



论 文

POLD1 基因启动子中 CDE/CHR 元件的鉴定及功能分析

宋楠萌^①, 朱晓宇^{①②}, 石磊^①, 安婧^①, 武彦威^①, 桑建利^{①*}^① 北京师范大学细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室, 北京 100875^② 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206

* 联系人, E-mail: jlsang@bnu.edu.cn

收稿日期: 2009-03-01; 接受日期: 2009-04-09

国家重大科学研究计划(批准号: 2007CB914401)和国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA02Z4A6)资助项目

摘要 *POLD1* 基因编码真核生物 DNA 聚合酶 δ 的催化亚基, 其表达调控与细胞周期密切相关. 为了探讨 *POLD1* 基因表达的调控机理, 本研究首次在 *POLD1* 基因启动子中鉴定出 CDE/CHR 元件, 随后通过分析元件序列定点突变对其转录活性的影响, 以及与细胞周期相关的转录因子 E2F 和 CDK 及抑制因子 p21^{WAF1/Cip1} 对其转录活性的调控作用, 对此元件的功能进行了分析. 结果显示, CDE/CHR 元件序列突变后 *POLD1* 基因启动子转录活性明显升高, 其转录活性不再受到 E2F 和 p21^{WAF1/Cip1} 的调控, 转录活性的细胞周期依赖性调控消失. 与此同时本研究对直接参与 CDE/CHR 元件调控的蛋白进行了初步检测, 结果显示, 至少存在 3 种蛋白复合体能够与 *POLD1* 基因启动子中的 CDE/CHR 元件结合. 由此证实, *POLD1* 基因启动子中存在 CDE/CHR 元件, 此元件与 *POLD1* 基因转录的细胞周期依赖性调控直接相关.

关键词*POLD1* 基因
启动子活性
CDE/CHR 元件
定点突变

在正常细胞中, DNA 复制调控系统进行正常 DNA 复制合成, 以供细胞正常增殖所需, 一旦这个平衡失调, 将造成 DNA 复制异常进而导致细胞病变或癌变. 研究细胞周期调控系统调控 DNA 正常复制的机理, 一个直接的突破口就是 DNA 复制相关蛋白本身(如 DNA 聚合酶 δ)的调控^[1,2]. DNA 聚合酶 δ (pol δ)是一种细胞周期依赖性表达的 DNA 聚合酶, 在 DNA 复制、修复、重组及细胞周期调控中都起到重要作用^[3]. 哺乳动物细胞 pol δ 由 4 个亚基构成(p125, p66, p50 和 p12), 其中 p125 亚基为催化亚基, 其编码基因称为 *POLD1*. 目前已在肝癌、结肠癌、淋巴癌等细胞或临床样本中检测到 *POLD1* 基因某些位点的突变, 因此而导致的 DNA 复制过程发生根本变化有可能是

细胞癌变的原因^[4]. 人 *POLD1* 基因定位于染色体 19q13.3~q13.4, 包括 27 个外显子和 26 个内含子, 其转录起始位点位于翻译起始位点 ATG 上游第 53 个核苷酸处. *POLD1* 基因启动子富含 GC 碱基但没有 TATA 框^[5]. 在 HaLe 细胞中, 其核心启动子位于主要转录起始位点上游 328 个核苷酸的区域内^[6]. Zeng 等人^[7]的研究结果表明, *POLD1* 基因的表达受到细胞周期的调控, 其 mRNA 及蛋白水平在 G1/S 交界达到最高值. 也有实验显示在血清刺激 G0 期细胞增殖的过程中, *POLD1* 基因启动子活性在 G1/S 交界至早 S 期都保持较高活性. 然而, 目前仍不清楚细胞周期对 *POLD1* 基因启动子调控的机制、通路以及启动子上对细胞周期调控因子产生应答的元件. 根据已有的

研究显示, 癌细胞 *POLD1* 基因启动子上存在与正常细胞不同的 DNA/蛋白复合体, 它们可能与恶性增殖的癌细胞中 *POLD1* 基因异常的表达调控相关.

目前已经发现, 许多受到细胞周期调控的基因的启动子中都存在着这样一个负调控元件, 该元件由两部分组成, 一部分富含 GC 碱基, 称为 CDE 序列; 另一部分与 CDE 序列相距 4~10 个核苷酸, TA 含量较高, 常常由 TTGAA 构成, 称为 CHR 序列, 这个保守序列被命名为 CDE/CHR 的元件, 且其作用没有方向性^[8]. 目前已知在 *cyclinA*, *cdc25C*, *cdc2*, *b-myb*, *survivin* 和 *PLK* 等一些细胞周期依赖性表达的基因中均存在这个元件^[9]. CDE/CHR 元件在这些基因的启动子中协同接受细胞周期相关因子的调控, 对基因的细胞周期依赖性表达起重要作用, CDE 或 CHR 任何一个的失活都会导致这些启动子在细胞周期中的转录活性持续性增高.

本研究首次发现了 *POLD1* 基因启动子序列中存在的 CDE/CHR 元件, 通过 CDE/CHR 序列突变型启动子与野生型启动子比较, 分析启动子活性的变化、周期相关因子对启动子活性的影响、启动子活性在周期中的变化及启动子结合蛋白的变化等, 证明了 CDE/CHR 元件在 *POLD1* 基因启动子活性调控中的功能, 以及与细胞周期依赖性转录调控的相关性.

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

pGL2-(−1758) 重组质粒是将 *POLD1* 基因 5'上游约 1.8 kb 区域的 DNA 片段连接到 pGL2-Basic 载体中构建而成, 以主要转录起始位点作为+1, 则该质粒

中包含 *POLD1* 基因启动子−1758 至+49 区域, pGL2-Basic 载体及 pSV-β-Galactosidase 载体购自 Promega. 实验用真核细胞表达载体分别为: pHM6 和 pXJ41-neo. 实验用细胞为人乳腺癌细胞系 MCF7.

1.2 主要试剂

LA Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*Sac* 及 *Hind* 限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司. ONPG (Ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside)、溴化乙锭 (EB)、碘化丙锭 (PI)、脱氧胸腺嘧啶核苷 (TdR) 和 RNase 均购自 Sigma 公司, 胰蛋白酶购自 Gibico 公司, Vigofect 转染剂购自北京威格拉斯公司.

