

核基质结合区对转基因表达的影响及其作用机制

王天云 柴玉荣 袁保梅 侯卫红 薛乐勋*

(郑州大学, 河南省分子医学重点学科开放实验室, 郑州 450052)

摘要 核基质结合区(matrix attachment region, MAR)是一段在体外能与核基质结合的富含 AT 的 DNA 序列。研究发现 MAR 能使染色质形成环状结构; 将其连到目的基因二侧构建载体并转至生物体中, 发现它能增强基因转录表达水平及稳定性, 在一定程度上降低转基因个体或细胞系之间转基因的表达水平的差异, 这很可能是减低了基因沉默所致。现对 MAR 的序列特征、MAR 对转基因表达的影响及对转基因效应的影响机制进行综述。

关键词 基质; 基质结合区; 基因表达; 基因沉默

体外与核基质(或核骨架)相结合从而将染色质固定于核基质的 DNA 序列称为核基质结合区(matrix attachment regions, MARs)或核骨架结合区(scaffold attachment regions, SARs)。近年来研究发现, MAR 能使染色质形成环状结构, 还可以作为 DNA 复制的起始点或调控基因的转录。尤其是将 MAR 构建载体能提高外源基因的表达水平, 增强外源基因表达的稳定性而引起人们的极大兴趣。

1 MAR 的分子结构特征

MAR 的鉴定主要有两个依据^[1]: ①作为内源 DNA 片段, 当大多数 DNA 被核酸酶消化去除后与核基质仍紧密结合; ②作为外源加入 DNA 片段, 能在竞争性 DNA 存在情况下结合至纯化的核基质上。MAR 的主要特征是富含 AT 碱基对, 几乎所有的 MAR 其 AT 含量均超过 65%, 长度可由 100 bp 至数千 bp 不等, 常含有一些特征性模体(sequence motifs), 如 A-box(AATAAAA/CAA), T-box(TTTTATTTTT), 酵母自主复制序列 ARS、果蝇拓朴异构酶 II 识别位点和能形成蛋白质识别位点的松散 DNA (unwinding DNA)、富 AT 区、弯曲 DNA (curved DNA)等^[2]。MAR 与核基质结合受 AT 区的位置及结构影响, 然而简单富含 AT 并不能使一个 DNA 片段为 MAR, 但可作为预测核基质结合的大小^[3]。MAR 通常包含碱基未配对区(base uppairing regions, BURs), BURs 是 MAR 的重要识别子, 可作为局部 DNA 解螺旋的位点以减轻 DNA 螺旋链的超螺旋张力。其二级结构表现为狭窄的 DNA 小沟, 易

于弯曲和解链。MAR 一般位于功能转录单位的侧翼, 作为一种边界元件, 但也有一些 MAR 位于某些基因的内含子中。虽然 MAR 具有一些序列特征, 但比较不同 MAR 的碱基序列, 发现 MAR 在碱基组成上并不具保守性。

有证据表明, A-box 是决定 MAR 功能的主要序列。A-box 可以使 DNA 弯曲或者抑制核小体的形成, 并且 A-box 中的碱基是以两个氢键相连, 易使 DNA 形成窄的小沟, 从而形成不同于 B 型 DNA 的易变体。Käs 等^[4]用多肽类抗生素偏端霉素(distamycin)证明 A-box 在 MAR 核基质结合中起着决定性的作用。拓朴异构酶 II 是核基质的组成成分, 在 MAR 中又出现它的识别切割位点, 因此人们推测拓朴异构酶 II 和 MAR 在体内可能相互作用, 改变 DNA 链的超螺旋状态, 但这种说法并未得到定论。

2 MAR 序列对转基因表达的影响

随着越来越多的 MAR 分子被分离出来, 研究人员对它的功能有了一定的认识。大量实验表明, 将 MAR 连接到报告基因的两翼, 在暂时表达及稳定表达的转基因植物中, MAR 在一定程度上提高了转基因的平均表达水平, 同时也可降低转化体之间转基因表达水平的差异。表 1 总结了近年来有关 MAR 对动植物及细胞系表达的影响^[5-23]。

