

神经系统特异表达基因调控机理的研究进展

刘瑾* 袁建刚 强伯勤

(中国医学科学院基础医学研究所 国家人类基因组北方研究中心, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)
中国协和医科大学基础医学院

摘要 神经系统特异性基因正确的时空表达受细胞内外信号的调控, 信号传导途径最终的靶位点是能结合特异转录因子的 DNA 序列。目前发现的决定神经系统基因特异性表达的顺式作用元件既有增强子, 也有沉默子。它们可以特异性地增强基因在神经系统的表达, 或特异性抑制基因在非神经系统的表达。顺式元件要发挥这些作用, 依赖于与其结合的反式因子, 而这些反式因子又能与其他蛋白质或 DNA 序列发生互动, 通过协调作用, 共同决定基因的时空表达顺序。

关键词 神经系统特异性表达, 顺式元件, 反式因子

学科分类号 Q343

神经系统是人体中最复杂、最精细、功能最奇妙的系统。据推测, 人基因组约含十万个基因, 脑是基因表达最丰富的组织。现已发现许多脑疾患与基因的异常表达有关, 同时, 随着越来越多的国家进入老龄化社会, 脑的分化、发育和生理功能成为目前研究的一个热点。

神经系统的发育分化是细胞内外信号调控基因选择性表达的结果, 目前对这种调控的机制还知之甚少。其中涉及各种信号传导通路、调控蛋白、顺式元件和反式因子。所谓顺式元件, 指的是基因非编码区中一些短的 DNA 序列, 能与特异的蛋白质结合; 反式因子就是能与顺式元件特异结合的蛋白质。通过顺式元件与反式因子, 顺式元件与顺式元件, 及反式因子与反式因子之间的协同作用, 实现对基因的表达调控。目前, 已有一些神经系统特异表达的基因被克隆, 现将近 10 年的研究结果综述如下。

1 顺式元件

1.1 沉默子 (silencer)

越来越多的证据表明, 基因在神经系统的特异表达与负调控元件有关, 它能与相应的蛋白质形成复合物, 特异性抑制基因在非神经系统的表达。与大量不同种类的活化复合体一样, 存在不同的抑制复合体, 以不同的机制发挥作用。

目前已确定的、研究得最深入的沉默子是 NRSE (neuron restrictive silencer element), 又称 RE1 (restrictive element 1)。它最先是在研究 II 型钠离子通道和 SCG 10 基因时被发现的, 此后又在

突触蛋白、多巴胺羟化酶、神经粘附分子 L1 等基因中发现。

II 型钠离子通道 (Na II) 是钠离子通道家族的一个成员, 在成年大鼠中枢神经系统有高水平的表达。5' 删除后瞬时转染 PC12 细胞 (表达内源性 Na II 的神经样细胞) 和 L6 细胞 (骨骼肌细胞), 证实其上游 -1 kb 处一个 28 bp 的元件决定其神经系统特异性表达, 称为 RE1 (restrictive element 1)。电泳迁移率变动分析 (electrophoretic mobility shift analysis, EMSA) 中, 所有不表达内源性 Na II 的细胞核抽提物均能与 RE1 形成复合物, 包括成纤维细胞、骨骼肌细胞和某些神经细胞, 说明 RE1 与其结合蛋白的相互作用与基因的组织特异性表达有关。RE1 具有一般沉默子的特征, 能在正反两个方向及异源性启动子中起作用^[1]。SCG 10 编码一种神经元特异的生长相关蛋白, 其上游发现的一个负调控序列被称为 NRSE (neuron restrictive silencer element)。经比较发现, NRSE 与 RE1 实际上为同一元件^[2]。

1995 年, NRSE 的结合蛋白被克隆, 称 NRSEF (neuron restrictive silencer factor), 此后的研究围绕 NRSE 和 NRSEF 同时进行, 更进一步阐明了基因的调控机制。

m4 蕈毒乙酰胆碱受体 (m4 muscarinic acetylcholine receptor, m4AChR) 是 G 蛋白超家族的成员, 主要分布于中枢神经系统的端脑区和自主

