

*IKBKB*基因c.1183T>C点突变小鼠的建立及基本表型分析

冯茂璇^{1,2} 周丽娜^{1,2} 秦涛^{2,3} 赵晓东^{1,2} 贾彦军^{1,2*}

(¹重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所, 儿童感染免疫重庆市重点实验室, 重庆 400014;

²儿童发育疾病研究教育部重点实验室; 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心(重庆); 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014; ³重庆医科大学附属儿童医院感染科, 重庆 400014)

摘要 该研究主要为探究*IKBKB*基因c.1183T>C位点突变对人免疫器官淋巴细胞的影响。采用CRISPR/Cas9技术构建相应点突变模式小鼠, 并提取小鼠(C57BL/6J)基因组DNA进行PCR及一代测序、鉴定及扩繁, 使用密度梯度离心法提取小鼠脾脏及胸腺淋巴细胞, 采用Real-time PCR及Western blot检测淋巴细胞中IKKs家族各亚基(IKK α 、IKK β 和IKK γ) mRNA及蛋白的表达, 并使用分子运行模式(molecular operating environment, MOE)软件分析蛋白PDB结构及建立3D模型。小鼠基因测序结果表明成功构建点突变稳定基因型小鼠; 与野生型小鼠相比, 纯合突变小鼠*IKBKB* mRNA表达无明显变化, 而IKK β 蛋白表达明显降低; 蛋白结构分析结果提示, 突变后的IKK β 蛋白空间构型明显改变。研究初步表明, *IKBKB* Y397H突变导致小鼠脾脏及胸腺的淋巴细胞中IKK β 蛋白明显下降, 可能是由于突变导致蛋白结构发生改变而使其稳定性降低, 这为进一步探究该位点突变对免疫细胞稳态调节及其致病机制提供了新思路及实验基础。

关键词 CRISPR/Cas9; *IKBKB*基因; 小鼠模型; 蛋白预测; 淋巴细胞

The Establishment of *IKBKB* Gene c.1183T>C Point Mutation Mice and Analysis of Basic Phenotype

FENG Minxuan^{1,2}, ZHOU Lina^{1,2}, QIN Tao^{2,3}, ZHAO Xiaodong^{1,2}, JIA Yanjun^{1,2*}

(¹Pediatric Research Institute, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Child Infection and Immunity, Chongqing 400014, China; ²Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; National Clinical Research Center for Child Health and Disorder (Chongqing); China International Science and Technology Cooperation Base of Child development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing 400014, China;

³Department of Infection, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract To explore the effect of *IKBKB* gene c.1183T>C mutation on immune response, CRISPR/Cas9 gene-targeting strategy was used to introduce a corresponding mutation in the *IKBKB* gene in C57BL/6J mouse embryos. Genomic DNA was genotyped by PCR and confirmed by Sanger sequencing. Both splenic and thymic-lymphocytes were isolated by density centrifugation, and then the mRNA and protein expressions of members of IKKs family were detected by Real-time PCR and Western blot, respectively. The MOE (molecular operating environment) software was used to analyze the PDB structure of the protein and to establish the 3D model. Sanger se-

收稿日期: 2019-10-28 接受日期: 2020-02-17

国家自然科学基金(批准号: 81601753)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15223067060, E-mail: yanjunjia168@cqmu.edu.cn

Received: October 28, 2019

Accepted: February 17, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81601753)

*Corresponding author. Tel: +86-15223067060, E-mail: yanjunjia168@cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5202>

quencing results showed that the mutant mouse was accurately generated and normally propagated. In addition, the mRNA expression of *IKBKB* in splenic and thymic lymphocytes from mutant mice was comparable to that in wild type cells, whereas the expression of IKK β protein in abovementioned lymphocytes of the *IKBKB* Y397H mutant mice was obviously decreased. Furthermore, protein structure analysis showed that the conformational structure of mutant IKK β protein obviously changed. These results showed that the abundance of IKK β protein was reduced in mutant mice, which might be caused by the disruption and instability of spatial structure of mutant protein. This research provided a good model basis for further exploration of the site mutation to the steady state regulation in immune cells and its pathogenic mechanisms.

Keywords CRISPR/Cas9; *IKBKB* gene; mouse model; protein prediction; lymphocytes

*IKBKB*基因定位于人染色体8p11.2, 编码由754个氨基酸组成的IKK β (inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta)蛋白。IKK β 蛋白广泛表达于机体各组织。作为I κ B激酶复合物(I κ B kinase complexes, IKKs)的催化亚基, IKK β 参与NF- κ B(nuclear factor κ B)经典通路激活过程。细胞处于静息或未刺激状态时, I κ B α (inhibitors of κ B- α)与IKK β 紧密结合, 阻留NF- κ B核转录因子定位于细胞质, 使NF- κ B无法启动下游基因转录^[1-2]。而当细胞受到刺激信号(如脂多糖等)被活化时, 多种受体信号通路通过相应的激酶活化IKK β , 进而催化I κ B α 蛋白磷酸化。磷酸化I κ B α 失去稳定性而被泛素化蛋白酶体降解, 并与NF- κ B解离, 最终使得游离的NF- κ B进入细胞核, 与其相关的DNA反应元件结合以诱导靶基因的转录与翻译, 参与免疫细胞发育、分化和功能行使^[3-7]。