1.3 质粒构建

以 pGL2-(−1758)质粒为模板, 用 PCR 方法扩增 *POLD1* 基因启动子上−585~+49 区域的启动子, 并用 *Sac* 和 *Hind* 双酶切后连接到 pGL2-Basic 中, 构建得到重组质粒 pGL2-(−585). 通过设计含有突变序列的引物, 以 pGL2-(−585)为模板进行 PCR 扩增, 分别得到 CDE 序列突变的片段、CHR 序列突变的片段和 CDE/CHR 序列均突变的片段, 所用引物见表 1. 将这些片段用 *Sac* 和 *Hind* 进行双酶切并分别连入 pGL2-Basic 载体中, 分别构建得到质粒 pGL2-(CDE), pGL2-(CDE2), pGL2-(CHR), pGL2-(CHR2), pGL2-(CDE/CHR) 和 pGL2-(CDE/CHR2). 重组质粒由 Invitrogen 公司测序鉴定.

1.4 细胞培养

细胞培养方法主要参考 ATCC(american type culture collection)提供的方法, 人乳腺癌细胞系

表 1 载体构建所用引物序列^{a)}

引物	序列
共用上游引物为:	5'-CCG AGC TCT CCG TTG GGG CGG GGA ACA GCG GAA GTG AGA G-3'
下游引物分别为:	pGL2- (-585): 5'-CCCAA GCTTG ATTCT TCAAA CAGCG TTTCC CGCC-3'
	pGL2-(CDE): 5'-CCCAA GCTTG ATTCT TCAAA CAGCG TTTCT aatCA CAGCC TACGC CGCC-3'
	pGL2-(CHR): 5'-CCCAA GCTTG ATTCT atgcA CAGCG TTTCC CGCCA CAGCC-3'
	pGL2-(CDE/CHR): 5'-CCCAA GCTTG ATTCTatgcA CAGCG TTTCT aatCA CAGCC TACGC CGCC-3'
	pGL2-(CDE2): 5'-CCCAA GCTTG ATTCT TCAAA CAGCG TTTCg tcaA CAGCC TACGC CGCC-3'
	pGL2-(CHR2): 5'-GCCAA GCTTG ATTCT ctgcA CAGCG TTTCC CGCCA CAGCC TACGC-3'
	pGL2-(CDE/CHR2): 5'-CCCAA GCTTG ATTCT ctgcA CAGCG TTTCg tcaCA CAGCC TACGC CGCC-3'

a) 小写字母示突变碱基

MCF7 用 RPMI1640 (Hyclone) 培养基添加 10% 胎牛血清(四季青)培养于 37℃ 含 5% CO₂ 的温箱中.

1.5 瞬时转染实验及荧光素酶报告基因的检测

转染实验步骤参照文献[10], 其中启动子质粒与 pSV-β-Galactosidase 共转染 MCF7 细胞, 测定各启动子质粒表达的荧光素酶 Luc 值, 及 pSV-β-Galactosidase 表达的 β-gal 活性作为实验内对照. 启动子活性 = 荧光素酶 Luc 值/半乳糖苷酶 β-gal 值. 荧光素酶检测样品收集使用 Luciferase Assay Kit(Promega). 转染实验设计不同的质粒组合分别在文中相应部分具体写出.

1.6 细胞周期分析

用 TdR 双阻断法将细胞同步化到 S 期, 方法主要参照文献[11]. 在两次 TdR 阻断中间间隔时间内进行转染实验. 细胞周期的测定采用流式细胞术 FCM (flow cytometry).

1.7 WesternBlot 检测蛋白表达

提取细胞系的蛋白(裂解液: 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1% Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L PMSF), 用 12% SDS-PAGE 分离蛋白, 并将蛋白转移至 PVDF 膜上, 通过 Western Blot 检测 E2F 和 p21 的表达. 其中 tubulin 作为上样量对照. 电泳、转膜等具体步骤参照参考文献[12].

1.8 凝胶阻滞实验

核蛋白提取使用 NE-PER(PIERCE)试剂盒, 核蛋白浓度约 3 μg/μL, 凝胶阻滞(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)实验使用 LightShift(PIERCE)试剂盒, 化学发光使用 X-Ray(柯达)胶片, 显影液及定影液用前配制, 所用引物序列见表 2.

2 结果

2.1 *POLD1* 基因的转录水平呈细胞周期依赖性变化

根据已有的研究结果, *POLD1* 基因启动子的核心区域为-585~+49(以转录起始位点为+1), 运用 PCR 方法扩增了 *POLD1* 基因启动子-585~+49 区域, 经双酶切后连接到 pGL2-Basic 荧光素酶报告基因载体中,

表 2 EMSA 所用引物序列^{a)}

探针	序列
探针:	5'-Biotin-GCTGTGGCGGGAAACGCTGTTTGAA GCGGG-3'
“冷”探针:	
WT:	5' GCTGTGGCGGGAAACGCTGTTTGAAGCGGG-3'
CDE:	5' GCTGTGGGattaAAACGCTGTTTGAAGCGGG-3'
CHR:	5' GCTGTGGCGGGAAACGCTGTgcatAGCGGG-3'
CDE/CHR:	5' GCTGTGattaGAAACGCTGTgcatAGCGGG-3'

a) 小写字母示突变碱基

构建得到野生型启动子质粒 pGL2-(-585). 用 TdR 双阻断的方法同步化 MCF7 细胞, 在同步化的过程中将 pGL2-(-585)转染细胞, 在释放后不同时间点收取样品, 用流式细胞术检测细胞周期分布, 同时测定荧光素酶活性, 并以 pSV 作为内对照, 计算启动子活性. 结果表明, *POLD1* 基因启动子活性随细胞周期不同时相变化, 释放后 1~3 h, 细胞周期到达 G1/S 及 S 期时, 启动子活性达到最大值, 随着周期的进行, 启动子活性在 S 期后期开始下降, 至 G2/M 期降到最低. 以上结果表明 *POLD1* 基因启动子的活性受到细胞周期依赖性调控(图 1(A)和(B)). 同时对 MCF7 细胞同步化后释放 1, 7, 16 h 的样品蛋白进行检测, 结果与启动子活性变化一致, *POLD1* 基因编码的 p125 蛋白表达在 G1 期最高, 随着细胞周期的进行而逐渐下降, 在 G2/M 期达到最低(图 1(C)).

2.2 *POLD1* 基因启动子中存在保守的 CDE/CHR 序列

对于 *POLD1* 基因启动子受到细胞周期调控的机制, 目前仍不清楚. 对 *POLD1* 基因启动子序列进行生物信息学分析发现, 在+29~+33 的位置存在富含 GC 的 CDE 保守序列, 在+44~+48 的位置存在 CHR 保守序列 TTGAA, 中间间隔 10 个核苷酸; 与其他周期依赖性调控的基因启动子比较, 这两个序列具有保守性; 并且将不同物种的 *POLD1* 基因启动子的 3' 端序列比对发现, 此段序列的同源性达到 92%, 其中的 CDE/CHR 序列非常保守(图 2). 根据已有的研究, *POLD1* 基因的 mRNA 水平及启动子活性都呈细胞周期依赖性变化, 因此推测, 在 *POLD1* 基因启动子中可能存在一个与细胞周期调控相关的具有功能的 CDE/CHR 元件.

