

Pur α 蛋白质不同结构域对APP基因表达的调控作用

李永玲^{2#} 贾中发^{2#} 柴娟¹ 李平² 袁程敏¹ 孙涛¹ 崔建奇^{1,2*}

(¹宁夏医科大学颅脑疾病重点实验室, 省部共建国家重点实验室培育基地, 银川 750004;

²宁夏医科大学基础医学院, 银川 750004)

摘要 该研究将构建的含淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)基因启动子的萤火虫荧光素酶报告质粒与Pur α 全长基因或含不同结构域的Pur α 缺失突变体共转染到U87MG细胞中, 进行萤火虫荧光素酶活性测定, 以确定Pur α 对APP基因表达的调控作用。同时, 将Pur α 全长基因及含有不同结构域的Pur α 缺失突变体的真核表达载体分别转染至U87MG细胞, 使目的蛋白过表达, 通过实时定量PCR(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹(Western blot)研究Pur α 不同的结构域对APP基因在转录、翻译水平的调控作用。结果显示, Pur α 全长蛋白及其不同结构域对APP基因表达均有不同程度的抑制作用, 但至少保持N-端或C-端的结构域可能是维持Pur α 蛋白功能的必要条件。

关键词 Pur α ; 蛋白质结构; 结构域; APP; 基因表达

Effects of Pur α or Its Domains on the Regulation of APP Gene Expression

Li Yongling^{2#}, Jia Zhongfa^{2#}, Chai Juan¹, Li Ping², Yuan Chengmin¹, Sun Tao¹, Cui Jianqi^{1,2*}

(¹Ningxia Key Laboratory of Cerebrocranial Diseases, the Incubation Base of National Key Laboratory, Yinchuan 750004, China;

²School of Basic Medical Sciences, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Abstract The eukaryotic expression vector pCDNA3.0-Pur α and the deletions which contain the different DNA binding domains were constructed. Then co-transfected into U87MG cells with Luciferase reporter construct with which the APP promoter (-170/+147) was inserted into the upstream of Luciferase gene. The Luciferase assays were performed to analyze the transactivation effects of Pur α on APP gene expression. The Real-time PCR and Western blot were used to evaluate the effects of Pur α and the different domains on APP gene expression both in transcriptional and translational levels. The results of Luciferase assay demonstrated that the full length of Pur α and the different deletions could down-regulate APP promoter activities in various extent; at the meantime, the results of Real-time PCR and Western blott confirmed that Pur α could suppress APP gene expression both in transcriptional and translational levels, but at least to keep the intact structure in N-terminal or C-terminal of the Pur α may be essential for maintenance of the functions of Pur α .

Keywords Pur α ; protein structure; domain; amyloid precursor protein; gene expression

收稿日期: 2015-04-29 接受日期: 2015-07-13

国家自然科学基金(批准号: 81260197)和国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2012CB722408、2014CB560711)资助的课题

*共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0951-6880697, Email: jianqi@gmail.com

Received: April 29, 2015 Accepted: July 13, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81260197) and the State Key Development Program for Basic Research of China (973 Program) (Grant No.2012CB722408, 2014CB560711)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-951-6880697, E-mail: jianqi@gmail.com

网络出版时间: 2015-09-06 17:00:53 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150906.1700.004.html>

Pur α 是一种广泛存在于体内而且能与核酸结合的蛋白质。它能结合于小鼠鞘磷脂蛋白基因启动子的DNA特异序列上,根据这个特性,最初从小鼠的大脑中纯化得到这种蛋白质^[1-2]。人类Pur α 的典型特征是能结合于人*c-Myc*基因上游的DNA序列,它的cDNA已经从HeLa细胞中克隆并进行了序列分析^[3-4]。小鼠Pur α 序列与人Pur α 序列几乎相同,在所有的322个氨基酸中仅有两个氨基酸不同^[4-6]。Pur α 具有模体结构,它的中心部位为DNA结合区,含有三个1级重复序列和两个2级重复序列^[7]。其他比较显著的结构特征还包括N-端的富含甘氨酸区,一个“Psycho”模体区^[5]和C-端的富含谷氨酰胺和谷氨酸区。在整个进化过程中,Pur α 的DNA结合区域的序列是极其保守的。

Pur α 、Pur β 和Pur γ 同属于Pur家族。Pur α 有两种不同的异构体,使用不同的多聚腺苷酸位点^[6]。Pur α 几乎在所有后生动物组织中表达^[8],它是一种多功能蛋白质,既可以与DNA结合,也可以与RNA结合,在DNA复制起始、mRNA转录和蛋白质翻译等过程中都发挥着不同程度的作用^[8-9]。也有文献报道,在神经元中Pur α 可以转运并结合在mRNA上^[10-11]。Pur α 与病毒和细胞复制起始位点的DNA序列有着很密切的关系,由于复制和转录的起始需要双链DNA的解链,这比较符合Pur α 作为一种单链核酸结合蛋白,具有使DNA螺旋失稳的特点^[12]。此外,近来研究还发现,Pur α 在DNA损伤修复方面也发挥着一定的作用^[13-14],这对维持神经系统基因组的稳定性有着一定的意义。

Pur α 作为转录因子在调控基因转录方面的作用是双重性的。对于某些基因来说,它可以作为一种转录活化因子而调节着这些基因的表达,如多瘤病毒(polyomavirus, JC)的早期和晚期启动子^[15-16]、人类获得性免疫缺陷病毒-1(human immunodeficiency virus-1, HIV-1)的长末端重复序列^[17]以及一些编码细胞因子的基因启动子[如肿瘤坏死因子 α (TNF α)^[18]、髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)^[19-20]、 β 2型整联蛋白(β 2-integrin)^[21]、胎盘催乳激素(placental lactogen)^[22]、CD11c β 2型整联蛋白(CD11c β 2-integrin)^[23]、转化生长因子 β 1(TGF β 1)^[24]、神经特异型FE65蛋白^[25]以及血小板衍生型生长因子-A(platelet-derived growth factor-A, PDGF-A)^[26]]。最近的一项蛋白质组学分析研究结果发现,Pur α 可以结合到髓鞘蛋白脂*Plp1*