我们前期通过全外显子测序筛检确诊一例因*IKBKB*基因纯合错义突变而引起的重症联合免疫缺陷疾病(severe combined immunodeficiency diseases, SCID)患者, 该患儿为新发突变(*IKBKB* c.1183T>C, p.Y395H), 突变方式与之前报道的移码、缺失等重型突变不同, 为磷酸化位点的点突变。该患儿自幼发生呼吸道、消化道反复感染, 腹泻尤为突出, 生长发育明显落后。经免疫筛查发现外周血T、B淋巴细胞数量正常, 但记忆B细胞数量明显下降, 免疫球蛋白降低, 这与传统*IKBKB*突变引起的疾病特征相一致^[8]。但其临床表现与以往报道的*IKBKB*突变患儿相比较, 存活时间较长, 且病情相对较轻, Treg细胞缺如。因此, 为探究该突变位点对疾病可能的影响及致病机制, 本研究拟通过CRISPR/Cas9技术, 构建此患儿同源突变位点(c.1183T>C, p.Y395H)模型小鼠, 采用基因测序验证模型并对突变蛋白进行建模,

初步明确Y397H突变对*IKBKB*基因及其编码蛋白的表达变化及可能的原因, 为*IKBKB*基因Y397H突变的致病机制提供研究模型和实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料及仪器

2 $\times$ Taq PCR MasterMix购自天根生化科技(北京)有限公司; PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; RNA提取试剂盒购自Qiagen公司; Real-time PCR所需逆转录试剂盒及蛋白酶K购自Roche公司; 胎牛血清购自Gibco公司; Hank's平衡盐溶液(Hank's balanced salt solution, HBSS)、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂购自Sigma公司; SDS-PAGE制胶盒、蛋白裂解液RIPA和BCA蛋白浓度测定盒均购自上海碧云天生物科技有限公司; 兔抗小鼠IKK α 单克隆抗体(mAb)、IKK β mAb和IKK γ mAb购自Abcam公司; 兔抗小鼠 β -actin mAb和辣根过氧化物酶HRP偶联羊抗兔IgG二抗均购自CST公司; PCR仪购自Bio-Rad公司; FACS Canto II流式细胞仪购自美国BD公司; CD4(PE-Cy7)、CD25(BV421)和FoxP3(PE-Cy5)流式抗体均为兔抗小鼠mAb, 购自Biolegend公司; 细胞FoxP3固定打孔剂试剂盒购自eBioscience公司; 其余常用化学试剂购自Sigma及重庆川东化工有限公司。

1.2 实验动物

SPF级4~8周龄C57BL/6J小鼠由上海南方模式生物研究中心提供。小鼠饲养在恒温(21~22 $^{\circ}$ C)具备空气过滤的SPF级动物房内, 12 h光暗循环, 每日小鼠自由进食标准鼠粮及饮水。本文的动物实验方案获得上海南方模式生物研究中心实验动物使用与看护委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)批准, 批准号为20150003。

1.3 gRNA重组质粒设计

根据 Genbank 数据库小鼠 *IKBKB* 基因序列 (MGI:1338071), 与人 *IKBKB* 基因序列进行比对, 找到同源突变位点。将待编辑序列利用 <http://crispr.mit.edu> 在线分析, 设计大小为 20 bp 的 gRNA 靶向序列 (图1), 送交上海南方模式生物科技股份有限公司设计其上下游引物进行重组质粒构建。

1.4 gRNA、Cas9体外转录及纯化

上海南方模式生物科技股份有限公司自行购置体外转录试剂盒对 gRNA 进行转录、纯化。同时以 *Cas9* DNA 为模板, 通过 PCR 反应克隆 *Cas9* 基因, PCR 产物纯化后进行体外转录, 转录方法按试剂盒说明书进行。RNA 转录产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后 -80 °C 保存备用。

1.5 显微注射及杂交繁殖小鼠

委托上海南方模式生物科技股份有限公司将 *Cas9* mRNA、gRNA 和 donor DNA 显微注射至 C57BL/6J 小鼠受精卵, 经 PCR 产物测序确认获得目的基因点突变的 F0 代小鼠。利用 F0 代小鼠与 C57BL/6J 小鼠交配获得阳性 F1 代小鼠。F1 代小鼠之间进行杂交, 获得 F2 代, 对其进行鉴定, 以获得野生型 (wild type, WT)、杂合 (heterozygous, HE) 和纯合 (homozygous, HO) 突变小鼠。对鉴定成功的小鼠进行回交或杂交, 至少 4 代, 对于每代每只小鼠均进行测序验证, 以确定模型稳定。

1.6 小鼠基因型鉴定

剪取出生 2~3 周小鼠尾巴约 3 mm, 加入 500 μ L 裂解液 (含 10% SDS、1 mol/L Tris、0.5 mol/L EDTA 和 5 mol/L NaCl) 及 20 μ L 蛋白酶 K (10 mg/mL), 55 °C 消化过夜, 13 000 r/s 室温离心 15 min 后取上清, 加入等体积预冷的异丙醇室温静置 5~10 min, 13 000 r/s 室温离心 15 min 后弃上清, 用 400 μ L 75% 乙醇洗涤,

待乙醇挥发之后溶解于 80 μ L 纯水中, 55 °C 干浴 2 h, 即可得到基因组 DNA。取 100 ng DNA 进行 PCR 扩增。上下游引物分别如下。正向引物 F: 5'-GGT GTC TGC CCC AAG GTG-3', 反向引物 R: 5'-GGC TGG TCT CGA ACA TCC TA-3'。PCR 反应条件: 94 °C 1 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环; 72 °C 再延伸 10 min, 得到 PCR 扩增产物。对 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 并送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行一代测序, 并采用正向引物测序。

