

SLFN14 抗 LINE-1 分子机制研究

毛洋, 丁寄葳, 陈淑敏, 岑山, 李晓宇

中国医学科学院&北京协和医学院医药生物技术研究所免疫生物学室, 北京 100050

摘要: 长散在核重复序列 1 (long interspersed nuclear element-1, LINE-1) 是迄今为止发现的人体基因组中唯一具有自主转座活性的逆转录转座子, 其转座常引起宿主基因组不稳定, 从而导致包括癌症在内的各种严重基因疾病的发生。宿主因子在宿主抗 LINE-1 转座中发挥着重要作用。宿主因子 SLFN14 作为免疫系统重要成员, 具有抗病毒活性。本实验室研究发现 SLFN14 对于 LINE-1 的转座具有抑制作用。为进一步探究其具体的作用机制, 通过对 LINE-1 复制周期中的转录、翻译、逆转录、整合环节进行实验分析, 证实 SLFN14 能够通过影响 LINE-1 mRNA 转录过程及其半衰期, 降低 LINE-1 mRNA 的水平, 从而影响 LINE-1 蛋白及 cDNA 表达水平, 最终导致 LINE-1 复制受阻。同时, 通过对 SLFN14 活性中心的定位, 本研究还发现 SLFN14 的抗 LINE-1 活性与其核糖核酸内切酶结构域和核糖体结合结构域密切相关。上述研究结果展示了 SLFN14 调控 LINE-1 复制的机制, 进一步完善了宿主因子调控网络, 为控制因 LINE-1 复制引起的基因组不稳定提供了新思路。

关键词: 转座; 逆转录转座子; LINE-1; SLFN14; 5'-UTR 内部启动子区

SLFN14 inhibits LINE-1 transposition activity

Yang Mao, Jiwei Ding, Minshu Chen, Shan Cen, Xiaoyu Li

Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: Long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) is the only active autonomous transposon in the human genome. Its transposition frequently induces host genome instability, leading to a variety of genetic diseases, including cancers. The host factors play important roles in inhibiting LINE-1 retrotransposition. As an important component of the immune system, the host factor SLFN14 has antiviral activity. Our laboratory shows that SLFN14 possesses potent inhibitory activity against LINE-1 retrotransposition. To explore the potential mechanism of SLFN14 inhibition, we analyzed its effects on transcription, translation, reverse transcription and insertion in the LINE-1 replication cycle. We confirmed that SLFN14 could suppress the LINE-1 mRNA level by affecting its transcription and degradation, thereby

收稿日期: 2020-04-26; 修回日期: 2020-05-22

基金项目: 国家科技重大专项(编号: 2018ZX10301408-004)和中国医学科学院医学与健康创新工程项目(编号: CIFMS 2016-12M-2-002)资助

[Supported by the National Science and Technology Major Project of the Ministry of Science and Technology of China (No. 2018ZX10301408-004)] and Chinese Academy of Medical Sciences Innovation Fund for Medical Sciences (No. CIFMS 2016-12M-2-002)]

作者简介: 毛洋, 在读硕士研究生, 专业方向: 宿主因子对转座子调控机制研究。E-mail: yangmao-MY@outlook.com

通讯作者: 李晓宇, 博士, 副研究员, 研究方向: 病毒学。E-mail: xiaoyulik@hotmail.com

岑山, 博士, 研究员, 研究方向: 病毒学。E-mail: shancen@imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.20-081

网络出版时间: 2020/5/26 10:53:37

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20200525.1400.002.html>

diminishing the protein and cDNA levels of LINE-1, which eventually block the LINE-1 retrotransposition. Further, by mapping the active domains of SLFN14, we found its inhibitory activity on LINE-1 being closely related to its endoribonuclease and ribosome binding domains. These results demonstrate the mechanism of SLFN14 in regulating LINE-1 replication, which further provide new insights for improving the regulation network of host factors for controlling genomic instability caused by LINE-1 replication.

Keywords: transposition; retrotransposon; LINE-1; SLFN14; 5'-UTR internal promotor region

转座子, 又被称为转座元件(transposable elements, TEs), 是一类能在基因组移动的 DNA 重复序列, 约占基因组总量的 45%^[1]。LINE-1 是目前发现的人类基因组中唯一具有自主转座活性的转座子, 占据人类基因组的 17%, 其全长约为 6000 bp^[2], 包括 5'端和 3'端的非翻译区(untranslated regions, UTR)和两个开放式读码框架 ORF1 及 ORF2 (open reading frame 1 protein, open reading frame 2 protein)。5'-UTR 是其内部启动子区域^[3]; ORF1p 是 RNA 结合蛋白, 具有分子伴侣活性^[4]; ORF2p 具有逆转录酶活性和核酸内切酶活性^[5-8]。LINE-1 的转座方式为“复制-粘贴”型转座, 即在 LINE-1 的逆转录转座过程中, 首先 RNA 聚合酶 II 介导 LINE-1 启动子启动转录, 转录生成的 LINE-1 RNA 既能作为 LINE-1 的基因组 RNA, 又能行使 mRNA 的功能。随后, LINE-1 RNA 出核, 进入细胞质, 翻译出 ORF1p 和 ORF2p, 两者能与 LINE-1 RNA 结合形成核糖核蛋白复合物(ribonucleoprotein complexes, RNPs)。LINE-1 RNPs 进入细胞核, 识别宿主细胞基因组 DNA 上的目的序列, 并在双链 DNA 的其中一条链上切开一个切口, 逆转录酶引导 LINE-1 RNA 逆转录生成 LINE-1 cDNA, 该过程被称为靶位点引导反转录(target-site primed reverse transcription, TPRT)。最后, DNA 的另一条链也被切开, 继续进行另一条 DNA 链的合成, LINE-1 cDNA 被整合入到基因组中新的位点, 完成逆转录转座^[9-11]。

LINE-1 转座对基因组的结构和功能都会产生重要影响。在正常分化的细胞中, LINE-1 启动子为高甲基化状态, 不进行转座^[12-15]; 而在生殖细胞发育、胚胎发育的早期则为激活状态, 一旦对其进行抑制, 小鼠胚胎无法正常发育^[16]。由此可见, 宿主