* 通讯联系人。

Tel: 010-65296411, E-mail: lujin 1999@hotmail.com

收稿日期: 1999-11-17, 修回日期: 2000-01-29

神经节等部位. 已证实, 位于上游 - 570 bp 的 NRSE 可抑制该基因在非神经系统的表达. 它与其他神经元特异表达的基因不同, 如 SCG10、NaII、突触蛋白 I 等, 这些基因在神经系统中广泛表达, 而 m4AChR 只在某些类型的神经元中表达. 已知 NRSF 在分化成熟的神经元中不表达, 说明 m4AChR 在分化过程中必然还受到其他蛋白质的调控^[3]. EMSA 显示, m4AChR 基因上游的 SP1 位点在不同神经细胞系中形成不同的蛋白质复合物, 这是否与基因的特异表达有关还有待证明. 其后, Mieda 等用 NRSE 构建不同的异源性启动子, 与 NRSF 表达质粒共转染 NG108-15 细胞 (鼠成神经细胞 N18 与鼠神经胶质瘤细胞形成的杂交细胞), 发现 NRSE 抑制作用的高低与相连的启动子有关, 这与早先的一些研究结果类似, 说明它与其他因素存在相互作用.

以上研究中, NRSE 总是在上游非翻译区发挥作用. 1997 年, Kallunki 等^[4]对神经粘附分子 L1 的研究发现, NRSE 还能在内含子中发挥作用. L1 是神经细胞粘附分子 (N-CAM) 家族成员之一, 分布于减数分裂后的神经元细胞和外周神经系统的胶质细胞. NRSE 位于 L1 基因第二个内含子内, 体外实验证实了它在非神经细胞中的抑制作用. 转基因鼠实验也证实, NRSE 的缺失导致报告基因在某些非神经系统的高表达. 值得注意的是, 在神经嵴分化为周围神经系统和间质细胞之前, 缺失 NRSE 的报告基因要比携带 NRSE 的基因表达早; 在某些前体细胞中, 缺失 NRSE 的基因表达, 而携带 NRSE 的基因被抑制表达. 说明 NRSE 和 NRSF 很可能在神经细胞系的进一步分化过程中发挥重要作用. 进一步的研究发现^[5], 虽然 L1 在减数分裂后神经元的分化过程中开始出现, 它的大量表达则是在出生后的发育过程中, 这期间伴随着神经元的显著生长和突触的形成. 转基因鼠实验中, 带 NRSE 的报告基因以正确的空间分布模式表达, 缺失 NRSE 的基因则发生异位表达, 出现于几种非神经的组织, 如脑膜、皮肤的黑色素细胞、牙齿等. 意外的是, 它在部分神经结构中的表达水平和方式发生了变化, 如在成年小鼠的大脑皮层和纹状体, 基因的表达水平下降, 说明此时 NRSE 对 L1 的表达有增强作用; 而在丘脑中基因的表达水平上升, 说明此时 NRSE 对 L1 的表达起抑制作用. 由以上结果可见, NRSE 在神经系统中既可作为增强子又可作为沉默子, 与其发育阶段、细胞系来源和

所处的细胞基质有关, 突破了以往 NRSE 仅作为沉默子的看法.

1997 年, Bessis 等^[6]对 NRSE 的位置效应进行了研究. 体外实验中, NRSE 对于非神经细胞总是作为沉默子. 对于神经细胞, 当 NRSE 位于转录起始位点上游 50 bp 以外时对基因表达有抑制作用; 当 NRSE 位于 TATA box 下游或上游 50 bp 以内时, 能增强基因的转录. 过去的研究结果中, 神经细胞核抽提物无 NRSE 结合活性, Bessis 所进行的 EMSA 中, 神经细胞的核抽提物能在与成纤维细胞相同的位置形成复合物, 但信号要弱得多. 更精确的 RT-PCR 证实, 神经细胞中存在 NRSF 的 mRNA. 利用反义 RNA 和共转染 NRSF 表达质粒等实验, 证实 NRSF 在某些神经细胞中对带 NRSE 的基因有转录激活作用. 对 NRSE 双重性一种可能的解释是, NRSE 能与其他因子相互作用, 作用的结果有赖于它的位置和不同的细胞类型, 共同调控基因的表达.

目前, 已在 17 个神经系统特异表达的基因中发现有 NRSE 的共有序列 (约 30 bp), 这意味着 NRSE 可能是神经系统基因表达中一个起主要作用的元件.