1.7 小鼠胸腺及脾脏淋巴细胞提取

将小鼠脱颈处死后, 取小鼠脾脏组织在钼上轻柔研磨, 用适量 HBSS 冲洗并过滤, 将所得的脾脏细胞轻柔地加入到 37 °C 预热的鼠 *Ficoll* 上层, 在室温下进行密度梯度离心 (800 $\times g$ 、20 min, 增减速均为 3 $\times g/s$), 后吸取中间白色悬浮层于含 5 mL PBS 的离心管中, 2 500 r/min 离心 5 min 后底部沉淀即为脾脏淋巴细胞。胸腺则只需通过上述方法研磨、冲洗并过滤后 2 500 r/min 离心 5 min, 去上清, 经 PBS 垂直悬即可得胸腺细胞。

1.8 Real-time PCR检测IKKs家族各亚基mRNA表达

从已获得的脾脏、胸腺淋巴细胞中提总 RNA, 提取方法参照试剂盒说明书。逆转录后通过 Real-time PCR 对 IKKs 家族 mRNA 表达进行检测, *β -actin* 编码基因作为内参。以 WT 组小鼠基因表达为对照, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算靶基因的相对表达。目的基因引物分别如下。*IKBKA* 正向: 5'-GGA GAA GTT CGG TTT AGT AGC C-3', 反向: 5'-TTT ATT CCT GTT TCA CGC TCA-3'; Pre-*IKBKB* 正向: 5'-GTG ACA TCG CAT CGG CTC TTA-3', 反向: 5'-TGC ACA GGC TGC CAG TTA GG-3'; Late-*IKBKB* 正向: 5'-CAG CTA ATG TCC CAG CCT TCC-3', 反向: 5'-TGT CTT GCT CCT

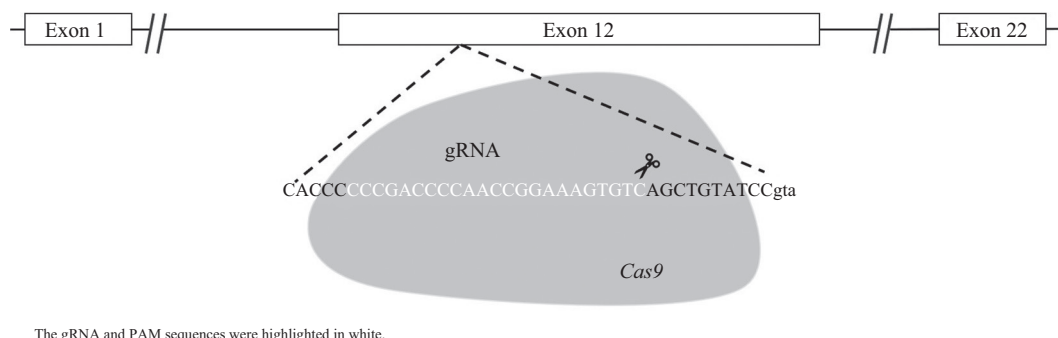


图1 gRNA序列设计

Fig.1 gRNA sequences design

TCA CAG TGT CC-3'; *IKBKG*正向: 5'-TTC CAA GAC TAC GAC AGC CAC A-3', 反向: 5'-GCC GCT TCC TCA TAT CCT CAA T-3'; β -actin正向: 5'-GAA ATC GTG CGT GAC ATC AAA GA-3', 反向: 5'-CCC AAG AAG GAA GGC TGG AAA A-3'。扩增条件均为: 94°C 1 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s, 40个循环; 72°C 10 min。

1.9 Western blot检测IKKs家族各亚基蛋白表达

取 4×10^6 个细胞于120 μ L含有1% PMSF的RIPA中, 冰上裂解20 min, 4 °C、12 000 r/min离心20 min后获得总蛋白, 经BCA法测定蛋白浓度。变性后的蛋白经SDS-PAGE电泳, 湿转法转膜至PVDF膜, 用5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 之后与兔抗小鼠IKK α mAb(1:1 000)、兔抗小鼠IKK β mAb(1:1 000)、兔抗小鼠IKK γ mAb(1:1 000)及HRP偶联兔抗小鼠 β -actin mAb(1:2 000)抗体于4 °C过夜孵育, 经TBST洗涤3次, 每次10 min后, 与羊抗兔HRP-IgG室温孵育1 h, 之后经TBST洗涤3次, 每次10 min后, 配置ECL显色液, 采用LI-COR成像仪进行显影, 利用Quantity One软件分析各条带灰度值, 并与WT的灰度值相比较, 进行统计分析。

1.10 PDB数据库蛋白结构分析

以人IKK β 蛋白[PDB(protein data bank)代码: 4KIK]的PDB结构数据^[9]为模版, 利用MOE(molecular operating environment, 加拿大蒙特利尔化学化工集团公司, www.chemcomp.com)软件对小鼠Y397H突变体结构进行同源建模, 并使用PyMOL 2.2绘制结构模型图。

