

脆性X智力低下蛋白致病机制研究进展

董玉霞 孙晓红 宋卫科 何悦

【关键词】 脆性X综合征； 脆性X智力低下蛋白质； 综述文献

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2010.03.021

脆性X智力低下蛋白(FMRP)是X染色体长臂脆性X智力低下1(*fmr1*)基因编码的一种多功能mRNA结合蛋白,其结合并调控神经元胞质内多种mRNA的靶向转运与翻译过程,调控突触部位多种功能蛋白的表达。目前研究认为,由*fmr1*基因动态突变引起的脆性X智力低下蛋白不表达或低表达可影响神经元的发育成熟和突触可塑性,最终导致脆性X综合征(FXS),出现癫痫发作、认知功能障碍和智力障碍等典型临床症状^[1]。

脆性X智力低下蛋白由*fmr1*基因编码,突触兴奋时在树突棘基部合成,可与包括其自身mRNA在内的多种mRNA结合,通过对mRNA表达过程的调节来调控神经元形态及可塑性,其表达缺失可引起一种常见的人类家族遗传性智力障碍疾病——脆性X综合征。主要表现为智力发育迟缓低下、适应能力下降和孤独样症状,部分患者出现癫痫发作,同时伴大睾丸、脸颊狭长、下颌突出等典型体征。Sherman等^[2]经对此类家系大量研究后提出了遗传早现(anticipation)理论,即某种遗传性疾病家系中智力低下个体数目比例及发病程度随代数传递而增加。这种不符合孟德尔遗传规律的现象引起了学者们的广泛关注,对该疾病及其致病机制的探索成为遗传学、神经发育生物学、神经病学,以及行为学等多个专业领域的研究热点。

一、脆性X智力低下蛋白的编码基因

脆性X智力低下蛋白的编码基因*fmr1*位于Xq27.3, Verkerk等^[3]首先采用酵母人工染色体技术克隆出*fmr1*基因,对其结构分析发现整个基因跨度38 kb,包括17个外显子和16个内含子;转录后的mRNA长度约为4.40 kb。正常人群*fmr1*基因5'端存在多态性分布的胞嘧啶-鸟嘌呤-鸟嘌呤(CGG)重复序列,重复序列数目为6~54个单元,频率高峰位于29个单元,重复序列间穿插腺嘌呤-鸟嘌呤-鸟嘌呤

(AGG)序列。脆性X携带者CGG呈不显著扩增状态,重复序列为60~230个单元,仍保持相对正常的蛋白质表达水平。当CGG重复序列>230个单元时为全基因突变,通常伴其上游250 bp处基因启动子CpG岛(promoter region of the gene—a CpG island)的异常甲基化,此时*fmr1*基因呈失活状态,无蛋白质表达产物^[4]。

二、脆性X智力低下蛋白的结构特点

体外研究表明,脆性X智力低下蛋白可以与包括其自身mRNA在内的约4%的脑组织mRNA结合^[5]。这种结合的实现由其自身结构所决定。脆性X智力低下蛋白的相对分子质量为(69~70)×10³,空间结构中含有与RNA结合所必需的结构域:两个内源性重复序列(KH)控制域和一个富含精氨酸和甘氨酸的RGG盒(RGG box)^[6]。KH控制域由*fmr1*基因外显子7、8、9编码,位于多肽链中间,是脆性X智力低下蛋白结合靶mRNA必不可少的结构。据文献报道,*fmr1*基因第367位亮氨酸突变为天冬氨酸使KH控制域结构发生改变,无法结合mRNA,临床表现为严重智力障碍。RGG盒由*fmr1*基因外显子15和16编码,位于羧基末端(C末端),决定脆性X智力低下蛋白与靶mRNA的特异性识别和结合^[7]。体外构建KH控制域和RGG盒突变模型证明,完整的KH控制域和RGG盒是脆性X智力低下蛋白与RNA结合不可或缺的前提条件。

脆性X智力低下蛋白在细胞内的定位和转移同样依赖于其自身结构。脆性X智力低下蛋白第117~184号氨基酸位点存在一个核定位信号(NLS)区域,第429~438号氨基酸位点有一核输出信号(NES)区域^[8]。脆性X智力低下蛋白在突触附近区域合成并形成二聚体,借助核定位信号转移到细胞核内,通过KH控制域和RGG盒与靶mRNA结合形成信使核糖核蛋白(FMRP-mRNP),随后借助核输出信号出核,以直接结合或间接结合两种方式与核糖体结合,在神经元胞质局部或运输到树突远端调节蛋白质表达^[9]。间接结合方式指FMRP-mRNP首先与RNA诱导沉默复合体(RISC)连接,借助RISC与核糖体结合。

