

突触黏附分子编码基因NRXN2 α 启动子的功能分析

周家红[#] 郭印[#] 孟莎莎 周卫辉^{*}

(重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室,

认知发育与学习记忆障碍转化医学重庆市重点实验室,

国家儿童健康与疾病临床医学研究中心, 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 重庆 400014)

摘要 Neurexins是突触前膜细胞黏附分子, 参与神经元和脑回路的跨突触信号传递, 其基因表达水平的调控密切影响着突触可塑性和特异性。为分析NRXN2 α 基因转录水平的调控, 该研究构建了含有NRXN2 α 基因5'端不同区域的荧光素酶报告基因质粒, 转染HEK293和U-87 MG细胞并检测双荧光素酶报告基因的表达水平, 该研究确定了具有较强转录活性的NRXN2 α 基因启动子区域-911/+60(转录起始位点为+1), 并鉴定了具有基础转录活性的最小启动子区域-58/+60, 以及4个正向调控功能区域-911/-629、-109/-76、-49/-17、-17/+60, 和1个负向调控功能区域+146/+238。最小启动子区域序列分析鉴定了1个典型的核心启动子元件initiator(Inr)。总之, 该研究首次克隆了NRXN2 α 基因的启动子区域并进行了功能分析, 为进一步阐明转录调控机制和加深对突触可塑性的理解奠定了基础。

关键词 NRXN2 α ; 启动子; 转录; 突触

Functional Analysis of the Promoter of NRXN2 α Gene Coding Synaptic Adhesion Molecule

ZHOU Jiahong[#], GUO Yin[#], MENG Shasha, ZHOU Weihui^{*}

(Department of Pediatric Research Institute, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Translational Medical Research in Cognitive Development and Learning and Memory Disorders, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, China International Science and Technology Cooperation base of Child development and Critical Disorders, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract Neurexins are a family of presynaptic adhesion proteins which play critical roles in overall trans-synaptic signaling network in neurons and circuits. Regulation of gene expression in transcriptional and post-transcriptional levels affects synaptic plasticity and synaptic specificity. To investigate the transcriptional regulation of NRXN2 α gene, luciferase reporter plasmids containing different regions of 5' end of NRXN2 α gene were constructed and transfected into HEK293 and U-87 MG cells. Then, the promoter activity was determined by the luciferase activity assay of reporter genes. Here, the promoter region of human NRXN2 α gene (-911/+60, +1 being the transcription start site) was defined. Then, further study identified the minimal promoter region of NRXN2 α gene (-58/+60), which was sufficient to initiate a basal transcription. Moreover, four regions with positive regulatory

收稿日期: 2020-02-20 接受日期: 2020-04-08

国家重点基础研究发展计划(973项目)(批准号: 2012CB517903)和国家自然科学基金(批准号: 81070269、81571388)资助的课题

[#]共同第一作者

^{*}通讯作者。Tel: 023-63633751, E-mail: zwh@hospital.cqmu.edu.cn

Received: February 20, 2020 Accepted: April 8, 2020

This work was supported by the National Basic Research Program (973 Program) of China (Grant No.2012CB517903) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81070269, 81571388)

[#]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding author. Tel: +86-23-63633751, E-mail: zwh@hospital.cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5267>

function (−911/−629, 109/−76, −49/−17, and −17/+60) and one region with negative regulatory function (+146/+238) for transcription of *NRXN2α* gene were defined. In addition, the typical Inr (initiator) motif in the minimal promoter was characterized. Collectively, for the first time, the promoter region of *NRXN2α* gene is characterized, and its function in regulating gene expression is analyzed, which lays a foundation for further elucidating its transcriptional regulation mechanism.

Keywords *NRXN2α*; promoter; transcription; synapse

神经回路是大脑中信息处理的基本单位,神经突触是神经回路中连接不同神经元的特殊节点,负责将信息从突触前神经元传递到突触后细胞,从而把神经元连接到数百万个重叠且相互交叉的神经回路中^[1]。突触间信息的传递是快速、高效、动态且受到严格控制的,尤其是对于化学突触^[2]。体内有多种蛋白质分子参与化学突触的形成,其中跨突触的细胞黏附分子在协调突触形成、重建和消除中发挥着极为重要的作用,而轴突蛋白(neurexins)是目前研究最多的一组突触黏附分子^[3-4]。作为突触前膜细胞表面黏附分子,neurexins通过与突触后膜的神经连接蛋白(neuroligins, NLGs)^[5-6]、肌营养不良蛋白聚糖(dystroglycan, DG)^[7]、富亮氨酸重复序列跨膜蛋白(leucine rich repeat transmembrane neuronal, LRRTM)^[8-9]和脑苷肌肽(cerebellin, CBLN)^[10-11]等配体相互作用来调节突触的传递,而这些配体又进一步和其他的细胞内外的信号蛋白相互作用形成一个动态的分子网络系统。Neurexins蛋白参与整个突触信号网络的传递,因此其表达和功能的变化将导致多种神经精神障碍疾病发生。有研究表明,轴突蛋白基因 *NRXN* 的罕见突变和拷贝数变异与多种神经精神疾病相关,尤其是自闭症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)^[12-15]、精神分裂症^[16-18]、Tourette 综合征^[19]。

Neurexins 是一组定位于突触前膜的细胞黏附分子,在哺乳动物中由3个非连锁基因(*NRXN1*、*NRXN2* 和 *NRXN3*)编码,之前的研究普遍认为每个基因包括两种亚型: α -*NRXN* 和 β -*NRXN*, 每个亚型均由独立的启动子起始转录,分别编码较长的 α -neurexin 蛋白和较短的 β -neurexin 蛋白^[20-22]。Neurexins 通过可变启动子和广泛的可变剪切可能产生超过 2 000 种亚型^[23], 这种分子的多样性被认为是突触可塑性和特异性最重要的物质基础^[24-26]。因此,对 neurexins 蛋白表达调控的研究至关重要,而调控 neurexins 蛋白表达的先决因素是该基因上游的启动子,启动子可与转录因

子相互作用,控制转录的起始及其程度,在转录水平上调控 *NRXN* 基因的表达。*NRXN* 基因属于体内少有的分子量巨大的基因之一,其中 *NRXN1* 和 *NRXN3* 的基因大小分别是 1.1 Mb 和 1.7 Mb, 两者在基因结构上也更为近似。而 *NRXN2* 基因只有 110 Kb, 在进化上与前两者的关系更远^[24]。有研究报道, *NRXN2α* 基因的缺失可诱发孤独症样的行为^[27-28]。我们刚刚发表的文章研究了 *NRXN2α* 基因 mRNA 的 5' 末端的非翻译区在调节蛋白质表达方面的作用,但对于同样重要的 *NRXN2α* 基因在转录水平的调控以及其启动子功能的分析尚未见报道^[29]。本研究首次克隆了人 *NRXN2α* 基因的启动子区域并应用报告基因实验详细分析了启动子的功能,确定了最小启动子区域和多个能够调控启动子活性的功能区域,为进一步发现与之结合的关键转录因子及阐明该基因的转录调控机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pGL4.10、pGL3-promoter、pRL-CMV 购自 Promega 公司; HEK293 细胞购自 ATCC 公司; U-87 MG 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.2 试剂及仪器