基因的内含子区域的增强子上(在中枢神经系统的发育过程中的髓鞘形成阶段,该增强子负责*Plp1*蛋白的大量合成);另一方面,Pur α 对另外一些基因表达呈负调控作用。最有趣的是,Pur α 可以对自己基因的启动子进行负调控^[27]。受Pur α 负调控的基因包括 α -肌动蛋白(α -actin)^[28-31]、淀粉样前体蛋白^[32]、CD43^[33-34]、 α -肌球蛋白(α -myosin)^[35]、*fas*^[36]、*gata-2*^[37]以及生长激素抑制素(somatostatin)^[38]等。

淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)是广泛存在于体内的一种跨膜蛋白,其编码基因位于人类第21条染色体上。APP在整个进化过程中高度保守,在发育方面的调控作用与突触形成是平行的^[39]。在小鼠发育过程中,APP基因表达的高峰出现在胚胎的第二周,这个时间点恰好也是突触形成的高峰时期,而到了成年,其表达逐渐降低到一个较低的水平。APP有多种异构体,许多研究表明,在哺乳动物的神经系统中这些异构体的表达模式是不同的^[40]。APP在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的发病过程中扮演着重要的角色,一般认为,该蛋白质表达的增加可能会对AD的病理改变有着促进作用,也可能会诱发淀粉样蛋白质多肽(amyloid β -peptide, A- β)的产生和沉积,并由此引发神经组织的损害^[41-42]。APP能促进神经元分枝和突触的形成,调节神经元的兴奋性和突触可塑性,同时,可能保护神经元免于氧化应激的损伤^[39]。另外,已有的研究结果表明,APP在血液凝固、血小板活化以及免疫细胞对损伤和感染的应答方面具有潜在功能^[43]。

我们以前的研究发现,人转录因子活化蛋白Pur α 对APP基因表达有负调控作用^[32]。而对于Pur α 来说,其结构上特异性在转录调控方面的详尽机制目前仍然不是十分清楚。本文对Pur α 蛋白质不同结构域在APP基因表达调控中的作用进行了详尽的研究,以期揭示Pur α 蛋白质结构与功能之间的有机联系。

1 材料与方法

1.1 材料

真核表达载体pCDNA3.0以及报道质粒载体pGL3-basic和含有APP启动子-170/+147的报道质粒载体pGL3 basic-APP(-147/+170)系本实验室保存;U87MG细胞为本实验所保存;构建质粒所用到的内切酶、dATP、逆转录试剂盒(RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit)均购自Thermo公司,T4

连接酶、pEASY-T1购自TRANS Gen Biotech公司, IPTG购自Merck公司, PCR Mix和real time PCR Mix购自CW BIO公司, Lipofectamine® 2000试剂购自Invitrogen公司, Dual-Glo® Luciferase Assay System试剂购自美国Promega公司, BCA试剂盒购自凯基生物公司, Pur α 抗体购自美国Abcam公司(能识别1-100氨基酸序列: MADRDSGSEQ GGAALGSGGS LGHPGSGSGS GGGGGGGGGG GSGGGGGGA PGGLQHETQE LASKRVDIQN KRFYLDVKQN AKGRFLKIAE VGAGGNKSRL), GFP抗体购自美国ORIGENE公司, APP抗体购自Millipore公司、 β -actin抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 质粒构建

首先, 根据图1所示的Pur α 蛋白的结构来进行不

同的缺失片段的构建, 所构建的四个片段的详细信息见表1。

根据上表的信息设计PCR引物(表2)。通过PCR扩增目的基因, 扩增的PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳来比对分子量大小, 并对分子量与预期结果一致的目的片段进行纯化和回收。纯化的目的条带需要两个末端加A进行进一步的亚克隆, 使用taq polymerase和dATP在72 °C作用30 min完成末端加A过程。将末端加A后的PCR片段与pEASY-T1克隆载体进行连接完成亚克隆过程, 连接反应在16 °C水浴环境下过夜完成。第2 d将连接产物转化到感受态细胞中, 然后将转化的菌液涂到含有X-gal和IPTG的氨苄青霉素的琼脂培养板上, 置于37 °C培养箱中过夜。次日待菌斑形成后进行蓝白斑筛选。挑取白斑

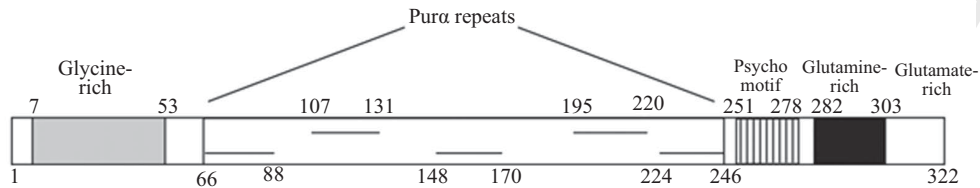


图1 Pur α 蛋白质结构示意图

Fig.1 Schematic diagram of the structure of Pur α protein

表1 Pur α 全长及不同缺失突变体的片段大小及其特点

Table 1 The sizes and characteristics of full length and different deletions of Pur α

片段名称 Name of fragment	基因大小 Gene size	碱基起止 Start and end of bases	氨基酸起止 Start and end of amino acids	特点 Characteristic
Full length Pur α	969	1-969	1-322	Full length Pur α
P1	807	160-966	54-322	The glycine rich domain in N-terminal was deleted
P2	321	646-966	216-322	Including the 3rd class II binding domain and C-terminal
P3	651	1-648	1-216	Complement of P2, containing N-terminal and preceding 4 DNA binding domains
P4	435	253-687	85-229	Lack of N-terminal and C-terminal

表2 设计的引物

Table 2 Designed primers

引物 Primer	序列 Sequence
Pur α -F	5'-CGC GGA TTC ATG GCG GAC AGC GGC AGC-3'
Pur α -R	5'-CCG GAA TTC TCA ATC TTC CCC TTC CTC-3'
P1-F	5'-CGC GGA TCC ATG CTG CAG GAG ACG CAG GA-3'
P1-R	5'-CCG GAA TTC TCA ATC TTC TTC CCC TTC TTC CTC-3'
P2-F	5'-CGC GGA TCC ATG GAG CTG CCC GAG GGC ACC TCC TTG-3'
P2-R	5'-CCG GAA TTC TCA ATC TTC TTC CCC TTC TTC CTC-3'
P3-F	5'-CGC GGA TTC ATG GCG GAC AGC GGC AGC-3'
P3-R	5'-CCG GAA TTC TCA GGC CGG CTC CTC CTC CAC TCC GTA-3'
P4-F	5'-CGC GGA TCC ATG CTG AAG ATC GCC GAG GTG GGC GCG-3'
P4-R	5'-CCG GAA TTC TCA GCG CTT GTT GTC CAC AGT CAA GGA-3'

