

人*Ska2/FAM33A*核心启动子区域的初步鉴定与分析

艾 青^{1,2} 翁华莉^{1,2} 张 莹^{1,2} 刘 竹^{1,2} 王义涛^{1,2} 李 轶^{1,2}朱慧芳^{1,2} 张春冬^{1,2*} 卜友泉^{1,2*}⁽¹⁾重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400016;⁽²⁾重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

摘要 *Ska2*(spindle and KT associated 2), 也称*FAM33A*(family with sequence similarity 33, member A), 是新近发现的一个与细胞周期调控和肿瘤发生发展均密切相关的新基因, 但其表达调控机制仍不清楚。该研究是在此前对*Ska2*基因启动子鉴定分析的基础上, 进一步对*Ska2*基因的核心启动子区域进行初步鉴定和分析。采用PCR技术, 构建5个*Ska2*基因启动子的系列删除体, 并对*Ska2*核心启动子区中的2个潜在NF-Y结合位点进行单独或联合定点突变, 构建3个定点突变重组体, 采用荧光素酶双报告基因分析技术检测各重组体的启动子活性。启动子活性分析结果表明, 所构建删除体均具有较强启动子活性; 2个潜在NF-Y结合位点单独或联合定点突变均可导致*Ska2*启动子活性的降低; 共转染NF-Y表达质粒后, *Ska2*的启动子活性明显提高。该研究结果不仅将*Ska2*的核心启动子区域定位在一个80 bp的范围内, 并且也提示NF-Y是一个调节*Ska2*转录的重要转录因子。

关键词 *Ska2*; *FAM33A*; 启动子; 转录调控; NF-Y

Preliminary Identification and Characterization of Human *Ska2* Core Promoter Region

Ai Qing^{1,2}, Weng Huali^{1,2}, Zhang Ying^{1,2}, Liu Zhu^{1,2}, Wang Yitao^{1,2}, Li Yi^{1,2},Zhu Huifang^{1,2}, Zhang Chundong^{1,2*}, Bu Youquan^{1,2*}⁽¹⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;⁽²⁾Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract *Ska2* (spindle and KT associated 2), also known as *FAM33A* (family with sequence similarity 33, member A), is a recently discovered novel gene involved in both cell cycle regulation and tumorigenesis. The molecular regulatory mechanism of its expression, however, remains unclear. We have previously identified its main promoter region, thus the present study was designed to further identify and characterize its core promoter region. PCR was used to make five different deletion mutants of *Ska2* promoter reporter. Either or both of the two potential NF-Y binding sites were mutated to make three *Ska2* mutant promoter reporters using PCR based site-directed mutagenesis. Dual luciferase reporter assay was used to determine promoter reporter activity. The results of promoter activity analysis showed that the five deletion mutants showed significant promoter activity, and site-directed mutagenesis of either or both NF-Y binding sites resulted in decreased promoter activity. Additionally, ectopic overexpression of NF-Y enhanced the *Ska2* promoter activity. Taken together, our results suggested that the

收稿日期: 2013-02-21 接受日期: 2013-03-22

国家自然科学基金(批准号: 30801356、81171879)资助的课题

*通讯作者. Tel: 023-68485991, E-mail: zcd308@163.com; E-mail: buyqcn@yahoo.com.cn

Received: February 21, 2013 Accepted: March 22, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30801356, 81171879)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485991, E-mail: zcd308@163.com; E-mail: buyqcn@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2013-04-10 15:10 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130410.1510.001.html

core promoter region of *Ska2* gene is mainly located in a 80 bp region and NF-Y might play an important role in the transcriptional regulation of *Ska2* gene.