主要仪器包括: PCR 仪(Bio-Rad, 美国)、电泳仪(Bio-Rad, 美国)、凝胶成像仪(Bio-Rad Gel Doc™ E2 Imager, 美国)、常温离心机(Thermo Scientific, 美国)、气浴摇床(Thermo, 美国)、A2 生物安全柜(Thermo Scientific, 美国)、二氧化碳恒温培养箱(Thermo Scientific, 美国)、单管发光检测仪(Promega, 美国)、纯水/超纯水系统(Millipore, 美国)。

实验试剂包括: PureYield™ Plasmid Miniprep System、Dual-luciferase® Reporter Assay System E1910 购自 Promega 公司; 限制性内切酶、DNA Ligation Kit 购自 TaKaRa 公司; DMEM 培养基、Lipofectamine 2000、Opti-MEM 购自 Invitrogen 公司;

Phusion High-Fidelity polymerase及PCR相关试剂购自NEB公司; 胎牛血清购自Gibco公司; 胶回收试剂盒购自Axygen公司; Tryptone、Yeast Extract、NaCl、Agar gel购自Sigma公司。

1.3 质粒构建

为构建萤火虫荧光素酶报告质粒p4Promoter, 在*Xho* I/*Hind* III酶切位点将来自质粒pGL3-promoter的启动子SV40序列插入到pGL4.10中。为构建海肾荧光素酶报告基因质粒p3PRluc, 通过PCR扩增质粒phRL-CMV的海肾荧光素酶的编码序列, 并在*Hind* III/*Xba* I酶切位点将pGL3-promoter中萤火虫荧光素酶的编码序列替换成海肾荧光素酶的编码序列。萤火虫荧光素酶报告质粒p4PNRXN2α-911/+60包括NRXN2α人类基因组-911到+60的序列(第一个外显子的第一个碱基为+1, 染色体位置为64723197), 以HEK293细胞的基因组DNA为模版, 设计引物NRXN2α-911-BgF(5'-GAA GAT CTG TAC CCT TAC AGG AGA GAC C-3')和NRXN2α+60-HinR(5'-CCC AAG CTT GAG GAT GCT CCG CGA GTC

AG-3'), 扩增DNA片段NRXN2α-911/+60并引入相应的酶切位点, 在*Bgl* II/*Hind* III酶切位点将PCR产物插入到无启动子活性的荧光素酶报告质粒pGL4.10中。荧光素酶报告质粒p4NRXN2α-629/+60、p4NRXN2α-394/+60、p4NRXN2α-191/+60、p4NRXN2α-109/+60、p4NRXN2α-76/+60、p4NRXN2α-58/+60、p4NRXN2α-109/+238、p4NRXN2α-109/+146、p4NRXN2α-109/-17、p4NRXN2α-109/-49构建方法与质粒p4PNRXN2α-911/+60相同, 以HEK293细胞的基因组DNA为模板, 使用相应的引物(表1)进行PCR扩增, 然后将PCR扩增产物插入到pGL4.10的*Bgl* II/*Hind* III酶切位点中。除此之外, 质粒p4NRXN2α-629/+60含有两个*Xho* I酶切位点, 使用*Xho* I单酶切后进行自连得到荧光素酶报告质粒p4NRXN2α-191/+60。所有质粒经酶切筛选出阳性克隆后, 再由一代DNA测序确认。

1.4 细胞培养和转染

HEK293和U-87 MG细胞使用含有10%胎牛血清的DMEM培养基于37℃、5% CO₂条件下常规培

表1 NRXN2α荧光素酶报告基因质粒构建模板和引物
Table 1 Primers and templates for generating luciferase report plasmids of NRXN2α gene

质粒 Plasmids	模板 Templates	正向引物(5'→3') Sense primers (5'→3')	反向引物(5'→3') Antisense primers (5'→3')
p4NRXN2α-911/+60	HEK293 genomic DNA	NRXN2α-911-BgF: GAA GAT CTG TAC CCT TAC AGG AGA GAC C	NRXN2α+60-HinR: CCC AAG CTT GAG GAT GCT CCG CGA GTC AG
p4NRXN2α-629/+60	HEK293 genomic DNA	NRXN2α-629-BgF: GAA GAT CTC TCC GTC TTT ATC CCA GCA A	NRXN2α+60-HinR
p4NRXN2α-394/+60	HEK293 genomic DNA	NRXN2α-394BgF: GAA GAT CTC CAA GTC GGG GTC CAC AGC	NRXN2α+60-HinR
p4NRXN2α-191/+60	p4NRXN2α-629/+60	Digested by enzyme <i>Xho</i> I and self-ligated to generate circle plasmid	
p4NRXN2α-109/+60	HEK293 genomic DNA	NRXN2α-109BgF: GAA GAT CTC TGG ACT GGC GGC TTC TGA G	NRXN2α+60-HinR
p4NRXN2α-76/+60	HEK293 genomic DNA	NRXN2α-76BgF: GAA GAT CTTGCG CTG CTC GCC CGT CAG C	NRXN2α+60-HinR
p4NRXN2α-58/+60	HEK293 genomic DNA	NRXN2α-58BgF: GAA GAT CTGCGC AGC GTG GTC CAA TG	NRXN2α+60-HinR
p4NRXN2α-109/+238	HEK293 genomic DNA	NRXN2α-109BgF	NRXN2α+238-HinR: CCC AAG CTT CCC ATT TTA CCC TGG TTC TC
p4NRXN2α-109/+146	HEK293 genomic DNA	NRXN2α-109BgF	NRXN2α+146-HinR: CCC AAG CTT GCT AGC GGT GTC TGC CGC CT
p4NRXN2α-109/-17	HEK293 genomic DNA	NRXN2α-109BgF	NRXN2α-17HinR: CCC AAG CTT TGA CGG CAG CAT CAG CAC C
p4NRXN2α-109/-49	HEK293 genomic DNA	NRXN2α-109BgF	NRXN2α-59HinR: CCC AAG CTT CGA GAC GCG CGC ATT GGA CC