在LB培养基中过夜培养,提取质粒并酶切鉴定,对鉴定结果为阳性且大小正确的片段进行切胶回收。随后将回收的片段克隆到pCDNA3.0真核表达载体中去。简言之,将真核表达载体pCDNA3.0用BamH I与EcoR I双酶切,纯化回收线性化的载体DNA,与同样酶切的Pura缺失突变的回收片段在16 °C水浴环境下过夜连接,并进行转化、铺板、挑单克隆、摇菌、提质粒、酶切鉴定,最终通过序列测定进行确定。

1.3 萤火虫荧光素酶报告基因实验

将构建好的质粒与pGL3 basic以及pGL3 basic-APP(-170/+147)报道质粒共转染到U87MG细胞中,实验参照Invitrogen公司的Lipofectamine® 2000试剂说明书进行。细胞转染后继续培养48 h,收获细胞进行实验。简言之,弃去细胞培养板中的培养基,然后用PBS洗涤细胞,用胰酶将细胞从培养板上消化下来,1 000 r/min离心5 min收集细胞,然后加入100 μ L 1 \times lysis buffer消化细胞提取细胞蛋白。随后,取50 μ L上清蛋白液加入到96孔测量板中,设置自动进样器2和3分别加入50 μ L Dual-Glo® Luciferase Reagent和Dual-Glo® Stop & Glo Reagent试剂,用Centro LB 960进行测定,在Mikrowin2000发光仪器上,依照美国Promega公司生产的Dual-Glo® Luciferase Assay System对萤火虫荧光素酶活性进行测定,用Renilla作为内参来校正转染效率。

1.4 实时定量PCR(Real-time PCR)

将构建成功Pura过表达载体和空载体分别转染U87MG细胞,培养48 h后,用Trizol法提取细胞总

RNA,用Nanodrop分光光度仪对RNA进行定量,当 D_{260}/D_{280} 在2.0左右时进行实验,使用Thermo逆转录试剂盒进行逆转录并合成cDNA,然后将合成的cDNA液稀释10倍,取出2 μ L用荧光Mix进行Real-time PCR,用Bio-Rad CFX96™ Real-time System进行检测。PCR反应所用的引物见表3,所用的扩增程序见表4,用GAPDH作为内参。

1.5 蛋白质免疫印迹(Western blot)

将构建成功Pura过表达载体和空载体分别转染U87MG细胞,培养48 h后,收集细胞。用冷的PBS洗涤细胞后,再用加有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA缓冲液裂解细胞,离心除去不溶的细胞碎屑,用BCA试剂对细胞溶解物进行蛋白质定量。取含40 μ g总蛋白的细胞裂解液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结束后转印到PVDF膜,用5%脱脂奶粉溶液进行封闭,一抗4 °C孵育过夜,TBST洗膜5次,每次5 min,然后加入相应的二抗,室温下孵育120 min,TBST洗膜5次,用ODYSSEY CLx进行检测。一抗比例1:1 000,GFP抗体比例1:1 000,内参 β -actin比例1:3 000,荧光二抗比例1:5 000。

1.6 统计学分析

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用SPSS 20.0统计软件进行统计学处理,采用单因素方差分析,多组间比较用LSD法进行均数间的两两比较,检验水准 $\alpha=0.05$,实验均重复3次以上。

2 结果

2.1 pCDNA3-Pura全长及四个突变体载体的构建与鉴定

所构建pCDNA3-Pura全长及四个突变体载体经酶切鉴定与设想的一致(图2),并同时测序分析以做进一步确认。

2.2 Pura对APP基因启动子表达活性的影响

将构建的含有Pura不同结构域的真核表达载

表3 Real-time PCR的引物

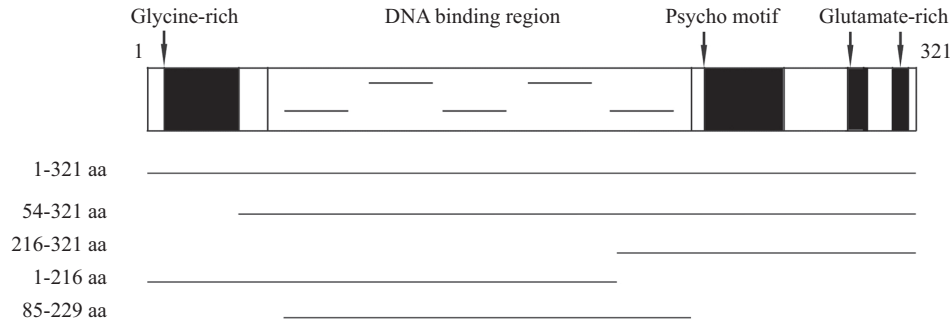
Table 3 Primers for Real-time PCR

引物 Primer	序列 Sequence
APP-F	5'-ATT CTT ACA CCA GGA GAG-3'
APP-R	5'-GAA TCC ACA TTG TCA CTT-3'
GAPDH-F	5'-GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT-3'
GAPDH-R	5'-GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG-3'

表4 Real-time PCR扩增程序

Table 4 The amplification procedure for Real-time PCR

步骤 Step	温度(°C) Temperature (°C)	时间 Time	循环数 Number of cycles
Initial denaturation	94	3 min	1
Denaturation	94	30 s	
Annealing	60	30 s	40
Extension	72	45 s	

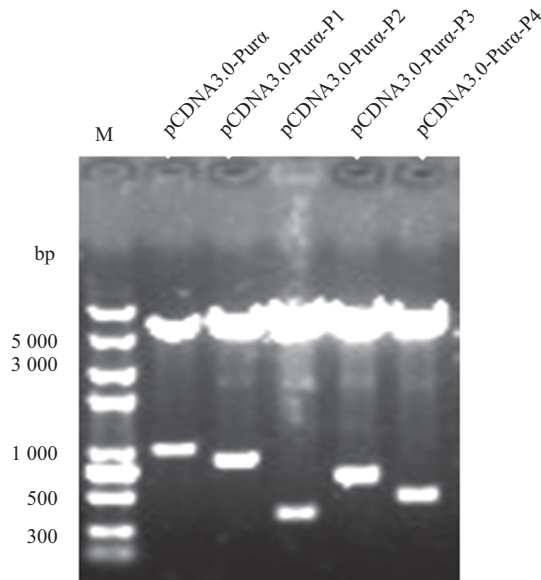


Pura结构示意图, 位于中心区域的DNA结合区包含三个I级重复序列和两个II级重复序列, 它的N-端富含甘氨酸, C-端含有一段模体和谷氨酰胺与谷氨酸富集区。我们按照上图片大小构建Pura片段的长度。

The structure of full length Pura. The central DNA binding region contains 3 class I and 2 class II repeats, the N-terminal has a glycine-rich domain and the C-terminal contains a psycho motif and glutamine and glutamic acid-rich domains.