Key words *Ska2*; *FAM33A*; promoter; transcriptional regulation; NF-Y

Ska2(spindle and KT associated 2), 也称*FAM33A* (family with sequence similarity 33, member A), 是新近发现的一个与细胞周期调控和肿瘤发生发展均密切相关的新基因^[1]。关于其在细胞周期中的作用, 现在认为*Ska2*主要在细胞周期有丝分裂过程中发挥非常重要的作用, 对有丝分裂中期赤道板的维持以及纺锤体检测点的适时关闭至关重要^[2]。*Ska2*与肿瘤也密切相关, 它不仅通过调控细胞周期检验点来影响细胞增殖, 还能通过其他机制参与肺癌、乳腺癌等多种肿瘤的发生发展过程。因此, *Ska2*可能在肿瘤的诊断、预后判断和靶向治疗方面具有潜在的临床应用价值^[3-5]。

然而, 对于*Ska2*基因的表达调控研究国内外鲜有报道。我们在前期研究中, 对人*Ska2*基因的启动子区域进行了初步的鉴定和分析^[1]。本研究则在此基础上, 进一步对人*Ska2*基因的核心启动子进行鉴定和分析, 为深入研究*Ska2*的表达调控机制奠定坚实基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人非小细胞肺癌细胞系H1299为本实验室保存, 采用RPMI1640培养基培养, 培养基中加入10% FBS和链霉素(100 μg/mL)/青霉素(100 IU/mL), 培养于CO₂培养箱。RPMI 1640培养基、胎牛血清和Lipofectamine 2000试剂购于Gibco公司; 各种限制性内切酶和KOD-Plus-Mutagenesis Kit购自TOYOBO公司; DNA连接试剂盒购自TaKaRa公司; 高保真酶购自Invitrogen公司; Dual-Luciferase® Reporter Assay System和pGL3-basic vector购自Promega公司; 质粒小抽纯化回收试剂盒购自Omega公司; 普通PCR产物纯化回收试剂盒和普通琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒购自TIANGEN公司; NF-Y真核表达质粒由第三军医大学生物化学与分子生物学实验室张艳博士惠赠。*Ska2*-P2056重组质粒由本实验室前期构建并保存。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 从GenBank等基因数据库获得*Ska2*基因的启动子序列, 用TFsearch、

TRANSFAC等多种软件对启动子区域进行转录因子结合位点分析。

1.2.2 *Ska2*基因启动子报告基因重组删除体和突变体的构建 以前期构建的*Ska2*-P2056为模板, 采用PCR定向克隆和基因定点突变技术构建8个长度不同的系列删除体, 分别命名为*Ska2*-P688、*Ska2*-P474、*Ska2*-P436、*Ska2*-P211、*Ska2*-P80、*Ska2*-P80-mNFY1、*Ska2*-P80-mNFY2和*Ska2*-P80-mNFY1+2。其中, *Ska2*-P688的构建采用PCR定向克隆方法, 使用Invitrogen高保真酶, 具体方法参见其说明书; 其它重组体的构建主要采用PCR介导的基因定点突变技术, 具体参照KOD-Plus-Mutagenesis Kit说明书进行。其中, 将两个NF-Y结合位点的CCAAT序列分别突变为CTGAA和TCTAG序列, 结合生物信息学分析确保其不产生新的转录因子结合位点。各重组体最后均经DNA测序验证确认正确无误。使用引物的具体名称和序列参见表1。

1.2.3 瞬时转染质粒 瞬时转染采用Lipofectamine 2000试剂, 参照作者前期文献^[6-8]进行。转染前一天, 将细胞以1×10⁵/孔接种至12孔培养板, 待细胞生长密度至80%时进行转染。每组设置3个重复孔, 同时共转染入10 ng pRL-TK质粒, 作为内参对照。

1.2.4 荧光素酶报告基因活性检测 质粒转染48 h以后检测荧光素酶报告基因活性, 采用Dual-Luciferase® Reporter Assay System, 参照作者前期文献^[6-8]进行。报告基因活性检测方法参照试剂使用说明书。细胞先用1×PBS洗2次, 加入250 μL 1×细胞裂解液, 室温120 r/min摇15min后, 收集细胞裂解液, 离心去除细胞碎片。用化学发光检测仪检测荧光素酶活性, 取细胞裂解液上清20 μL加入荧光素酶检测试剂II(LARII) 100 μL, 测量萤火虫荧光素酶活性, 并继续加入Stop&Glo®试剂, 将上述反应猝灭, 同时启动海肾荧光素酶反应, 测量海肾荧光素酶活性。