细胞对 LINE-1 的活跃与抑制具有严格的调控。同时, 各项研究表明 LINE-1 在多数肿瘤细胞中高表达^[17,18], 这表明在病理状态下, 活跃的 LINE-1 会对基因组结构和功能造成不利影响进而引起基因疾病和癌症, 这可能是由于 LINE-1 可以通过插入、缺失、重组和转导等方式影响基因组的完整性和不稳定性。因此, 通常情况下, 细胞会通过表观遗传学修饰、RNA 干扰和宿主限制因子调控等手段对 LINE-1 的转座进行严格控制^[19,20]。表观遗传学修饰主要包括 DNA 甲基化和组蛋白修饰, 它能在转录层面抑制 LINE-1 转座; RNA 干扰途径主要在转录后层面抑制 LINE-1 转座; 宿主限制因子也是近年来研究的热点之一, 目前已发现多种宿主限制因子能够抑制 LINE-1 转座活性^[21], 其中包括 APOBEC 家族蛋白、SAMHD1 蛋白以及本课题组正在研究的 Schlafen (SLFN) 家族蛋白。

SLFN 家族作为胸腺细胞成熟和激活的调节剂被首次发现^[22], 随后多篇研究报道了它在其他细胞中的多种功能, 如调控细胞增殖、调节 T 细胞和巨噬细胞分化、抑制肿瘤细胞的移动和侵袭及增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性等^[23]。这些研究证实 SLFN 蛋白是免疫系统的重要组成部分, 在抗病毒复制和抗肿瘤方面发挥着重要作用^[23]。有研究证实, 部分 SLFN 家族成员具有抗逆转录病毒活性, 并且 SLFN14 作为 SLFN 家族成员之一已被证实是一种新型抗病毒因子^[24,25], 考虑到 LINE-1 在复制周期上与逆转录病毒具有相似性, 分析认为 SLFN14 可能对 LINE-1 具有抑制作用。因此本研究对 SLFN14 是否具有抑制 LINE-1 转座的活性进行研究, 并对其抗 LINE-1 活性位点进行分析, 同时对 SLFN14 抗 LINE-1 机制进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

HEK293T、HeLa 细胞系(购于美国 ATCC 细胞库)培养于含有 10%胎牛血清(购自美国 Gibco 公司)的 DMEM (购自美国 Life Technologies 公司)。HEK293T 细胞与 HeLa 细胞均以 1 : 6 的比例进行传代,传代后的细胞置于 37℃、5% CO₂ 培养箱静置培养,接种后 2~3 d 即可长成致密单层。

1.2 脂质体介导的细胞转染

HEK293T 与 HeLa 细胞系以合适的密度(转染过表达质粒时细胞密度应为 70%~90%)接种于相应的孔板中。接种 24 h 后,HEK293T 细胞使用 Lipofectamine 2000 (购自美国 Life Technologies 公司)、HeLa 使用 TransEasy (购自北京博雅创新科技发展有限公司)按说明书进行质粒转染。转染后,将培养皿放置于培养箱中静置培养 4~6 h,之后更换细胞对应的完全培养液正常培养。转染 48 h 后收样。

1.3 逆转录转座实验(retrotransposition assay)

对转染 48 h 后的 HeLa 细胞进行计数,在六孔板中接种 2.0×10^5 个细胞/孔的 HeLa 细胞,用含有适宜浓度的 G418 培养基进行培养。10~12 d 后,用 PBS 润洗六孔板,每孔加入 1 mL 甲醇固定 10 min,随后结晶紫染色 10 min,最后用蒸馏水冲洗干净。对形成的细胞集落进行计数。

1.4 总 RNA、cDNA 提取和 Real-time PCR

按广州美基生物科技有限公司的 RNA 提取试剂盒使用说明书提取细胞总 RNA,测定 RNA 浓度。取 2 μ g 所提取 RNA,使用随机引物通过 M-MLV 反转录酶反转录为 cDNA,以反转录的 cDNA 为模板进行相对定量 PCR 扩增检测。PCR 扩增引物见表 1,PCR 反应体系见表 2。反应条件: 98℃ 2 min; 98℃ 10 s, 55℃ 15 s, 72℃ 2 min 15 s, 40 个循环。

按照 QIAamp DNA Mini Kit 基因组提取试剂盒说明书要求提取 cDNA,取 2 μ L cDNA 进行绝对定量 PCR 实验。PCR 扩增引物见表 1,PCR 反应体系见表 2。反应条件: 98℃ 2 min; 98℃ 10 s, 72℃

表 1 PCR 扩增所需引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR amplification

引物名称	引物序列(5'→3')
LINE-1-RNA-F	CTGAAGCGGGAAGGGACTG
LINE-1-RNA-R	CCTTGAGCCTGGCGAACAG
LINE-1-cDNA-F	TTCGGCTGGCGGAGCCCTG
LINE-1-cDNA-R	TGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCC
GAPDH-F	GGTATCGTGGAAGGACTCATGAC
GAPDH-R	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG

表 2 PCR 扩增体系

Table 2 Components for PCR amplification

组分	体积(μ L)
Sso-fast	10
Prime STAR HS DNA Polymerase (2.5 U/mL)	0.5
dNTP 混合物(2.5 mmol/L)	4
模板	1
Forward primer (10 μ mol/L)	1
Reverse primer (10 μ mol/L)	1
ddH ₂ O	2.5

2 min 40 s, 40 个循环。

1.5 免疫印迹(Western blot)分析

提取收集细胞总蛋白后,通过 Western blot 法检测细胞系中 SLFN14-flag 或 ORF1 蛋白表达量。SDS-PAGE 进行蛋白分离,恒压电流浓缩胶 70 V,分离胶 120 V。湿转法进行蛋白转膜,冰浴中以 75 V 恒压电转 75 min。质量分数 5%的脱脂奶粉室温封闭 1 h。按照说明书标示比例加入一抗稀释液(购自苏州新赛美生物科技有限公司)稀释的 β -actin 抗体(购自美国 Abcam 公司, SC-47778)、flag 抗体(购自美国 Sigma-Aldrich 公司, #14793)、ORF1p 抗体(由中国医学科学院病原微生物研究所郭斐研究员实验室惠赠),4℃轻摇过夜。次日,洗膜后按照体积比 1 : 5000 比例加入 PBST 稀释的二抗,室温轻摇 1 h。最后辣根过氧化物酶化学发光法显色。

1.6 免疫荧光实验

HeLa 细胞铺 $\Phi 35$ mm 共聚焦专用皿,每皿接种 5×10^4 个细胞。细胞置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后转染,继续培养 48 h,收细胞处理。PBS

润洗细胞 3 次, 4% 细胞固定液室温固定 10 min; 吸弃细胞固定液, 加入 0.02% Triton X-100 溶液, 室温打孔 10 min; PBS 洗涤细胞 3 次, 2% BSA 溶液封闭 1 h 后, 一抗孵育 1 h; 回收一抗, PBS 洗涤细胞 3 次, 荧光二抗孵育 1 h; 回收二抗, PBS 洗涤细胞 3 次, 加入 1~2 滴含 DAPI 的封片液。激光共聚焦显微镜观察。

