

儿童孤独症相关基因 *NRXN1β* 启动子功能分析

刘静茹, 孟莎莎, 周卫辉

重庆医科大学附属儿童医院, 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, 重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014

摘要: Neurexins 是神经特异性突触蛋白, Neurexin1 β 结构的异常与孤独症密切相关。为分析孤独症相关基因 *NRXN1β* 最小启动子和调节基因转录的功能元件, 本文构建了含 *NRXN1β* 基因上游调控区不同区域的荧光素酶报告基因质粒, 转染 HEK293 细胞后, 利用检测双荧光素酶报告基因的转录活性以确定 *NRXN1β* 基因最小启动子区, 进而筛选出相应的显著增强或抑制报告基因活性的功能区; 同时, 为鉴定顺式作用元件, 利用基因定点突变技术对基因功能区内和临近 DNA 序列进行连续的碱基突变; 最后, 采用转录因子预测工具对启动子功能区的转录调控元件进行分析。结果首次发现 *NRXN1β* 最小启动子区位于 -88~+156 bp, -88~-73 bp 和 +156~+149 bp 可增强启动子活性, +229~+419 bp 可抑制启动子活性, 且 -84~-63 bp 为能够显著性增强启动子活性的顺式作用元件, 该区域可能存在 DBP(Albumin D-site-binding protein, DBP)和 ABF1(Autonomously replicating sequence-binding factor 1, ABF1)两个转录因子结合位点。

关键词: *NRXN1β*; 启动子; DBP; ABF1; 转录因子

Functional analysis of autism-associated *NRXN1β* gene promoter

Jingru Liu, Shasha Meng, Weihui Zhou

Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; Chongqing Key Laboratory of Translational Medical Research in Cognitive Development and Learning and Memory Disorder; Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China

Abstract: Neurexins are neuron-specific synaptic proteins, and abnormal structure of Neurexin1 β is closely associated with autism. To characterize the minimal promoter of autism-associated *NRXN1β* gene and identify functional elements regulating its transcription, luciferase reporter plasmids containing different regulatory regions upstream of *NRXN1β* gene were constructed. After transfecting HEK293 cells with these plasmids, the minimal promoter region of *NRXN1β* gene was determined by detecting the transcriptional activity of luciferase reporter genes while the corresponding functional elements that significantly enhance or inhibit the activity of reporter genes were further screened out. To identify *cis*-acting elements, continuous nucleotide mutation within the functional regions and adjacent DNA sequences were generated using site-directed mutagenesis techniques and then transcriptional regulatory elements in corresponding regions were analyzed using transcription factor binding prediction tool. Our results showed for the

收稿日期: 2015-03-13; 修回日期: 2015-06-16

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(973 计划)(编号: 2012CB517903)资助

作者简介: 刘静茹, 硕士研究生, 专业方向: 孤独症致病机制。Tel: 023-63633751; E-mail: yanse.429093913@163.com

通讯作者: 周卫辉, 博士, 研究员, 研究方向: 分子生物学。E-mail: zhouweihui@hotmail.com

DOI: 10.16288/j.ycz.15-105

网络出版时间: 2015-6-30 15:43:25

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150630.1543.001.html>

first time that the minimal promoter region of human *NRXN1 β* gene is located between positions -88 and +156 (-88/+156); two regions -88/-73 and +156/+149 enhance while the region +229/+419 inhibits promoter activity. The region -84/-63 significantly enhances promoter activity as *cis*-acting elements, suggesting the presence of DBP and ABF1 transcription factor binding sites in this region.

Keywords: *NRXN1 β* ; promoter; ABF1; DBP; transcription factor

儿童孤独症(Autism),又称自闭症,是一种发源于婴幼儿期严重的神经系统疾病,在临床上主要表现为社会交往障碍、活动兴趣局限以及行为刻板重复等,甚至多数患儿还伴有不同程度的智力发育落后^[1]。普遍认为儿童孤独症是由多种生物学因素引起,而遗传与环境变化因素的共同作用是致病的主要原因。前人的研究表明^[2-5],*NRXN* 基因编码的 Neurexin 蛋白在神经突触的发生、发展和神经信号的传递中起着至关重要的作用。目前研究发现在孤独症的患儿中 *NRXN* 基因表达异常^[6]。Neurexin 轴突蛋白是一类突触前膜细胞表面粘附分子,其转录和翻译过程以及同突触后膜蛋白质之间的联系情况,可以影响突触的发生和信息传递^[7-12]。此外,神经元的分化也可以增强 Neurexin 蛋白的表达水平^[13]。因此,*NRXN* 基因启动子转录活性的高低影响着突触的发生发展,从而与孤独症致病机制密切相关。人 *NRXN1*、*NRXN2*、*NRXN3* 基因分别位于第 2、11、14 号染色体上,分别有 1.1 Mb、106 kb 和 1.6 Mb,每个亚型转录出 α 和 β 转录本^[14],迄今为止尚未见对 *NRXN* 基因家族启动子区转录调控顺式作用元件的研究报道。本研究首次分析了 *NRXN1 β* 启动子区域的功能区和调节基因转录的顺式作用元件。

1 材料和方法

1.1 材料

萤火虫荧光素酶报告基因载体 pGL4.10、质粒抽提试剂盒、Dual-Luciferase Reporter Assay Systems 购自 Promega 公司; *Escherichia coli* DH5 α 感受态菌株为本实验室留存; HEK293 细胞株购自 American Type Culture Collection 公司; Phusion 超保真 DNA 聚合酶及相关 PCR 试剂购自 New England Biolabs 公司;引物合成、脂质体转染试剂 Lipofectamine2000 购于 Invitrogen 公司;限制性内切酶和 Mutant BEST Kit 试剂购自 TaKaRa 公司;Tris Base、Na₂EDTA·2H₂O、Tryptone、Yeast Extract 购自 Sigma 公司。

1.2 质粒的构建

根据 *NRXN1 β* 的基因组序列设计引物(表 1),分别在引物的 5'侧翼引入限制性内切酶的位点和相应的保护碱基,按常规分子生物学方法提取 HEK293 细胞基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增反应。*Kpn* I 和 *Sac* I 双酶切 PCR 产物及载体 pGL4.10,回收纯化后,将 PCR 产物与载体经连接、转化,通过酶切鉴定,送上海英骏生物工程有限公司测序得到阳性报告基因质粒。