2 结果

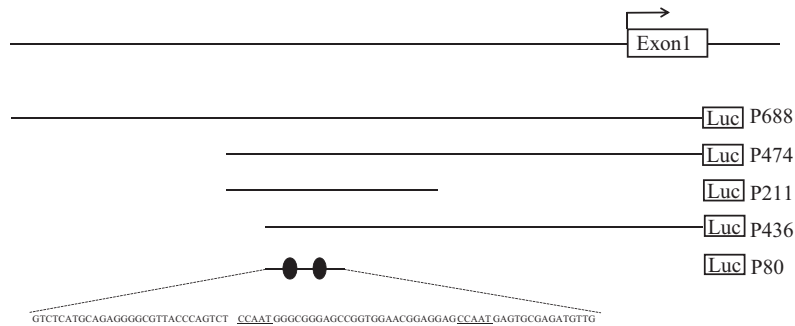
2.1 *Ska2*基因启动子报告基因系列删除体的构建 以我们以前期构建的启动子报告基因重组体

表1 *Ska2*基因启动子报告基因重组删除体和定点突变体构建用引物

Table 1 Primers of the *Ska2* gene promoter reporter constructs and mutant constructions

重组体名称	引物序列	模板
Name of constructs	Primer sequences	Template
<i>Ska2</i> -P688	<i>PRR11</i> -PF562-2: 5'-CTA GGC TAG CGG GAG GGA GGG AAT AAA GAG AAC-3' <i>PRR11</i> -PR2617-2: 5'-GGG GTA CCT CAT CCC GCA CAG TAT TAG GC-3'	<i>Ska2</i> -P2056
<i>Ska2</i> -P474	<i>PRR11</i> -PF1483: 5'-GTA CTA GCA CGG AGG GCC TCC ATT G-3' pGL3b-mutationF: 5'-GCT AGC CCG GGC TCG AGA TCT GCG ATC T-3'	<i>Ska2</i> -P688
<i>Ska2</i> -P436	<i>PRR11</i> -PF1521: 5'-CAA CAT CTC GCA CTC ATT GGC TCC T-3' pGL3b-mutationF: 5'-GCT AGC CCG GGC TCG AGA TCT GCG ATC T-3'	<i>Ska2</i> -P688
<i>Ska2</i> -P211	pGL3b-mutationR: 5'-GGT ACC TAT CGA TAG AGA AAT GTT CTG GC-3' <i>PRR11</i> -PR1693: 5'-AGT AGA GAG GAG GGG GCA GCC AAT G-3'	<i>Ska2</i> -P474
<i>Ska2</i> -P80	pGL3b-mutationR: 5'-GGT ACC TAT CGA TAG AGA AAT GTT CTG GC-3' <i>PRR11</i> -PR1600: 5'-GTG TCT CAT GCA GAG GGG CGT TAC C-3'	<i>Ska2</i> -P436
<i>Ska2</i> -P80-mNFY1	<i>PRR11</i> -PF-mNFY1a: 5'-CTC CTC CGT TCC ACC GGC TCC CGC C-3' <i>PRR11</i> -PR-mNFY1a: 5'- <u>TCT</u> AGG AGT GCG AGA TGT TG-3'	<i>Ska2</i> -P80
<i>Ska2</i> -P80-mNFY2	<i>PRR11</i> -PF-mNFY2a: 5'- <u>TTC</u> AGA GAC TGG GTA ACG CCC CTC T-3' <i>PRR11</i> -PR-mNFY2a: 5'-GGG CGG GAG CCG GTG GAA CGG AGG A-3'	<i>Ska2</i> -P80
<i>Ska2</i> -P80-mNFY1+2	<i>PRR11</i> -PF-mNFY2a: 5'- <u>TTC</u> AGA GAC TGG GTA ACG CCC CTC T-3' <i>PRR11</i> -PR-mNFY2a: 5'-GGG CGG GAG CCG GTG GAA CGG AGG A-3'	<i>Ska2</i> -P80-mNFY1

下划线为突变序列。
The mutant sequences are underlined.