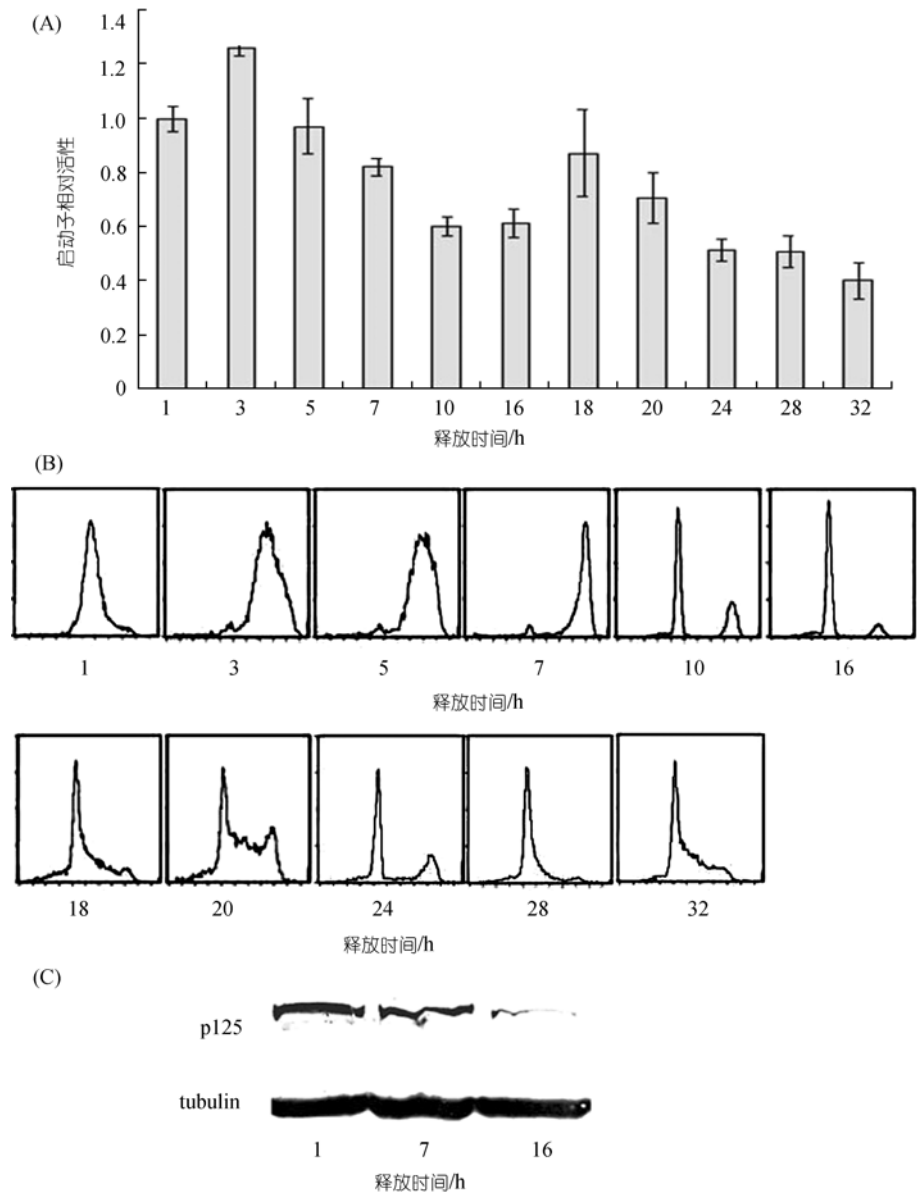


图 1 *POLD1* 基因启动子活性在细胞周期不同时期中的变化

(A) 不同时间点样品的启动子相对活性: 将 pGL2-(−585)质粒转染 MCF7 细胞, TdR 双阻断法同步化细胞, 以释放后 1 h 样品的启动子活性为 1, 各时间点启动子相对活性=各时间点启动子活性/对照启动子活性; 结果为 3 次独立实验的平均值; (B) FCM 测定不同时间点样品的细胞周期时相; (C) 分别取释放后 1, 7, 16 h 的样品, Western Blot 检测样品中 p125 蛋白的表达, tubulin 为蛋白样品上样量对照

2.3 CDE/CHR 序列的突变影响 *POLD1* 基因启动子活性

为了验证由序列比对得到的 CDE/CHR 序列在 *POLD1* 基因启动子中是否为有功能的调控元件, 研究了该序列的突变是否会影响 *POLD1* 基因启动子活性. 在野生型质粒的基础上, 通过 PCR 引物引入

突变序列的方法, 构建得到 CDE 序列单独突变型质粒 pGL2-(CDE); CHR 序列单独突变型质粒 pGL2-(CHR); CDE/CHR 序列突变型的 pGL2-(CDE/CHR)质粒(图 3(A)). 将重组质粒 pGL2-(CDE), pGL2-(CHR), pGL2-(CDE/CHR)分别与 pGL2-(−585)转染 MCF7 细胞, 检测启动子活性. 结果显示, 各突变体的启动子

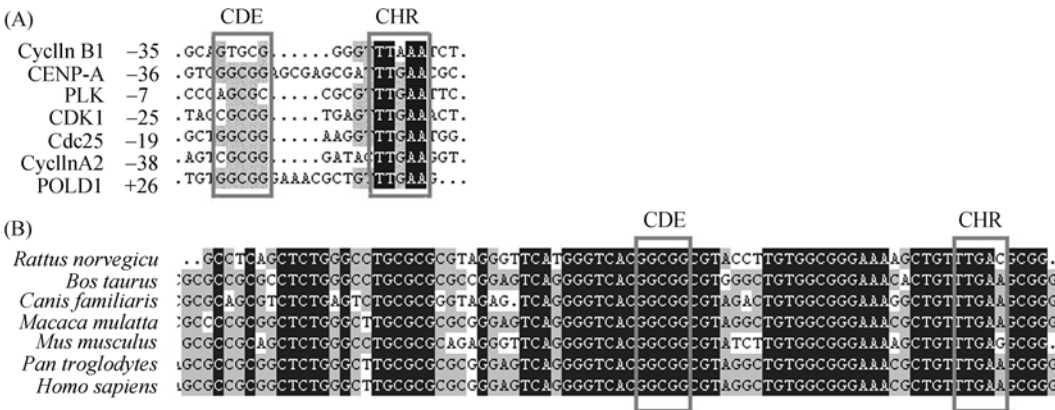


图 2 *POLD1* 基因启动子中 CDE/CHR 序列的比对

(A) 几种细胞周期依赖性表达基因启动子中 CDE/CHR 序列的比对; (B) 不同物种的 *POLD1* 基因启动子中 CDE/CHR 序列及附近区域序列的比对