以构建成功的质粒为模板,设计具有单双突变碱基的正反向引物(表 1),按 Mutant BEST Kit 试剂盒说明书进行操作,经 PCR、酶切、测序鉴定后获得阳性含有突变的报告基因质粒。

1.3 细胞培养和转染实验

HEK293 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,37℃、5% CO₂ 条件下培养。用 Promega 公司去除内毒素质粒抽提试剂盒提取质粒,测定浓度及纯度。HEK293 细胞接种于 48 孔板,培养至细胞长至 70%~90%时进行转染。将 270 ng 的报告基因质粒和 30 ng 的内参照质粒 p3PRLuc 共转染,具体步骤参照 Lipofectamine 2000 说明书进行。每个样品做 3 个孔,进行 3 次重复实验。

1.4 双荧光素酶活性测定

HEK293 细胞转染 24~48 h 后,吸弃培养基。然后参照双荧光素酶报告基因分析系统(Promega)操作手册进行,在 Glo Max 20/20 Luminometer(Promega)仪器中检测每孔 Firefly 荧光素酶活性(*F* 值)和 Renilla 荧光素酶活性(*R* 值)。以 *F/R* 值表示各个样本的荧光素酶活性。

1.5 统计学和生物信息学分析

实验数据均采用 Graph Pad Prism5 软件(Graph Pad Software, USA)进行统计分析,所有数据采用 $\bar{X} \pm SD$,采用方差分析 ANOVA,显著水平 $P < 0.05$ 。

表 1 引物信息

引物名称	引物序列(5'→3')	扩增片段大小(bp)
NRXN1 β -543/+668	F : GGGGTACCCCTCCTTGTGAGTTTGGTC R : CGAGCTCCCTCCTTCGGACAGTCTTCT	1211
NRXN1 β -274/+668	F : GGGGTACCTGCCATTGTCATTGTAGTTC R : CGAGCTCCCTCCTTCGGACAGTCTTCT	942
NRXN1 β -209/+668	F : GGGGTACCTTCCCGTTTCGCCTTACA R : CGAGCTCCCTCCTTCGGACAGTCTTCT	877
NRXN1 β -106/+668	F : GGGGTACCATAGGCTCGTCCTCTGCA R : CGAGCTCCCTCCTTCGGACAGTCTTCT	774
NRXN1 β -88/+668	F : GGGGTACCTTGCATCCGAGCTTCAGT R : CGAGCTCCCTCCTTCGGACAGTCTTCT	756
NRXN1 β -73/+668	F : GGGGTACCAGTGATTGCTGTTTGGAGAC R : CGAGCTCCCTCCTTCGGACAGTCTTCT	741
NRXN1 β -37/+668	F : GGGGTACCAGCCCCCTTGCTTCACCAG R : CGAGCTCCCTCCTTCGGACAGTCTTCT	705
NRXN1 β +34/+668	F : GGGGTACCTCTCCCTTACTCCTTCGTC R : CGAGCTCCCTCCTTCGGACAGTCTTCT	634
NRXN1 β -106/+419	F : GGGGTACCATAGGCTCGTCCTCTGCA R : CGAGCTCCCTCCTGGAAGGTCCTCACT	525
NRXN1 β -106/+156	F : GGGGTACCATAGGCTCGTCCTCTGCA R : CGAGCTCCGCTCCTGACACTTACGC	262
NRXN1 β -106/+138	F : GGGGTACCATAGGCTCGTCCTCTGCA R : CGAGCTCCCCGGCGAGGGGTTTACA	244
NRXN1 β -106/+143	F : GGGGTACCATAGGCTCGTCCTCTGCA R : CGAGCTCTTACGCCGGCGAGGGGTTT	249
NRXN1 β -106/+149	F : GGGGTACCATAGGCTCGTCCTCTGCA R : CGAGCTCTGACACTTACGCCGGCGAGG	252
NRXN1 β -209/+156	F : GGGGTACCTTCCCGTTTCGCCTTACA R : CGAGCTCCGCTCCTGACACTTACGC	365
NRXN1 β -116/+156	F : GGGGTACCCCTCGTTACATAGGCTCGTC R : CGAGCTCCGCTCCTGACACTTACGC	272
NRXN1 β -88/+156	F : GGGGTACCTTGCATCCGAGCTTCAGT R : CGAGCTCCGCTCCTGACACTTACGC	244
NRXN1 β -73/+156	F : GGGGTACCAGTGATTGCTGTTTGGAGAC R : CGAGCTCCGCTCCTGACACTTACGC	229
p4NRXN1 β -116/+156 -88-87M	F : aaGCATCCGAGCTTCAGTG R : TGCAGAGGACGAGCCTAT	272
p4NRXN1 β -116/+156 -86-85M	F : TTaaATCCGAGCTTCAGTGATTGTC R : TGCAGAGGACGAGCCTAT	272
p4NRXN1 β -116/+156 -84-83M	F : TTGCggCCGAGCTTCAGTGATTGTC R : TGCAGAGGACGAGCCTAT	272
p4NRXN1 β -116/+156 -82-81M	F : TTGCATaaGAGCTTCAGTGATTGCTG R : TGCAGAGGACGAGCCTAT	272
p4NRXN1 β -116/+156 -80-79M	F : ccGCTTCAGTGATTGCTGTTT R : GGATGCAATGCAGAGGACGC	272
p4NRXN1 β -116/+156 -78-77M	F : GAaaTTCAGTGATTGCTGTTTGG R : GGATGCAATGCAGAGGACGC	272
p4NRXN1 β -116/+156 -76-75M	F : GAGCaaCAGTGATTGCTGTTTGGAG R : GGATGCAATGCAGAGGACGC	272
p4NRXN1 β -116/+156 -74-73M	F : GAGCTTggGTGATTGCTGTTTGGAG R : GGATGCAATGCAGAGGACGC	272