*Ska2*的转录起始位点以箭头表示, NF-Y结合位点以填充椭圆表示; 80 bp的核心启动子序列显示在图下方, 其中NF-Y结合位点序列以下划线表示。
The transcriptional start site of *Ska2* gene is shown as arrow. NF-Y binding sites are shown as filled oval. The sequence of *Ska2* core promoter is shown at the lower panel and that of NF-Y binding sites are underlined.

图1 *Ska2*基因启动子报告基因系列删除体构建示意图

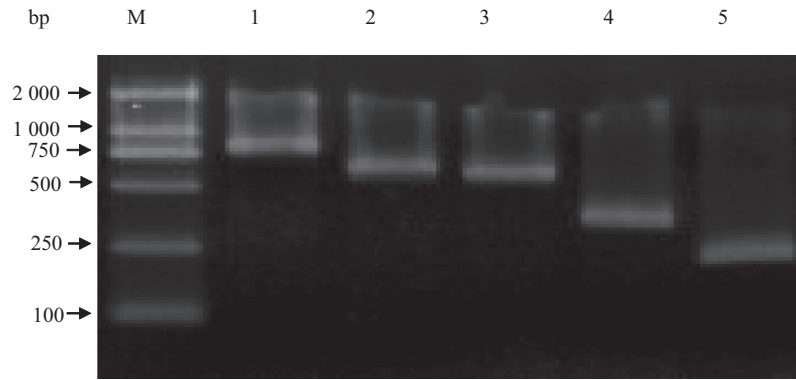
Fig.1 Schematic diagram of the *Ska2* gene promoter reporter constructs

Ska2-P2056为模板, 分别采用PCR定向克隆和PCR介导的定点突变方法, 构建了5个长度不同但相互重叠的系列删除体, 分别命名为*Ska2*-P688、*Ska2*-P474、*Ska2*-P436、*Ska2*-P211和*Ska2*-P80, 构建示意图参见图1。重组质粒经PCR快速鉴定, 插入片段大小均符合预期(因为PCR鉴定采用的引物是位于pGL3-basic载体的多克隆位点两侧的GL2和RV3测序引物, 故PCR产物均比实际插入的基因启动子片段约长160 bp)(图

2)。各阳性重组体最后均经测序确认正确无误。

2.2 *Ska2*基因系列删除体启动子活性分析

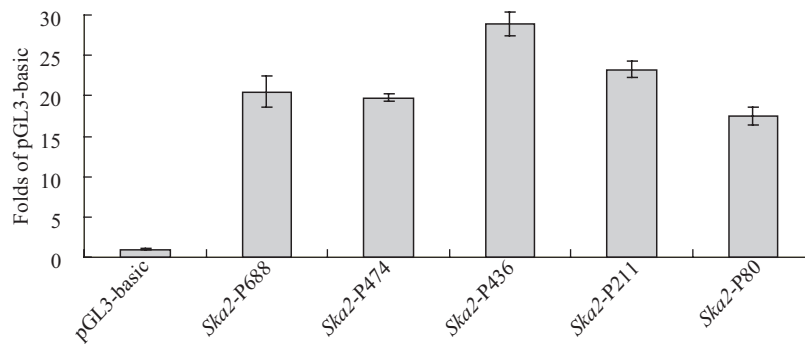
将上述构建的启动子报告基因系列删除体分别转染H1299细胞, 同时共转染10 ng的pRL-TK质粒(包含海肾荧光素酶基因)作为内参对照, 通过测量萤火虫荧光素酶(Firefly)活性和海肾荧光素酶(Renilla)活性的比值, 来表示不同启动子片段的活性。结果表明, 与不含任何启动子的空载体pGL3-



M: 2 000 bp DNA ladder; 1: *Ska2*-P688; 2: *Ska2*-P474; 3: *Ska2*-P436; 4: *Ska2*-P211; 5: *Ska2*-P80.