收稿日期: 2004-02-02 接受日期: 2004-05-12

国家自然科学基金(No.30270031)和国家高新技术研究发展计划(863 计划)(No.2002AA628050)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0371-6999548, E-mail: lxxue@public2.zz.ha.cn

表1 MAR对转基因动植物基因表达及株系表达差异的影响

| 动植物系 | MAR来源 | 启动子及报告基因 | DNA转移 | 表达影响 | 表达差异影响 | 参考文献 |
|-------|-------|------------------|-------|---------|--------|------|
| 烟草细胞 | 豌豆 | nos-GUS | T-DNA | 略降低 | 略降低 | [5] |
| | 人 | nos-GUS | T-DNA | 无影响 | 略降低 | |
| 烟草植物 | 豌豆 | heat shock-GUS | T-DNA | 增加9倍 | 无影响 | [6] |
| 烟草细胞 | 酵母 | 35S-GUS | 基因枪 | 增加12倍 | 不显著 | [7] |
| 烟草植物 | 鸡 | Lhca3-GUS | T-DNA | 增加4倍 | 降低3倍 | [8] |
| | 鸡 | Lhca3-GUS | T-DNA | 增加3倍 | 降低7倍 | |
| 烟草植物 | 芸豆 | Phaseolin-GUS | T-DNA | 增加3倍 | 降低2倍 | [9] |
| 烟草植物 | 鸡 | Enh35S-GUS | T-DNA | 增加2倍 | 降低2倍 | [10] |
| | 鸡 | Enh35S-GUS | T-DNA | 增加2倍 | 降低7倍 | |
| 烟草细胞 | 烟草 | 35S-GUS | 基因枪 | 增加60倍 | 无降低 | [11] |
| 白杨外植体 | 烟草 | 35S-GUS | T-DNA | 增加10倍 | 不显著 | [12] |
| 烟草叶圆盘 | 烟草 | 35S-GUS | T-DNA | 不显著 | 不显著 | |
| 烟草植物 | 拟南芥 | 35S-GUS | T-DNA | 增加5~10倍 | 无影响 | [13] |
| 玉米细胞 | 鸡 | 35S-cabl-GUS | 基因枪 | 增加36倍 | 增加 | [14] |
| 水稻植物 | 烟草 | 35S-GUS | 基因枪 | 增加2.5倍 | 不显著 | [15] |
| | 酵母 | 35S-GUS | 基因枪 | 增加3倍 | 不显著 | |
| 烟草植物 | 烟草 | Enh35S-GUS | T-DNA | 增加2~4倍 | 不显著 | [16] |
| 松树 | 烟草 | Enh35S-GUS-nptII | T-DNA | 增加3~4倍 | 降低 | [17] |
| CHO | 人 | beta-globin | 转染 | 增加7倍 | 无影响 | [18] |
| 鼠 | 鸡 | hFIX | 转染 | 增加5倍 | 无影响 | [19] |
| NIH | 人 | MFG-egfp | 转染 | 增加5倍 | 无影响 | [20] |
| 烟草植物 | 豌豆 | Uida-GUS | 基因枪 | 增加2倍 | 不显著 | [21] |
| 烟草植物 | 烟草 | Uida-GUS | T-DNA | 增加2倍 | 不显著 | [22] |
| 烟草植物 | 烟草 | CaMV | T-DNA | 增加10倍 | 不显著 | [23] |