续表

引物名称	引物序列(5'→3')	扩增片段大小(bp)
p4NRXN1β -116/+156 -72-71M	F : aaGATTTGCTGTTTGGAGACTGCAG R : TGAAGCTCGGATGCAATGCAG	272
p4NRXN1β -116/+156 -70-69M	F : GTccTTTGCTGTTTGGAGACTGCAG R : TGAAGCTCGGATGCAATGCAG	272
p4NRXN1β -116/+156 -68-67M	F : GTGAaaTGCTGTTTGGAGACTGCAG R : TGAAGCTCGGATGCAATGCAG	272
p4NRXN1β -116/+156 -66-65M	F : GTGATTaaCTGTTTGGAGACTGCAG R : TGAAGCTCGGATGCAATGCAG	272
p4NRXN1β -116/+156 -64-63M	F : aaGTTTGGAGACTGCAGATTTCAT R : CAAATCACTGAAGCTCGGATGCAA	272
p4NRXN1β -116/+156 -62-60M	F : CTaaaTGGAGACTGCAGATTTCAT R : CAAATCACTGAAGCTCGGATGCAA	272

注：引物名称中下划线表示突变碱基所处位置，M 表示该质粒含突变碱基。引物序列中下划线表示引入 *Kpn* I 和 *Sac* I 的酶切位点，小写英文字母表示该位点的突变的碱基，F 表示上游引物，R 表示下游引物。

应用在线转录起始位点查询网站 DBTSS (<http://dbtss.hgc.jp/>)，查询 *NRXN1β* 转录起始位点。应用 UCSC Genome Browser(GRch37/hg19)公布的数据，对 *NRXN1β* 功能区碱基的保守性进行分析。应用在线转录因子预测软件 PROMO(<http://alggen.lsi.upc.es/>)对 *NRXN1β* 基因功能区内转录因子进行分析和预测。

2 结果与分析

2.1 *NRXN1β* 具有最小启动子活性的 5'侧翼边界

根据 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)公布的 *NRXN1β* 的参考基因 NM_138735.2 与 UCSC Genome Browser(GRch37/hg19)公布的人类基因组序列比对后，确定 *NRXN1β* 转录起始位点(第 1 个外显子的第 1 个核苷酸)位于基因组第 2 号染色体的 50574769 位置。为分析启动基因转录活性区，以第 1 个外显子第 1 个碱基为+1，首先构建了含有 *NRXN1β* 启动子区域的报告基因质粒 p4NRXN1β-543/+668，测序结果显示该质粒插入了人第 2 号染色体 50574227~50575537 的片段。除了在+59 位置有一个碱基 T 变为 A，属于单核苷酸多态性的位点 rs116199888(chr. 2: 50574892)外，其他序列完全正确。报告基因质粒 p4NRXN1β-543/+668 与内参质粒 p3PRluc 共转染 HEK293 细胞，报告基因相对荧光素酶活性结果显示，以质粒 pGL4.10 的荧光素酶活性为基准 1，p4NRXN1β-543/+668 其荧光素酶活性显著高于阴性对照 pGL4.10 空载体，为 32.48 ± 2.33 ($P<0.01$)，提示插入片段 NRXN1β-543/

+668 具有启动子活性。

为确定启动子 5'侧翼的最小边界，对 5'侧翼序列进行删切构建了一系列含有不同启动子区域的荧光素酶报告基因(图 1A 和 C)，并将重组质粒分别与内参质粒共转染 HEK293。

相对荧光素酶活性结果显示：对比实验组 b~d 和 f~h 发现在-543~-88 区域，启动子活性随插入片段的缩短变化无统计学意义；而对比实验组 h 和 i 在 NRXN1β-88/+668 进一步删切 15 bp 启动子活性随插入片段的缩短明显降低($P<0.01$)；对比实验组 i 和 j，-73~-37 删切后启动子活性改变无统计学差异；最后通过实验组 j 和 k 发现，-37~+34 删切后 *NRXN1β* 的启动子活性消失(图 1B 和 D)。

上述结果提示，具有较高活性的 *NRXN1β* 最小启动子 5'侧翼边界位于第 1 个外显子上游 88 的位置，而-88~-73 可能存在具有增强启动子活性作用的功能区。

2.2 *NRXN1β* 具有最小启动子活性的 3'侧翼边界

上述结果表明-543~-88 删切后相对荧光素酶活性无明显差异，而 5'侧翼删切到-73 荧光素酶的活性则显著降低，为避免载体 DNA 序列对-88/-73 的影响，选择插入片段的 5'端为-106 的报告基因质粒 p4NRXN1β-106/+668 为基础，构建了一系列含不同启动子区域的 3'侧翼序列删切质粒(图 2A、C 和 E)，其中 p4NRXN1β-106/+229 由 *Nhe* I 单酶切 p4NRXN1β-106/+668 质粒后重新连接得到，将质粒分别与内参质粒共转染 HEK293 细胞。