图2 *Ska2*基因启动子报告基因重组系列删除体的PCR快速鉴定

Fig.2 Identification of the *Ska2* gene promoter luciferase reporter by PCR



各报告基因重组体与pRL-TK瞬时转染入H1299细胞系。荧光素酶活性检测参见“材料与方法”部分。启动子活性表示为各重组体与pGL3-basic的倍数比。结果显示为3个重复实验的平均值与标准差。

H1299 cells were transiently co-transfected in triplicate in 12-well plates with the indicated luciferase reporter constructs, the Renilla luciferase reporter plasmid (pRL-TK). The luciferase activities were measured as described in “Materials and Methods”. Promoter activities were shown as folds induction compared with the activity of cells transfected with the pGL3-basic vector. The results are presented as the mean±S.D. of triplicates from a representative experiment.

图3 *Ska2*基因启动子活性分析

Fig.3 Luciferase assay of the *Ska2* gene promoter reporter constructs

basic载体相比, *Ska2*-P688、*Ska2*-P474、*Ska2*-P436、*Ska2*-P211、*Ska2*-P80均具有较高的启动子活性, 其中最短的删除体*Ska2*-P80仍具有较高启动子活性, 提示*Ska2*基因的核心启动子区域即包含于该最短删除体*Ska2*-P80的80 bp的片段内(图3)。

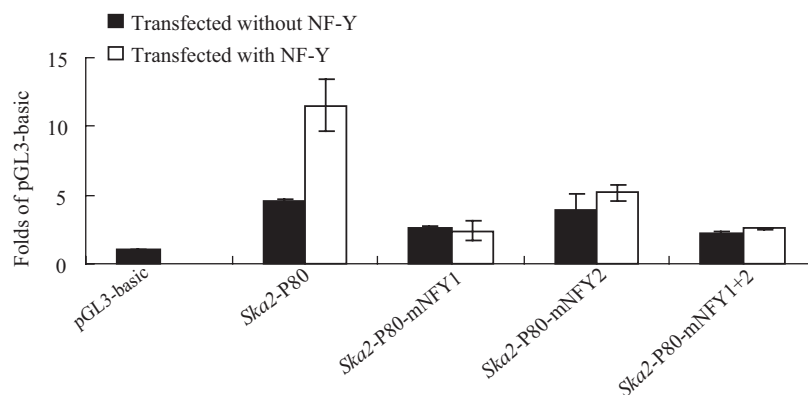
2.3 NF-Y潜在结合位点的突变及启动子活性分析

我们对上述鉴定的*Ska2*的80 bp的核心启动子序列用TF search等软件对其进行转录因子结合位点分析, 结果表明, *Ska2*的核心启动子区域含有两个典型的NF-Y结合位点(图1), 提示NF-Y在*Ska2*的转录调控中起重要作用。

为了进一步分析*Ska2*核心启动子区域中NF-Y结合位点的作用, 我们首先采用传统的碱基点突

变方法对*Ska2*核心启动子区域中的NF-Y结合位点进行了定点突变分析。分别将*Ska2*核心启动子区域包含的两个NF-Y结合位点进行单独和联合双位点定点突变, 获得的定点突变重组体分别命名为*Ska2*-P80-mNFY1、*Ska2*-P80-mNFY2和*Ska2*-P80-mNFY1+2, 经琼脂糖凝胶电泳和DNA测序结果证实, 各定点突变体均构建成功。

进而将上述各NF-Y结合位点突变体分别单独转染或与NF-Y表达质粒共转染H1299细胞, 启动子活性分析表明, 野生型*Ska2*-P80的启动子活性高于突变体*Ska2*-P80-mNFY1、*Ska2*-P80-mNFY2和*Ska2*-P80-mNFY1+2的活性, 提示NF-Y结合位点定点突变可导致*Ska2*启动子活性的降低, 其中尤其以NF-Y1



各报告基因重组体与pRL-TK瞬时转染入H1299细胞系, 且分别设置NF-Y共转染组, 每组3个重复。荧光素酶活性检测参见“材料与方法”部分。启动子活性表示为各重组体与pGL3-basic的倍数比。结果显示为3个重复实验的平均值与标准差。

H1299 cells were transiently co-transfected in triplicate in 12-well plates with the indicated luciferase reporter constructs, the Renilla luciferase reporter plasmid (pRL-TK), and NF-Y plasmid. The luciferase activities were measured as described in “Materials and Methods”. Promoter activities are shown as folds induction compared with the activity of cells transfected with the pGL3-basic vector. The results are presented as the mean±SD of triplicates from a representative experiment.