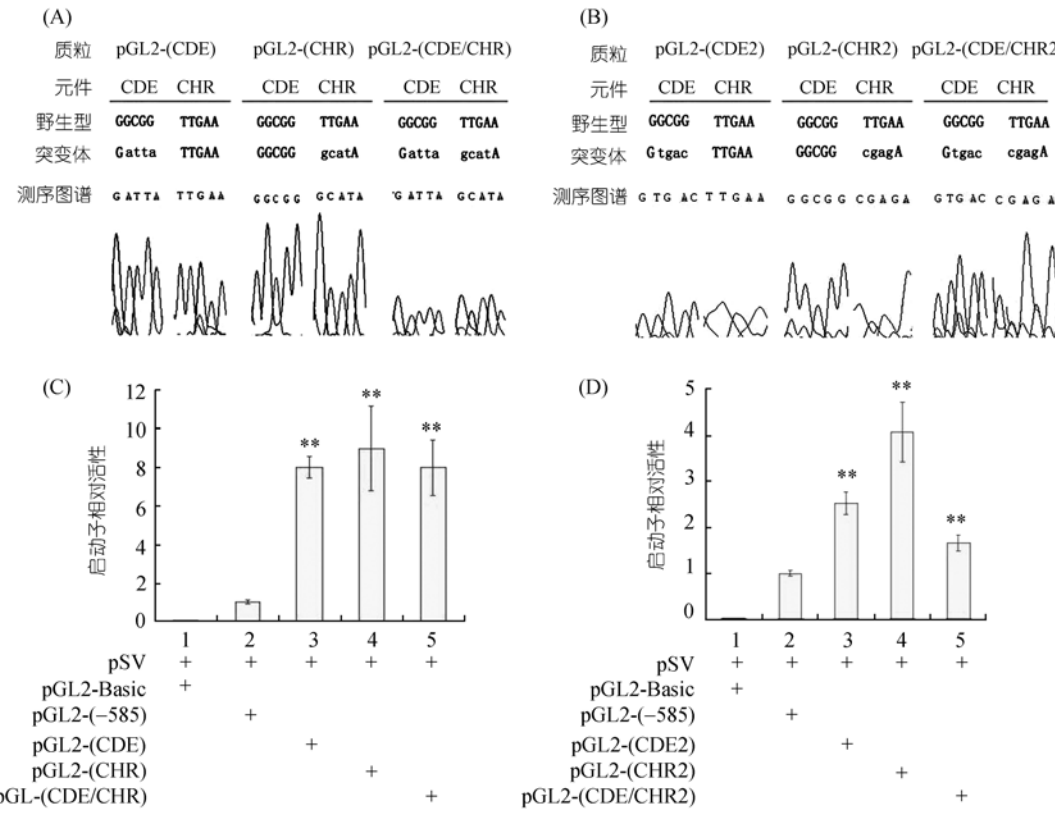


图 3 CDE/CHR 序列的突变型质粒的鉴定及其启动子活性

(A)和(B) 测序图谱显示突变型质粒构建成功, 小写字母表示突变的碱基; (C)和(D) 野生型及各突变型质粒分别转染 MCF7 细胞, 检测启动子活性, 以野生型启动子活性为 1, 各突变型启动子相对活性=突变型启动子活性/野生型启动子活性, 结果为 3 次独立实验的平均值, ** 示差异极显著($P<0.01$, t 检验)

活性均高于 pGL2-(-585)的启动子活性,以 pGL2-(-585)的启动子活性为 1,则 pGL2-(CDE)的启动子相对活性为 8.0, pGL2-(CHR)的相对活性为 9.0, pGL2-(CDE/CHR)的相对活性为 8.0, 3 个突变型启动子活性比野生型显著升高(图 3(C)).

为了更充分地证明 CDE/CHR 序列突变对 *POLD1* 基因启动子活性的影响,本研究同时做了另一组突变型质粒, pGL2-(CDE2), pGL2-(CHR2), pGL2-(CDE/CHR2) (图 3(B)). 重复启动子活性实验结果显示,各突变体的启动子活性仍高于 pGL2-(-585)的启动子活性,差异极显著. 以 pGL2-(-585)的启动子活性为 1, pGL2-(CDE2)的相对活性约为 2.7, 而 pGL2-(CHR2)及 pGL2-(CDE/CHR2)相对活性分别约为 4.0 和 2.3, 突变型启动子活性比野生型显著升高(图 3(D)). 以上两组对 CDE/CHR 序列进行的不同突变,得到一致结果,说明野生型启动子中存在的 CDE/CHR 序列与 *POLD1* 基因启动子活性相关,是一个具有负调控功能的作用元件,其序列的部分或全部突变均能显著增强 *POLD1* 基因启动子活性. 由于两次突变所构建的突变型启动子结果相似,故后续结果全部采用第一组突变型质粒的实验数据.

2.4 E2F 及 p21 对 CDE/CHR 元件的调控作用

CDE/CHR 序列突变对启动子活性的影响,可能是通过影响该元件上周期相关因子的作用而产生的. 为此本实验研究了细胞周期相关转录因子 E2F1 及 CDK 抑制因子 p21^{WAF1/Cip}(p21)对 *POLD1* 基因启动子的作用. 将真核细胞表达质粒 pXJ41-E2F1 分别与 pGL2-(-585), pGL2-(CDE), pGL2-(CHR) 和 pGL2-(CDE/CHR)转染 MCF7 细胞,作为实验组;同时将 pXJ41 分别与上述启动子质粒转染 MCF7 细胞,作为对照组;将实验组的启动子活性除以对照组的启动子活性,得到 E2F1 对野生型启动子及突变型启动子的促进倍数. 结果显示, E2F1 可促进野生型启动子活性增强 5 倍以上,而对突变型启动子的促进作用下降,促进倍数不到 2 (图 4(A)).

将真核细胞表达质粒 pHM6-p21 分别与上述启动子质粒共同转染 MCF7 细胞,作为实验组;同时将 pHM6 分别与上述启动子质粒共同转染 MCF7 细胞,作为对照组;将对照组的启动子活性除以实验组启

动子活性,得到 p21 对野生型启动子及突变型启动子的抑制倍数. 结果显示, p21 可以抑制野生型启动子活性 2 倍,而对突变型启动子几乎没有作用,抑制倍数约为 1(图 4(B)). 以上结果表明,周期调控相关因子 E2F1 及 p21 对 *POLD1* 基因启动子的调控作用与 CDE/CHR 序列具有相关性, CDE/CHR 序列突变后 E2F1 对启动子活性的促进作用消失, p21 对启动子活性的抑制作用消失.