养。细胞接种于48孔板,培养至70%~90%的密度之后,使用Lipofectamine 2000试剂进行转染,由于边缘效应,仅转染48孔板中间24孔,转染质粒经去除内毒素质粒抽提试剂盒提取,每孔共转270 ng萤火虫荧光素酶报告基因质粒和30 ng海肾荧光素酶报告基因p3PRLuc质粒,其中p3PRLuc作为转染内参以标化转染效率。

1.5 双荧光素酶活性测定

HEK293和U-87 MG细胞转染24 h后,吸弃培养基,每孔加入50 μ L缓冲裂解液,参照供应商Promega操作规程,使用双荧光素酶报告基因检测系统测量荧光素酶活性(E1910),用标化后的相对荧光素酶活性(萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性)反映启动子活性。

1.6 统计分析

实验中每个样本有3~4个重复,运用软件IBM SPSS 23.0进行统计分析,利用Graph Pad prism 7.0进行绘图。数据采用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间两两比较采用LSD法或者Dunnett T3法进行。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NRXN2 α 基因的-911/+60区域具有启动子活性

在NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)数据库中总共登载了2个NRXN2 α 基因的转录本,分别是NM_015080.3和NM_138732.2。这2个转录本具有完全相同的由472个碱基(bp)组成的5'非翻译区(5' UTR)序列。5' UTR包括了外显子1全部227 bp和外显子2上游245 bp部分转录组的序列,其中外显子1的第一个碱基对应于人类基因组(GRCh38.p13)第11号染色体64723197位置。为确定启动子活性区域,我们用PCR的方法从人HEK293细胞的基因组DNA中扩增出相应的DNA片段,首先以外显子1的起始碱基对应的人类基因组核苷酸为+1,设计引物并扩增该位点上游911 bp到下游60 bp总共971 bp的片段,然后将该片段插入到PGL4.10中构建了质粒p4PNRXN2 α -911/+60(图1A)。由于PGL4.10载体中荧光素酶报告基因编码序列的上游缺乏真核启动子和增强子序列,因此荧光素酶活性取决于插入的上游启动子序列。我们用质粒pGL4.10(阴性对照)、p4Promoter(阳性对照)和p4NRXN2 α -911/+60分别转

染HEK293和U-87 MG细胞,结果显示,以pGL4.10为基准1, p4NRXN2 α -911/+60在两种细胞中分别有(26.39 $\pm$ 2.65)倍和(29.62 $\pm$ 1.86)倍的荧光素酶活性,表明插入片段NRXN2 α 基因外显子1的起始核苷酸上游911到下游60个核苷酸的基因组区段具有较强的启动子活性(图1B~图1E)。

2.2 -911/-629序列含有能增强基因转录的功能区域

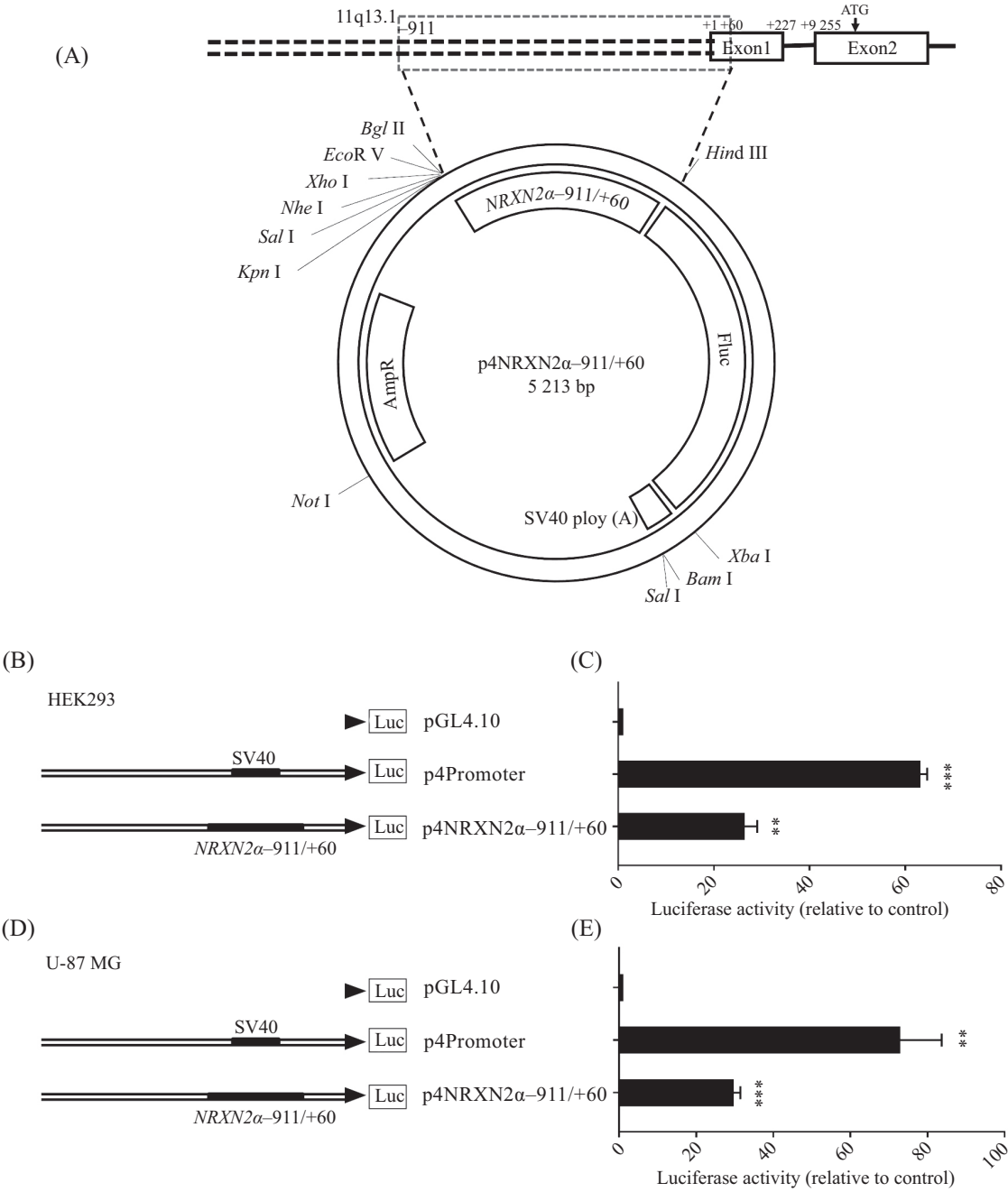
为了确定NRXN2 α 基因启动子5'侧翼的功能区域,我们以-911/+60区域为基准,从5'末端序列起始进行了序贯删切,构建了多个荧光素酶报告基因质粒,并转染HEK293和U-87 MG细胞,进行荧光素酶活性检测。结果显示,从-911删切到-629,荧光素酶活性降低具有统计学意义,继续删切235 bp、203 bp、82 bp分别得到质粒p4NRXN2 α -394/+60、p4NRXN2 α -191/+60、p4NRXN2 α -109/+60,荧光素酶活性无明显变化但都远高于对照PGL4.10(图2)。上述结果表明,-911/-629含有能增强基因转录的功能区域,-109可作为最小启动子进一步删切的5'端边界。