图2 Pura的结构以及含有不同结构域的Pura缺失片段示意图

Fig.2 Schematic diagram of Pura and its various deletions



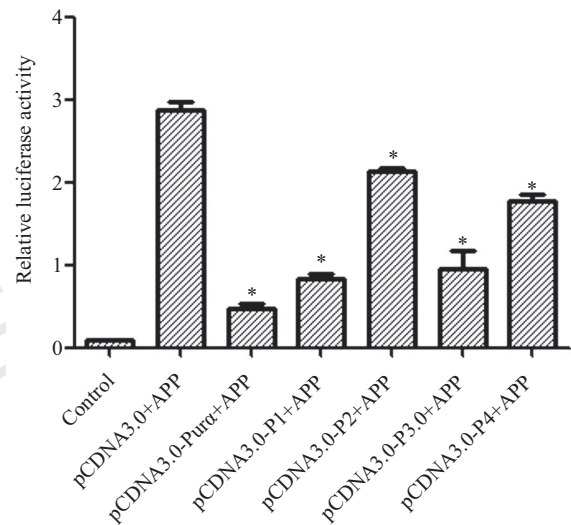
所构建的pCDNA3.0-Pura全长以及不同的缺失突变真核表达质粒用EcoR I和BamH I双酶切后进行琼脂糖凝胶电泳的图谱, 所显示插入片段的大小与实验设计一致。

The constructed full length Pura in eukaryotic expression vector pCDNA3.0 as well as their various deletions which contain the different domains of Pura. The constructs were identified with endonuclease cutting (EcoR I and BamH I). The agarose gel electrophoresis demonstrated that the size of inserts was consistent with the experimental expectation.

图3 构建质粒酶切鉴定

Fig.3 Identification of constructs with endonuclease cutting

体, 全长Pura以及用作对照的空白载体pCDNA3.0与含有APP基因启动子的荧光素酶报告质粒载体PGL3 Basic-APP(-170/+147), 分别共转染到U87MG细胞中, 然后, 用Promega公司的Luciferase试剂盒检测荧光素酶活性来评估含有不同结构域的Pura缺失突变体对APP启动子活性的影响。结果显示, 与对照组相比, Pura全长和含有不同结构域的Pura缺



* $P < 0.05$, 与对照组比较。

* $P < 0.05$ vs control group.

图4 全长Pura及含有不同结构域的Pura缺失突变体真核表达质粒对APP基因启动子活性的影响

Fig.4 The effects of full length Pura and its deletions which contain different domains on APP gene promoter activities

失突变体对APP启动子的活性都有不同程度的抑制作用(图4); 与全长的Pura相比, 各个不同的缺失突变体的影响效果是不一致的: 去除N-端富含甘氨酸区域, 但保持完整的5个DNA结合区域和C-端富含谷氨酸、谷氨酰胺以及Psycho模体的P1所受的影响比较小; 其次为去除第5个DNA结合域和C-端的P3突变体; 而与P3在序列上互补的P2, 只保留了第5个DNA结合区域以及完整的C-端, 则其活性明显受到影响; 同时去除C-端和N-端序列, 仅保留5个DNA结合区域的P4, 则对APP启动子的调控作用明显减弱。以上结果说明, 维持Pura基因结构的完整性对Pura的活性是非常重要的, Pura对APP启动子活性的调

控可能在于第1到第4个DNA结合区域,同时至少要维持C-端和N-端任何一个结构的完整,若是没有两个末端结构的完整,即使保留全部5个DNA结构域,Pura的活性依然受到影响。

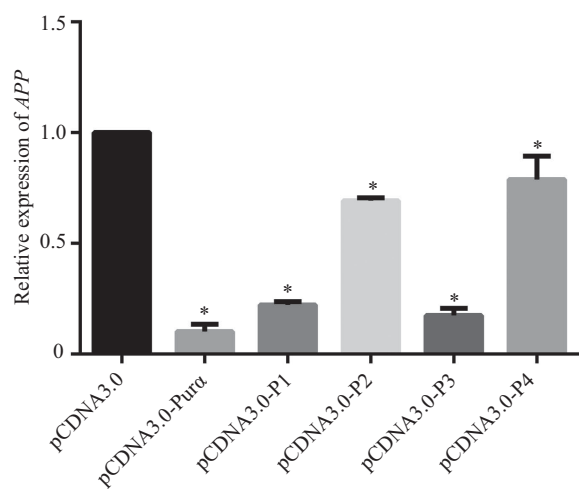
2.3 Pura在mRNA水平上对APP基因表达的影响

为了进一步确定Pura在mRNA水平上对APP基因表达的调控作用,我们将构建的含不同结构域的全长Pura缺失突变体的真核表达载体质粒(pCDNA3.0-P1、pCDNA3.0-P2、pCDNA3.0-P3和pCDNA3.0-P4)、全长Pura真核表达载体质粒pCDNA3.0-Pura以及用于作为对照的真核表达空白载体质粒pCDNA3.0分

别转染到U87MG细胞中,然后提取细胞总RNA,通过qPCR检测不同的Pura缺失突变体对APP基因在mRNA水平上的影响。结果显示,Pura以及不同的缺失突变体对APP基因在mRNA水平上都有一定的影响,其趋势与Luciferase的实验结果基本上是一致的,全长的Pura对APP基因在mRNA水平上有明显的影响,而含不同缺失片段的突变体与全长Pura相比(图5),其影响的效果要略为降低,但P1和P3的影响效果比P2和P4明显要好。