2.5 CDE/CHR 元件是 *POLD1* 基因启动子细胞周期调控的必需元件

已有报道显示 CDE/CHR 元件参与调控了一些基因的细胞周期依赖性表达,且本实验的结果证明 CDE 和 CHR 序列的突变影响了周期调控相关的转录因子 E2F 及细胞周期抑制因子 p21 对 *POLD1* 基因启动子的作用,那么这些影响是否导致了突变型的启动子失去被细胞周期调控的功能呢? 为此本研究通过同步化的方法,检测细胞周期不同时相中,野生型及突变型启动子的活性. 用 TdR 双阻断的方法同步化 MCF7 细胞,在同步化的过程中用 pGL2-(-585)及 pGL2-(CDE), pGL2-(CHR) 和 pGL2-(CDE/CHR)分别瞬时转染 MCF7 细胞. 分别在同步化后的 1, 7, 16 h 收集细胞,分别得到富集的 S 期、G2/M 期及 G1 期细胞,测定荧光素酶活性. 比较各突变启动子与野生型启动子活性发现,由于 CDE/CHR 序列的突变,启动子活性在细胞周期不同时相中的活性均升高(图 5(A)). 将各质粒在同步化后 1 h 的启动子活性设为 1, 分别比较各质粒在不同时间点的启动子活性,并绘制启动子活性变化曲线. 比较启动子活性变化曲线发现,同步化释放后,在细胞周期由 G1/S 向前行进过程中,突变型启动子的活性变化均小于野生型启动子活性变化;当 CDE/CHR 序列突变后,启动子活性在 G2/M 和早 G1 期不再下降. 总之, CDE/CHR 序列突变后,该元件作为负调控元件的功能丧失,细胞周期在 G2/M 和早 G1 期对 *POLD1* 基因启动子的抑制作用消失;与野生型启动子比较, CDE/CHR 突变的启动子活性不再受到周期调控,在整个周期中均维持较高的活性水平(图 5(B)). 将与野生型启动子差异最明显的突变型启动子 pGL2-(CDE/CHR)转染细胞,在更密集的时间点及更长的时间内收集样品,得

到连续两个细胞周期中的结果, 在细胞周期进程中, 野生型启动子活性随周期呈阶段性升高, 而突变型启动子活性则一直维持较高水平(图 5(C)), 这种异常的高水平转录很可能导致 DNA 复制的水平异常增高, 进而造成细胞的大量异常增殖.

2.6 *POLD1* 基因启动子 CDE/CHR 元件上的调控因子

目前对于各个基因启动子 CDE/CHR 元件上确切的结合蛋白复合体仍然不能确定, 而且争议颇多. 本文采用 MCF7 细胞核提取物及含有 CDE/CHR 元件的

一段 DNA 序列用生物素标记作为探针, 进行 EMSA 实验研究, 结果显示了 *POLD1* 基因启动子的 CDE/CHR 元件上 DNA/蛋白复合体特征. 如杂交结果图 6 显示, 至少有 3 种 CDE/CHR 元件特异的 DNA/蛋白复合体可以被检测到(泳道 1 和 3), 此 3 个条带可被 200 倍未标记的野生型“冷”探针 WT 竞争(泳道 2), 说明这 3 种复合体是特异的与探针序列结合的. 其中的两条 CHR 特异结合条带, 可以被 CDE 序列单独突变的“冷”探针 CDEmut 竞争(泳道 4), 因为 CDEmut 探针的 CHR 序列为野生型, 仍然能竞争掉探针 CHR 序列上结合的蛋白复合体; 但是 CHR 序列