2.3 NRXN2 α 基因启动子5'侧翼的不同区域具有不同的功能

为了鉴定NRXN2 α 基因启动子3'侧翼的功能区域,以具有较高活性的-109为5'端构建了一系列3'端删切质粒,转染HEK293和U-87 MG细胞并进行荧光素酶活性检测。结果显示,从+238删切至+146,荧光素酶活性有3倍左右的增加,进一步删切至+60,活性没有明显的变化,然而,再删切77 bp(产生p4NRXN2 α -109/-17)和32 bp(产生p4NRXN2 α -109/-49)导致荧光素酶活性持续降低,但仍然高于空白对照(图3)。由此可见,片段+146/+238包含负向调控功能元件,而片段-49/-17和-17/+60包含正向调控功能元件。

2.4 确定NRXN2 α 基因最小启动子区域-58/+60

由于3'端质粒从+60删切至-17活性显著降低,为了明确NRXN2 α 基因最小启动子的范围,我们在NRXN2 α -109/+60的基础上进一步进行了5'端删切。荧光素酶实验结果显示,从-109删切到-76,荧光素酶活性降低为原来的1/3左右,进一步删切至-58,活性没有明显变化,但仍然高于对照接近5倍(图4)。综上,-109/-76具有较强的增强启动子活性的调控元件,而-58/+60这118 bp长的片段具有NRXN2 α 基因转录的基础启动子活性,为NRXN2 α 基因的最小启动子区域。



A: 荧光素酶报告基因质粒p4NRXN2α-911/+60结构示意图。虚线框表示插入片段NRXN2α-911/+60在染色体上的位置; B、D: 转染质粒结构示意图; C: 转染HEK293细胞24 h后荧光素酶活性检测结果; E: 转染U-87 MG细胞24 h后荧光素酶活性检测结果。数据已标化为对照PGL4.10的倍数。** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与PGL4.10阴性对照组比较。

A: schematic diagram of luciferase reporter plasmid p4NRXN2α-911/+60. Dotted box indicates the location on the chromosome of inserting fragment NRXN2α-911/+60; B,D: schematic diagram of reporter plasmids for transfection; C: results of luciferase activity assay in HEK293 cells after 24 h of transfection; E: results of luciferase activity assay in U-87 MG cells after 24 h of transfection. Data is shown as folds over the samples transfected with empty control pGL4.10 plasmid. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs PGL4.10 negative control group.

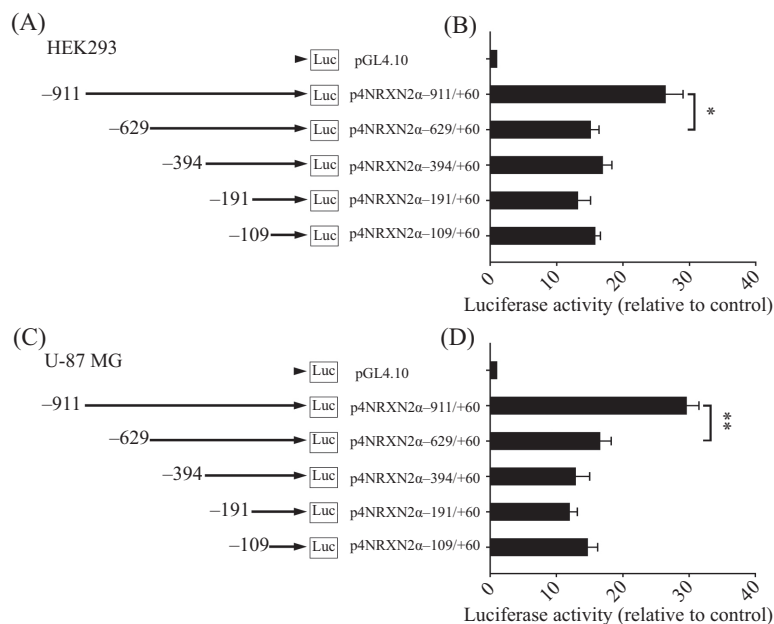
图1 NRXN2α基因启动子区域的克隆和验证

Fig.1 Cloning and identification of NRXN2α gene promoter region

2.5 NRXN2α基因最小启动子区域包含典型的核心启动子元件Inr

为了确定NRXN2α基因最小启动子区域是否含

有典型的核心启动子元件, 我们对-58/+60片段进行了更详尽的分析。目前已知的核心启动子元件包括起始子(initiator, Inr, 共识序列为bbcabw)、TATA

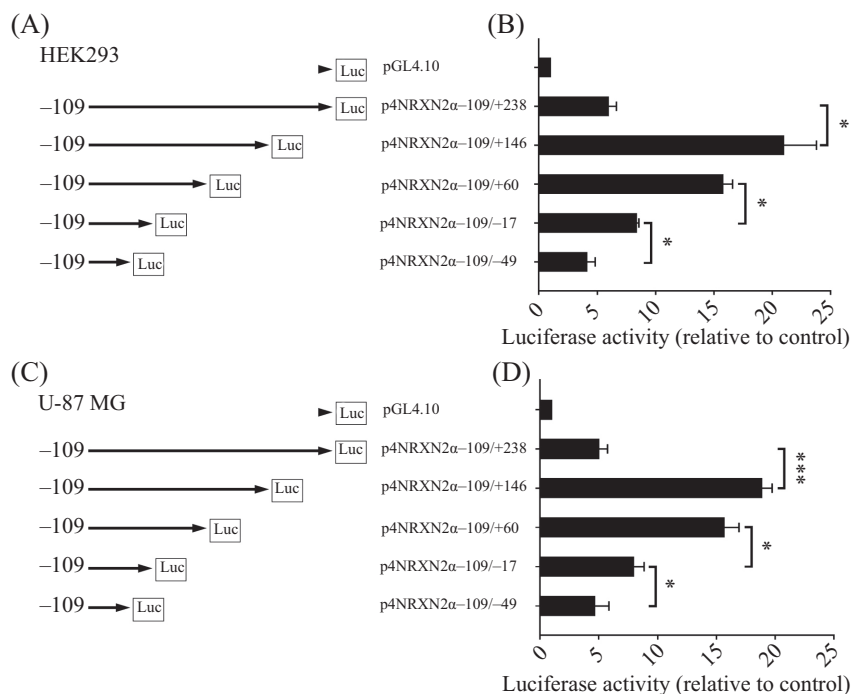


A、C: *NRXN2α*启动子5'端删切质粒示意图; B: 转染HEK293细胞24 h后荧光素酶活性检测结果; D: 转染U-87 MG细胞24 h后荧光素酶活性检测结果。数据已标化为对照PGL4.10的倍数。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A,C: schematic diagram of 5' end promoter deletion plasmids of *NRXN2α* gene; B: results of luciferase activity assay in HEK293 cells after 24 h of transfection; D: results of luciferase activity assay in U-87 MG cells after 24 h of transfection. Data is shown as folds over the samples transfected with empty control pGL4.10 plasmid. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图2 *NRXN2α*基因启动子5'侧翼删切质粒的荧光素酶活性测定结果