2.4 Pura在蛋白水平上对APP基因表达的影响

为了进一步研究不同的Pura结构域对APP基因在蛋白水平上的作用,我们将全长的Pura真核表达载体pCDNA3.0-Pura以及所构建的含有不同蛋白结构域的缺失突变体的真核表达载体pCDNA3.0-P1、pCDNA3.0-P2、pCDNA3.0-P3和pCDNA3.0-P4分别转染到U87MG细胞中,48 h后收获细胞总蛋白进行蛋白免疫印迹实验以分析APP蛋白有表达情况,从而确定Pura蛋白不同的结构域对APP蛋白表达的影响作用。结果显示,与对照组相比,不同的Pura缺失突变体对APP蛋白的表达都有不同程度的抑制作用,而以pCDNA3.0-P3对APP蛋白表达的影响作用最为明显。APP蛋白的表达趋势与其在mRNA水平上的影响基本是一致的。为了确定Pura蛋白在细胞内的表达,同时也通过Western blot检测了细胞内Pura蛋白的表达情况。由于所用的Pura抗体仅能识别Pura蛋白的第1~100氨基酸残基,并不能完全识别其他缺失突变体的表达情况,因此又构建了含有GFP-tag

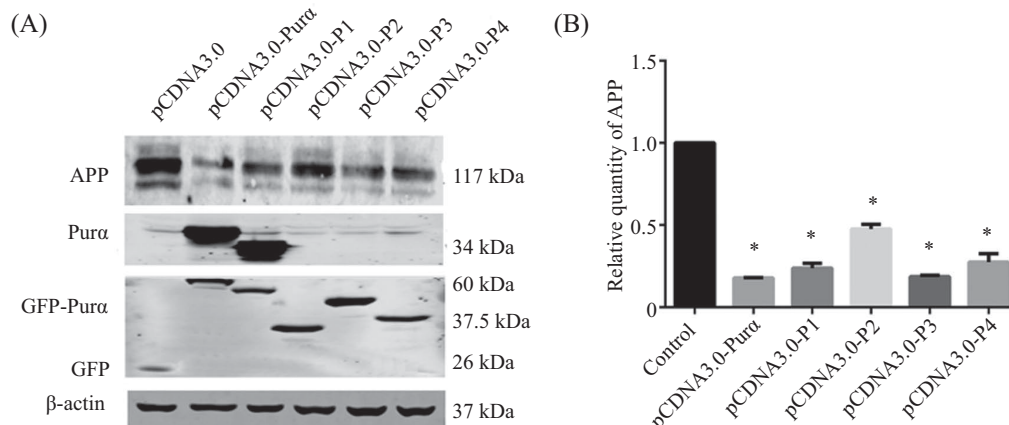


* $P < 0.05$, 与对照组比较。

* $P < 0.05$ vs control group.

图5 全长Pura及其含有不同结构域的缺失突变体对APP基因表达在mRNA水平上的影响

Fig.5 Effects of Pura and its deletions which contain the different domains on the expression of APP gene in mRNA level



A: 蛋白免疫印迹分析检测全长Pura蛋白以及其含有不同结构域的缺失突变体过表达对APP蛋白表达的影响; B: 用密度扫描法对APP蛋白表达进行定量分析, * $P < 0.05$, 与对照组比较。

A: the effects of full length Pura and its deletions which contain the different domains on APP protein expression; B: the results of Western blot analyzed with densitometry and quantified. * $P < 0.05$ vs control group.

图6 蛋白免疫印迹分析检测含有不同结构域的Pura缺失突变体对APP基因表达的影响

Fig.6 The effects of Pura deletions containing the different structural domains on APP gene expression detected by Western blot

的融合表达突变体pEGFP-C1-P1、pEGFP-C1-P2、pEGFP-C1-P3和pEGFP-C1-P4, 然后通过检测GFP蛋白的表达水平来间接地反映Pur α 突变体蛋白在细胞内的表达情况。结果表明, 所有的缺失突变体在细胞内都有很好的表达, 而且Pur α 对APP蛋白质的表达有很强的负调控作用(图6)。

3 讨论

Pur α 是一个多功能蛋白质, 其蛋白家族成员的序列从细菌到人是保守的^[9]。它能以一种序列特异性的方式(富含GC区域的GGN重复序列)结合于单链DNA和RNA, Pur α 在DNA复制和转录方面起着多种重要的作用^[8-9], 它是一种在RNA分隔式翻译中的重要元件^[10,44]。Pur α 是一种广泛表达的蛋白质, 然而它显示出了对发育和组织特异性的调控作用^[45]。例如, 在小鼠大脑胚胎发育时期, Pur α 蛋白质的表达很低, 然而在出生后的第1周, 它的表达迅速升高, 在第18 d达到高峰, 然后Pur α 维持在一个相对较高的表达水平直至成年。此外, 除了它在细胞核内的功能之外, Pur α 在神经元细胞的胞质中的含量也很丰富。特别是在突触的分支处, Pur α 、聚核糖体和细胞核内不均一核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNP)以一种复合体的形式存在^[11]。Pur α 还有助于维持基因组的稳定性, 在特异性的组织中有特异性的表达。在中枢神经系统, 已经证实了Pur α 主要参与mRNA转运和翻译的特殊机制^[46-47]。

Pur α 的蛋白质结构^[7,48]包括三大部分: N-端的富含甘氨酸区域、C-端的psycho模体、富含谷氨酰胺和谷氨酸区域以及中央的DNA结合区域。它的DNA结合区域包含3个1级重复序列和2个2级重复序列, 分别位于66~88、102~131、148~170、188~120和224~246位氨基酸区域(图1)。Graebisch等^[49]通过X-射线衍射分析发现, Pur α 含有旋转样折叠和一个不同寻常的核酸结合表面。Pur α 与核酸的结合是由其中央核心区域所介导的, 而此区域的信息并不是十分清晰。Graebisch等^[49]还发现, 果蝇的Pur α 从40~185位氨基酸部位有两个可以明确辨析的结构上的模体, 并命名为“PUR重复”。这两个重复序列相互作用而形成Pur α 的结构域, 而且DNA和RNA结合实验也确认了这个结合部位确实是有功能的。本研究结果也证实, 保持这个区域结构的完整对维持Pur α 的功能是必要的(P1和P3突变体), 而删除这个区域(P2)

则会影响Pur α 的功能。近来其他研究还发现, Pur α 的突变可在5q31.3微缺失综合征的患者引起明显的新生儿肌张力缺陷、癫痫和巨脑症^[50]。另外, Hunt等^[51]通过全基因组测序发现, Pur α 的突变是引起新生儿神经认知功能障碍的主要原因, 可引起明显的神经系统发育迟缓和学习能力的缺失。