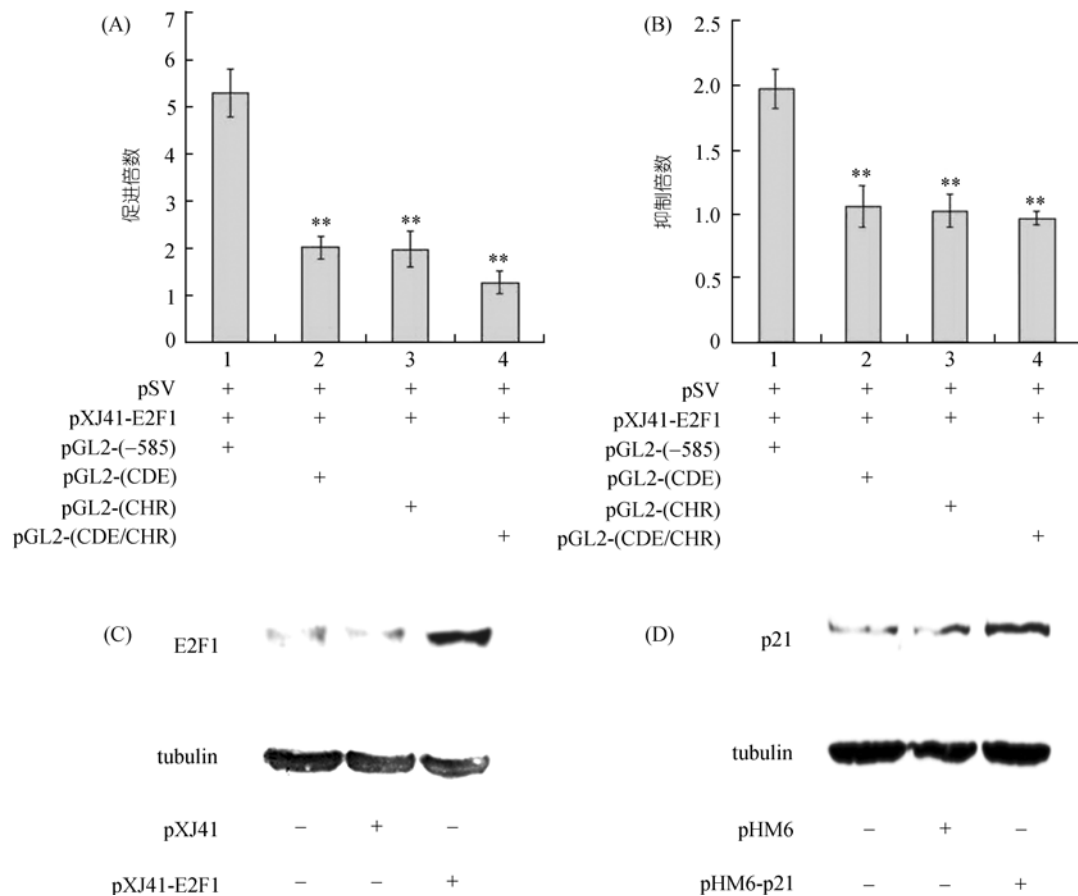


图 4 E2F1 及 p21 对野生型及突变型启动子的作用

(A) pXJ41-E2F1 及 pXJ41 分别与 pSV 和 pGL2-(585), pGL2-(CDE), pGL2-(CHR), pGL2-(CDE/CHR) 共转染 MCF7 细胞, 促进倍数=启动子与 E2F1 共转染的启动子活性/启动子与 pXJ41 共转染的启动子活性, 结果为 3 次独立实验的平均值, ** 示差异极显著($P<0.01$, t 检验); (B) pHM6-p21 及 pHM6 分别与 pSV 和 pGL2-(585), pGL2-(CDE), pGL2-(CHR), pGL2-(CDE/CHR) 共转染 MCF7 细胞, 抑制倍数=启动子与 pHM6 共转染的启动子活性/启动子与 p21 共转染的启动子活性, 结果为 3 次独立实验的平均值, ** 示差异极显著($P<0.01$, t 检验); (C) 和(D) 将真核表达质粒 pXJ1-E2F1 及 pHM6-p21 分别转染 MCF7 细胞后, Western Blot 检测 E2F1 及 p21 蛋白在细胞中的表达, tubulin 为蛋白样品上样量对照

突变的“冷”探针 CHRmut 和 C/Cmut, 则不能将此复合体竞争掉(泳道 5 和 6). 而同理另一条 CDE 特异结合条带, 可以被 CHR 序列单独突变的“冷”探针 CHRmut 竞争(泳道 5). 以上结果表明, *POLD1* 基因启动子中 CDE/CHR 元件上至少存在 3 种相互独立的不同的蛋白复合体与 CDE 和 CHR 序列分别结合, 这些复合体可能是完全不同的蛋白组成, 也可能 3 者之间存在共同的组分.

3 讨论

DNA 复制是受到细胞周期严格调控的过程. 在 G1/S 交界, 有众多与 DNA 复制密切相关的基因表达增强. DNA 聚合酶 δ 是 DNA 合成的主要酶, 与细胞周期密切相关, 其催化亚基的编码基因 *POLD1* 的表达受到细胞周期的严格调控. 已有研究显示在血清刺激 G0 期细胞增殖的过程中, *POLD1* 基因启动子活性在 G1/S 交界至早 S 期都保持较高活性^[7], 这说明

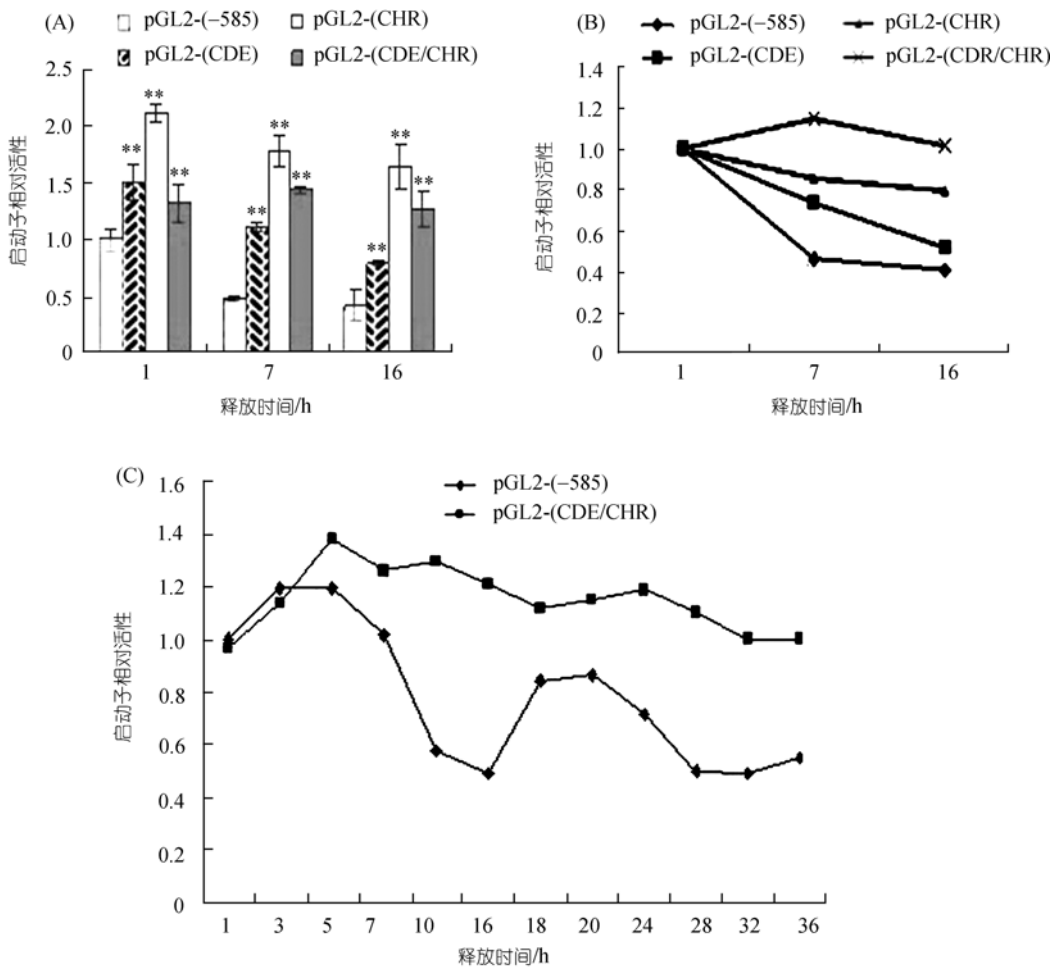


图5 CDE/CHR 元件的突变后 *POLD1* 基因启动子活性在细胞周期中的变化

(A) 将野生型及突变型启动子分别转染 MCF7 细胞, 在细胞同步化后的 1, 7, 16 h 收集细胞样品, 以释放后 1 h 野生型启动子活性为 1, 各样品启动子相对活性=各样品启动子活性/释放后 1 h 野生型启动子活性; 结果为 3 次独立实验的平均值, ** 示差异极显著 ($P < 0.01$, t 检验); (B) 同上述的样品, 以各质粒释放后 1 h 后启动子活性分别为 1, 分别计算各启动子其余时间点的相对活性, 各时间点启动子相对活性=各时间点启动子活性/该质粒释放后 1 h 的启动子活性; (C) 将野生型启动子 pGL2-(-585) 及突变型启动子 pGL2-(CDE/CHR) 分别转染 MCF7 细胞, 在细胞同步化释放后的连续两个细胞周期中收集细胞样品, 以各质粒释放后 1 h 后启动子活性分别为 1, 分别计算各启动子其余时间点的相对活性, 各时间点启动子相对活性=各时间点启动子活性/该质粒释放后 1 h 样品的启动子活性

在细胞由静息状态进入增殖状态时, *POLD1* 基因启动子活性增高, 而本研究采用了 TdR 双阻断的方法同步化细胞, 在增殖的细胞中连续检测启动子活性, 结果证明, 在增殖细胞中 *POLD1* 基因启动子活性呈现细胞周期依赖性变化, 在 G1/S 交界至早 S 期呈较高活性.

