

# 多聚谷氨酰胺病 CAG 重复序列动态突变机制研究进展

王春荣 江泓

**【摘要】** 多聚谷氨酰胺病是一类中枢神经系统退行性疾病,由致病基因外显子内胞嘧啶-腺嘌呤-鸟嘌呤(CAG)三核苷酸重复序列拷贝数异常扩增导致其编码的多聚谷氨酰胺链异常延长,引起多聚谷氨酰胺扩展突变型蛋白积聚而致病。迄今为止,共发现9种因多聚谷氨酰胺扩展突变型蛋白积聚引起的遗传性神经退行性疾病。CAG重复序列在代间传递过程中发生动态突变(拷贝数不断扩增),进而导致发病年龄提前和疾病严重程度增加。

**【关键词】** 神经变性疾病; 谷氨酰胺; 三核苷酸重复; 动态突变; 综述

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2012.03.023

## Progress study on the mechanism of CAG repeats dynamic mutation in polyQ disease

WANG Chun-rong, JIANG Hong

Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan, China

Corresponding author: JIANG Hong (Email: jianghong73868@yahoo.com.cn)

**【Abstract】** Polyglutamine (polyQ) disease is a group of neurodegenerative disorders caused by abnormal expansion of CAG repeats within coding regions of certain causative genes, which are translated into a series of abnormally expanded polyQ tracts causing cytotoxicity. So far, nine diseases caused by expanded polyQ tracts have been demonstrated including Huntington's disease (HD), spinobulbar muscular atrophy (SBMA), dentatorubral-pallidoluyasian atrophy (DRPLA) and several spinocerebellar ataxias subtypes (SCA). In human, long CAG repeats tend to expand during transmissions from parent to offspring, named as dynamic mutation, leading to an earlier age of disease onset and more severe symptoms in subsequent generations. The review presents some novel mechanisms based on dynamic mutation.

**【Key words】** Neurodegenerative diseases; Glutamine; Trinucleotide repeats; Dynamic mutation; Review

**Fund Project:** Major State Basic Research Development Program of China (973 Program, No. 2012CB944600); National Natural Science Foundation of China (No. 30971585, No. 30871354, No. 30710303061, No. 30400262); New Century Excellent Talents in University (No. NCET-10-0836)

多聚谷氨酰胺(polyQ)病是一类由基因组特定区域胞嘧啶-腺嘌呤-鸟嘌呤(CAG)三核苷酸重复序列因动态突变发生病理性扩增进而引起 polyQ 链异常延长的遗传性中枢神经系统退行性疾病<sup>[1]</sup>,为三

核苷酸重复序列疾病(TRD)中的常见类型,包括亨廷顿病(HD)、脊髓延髓肌萎缩症(SBMA)、齿状核红核苍白球路易体萎缩(DRPLA),以及脊髓小脑共济失调 I 型(SCA1)、SCA2、SCA3[马查多约瑟夫病(Machado - Joseph 病, MJD)]、SCA6、SCA7 和 SCA17。基因动态突变系以 DNA 重复序列拷贝数在代间传递过程中发生不稳定持续扩增为特征的一类突变,经研究证实在代间传递过程中,下一代患者将表现为 CAG 重复序列更长、发病年龄更早、疾病症状更加严重,即“遗传早现”现象<sup>[2-3]</sup>。已知任何涉及单链 DNA 的生物过程,例如 DNA 修复、重组、复制或转录均可导致 CAG 重复序列拷贝数目异

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)(项目编号:2012CB944600);国家自然科学基金资助项目(项目编号:30971585);国家自然科学基金资助项目(项目编号:30871354);国家自然科学基金资助项目(项目编号:30710303061);国家自然科学基金资助项目(项目编号:30400262);2010年度教育部新世纪优秀人才支持计划(项目编号:NCET-10-0836)

作者单位:410008 长沙,中南大学湘雅医院神经内科

通讯作者:江泓(Email:jianghong73868@yahoo.com.cn)