除 NRSE 外, 另一个被证实的神经系统特异性沉默子是 SNOG 元件^[7]. GAP-43 (growth associated protein43) 是神经元轴突生长过程中表达的一种蛋白质, 瞬时转染和转基因动物实验表明, 负调控区 (约 30 bp) 位于远端启动子 TATA box 下游, 并具位置依赖性. EMSA 显示, 负调控区能与核抽提物形成至少两种复合体, 在神经细胞与非神经细胞中的含量有显著差异. 定点突变显示, 该区含两个可能的蛋白质结合位点, 检索 GenBank 数据库神经元特异性基因, 发现其中一个位点与另两个基因相应位置 (TATA 下游) 有同源性, 一个是鸡和小鼠的 *Snap 25*, 另一个是人的 *NOS*, 因此将该共有序列命名为 SNOG 元件. 三个启动子中的 SNOG 在 EMSA 中能竞争结合相同的蛋白质. 更大范围的检索发现, 另六个非神经系统基因 TATA 下游 60 bp 内也具 SNOG 元件, 对该元件在其中的作用还未进行研究. 由于 SNOG 元件位于 TATA 下游, 它的作用机制可能是与特异性抑制蛋白结合, 干扰了转录起始复合物的组装, 或阻止转录起始复合物转变为延伸复合物.

此外, 在其他神经系统特异表达的基因中也发现特异性的负调控序列. 如外周蛋白 (peripherin)

基因, 大鼠速激肽前体 (rat preprotachykinin, rPPT) 基因, 多巴胺羟化酶基因等。

1.2 增强子 (enhancer)

特异表达的基因除了可以通过沉默子抑制其在非神经系统的表达外, 还可通过增强子特异增强其在神经系统的表达, 而在非神经系统中不被激活。目前已有几个这样的例子。

酪氨酸羟化酶 (TH) 是催化儿茶酚胺生物合成的限速酶, 该途径能产生神经递质如多巴胺、去甲肾上腺素等, 其基因上游存在正调控序列, 包含 AP-1 位点和相邻的 E box。体内和体外实验证明, 任一位点的突变都将导致转录活性降低 65% ~ 95%。异源性启动子中, 两者同时存在能导致细胞特异性激活。说明, AP-1 位点和 E box 的协同作用决定 TH 基因的细胞特异性表达^[8]。

另一个例子是鼠的 *Ncx* 基因^[9], 是 *Hox* 11 基因家族的一个成员, 编码一类具保守的同源异形结构域的蛋白, 在胚胎发育过程中具有重要的作用。瞬时转染发现, 翻译起始位点上游 1 387 ~ 1 368 bp 的序列能特异性增强基因表达。EMSA 及突变实验证明, 该序列能与神经细胞核抽提物形成特异的复合物。由于未发现组织特异性的沉默子, 推测该序列的结合蛋白很可能就是决定它组织特异性的因子。值得注意的是, 其中一个不表达内源性 *Ncx* 的神经细胞系也能与该序列形成复合物, 提示不同来源的神经细胞存在特异的转录因子, 调控该基因的表达。对这些因子的发现和研究, 将有助于我们揭示 *Hox* 基因组织特异性表达的机制。比较人 *NCX* 和鼠的 *Ncx* 基因 5' 非编码区, 在增强子处具有高度的同源性。

1.3 元件的相互作用

事实上, 许多神经系统基因表达的精细调节不可能通过单一的增强子或沉默子来实现。通常在基因 5' 上游存在多个正、负调控元件, 一种更为合理的机制是: 正负元件的相互作用决定基因的细胞类型和发育阶段特异性表达。

2 反式因子

DNA 元件在同一生物不同组织的基因组中是相同的, 因此, 基因的组织特异性表达主要由不同组织中不同的转录因子家族决定。同一组织不同亚群的细胞中还可能存在特异的转录因子。由于转录因子的分离和鉴定比较困难, 目前发现的与神经系统特异表达有关 DNA 结合蛋白还很少。

1995 年两个独立的研究小组同时克隆到一个 NRSE 结合蛋白, 命名为 NRSF (neuron restrictive silencer factor)。它是一种多锌指蛋白, 在非神经系统及未分化的神经系统高水平表达, 而在分化后的神经元不表达^[10]。通过共转染实验及设计有功能缺陷的 NRSF, 证实它确实能与 NRSE 结合并抑制基因的表达。进一步研究发现, NRSF 与已知的 XBR (X2 box repressor) 为同一蛋白质, XBR 能抑制免疫系统特异的主要组织相容性复合体 II 基因在分化终末 B cell 系中的表达, 说明 NRSE 的抑制作用不仅限于神经系统^[11]。在成鼠脑中发现, NRSF 前体 mRNA 经过选择性剪接产生几个转录本, 它们编码的蛋白 DNA 结合特异性高低不同, 但在瞬时表达分析中均介导抑制作用。高水平表达目的基因的部位通常伴随着低水平的 NRSF, 但也有例外, 如海马回, 目的基因表达的同时有较高水平的 NRSF, 说明其他因子的作用对基因在不同神经细胞亚群的正确表达是必需的。