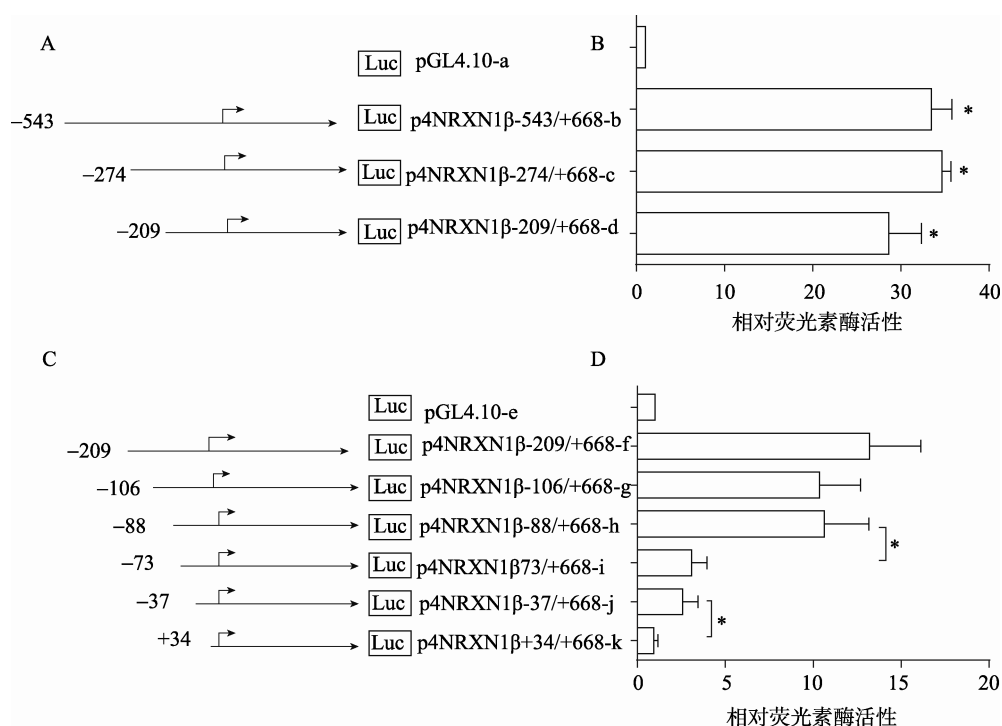


图 1 HEK293 中 5'侧翼序列质粒荧光素酶活性测定结果分析

A 和 C 为质粒删切示意图。箭头表示转录起始位点和转录方向, 横线代表 *NRXN1 β* 的启动子区, Luc 方框代表编码荧光素酶报告基因的序列所在位置, a~k 英文字母代表实验组顺序, 质粒命名以 Exon1 第 1 个碱基作为+1。B 和 D 为质粒相对荧光素酶活性结果分析图。* $P<0.05$ 表示与阴性对照质粒比较或标注的组间比较。

相对荧光素酶活性结果显示: 对比实验组 m~n、q~r 和 u~v 发现 3'侧翼序列+668~+419、+229~+156 和+149~+143 的缺失对 *NRXN1 β* 启动子的活性无明显改变; 对比实验组 n 和 o 发现+419~+229 删切后启动子活性升高了一倍, 差异具有统计学意义($P<0.05$); 对比实验组 t 与 u 可见进一步删切+156~+149 后启动子活性明显降低($P<0.01$); 实验组 v 和 w 的结果表明+143~+138 删除后启动子活性消失(图 2 B、D 和 F)。

上述结果提示, *NRXN1 β* 最小启动子 3'侧翼边界可能位于转录起始位点下游 156 的位置, 且在+149~+156 存在增强启动子活性的功能区, 在+229~+419 存在抑制启动子活性的功能区。

2.3 -88/+156 为具有高启动子活性的 *NRXN1 β* 最小的启动子区

基于上面的实验发现具有较高启动子活性的基因组序列的边界分别是 5' -88 和 3' +156。为进一步证实该区域-88/+156 是否为最小的启动子区, 构建了以+156 结尾的一系列 5'侧翼区的删切质粒(图 3A), 分别与内参质粒共转染 HEK293 细胞, 相对荧光素酶

活性结果显示: 重组质粒 p4NRXN1 β -209/+156、p4NRXN1 β -116/+156、p4NRXN1 β -106/+156 和 p4NRXN1 β -88/+156 之间无显著差异($P>0.05$), 而 p4NRXN1 β -73/+156 的荧光素酶活性显著低于 p4NRXN1 β -88/+156($P<0.05$)(图 3B)。结果说明 NRXN1 β -88/+156 确为迄今为止所发现的具有较高转录活性的最小的基因组序列, 而 NRXN1 β -73/+156 有可能是维持低活性基础转录的启动子区。

2.4 第 1 外显子上游的-84/-63 为 *NRXN1 β* 基因的顺式作用关键区域

应用在线转录起始位点数据库 DBTSS 寻找人 *NRXN1 β* 转录起始位点在基因组的定位, 发现成人脑组织 *NRXN1 β* 转录起始碱基位于第 1 个外显子上游 48, 而胚胎组织中位于第 1 个外显子上游 41。这两个位点都包括在最小启动子区-88/+156 中。为确认参与-88/-73 功能区的碱基序列, 以 p4NRXN1 β -116/+156 为模板, 在-88/-73 功能区附近和转录起始位点上游选择-88/-60 区构建了一系列突变质粒(图 4A), 转染 HEK293 细胞。