1.7 Luciferase 报告系统实验

HEK293T 铺六孔板, 转染 48 h 后收取细胞。细胞吹打混匀, 吸取 50 μ L 混匀的细胞液至白色底板中, 加入 50 μ L 2 \times 裂解液, 混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱中放置 25 min; 将孵育好的样品混匀后吸取 10 μ L 至白色底板中, 再加入 40 μ L luciferase 荧光底物, 混匀后酶标仪检测。

1.8 LEAP (LINE-1 element amplification protocol) 实验

HeLa 细胞铺 10 cm 细胞培养皿, 24 h 后转染。继续培养 48 h 后收取细胞。加入细胞裂解液裂解 1 h 后离心 20 min, 收集上清液。配置 50 mL 8% 和 16% 的蔗糖溶液(1 mol/L NaCl 1.6 mL, 0.1 mol/L MgCl₂ 2.5 mL, 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 1 mL, 1 mol/L DTT 50 μ L, 蛋白酶抑制剂 1 片, 无 RNA 酶水 45 mL 及 4 g 或 8 g 蔗糖)。随后将配制好的蔗糖溶液加入到超速离心管中, 上层加入裂解液, 4 $^{\circ}$ C 超速离心 41,000 r/min, 3 h。超速离心后用 100 μ L 无 RNA 酶水溶解离心管底部样品, 1:1 加入甘油, -20 $^{\circ}$ C 保存。取一部分样品定量后, 取适量样品加入到 49 μ L LEAP 反应体系中, 反应体系组分见表 3。37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 将反转录后的 cDNA 进行 Real-time PCR 扩增, 测定各组 cDNA 量。LEAP 实验所需引物序列见表 4。

1.9 RNA 稳定性实验

HEK293T 铺六孔板, 转染 24 h 后用放线菌素 D (5 μ g/mL) 进行处理, 分别于 0、0.5、1、2、4、8 h 收集细胞, 提取细胞总 RNA。利用 Real-time PCR 对 LINE-1 RNA 进行检测。

1.10 统计学分析

实验数据采用 GraphPad Prism 5 进行处理, 以

表 3 LEAP 孵育体系

Table 3 Components for LEAP

组分	浓度或体积
Tris-HCl (pH=7.5)	50 mmol/L
KCl	50 mmol/L
MgCl ₂	5 mmol/L
DTT	10 mmol/L
3' RACE adapter primer	0.4 mmol/L
RNasin	0.4 U/ μ L
dNTPs	0.2 mmol/L
Tween 20	0.05% (v/v)
ddH ₂ O	2.5 μ L

表 4 LEAP 实验所需引物序列

Table 4 Primer sequences for PCR amplification

引物名称	引物序列(5'→3')
3' RACE adapter	GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGG TTTTTTTTTTTTVN
LINE-1-F	AATGAGATCACATGGACACAGGAAG
LINE-1-R	TGTATACATGTGCCATGCTGGTGC

3 次实验的平均值和标准误(mean \pm SEM)表示。组间比较用 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 SLFN14 抑制 LINE-1 转座

为确定 SLFN14 能否抑制 LINE-1 转座活性, 本研究进行了逆转录转座实验。该实验是利用 Thierry Heidmann 实验室的报告质粒 CMV-LINE-1-NEO^{RT} (以下简称 LINE-1 质粒), 该质粒在 LINE-1 的 3'-UTR 上游设计了一个含有内含子的新霉素(*neo*)抗性基因, 此 *neo* 基因只有在 LINE-1 质粒成功进行逆转录转座去除内含子后才能表达新霉素抗性(图 1A)。在含有 G418 抗性的培养基中, 含有成功进行逆转录转座 LINE-1 的 HeLa 细胞才能存活, 并形成细胞集落, 细胞集落数目的多少便能反映 LINE-1 转座效率的高低^[26]。

在 HeLa 细胞中, 共同转染 LINE-1 与不同浓度的 SLFN14-flag 质粒, 通过逆转录转座实验观察发现, 不同转染量 SLFN14-flag 对含 LINE-1 细胞的集落形成产生影响。结果显示, 随着 SLFN14 表达的

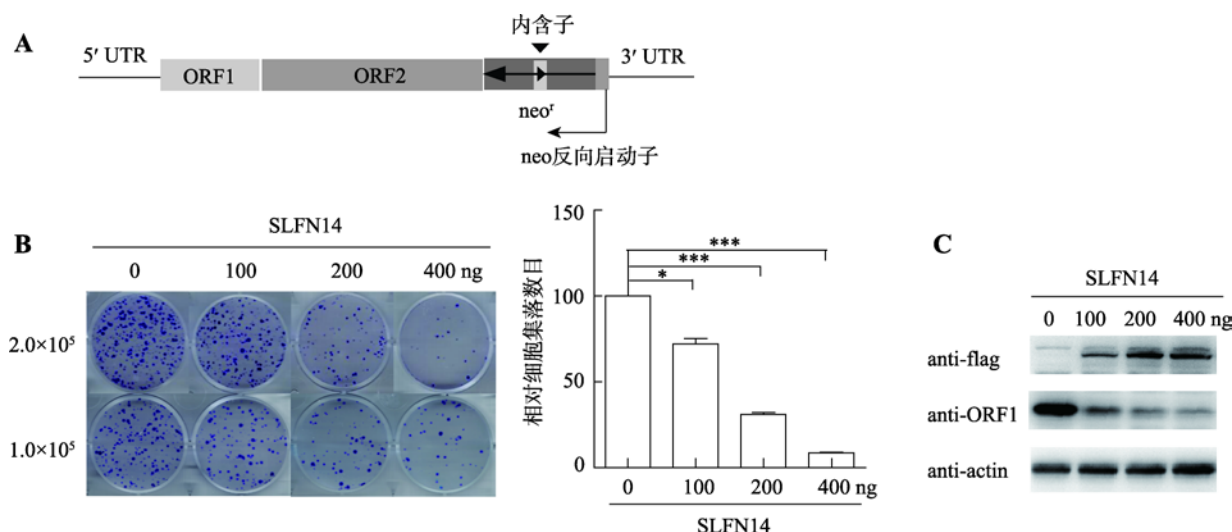


图1 SLFN14抑制LINE-1逆转录转座

Fig. 1 SLFN14 inhibits LINE-1 retrotransposition

A: 逆转录转座实验原理示意图。*neo* 抗性基因中含有一段反向的内含子, 此 *neo* 基因只有在 LINE-1 质粒成功进行逆转录转座去除内含子后才能表达新霉素抗性。B: 逆转录转座实验检测分别转染 0、100、200、400 ng SLFN14-flag 及 1000 ng LINE-1 质粒后 LINE-1 逆转录转座形成的细胞集落数量变化。将未转染 SLFN14-flag 的对照组细胞集落数目看作 100; *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$ 。C: 免疫印迹法检测 SLFN14 对 LINE-1 ORF1p 表达的影响。

