和 USF 的结合模体集中分布在一个 430 bp 区域. 这些因子已被证明能够在促进基因转录的调控过程中发挥重要作用. 本文实验证明这一区域的确包含了 1.7 kb 片段中的大部分增强子活性. GATA-1

和 C/EBP 结合模体也存在于 HPFH-1 和 HPFH-3 缺失 3' 端点下游的增强子样顺序中^[11, 14]. GATA-1/SP1 和 USF 的结合模体也存在于 β 珠蛋白基因簇位点控制区 (LCR) 的 HS2 中^[1]. 由此我们推测在 430 bp 区域存在的这些反式作用因子的结合位点可能对 1.7 kb 片段的增强子活性具有重要作用. 对位于缺失 3' 端点下游 10 kb 的 1.4 kb 增强子样顺序的分析, 也发现在 *EcoR* I 位点下游 0.5 kb 区域内比较集中地分布着三个重要转录因子 HNF-1、AP-1 和 TFIID 的潜在结合模体, 这些模体也可能对增强子活性具有重要作用. 这两个增强子样顺序的确切作用及作用机制尚待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Stamatoyannopoulos G, Nienhuis A W. Hemoglobin switching. In: Stamatoyannopoulos G, Nienhuis A W, Varmus H, eds. The Molecular Basis of Blood Diseases. Philadelphia: Saunders W B, 1994. 107~155
- 2 Zhang J W, Song W-F, Zhao Y-J, *et al.* Molecular characterization of a novel form of ($\text{A}\gamma\delta\beta$)⁰-thalassaemia deletion in a Chinese family. *Blood*, 1993, **81** (6): 1624~1629
- 3 Zhang X Q, Zhang J W. The 3' breakpoint of the Yunnanese ($\text{A}\gamma\delta\beta$)⁰-thalassaemia deletion lying in a L1 family sequence: implicated in the mechanisms of the deletion and the reactivation of G γ globin gene. *Human Genetics*, 1998, **131** (1): 90~95
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1.42~1.43
- 5 张俊武, 赵艳君, 吴冠芸, 等. 野生型及启动子区突变的 HPFH A γ -珠蛋白基因在 MEL 细胞中的表达. *生物化学杂志*, 1995, **11** (3): 343~347
- 6 Zhang J W, Zhao Y J, Wu G Y, *et al.* Chinese Biochemical Journal, 1995, **11** (3): 343~347
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 16.33~16.40
- 7 Huisman T H, Schroeder W A, Efremov G D, *et al.* The present status of the heterogeneity of fetal hemoglobin in beta-thalassemia: an attempt to unify some observations in thalassemia and related conditions. *Ann N Y Acad Sci*, 1974, **232**: 107~124
- 8 Tuan D, Feingold E, Newman M, *et al.* Different 3' end points of deletions causing delta beta-thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin: implications for the control of gamma globin gene expression in man. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80** (22): 6937~6941
- 9 Enver T, Raich N, Ebens A J, *et al.* Developmental regulation of human fetal-to-adult globin gene switching in transgenic mice. *Nature*, 1990, **344** (6264): 309~313
- 10 Bernards R and Flavell RA. Physical mapping of the globin gene deletion in hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH). *Nucleic Acids Res*, 1980, **8** (7): 1521~1530
- 11 Anagnou N P, Perez-Stable C P, Gelinas R, *et al.* Sequences located 3' to the breakpoint of the hereditary persistence of fetal hemoglobin-3 deletion exhibit enhancer activity and can modify the developmental expression of the human A γ globin gene in transgenic mice. *J Biol Chem*, 1995, **270** (17): 10256~10263

- 12 Kosteas T, Palena A, Anagnou N P. Molecular cloning of the breakpoints of the hereditary persistence of fetal hemoglobin type 6 (HPFH-6) deletion and sequence analysis of the novel juxtaposed region from the 3' end of the beta globin gene cluster. *Hum Genet*, 1997, **100** (3~4): 441~445
- 13 Elder JT, Forrester W C, Thompson C, et al. Translocation of an erythroid-specific hypersensitive site in deletion-type hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Mol Cell Biol*, 1990, **10** (4): 1382~1389
- 14 Arcasoy M O, Romana M, Fabry M E, et al. High levels of human γ -globin gene expression in adult mice carrying a transgenic of deletion-type hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Mol Cell Biol*, 1997, **17** (4): 2076~2089
- 15 张俊武, 吴冠芸, 刘体超, 等. 与胎儿珠蛋白持续表达有关的 (A $\gamma\delta\beta$)⁰ 地贫纯合子及杂合子的分子鉴别, *生物化学杂志*, 1991, **7** (3): 333~338
Zhang J-W, Wu G-Y, Zhao Y-J, et al. Chinese Biochemical Journal, 1991, **7** (3): 333~338

Two Enhancer-Like Sequences Were Identified from Downstream of The 3' Breakpoint of The Yunnanese (A $\gamma\delta\beta$)⁰-thalassemia Deletion*

HUANG Xiao-Dong, ZHANG Jun-Wu**

(National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

Abstract The *cis*-acting elements were scanned within 11.5 kb of the 3' juxtaposed region of the Yunnanese (A $\gamma\delta\beta$)⁰-thalassemia deletion using the luciferase report gene system. A 1.7 kb fragment immediately downstream of the 3' breakpoint of the deletion was found to increase expression of the luciferase gene driven by G γ -globin gene promoter by 3.8 to 4.0 fold in K562 cells and MELGM979 cells and 1.5 fold in HeLa cells. A 1.4 kb fragment that is located 10 kb downstream of the 3' breakpoint was found to increase the luciferase expression by 2.4 to 2.9 fold in K562 cells and MELGM979 cells but no enhancement in HeLa cells. The results suggested that the two fragments contain enhancer-like elements and they function in a certain erythroid-specific manner. Furthermore, a 430 bp region that contains several putative motifs for known transacting factors binding within the 1.7 kb fragment was showed to include the most of the enhancer activity of the fragment. These results provided experimental proof for the hypothesis that the importation of enhancer-like sequences into the vicinity of G γ globin gene may be responsible for the reactivation of the G γ -globin gene in the Yunnanese (A $\gamma\delta\beta$)⁰-thalassemia mutant.

Key words G γ globin gene, (A $\gamma\delta\beta$)⁰-thalassemia, enhancer-like sequence

* This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China (39370160 and 39893320).

** Corresponding author. Tel: 86-10-65296423, E-mail: junwuzhang@263.net or junwu_zhang@hotmail.com

Received: April 24, 2001 Accepted: May 24, 2001