

NRSE与 NRSF 及其对神经元特异性基因表达的调控作用 *

王小飞^{1,2)} 于盼盼¹⁾ 陆佩华^{1)**}

(¹⁾上海第二医科大学神经生物学实验室, 上海 200025;

²⁾南通大学附属医院基因诊断实验室, 南通 226001)

摘要 神经限制性沉默元件 (NRSE) 是一段长度为 21~23 bp 的保守 DNA 序列, 存在于许多神经元特异表达基因的转录调控区中, 神经限制性沉默因子 (NRSF) 能特异性结合到 NRSE dsDNA 上, 并通过其 N 端和 C 端阻遏结构域分别连接共阻遏蛋白 Sin3A/B 和 CoREST, Sin3A 招募 HDAC 对组蛋白进行去乙酰基化修饰, CoREST 则作为平台蛋白招募特异的“沉默组件”, 以此维持基因沉默. 最近的研究显示, NRSE dsRNA 能在转录水平与 NRSF 蛋白直接作用, 而不是作为 siRNA 或 miRNA 在转录后水平启动神经元特异性基因的表达.

关键词 神经限制性沉默元件, 神经限制性沉默因子, 神经元特异性基因, NRSE 双链 RNA

学科分类号 Q291

对神经元特异性基因表达的研究大多是从正调控的角度入手的, 人们已经对多个神经元特异性表达基因的顺式调控元件进行了研究. 近期的研究提示负调控作用在控制神经元特异性基因的表达中起着同样重要的作用, 有学者认为神经元特异性基因表达的负调控机制是神经元分化、多样性、可塑性及生存的基础, 甚至有关于神经元基因表达调控的“沉默是金”之说^[1]. 神经限制性沉默因子 (neuronal restricted silencing factor or RE1-silencing transcription factor, NRSF/REST) 是一种锌指蛋白转录因子, 它能结合于一个被称为神经限制性沉默元件 (neuron-restrictive silencer element or repressor element-1, NRSE/RE1) 的 DNA 片段上, 从而在转录水平抑制许多与神经元发育及功能相关的基因在非神经元细胞中的表达. NRSF 和 NRSE 的相互作用还涉及许多相关的蛋白质和小的调节性双链 RNA (small modulatory RNA, smRNAs), 本文就其中的进展综述如下.

1 NRSE/RE1

NRSE 是最早在电压门控 II 型钠离子通道 (NaCh II) 和颈上神经节基因 10 (SCG10) 的 5' 非编码区发现的一个基因转录沉默子^[2], 是长度为 21~23 bp 的 DNA 反应元件. NRSE 序列在蟾蜍、小鼠、大鼠、鸡、羊和人之间具有高度的同源性.

至今已在多个基因的转录调控区域 (主要是启

动子区) 发现了 NRSE 序列, 这些基因的表达产物大部分与神经的发育及功能相关. 主要可分为以下几类: 离子通道, 如 NaCh II; 神经递质及其受体与合成酶类, 如烟碱型乙酰胆碱受体 β_2 亚单位、胆碱乙酰基转移酶; 神经营养因子及其受体, 如 BDNF; 突触囊泡蛋白, 如 synapsin I、SNAP25; 细胞黏附分子, 如 L1-CAM、Ng-CAM; 细胞骨架蛋白与细胞外基质, 如 SCG10、 β -tubulin III; 激素以及细胞内信号转导分子等^[3]. 其中很多基因仅特异地在神经元中表达, 对形成并维持神经元的表型、突触可塑性有着重要作用. 除了存在于神经元中表达的基因外, NRSE 也存在于一些非神经元表达的基因中. 最近 Bruce 等^[4]结合生物信息学和生物化学技术, 从人、小鼠和河豚基因组中分别鉴定出 1 892、1 894 和 554 个含 NRSE 序列的基因并在网上建立了一个数据库: RE1db database (<http://bioinformatics.leeds.ac.uk/group/online/RE1db/re1db-home.htm>). 该数据库根据所表达分子的功能将所有鉴定出的基因分成 10 个组别, 并列出了这些基因的具体序列及在染色体上的定位等一些详细信息.

*国家重点基础研究发展规划项目(973)(2003CB515302), 上海市科技发展基金资助项目(02JC14014).