阿尔茨海默病的一个重要的病理学标志是纤维性淀粉样 β 沉积物(A β)的出现, 这种淀粉样 β 多肽是来自淀粉样前体蛋白(APP)的裂解^[40]。已有研究发现, Pur α 蛋白质对APP的基因表达有负调控作用^[32], 其作用机理在于Pur α 蛋白质可以与APP基因启动子5'UTR的特异性序列结合, 从而抑制了Egr-1对APP基因的正调控作用^[55-56]。但是, Pur α 蛋白质存在着不同的DNA结合区域, 究竟是哪个结合区域在调控APP基因表达中发挥着重要作用呢? 我们的研究证明了Pur α 的N-端和C-端是维持Pur α 生物活性不可或缺的部位。Pur α 蛋白质可以负性调控APP基因的表达, 从而有可能减少A β 的形成和在脑内的沉积, 这对阿尔茨海默病的预防和治疗有着重要的意义。已有研究发现, APP是一种广泛表达的蛋白质, 在整个进化过程中极为保守, 在发育过程中受到严格的调控, 并且与突触形成相平行^[39]。在小鼠体内, APP蛋白质水平在出生后第2周时最高, 这与突触形成的高峰期相一致, 在成年以后逐步降低到一个较低的水平。

人和小鼠的APP启动子都缺乏传统的TATA和CCAAT盒, 却聚集了许多富含G/C的序列。已经有研究证实, 人和小鼠APP启动子有明显的序列重合^[52-54]。APP启动子活性在神经细胞中最高。靠近转录起始位点的许多启动子元件对启动子活性是至关重要的^[41]。人和小鼠APP启动子中富含G/C保守序列, 在大脑发育阶段以及成年脑组织的神经元中均有Pur α 和Egr-1的高表达。我们以前的研究已经发现, Pur α 过表达对APP基因表达存在着负调控作用^[32]。而与此相反的是, Egr-1对APP的表达则为正调控作用^[55], 两种因子都可以与APP启动子5'UTR的特异性位点相结合^[56]。为了进一步研究Pur α 蛋白的不同结构域对APP启动子的作用, 我们在前期实验的基础上, 设计了含有不同结构域的Pur α 缺失突变体, 通过其对APP启动子活性的影响来分析可能会起作用的结构域。我们所设计的四个结构互补的突变体, 从不同的方面来观察Pur α 结构与功能的关系。我们首先分别对N-端和C-端的功能进行了比较, 与全长的Pur α

相比, 缺失任何一个末端都会对*Pura*的功能有影响(P1和P3), 但是同时去除两个末端之后即使完整地保留*Pura*中央区的5个DNA结合区域, 然而*Pura*的活性也大受影响(P4), 由此可见, 富含甘氨酸的N-端和富含谷氨酸与谷酰胺的C-端对维持*Pura*的功能是不可或缺的。通过比较在序列上互补的P2与P3, 我们发现*Pura*蛋白对*APP*启动子DNA的结合应该在前4个DNA结合位点上, 这与Graebbscha等^[49]报道的*Pura*是通过中央的核心区域与核酸的结合一致; 为了进一步验证我们的实验结果, 我们将所构建的4种缺失突变体与全长的*Pura*真核表达质粒转染到U87MG细胞中, 分别通过Real-time PCR和Western blot在转录和翻译水平上检测*Pura*缺失突变体的作用。结果分析表明, 4个缺失突变体对*APP*基因表达的影响趋势是一致的, 说明*Pura*功能的维持需要至少N-端或C-端的存在, 去除两个末端, 仅保留5个DNA结合位点不足以维持*Pura*的功能。本文对*Pura*蛋白质的结构与功能结合起来进行了研究, 目前尚未见到类似的实验报道。

*Pura*对神经系统的发育的重要性已如前文所述。当缺乏*Pura*时, 出生后的小鼠仅能存活4周^[45]。在*Pura*基因敲除小鼠中所见到的这种表型上缺陷的严重程度与*Pura*在发育过程中的表达量的增加是平行的, *Pura*的表达水平在出生后10 d显著增高, 到第3周时达到峰值^[45], 而*Pura*基因敲除对小鼠最为显著的影响是神经元的发育缺陷。我们以前的研究只是探讨了*Pura*对*APP*基因表达的调控作用, 而没有涉及到*Pura*的结构域对*APP*基因表达的影响作用^[32]。本文从*Pura*的结构入手, 通过研究*Pura*蛋白结构域对其功能的影响, 进一步拓宽了*Pura*结构与功能关系方面的研究。当然, *Pura*含有5个DNA结合位点, 为了更进一步深入地对其结构进行详尽的研究, 我们还需进一步构建更多的不同的缺失突变体, 甚至包括点突变, 同时也需要进行相应的蛋白核酸结合实验来进一步明确*Pura*对*APP*基因表达调控的作用机制。

参考文献 (References)