常<sup>[2,4]</sup>。一直以来,探索基因动态突变的分子发病机制是遗传学的研究热点,笔者现将这方面研究的最新进展进行概述。

### 一、DNA 甲基化异常

人类体细胞 DNA 甲基化主要见于胞嘧啶-鸟嘌呤(CpG)二核苷酸中的胞嘧啶甲基化<sup>[5]</sup>,在 DNA 甲基转移酶(DNMTs)的作用下,CpG 二核苷酸中的胞嘧啶第 5 位碳原子被甲基化,修饰为 5 甲基胞嘧啶(5mC)。DNA 甲基化参与了基因的组织特异性表达、印迹和 X 染色体失活等多种生物学过程<sup>[6]</sup>。Bird<sup>[7]</sup>的研究表明,哺乳类动物细胞的 DNA 甲基化异常出现在基因重复序列或邻近重复序列的区域。在受精后胚胎发育早期和生殖细胞形成过程中,可先后两次出现三核苷酸重复序列不稳定<sup>[8]</sup>,此时 CpG 岛内均先后发生 DNA 去甲基化和重新甲基化<sup>[9]</sup>。因此,有学者提出上述时期出现的重复序列拷贝数目的不稳定可能与表观遗传机制有关<sup>[8]</sup>。迄今,有关相关致病基因甲基化对 CAG 重复序列动态突变影响的文献报道甚少。Laffita-Mesa 等<sup>[10]</sup>的研究结果显示,SCA2 致病基因 *ATXN2* 启动子区域 CpG 的 DNA 甲基化水平与患者 CAG 重复序列动态突变有关。Gorbunova 等<sup>[11]</sup>采用 5-aza-20 脱氧胞嘧啶核苷酸(破坏甲基转移酶活性)和胍苯哒嗪(抑制甲基转移酶的表达)处理哺乳动物细胞,发现可导致 CAG 重复序列拷贝数目的不稳定。Dion 等<sup>[12]</sup>应用 SCA1 转基因小鼠研究 DNA 甲基转移酶缺陷与 CAG 重复序列拷贝数稳定性之间的关系,其结果显示,与 DNMT1 纯合子转基因小鼠相比, DNMT1 杂合子转基因小鼠后代的 CAG 重复序列拷贝数目增加的概率明显增加;降低 DNMT1 表达水平可增加 CAG 重复序列拷贝数的不稳定性。López 等<sup>[13]</sup>亦发现,通过 DNA 甲基转移酶可以改变一些非 CpG 位点的胞嘧啶甲基化,从而引起亨廷顿病等疾病致病基因的 CAG 重复序列拷贝数的不稳定。

### 二、组蛋白修饰异常

有研究报道,组蛋白乙酰化程度降低和甲基化程度升高均可对亨廷顿病致病基因 *Htt* 的活化和沉默产生重要作用<sup>[14]</sup>。SET {Su (var), Enhancer of zeste [E(z)], and Trithorax} 结构域中的 ERG 结合蛋白(ESET)为新发现的组蛋白甲基化转移酶(HMT),具有调节组蛋白甲基化的功能。Ryu 等<sup>[15]</sup>发现,亨廷顿病患者和转基因小鼠纹状体 ESET 表达水平显著高于正常对照组及正常大鼠,而下调亨廷顿病小

鼠纹状体 *ESET/SETDB1* 基因表达水平则可改善病情。据 Wang<sup>[16]</sup>报告,组蛋白修饰功能的改变可以影响染色体结构,进而导致多种神经肌肉退行性疾病患者的 CAG 重复序列拷贝数不稳定。由组蛋白乙酰转移酶(HAT)介导的组蛋白乙酰化水平对维持 CAG 重复序列拷贝数的稳定性至关重要,其机制可能是在复制叉中促进核小体的组装从而阻止 DNA 结构异常变化,而由于组蛋白乙酰转移酶的缺陷将导致 CAG 重复序列拷贝数的不稳定<sup>[17]</sup>。最近,Debacker 等<sup>[18]</sup>发现,组蛋白去乙酰化酶复合体(HDACs)可促进亨廷顿病患者的转基因酵母 CAG 重复序列拷贝数的不稳定,若敲除经体外培养的星形胶质细胞的 *HDAC3* 基因或抑制其表达,可减少 CAG 重复序列拷贝数目;而采用小干扰 RNA (siRNA)技术沉默组蛋白乙酰转移酶 CBP/p300,则可使 CAG 重复序列拷贝数目增加。