增加, LINE-1 形成的细胞集落数量有明显的下降(图 1B)。此结果表明, 外源表达的 SLFN14 能明显抑制 LINE-1 转座且这种抑制活性与 SLFN14 的表达呈剂量依赖性关系。同时还发现, 随着 SLFN14 表达量的增加, LINE-1 ORF1p 的表达也在下降, 而且下降的幅度与 LINE-1 转座水平下降的趋势一致(图 1C), 这表明 SLFN14 有可能直接抑制 LINE-1 ORF1p 蛋白的表达, 抑或是通过抑制 LINE-1 RNA 表达水平来降低 ORF1p 蛋白的表达。基于此分析, 后续的实验中将直接通过检测 ORF1p 的表达量来反映 SLFN14 对 LINE-1 转座的影响。

2.2 SLFN14 抑制 LINE-1 的结构域分析

SLFN14 包括 3 个分别具有内切核糖核酸酶活性、核糖体结合功能和解旋酶活性的关键结构域, 因此本研究分别构建了缺失以上 3 个关键结构域的 SLFN14 dC1、dC2、dC3、dN1、dN2、dN3 六个截短体(图 2A)以对不同结构域进行分析。

从 2.1 实验可知, SLFN14 对 LINE-1 转座的影响可以通过 LINE-1 ORF1p 的表达体现。因此, 为确定 SLFN14 dC1、dC2、dC3、dN1、dN2、dN3 六个截短体是否仍然具有抗 LINE-1 活性, 本研究共同

转染 LINE-1 与 SLFN14 的六个截短体质粒, 并以 SLFN14 野生型作为对照。通过检测 ORF1p 蛋白表达的变化, 发现与野生型 SLFN14 相比, dC1 和 dC2 依然能够一定程度抑制 ORF1p 的表达活性, 证明 SLFN14 的 C 端的解旋酶结构域不是 SLFN14 抑制 LINE-1 转座活性的关键结构域; 另一方面 dN3 的表达对 LINE-1 ORF1p 的影响与未转染 SLFN14-flag 质粒的空白对照组相比没有显著性差异, 这提示 dN3 完全丧失了抗 LINE-1 活性(图 2B)。此结果表明 SLFN14 解旋酶结构域在其抗 LINE-1 活性中可能作用有限, 而内切核糖核酸酶结构域与核糖体结合结构域在其中发挥重要作用。

利用激光共聚焦显微镜对 SLFN14 及其截短体在细胞中的分布情况进行了观察。结果显示, 保留主要抗 LINE-1 活性的 dC1 的细胞定位情况与野生型完全一致, 主要定位于细胞质中; 而完全丧失了抗 LINE-1 活性的 SLFN14 dN3 则有明显弥散现象, 在细胞质、细胞核均有分布(图 2C)。

上述实验结果表明, SLFN14 dN3 不抑制 LINE-1 ORF1p 表达。基于此, 在后续实验中以 SLFN14 dN3 为阴性对照进行 SLFN14 抗 LINE-1 活性的机制研究。