Akazawa 等^[12]以果蝇神经发育相关基因为线索, 克隆到大鼠的几个基因, 其编码蛋白命名为 HES-1, 2, 3, 4, 5。其中的 HES-5 与 bHLH 家族的成员有部分同源性, 在神经系统内特异性表达。DNase I 足迹法显示, HES-5 识别 CACNAG 序列, 称为 N box, 不同于其他 HLH 蛋白识别的 E box。将 HES-5 表达载体与携带 N box 的报告基因共转染培养细胞, 能显著抑制基因的表达。该研究小组同时克隆到的 HES-1、HES-3 也具 bHLH 结构域, 它们在神经系统发育的不同阶段特异性表达, 推测 HES 因子与神经的发育有关。

此外, 与神经系统基因特异表达有关的转录因子还有 E box 结合蛋白家族, 它们是一类具有 bHLH 结构域的转录调控因子, 经常参与细胞分化和组织特异性基因的表达。

综上所述, 决定基因在神经系统特异表达的顺式元件既可以是增强子, 也可以是沉默子, 它们可能单独起作用, 也可能存在多个元件的协调, 与转录因子相互作用, 精确调控基因的组织特异性、发育阶段特异性表达。而整个神经系统发育分化规律的阐明, 还有赖于对特异性转录因子、细胞信号传导途径及其相互联系的研究。

参 考 文 献

- 1 Kraner S D, Chong J A, Tsay H J, et al. Silencing the type II sodium channel gene: a model for neural-specific gene regulation.

- Neuron, 1992, **9** (1): 37~ 44
- 2 Mori N, Stein R, Sigmund O, *et al.* A cell type-preferred silencer element that controls the neural-specific expression of the *SCG10* gene. *Neuron*, 1990, **4** (4): 583~ 594
 - 3 Wood I C, Roopra A, Buckley N J. Neural specific expression of the m4 muscarinic acetylcholine receptor gene is mediated by a RE1/NRSE-type silencing element. *J Biol Chem*, 1996, **271** (24): 14221~ 14225
 - 4 Kallunki P, Edelman G M, Jones F S. Tissue specific expression of the L1 cell adhesion molecule is modulated by the neural restrictive silencer element. *J Cell Biol*, 1997, **138** (6): 1342~ 1354
 - 5 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
 - 6 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 the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (11): 5906~ 5911
 - 7 Weber J R M, Skere J H P. Identification of a novel repressive element that contributes to neuron-specific gene expression. *J Neurosci*, 1997, **17** (20): 7583~ 7593
 - 8 Yoon S O, Chikaraishi D M. Tissue specific transcription of the rat tyrosine hydroxylase gene requires synergy between an AP-1 motif and an overlapping E box-containing dyad. *Neuron*, 1992, **9** (1): 55~ 67
 - 9 Iitsuka Y, Shimizu H, Kang M M, *et al.* An enhancer element for expression of the *Ncx* (*Enx*, *Hox11L1*) gene in neural crest-derived cells. *J Biol Chem*, 1999, **274** (34): 24401~ 24407
 - 10 Chong J A, Ramirez J T, Kim S, *et al.* REST: A mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell*, 1995, **80** (6): 949~ 957
 - 11 Scholl T, Stevens M B, Mahanta S, *et al.* A zinc finger protein that represses transcription of the human MHC class II, *DPA*. *J Immunol*, 1996, **156** (4): 1448~ 1457
 - 12 Akazawa C, Sasai Y, Nakanishi S, *et al.* Molecular characterization of a rat negative regulator with a basic helix-loop-helix structure predominantly expressed in the developing nervous system. *J Biol Chem*, 1992, **267** (30): 21879~ 21885

Transcriptional Regulation of Neuronal-specific Gene Expression

LIU Jin^{*}, YUAN Jiar-Gang, QIANG Bo-Qin

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

Abstract The differentiating of neurons and other distinct cell types during embryonic development requires the selective activation or repressing of many different sets of genes. Gene expression patterns in neurons are modulated by multiple extracellular and intracellular stimuli. The transcriptional regulation of individual gene is mediated by small DNA sequences such as silencer and enhancer, and the expression pattern can be determined by the integration of the effects of a very large number of these *cis*-acting elements. These DNA elements either activate or repress promoter activity depending upon the nature of the transcription factors that bind to them. It is possible that there are different regulatory mechanisms of gene expression in the nerve system.

Key words neuronal-specific expression, *cis*-element, trans-factor

^{*} Corresponding author. Tel: 86-10-65296411, E-mail: lujin1999@hotmail.com

Received: November 17, 1999 Accepted: January 29, 2000