### 三、插入序列对 CAG 重复序列的影响

重复序列中的插入序列可增加重复序列的稳定性。SCA1 致病基因 *ATXN1* 在正常情况下,其基因序列内的 CAG 重复序列中包含 1~3 个胞嘧啶-腺嘌呤-胸腺嘧啶(CAT)插入序列,它们之间通常由一个 CAG 序列间隔。CAG 重复序列中若无插入序列,则其拷贝数越多重复序列越不稳定<sup>[18]</sup>; *ATXN1* 基因 CAG 重复序列保持稳定的临界拷贝数为 35 次<sup>[19]</sup>。插入序列可以稳定 CAG 重复序列的拷贝数,而相关机制的研究鲜见报道。插入序列除可减少 DNA 滑链结构的形成、促进复制叉形成及修复复制中断的重复片段,还可通过改变核小体的结构以维持重复序列的稳定性。Mulvihill 等<sup>[20]</sup>的研究结果显示, CAG 重复序列中 CAT 插入类型及其插入位点对保持 *ATXN1* 基因的稳定性具有特异性作用,但其作用机制不明; SCA1 患者 *ATXN1* 基因 CAG 重复序列中的插入序列能够明显减少在核小体组装过程中 CAG 重复序列的拷贝数,而且是仅减少其拷贝数,不完全阻止 CAG 重复序列的病理性扩增。Yu 等<sup>[21]</sup>对肌萎缩侧索硬化症(ALS)患者进行 *ATXN2* 基因突变检测,发现有胞嘧啶-腺嘌呤-腺嘌呤(CAA)插入序列者较无插入序列者其 CAG 重复序列拷贝数目减少。在 *ATXN17* 基因三核苷酸序列中,若 CAA 插入 CAG 重复序列,则可限制该基因 CAG 重复序列拷贝数目的扩增<sup>[22-23]</sup>;而在 *ATXN2* 基因拷贝数目正常的 CAG 重复序列中含有 CAA 插入序列,而无 CAA 插入序列的 CAG 重复序列通常可出现拷贝数目的

动态扩增<sup>[24]</sup>。

#### 四、转录调控异常

转录关键因子和转录调控亦可引起 CAG 重复序列拷贝数的不稳定<sup>[25]</sup>。对人类及果蝇的研究显示,在 CAG 重复序列转录过程中形成的 DNA 二级结构可导致代间传递过程中重复序列拷贝数的不稳定<sup>[26-27]</sup>,同时亦证实,SCA7 致病基因 *ATXN7* 的 DNA 顺式作用元件可于特定位点调控 CAG 重复序列的拷贝数。目前,对于顺式作用元件调控 CAG 重复序列动态突变的机制尚不十分清楚,推测可能与下列因素有关:重复区域内重复序列的拷贝数及纯度、DNA 侧翼序列、遗传环境、复制起点、反式作用因子,以及转录活性等<sup>[2,28]</sup>。CCCTC-结合因子(CTCF)为一种进化保守的含锌指结构的 DNA 结合蛋白质(又名 11-锌指蛋白),与转录调节和基因组印迹有关,可影响染色体的高级结构<sup>[29]</sup>。为了明确转录因子对 *ATXN7* 基因中 CAG 重复序列拷贝数的作用,Libby 等<sup>[30]</sup>通过对 SCA7 转基因小鼠进行观察,发现 CTCF-1 结合位点的基因突变可导致结合位点减少,从而引起 CAG 重复序列拷贝数目的不稳定性。转录过程中长 CAG/CTG 重复序列所形成的 DNA-RNA 杂合链,也可以促进 CAG/CTG 重复序列拷贝数目的不稳定性<sup>[31]</sup>。

#### 五、DNA 重组及修复异常

有研究显示,同源重组可导致中国仓鼠卵巢细胞(CHO)腺嘌呤磷酸核糖转移酶位点的 CAG 重复序列的不稳定性<sup>[32]</sup>,而 DNA 甲基化并非通过同源重组机制诱发 CAG 重复序列拷贝数的动态突变<sup>[33]</sup>。分子伴侣 Hsp90 也可通过同源基因重组而导致 CAG 重复序列拷贝数不稳定<sup>[34]</sup>。另外,含有 CAG 重复序列的基因片段在 DNA 双链缺口修复过程中,错配修复(MMR)可导致非典型性修复终止,从而使 CAG 重复序列扩增<sup>[35]</sup>;DNA 错配修复同样是 CAG 重复序列拷贝数不稳定的原因之一<sup>[36]</sup>。Crespan 等<sup>[37]</sup>的研究结果表明,亨廷顿病患者在 DNA 修复过程中其 DNA 聚合酶 $\beta$ 通过末端连接可导致 CAG 重复序列拷贝数目的扩增。而 Liu 和 Leffak<sup>[38]</sup>则认为,在 DNA 复制和切除修复过程中,若新生成的 DNA 链中发夹结构存留时间过长并成为下一轮 DNA 复制的模板,则可引起随后生成的 DNA 链中 CAG 重复序列的拷贝数目扩增。