三、脆性X智力低下蛋白的功能

脆性X综合征患者出现广泛的临床症状并突出表现为智力低下及认知功能障碍,与脆性X智力低下蛋白在体内的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:30700220);中国博士后科研基金资助项目(项目编号:20080431165);辽宁省博士启动基金资助项目(项目编号:20081057);辽宁省沈阳市科技计划项目(项目编号:1081234-1-00)

作者单位:110032 沈阳,中国医科大学附属第四医院神经内科
通信作者:孙晓红(Email:sunxiaohong1972@hotmail.com)

分布特点密不可分。免疫组织化学研究显示,脆性 X 智力低下蛋白表达于机体多数组织细胞胞质内,尤以大脑海马和皮质浦肯野细胞层神经元、颗粒细胞层神经元和睾丸精原细胞含量丰富^[10]。目前,有关脆性 X 智力低下蛋白功能的研究主要集中于脆性 X 智力低下蛋白对神经元发育和突触可塑性的分子学机制及形态学影响上。

1. 脆性 X 智力低下蛋白与 mRNA 的结合方式 脆性 X 智力低下蛋白通过 KH 控制域和 RGG 盒与靶 mRNA 结合,具体存在两种方式。(1)直接结合:脆性 X 智力低下蛋白与靶 mRNA 直接结合需依赖靶 mRNA 分子中存在的 G-四聚体结构^[11,12]。对靶 *fmr1* mRNA 进行研究发现,其与脆性 X 智力低下蛋白的结合部位在 *fmr1* mRNA 含 G-四聚体结构的 RGG 盒编码区^[11]。G-四聚体结构周围环的特征序列影响二者的结合,G-四聚体结构以外或者茎部核苷酸突变可以显著降低其结合能力^[12]。(2)间接结合:突触处非编码 RNA——BC1 (brain cytoplasmic RNA 1)可以同时结合脆性 X 智力低下蛋白和 mRNA,从而介导二者的间接结合^[13]。此外,有研究认为脆性 X 智力低下蛋白通过 RNA 相互作用蛋白实现与 mRNA 的结合^[14]。

2. 脆性 X 智力低下蛋白对 mRNA 表达的调控 脆性 X 智力低下蛋白与靶 mRNA 结合形成 FMRP-mRNP 转运出细胞核,复合物中的脆性 X 智力低下蛋白与驱动蛋白结合,在代谢型谷氨酸受体(mGluR)激活的情况下,驱动蛋白轻链协助 FMRP-mRNP 在树突中转运并定位^[15]。目前研究认为,脆性 X 智力低下蛋白负性调节神经元局部及树突部位活性蛋白的表达。定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)观察到 *fmr1* 基因敲除小鼠树突处编码成熟相关蛋白的 mRNA 翻译效率高于野生对照组^[13],此类成熟蛋白质包括微管相关蛋白 1B(MAP1B)、钙/钙调素依赖蛋白激酶 II (CaMK II) 等。与 FMRP-mRNP 结合核糖体的方式相对应,目前已知的脆性 X 智力低下蛋白调节 mRNA 表达的方式可归纳为直接和间接两种:(1)脆性 X 智力低下蛋白通过自身磷酸化状态的转换直接调节 mRNA 表达^[16]。脆性 X 智力低下蛋白为一种磷酸蛋白,是非受体型酪氨酸激酶 FeS 的底物^[17]。脆性 X 智力低下蛋白磷酸化状态主要存在于细胞核内,对靶 mRNA 翻译抑制作用较强,转运出细胞核后脆性 X 智力低下蛋白主要以去磷酸化状态存在,翻译抑制作用减弱。(2)脆性 X 智力低下蛋白介导 RNA 干扰(RNAi)间接调节表达过程^[18]。RNAi 系指将与靶基因 mRNA 存在同源互补序列的双链 RNA(dsRNA)导入细胞,特异性地降解该 mRNA,从而产生相应的功能表型缺失,这一过程属于转录后基因沉默机制范畴^[19]。FMRP-mRNP 与核糖体的间接结合是通过 RISC 实现的,RISC 的成分包括小干扰 RNA (siRNA)、内切核酸酶、外切核酸酶、解旋酶和 PAZ/Piwi 蛋白家族成员如 Ago2 等。其中 siRNA 是 RNA 干扰作用赖以实现的重要中间分子,据文献报道,RISC 中的 Ago2 成分是脆性 X 智力低下蛋白发挥负性调节作用所必需的^[20]。说明脆性 X 智力低下蛋白以 RISC 为中