从表1中可以看出,大多数报道认为MAR能在一定程度上提高转基因的表达水平,但研究多以转基因植物为主,植物中又以烟草为多。转化方法主要采用农杆菌介导法和基因枪法。用基因枪进行介导,MAR对转基因植株表达的促进效应比T-DNA要高。在用基因枪稳定转化的烟草培养细胞中,酵母MAR介导GUS的表达水平能提高12倍,而烟草MAR介导的GUS的表达水平能提高60倍^[7]。在相同的基因枪轰击程序及相同的强结合MAR在再生的烟草植物中只提高2~3倍的表达水平,而在培养的烟草细胞中却能提高60倍^[16]。MAR效应在植物组织不同种类细胞中亦有差异,Thompson等^[24]已经注意到在胚胎鼠细胞中,MAR的效应极强,然而在成体组织分化细胞中效应相对小一些。

此外,MAR对转基因的效应要求转基因两侧的MAR必须是同源的,当源于拟南芥的AtMAR同时出现在转基因GUS两侧时才能提高其在烟草植株中的表达水平,当转基因两侧的MAR异源时,如5'端为拟南芥的AtMAR,3'端为豌豆的VicMAR则不能提高转基因的表达水平^[13]。

MAR对转基因表达的影响,虽然大多数报道能增强转基因的表达,但仍然存在一些问题:①所

用的植物大多数为模式植物烟草,其他较少;②多选用报告基因GUS,其他基因报道较少;③转化方法主要采用农杆菌介导法和基因枪法,不同转化方法存在着差别;④组织细胞类型不同,MAR的影响亦存在差别;⑤MAR的来源不同对转基因表达影响也存在差别。

3 MAR的作用分子机制

3.1 MAR作为终止子

MAR可能作为终止子,弱的转录终止能明显地减少基因转录表达水平,也可能导致异常RNA产物诱导转录后基因沉默^[25]。关于这种现象的发生有几种可能性。如果RNA聚合酶连续转录成周围转录单位,转录干涉可能发生,使转录水平降低^[24, 26]。另外,转录本的通读基因在多拷贝位点产生多个启动子序列的转录本。最近证据显示细胞核启动子转录本的积累可能引起转录基因沉默,如MAR加强终止,它们可能至少部分缓解这个问题^[27]。

3.2 染色质环状结构模型

按照染色质组织的环状结构模型,MAR作为边界元件限定了染色质的集缩程度,将不同的基因片段界定于不同的染色质环内,并阻挡了邻近染色

质区的顺式调控元件对环内基因的影响。按照这种学说,外源DNA常以随机方式整合进宿主基因组,如被整合到转录活跃区,外源基因可进行高水平的转录,反之随机整合的转基因尤其是拷贝数较多时,可能整合在转录活性低的异染色质区以至表达水平较低或不表达,即表现出“位置效应”^[28]。转基因两侧连有MAR时,有可能形成一个独立的环区,此区受周围染色质的影响很小,使得外源基因能够进行高水平的转录,即存在“拷贝数依赖性(copy number dependent)。”

3.3 减少同源依赖性基因沉默

染色质环状结构模型能较好地解释MAR普遍提高基因表达水平的现象,但不能完全解释MAR对转基因表达的实验结果。最初MAR减弱基因沉默的假说来自于Allen等^[7]的试验,他们用酵母MAR构建在35S-GUS表达盒两侧,证实MAR位于转基因两侧能抵御位置效应因而表达水平与基因拷贝数成正比,然而试验并未发现植物细胞系统中拷贝数依赖性表达,而是发现酵母的MAR及Rb7能在转化群体中提高平均表达水平,并且发现转基因拷贝数超过一定阈值水平降低了表达水平,这个所谓的“阈值”在用MAR构建的转化群体中似乎高一些,而在对照转化体中实际上十分低,这就意味着涉及到同源依赖性基因沉默,而非典型的位置效应。因而认为MAR可能抵抗同源依赖性基因沉默。基因沉默主要由涉及转基因本身的同源依赖性相互作用造成的,同源依赖性基因沉默包括转基因之间同源和转基因与受体植物内源基因同源。转基因的位置效应反映了整合位点染色体的固有特性,如与基因组之间的增强子间的距离、染色体的集缩程度等,但位置效应和基因沉默并非互不相干,MAR有可能通过减弱基因沉默的负影响而提高转基因的表达效率。