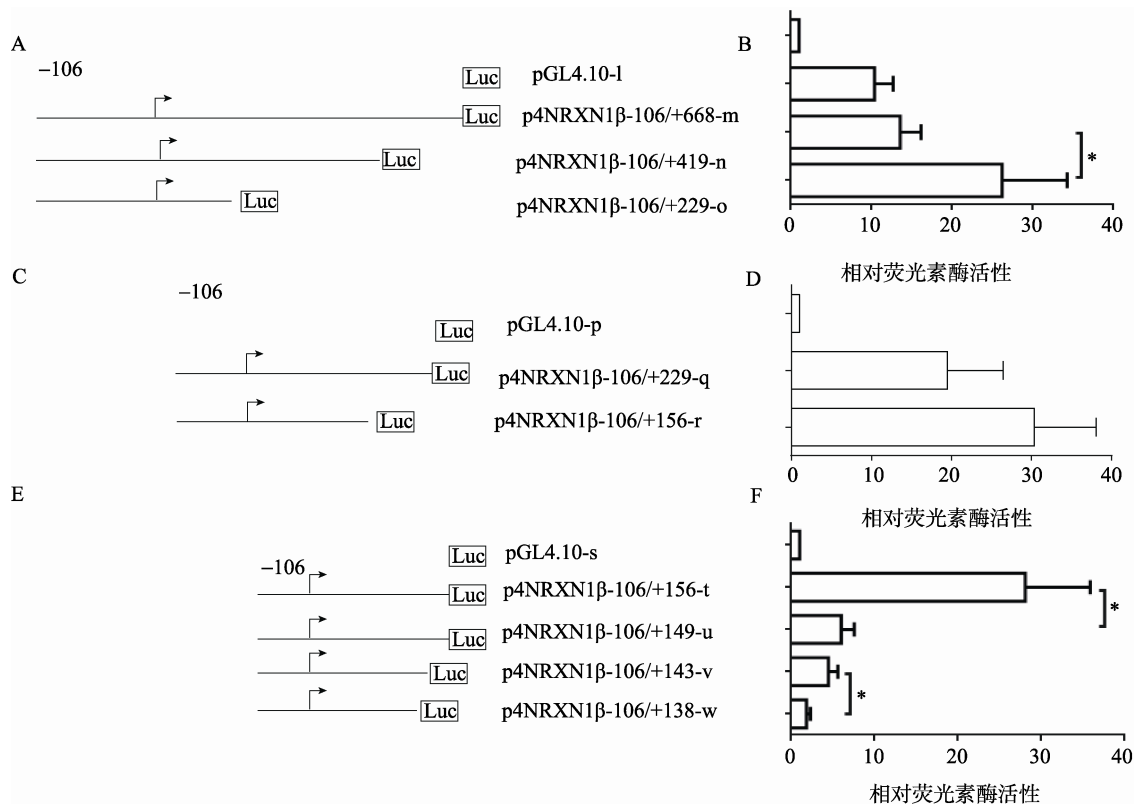


图 2 HEK293 中 3'侧翼序列质粒荧光素酶活性测定结果分析

A、C 和 E 为质粒删切示意图。箭头表示转录起始位点和转录方向，横线代表 *NRXN1β* 的启动子区，Luc 方框代表编码荧光素酶报告基因的序列所在位置，l~w 字母表示实验组顺序，质粒命名以 Exon1 第 1 个碱基作为+1。B、D 和 F 为质粒相对荧光素酶活性结果分析图。* $P < 0.05$ 表示标注的组间比较。

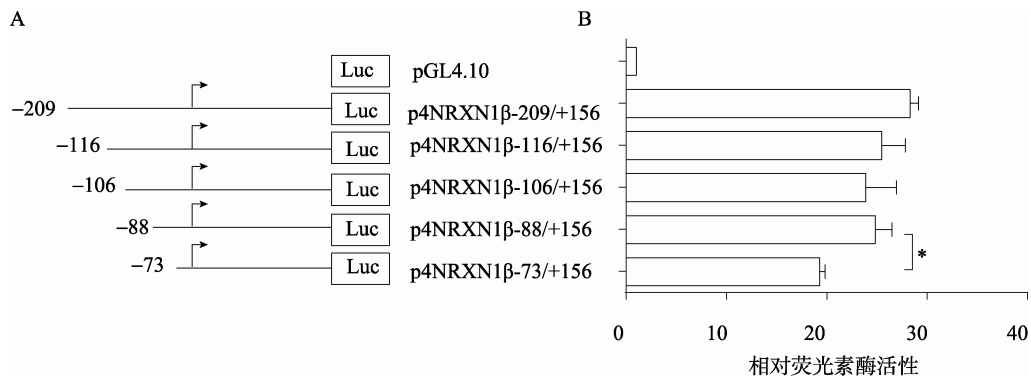


图 3 HEK293 中 3'端为+156 系列质粒荧光素酶活性测定结果分析

A 为质粒删切示意图。箭头表示转录起始位点和转录方向，横线代表 *NRXN1β* 的启动子区，Luc 方框代表编码荧光素酶报告基因的序列所在位置，质粒命名以 Exon1 第 1 个碱基作为+1。B 为质粒相对荧光素酶活性结果分析图。* $P < 0.05$ 表示标注的组间比较。

将图 4A 中实验组按 1~16 序号编码，以质粒 pGL4.10 为实验组 1，其相对荧光素酶活性为基准 1，对比第 2、3、4 和 16 实验组发现，-88~-85 以及 -62~-61 碱基突变后对启动子活性无重要作用 ($P \geq 0.05$)；对比第 2、5~11 实验组可见，-84~-71 的碱基突变对启动子活性有一定影响 ($P < 0.05$)；最后对比第 2 和 12~15 实验组，-70~-63 碱基突变后对启动子活性影

响显著 ($P < 0.01$) (图 4B)。

上述结果提示，*NRXN1β* 功能区 -88/-73 真正具有增强启动子活性的碱基位于 -84~-63 之间。

基于 UCSC Genome Browser (GRch37/hg19) 公布的数据，分析了这一功能区序列保守性，结果显示 *NRXN1β* 基因 5'侧翼区 -84~-63 区域，在多个不同的种属间高度保守 (图 5)，说明了此区域可能存在具有