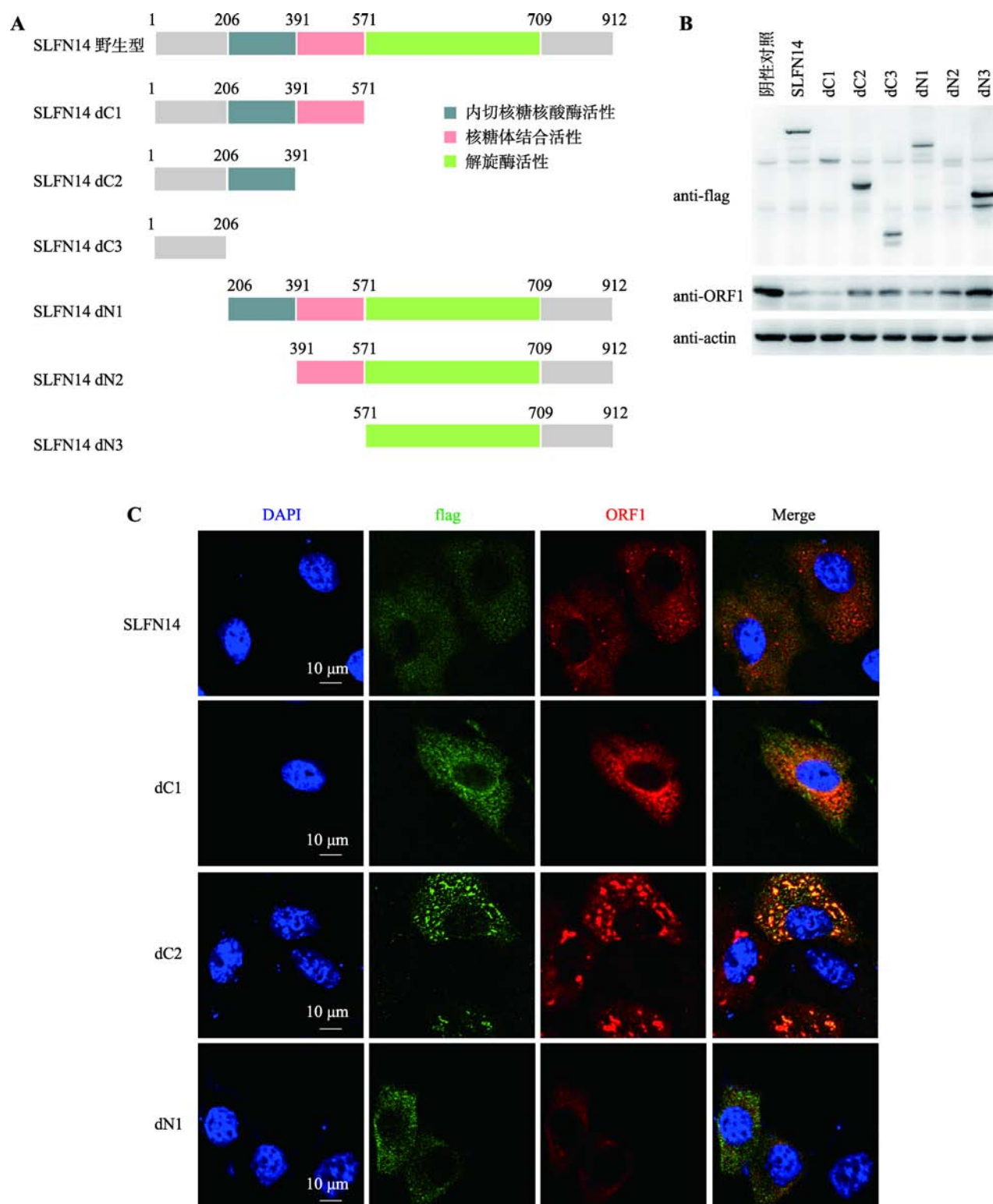


图 2 SLFN14 抑制 LINE-1 转座的活性结构域定位

Fig. 2 Active domain mapping of SLFN14 in inhibiting LINE-1 transposition

A: SLFN14 野生型及各个截短体结构域示意图。B: Western blot 检测 HEK293T 细胞中转染 SLFN14-flag 野生型及各个截短体质粒时对 ORF1p 表达情况的影响。将转染 LINE-1 及 pcDNA4.0 质粒组作为阴性对照, 将转染 LINE-1 及 SLFN14-flag 野生型质粒组作为阳性对照。C: 免疫荧光实验检测 HeLa 细胞中转染 SLFN14-flag 野生型及各个截短体质粒时 SLFN14 蛋白在细胞内的定位情况。

2.3 SLFN14 并非通过影响 ORF2p 逆转录酶活性影响 LINE-1 cDNA 水平

以上实验证实 SLFN14 可以抑制 LINE-1 逆转录转座, 这意味着 SLFN14 可能会减少插入宿主基因组的 LINE-1 拷贝数。为验证 SLFN14 是否会减少插入到细胞基因组中的 LINE-1 cDNA, 本研究设计了一对引物, 其中正向引物只与拼接的 *neo* 基因结合, 这样只有从拼接的 RNA 中逆转录的 LINE-1 cDNA 才能被扩增(图 3A)。与仅转染 LINE-1 质粒的对照组相比, SLFN14 的表达呈剂量依赖性地降低 LINE-1 cDNA 水平(图 3B), 而 SLFN14 dN3 的表达不降低 LINE-1 cDNA 水平(图 3C)。

SLFN14 减少 LINE-1 cDNA 拷贝数的原因有多种, 最可能的是影响了 LINE-1 ORF2p 逆转录酶的活性或直接减少了其 RNA 的拷贝数, 为此首先采用 LEAP 实验来给予验证。利用细胞内各组分沉降系数的差异进行差速离心, 分离各个组分, 通过超速区带离心分离得到 LINE-1 RNP。对其定量后, 利用

RNP 中自带的 ORF2p 以及 LINE-1 RNA 模板模拟 TPRT 过程, 反转录出 LINE-1 cDNA 并用实时定量 PCR 进行定量^[27]。在等量 RNP 的情况下, 检测 SLFN14 对逆转录过程的影响, 结果显示 SLFN14 不影响 LINE-1 的逆转录过程(图 3D), 提示 SLFN14 对 LINE-1 cDNA 的影响并非通过影响 LINE-1 ORF2p 逆转录酶活性而实现的。由于 LINE-1 RNA 同时作为编码蛋白质的 mRNA 和 RNA 中间体产生新的 cDNA 拷贝, 因此 SLFN14 更可能是影响了 LINE-1 RNA 的转录, SLFN14 影响 LINE-1 ORF1p 表达同样证明了这一观点。

2.4 SLFN14 降低 LINE-1 RNA 水平

将 LINE-1 和不同浓度的 SLFN14 质粒共转染 HEK293T 细胞, 然后 Real-time PCR 测定总 LINE-1 RNA, 结果显示, 随着 SLFN14 的增加, LINE-1 RNA 明显下降且呈剂量依赖性(图 4A), SLFN14 dN3 则与对照组相比无显著差异(图 4B), 这表明 SLFN14 影响了 LINE-1 RNA 水平。

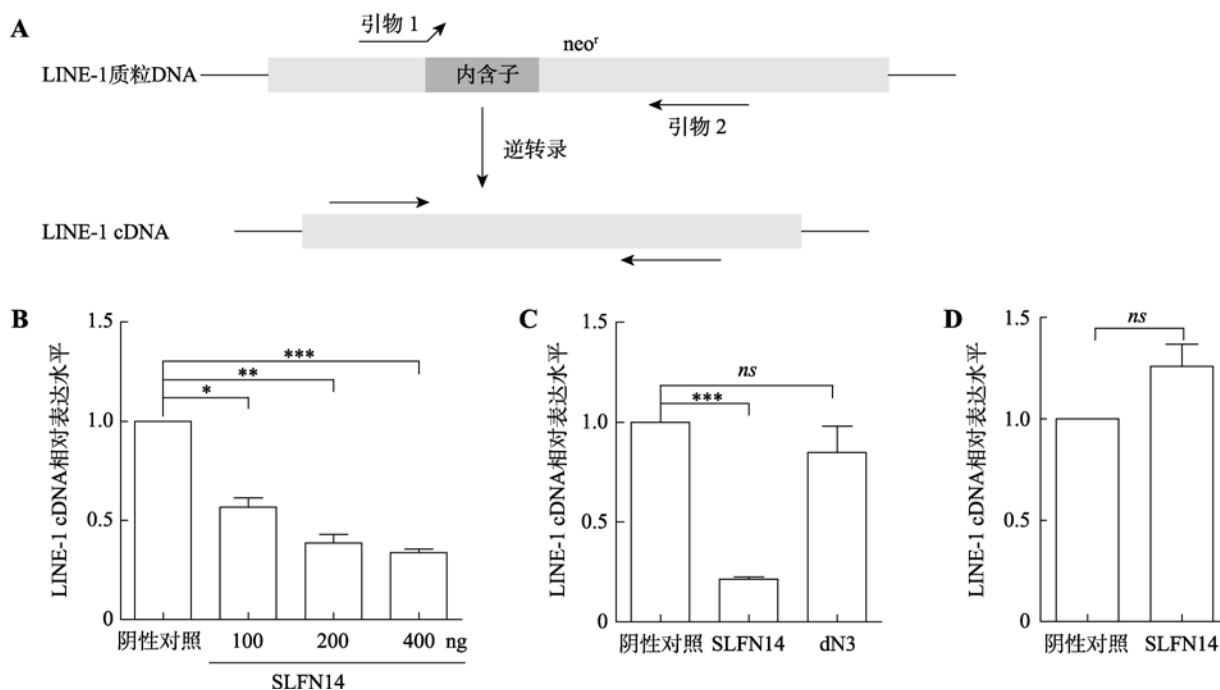


图3 SLFN14 并非通过影响 ORF2p 逆转录酶活性而影响 LINE-1 cDNA 水平

Fig. 3 SLFN14 does not inhibit LINE-1 cDNA level by affecting ORF2p reverse transcriptase activity