1.11 流式细胞术检测小鼠脾脏Treg细胞

取 2×10^6 个脾脏淋巴细胞于干燥洁净流式管中, 加入兔抗小鼠PE-Cy7 CD4 mAb(1:200)、BV421 CD25 mAb(1:100), 4 °C避光染色30 min; 采用预冷PBS洗涤2次后, 400 μ L固定剂4 °C避光固定30 min; 预冷PBS洗涤2次, 800 μ L打孔剂室温避光孵育20 min、4 000 r/min离心3 min、弃上清, 加入兔抗小鼠PE-CY5 FoxP3 mAb(1:50), 室温避光孵育40 min, 打孔剂、PBS依次洗涤细胞, 加入200 μ L PBS重悬细胞, 利用FACS Canto II流式细胞仪进行检测。检测结果利用FlowJo软件进行分析。

1.12 统计学分析

所有计量资料均表示为平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)。数据的统计使用SPSS 22统计软件包, 多组间比较采

用ANOVA分析, 两组间比较采用Dunnett-*t*检验, 以 $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 gRNA及Cas9体外转录

以pX330重组质粒为模板, 根据目的gRNA序列设计特异上下游引物进行扩增反应, 得到与理论值大小相符的约为120 bp的PCR产物; 通过已设计的Cas9引物进行PCR扩增, 得到大小约为2 200 bp的PCR产物, 与理论值相符, 并经测序后比对证实。上述两种PCR产物纯化后在T7启动子介导下进行体外转录反应, 转录产物经紫外分光光度计检测, $D_{260/280} > 1.9$, $D_{260/230} > 2.0$, 提示RNA纯度高。其转录产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定如图2所示。

2.2 成功获得稳定IKBKB c.1183T>C纯合点突变小鼠

F2代小鼠经繁育至少4代, 即F6代, 提取3~4周龄小鼠基因组DNA, 经PCR扩增后, 对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。利用琼脂糖凝胶成像仪进行显像, 在700 bp位置可见一条单一明亮的电泳条带(图3A), 与扩增靶基因产物大小(696 bp)相一致。由于此点突变不能改变目的基因IKBKB大小, 不能通过电泳进行基因型鉴定。因此, 将PCR产物进行测序, 利用测序结果分析小鼠基因类型。Sanger测序结果显示, WT小鼠1183位点为T/T, HE小鼠为T/C杂合, HO小鼠为C/C纯合突变(图3B)。

2.3 IKBKB c.1183T>C点突变对其mRNA表达无明显影响

对F6代WT、HE及HO小鼠脾脏和胸腺淋巴细胞IKKs家族IKK α 、IKK β 和IKK γ 亚基的编码基因mRNA表达进行检测, 结果显示与WT小鼠相比, IKBKA(编码IKK α 蛋白)和IKBKG(编码IKK γ 蛋白)mRNA在各种基因型小鼠脾脏、胸腺淋巴细胞中表达无明显差异(图4A和图4B)。另外, 针对IKBKB编码基因5'端和3'端mRNA序列, 设计特异的2对引物序列, 对其mRNA表达进行检测。结果显示, 无论是利用5'端还是3'端引物进行扩增, 与WT相比, HE和HO小鼠IKBKB mRNA表达无明显差异, 这说明, 此突变对IKBKB基因转录无明显影响(图4C和图4D)。

2.4 IKBKB c.1183T>C点突变小鼠IKK β 蛋白表达明显降低

对各基因类型小鼠脾脏和胸腺淋巴细胞IKK β

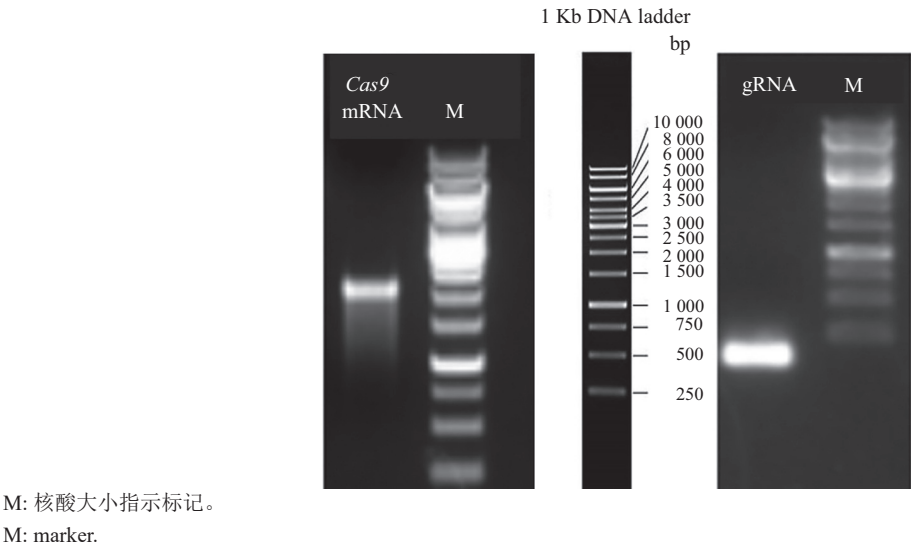
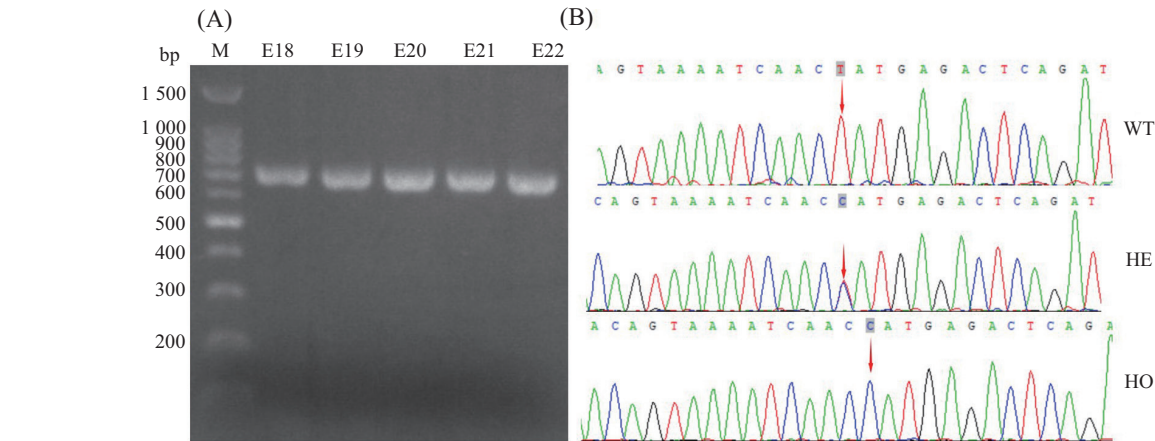