Fig.2 Results of luciferase activity assay of *NRXN2α* gene promoter 5' flanking deletion plasmids

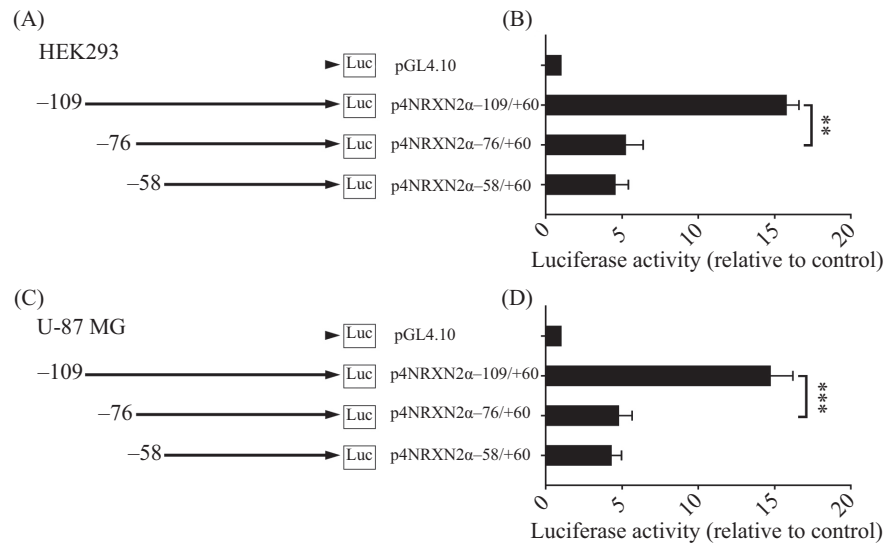


A、C: *NRXN2α*基因启动子3'端删切质粒示意图; B: 转染HEK293细胞24 h后荧光素酶活性检测结果; D: 转染U-87 MG细胞24 h后荧光素酶活性检测结果。数据已标化为对照PGL4.10的倍数。* $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

A,C: schematic diagram of 3' end promoter deletion plasmids of *NRXN2α* gene; B: results of luciferase activity assay in HEK293 cells after 24 h of transfection; D: results of luciferase activity assay in U-87 MG cells after 24 h of transfection. Data is shown as folds over the samples transfected with empty control pGL4.10 plasmid. * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

图3 *NRXN2α*基因启动子3'侧翼删切质粒的荧光素酶活性测定结果

Fig.3 Results of luciferase activity assay of *NRXN2α* gene promoter 3' flanking deletion plasmids



A、C: *NRXN2α*基因最小启动子活性区域删切质粒示意图; B: 转染HEK293细胞24 h后荧光素酶活性检测结果; D: 转染U-87 MG细胞24 h后荧光素酶活性检测结果。数据已标化为对照pGL4.10的倍数。** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A,C: schematic diagram of minimal promoter region deletion plasmids of *NRXN2α* gene; B: results of luciferase activity assay in HEK293 cells after 24 h of transfection; D: results of luciferase activity assay in U-87 MG cells after 24 h of transfection. Data is shown as folds over the samples transfected with empty control pGL4.10 plasmid. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图4 确定*NRXN2α*最小启动子区域

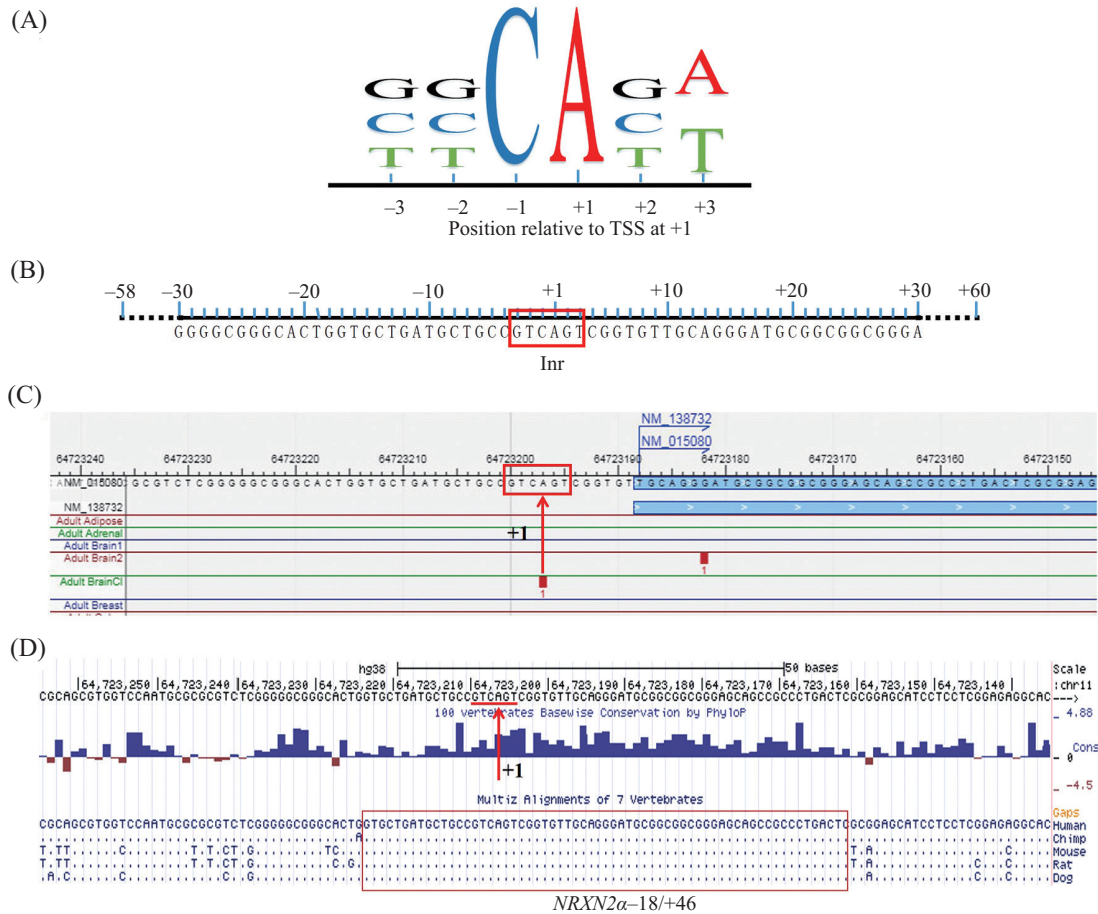
Fig.4 Identification of the minimal promoter region of *NRXN2α* gene