** 通讯联系人.

Tel: 021-64453296, E-mail: neuron@shsmu.edu.cn

收稿日期: 2004-12-31, 接受日期: 2005-03-28

NRSE的功能主要是其作为沉默子介导了神经元特异性基因在非神经元细胞中的转录抑制作用,从而赋予了神经元的细胞特异性.如在早期发育的非神经元细胞中,NRSE作为沉默子抑制L1基因的表达.但在出生后发育阶段和成年的神经细胞,NRSE既能作为沉默子也能作为增强子调节L1基因的表达^[5].Bessis等^[6]也发现当NRSE位于TATA盒上游和下游50 bp以内时,会起到增强子的作用,而位于较远端时则具有抑制功能,说明该元件具有双重特性.

2 NRSF/REST

NRSF是一分子质量为116 ku的Cys₂/His₂型锌指蛋白,属于Gli-Kruppel样转录因子家族.最早是因为其能够与NRSE的DNA保守序列结合而被发现,并由此得名^[7].整个分子包含N端阻遏结构域RD-1、近N端锌指结构、DNA结合区域(含7个排列成簇的锌指结构)、赖氨酸富含区、脯氨酸富含区、C端阻遏结构域RD-2(含一个锌指结构)^[8,9].至今已经在人类、大鼠、小鼠、鸡、河豚及蟾蜍等物种中发现了NRSF的同源物,而在果蝇中未发现该分子,表明该分子可能最早是在约5亿年前伴随着脊椎动物的进化而出现的^[4].研究发现,NRSF存在不同的剪接体,其中REST4和REST5在成年大脑成熟的神经元中有低水平的表达,这两个剪接体是在第5个和第6个锌指结构间分别插入一段16个和28个核苷酸序列,形成只包括NRSF 9个锌指结构中前5个的一种截短的模式^[10].

NRSF的功能是维持正常胚胎发育所必需的.在胚胎8.5~9.5天之间,NRSF在发育的非神经元细胞和神经元前体细胞中广泛表达,但当神经元前体细胞开始向神经元分化以后,其表达明显下调,仅能在脑室区的神经元前体细胞中检测到低水平的NRSF mRNA及其蛋白质,在神经元中其表达则进一步下调^[11];在神经干细胞中转染重组转录因子REST-VP16能直接激活NRSF所抑制的目标基因,并有效诱导神经干细胞向神经元分化^[12];对NRSF基因敲除小鼠进行表型分析及在鸡胚中进行的有关NRSF异常表达的实验结果表明,干扰NRSF的表达或影响其功能可以引起细胞凋亡、异常分化或形态发育异常,甚至个体死亡^[13].这些实验表明,NRSF/REST在抑制神经元特异性基因在非神经元细胞中的表达,以及防止神经元前体细胞过早向神经元分化等过程中起着关键作用,NRSF表达的下

调是保证神经元正确分化的重要基础,也是神经元表型维持所必需的.

虽然NRSF在成熟神经元中的表达是下调的,但在成年中枢神经系统中仍然能够检测到其mRNA和蛋白质的表达,在海马及大脑皮层神经元中,其表达可以被谷氨酸的类似物红藻氨酸所诱导,提示NRSF的表达可能受到神经元活性的调节^[10,12].在PC12细胞中,蛋白激酶A诱导的剪接异构体REST4能够作为“抗沉默子”(antisilencer)与全长的NRSF竞争结合NRSE,从而逆转NRSF对两种与胆碱能递质传递有关的基因的抑制作用^[14].另外,在缺血性或癫痫损害时,NRSF的水平会显著增高^[10],亨廷顿舞蹈症基因的产物huntingtin能与NRSF蛋白直接作用,调节神经元特异性基因的转录^[15],NRSF还与肿瘤的生长密切相关^[16].这些研究表明,除了与胚胎早期发育有关外,NRSF在调节活性依赖的突触可塑性以及在一些神经系统疾病的病理生理过程中也起着重要作用.