图2 琼脂糖凝胶电泳鉴定*Cas9*及*gRNA*转录产物
Fig.2 Identification of *Cas9* and *gRNA* transcripts by agarose gel electrophoresis



A: 基因组DNA PCR产物琼脂糖凝胶电泳条带; B: Sanger测序结果。M: 核酸大小指示标记; WT: 野生型; HE: 杂合型; HO: 纯合型。红色箭头示突变碱基位点。E18~E22为5同代5只小鼠。
A: agarose gel electrophoresis for PCR product of genomic DNA; B: results of Sanger sequencing. M: marker; WT: wild type; HE: heterozygous; HO: homozygous. The red arrows show the mutated base site. E18-E22 represent the repeat for 5 same generation mice.

图3 F6代突变小鼠*IKBKB*基因的基因型鉴定结果
Fig.3 Identification of *IKBKB* gene genotype in F6 generation mutant mice

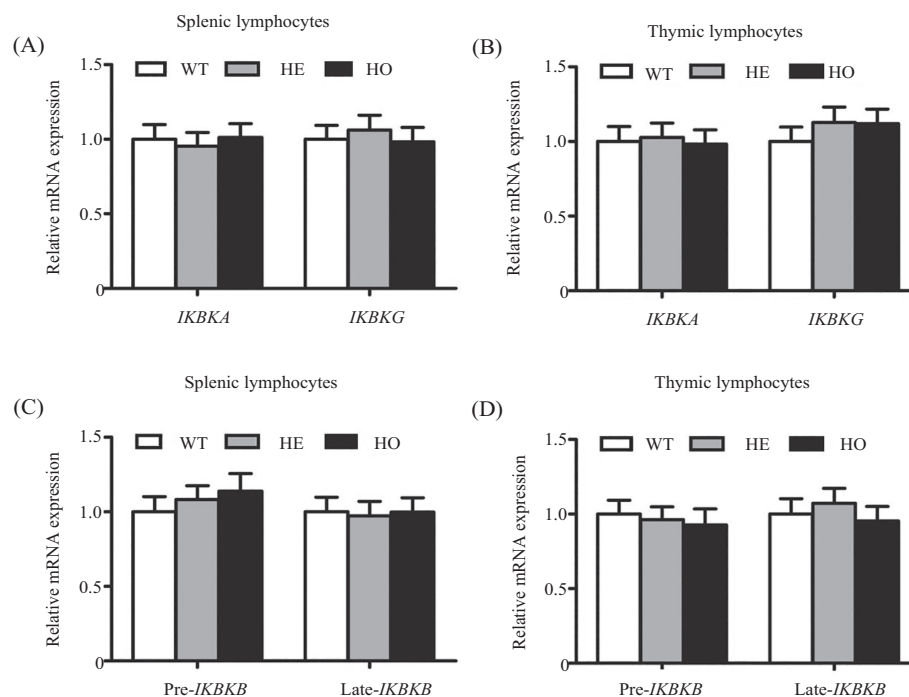
蛋白表达进行检测, 结果显示与WT小鼠相比, HE和HO组小鼠胸腺和脾脏淋巴细胞IKK β 蛋白表达显著降低($P<0.05$, 图5)。对IKKs家族其他成员进行分析, 结果显示, 各组间IKK α 及IKK γ 蛋白均无统计学差异($P>0.05$, 图5)。

2.5 PDB蛋白数据库分析提示IKK β 蛋白结构发生变化

通过MOE软件对野生型及突变型IKK β 蛋白的PDB数据进行分析, 发现在野生型IKK β 蛋白结构图中, Y397的结构其主体为苯环, 其侧枝连接的羟基与第391位的天冬氨酸侧链上的氨基形成氢键, 而在

H397突变的结构中, 由于其主体并非苯环, 且相应的侧链上并未连接有羟基, 无法与391位的天冬氨酸侧链的氨基形成氢键(图6A和图6B中箭头标记所示)。因此突变IKK β 蛋白该区域分子间作用力发生变化, 空间构象也发生了改变, 蛋白内部结构疏松(图6C和图6D)。

2.6 点突变小鼠脾脏淋巴细胞中Treg比例明显下降
利用流式细胞术对小鼠脾脏Treg(regulatory T cell, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺)进行检测, 结果发现与WT相比, *IKBKB*突变型小鼠该细胞亚群比例降低(图7A和图7B), $P<0.01$, 差异具有统计学意义。