盒(TATA box, 共识序列为tatawaar)、上游TFIIB识别元件(upstream TFIIB recognition element, BREu, 共识序列为ssrcgcc)、下游TFIIB识别元件(downstream TFIIB recognition element, BREd, 共识序列为rtddkkkk)、下游核心启动子元件(downstream core promoter element, DPE, 共识序列为rgwyv或rgwyvt)、基序十元件(motif ten element, MTE, 共识序列为csarcssaacgs)、X核心启动子元件1(X core promoter element 1, XCPE1, 共识序列为dsgyggrassm)、多聚嘧啶起始子(polypyrimidine Inr, TCT, 共识序列为yc-tytyy)和下游转录起始元件(downstream transcription initiation element, DTIE, 共识序列为gsggrdnhgg)^[30-32], 其中DPE元件在果蝇中较为常见, 但在人类核心启动子中很少发现, 仍有待证实^[31], 因此, DPE元件不纳入核心启动子元件的分析。序列分析结果显示, *NRXN2α*基因最小启动子区域-58/+60不包含典型的核启动子元件TATA盒、BRE、MTE、XCPE1、TCT和DTIE, 但是存在一个Inr元件(GTC AGT), 位于-3到+3(图5B), 它的共识序列为BBCA₊1BW[B=C/G/T, W=A/T, A₊作为转录起始位点(transcriptional start site, TSS)](图5A)。为了进一步鉴定这个Inr基序是否有功能, 我们搜索了基因转录起始位点数据库(dbTSS^[33])中*NRXN2α*基因上游2 000 bp到下游1

500 bp范围内的数据, 结果显示, 在成人脑组织中有两个TSS, 分别位于+1和+16, 其中+1的碱基A和预测的Inr中的TSS一致(图5C)。与此同时, 我们还对最小启动子区域进行保守性分析, 发现在人、黑猩猩、小鼠、大鼠、狗这些不同的种属中, 片段*NRXN2α*-18/+46序列是一致的, 而其中位于-3/+3的Inr序列在100种脊椎动物和这5种种属中都是高度保守的(图5D)。以上证据表明, 位于*NRXN2α*-3/+3的Inr基序很可能是有功能的典型核心启动子元件。

3 讨论

突触可塑性是指突触对活动的变化而作出反应, 随着时间而增强或减弱的能力, 被认为是学习和记忆形成的重要神经化学基础之一。突触可塑性涉及突触分子组成的改变, 而突触黏附分子是突触非常重要的组成部分, 在调节突触可塑性, 进而在调节学习和记忆形成中起着重要的作用。突触黏附分子的丰度和多样性与突触可塑性和突触特异性密切相关, 特别是改变突触上特定的突触黏附分子的丰度可能从根本上影响突触的发生、维持和最终消除^[34]。突触黏附分子调节突触可塑性包括暂时的和持久的形式, 其中持久形式的突触可塑性与突触结构的重塑和新突触的形成有关, 这依赖于相应基因的转录



A: 人类5'-GRO-seq Inr共识序列示意图; B: *NRXN2α*基因最小启动子区域中典型的核启动子元件分析。红色框线所示为Inr基序的序列和位置; C: dbTSS数据库中*NRXN2α*基因的TSS。红色框线所示为Inr基序, 箭头所指为*NRXN2α*基因外显子1的起始碱基; D: *NRXN2α*基因最小启动子区域保守性分析。红色下划线所示为Inr基序, 箭头所指为*NRXN2α*基因外显子1的起始碱基, 红色框线表示*NRXN2α*基因-18/+46的区域。

A: consensus Inr sequence of human 5' GRO-seq; B: typical core promoter motifs analysis of the minimal promoter region of *NRXN2α* gene. The red box indicates the sequence and the location of Inr motif; C: *NRXN2α* TSS from database of dbTSS. The red box indicates the Inr motif, and the arrow shows the first nucleotide in first exon of *NRXN2α* gene; D: conservation analysis of minimal promoter region of *NRXN2α* gene. The red underline indicates the Inr motif, the arrow shows the first nucleotide in first exon of *NRXN2α* gene, and the red box shows the region of *NRXN2α* gene from upstream 18 to downstream 46.

图5 *NRXN2α*基因最小启动子包括典型的核启动子元件Inr

Fig.5 *NRXN2α* gene minimal promoter contains typical core promoter element Inr

进而合成新的蛋白质^[35]。因此, neurexins蛋白作为研究最多的重要突触黏附分子, 其转录和转录后基因表达水平的调控密切影响着突触黏附分子的丰度和多样性的变化, 从而影响着突触的可塑性和特异性。

在本研究中, 我们首次克隆并分析了人类 *NRXN2α* 基因的启动子。 *NRXN2* 基因位于染色体 11q13.2, 其在 neurexins 家族中较 *NRXN1* 和 *NRXN3* 基因更小, *NRXN2* 总共包括 24 个外显子, 其中 *NRXN2α* 包括 23 个外显子, 并从外显子 1 上游的 α 启动子开始转录, 而 *NRXN2β* 包括七个外显子, 从 β 外显子 (位于外显子 17 和外显子 18 之间) 上游的 β 启动子开始转

录^[25-26]。为了确定 *NRXN2α* 的启动子区域, 我们根据 NCBI 数据库中 *NRXN2α* 的参考序列, 以 TSS (第一个外显子的第一个碱基) 为 +1, 通过检测发现了片段 -911/+60 具有较强的启动子活性。进一步的 5' 端和 3' 端连续的删切确定了仅仅 118 bp 长的最小启动子区域 -58/+60, 以及四个正向调控功能区域 -911/-629、-109/-76、-49/-17、-17/+60, 和一个负向调控功能区域 +146/+238, 其中功能区域 -109/-76 和 +146/+238 变化最为显著 (表 2) (图 6)。