A: 扩增 LINE-1 cDNA 的引物示意图。此正向引物被设计成只与拼接的耐新霉素基因结合, 这样只有从拼接的 RNA 中逆转录的 LINE-1 cDNA 才能被扩增。B: Real-time PCR 检测梯度转染野生型 SLFN14 后 LINE-1 cDNA 的变化情况。C: Real-time PCR 检测转染野生型 SLFN14 及截短体 SLFN14 dN3 后 LINE-1 cDNA 的变化情况。D: LEAP 实验检测 ORF2p 逆转录活性对 LINE-1 cDNA 水平的影响。将转染 LINE-1 及 pcDNA4.0 质粒组作为阴性对照组; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: 无显著性差异。

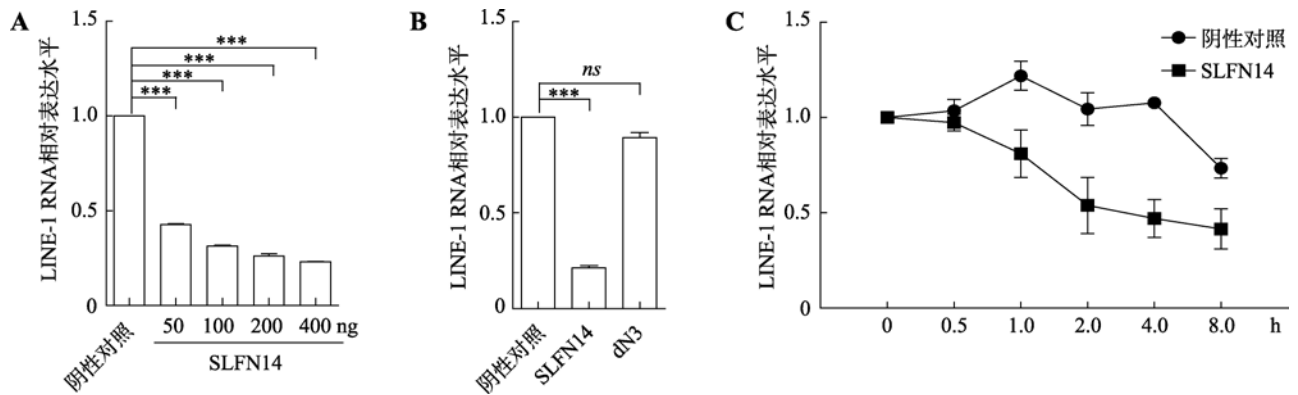


图 4 SLFN14 能够降低 LINE-1 RNA 水平

Fig. 4 SLFN14 suppresses LINE-1 RNA level

A: Real-time PCR 检测梯度转染野生型 SLFN14 后 LINE-1 RNA 的变化情况。B: Real-time PCR 检测转染野生型 SLFN14 及截短体 SLFN14 dN3 后 LINE-1 RNA 的变化情况。转染 LINE-1 及 pcDNA4.0 质粒组作为阴性对照组; ***: $P < 0.001$; ns: 无显著性差异。C: Real-time PCR 检测放线菌素 D 处理后不同时间段 SLFN14 对 LINE-1 RNA 降解情况的影响。

那么 SLFN14 是在转录前还是转录后水平发挥作用呢? 有研究证实兔源 SLFN14 具有核酸内切酶活性, 能够降解 RNA^[28]。因此本研究利用放线菌素 D 能够抑制 RNA 聚合酶 II 活性的特性, 通过测量 LINE-1 RNA 的衰减变化进而验证 SLFN14 是否对 LINE-1 RNA 稳定性产生影响。将 LINE-1 和 SLFN14 质粒(1 mg)共转染 HEK293T 细胞 24 h 后放线菌素 D(5 $\mu\text{g/mL}$)处理, 于 0、0.5、1、2、4、8 h 后收集细胞, 提取细胞总 RNA, 利用 Real-time PCR 对 LINE-1 RNA 进行检测。结果显示, SLFN14 对于 LINE-1 RNA 降解有作用(图 4C), 这表明 SLFN14 可以在转录后水平影响 LINE-1 RNA 的降解。

2.5 SLFN14 通过抑制 LINE-1 5'-UTR 的内部启动子来抑制 LINE-1 RNA 的产生

SLFN14 是否也会在 LINE-1 转录前水平发挥作用呢? LINE-1 的 5'-UTR 包含具有转录启动功能的启动子, 这对于 LINE-1 的转录至关重要。为确定 SLFN14 是否影响 LINE-1 启动子活性, 将 LINE-1 5'-UTR 启动子序列克隆至 pGL3-basic 启动子活性报告质粒(图 5A), 该质粒的多克隆位点下游是一个缺少启动子序列的荧光素酶(luciferase)序列, 只有在其上游插入具有启动子活性的序列, 才能被激活进而表达出荧光素酶, 而后加入相应底物, 便可以通过酶标仪测定生物荧光变化, 反映基因的表达情况。

在排除 SLFN14 对 CMV 强启动子影响(图 5B)后, 结果显示, 野生型 SLFN14 会极大程度地抑制 LINE-1 5'-UTR 启动子活性(图 5C), 而 SLFN14 dN3 则无抑制作用(图 5D), 这表明 SLFN14 也可以在转录前水平抑制了 LINE-1 5'启动子活性从而抑制 LINE-1 RNA 表达, 最终影响 LINE-1 逆转录转座。

3 讨论

近年来对 SLFN 家族成员, 特别是 SLFN14 的研究较少, 其功能还没有被了解完全。迄今为止对 SLFN14 唯一的功能描述是称其为一真正的哺乳动物内切核糖核酸酶, 而目前对 SLFN14 病理性研究主要集中于血液病方向, SLFN14 是最近发现的与遗传性血小板减少相关的基因之一, 研究认为 SLFN14 可能参与了血小板形成和成熟过程及核糖体的降解^[29-32]。此外, 有研究表明在流感病毒感染时 SLFN14 表达于细胞核, 并对流感病毒的核蛋白(nuclearprotein, NP)表达进行限制^[25], 这提示 SLFN14 可能与 NP 相互作用。对此, 本课题组也对 SLFN14 与 LINE-1 核蛋白 ORF1p 的相互作用进行探究, 但却没有发现两者存在相互作用(结果未显示)。这提示 SLFN14 抗 LINE-1 转座机制可能与其抗流感感染机制不同, SLFN14 是通过间接作用影响 LINE-1 ORF1p 的表达。