#### 六、结论与展望

目前,尽管 polyQ 病的发病机制尚未完全阐明,

但 CAG 重复序列动态突变作为始动因素的观点已被广泛接受。由于动态突变的致病范围较大、致病途径复杂多样,目前仍有一些问题亟待阐明,例如:DNA 甲基化、组蛋白去乙酰化引起 CAG 重复序列不稳定性的作用机制,以及 CAG 重复序列通过影响致病基因转录和翻译而致病的机制等。上述问题的深入探讨对攻克 polyQ 病等中枢神经系统遗传性疾病具有重要指导意义。

#### 参 考 文 献

- [1] Orr HT, Zoghbi HY. Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci*, 2007, 30:575-621.
- [2] Mirkin SM. Expandable DNA repeats and human disease. *Nature*, 2007, 447:932-940.
- [3] Lee JM, Ramos EM, Lee JH, et al. CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. *Neurology*, 2012, 78:690-695.
- [4] Claassen DA, Lahue RS. Expansions of CAG. CTG repeats in immortalized human astrocytes. *Hum Mol Genet*, 2007, 16:3088-3096.
- [5] Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell*, 2007, 128:669-681.
- [6] Bartolomei MS, Ferguson-Smith AC. Mammalian genomic imprinting. *Cold Spring Harb Perspectives Biol*, 2011, 3:a002592.
- [7] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 2002, 16:6-21.
- [8] Pearson CE, Nichol Edamura K, Cleary JD. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet*, 2005, 6:729-742.
- [9] Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, 2007, 447:425-432.
- [10] Laffita-Mesa JM, Bauer PO, Kouri V, et al. Epigenetics DNA methylation in the core ataxin - 2 gene promoter: novel physiological and pathological implications. *Hum Genet*, 2012, 131:625-638.
- [11] Gorbunova V, Seluanov A, Mittelman D, et al. Genome-wide demethylation destabilizes CTG. CAG trinucleotide repeats in mammalian cells. *Hum Mol Genet*, 2004, 13:2979-2989.
- [12] Dion V, Lin Y, Hubert L Jr, et al. Dnm1 deficiency promotes CAG repeat expansion in the mouse germline. *Hum Mol Genet*, 2008, 17:1306-1317.
- [13] López Castel A, Nakamori M, Thornton CA, et al. Identification of restriction endonucleases sensitive to 5-cytosine methylation at non-CpG sites, including expanded (CAG)<sub>n</sub>/(CTG)<sub>n</sub> repeats. *Epigenetics*, 2011, 6:416-420.
- [14] Gardian G, Browne SE, Choi DK, et al. Neuroprotective effects of phenylbutyrate in the N171-82Q transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Biol Chem*, 2005, 280:556-563.
- [15] Ryu H, Lee J, Hagerty SW, et al. ESET/SETDB1 gene expression and histone H3 (K9) trimethylation in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:19176-19181.
- [16] Wang YH. Chromatin structure of repeating CTG/CAG and CCG/CCG sequences in human disease. *Front Biosci*, 2007, 12:4731-4741.
- [17] Yang JH, Freudenreich CH. The Rtt109 histone acetyltransferase facilitates error-free replication to prevent CAG/CTG repeat contractions. *DNA Repair (Amst)*, 2010, 9:414-