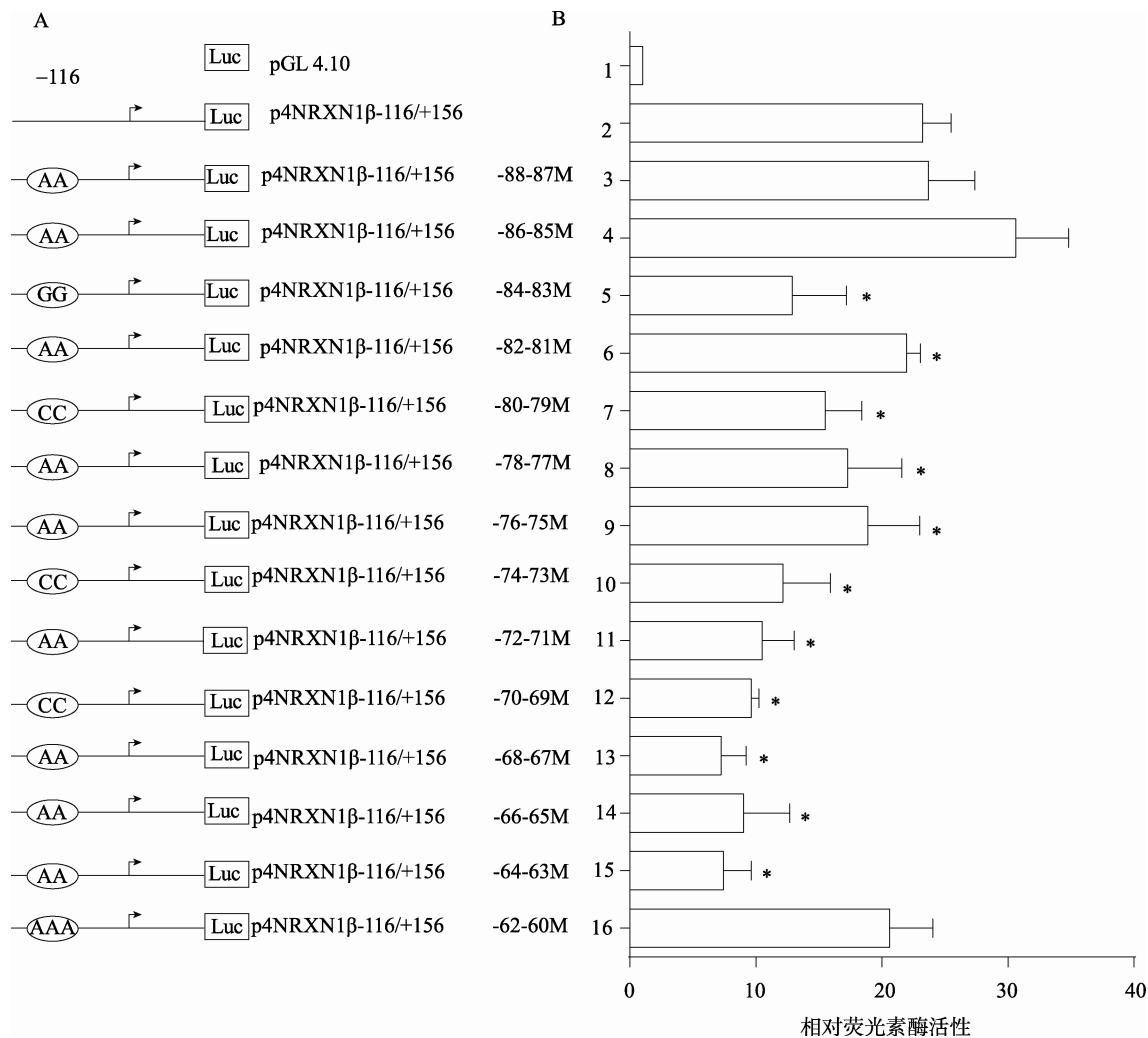


图 4 -88/-60 功能区定点突变质粒荧光素酶活性测定结果分析图
A 为质粒突变位点示意图。箭头表示转录起始位点和转录方向，横线代表 *NRXN1β* 的启动子区，Luc 方框代表编码荧光素酶报告基因的序列所在位置，质粒命名以 Exon1 第 1 个碱基作为+1，圈内大写英文字母表示该位置突变后的碱基。B 为质粒相对荧光素酶活性结果分析图。1~16 为实验分组编码。**P*<0.05 相比于 p4NRXN1β-116/+156。

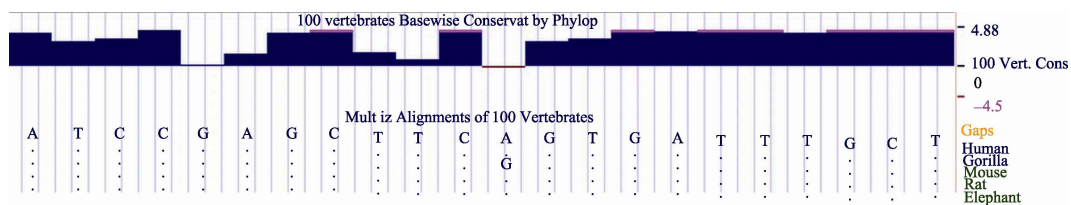


图 5 人、狒狒、小鼠、大鼠、大象-88~-63 碱基对比分析

正调控作用的转录因子结合位点。

用转录因子搜索程序 PROMO 对 *NRXN1β* 5'侧翼区-84~-63 的基因组序列区域进行了分析，结果分析显示在真核细胞中 *NRXN1β* 基因 5'侧翼区-84~-63 共有 2 个转录因子结合位点，其位点及相应转录因子见表 2。

表 2 *NRXN1β* 基因 5'侧翼区-84~-63 区段内的转录因子结合位点

转录因子	相对位置	序列信息	相似度
DBP	-69~-63	ATTGCT	100%
ABF1	-73~-68	AGTGAT	100%

3 讨论

1992 年, Sudhof 实验室首先报道轴突蛋白 Neurexin 为一个神经元表面蛋白家族, 这一家族的 3 个基因分别转录出两种具有不同的 5' 非翻译区和蛋白质氨基末端的变异体 α 转录本和 β 转录本^[14,15]。从 *NRXN* 被首次发现至今, 研究主要集中在其蛋白质的功能、在神经突触信号传递中的作用以及数千个蛋白质异构体形成的机制等方面^[16], 缺乏基因转录水平对其表达机制的研究。目前除了个别报道发现了在翻译起始位点上游部分区域有重要功能^[17], 对 Neurexin1 β 转录调控方面未见有相关报告。

本文针对 *NRXN1 β* 基因启动子区域进行研究, 利用经典的启动子定位实验找到了 *NRXN1 β* 只有 244 个碱基同时又有较高启动子活性的区域 -88/+156, 无论哪一侧翼的进一步删切都会造成其启动子活性显著降低, 因此这一区域为能够驱动 *NRXN1 β* 高表达的最小启动子区。应用基因定点突变技术证实了在 *NRXN1 β* 基因启动子的 -84/-63 存在一个能显著增强转录活性的顺式作用功能区, 5' 侧翼删切 -88/-73 导致的插入序列启动子活性的降低可能是由于这一顺式作用功能区遭到破坏所致。在结果 3 中以 +156 结尾的 5' 侧翼序列删切质粒荧光素酶活性测定结果所表现的启动子活性趋势虽然与结果 1 相一致, 但 -88~-73 在结果 1 中删切该区域后, 以 +668 结尾的质粒启动子活性降低了约 68%, 而结果 3 中删切该区域后, 以 +156 结尾的质粒启动子活性降低了 20% 左右, 此差异可能是由于 -84/-63 功能区与存在于 +156/+668 的某个功能域相互作用而导致启动子转录活性的变化。