3 NRSE与NRSF介导的神经元特异性基因表达调控机制

NRSF蛋白与NRSE dsDNA序列结合后可以通过两种独立途径来介导对神经元特异性基因的抑制^[17](图1).途径一,NRSF的N端阻遏结构域RD-1能与共阻遏蛋白Sin3A/B的PAH1和PAH2结构域结合,Sin3A/B随后通过形成共阻遏复合体将组蛋白脱乙酰基酶(HDAC)及相关蛋白SAP30、SAP18、RbAp46/48等招募到基因的启动子区,HDAC则通过对核小体组蛋白的赖氨酸残基进行去乙酰基化修饰,促使核小体紧密包裹,形成异染色质,阻止其他转录因子和II型RNA聚合酶(RNA P II)接近启动子,从而阻遏了转录过程,并因此维持基因沉默^[18,19].实验表明,HDAC活性抑制剂TSA能有效减弱非神经元细胞中NRSF对含NRSE序列基因的转录阻遏^[20].另一种HDAC活性抑制剂丙戊酸、2-丙基戊酸(VPA),能诱导大鼠海马神经前体细胞向神经元分化,同时抑制其向星形胶质细胞和少突胶质细胞分化^[21].途径二,NRSF的C端阻遏结构域RD-2能与共阻遏蛋白CoREST的SANT结构域结合,CoREST也能通过形成共阻遏复合体将HDAC及相关蛋白招募到基因的启动子区,或作为功能性“分子塔”(molecular beacon)招募MeCP2、SUV39H1和异染色质蛋白HP1等“沉默组件”(silencing machinery)来促进或维持

³H CpG 依赖的沉默状态^[22]. 最近发现: 虽然 TSA 能有效减弱 NaCh II 基因的转录阻遏, 却不能阻止 NRSF 对谷氨酸受体 GluR2 基因的转录阻遏^[23]; NRSF 的 C 端阻遏结构域还必须与 TATA 结合蛋白 (TBP) 作用才能正常发挥其阻遏活性^[24]; 与 HDAC 相比, CoREST 的招募可能与长时阻遏的维持有关^[22]. 这些都提示 NRSF/REST 的 C 端可能存在多种复杂的阻遏机制.

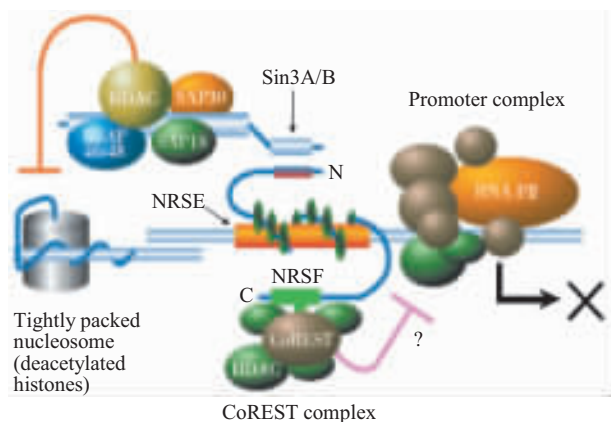


Fig.1 Dual mechanism of repression via The NRSF-NRSE interaction^[17]

图 1 NRSE-NRSF 作用介导的阻遏机制^[17]

NRSF 的 N 端与 Sin3A/B 结合, Sin3A/B 将 HDAC 及相关蛋白 SAP30、SAP18、RbAp46/48 招募到基因的启动子区, HDAC 随后对核小体组蛋白的赖氨酸残基去乙酰基化修饰, RNA P II 的活性受到抑制 (用 “x” 表示); NRSF 的 C 端与含 HDAC 的 CoREST 复合体结合, 通过不同于 N 端的可能更复杂的机制发挥阻遏作用 (用 “?” 表示).

非编码小 RNA 也能参与对神经元特异性基因的表达调控. NRSE dsRNA 是最近被发现的长度为 20 bp 左右, 在介导神经分化过程中起重要作用的小分子调节性 RNA(smRNAs)^[25]. 在成年哺乳动物脑组织, NRSE dsRNA 的表达严格限制在成年神经发生区之一的齿状回颗粒下层. 实验表明, NRSE dsRNA 不是作为小分子干扰 RNA (siRNAs) 或微小 RNA (miRNAs) 参与转录后水平的调控, 而是通过与蛋白质直接作用参与转录水平的调控. 神经发育的早期, NRSE dsRNA 通过调节 NRSE DNA 与 NRSF 蛋白的作用, 使干细胞中处于抑制状态的神经元特异性基因在早期神经元中呈激活状态, 但这种 NRSE dsRNA 依赖的激活机制并不是简单地通过 NRSE dsRNA 作为 “诱饵” (decoy) 俘获 NRSF, 将其拉离 NRSE, 从而使处于抑制状态的染色体释