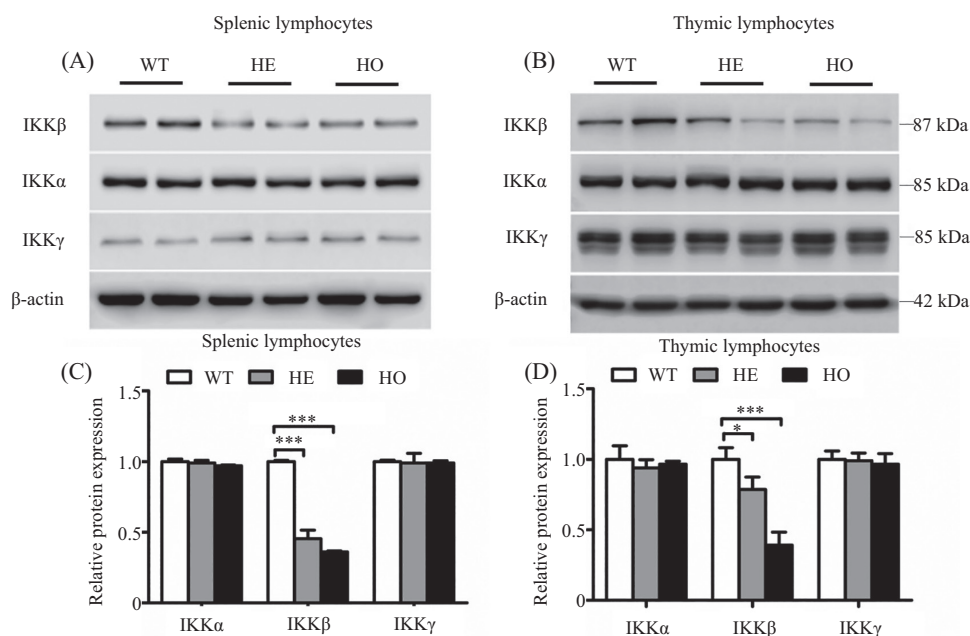


A、B: WT、HE及HO小鼠脾脏和胸腺淋巴细胞中IKKα和IKKβ mRNA的表达; C、D: WT、HE及HO小鼠脾脏和胸腺淋巴细胞中Pre-IKKβ和Late-IKKβ mRNA表达。WT: 野生型; HE: 杂合型; HO: 纯合型; Pre-IKKβ: IKKβ突变点5'端mRNA; Late-IKKβ: IKKβ突变点3'端mRNA。

A,B: expressions of IKKα and IKKβ mRNA in splenic and thymic lymphocytes from WT, HE and HO mice; C,D: expressions of Pre-IKKβ and Late-IKKβ mRNA in splenic and thymic lymphocyte from WT, HE and HO mice. T: wild type; HE: heterozygous; HO: homozygous; Pre-IKKβ: mRNA at the 5' terminal of the IKKβ mutation site; Late-IKKβ: mRNA at the 3' terminal of the IKKβ mutation site.

图4 IKKs家族各亚基mRNA在小鼠脾脏及胸腺淋巴细胞中表达

Fig.4 Expressions of IKKs mRNA in splenic and thymic lymphocytes from mice

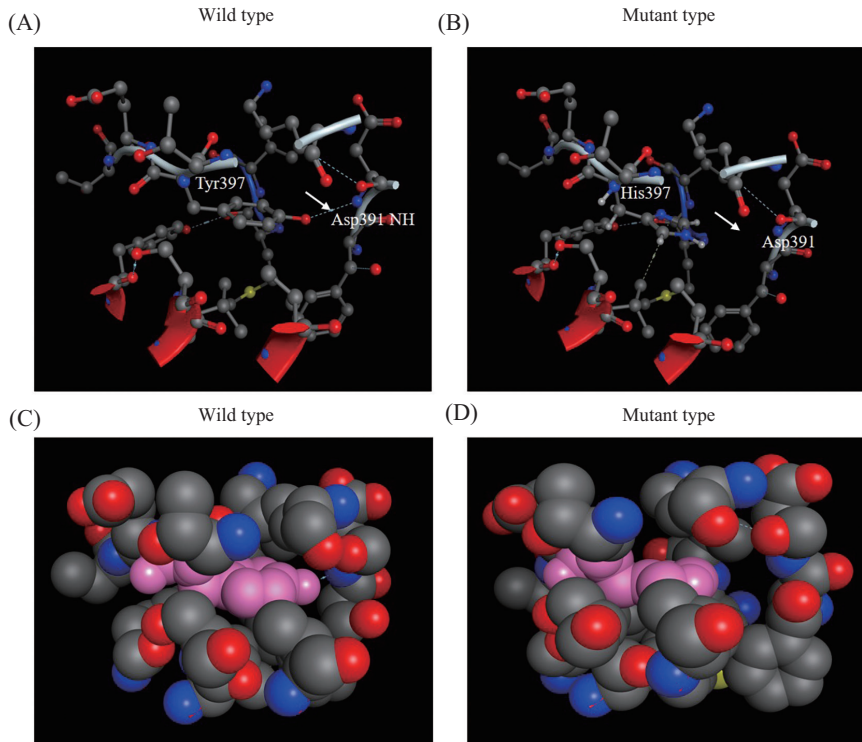


A、B: WT、HE及HO小鼠IKKs家族蛋白在脾脏和胸腺淋巴细胞中的表达; C、D: WT、HE及HO小鼠IKKs家族蛋白在脾脏和胸腺淋巴细胞中表达的统计学分析。WT: 野生型; HE: 杂合型; HO: 纯合型。* $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