间物质介导靶 mRNA 分子中与 siRNA 反义链互补区域的剪接,从而实现基因表达的干扰作用。另有研究发现,脆性 X 智力低下蛋白对翻译的抑制作用在一定程度上受 CYFIP1 (cytoplasmic *fmr1* interacting protein 1)调控^[21]。CYFIP1/Sral 是脆性 X 智力低下蛋白的结合伴侣之一,所含与翻译抑制剂 4E-BP(eIF4E binding proteins)相似的结构域可直接结合翻译起始因子 4E(eIF4E)阻断翻译过程,CYFIP1 减少时,靶 mRNA 编码的蛋白质水平升高,CYFIP1 与 eIF4E 分离时,蛋白质合成增加;脆性 X 智力低下蛋白的另一结合伴侣胞质 RNA(BC1)可以促进 CYFIP1 与 eIF4E 结合。

四、与临床症状相关的神经元形态和功能改变

脆性 X 智力低下蛋白表达缺失时突触树突棘部位维持神经元发育的功能蛋白表达改变,从而影响神经干细胞分化成熟及神经元突触可塑性。*fmr1* 基因敲除小鼠神经干细胞体外诱导分化发现,神经球突起短而小、神经元体积小、室管膜及室管膜下区幼稚细胞表达是对照组的 4 倍^[22]。脆性 X 综合征患者的尸检及 *fmr1* 基因敲除小鼠神经元形态学研究发现,大脑海马锥体细胞和小脑浦肯野细胞树突棘密度增加,呈现细长、扭曲的幼稚形态^[9]。树突棘是神经元树突的功能性突起结构,通常作为突触后成分与投射来的轴突共同组成完整的突触连接,结构和功能呈明显可塑性。树突棘形态改变影响突触后膜接收神经递质,表现为突触可塑性异常。当上述病理改变广泛出现在大脑皮质、海马等认知功能区时,临床上即表现为明显的认知功能与智力障碍。

另外,部分脆性 X 综合征患者伴有癫痫发作,是否与调节神经元和神经胶质细胞兴奋性的代谢型谷氨酸受体有关?依循这一思路,芬兰神经科学中心(Neuroscience Center of Finland)Castrén 实验小组和美国霍华德·休斯医学研究所(HHMI)脑与认知科学中心 Bear 小组分别进行了不同的实验研究^[22,23]。前者在实验中增加钙离子信号通道的水平,发现脆性 X 综合征患者与 *fmr1* 基因敲除小鼠的体外诱导神经元分化受到抑制,认为脆性 X 智力低下蛋白表达缺失时代谢型谷氨酸受体依赖性翻译过表达,是神经元成熟早期形态学异常及神经递质表达异常的原因,导致临床发育迟滞及智力障碍^[22]。后者则在实验中应用代谢型谷氨酸受体激动剂刺激 *fmr1* 基因敲除小鼠,发现代谢型谷氨酸受体依赖性长时程抑制(LTD)效应增强,并伴突触蛋白合成酶增加,认为脆性 X 智力低下蛋白功能缺失是脆性 X 综合征智力障碍与癫痫发作的病理生理学因素^[23]。

五、展望

迄今,有关脆性 X 智力低下蛋白的研究主要采用基因敲除小鼠和果蝇模型,已取得阶段性认识^[24,25]。近年来,一种可视化小鼠模型为脆性 X 综合征相关蛋白与基因致病机制研究提供了新途径,即在小鼠活体胚胎时期用电极针刺技术将标记增强型绿色荧光蛋白(EGFP)表达载体的质粒转染到脑内,结合激光共聚焦检测技术动态、直观地观察小鼠从胚胎到出生后脑发育过程中神经元的迁徙分化情况^[26]。目