目前对于 pol δ 如何接受细胞周期调控完成 DNA 复制的功能仍不清楚, 而其启动子活性的细胞周期调控机制是研究的一个突破口. Li 等人^[13]研究发现 *POLD1* 基因启动子-92 至-22 之间的区域有两个正向重复的 11 bp 序列, 缺失其中任一个或两个序列都将导致启动子活性明显降低, 经比对发现其与 Sp1 的结合序列具有同源性, Southern Blot 及 EMSA 实验证明 Sp1 及其相互作用蛋白在这个序列上结合. 而进一步的研究发现, p53 能抑制 Sp1 的这种促进作用, 这可能是由于 Sp1 的结合位点与 p53 的结合位点有部分序列重叠, p53 对 *POLD1* 基因启动子竞争性地抑制了 Sp1 结合, 而导致这种调节作用降低. 但是此元件的发现并没有解释 *POLD1* 基因与细胞周期调控之间的联系. 而本研究则通过序列比对发现, 在 *POLD1* 基

因启动子的 3'端存在一个保守的类似 CDE/CHR 元件的序列. CDE/CHR 元件存在于多个细胞周期依赖性表达的基因启动子中, 与基因的细胞周期调控关系密切; 并且在多个物种的 *POLD1* 基因启动子中, 这部分序列及其临近的上下游片段均非常保守^[14]. 因此我们推测在 *POLD1* 基因启动子中存在的这个序列, 很可能是与其周期调控密切相关的功能性元件. 点突变体实验证明, 其序列突变后, 确实导致启动子活性变化; 并且不再受细胞周期调控, 因此, *POLD1* 基因启动子中的此序列为具有调控功能的 CDE/CHR 元件. 此元件为一个新鉴定出的 *POLD1* 基因启动子调控元件, 且与该基因的细胞周期调控紧密相关.

启动子元件参与调控基因的细胞周期依赖性表达的机制可简单归纳为: 抑制因子在某一周期时相结合在调控元件上, 使得促进基因转录的因子无法发挥作用, 因此基因不转录; 而到了另一周期时相, 在一系列信号通路的作用下, 结合到调控元件上的抑制因子脱落或改变作用方式, 使得被抑制的基因开始转录, 蛋白表达, 以满足细胞周期进程的需要, 这样就形成了基因转录的细胞周期性变化. 这种转

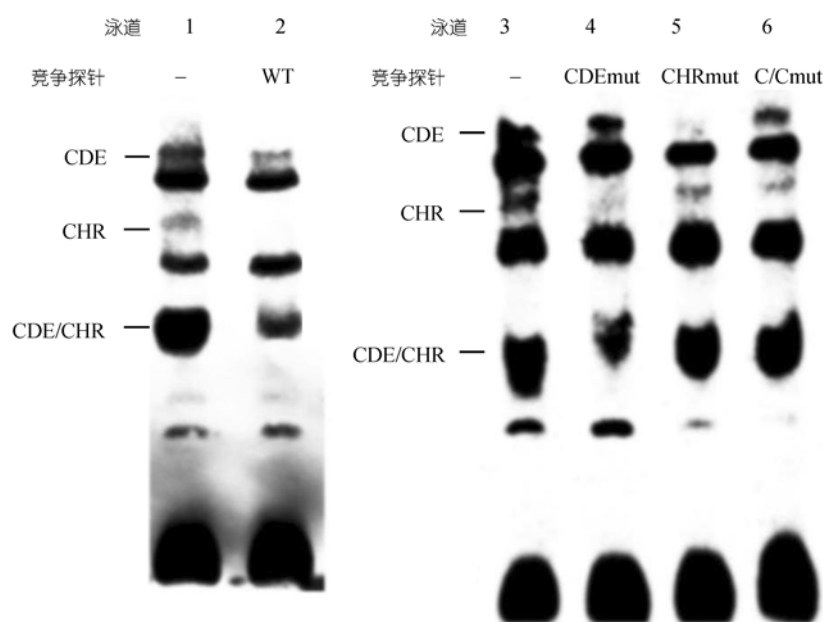


图 6 EMSA 实验显示 *POLD1* 基因启动子 CDE/CHR 元件上的 DNA/蛋白复合体

条带 CDE 为 CDE 序列的特异结合带, 条带 CHR 为 CHR 序列的特异结合带. 实验用探针为生物素标记的探针; 竞争探针为 4 种未标记的“冷”探针, 分别为野生型 WT, CDE 序列突变型 CDEmut, CHR 序列突变型 CHRmut, CDE/CHR 序列均为突变型 C/Cmut

录抑制被认为是细胞周期进程中调节基因表达的主要机制^[15]。转录因子 E2F 是细胞周期由 G1 期向 S 期过渡的重要调控因子。已有的研究表明 G1 期中后期 Rb 蛋白被周期蛋白磷酸化,而后释放有活性的 E2F,由此激活了一系列 S 期必需基因的转录,使得细胞进入 S 期^[16]。而 *POLD1* 基因正是 S 期必需基因之一,研究发现其活性可以被 E2F1 促进 5 倍以上,而 E2F1 对 CDE/CHR 元件突变型启动子的促进作用明显下降。p21 是一种广谱的 CKI,可以和多种细胞周期因子/细胞周期依赖性激酶(cyclin/Cdk)复合体结合,对细胞周期进程起抑制作用。在本研究中发现 p21 也可以抑制 *POLD1* 基因启动子活性,而对 CDE/CHR 元件突变型启动子的抑制作用明显下降。因此证明了 CDE/CHR 元件与 E2F1 及 p21 对启动子的调控作用紧密相关,由于 CDE/CHR 元件突变所导致的这种正、负调控作用失效,很可能最终导致了突变型 *POLD1* 基因启动子的细胞周期调控失效。

目前关于 CDE/CHR 元件的研究中,对细胞内结合到不同基因 CDE/CHR 元件上的蛋白复合体,其具体成分目前仍有争议,通过何种方式发挥作用也不十分清楚。据报道^[17], *cdc2* 和 *cyclinA* 基因启动子的 CDE 元件能在体外实验中以较低的效率结合到细胞的 E2F/DP-1/pRb 三组分的蛋白复合体上。并且已有研究发现 *B-myb* 及 *survivin* 基因启动子上存在的 CDE/CHR 元件与 E2F 对启动子的调控作用密切相关,于是有人提出了一种假设,即参与 CDE/CHR 元件调控作用的蛋白因子可能为 E2F 家族成员^[18,19]。本研究结果显示, E2F1 可以促进 *POLD1* 基因启动子活性, CDE 和 CHR 任意一个位点的突变都显著降低了 E2F1 对 *POLD1* 基因启动子的促进作用,因此参与 *POLD1* 基因启动子 CDE/CHR 序列调控的成员之一