A,B: expressions of IKKs family proteins in splenic and thymic lymphocyte from WT, HE and HO mice; C,D: statistical analysis of IKKs proteins expression in splenic and thymic lymphocyte from WT, HE and HO mice. WT: wild type; HE: heterozygous; HO: homozygous. * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

图5 小鼠脾脏和胸腺淋巴细胞中IKKs各亚基蛋白表达

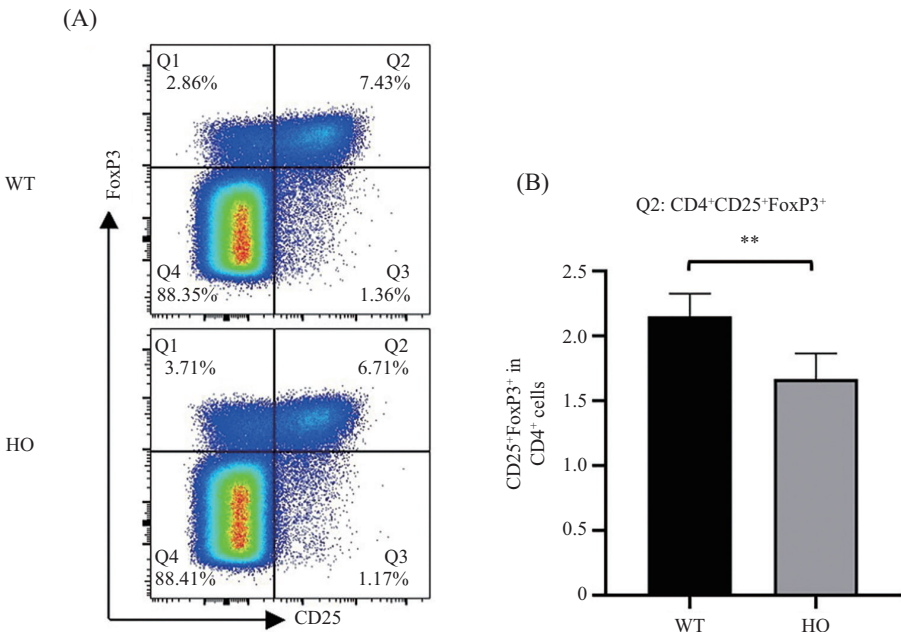
Fig.5 Abundance of IKKs protein in splenic and thymic lymphocytes from mice



A: 野生型IKK β 蛋白的三维结构分子间作用力; B: 突变型IKK β 蛋白的三维结构分子间作用力; C: 野生型IKK β 蛋白空间结构示意图; D: 突变型IKK β 蛋白空间结构示意图。白色箭头所示为氢键。
A: three-dimensional structure intermolecular force of wild type IKK β protein; B: three-dimensional structure intermolecular force of mutant type IKK β protein; C: schematic diagram of the spatial structure of wild type IKK β protein; D: schematic diagram of the spatial structure of mutant type IKK β protein. The white arrow shows the hydrogen bond.

图6 野生型与突变型IKK β 蛋白三维结构分析

Fig.6 Three-dimensional structure analysis of wild type and mutant type IKK β protein



A: WT及HO小鼠脾脏CD4⁺ T中Treg细胞染色; B: WT及HO小鼠脾脏CD4⁺ T细胞中Treg细胞比例。WT: 野生型; HO: 纯合型。 ** $P<0.01$.
A: expression of Treg in splenic CD4⁺ T cells from WT and HO mice; B: percentage of Treg in splenic CD4⁺ T cells from WT and HO mice. WT: wild type; HO: homozygous. ** $P<0.01$.

图7 野生型与突变型小鼠脾脏淋巴细胞中Treg细胞比例

Fig.7 Proportion of Treg in splenic lymphocytes from wild and mutant mice

3 讨论

*IKBKB*基因病理性突变或缺陷会引起一种免疫表型特殊的重症联合原发性免疫缺陷病^[8]。*IKBKB*缺陷病自2013年首次报道以来,截至目前,全球范围共报道15例患儿,均为常染色体隐性遗传,表现为无义突变及移码突变。该疾病主要表现为自新生儿期出现的较为严重的呼吸道、消化道反复感染。与传统的SCID不同的是,该疾病患儿外周血淋巴细胞数量正常,而血清免疫球蛋白水平降低。该病属于罕见病,发病率极低,但病情重、死亡率高,即使经过造血干细胞移植治疗,预后仍不理想^[8,10-13]。

我们前期诊治1例未曾报道的IKK β 第395氨基酸位点纯合错义突变(c.1183T>C,p.Y395H)所致的SCID男性患儿,其临床表现与文献报道高度相似,但与此同时,与以往报道的*IKBKB*突变患儿之间的差异在于存活时间较长(内科丙球支持对症治疗可存活至17岁,现移植后生存尚可),且病情相对较轻,Treg细胞缺如是其突出的免疫学表型。我们最初怀疑是否系该突变并未导致蛋白质的减少或缺失,但使用患儿PBMC进行Western blot验证后发现其IKK β 蛋白几乎是消失的(未发表),表明该突变确实意义重大。为进一步阐释致病机制,我们构建了同源位点突变小鼠模型,并通过Sanger测序证实构建成功。随后我们通过Real-time PCR检测了IKK β 突变前后端及其家族其他成员的mRNA表达量,发现该位点并不影响其转录水平。之后,我们通过Western blot确认突变体IKK β 蛋白明显减少。为了解突变体IKK β 蛋白降低机制,我们对其蛋白结构解析,发现突变体蛋白内部结构较疏松,因此我们推测可能是由于其稳定性降低导致蛋白减少。与此同时,利用流式细胞术对小鼠脾脏淋巴细胞Treg(CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺)进行检测,我们发现,*IKBKB*突变体小鼠Treg细胞亚群比例明显降低,这与患儿的免疫学表型相一致,进一步表明该突变与疾病表型联系密切。