放出来. 染色质免疫沉淀分析 (ChIP) 表明, 无论是在 “干细胞状态” 还是在 “分化状态”, NRSF 总是与 NRSE DNA 保持稳定的结合. 因此有两种可能的作用机制: NRSE dsRNA 直接与 NRSF 在 NRSE 上结合, 诱导沉默组件的组成发生变化 (organizational change), 启动转录激活 (图 2, 机制 A); NRSE dsRNA 与 NRSF 同型二聚体 (homodimer) 中一个单体结合, 另一单体则与 NRSE 保持结合状态, 从而诱导 NRSF 和 / 或相关蛋白在与 NRSE dsRNA 作用后构象发生改变 (conformation change) (图 2, 机制 B), 无论哪种情况, 与 NRSE dsRNA 作用之后, NRSF 都会失去对 HDAC 等阻遏蛋白的正常结合, 因而使一些处于阻遏状态的神经元特异性表达基因重新激活. 实验表明, NRSE dsRNA 对多潜能神经干细胞特异地向神经元分化是必要的也是充分的^[25].

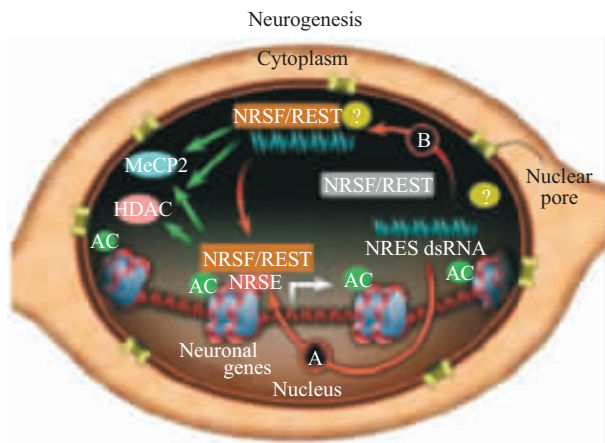


Fig.2 Schematic representation of activation events by NRSE dsRNA^[25]

图 2 NRSE dsRNA 激活事件示意图^[25]

机制 A: NRSE dsRNA 直接与 NRSF 在 NRSE 上结合, 诱导沉默组件的组成发生变化, 启动转录激活; 机制 B: NRSE dsRNA 与 NRSF 同型二聚体中一个单体结合, 另一单体则与 NRSE 保持结合状态, 诱导 NRSF 和 / 或相关蛋白构象发生改变, 启动转录激活.

4 结语与展望

基因的表达调控是一个多层次、多因子参与的复杂过程. 虽然人们对 NRSE 和 NRSF 的结构、功能以及它们在神经元特异性基因表达中的调控作用已经有了一定的了解, 但仍有许多问题等待我们去探索, 如: 在胚胎发育过程中 NRSF 的表达是动态变化的, 这种变化本身受哪些因素的调控? NRSF

的 N 端和 C 端阻遏作用是否具有平等的效率? 核内 smRNAs 产生的精确机制是什么? 相信随着研究的不断深入, 这些问题会逐步得到解答.