最小或者核心启动子的活性很大程度上取决于特定的核心启动子元件^[32], 我们经过序列分析, 发现了最小启动子区域中包含了经典的 Inr 元件, 位

于-3/+3, 其中位于+1的TSS A与dbTSS数据库中的TSS相一致。保守性分析显示, 该模体在100种脊椎动物中是高度保守的, 同时当从3'侧翼+60删切至-17时, 荧光素酶活性显著降低。因此, 多方面证据表明, 该Inr元件很可能为有功能的核心启动子元件。

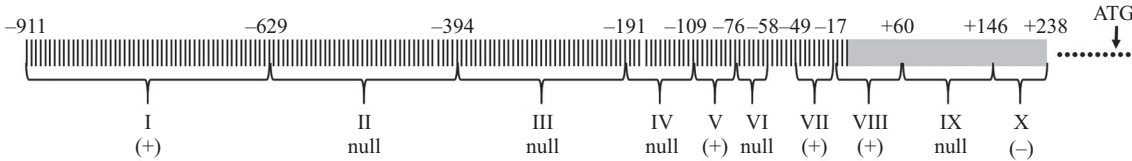
在真核生物转录分析中, 转录起始主要包括两种模式, 分别为“聚集”和“分散”模式。这两种模式反应了两种不同类型的核心启动子所特有的转录机制, 以“聚集”模式为主的启动子, 通常在单个核苷酸或者小范围内的几个核苷酸起始转录, 其核心启动子区域包含一个或者多个典型的启动子元件, 如TATA盒, 这种启动子在特异性表达调控的基因中较为常见, 因此通常转录不稳定且GC含量低; 而以“分散”模式为主的启动子, TSS分散, 存在多个弱起始位点, 很大程度上缺乏典型的启动子元件, 并且通常与管家基因相关, 因此具有稳定的转录状态和高GC含量, 除此之外, 还有中间型的启动子, 包含“聚集”和“分散”两种模式, 表现为具有一个主要

TSS的分散模式^[32,36]。在本文中, 我们发现dbTSS数据库中NRXN2α基因的两个真实的TSS分别位于+1和+16, 两者相隔很近, 并且至少其上游2 000 bp到下游1 500 bp均未发现其他的TSS, 该结果与NCBI提供的TSS信息相一致, 并且与最小启动子-58/+60具有基础启动子活性的结果也一致。但是在删切结果中我们发现, 片段-109/-17和-109/-49仍然具有约8倍和4倍的荧光素酶活性, 此外, 对启动子活性较强的片段-109/+60进行GC含量分析, 结果表明GC含量为70.2%。因此, 这些结果暗示了NRXN2α基因启动子可能是一个既包含“聚集”模式又包含“分散”模式的中间型启动子, 具有一个主要的TSS, 以及多个分散的弱起始位点。

相关研究表明, NRXN基因除了在神经元表达以外, 也可在神经胶质细胞内表达^[37-38]。在本研究中, 我们选取了高转染效率的HEK293细胞和大脑来源的U-87 MG细胞进行启动子活性的探究, 在Human Protein Atlas网站 (<https://www.proteinatlas.org/>)中查

表2 NRXN2α基因5'端序列调控区域汇总(第一个外显子的第一个碱基为+1)
Table 2 Regulatory regions in the NRXN2α gene 5' flanking sequence (first base of first exon is +1)

启动子区域 Promoter region	功能 Function	起始位置 Start position	结束位置 End position
I	Positive	-911	-629
II	Null	-629	-94
III	Null	-394	-191
IV	Positive	-191	-109
V	Positive	-109	-76
VI	Null	-76	-58
VII	Positive	-49	-17
VIII	Positive	-17	+60
IX	Null	+60	+146
X	Negative	+146	+238



启动子区域删切分析确定了正向调控功能区域I、V、VII、VIII, 负向调控功能区域X, 而区域II、III、IV、VI和IX没有明显变化。阿拉伯数字代表相对于NRXN2α第一个外显子的第一个碱基的位置。(+)和(-)分别表示正向和负向调控功能区域。
Promoter region, as determined by deletion analysis, fragments I, V, VII, and VIII are predominantly positive regulatory regions, whereas X is predominantly negatively regulatory regions, fragments II, III, IV, VI and IX seems to be no obvious effects. Arabic numerals represent base sequence relative to the first base of first exon of NRXN2α. (+) and (-) separately represent the functional areas of positive and negative regulation.

图6 NRXN2α基因启动子调控区域定位图
Fig.6 Mapping of putative regulatory regions of NRXN2α gene promoter

询发现, *NRXN2* 基因在 U-87 MG 细胞中检测到较高丰度的 RNA 内源性表达 ($NX=11.4$), 而在 HEK293 细胞中几乎没有检测到 RNA 内源性的表达 ($NX=0.2$)。具有较高内源性表达的 U-87 MG 细胞可能含有调控特异性表达所需的转录因子, 但是两种细胞的荧光素酶活性检测结果没有显著差异, 这提示, 本研究中的 *NRXN2* 启动子区域可能只决定其基础的表达水平, 而决定其组织和细胞特异性表达的区域可能在其他位置。

在本研究中, 我们首次克隆了 *NRXN2* 基因的启动子区域, 并在 HEK293 细胞和 U-87 MG 细胞中均进行了验证, 进一步鉴定了最小启动子区域和多个功能区域。我们将进一步探究是否存在起关键作用的顺式作用元件和与之相互作用的转录因子, 以及如何调控 *NRXN2* 蛋白的表达, 以更深入地理解突触黏附分子的丰度差异和转录本多样性的机制, 以及突触的功能和可塑性的分子基础。通过分析人类 *NRXN2* 基因启动子功能区域, 我们的研究为进一步发现关键的调控元件和转录因子, 以及阐明该基因的转录调控机制奠定了基础。

参考文献 (References)

