

学校编码: 10384
学 号: 24520141153525

分类号____ 密级____
UDC____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

人 *FMR1* 基因一个新型可变剪接变异体的
鉴定及其编码产物的功能研究

Characterization of a Novel Alternatively Spliced
Variant from Human *FMR1* Gene and Function of Its
Encoded Product

杨文静

指导教师姓名: 兰风华 教授
专 业 名 称: 临床检验诊断学
论文提交日期: 2017 年 5 月
论文答辩时间: 2017 年 5 月
学位授予日期: 2017 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

脆性 X 智力障碍 1 基因 (fragile X mental retardation 1 gene, *FMR1*) 编码一个选择性 RNA 结合蛋白, 称脆性 X 智力低下蛋白 (fragile X mental retardation protein, FMRP)。该蛋白表达减少或缺失可导致一种常见的遗传性智力缺陷疾病, 称脆性 X 综合征 (fragile X syndrome, FXS)。 *FMR1* 基因的可变剪接与 FMRP 蛋白表达关系密切。不同的剪接方式会产生不同的转录本, 最后导致 FMRP 蛋白的结构和功能发生改变, 且相应的信号通路也受到影响。但对不同剪接异构体的检测及其生理功能仍研究较少。我们在先前的研究中采用克隆-测序技术, 从 RNA 途径分析人 *FMR1* 基因的可变剪接表达, 发现了一个 140bp 大小的新型隐匿外显子, 为 *FMR1* 基因内含子 9 的一部分。生物信息学分析发现, 此新型隐匿外显子的插入改变了 *FMR1* 基因开放阅读框, 并产生一截短的多肽链。

为了研究该新型隐匿外显子在健康人外周血中的表达丰度, 本研究通过 qPCR 和免疫印迹技术对单位质量内新型可变剪接体进行检测分析。结果发现, 该新型隐匿外显子转录本 mRNA 表达水平在健康人群中呈偏态分布, 且该新型隐匿外显子蛋白在正常人群中均有表达。

为了探索 *FMR1* 基因含新型隐匿外显子转录本的生物学功能, 我们分别构建了含全长编码区序列 *FMR1* 基因真核表达载体 (野生型): pEGFP-N2-wFMR1 和含新型隐匿外显子 *FMR1* 基因真核表达载体 (截短型): pEGFP-N2-tFMR1。将 2 种质粒分别转染至 HEK293T 细胞后, Western blot 分析显示: 全长型及含新型隐匿外显子融合蛋白在 HEK293T 细胞中成功表达。免疫荧光分析显示: 全长型融合蛋白主要表达于胞质, 而含新型隐匿外显子的融合蛋白主要表达于细胞核。

为进一步评估该新型隐匿外显子转录本是否会影响 FMRP 的功能以及可能参与的分子机制, 本研究利用慢病毒载体构建了稳定过表达含新型隐匿外显子转录本载体: pLEX-MCS-tFMR1。随后对新型隐匿外显子转录本过表达进行 RNA 芯片表达谱分析, 结果发现 545 个差异表达基因, 其中, *BEX1* 基因可能参与调控 FMRP 相关信号通路。本研究将不仅丰富 FMRP 的信号网络与调控机制, 而且为 FXS 治疗候选方案的建立提供理论依据。

关键词: *FMRI*; *FMRP*; *FXS*; 隐匿外显子; 可变剪接

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Fragile X mental retardation 1 gene (*FMR1*) encodes a selective messenger RNA-binding protein, which is called fragile X mental retardation protein (FMRP). Its absence can cause to a common form of inherited intellectual disability, known as fragile X syndrome (FXS). The alternative splicing of *FMR1* gene has a close relationship with FMRP expression. Different ways of splicing will produce different splice variants of *FMR1*, thereby altering FMRP's structure and function and affecting the corresponding signaling pathways. However, how to detect various alternatively spliced isoforms and what are their biological functions are still poorly understood. In our previous work, we used clone-sequencing technology to analyze the expression of human *FMR1* gene and a 140bp sequence splicing from the middle of intron 9 was detected. Bioinformatics showed that the novel cryptic exon insertion alters the open reading frame of *FMR1* gene and creates a truncated novel polypeptide chain.