应用转录因子结合位点识别工具, 对可能与功能区 -84/-63 的序列相结合的转录因子进行了初步分析, 发现转录因子 ABF1 (Autonomously replicating sequence-binding factor 1, ABF1) 和 DBP (Albumin D-site-binding protein, DBP) 结合的序列与功能区 -84/-63 所包括的序列高度吻合。相关文献报道转录因子 ABF1 是一个多功能的, 能够结合 DNA 特定区域的蛋白质, 对于酵母菌的细胞活性有重要作用; 并控制着 DNA 的转录、复制以及基因的沉默, 研究发现对于 ABF1 这些功能都是由 C 端的两个重要功能区 CS1 (624~628 氨基酸序列) 和功能区 CS2

(639~662 氨基酸序列) 所调控的, 前者主要负责调节细胞的活力, 参与细胞核中的多项程序, 后者主要调控染色体的复制和转录活性^[18]。另一个转录因子 DBP (Albumin D-site-binding protein, DBP) 的过表达可以抑制空间的学习但是不影响记忆, 增加了红藻氨酸诱导的惊厥敏感性; 并认为其作为一种转录因子介导了海马神经元 GLR-1R (Glucagon like peptide-1 receptor, GLR-1R) 的激活与神经元可塑性之间的联系^[19]。课题组正在进行的初步实验结果表明, 以功能区 -84/-63 的序列为探针确实能在凝胶电泳迁移率实验中显示与核蛋白提取物的特异结合条带, 但要确认结合的蛋白质, 还需更多的实验证据。

孤独症与轴突蛋白的联系主要来自孤独症人群的基因组关联研究和发现的多种 *NRXN* 基因组序列的变异, 包括拷贝数的变异、大片段的序列缺失和单个碱基的突变等多种形式, 变异的位置既有外显子编码区也有基因启动子区^[20~23]。目前认为与孤独症发生有关联的 *NRXN* 基因的突变是通过损害兴奋性和抑制性突触功能的平衡而发挥作用的, 特别是在突触的发生和发展以及神经元分化中, Neurexin1 β 都担任了重要的角色^[24]。研究发现一些 ASD 病例中 *NRXN* 基因 5' 侧翼端的缺失较 3' 侧翼端要多^[25]。基因编码区的错义突变能够改变轴突蛋白的氨基酸组成和结构, 从而影响神经环路的信号传递。而位于启动子区变异的作用尚缺乏深入研究, 最近的一篇筛查孤独症人群的 *NRXN1* 基因变异的报道^[26], 共筛查到 7 个新的变异, 但并未对这些变异对基因功能的影响做进一步的研究, 其中两个变异 c.-749T>A 和 c.-675G>T 位于 *NRXN1 β* 的第 1 外显子的非编码区, 相当于 cDNA 的翻译起始点的上游第 749 和 675 位的碱基, 通过与所克隆的基因组序列的比对, 这两个变异恰好就位于具有启动子活性插入片段 -88/+668 的 +1 到 +135 之间, 而 +1/+135 是最小启动子 -88/+156 的核心区域, 提示这些在孤独症病人中发现的变异有可能通过影响基因的启动子活性而改变 *NRXN1 β* 基因的表达水平并最终影响兴奋性和抑制性突触功能的平衡。

综上所述, 根据目前初步的研究结果再结合其他研究者的临床研究资料, 以及未来对上述功能区针对性的研究, 将有助于阐明 *NRXN* 基因在孤独症发病中的可能作用及作用机制。