- 1 Haas S, Gordon J, Khalili K. A developmentally regulated DNA-binding protein from mouse brain stimulates myelin basic protein gene expression. *Mol Cell Biol* 1993; 13(5): 3103-12.
- 2 Haas S, Thatikunta P, Steplewski A, Johnson EM, Khalili K, Amini S. A 39-kD DNA-binding protein from mouse brain stimulates transcription of myelin basic protein gene in oligodendrocytic cells. *J Cell Biol* 1995; 130(5): 1171-9.
- 3 Bergemann AD, Johnson EM. The HeLa Pur factor binds single-stranded DNA at a specific element conserved in gene flanking regions and origins of DNA replication. *Mol Cell Biol* 1992; 12(3): 1257-65.
- 4 Bergemann AD, Ma ZW, Johnson EM. Sequence of cDNA comprising the human pur gene and sequence-specific single-stranded-DNA-binding properties of the encoded protein. *Mol Cell Biol* 1992; 12(12): 5673-82.
- 5 Ma ZW, Bergemann AD, Johnson EM. Conservation in human and mouse Pur alpha of a motif common to several proteins involved in initiation of DNA replication. *Gene* 1994; 149(2): 311-4.
- 6 Liu H, Johnson EM. Distinct proteins encoded by alternative transcripts of the PURG gene, located contrapodal to WRN on chromosome 8, determined by differential termination/polyadenylation. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(11): 2417-26.
- 7 White MK, Johnson EM, Khalili K. Multiple roles for Puralpha in cellular and viral regulation. *Cell Cycle* 2009; 8(3): 1-7.
- 8 Johnson EM. The Pur protein family: Clues to function from recent studies on cancer and AIDS. *Anticancer Res* 2003; 23(3A): 2093-100.
- 9 Gallia GL, Johnson EM, Khalili K. Puralpha: A multifunctional single-stranded DNA- and RNA-binding protein. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(17): 3197-205.
- 10 Johnson EM, Kinoshita Y, Weinreb DB, Wortman MJ, Simon R, Khalili K, *et al.* Role of Pur alpha in targeting mRNA to sites of translation in hippocampal neuronal dendrites. *J Neurosci Res* 2006; 83(6): 929-43.
- 11 Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N. Kinesin transports RNA: Isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 2004; 43(4): 513-25.
- 12 Darbinian N, Gallia GL, Khalili K. Helix-destabilizing properties of the human single-stranded DNA- and RNA-binding protein Puralpha. *J Cell Biochem* 2001; 80(4): 589-95.
- 13 Wang H, Wang M, Reiss K, Darbinian-Sarkissian N, Johnson EM, Iliakis G, *et al.* Evidence for the involvement of Puralpha in response to DNA replication stress. *Cancer Biol Ther* 2007; 6(4): 596-602.
- 14 Wang H, White MK, Kaminski R, Darbinian N, Amini S, Johnson EM, *et al.* Role of Puralpha in the modulation of homologous recombination-directed DNA repair by HIV-1 Tat. *Anticancer Res* 2008; 28(3A): 1441-7.
- 15 Chen NN, Khalili K. Transcriptional regulation of human JC polyomavirus promoters by cellular proteins YB-1 and Pur alpha in glial cells. *J Virol* 1995; 69(9): 5843-8.
- 16 Krachmarov CP, Chepenik LG, Barr-Vagell S, Khalili K, Johnson EM. Activation of the JC virus Tat-responsive transcriptional control element by association of the Tat protein of human immunodeficiency virus 1 with cellular protein Pur alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(24): 14112-7.
- 17 Chepenik LG, Tretiakova AP, Krachmarov CP, Johnson EM, Khalili K. The single-stranded DNA binding protein, Pur-alpha, binds HIV-1 TAR RNA and activates HIV-1 transcription. *Gene* 1998; 210(1): 37-44.
- 18 Darbinian N, Sawaya BE, Khalili K, Jaffe N, Wortman B,

- Giordano A, *et al.* Functional interaction between cyclin T1/ cdk9 and Puralpha determines the level of TNFalpha promoter activation by Tat in glial cells. *J Neuroimmunol* 2001; 121(1/2): 3-11.
- 19 Tretiakova A, Steplewski A, Johnson EM, Khalili K, Amini S. Regulation of myelin basic protein gene transcription by Sp1 and Puralpha: Evidence for association of Sp1 and Puralpha in brain. *J Cell Physiol* 1999; 181(1): 160-8.
- 20 Wei Q, Miskimins WK, Miskimins R. Stage-specific expression of myelin basic protein in oligodendrocytes involves Nkx2.2-mediated repression that is relieved by the Sp1 transcription factor. *J Biol Chem* 2005; 280(16): 16284-94.
- 21 Kong T, Scully M, Shelley CS, Colgan SP. Identification of Pur alpha as a new hypoxia response factor responsible for coordinated induction of the beta 2 integrin family. *J Immunol* 2007; 179(3): 1934-41.
- 22 Limesand SW, Jeckel KM, Anthony RV. Puralpha, a single-stranded deoxyribonucleic acid binding protein, augments placental lactogen gene transcription. *Mol Endocrinol* 2004; 18(2): 447-57.
- 23 Shelley CS, Teodoridis JM, Park H, Farokhzad OC, Bottinger EP, Arnaout MA. During differentiation of the monocytic cell line U937, Pur alpha mediates induction of the CD11c beta 2 integrin gene promoter. *J Immunol* 2002; 168(8): 3887-93.
- 24 Thatikunta P, Sawaya BE, Denisova L, Cole C, Yusibova G, Johnson EM, *et al.* Identification of a cellular protein that binds to Tat-responsive element of TGF beta-1 promoter in glial cells. *J Cell Biochem* 1997; 67(4): 466-77.
- 25 Zambrano N, De Renzis S, Minopoli G, Faraonio R, Domini V, Scaloni A, *et al.* DNA-binding protein Pur alpha and transcription factor YY1 function as transcription activators of the neuron-specific FE65 gene promoter. *Biochem J* 1997; 328(Pt 1): 293-300.
- 26 Zhang Q, Pedigo N, Shenoy S, Khalili K, Kaetzel DM. Puralpha activates PDGF-A gene transcription via interactions with a G-rich, single-stranded region of the promoter. *Gene* 2005; 348: 25-32.
- 27 Muralidharan V, Sweet T, Nadruga Y, Amini S, Khalili K. Regulation of Puralpha gene transcription: Evidence for autoregulation of Puralpha promoter. *J Cell Physiol* 2001; 186(3): 406-13.
- 28 Carlini LE, Getz MJ, Strauch AR, Kelm RJ Jr. Cryptic MCAT enhancer regulation in fibroblasts and smooth muscle cells. Suppression of TEF-1 mediated activation by the single-stranded DNA-binding proteins, Pur alpha, Pur beta, and MSY1. *J Biol Chem* 2002; 277(10): 8682-92.
- 29 Knapp AM, Ramsey JE, Wang SX, Godburn KE, Strauch AR, Kelm RJ Jr. Nucleoprotein interactions governing cell type-dependent repression of the mouse smooth muscle alpha-actin promoter by single-stranded DNA-binding proteins Pur alpha and Pur beta. *J Biol Chem* 2006; 281(12): 7907-18.
- 30 Subramanian SV, Polikandriotis JA, Kelm RJ Jr, David JJ, Orosz CG, Strauch AR. Induction of vascular smooth muscle alpha-actin gene transcription in transforming growth factor beta1-activated myofibroblasts mediated by dynamic interplay between the Pur repressor proteins and Sp1/Smad coactivators. *Mol Biol Cell* 2004; 15(10): 4532-43.
- 31 Zhang A, David JJ, Subramanian SV, Liu X, Fuerst MD, Zhao X, *et al.* Serum response factor neutralizes Pur alpha- and Pur beta-mediated repression of the fetal vascular smooth muscle alpha-actin gene in stressed adult cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294(3): C702-14.
- 32 Darbinian N, Cui J, Basile A, Del Valle L, Otte J, Miklossy J, *et al.* Negative regulation of AbetaPP gene expression by pur-alpha. *J Alzheimers Dis* 2008; 15(1): 71-82.
- 33 Da Silva N, Bharti A, Shelley CS. hnRNP-K and Pur(alpha) act together to repress the transcriptional activity of the CD43 gene promoter. *Blood* 2002; 100(10): 3536-44.
- 34 Shelley CS, Da Silva N, Teodoridis JM. During U937 monocytic differentiation repression of the CD43 gene promoter is mediated by the single-stranded DNA binding protein Pur alpha. *Br J Haematol* 2001; 115(1): 159-66.
- 35 Gupta M, Sueblinvong V, Raman J, Jeevanandam V, Gupta MP. Single-stranded DNA-binding proteins PURalpha and PURbeta bind to a purine-rich negative regulatory element of the alpha-myosin heavy chain gene and control transcriptional and translational regulation of the gene expression. Implications in the repression of alpha-myosin heavy chain during heart failure. *J Biol Chem* 2003; 278(45): 44935-48.
- 36 Lasham A, Lindridge E, Rudert F, Onrust R, Watson J. Regulation of the human fas promoter by YB-1, Puralpha and AP-1 transcription factors. *Gene* 2000; 252(1/2): 1-13.
- 37 Penberthy WT, Zhao C, Zhang Y, Jessen JR, Yang Z, Bricaud O, *et al.* Pur alpha and Sp8 as opposing regulators of neural gata2 expression. *Dev Biol* 2004; 275(1): 225-34.
- 38 Sadakata T, Kuo C, Ichikawa H, Nishikawa E, Niu SY, Kumamaru E, *et al.* Puralpha, a single-stranded DNA binding protein, suppresses the enhancer activity of cAMP response element (CRE). *Brain Res Mol Brain Res* 2000; 77(1): 47-54.
- 39 Ohta M, Kitamoto T, Iwaki T, Ohgami T, Fukui M, Tateishi J. Immunohistochemical distribution of amyloid precursor protein during normal rat development. *Brain Res Dev Brain Res* 1993; 75(2): 151-61.
- 40 Mattson MP. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 1997; 77(4): 1081-132.
- 41 Lahiri DK, Ge YW. Role of the APP promoter in Alzheimer's disease: Cell type-specific expression of the beta-amyloid precursor protein. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1030: 310-6.
- 42 Neve RL, McPhie DL. Dysfunction of amyloid precursor protein signaling in neurons leads to DNA synthesis and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772(4): 430-7.
- 43 Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJ, Hopkins R, Smith DW, *et al.* beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 1995; 81(4): 525-31.
- 44 Ohashi S, Kobayashi S, Omori A, Ohara S, Omae A, Muramatsu T, *et al.* The single-stranded DNA- and RNA-binding proteins pur alpha and pur beta link BC1 RNA to microtubules through binding to the dendrite-targeting RNA motifs. *J Neurochem* 2000; 75(5): 1781-90.
- 45 Khalili K, Del Valle L, Muralidharan V, Gault WJ, Darbinian N, Otte J, *et al.* Puralpha is essential for postnatal brain development and developmentally coupled cellular proliferation as revealed by