图4 *Ska2*-P80 NF-Y突变体的启动子活性分析

Fig.4 Luciferase assay of the *Ska2*-P80 promoter reporter with mutated NF-Y binding sites

结合位点的定点突变造成的启动子活性降低更为明显; 同时, 结果还表明, NF-Y过表达能够明显提高野生型*Ska2*-P80的启动子活性, 而对突变体*Ska2*-P80-mNFY1、*Ska2*-P80-mNFY2和*Ska2*-P80-mNFY1+2的启动子活性的激活作用不明显, 提示NF-Y参与了*Ska2*的转录调控(图4)。

3 讨论

在本研究中, 我们在前期对*Ska2*启动子初步鉴定的基础上, 对*Ska2*核心启动子区域进行了鉴定和分析, 并对核心启动子区内的NF-Y结合位点进行了定点突变分析, 结果表明, *Ska2*基因的核心启动子位于转录起始位点附近80 bp的范围内, NF-Y结合位点是*Ska2*核心启动子区域中的重要顺式作用元件。

*Ska2*是一个最近鉴定的参与细胞增殖和细胞周期的分子, 在赤道板维持和纺锤体检测点沉默过程中起着非常重要的作用, 并且在细胞有丝分裂期间, *Ska2*对于分裂后期的适时发生是必需的^[2]。另外有研究表明, *Ska2*在糖皮质激素信号转导和细胞增殖过程中也发挥了重要的作用^[4]。但其表达调控机制仍不清楚, 因此, 阐明其表达调控机制对于全面精确解析其功能具有重要意义。我们已经对*Ska2*的启动子区域进行了初步鉴定与分析, 发现*Ska2*的核心启动子区域含有NF-Y、GC盒以及Sp1、E2F和GATA-1等潜在的转录因子结合位点, 提示NF-Y、Sp1和E2F

等转录因子可能参与了*Ska2*基因的转录调控, 而这些转录因子与细胞增殖和细胞周期调控密切相关^[1]。目前, 已经有大量研究结果表明, NF-Y参与了细胞周期进程、细胞凋亡、细胞增殖以及癌变过程相关基因的表达调控, 在大量的细胞周期、细胞凋亡和肿瘤相关基因以及G₂/M期基因的启动子区域也均发现有典型的NF-Y结合位点^[9-13]。NF-Y通过募集组蛋白去乙酰化酶至靶基因的启动子区域, 维持一些肿瘤相关基因的转录活化状态, 从而调节细胞周期进程和促进细胞增殖以及肿瘤的发生^[9-13]。本研究的结果表明, NF-Y的外源过表达可以明显提高*Ska2*的启动子活性; 采用定点突变方法将*Ska2*核心启动子区域中的两个NF-Y结合位点单独或同时进行有效突变后, *Ska2*的启动子活性下降, 且NF-Y外源过表达对其启动子活性的激活效应也明显减弱(图4)。这些数据均表明, NF-Y结合位点是*Ska2*核心启动子区域中的重要顺式作用元件, NF-Y很可能通过与该位点结合并参与*Ska2*的转录调控。然而, NF-Y是否与该位点直接结合仍有待证实。因此, 在下一步的研究工作中, 很有必要通过RNA干扰、凝胶阻滞迁移率分析和染色质免疫共沉淀等实验确认NF-Y在*Ska2*基因转录调控以及其在细胞增殖、细胞凋亡、细胞周期进程和肿瘤发生发展中的作用。

总之, 本研究初步明确了*Ska2*的核心启动子区域位于转录起始位点附近80 bp的范围内, NF-Y结

合位点是*Ska2*核心启动子区域中的重要顺式作用元件, NF-Y可能通过参与*Ska2*的转录调控而调节细胞增殖与肿瘤发生发展。这将为进一步深入研究并阐明*Ska2*在细胞周期进程以及肿瘤的发生发展过程中的表达调控及分子行为机制奠定坚实的基础。