3.4 染色体开放模型

染色体开放模型最初由Laemmli实验室提出^[4],其论点是:当置换蛋白HMGI/Y大量存在时,MAR可以与染色质中的置换蛋白相互作用而取代组蛋白H₁,促使许多核小体处于松散状态,这样染色质就形成了一种RNA聚合酶容易接近的开放结构,从而提高转基因表达水平。早就知道H₁组蛋白优先结合至富含ATDNA区^[29]。后来工作证实H₁与MAR共同作用使H₁组蛋白进一步凝集及染色质的凝聚^[30]。Käs等^[4]发现寡肽偏端霉素能选择性地使H₁离开ATDNA,导致H₁组蛋白重新分布,通过DNA对限制

酶或拓扑异构酶II的敏感性测定发现,偏端霉素处理也导致染色质敏感性增加,H₁收缩,染色质因偏端霉素解凝缩。HMGI/Y家族中的染色质的非组蛋白通过小沟以和偏端霉素与DNA相似的方式与DNA相互作用^[31],另外,HMGI/Y从MARDNA代替H₁组蛋白,也发现HMGI/Y在去除H₁染色质中富集,因而,这些与富含ATMAR元件相互作用的蛋白质,成为最初(主要的)驱使染色质松散的候选者。

3.5 提高或增强整合

目前关于转化发生时DNA怎样被整合知之甚少,然而MAR元件及弯曲DNA元件在动物及酵母不规则整合位点早被发现^[32]。在拟南芥^[33]及水稻^[34]DNA侧翼整合位点也发现有MAR存在,从而可以推测它们可能创造了整合热点,也有可能在转化DNA中侧翼MAR以某种方式加速了整合过程。染色质蛋白如组蛋白H₁及HMGI/Y有限结合至MAR序列上,可能这种蛋白质保护了进入的DNA,激发了整合过程,甚至有助于将转化DNA定位到基因组整合区^[35]。

3.6 阻止配对相互作用

在动物^[36]及植物系统中^[37]已证实当复合转基因整合在一单位点时,更易发生沉默。Allen等^[1]证实,在多拷贝位点的外源基因两侧有MAR比单拷贝更能高频率表达。按照这个模型,多拷贝外源基因整合到同一位点时,更易在转基因间通过转基因之间的配对诱导沉默,MAR元件的存在能引起染色质结合至核基质上,从而阻止产生基因沉默的顺式相互作用。因此通过结合至基质上MAR可能阻止同源基因沉默促进基因的转录。阻止配对模型比较复杂,通过观察当转基因拷贝数增至一个关键水平,MAR存在不再阻止沉默,Allen认为有两种可能:第一种因为MAR元件在对多拷贝位点紧密相连,多拷贝排列可能使核基质区域提供的MAR结合位点饱和,这个模型预计在高拷贝排列的某些转基因不能结合至核基质上。尽管两翼存在MAR,在非结合序列的配对介导沉默,类似无MAR的位点。第二种可能是两翼存在MAR的转基因转录活跃,使mRNA的数量随着基因拷贝数增加至一个阈值水平,一旦转基因mRNA水平超过这个阈值,这种沉默被转录后诱导。这种可能性正引起人们的兴趣。

4 小结与展望

关于MAR序列的研究目前虽已取得相当大的进

展,但仍处于研究的早期阶段,有许多问题有待于回答。在体内 MAR 是否确定结合至核基质上或 MAR 如模型预计的使染色质松散有待于进一步证实。MAR 虽被普遍认为对转基因表达水平有增强作用,但对是否减弱了基因表达差异仍存在争议。MAR 序列的作用机制还不清楚, MAR 序列与核基质如何作用及 MAR 结合蛋白的性质等都需进一步研究,相信 MAR 作用机制的阐明将有助于我们进一步认识真核细胞基因在染色质水平上的调控作用。

参考文献 (References)