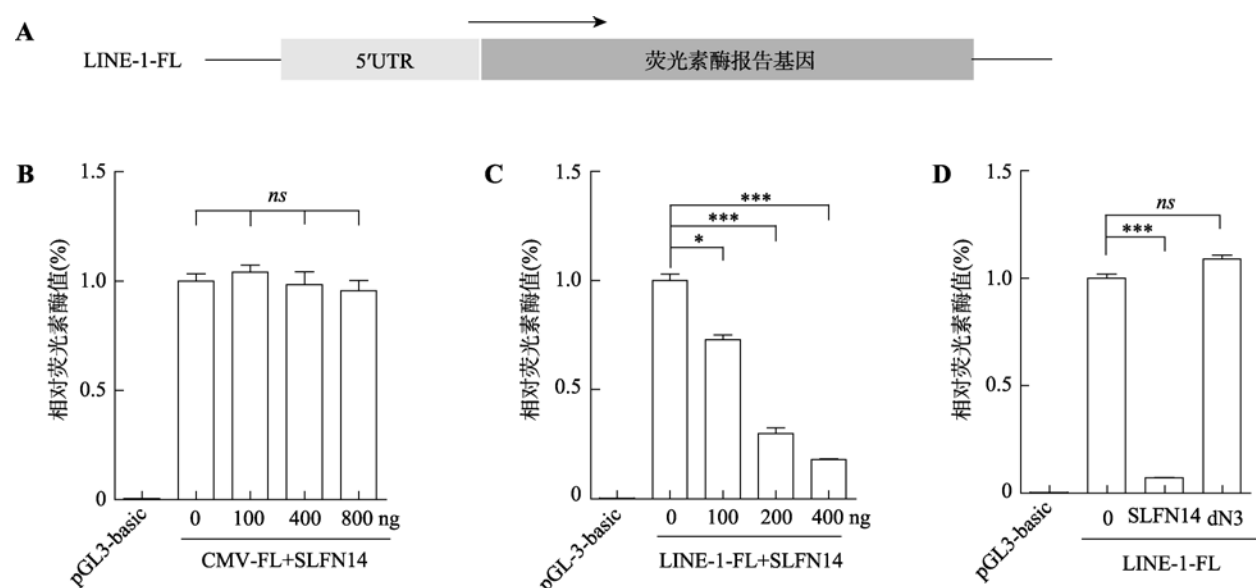


图5 SLFN14能够通过抑制 LINE-1 5'-UTR 启动子活性来抑制 LINE-1 转座

Fig. 5 SLFN14 inhibits LINE-1 retrotransposition by affecting LINE-1 5'-UTR promoter

A: 用于检测 LINE-1 5'-UTR 活性的 LINE-1-FL 质粒示意图。B: Luciferase 启动子活性报告系统检测转染野生型 SLFN14 对 CMV 启动子活性的影响。C: Luciferase 启动子活性报告系统检测转染野生型 SLFN14 后对 LINE-1 5'-UTR 内部启动子活性的影响。D: Luciferase 启动子活性报告系统检测转染 SLFN14 截短体 dN3 对 LINE-1 5'-UTR 内部启动子活性的影响。*: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$, ns: 无显著性差异。

本实验室对 SLFN14 的序列进行了分析, 经蛋白亚细胞定位预测工具网站(<https://www.genscript.com/psort.html>)比对, SLFN14 具有核定位序列, 预测其核定位序列为 PRVKKLH。通过免疫荧光实验发现, 野生型 SLFN14 主要定位于细胞质中。对此, Fletcher 等^[32]同样证实了这一点, 即 SLFN14 主要定位于细胞质当中, 在细胞核中仅有少量点状分布。然而, SLFN14 截短体的细胞分布却发生了显著变化, 丧失抗 LINE-1 活性的截短体 dN3 在细胞质、细胞核中弥散分布。因此推测一旦 SLFN14 大量停留在细胞核中, 便会丧失抗 LINE-1 活性。这表明正确的细胞分布对于 SLFN14 的抗 LINE-1 活性至关重要, 细胞分布的改变会对其活性产生负面影响。

通过 The Human Protein Atlas 数据库(<https://www.proteinatlas.org/>)分析 SLFN14 在细胞中蛋白表达水平低, 且经验证实验室常见细胞系无内源 SLFN14 蛋白表达, 因此没有对内源 SLFN14 的抗 LINE-1 转座活性进行进一步验证, 具有一定的局限性。同时, SLFN14 更详细的抗 LINE-1 转座作用机制, 特别是与 SLFN14 通过何种方式影响 LINE-1 5'-UTR 的相关分子机制研究还有待进一步研究。

综上所述, 本研究发现 SLFN14 可以抑制 LINE-1 的转座活性, 并将其活性中心定位于 N 端的核糖核酸内切酶及核糖体结合结构域上, 此部分的缺失会导致 SLFN14 细胞定位发生变化, 从而使 SLFN14 丧失抗 LINE-1 活性; 进一步实验证实 SLFN14 能够在转录前通过抑制 LINE-1 5'启动子活性从而降低 LINE-1 RNA 产生, 也能在转录后加速 LINE-1 RNA 的降解, 随后减少 LINE-1 ORF1p 及 cDNA 的表达, 最终抑制了 LINE-1 的转座。

参考文献(References):

- [1] Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrum J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann Y, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R,