参考文献 (References)

- 1 杜 刚, 卜友泉, 杨正梅, 兰 欢, 崔 涛, 镇 磊, 等. 人FAM33A基因启动子的克隆与鉴定. 医学分子生物学杂志(Du Gang, Bu Youquan, Yang Zhengmei, Lan Huan, Cui Tao, Zhen Lei, *et al.* Cloning and identification of human FAM33A Promoter. Journal of Medical Molecular Biology) 2009; 6(3): 219-24.
- 2 Hanisch A, Sillje HH, Nigg EA. Timely anaphase onset requires a novel spindle and kinetochore complex comprising Ska1 and Ska2. EMBO J 2006; 25(23): 5504-15.
- 3 Lu Z, Li Y, Takwi A, Li B, Zhang J, Conklin DJ, *et al.* miR-301a as an NF-kappaB activator in pancreatic cancer cells. EMBO J 2011; 30(1): 57-67.
- 4 Rice L, Waters CE, Eccles J, Garside H, Sommer P, Kay P, *et al.* Identification and functional analysis of Ska2 interaction with the glucocorticoid receptor. J Endocrinol 2008; 198(3): 499-509.
- 5 Shi W, Gerster K, Alajez NM, Tsang J, Waldron L, Pintilie M, *et al.* MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer. Cancer Res 2011; 71(8): 2926-37.
- 6 艾 青, 卜友泉, 刘 竹, 兰 欢, 吉 颖, 杜 刚, 等. 人PRR11启动子的结构与功能初步分析. 中国生物化学与分子生物学报(Ai Qing, Bu Youquan, Liu Zhu, Lan Huan, Ji Ying, Du Gang, *et al.* Structural and functional analysis of human PRR11 promoter. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology) 2011; 27(4): 356-63.
- 7 刘 竹, 卜友泉, 艾 青, 兰 欢, 吉 颖, 杨正梅, 等. 人ACER2基因启动子的鉴定与初步分析. 中国细胞生物学学报(Liu Zhu, Bu Youquan, Ai Qing, Lan Huan, Ji Ying, Yang Zhengmei, *et al.* Preliminary identification and functional analysis of human ACER2 promoter. Chinese Journal of Cell Biology) 2011; 33(6): 674-80.
- 8 翁华莉, 卜友泉, 张 莹, 艾 青, 龙银江, 谢濛宇, 等. 人PRR11核心启动子区域NF-Y结合位点的定点突变分析. 中国细胞生物学学报(Weng Huali, Bu Youquan, Zhang Ying, Ai Qing, Long Yinjiang, Xie Mengyu, *et al.* Site-directed mutagenic analysis of NF-Y-binding sites in human PRR11 core promoter. Chinese Journal of Cell Biology) 2013; 35(3): 309-15.
- 9 Bolognese F, Pitarque-Marti M, Lo Cicero V, Mantovani R, Maier JA. Characterization of the human EDF-1 minimal promoter: Involvement of NFY and Sp1 in the regulation of basal transcription. Gene 2006; 374: 87-95.
- 10 Hewetson A, Chilton BS. An Sp1-NF-Y/progesterone receptor DNA binding-dependent mechanism regulates progesterone-induced transcriptional activation of the rabbit RUSH/SMARCA3 gene. J Biol Chem 2003; 278(41): 40177-85.
- 11 Lutzner N, de-Castro Arce J, Rosl F. Gene expression of the tumour suppressor LKB1 is mediated by Sp1, NF-Y and FOXO transcription factors. PLoS One 2012; 7(3): e32590.
- 12 Zhou D, Masri S, Ye JJ, Chen S. Transcriptional regulation of the mouse PNRC2 promoter by the nuclear factor Y (NFY) and E2F1. Gene 2005; 361: 89-100.
- 13 Dalvai M, Mondesert O, Bourdon JC, Ducommun B, Dozier C. Cdc25B is negatively regulated by p53 through Sp1 and NF-Y transcription factors. Oncogene 2011; 30(19): 2282-8.