据报道,IKK β 蛋白有多个泛素化修饰位点,如Lys147、Lys418、Lys555和Lys703^[1],并且在GRP78(glucose regulated protein 78)过度表达时可激活自噬信号通路,诱导IKK β 蛋白自噬降解^[14],亦可通过p65-dependent途径将IKK β 蛋白转运至自噬体进行降解,导致NF- κ B信号通路失活^[15]。但关于IKK β 蛋白Y395H的突变引起的蛋白磷酸化改变与蛋白降解

途径的研究尚未见报道。而我们通过PDB数据进行建模后分析,推测Y395H突变引起的蛋白质立体结构和局部极性改变亦有可能引起IKK β 稳定性下降,易泛素化而被蛋白酶体降解,最终引起表达量下降,进而影响部分细胞如Treg细胞等的分化、发育等功能,但具体调控机制需要进一步实验证实。

综上所述,本研究利用CRISPR/Cas9技术,以*IKBKB* c.1183T>C突变位点为模板成功构建了小鼠同源突变模型,符合孟德尔遗传定律,可正常繁殖,并证实了在该模型中IKK β 蛋白表达减少。由于IKK β (*IKBKB*)全敲除会导致小鼠肝脏产生不可逆性损伤引起胚胎致死^[16],但是目前IKK β 蛋白在免疫调节中的机制尚不完全清楚。该模型的建立,为后续功能学研究及IKK β 蛋白在免疫调节中的作用机制提供了良好的动物模型和研究基础。

参考文献 (References)

- [1] GALLO L H, MEYER A N, MOTAMEDCHABOKI K, et al. Novel Lys63-linked ubiquitination of IKK β induces STAT3 signaling [J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(24): 3964-76.
- [2] KAI X, CHELLAPPA V, DONADO C, et al. I κ B kinase β (*IKBKB*) mutations in lymphomas that constitutively activate canonical nuclear factor κ B (NF κ B) signaling [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(39): 26960-72.
- [3] ADAMSON A, BODDINGTON C, DOWNTON P, et al. Signal transduction controls heterogeneous NF- κ B dynamics and target gene expression through cytokine-specific refractory states [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12057.
- [4] OH H, GRINBERG-BLEYER Y, LIAO W, et al. An NF- κ B transcription-factor-dependent lineage-specific transcriptional program promotes regulatory T cell identity and function [J]. *Immunity*, 2017, 47(3): 450-65, e5.
- [5] ZHANG Q, LENARDO M J, BALTIMORE D. 30 years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology [J]. *Cell*, 2017, 168(1/2): 37-57.
- [6] MIRAGHAZADEH B, COOK M C. Nuclear factor-kappaB in autoimmunity: man and mouse [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 613.
- [7] ZHAO M, JOY J, ZHOU W, et al. Transcriptional outcomes and kinetic patterning of gene expression in response to NF- κ B activation [J]. *PLoS Biol*, 2018, 16(9): e2006347.
- [8] PANNICKE U, BAUMANN B, FUCHS S, et al. Deficiency of innate and acquired immunity caused by an *IKBKB* mutation [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(26): 2504-14.
- [9] LIU S, MISQUITTA Y R, OLLAND A, et al. Crystal structure of a human I κ B kinase β asymmetric dimer [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(31): 22758-67.
- [10] MOUSALLEM T, YANG J, URBAN T J, et al. A nonsense mutation in *IKBKB* causes combined immunodeficiency [J]. *Blood*, 2014, 124(13): 2046-50.
- [11] NIELSEN C, JAKOBSEN M A, LARSEN M J, et al. Immunodeficiency associated with a nonsense mutation of *IKBKB* [J]. *J*

- Clin Immunol, 2014, 34(8): 916-21.
- [12] BURNS S O, PLAGNOL V, GUTIERREZ B M, et al. Immuno-deficiency and disseminated mycobacterial infection associated with homozygous nonsense mutation of IKK β [J]. J Allergy Clin Immunol, 2014, 134(1): 215-8.
- [13] CUVELIER G, RUBIN T S, JUNKER A, et al. Clinical presentation, immunologic features, and hematopoietic stem cell transplant outcomes for IKKB immune deficiency [J]. Clin Immunol, 2019, 205: 138-47.
- [14] LI Z, WANG Y, NEWTON I P, et al. GRP78 is implicated in the modulation of tumor aerobic glycolysis by promoting autophagic degradation of IKK β [J]. Cell Signal, 2015, 27(6): 1237-45.
- [15] LIU K, ZHANG L, ZHAO Q, et al. SKP2 attenuates NF- κ B signaling by mediating IKK β degradation through autophagy [J]. J Mol Cell Biol, 2018, 10(3): 205-15.
- [16] TANAKA M, FUENTES M E, YAMAGUCHI K, et al. Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-kappa B activation in IKK-beta-deficient mice [J]. Immunity, 1999, 10(4): 421-9.