- 420.
- [18] Debacker K, Frizzell A, Gleeson O, et al. Histone deacetylase complexes promote trinucleotide repeat expansions. *PLoS Biol*, 2012, 10:e1001257.
- [19] Chung MY, Ranum LP, Duvick LA, et al. Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet*, 1993, 5: 254-258.
- [20] Mulvihill DJ, Nichol Edamura K, Hagerman KA, et al. Effect of CAT or AGG interruptions and CpG methylation on nucleosome assembly upon trinucleotide repeats on spinocerebellar ataxia, type 1 and fragile X syndrome. *J Biol Chem*, 2005, 280:4498-4503.
- [21] Yu Z, Zhu Y, Chen-Plotkin AS, et al. PolyQ repeat expansions in ATXN2 associated with ALS are CAA interrupted repeats. *PLoS One*, 2011, 6:e17951.
- [22] Gao R, Matsuura T, Coolbaugh M, et al. Instability of expanded CAG/CAA repeats in spinocerebellar ataxia type 17. *Eur J Hum Genet*, 2008, 16:215-222.
- [23] Tomiuk J, Bachmann L, Bauer C, et al. Repeat expansion in spinocerebellar ataxia type 17 alleles of the TATA-box binding protein gene: an evolutionary approach. *Eur J Hum Genet*, 2007, 15:81-87.
- [24] Ramos EM, Martins S, Alonso I, et al. Common origin of pure and interrupted repeat expansions in spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2010, 153B:524-531.
- [25] Cleary JD, Nichol K, Wang YH, et al. Evidence of cis-acting factors in replication-mediated trinucleotide repeat instability in primate cells. *Nat Genet*, 2002, 31:37-46.
- [26] Lin Y, Wilson JH. Transcription-induced CAG repeat contraction in human cells is mediated in part by transcription-coupled nucleotide excision repair. *Mol Cell Biol*, 2007, 27:6209-6217.
- [27] Lin Y, Dion V, Wilson JH. Transcription promotes contraction of CAG repeat tracts in human cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13:179-180.
- [28] Jung J, Bonini N. CREB-binding protein modulates repeat instability in a Drosophila model for polyQ disease. *Science*, 2007, 315:1857-1859.
- [29] Filippova GN. Genetics and epigenetics of the multifunctional protein CTCF. *Curr Top Dev Biol*, 2008, 80:337-360.
- [30] Libby RT, Hagerman KA, Pineda VV, et al. CTCF cis-regulates trinucleotide repeat instability in an epigenetic manner: a novel basis for mutational hot spot determination. *PLoS Genet*, 2008, 4:e1000257.
- [31] Lin Y, Dent SY, Wilson JH, et al. R loops stimulate genetic instability of CTG. CAG repeats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107:692-697.
- [32] Meservy JL, Sargent RG, Iyer RR, et al. Long CTG tracts from the myotonic dystrophy gene induce deletions and rearrangements during recombination at the APRT locus in CHO cells. *Mol Cell Biol*, 2003, 23:3152-3162.
- [33] Dion V, Lin Y, Price BA, et al. Genome-wide demethylation promotes triplet repeat instability independently of homologous recombination. *DNA Repair (Amst)*, 2008, 7:313-320.
- [34] Mittelman D, Sykoudis K, Hersh M, et al. Hsp90 modulates CAG repeat instability in human cells. *Cell Stress Chaperones*, 2010, 15:753-759.
- [35] Sundararajan R, Gellon L, Zunder RM, et al. Double-strand break repair pathways protect against CAG/CTG repeat expansions, contractions and repeat-mediated chromosomal fragility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2010, 184:65-77.
- [36] Lin Y, Wilson JH. Diverse effects of individual mismatch repair components on transcription-induced CAG repeat instability in human cells. *DNA Repair*, 2009, 8:878-885.
- [37] Crespan E, Czabany T, Maga G, et al. Microhomology-mediated DNA strand annealing and elongation by human DNA polymerases lambda and beta on normal and repetitive DNA sequences. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40:1-14.
- [38] Liu G, Leffak M. Instability of (CTG)<sub>n</sub>\*(CAG)<sub>n</sub> trinucleotide repeats and DNA synthesis. *Cell Biosci*, 2012, 2:7.

(收稿日期:2012-05-21)

## 第四届新纪元国际脑血管病多学科共享大会会议通知

由 Cleveland Clinic Cerebrovascular Center 和解放军第二炮兵总医院新纪元卒中医疗救治研究中心主办的第四届新纪元国际脑血管病多学科共享大会(The 4<sup>th</sup> New Era International Multidisciplinary Sharing, NEIMS)中文会议 2012 年 7 月 20-22 日在北京歌华开元大酒店召开,英文会议 2012 年 9 月 21-23 日在美国拉斯维加斯召开。姜卫剑教授和 Peter Rasmussen 教授任大会主席。欢迎神经内科、神经外科、急诊科及重症医学科、心血管内科、老年病科、综合内科等相关科室及心脑血管病研究领域人员积极参会。

1. 会议内容 (1)卒中系统建设。(2)卒中患者的急诊接诊和处理。(3)脑卒中患者重症监护。(4)急性缺血性卒中的早期静脉溶栓治疗。(5)急性缺血性卒中的早期动脉溶栓治疗。(6)急性大动脉闭塞的机械性开通治疗。(7)脑缺血半暗带的评价。(8)缺血-再灌注损伤的预防。(9)破裂动脉瘤的栓塞治疗。(10)卒中的康复治疗。(11)卒中后吞咽功能的评价与训练。(12)脑卒中患者的外科减压治疗。(13)脑卒中患者的专业护理。(14)TCD 诊断及临床应用进展。(15)颈动脉支架成形术进展。(16)颅内动脉支架成形术进展。

2. 联系方式 北京市朝阳区工体东路 20 号百富国际大厦 A 座 18B。邮政编码:100020。联系人:钟小云。联系电话:(010)57108108;15300027108,18810236140。传真:(010)65919906。Email:NEIMSC@163.com。在线注册:www.nestroke.org。各种报名方式请务必说明或注明“NEIMS”大会。