- genetic inactivation in the mouse. *Mol Cell Biol* 2003; 23(19): 6857-75.
- 46 Jin P, Duan R, Qurashi A, Qin Y, Tian D, Rosser TC, *et al.* Pur alpha binds to rCGG repeats and modulates repeat-mediated neurodegeneration in a *Drosophila* model of fragile X tremor/ataxia syndrome. *Neuron* 2007; 55(4): 556-64.
- 47 Sofola OA, Jin P, Qin Y, Duan R, Liu H, de Haro M, *et al.* RNA-binding proteins hnRNP A2/B1 and CUGBP1 suppress fragile X CGG premutation repeat-induced neurodegeneration in a *Drosophila* model of FXTAS. *Neuron* 2007; 55(4): 565-71.
- 48 Wortman MJ, Johnson EM, Bergemann AD. Mechanism of DNA binding and localized strand separation by Pur alpha and comparison with Pur family member, Pur beta. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1743(1/2): 64-78.
- 49 Graebisch A, Roche S, Niessing D. X-ray structure of Pur-alpha reveals a Whirly-like fold and an unusual nucleic-acid binding surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(44): 18521-6.
- 50 Lalani SR, Zhang J, Schaaf CP, Brown CW, Magoulas P, Tsai AC, *et al.* Mutations in PURA cause profound neonatal hypotonia, seizures, and encephalopathy in 5q31.3 microdeletion syndrome. *Am J Hum Genet* 2014; 95(5): 579-83.
- 51 Hunt D, Leventer RJ, Simons C, Taft R, Swoboda KJ, Gawnecain M, *et al.* Whole exome sequencing in family trios reveals de novo mutations in PURA as a cause of severe neurodevelopmental delay and learning disability. *J Med Genet* 2014; 51(12): 806-13.
- 52 Hoffman PW, Chernak JM. The rat amyloid precursor protein promoter contains two DNA regulatory elements which influence high level gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 201(2): 610-7.
- 53 Izumi R, Yamada T, Yoshikai S, Sasaki H, Hattori M, Sakaki Y. Positive and negative regulatory elements for the expression of the Alzheimer's disease amyloid precursor-encoding gene in mouse. *Gene* 1992; 112(2): 189-95.
- 54 La Fauci G, Lahiri DK, Salton SR, Robakis NK. Characterization of the 5'-end region and the first two exons of the beta-protein precursor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159(1): 297-304.
- 55 马琳, 周瑜, 李永玲, 柴娟, 贾中发, 郭克, 等. Egr-1对APP基因表达的调控作用. *中国细胞生物学学报*(Ma Lin, Zhou Yu, Li Yongling, Chai Juan, Jia Zhongfa, Guo Ke, *et al.* Regulatory effects of Egr-1 on APP gene expression. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2015; 37(1): 39-46.
- 56 Chai J, Li YL, Guo K, Jia ZF, Ma L, Sun T, *et al.* Interplay between Pur α and Egr-1 in the transcriptional regulation of amyloid precursor protein gene expression. *Ann Clin Lab Res* 2015; 3(3): 20.