参 考 文 献

- Schoenherr C J. Silencing is golden: negative regulation in the control of neuronal gene transcription. *Curr Opin Neurobiol*, 1995, **5** (5): 5662~5671
- Mori N, Schoenherr C, Vandenbergh D J, *et al.* A common silencer element in the SCG10 and type II Na⁺ channel genes binds a factor present in nonneuronal cells but not in neuronal cells. *Neuron*, 1992, **9** (1): 45~54
- Schoenherr C J, Paquette A J, Anderson D J. Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (18): 9881~9886
- Bruce A W, Donaldson I J, Wood I C, *et al.* Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (28): 10458~10463
- Kallunki P, Edelman G M, Jones F S. The neural restrictive silencer element can act as both a repressor and enhancer of L1 cell adhesion molecule gene expression during postnatal development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (6): 3233~3238
- Bessis A, Champtiaux N, Chatelin L, *et al.* The neuron-restrictive silencer element: a dual enhancer/silencer crucial for patterned expression of a nicotinic receptor gene in brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (11): 5906~5911
- Chong J A, Tapia-Ramirez J, Kim S, *et al.* REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell*, 1995, **80** (6): 949~957
- Tapia-Ramirez J, Eggen B J, Peral-Rubio M J, *et al.* A single zinc finger motif in the silencing factor REST represses the neural-specific type II sodium channel promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (4): 1177~1182
- Thiel G, Lietz M, Cramer M. Biological activity and modular structure of RE1-silencing transcription factor (REST), a repressor of neuronal genes. *J Biol Chem*, 1998, **273** (41): 26891~26899
- Palm K, Belluardo N, Metsis M, *et al.* Neuronal expression of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR gene. *J Neurosci*, 1998, **18**(4): 1280~1296
- Schoenherr C J, Anderson D J. The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science*, 1995, **267** (5202): 1360~1363
- Su X, Kameoka S, Lentz S, *et al.* Activation of REST/NRSF target genes in neural stem cells is sufficient to cause neuronal differentiation. *Mol Cell Biol*, 2004, **24** (18): 8018~8025
- Chen Z F, Paquette A J, Anderson D J. NRSF/REST is required *in vivo* for repression of multiple neuronal target genes during embryogenesis. *Nat Genet*, 1998, **20** (2): 136~142
- Shimojo M, Paquette A J, Anderson D J, *et al.* Protein kinase A regulates cholinergic gene expression in PC12 cells: REST4 silences the silencing activity of neuron-restrictive silencer factor/REST. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (10): 6788~6795
- Zuccato C, Tartari M, Crotti A, *et al.* Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet*, 2003, **35** (1): 76~83
- Lawinger P, Venugopal R, Guo Z S, *et al.* The neuronal repressor REST/NRSF is an essential regulator in medulloblastoma cells. *Nat Med*, 2000, **6** (7): 826~831
- Roopra A, Huang Y F, Dingledine R. Neurological disease: listening to gene silencers. *Molecular Intervention*, 2001, **1** (4): 219~222
- Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 1997, **389** (6649): 349~352
- Taddei A, Roche D, Sibarita J B, *et al.* Duplication and maintenance of heterochromatin domains. *J Cell Biol*, 1999, **147**(6): 1153~1166
- Huang Y, Myers S J, Dingledine R. Transcriptional repression by REST: recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes. *Nat Neurosci*, 1999, **2** (10): 867~872
- Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, *et al.* Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(47): 16659~16664
- Lunyak V V, Burgess R, Prefontaine G G, *et al.* Corepressor-dependent silencing of chromosomal regions encoding neuronal genes. *Science*, 2002, **298** (5599): 1747~1752
- Naruse Y, Aoki T, Kojima T, *et al.* Neural restrictive silencer factor recruits mSin3 and histone deacetylase complex to repress neuron-specific target genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (24): 13691~13696
- Murai K, Naruse Y, Shaul Y, *et al.* Direct interaction of NRSF with TBP: chromatin reorganization and core promoter repression for neuron-specific gene transcription. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32** (10): 3180~3189
- Kuwabara T, Hsieh J, Nakashima K, *et al.* A small modulatory dsRNA specifies the fate of adult neural stem cells. *Cell*, 2004, **116** (6): 779~793

NRSE, NRSF and Their Modulatory Effects on The Expression of Neuronal-specific Genes*

WANG Xiao-Fei^{1,2)}, YU Pan-Pan¹⁾, LU Pei-Hua^{1)**}

¹⁾ *Department of Neurobiology, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China;*

²⁾ *Gene Diagnosis Laboratory, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China)*

Abstract Neuron-restrictive silencer element or repressor element-1 (NRSE/RE1), present in the transcriptional regulatory regions of multiple neuronal-specific genes, is a 21~23 bp conservative DNA sequence. Neuronal restricted silencing factor or RE1-silencing transcription factor (NRSF/REST) can bind to the NRSE, and then the gene repression was mediated in part through the association of its NH₂-terminal repression domain with the corepressor mSin3, resulting in the recruitment of histone deacetylase (HDAC) and consequent acetylation, and its COOH-terminal repression domain with the corepressor CoREST, that may serve as a platform protein for assembly of specialized repressor machinery. The recent study show that NRSE dsRNA can trigger gene expression of neuron-specific genes through interaction with protein NRSF at transcriptional level, rather than through siRNA or miRNA at posttranscriptional level.

Key words NRSE/RE1, NRSF/REST, neuronal specific genes, NRSE dsRNA

*This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (2003CB515302) and Shanghai Science Development Fund (02JC14014).

**Corresponding author . Tel: 86-21-64453296, E-mail: neuron@shsmu.edu.cn

Received: December 31, 2004 Accepted: March 28, 2005