前,基因干预和治疗时间窗选择等方面研究较少,是否可以致在致病机制研究基础上通过实验技术补充脆性X智力低下蛋白乃至分子诱导途径激发内源性代偿机制,从而改善脆性X智力低下蛋白缺失造成的神经元分化迁徙异常与发育迟滞症状,尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Huber KM. The fragile X - cerebellum connection. *Trends Neurosci*, 2006, 29:183-185.
- [2] Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, et al. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Human Genet*, 1985, 69:289-299.
- [3] Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, et al. Identification of a gene (FMR - 1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, 1991, 65:905-914.
- [4] Nichol Edamura K, Leonard MR, Pearson CE, et al. Role of replication and CpG methylation in fragile X syndrome CGG deletions in primate cells. *Am J Hum Genet*, 2005, 76:302-311.
- [5] Tamanini F, Meijer N, Verheij C, et al. FMRP is associated to the ribosomes via RNA. *Hum Mol Genet*, 1996, 5:809-813.
- [6] Siomi H, Siomi MC, Nussbaum RL, et al. The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell*, 1993, 74:291-298.
- [7] De Boulle K, Verkerk AJ, Reyniers E, et al. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet*, 1993, 3:31-35.
- [8] Eberhart DE, Malter HE, Feng Y, et al. The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet*, 1996, 5:1083-1091.
- [9] Van Esch H. The Fragile X premutation: new insights and clinical consequences. *Eur J Med Genet*, 2006, 49:1-8.
- [10] Agulhon C, Blanchet P, Kobetz A, et al. Expression of FMR1, FXR1, and FXR2 genes in human prenatal tissues. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1999, 58:867-880.
- [11] Schaeffer C, Bardoni B, Mandel JL, et al. The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. *EMBO J*, 2001, 20:4803-4813.
- [12] Darnell JC, Jensen KB, Jin P, et al. Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell*, 2001, 107:489-499.
- [13] Zalfa F, Giorgi M, Primerano B, et al. The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell*, 2003, 112:317-327.
- [14] Rackham O, Brown CM. Visualization of RNA - protein interactions in living cells: FMRP and IMP1 interact on mRNAs. *EMBO J*, 2004, 23:3346-3355.
- [15] Penagarikano O, Mulle JG, Warren ST. The pathophysiology of fragile X syndrome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2007, 8: 109-129.
- [16] Ceman S, O'Donnell WT, Reed M, et al. Phosphorylation influences the translation state of FMRP - associated polyribosomes. *Hum Mol Genet*, 2003, 12:3295-3305.
- [17] Castrén M, Haapasalo A, Oostra BA, et al. Subcellular localization of fragile X mental retardation protein with the I304N mutation in the RNA - binding domain in cultured hippocampal neurons. *Cell Mol Neurobiol*, 2001, 21:29-38.
- [18] Plante I, Davidovic L, Ouellet DL, et al. Dicer - derived microRNAs are utilized by the fragile X mental retardation protein for assembly on target RNAs. *J Biomed Biotechnol*, 2006, (4):64347.
- [19] Kim D, Rossi J. RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques*, 2008, 44:613-616.
- [20] Jin P, Zarnescu DC, Ceman S, et al. Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat Neurosci*, 2004, 7:113-117.
- [21] Napoli I, Mercaldo V, Boyle PP, et al. The fragile X syndrome protein represses activity - dependent translation through CYFIP1, a new 4E-BP. *Cell*, 2008, 134:1042-1054.
- [22] Castrén M, Tervonen T, Kärkkäinen V, et al. Altered differentiation of neural stem cells in fragile X syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102:17834-17839.
- [23] Bear MF, Huber KM, Warren ST. The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci*, 2004, 27:370-377.
- [24] Mientjes EJ, Nieuwenhuizen I, Kirkpatrick L, et al. The generation of a conditional Fmr1 knock out mouse model to study Fmrp function in vivo. *Neurobiol Dis*, 2006, 21:549-555.
- [25] Musumeci SA, Calabrese G, Bonaccorso CM, et al. Audiogenic seizure susceptibility is reduced in fragile X knockout mice after introduction of FMR1 transgenes. *Exp Neurol*, 2007, 203: 233-240.
- [26] Okada T, Keino-Masu K, Masu M. Migration and nucleogenesis of mouse precerebellar neurons visualized by in utero electroporation of a green fluorescent protein gene. *Neurosci Res*, 2007, 57:40-49.

(收稿日期:2009-09-16)

欢迎订阅2010年《中国现代神经疾病杂志》

《中国现代神经疾病杂志》为国家卫生部主管、中国医师协会主办的神经病学类专业期刊。办刊宗旨为:理论与实践相结合、普及与提高相结合,充分反映我国神经内外科临床科研工作重大进展,促进国内外学术交流。所设栏目包括述评、专论、论著、临床病理报告、应用神经解剖学、神经影像学、综述、短篇论著、临床医学图像、学术争鸣、病例报告、临床病理(例)讨论、新技术新方法、技术改进、临床药学查房、药物与临床、会议纪要以及国外研究动态等。

《中国现代神经疾病杂志》为国家科技部中国科技论文统计源期刊,国内外公开发行。中国标准连续出版物号:ISSN 1672-6731;CN 12-1363/R。国际大16开型,彩色插图,72页,双月刊,逢双月16日出版。每期定价8元,全年6册48元。2010年仍由邮电局发行,邮发代号:6-182。请向全国各地邮电局订阅,亦可直接向编辑部订阅(免费邮寄)。

编辑部地址:天津市河西区气象台路122号天津市环湖医院内,邮政编码:300060。

联系电话:(022)60367623;传真:(022)60367927。