有可能包括 E2F1。对此有的研究得到了不同的结果, Liu 等人^[20]鉴定了一个蛋白因子,称为 CDF-1 (CDE binding factor-1),能够和 *cdc25C* 基因启动子的 CDE/CHR 元件相互作用,但该蛋白却不能和同样含有 CDE/CHR 元件的 E2F 调控基因 *B-myb* 的启动子结合,而且 E2F 复合体也不能与 *cdc25C* 基因启动子结合,对此的解释可能是 E2F 和 CDF-1 在周期的不同时期发挥其抑制作用,即 E2F 调控的基因大约在中 G1 期被上调,而 CDF-1 调控的基因如 *cdc25C*, *cdc2* 和 *cyclinA* 等都是更晚的时相才被上调。然而这种 CDF-1 的组分没有得到明确的鉴定,其抑制方式和调节机制也仍有争议。

此外, Dimethylsulfate(DMS) Protection 实验结果显示, CDE 序列为 DNA 大沟, CHR 序列为 DNA 小沟,两个部位均存在蛋白可以结合的接触面。那么可能有两个或更多的蛋白分别与 CDE 和 CHR 结合,而蛋白之间互作,或者互相排斥;也可能是同一个蛋白的两个不同接触面分别与大沟、小沟结合^[21]。对于不同基因启动子中存在的 CDE/CHR 元件,其结合蛋白并不完全一样,因为这些基因在不同的细胞周期时相中转录,所以很可能存在不同的蛋白复合体在不同时相中与该元件结合。本研究 EMSA 结果显示,至少存在 3 种复合体与此元件结合,其中两种可能是与 CHR 序列结合的,但这些复合体成分的确定仍需进行深入研究。

总之,本研究在 *POLD1* 基因启动子中首次鉴定出 CDE/CHR 元件,并证明此元件与 *POLD1* 基因细胞周期调控密切相关,并研究了此元件上结合蛋白的初步特征。此结果有助于进一步认识 *POLD1* 基因细胞周期依赖性表达的机制。

参考文献

- 1 Kohn K W, Aladjem M I, Weinstein J N, et al. Chromatin challenges during DNA replication: a systems representation. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(1): 1—7[DOI]
- 2 徐珩, 刘谦. DNA 复制调控与人类重大疾病—我国生物医学科学中长期战略发展的一个方向. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(10): 1—8
- 3 张海江, 韩世炜, 桑建利. 真核细胞 DNA 聚合酶 δ 的结构与功能. *细胞生物学杂志*, 2004, 26(3): 271—275
- 4 Lee M Y, Tan C K, So A G, et al. Purification of deoxyribonucleic acid polymerase delta from calf thymus: partial characterization of physical properties. *Biochemistry*, 1980, 19: 2096—2101[DOI]
- 5 Chang L S, Zhao L, Zhu L, et al. Structure of the gene for the catalytic subunit of human DNA polymerase delta (*POLD1*). *Genomics*,

- 1995, 28(3): 411—419^[DOI]
- 6 Zhao L, Chang L S. The human *POLD1* gene: identification of an upstream activator sequence, activation by Sp1 and Sp3, and cell cycle regulation. *J Biol Chem*, 1997, 272(8): 4869—4882^[DOI]
 - 7 Zeng X R, Hao H, Jiang Y, et al. Regulation of human DNA polymerase delta during the cell cycle. *J Biol Chem*, 1994, 269(39): 24027—24033
 - 8 Liu N, Lucibello F C, Korner K, et al. CDF-1, a novel E2f-unrelated factor, interacts with cell cycle-regulated repressor elements in multiple promoters. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 4915—4920^[DOI]
 - 9 Fajas L, Le Cam L, Polanowska J, et al. A CDE/CHR-like element mediates repression of transcription of the mouse *RB2* (p130) gene. *FEBS Lett*, 2000, 471: 29—33^[DOI]
 - 10 朱晓宇, 徐恒, 李莉, 等. P53 亚细胞定位变化对 *POLD1* 基因启动子活性的影响. *自然科学进展*, 2006, 16(4): 555—562
 - 11 徐恒, 朱晓宇, 张海江, 等. G1 期细胞周期相关蛋白对 *POLD1* 基因启动子活性的调控. *自然科学进展*, 2007, 17(6): 716—723
 - 12 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 著. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1999. 889—898
 - 13 Li B Q, Lee M Y. Transcriptional regulation of the human DNA polymerase δ catalytic subunit gene *POLD1* by p53 tumor suppressor and Sp1. *J Biol Chem*, 2001, 276(32): 29729—29739^[DOI]
 - 14 Müller G A, Heissig F, Engeland K. Chimpanzee, orangutan, mouse, and human cell cycle promoters exempt CCAAT boxes and CHR elements from interspecies differences. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(3): 814—826^[DOI]
 - 15 Zwicker J, Müller R. Cell-cycle regulation of gene expression by transcriptional repression. *Trends Genet*, 1997, 13(1): 3—6^[DOI]
 - 16 Sun A, Bagella L, Tutton S, et al. From G0 to S phase: a view of the roles played by the retinoblastoma(Rb) family members in the Rb-E2F pathway. *J Cell Biochem*, 2007, 102(6): 1400—1404 ^[DOI]
 - 17 Zwicker J, Lucibello F C, Wolfrum L A, et al. Cell cycle regulation of the cyclin A, cdc25C and cdc2 genes is based on a common mechanism of transcriptional repression. *EMBO J*, 1995, 14(18): 4514—4522
 - 18 Yang J, Song K, Krebs T L, et al. Rb/E2F4 and Smad2/3 link surviving to TGF- β -induced apoptosis and tumor progression. *Oncogene*, 2008, 27: 5326—5338^[DOI]
 - 19 Liu N, Lucibello F C, Zwicker J, et al. Cell cycle-regulated repression of B-myb transcription: cooperation of an E2F site with a contiguous corepressor element. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(15): 2905—2910^[DOI]
 - 20 Liu N S, Lucibello F C, Körner K, et al. CDF-1, a novel E2F-unrelated factor, interacts with cell cycle-regulated repressor elements in multiple promoters. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4915—4920^[DOI]
 - 21 Alexandre P, Severine C, Ned L, et al. CHF: a novel factor binding to cyclin A CHR corepressor element. *Oncogene*, 1999, 18: 6222—6232^[DOI]