- [1] SUDHOF T C. Synaptic neurexin complexes: a molecular code for the logic of neural circuits [J]. *Cell*, 2017, 171(4): 745-69.
- [2] ZUCKER R S, REGEHR W G. Short-term synaptic plasticity [J]. *Annu Rev Physiol*, 2002, 64: 355-405.
- [3] ZHANG C, ATASOY D, ARAC D, et al. Neurexins physically and functionally interact with GABA(A) receptors [J]. *Neuron*, 2010, 66(3): 403-16.
- [4] BROCKHAUS J, SCHREITMULLER M, REPETTO D, et al. Alpha-neurexins together with alpha2delta-1 auxiliary subunits regulate Ca^{2+} influx through Cav2.1 channels [J]. *Neurosci*, 2018, 38(38): 8277-94.
- [5] KRUEGER D D, TUFFY L P, PAPADOPOULOS T, et al. The role of neurexins and neuroligins in the formation, maturation, and function of vertebrate synapses [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2012, 22(3): 412-22.
- [6] MISSLER M, HAMMER R E, SUDHOF T C. Neurexophilin binding to alpha-neurexins. A single LNS domain functions as an independently folding ligand-binding unit [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(52): 34716-23.
- [7] SUGITA S, SAITO F, TANG J, et al. A stoichiometric complex of neurexins and dystroglycan in brain [J]. *J Cell Biol*, 2001, 154(2): 435-46.
- [8] KO J, FUCCILLO M V, MALENKA R C, et al. LRRTM2 functions as a neurexin ligand in promoting excitatory synapse formation [J]. *Neuron*, 2009, 64(6): 791-8.
- [9] WIT J D, SYLWESTRAK E, O'SULLIVAN M L, et al. LRRTM2 interacts with neurexin I and regulates excitatory synapse formation [J]. *Neuron*, 2009, 64(6): 799-806.
- [10] MATSUDA K, YUZAKI M. Cbln family proteins promote synapse formation by regulating distinct neurexin signaling pathways in various brain regions [J]. *Eur J Neurosci*, 2011, 33(8): 1447-61.
- [11] UEMURA T, LEE S J, YASUMURA M, et al. Trans-synaptic interaction of GluRdelta2 and neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum [J]. *Cell*, 2010, 141(6): 1068-79.
- [12] WANG J, GONG J, LI L, et al. Neurexin gene family variants as risk factors for autism spectrum disorder [J]. *Autism Res*, 2018, 11(1): 37-43.
- [13] DACHTLER J, IVORRA J L, ROWLAND T E, et al. Heterozygous deletion of α -neurexin I or α -neurexin II results in behaviors relevant to autism and schizophrenia [J]. *Behav Neurosci*, 2015, 129(6): 765-76.
- [14] GAUTHIER J, SIDDIQUI T J, HUASHAN P, et al. Truncating mutations in *NRXN2* and *NRXN1* in autism spectrum disorders and schizophrenia [J]. *Hum Genet*, 2011, 130(4): 563-73.
- [15] YUAN H, WANG Q, LIU Y, et al. A rare exonic *NRXN3* deletion segregating with neurodevelopmental and neuropsychiatric conditions in a three-generation Chinese family [J]. *Am J Med Genet B*, 2018, 177(6): 589-95.
- [16] REICHELT A C, RODGERS R J, CLAPCOTE S J. The role of neurexins in schizophrenia and autistic spectrum disorder [J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62(3): 1519-26.
- [17] MARSHALL C R, HOWRIGAN D P, MERICO D, et al. Contribution of copy number variants to schizophrenia from a genome-wide study of 41,321 subjects [J]. *Nat Genet*, 2017, 49(1): 27-35.
- [18] YANG J, WANG S, YANG Z, et al. The contribution of rare and common variants in 30 genes to risk nicotine dependence [J]. *Mol Psychiatr*, 2015, 20(11): 1467-78.
- [19] HUANG A Y, YU D, DAVIS L K, et al. Rare copy number variants in *NRXN1* and *CNTN6* increase risk for Tourette Syndrome [J]. *Neuron*, 2017, 94(6): 1101-11.
- [20] MISSLER M, FERNANDEZ-CHACON R, SUDHOF T C. The making of neurexins [J]. *J Neurochem*, 1998, 71(4): 1339-47.
- [21] MISSLER M, SUDHOF T C. Neurexins: three genes and 1001 products [J]. *Trends Genet*, 1998, 14(1): 20-6.
- [22] REISSNER C, RUNKEL F, MISSLER M. Neurexins [J]. *Genome Biol*, 2013, 14(9): 213.
- [23] TREUTLEIN B, GOKCE O, QUAKE S R, et al. Cartography of neurexin alternative splicing mapped by single-molecule long-read mRNA sequencing [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(13): E1291-9.
- [24] TABUCHI K, SUDHOF T C. Structure and evolution of neurexin genes: insight into the mechanism of alternative splicing [J]. *Genomics*, 2002, 79(6): 849-59.
- [25] ROWEN L, YOUNG J, BIRDITT B, et al. Analysis of the human neurexin genes: alternative splicing and the generation of protein diversity [J]. *Genomics*, 2002, 79(4): 587-97.
- [26] PEDROSA E, KAUSHIK S, LACHMAN H M. ChIP-chip analysis of neurexins and other candidate genes for addiction and neuropsychiatric disorders [J]. *J Neurogenet*, 2010, 24(1): 5-17.
- [27] DACHTLER J, GLASPER J, COHEN R N, et al. Deletion of α -neurexin II results in autism-related behaviors in mice [J]. *Transl Psychiatr*, 2014, 4(11): e484.

- [28] BORN G, GRAYTON H M, LANGHORST H, et al. Genetic targeting of NRXN2 in mice unveils role in excitatory cortical synapse function and social behaviors [J]. *Front Synaptic Neurosci*, 2015, 7: 3.
- [29] DING X, MENG S, ZHOU J, et al. Translational Inhibition of alpha-Neurexin 2 [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 3403.
- [30] VO NGOC L, CASSIDY C J, HUANG C Y, et al. The human initiator is a distinct and abundant element that is precisely positioned in focused core promoters [J]. *Gene Dev*, 2017, 31(1): 6-11.
- [31] VO N L, WANG Y L, KASSAVETIS G A, et al. The punctilious RNA polymerase II core promoter [J]. *Gene Dev*, 2017, 31(13): 1289-301.
- [32] KADONAGA J T. Perspectives on the RNA polymerase II core promoter [J]. *Wires Dev Biol*, 2012, 1(1): 40-51.
- [33] YAMASHITA R, SUGANO S, SUZUKI Y, et al. DBTSS: DataBase of Transcriptional Start Sites progress report in 2012 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: D150-4.
- [34] RUDENKO G. Dynamic control of synaptic adhesion and organizing molecules in synaptic plasticity [J]. *Neural Plast*, 2017, 2017: 6526151.
- [35] BENSON D L, SCHNAPP L M, SHAPIRO L, et al. Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity [J]. *Trends Cell Biol*, 2000, 10(11): 473-82.
- [36] CARNINCI P, SANDELIN A, LENHARD B, et al. Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(6): 626-35.
- [37] ZHANG Y, CHEN K, SLOAN S A, et al. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(36): 11929-47.
- [38] GOKCE O, STANLEY G M, TREUTLEIN B, et al. Cellular taxonomy of the mouse striatum as revealed by single-cell RNA-seq [J]. *Cell Rep*, 2016, 16(4): 1126-37.