参考文献

- [1] 胡亚美, 江载芳. 诸福棠实用儿科学(第七版). 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1956–1958. [DOI]
- [2] Sindi IA, Tannenberg RK, Dodd PR. Role for the neurexin-neuroligin complex in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(4): 746–756. [DOI]
- [3] Bourne Y, Marchot P. The neuroligins and their ligands: from structure to function at the synapse. *J Mol Neurosci*, 2014, 53(3): 387–396. [DOI]
- [4] Xiang YY, Dong HH, Yang BB, MacDonald JF, Lu WY. Interaction of acetylcholinesterase with neurexin-1 β regulates glutamatergic synaptic stability in hippocampal neurons. *Mol Brain*, 2014, 7: 15. [DOI]
- [5] Born G, Breuer D, Wang SP, Rohlmann A, Coulon P, Vakili P, Reissner C, Kiefer F, Heine M, Pape HC, Missler M. Modulation of synaptic function through the α -neurexin-specific ligand neurexophilin-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(13): 1274–1283. [DOI]
- [6] Bang ML, Owczarek S. A matter of balance: role of neurexin and neuroligin at the synapse. *Neurochem Res*, 2013, 38(6): 1174–1189. [DOI]
- [7] Rowen L, Young J, Birditt B, Kaur A, Madan A, Philipps DL, Qin SZ, Minx P, Wilson RK, Hood L, Graveley BR. Analysis of the human neurexin genes: alternative splicing and the generation of protein diversity. *Genomics*, 2002, 79(4): 587–597. [DOI]
- [8] Graf ER, Kang Y, Hauner AM, Craig AM. Structure function and splice site analysis of the synaptogenic activity of the neurexin-1 β LNS domain. *J Neurosci*, 2006, 26(16): 4256–4265. [DOI]
- [9] Treutlein B, Gokce O, Quake SR, Südhof TC. Cartography of neurexin alternative splicing mapped by single-molecule long-read mRNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(13): E1291–E1299. [DOI]
- [10] Shen KC, Kuczynska DA, Wu IJ, Murray BH, Sheckler LR, Rudenko G. Regulation of neurexin 1 β tertiary structure and ligand binding through alternative splicing. *Structure*, 2008, 16(3): 422–431. [DOI]
- [11] Missler M, Südhof TC, Biederer T. Synaptic cell adhesion. *Cold Spring Harb Perspectives Biol*, 2012, 4(4): a005694. [DOI]
- [12] Futai K, Doty CD, Baek B, Ryu J, Sheng M. Specific Trans-synaptic interaction with inhibitory interneuronal neurexin underlies differential ability of neuroligins to induce functional inhibitory synapses. *J Neurosci*, 2013, 33(8): 3612–3623. [DOI]
- [13] Reissner C, Runkel F, Missler M. Neurexins. *Genome Biol*, 2013, 14(9): 213. [DOI]
- [14] Missler M, Südhof TC. Neurexins: Three genes and 1001 products. *Trends Genet*, 1998, 14(1): 20–26. [DOI]
- [15] Davletov BA, Krasnoperov V, Hata Y, Petrenko AG, Südhof TC. High affinity binding of α -latrotoxin to recombinant neurexin 1 α . *J Biol Chem*, 1995, 270(41): 23903–23905. [DOI]
- [16] Missler M, Fernandez-Chacon R, Südhof TC. The making of neurexins. *J Neurochem*, 1998, 71(4): 1339–1347. [DOI]
- [17] Runkel F, Rohlmann A, Reissner C, Brand SM, Missler M. Promoter-like sequences regulating transcriptional activity in neurexin and neuroligin gene. *J Neurochem*, 2013, 127(1): 36–47. [DOI]
- [18] Miyake T, Loch CM, Li R. Identification of a multifunctional domain in autonomously replicating sequence-binding factor 1 required for transcriptional activation, DNA replication, and gene silencing. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(2): 505–516. [DOI]
- [19] Klugmann M, Leichtlein CB, Symes CW, Klaussner BC, Brooks AI, Young D, During MJ. A novel role of circadian transcription factor DBP in hippocampal plasticity. *Mol Cell Neurosci*, 2006, 31(2): 303–314. [DOI]
- [20] Liu YL, Hu ZM, Xun GL, Peng Y, Lu LN, Xu XJ, Xiong ZM, Xia L, Liu DY, Li W, Zhao JP, Xia K. Mutation analysis of the NRXN1 gene in a Chinese autism cohort. *J Psychiatr Res*, 2012, 46(5): 630–634. [DOI]
- [21] Feng JN, Schroer R, Yan J, Song WJ, Yang CM, Bockholt A, Cook EH Jr, Skinner C, Schwartz CE, Sommer SS. High frequency of neurexin 1 β signal peptide structural variants in patients with autism. *Neurosci Lett*, 2006, 409(1): 10–13. [DOI]
- [22] Autism Genome Project Consortium, Szatmari P, Paterson AD, Zwaigenbaum L, Roberts W, Brian J, Liu XQ, Vincent JB, Skaug JL, Thompson AP, Senman L, Feuk L, Qian C, Bryson SE, Jones MB, Marshall CR, Scherer SW, Veland VJ, Bartlett C, Mangin LV, Goedken R, Segre A, Pericak-Vance MA, Cuccaro ML, Gilbert JR, Wright HH, Abramson RK, Betancur C, Bourgeron T, Gillberg C, Leboyer M, Buxbaum JD, Davis KL, Hollander E, Silverman JM, Hallmayer J, Lotspeich L, Sutcliffe JS, Haines JL, Folstein SE, Piven J, Wassink TH, Sheffield V, Geschwind DH, Bucan M, Brown WT, Cantor RM, Constantino JN, Gilliam TC, Herbert M, Lajonchere C, Ledbetter DH, Lese-Martin C, Miller J, Nelson S, Samango-Sprouse CA, Spence S, State M, Tanzi RE, Coon H, Dawson G, Devlin B, Estes A, Flodman P, Klei L, McMahon WM, Minshew N, Munson J, Korvatska E, Rodier PM, Schellenberg GD, Smith M, Spence MA, Stodgell C, Tepper PG, Wijsman EM, Yu CE, Rogé B, Mantoulan C, Wittmeyer K, Poustka

- A, Felder B, Klauck SM, Schuster C, Poustka F, Bölte S, Feineis-Matthews S, Herbrecht E, Schmötzer G, Tsiantis J, Papanikolaou K, Maestrini E, Bacchelli E, Blasi F, Carone S, Toma C, Van Engeland H, de Jonge M, Kemner C, Koop F, Langemeijer M, Hijmans C, Staal WG, Baird G, Bolton PF, Rutter ML, Weisblatt E, Green J, Aldred C, Wilkinson JA, Pickles A, Le Couteur A, Berney T, McCoshie H, Bailey AJ, Francis K, Honeyman G, Hutchinson A, Parr JR, Wallace S, Monaco AP, Barnby G, Kobayashi K, Lamb JA, Sousa I, Sykes N, Cook EH, Guter SJ, Leventhal BL, Salt J, Lord C, Corsello C, Hus V, Weeks DE, Volkmar F, Tauber M, Fombonne E, Shih A, Meyer KJ. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet*, 2007, 39(3): 319–328. [DOI]
- [23] Friedman JM, Baross Á, Delaney AD, Ally A, Arbour L, Armstrong L, Asano J, Bailey DK, Barber S, Birch P, Brown-John M, Cao MQ, Chan S, Charest DL, Farnoud N, Fernandes N, Flibotte S, Go A, Gibson WT, Holt RA, Jones SJ, Kennedy GC, Krzywinski M, Langlois S, Li HI, McGillivray BC, Nayar T, Pugh TJ, Rajcan-Separovic E, Schein JE, Schnerch A, Siddiqui A, Van Allen MI, Wilson G, Yong SL, Zahir F, Eydoux P, Marra MA. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet*, 2006, 79(3): 500–513. [DOI]
- [24] Ebert DH, Greenberg ME. Activity-dependent neuronal signalling and autism spectrum disorder. *Nature*, 2013, 493 (7432): 327–337. [DOI]
- [25] Chen XL, Shen YP, Zhang F, Chiang C, Pillalamarri V, Blumenthal I, Talkowski M, Wu BL, Gusella JF. Molecular analysis of a deletion hotspot in the *NRXN1* region reveals the involvement of short inverted repeats in deletion CNVs. *Am J Hum Genet*, 2013, 92(3): 375–386. [DOI]
- [26] Yangngam S, Plong-On O, Sriro T, Roongpraiwan R, Hansakunachai T, Wirojanan J, Sombuntham T, Ruangda-raganon N, Limprasert P. Mutation screening of the neu-rexin 1 gene in thai patients with intellectual disability and autism spectrum disorder. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2014, 18(7): 510–515. [DOI]

(责任编辑: 夏昆)