- [1] Allen GC *et al.* *Plant Mol Biol*, 2000, **43**: 361
- [2] Fukuda Y. *Plant Mol Biol*, 1999, **39**: 1051
- [3] Michalowski SM *et al.* *Biochem*, 1999, **38**: 12795
- [4] Käs E *et al.* *EMBO J*, 1993, **12**: 115
- [5] Breyne P *et al.* *Plant Cell*, 1992, **4**: 463
- [6] Schoffl F *et al.* *Transgenic Res*, 1993, **2**: 93
- [7] Allen GC *et al.* *Plant Cell*, 1993, **5**: 603
- [8] Mlynarova L *et al.* *Plant Cell*, 1994, **6**: 417
- [9] Van der Geest AHM *et al.* *Plant J*, 1994, **6**: 413
- [10] Mlynarova L *et al.* *Plant Cell*, 1995, **7**: 599
- [11] Allen GC *et al.* *Plant Cell*, 1996, **8**: 899
- [12] Han KH *et al.* *Transgenic Res*, 1997, **6**: 415
- [13] Liu J W *et al.* *Plant Cell Physiol*, 1998, **39**: 115
- [14] Odell JT *et al.* World Patent Publication Number WO98/16650, 1998
- [15] Vein P *et al.* *Plant J*, 1999, **18**: 233
- [16] Ulker B. *Plant J*, 1999, **18**: 253
- [17] Levée V *et al.* *Mol Breed*, 1999, **5**: 429
- [18] Kim JM *et al.* 2004, **107**: 95
- [19] Ehrhardt A *et al.* 2003, **14**: 215
- [20] 戴冰冰等. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, **19**: 24
- [21] 李旭刚等. *中国科学(C 辑)* 2001, **6**: 229
- [22] 张可伟等. *科学通报*, 2002, **47**: 1572
- [23] Fukuda Y. *Plant Mol Biol*, 2003, **51**: 665
- [24] Thompson AJ *et al.* *Plant Mol Biol*, 1997, **34**: 687
- [25] Stam M *et al.* *Ann Bot*, 1997, **79**: 3
- [26] Greger LH *et al.* *EMBO J*, 1998, **17**: 4771
- [27] Mette M F *et al.* *EMBO J*, 1999, **18**: 241
- [28] Renz M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, **72**: 733
- [29] Izaurrealde E. *J Mol Biol*, 1989, **210**: 573
- [30] Käs E *et al.* *J Mol Biol*, 1989, **210**: 587
- [31] Strick R *et al.* *Cell*, 1995, **83**: 1137
- [32] Rattray AJ *et al.* *Genetics*, 1993, **134**: 175
- [33] Sawasaki T *et al.* *Gene*, 1998, **218**: 27
- [34] Takano M *et al.* *Plant J*, 1997, **11**: 353
- [35] Zhao K *et al.* *EMBO J*, 1993, **12**: 3237
- [36] Wolffe AP. *Curr Biol*, 1997, **7**: R796
- [37] Wolffe AP *et al.* *Science*, 1999, **286**: 481

Effects and the Mechanism of Nuclear Matrix Attachment Regions on the Transgenic Expression

Tian-Yun Wang, Yu-Rong Chai, Bao-Mei Yuan, Wei-Hong Hou, Le-Xun Xue*

(Henan Key Laboratory of Molecular Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract Matrix attachment region (MAR) is operationally defined as DNA elements containing AT-rich that bind specifically to the nuclear matrix. When MAR are positioned on either side of the foreign gene, their presence usually results in higher and more stable expression in transgenic plants or cell lines, and reduce the variation of transgenic host, more likely by minimizing gene silencing. This paper reviews the characters and effects of MAR on the gene expression, and several plausible models to explain MAR effects on transgenic expression are also presented.

Key words matrix; matrix attachment region; gene expression; gene silencing

Received: February 2, 2004 Accepted: May 12, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30270031) and the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No.2002AA628050)

*Corresponding author. Tel: 86-371-6999548, E-mail: lxxue@public2.zz.ha.cn