- French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ, Szustakowski J, International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001, 409(6822): 860–921. [DOI]
- [2] Rodić N, Burns KH. Long interspersed element-1 (LINE-1): passenger or driver in human neoplasms? *PLoS Genet*, 2013, 9(3): e1003402. [DOI]
- [3] Leibold DM, Swergold GD, Singer MF, Thayer RE, Dombroski BA, Fanning TG. Translation of LINE-1 DNA elements in vitro and in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(18): 6990–6994. [DOI]
- [4] Martin SL. Nucleic acid chaperone properties of ORF1p from the non-LTR retrotransposon, LINE-1. *RNA Biol*, 2010, 7(6): 706–711. [DOI]
- [5] Piskareva O, Ernst C, Higgins N, Schmatchenko V. The carboxy-terminal segment of the human LINE-1 ORF2 protein is involved in RNA binding. *FEBS Open Bio*, 2013, 3: 433–437. [DOI]
- [6] Christian CM, deHaro D, Kines KJ, Sokolowski M, Belancio VP. Identification of L1 ORF2p sequence important to retrotransposition using Bipartite Alu retrotransposition (BAR). *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(10): 4818–4834. [DOI]
- [7] Ye ZJ, Liu QP, Cen S, Li XY. The function of LINE-1-encoded reverse transcriptase in tumorigenesis. *Hereditas(Beijing)*, 2017, 39(5): 368–376.
叶仲杰, 刘启鹏, 岑山, 李晓宇. LINE-1 编码的逆转录酶在肿瘤形成过程中的作用. *遗传*, 2017, 39(5): 368–376. [DOI]
- [8] Duan XC, Jin X, Xie Y, Jiao N, Liu J, Wang XY, Lv ZJ. Different effects on reporter gene expression by distinct L1-ORF2 segments. *Hereditas(Beijing)*, 2009, 31(1): 50–56.
段肖翠, 靳霞, 谢英, 焦宁, 刘静, 王晓燕, 吕占军. L1-ORF2 不同片段对报告基因表达产生不同影响. *遗传*, 2009, 31(1): 50–56. [DOI]
- [9] Goodier JL, Kazazian HH Jr. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell*, 2008, 135(1): 23–35. [DOI]
- [10] Babushok DV, Kazazian HH Jr. Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1. *Hum Mutat*, 2007, 28(6): 527–539. [DOI]
- [11] Ostertag EM, Kazazian HH Jr. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet*, 2001, 35: 501–538. [DOI]
- [12] Crowther PJ, Doherty JP, Linsenmeyer ME, Williamson MR, Woodcock DM. Revised genomic consensus for the hypermethylated CpG island region of the human L1 transposon and integration sites of full length L1 elements from recombinant clones made using methylation-tolerant host strains. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(9): 2395–2401. [DOI]

- [13] Thayer RE, Singer MF, Fanning TG. Undermethylation of specific LINE-1 sequences in human cells producing a LINE-1-encoded protein. *Gene*, 1993, 133(2): 273–277. [DOI]
- [14] Woodcock DM, Lawler CB, Linsenmeyer ME, Doherty JP, Warren WD. Asymmetric methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human L1 retrotransposon. *J Biol Chem*, 1997, 272(12): 7810–7816. [DOI]
- [15] Hata K, Sakaki Y. Identification of critical CpG sites for repression of L1 transcription by DNA methylation. *Gene*, 1997, 189(2): 227–234. [DOI]
- [16] Jachowicz JW, Bing X, Pontabry J, Bošković A, Rando OJ, Torres-Padilla ME. LINE-1 activation after fertilization regulates global chromatin accessibility in the early mouse embryo. *Nat Genet*, 2017, 49(10): 1502–1510. [DOI]
- [17] Rodic N. LINE-1 activity and regulation in cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2018, 23: 1680–1686. [DOI]
- [18] Liu Q, Wang JH, Li XY, Cen S. The connection between LINE-1 retrotransposition and human tumorigenesis. *Hereditas(Beijing)*, 2016, 38(2): 93–102.
刘茜, 王瑾晖, 李晓宇, 岑山. 逆转录转座子 LINE-1 与肿瘤的发生和发展. *遗传*, 2016, 38(2): 93–102. [DOI]
- [19] Bodak M, Yu J, Ciaudo C. Regulation of LINE-1 in mammals. *Biomol Concepts*, 2014, 5(5): 409–428. [DOI]
- [20] Wang XY, Zhang Y, Yang N, Cheng H, Sun YJ. DNMT3a mediates paclitaxel-induced abnormal expression of LINE-1 by increasing the intragenic methylation. *Hereditas(Beijing)*, 2020, 42(1): 100–111.
王昕源, 张雨, 杨楠, 程禾, 孙玉洁. DNMT3a 通过提升基因内部甲基化介导紫杉醇诱导的 LINE-1 异常表达. *遗传*, 2020, 42(1): 100–111. [DOI]
- [21] Goodier JL. Restricting retrotransposons: a review. *Mob DNA*, 2016, 7: 16. [DOI]
- [22] Schwarz DA, Katayama CD, Hedrick SM. Schlafen, a new family of growth regulatory genes that affect thymocyte development. *Immunity*, 1998, 9(5): 657–668. [DOI]
- [23] Liu FR, Zhou PT, Wang Q, Zhang MC, Li D. The Schlafen family: complex roles in different cell types and virus replication. *Cell Biol Int*, 2018, 42(1): 2–8. [DOI]
- [24] Li MQ, Kao E, Gao X, Sandig H, Limmer K, Pavon-Eternod M, Jones TE, Landry S, Pan T, Weitzman MD, David M. Codon-usage-based inhibition of HIV protein synthesis by human schlafen 11. *Nature*, 2012, 491(7422): 125–128. [DOI]
- [25] Seong RK, Seo SW, Kim JA, Fletcher SJ, Morgan NV, Kumar M, Choi YK, Shin OS. Schlafen 14 (SLFN14) is a novel antiviral factor involved in the control of viral replication. *Immunobiology*, 2017, 222(11): 979–988. [DOI]
- [26] Esnault C, Maestre J, Heidmann T. Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat Genet*, 2000, 24(4): 363–367. [DOI]
- [27] Kopera HC, Flasch DA, Nakamura M, Miyoshi T, Doucet AJ, Moran JV. LEAP: L1 element amplification protocol. *Methods Mol Biol*, 2016, 1400: 339–355. [DOI]
- [28] Pisareva VP, Muslimov IA, Tcherepanov A, Pisarev AV. Characterization of novel ribosome-associated endoribonuclease SLFN14 from rabbit reticulocytes. *Biochemistry*, 2015, 54(21): 3286–3301. [DOI]
- [29] Stapley RJ, Pisareva VP, Pisarev AV, Morgan NV. SLFN14 gene mutations associated with bleeding. *Platelets*, 2020, 31(3): 407–410. [DOI]
- [30] Marconi C, Di Buduo CA, Barozzi S, Palombo F, Pardini S, Zaninetti C, Pippucci T, Noris P, Balduini A, Seri M, Pecci A. SLFN14-related thrombocytopenia: identification within a large series of patients with inherited thrombocytopenia. *Thromb Haemost*, 2016, 115(5): 1076–1079. [DOI]
- [31] Fletcher SJ, Johnson B, Lowe GC, Bem D, Drake S, Lordkipanidzé M, Guiú IS, Dawood B, Rivera J, Simpson MA, Daly ME, Motwani J, Collins PW, Watson SP, Morgan NV. SLFN14 mutations underlie thrombocytopenia with excessive bleeding and platelet secretion defects. *J Clin Invest*, 2015, 125(9): 3600–3605. [DOI]
- [32] Fletcher SJ, Pisareva VP, Khan AO, Tcherepanov A, Morgan NV, Pisarev AV. Role of the novel endoribonuclease SLFN14 and its disease-causing mutations in ribosomal degradation. *RNA*, 2018, 24(7): 939–949. [DOI]

(责任编辑: 宋旭)