To investigate the expression of the novel cryptic exon in peripheral blood cells of normal individuals, quantitative real-time PCR and Western blot were used to analyze the new alternatively spliced *FMR1* transcript. The results of qPCR showed that the mRNA expression level of the novel cryptic exon skewed distributed and WB showed that the new alternatively spliced *FMR1* transcript all expressed in normal individuals.

To explore the biological functions of the new alternatively spliced *FMR1* transcript, we constructed the recombinant eukaryotic expression vectors with full-length coding sequence or the novel cryptic exon, which was named pEGFP-N2-wFMR1 (wild type) and pEGFP-N2-tFMR1 (truncated type), respectively. After transfecting into HEK293T cells, western blot showed that wild type and truncated type protein were expressed successfully in HEK293T cells, and Immunofluorescence revealed that wild type protein mainly expressed in the cytoplasm, while truncated type protein mainly expressed in cell nucleus.

To further evaluate whether the novel cryptic exon has an effect on *FMR1* gene expression and to understand its underlying molecular mechanisms, we constructed the lentiviral vector with the novel transcript of human *FMR1* gene and established stably transfected HEK293T cells. RNA microarray analysis was employed to detect the differentially expressed genes, and 545 altered specific mRNAs were identified, among which, *BEX1* gene may be involved in FMRP related signaling pathways. Our

study will refine our understanding of FMRP's signaling networks and provide the theoretical basis for the establishment of candidate schemes for the FXS therapy.

Keywords: *FMRI*; FMRP; FXS; cryptic exon; alternative splicing

厦门大学博硕士学位论文摘要库

英文缩略词表

缩略语	英文全名	中文名称
APS	ammonium persulfate	过硫酸铵
ASD	autism spectrum disorders	自闭症谱系障碍
Amp	ampicillin	氨苄青霉素
Akt	serine/threonine kinase	丝氨酸/苏氨酸激酶
BEX1	brain expressed X-linked 1	大脑表达伴X染色体1基因
DEPC	diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
EB	ethidium bromide	溴化乙锭
FMRP	fragile X mental retardation protein	脆性X智力障碍蛋白
FXS	fragile X syndrome	脆性X综合征
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
GFP	green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
GABRB3	gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3 subunit	氨基丁酸A型受体3
HBSS	hank's balanced salt solution	Hank's平衡盐溶液
KH	K Homology domains	KH同源结构域
mGluR	metabotropic glutamate receptor	代谢性谷氨酸受体
MAPK	mitogen-activated protein kinase	促分裂原活化蛋白激酶
LB	nitric oxide synthase 1	促分裂原活化蛋白激酶
LTD	luria-Bertani medium	LB培养基
LTP	long-term depression	长时程抑制
NES	long-term potentiation	长时程增强
NLS	nuclear export signal	核输出信号
NOS1	nuclear localization signal	核定位信号
NGF	nitric oxide synthase 1	一氧化氮氧合酶1
PAGE	nerve growth factor	神经生长因子
PBS	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液

英文缩略词表

(续前页)

PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PDK	pyruvate dehydrogenase kinase	丙酮酸脱氢酶
PEI	Polyetherimide	聚醚酰亚胺
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
P/S	Penicillin/Streptomycin	青霉素/链霉素
PIP2	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate	磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸
PPP1R1A	protein phosphatase 1 regulatory inhibitor subunit 1A	蛋白磷酸酶1调控抑制剂亚基1A
PP1	protein phosphatase 1	蛋白磷酸酶1
RGG	arginine-glycine-glycine	精氨酸-甘氨酸
SDS	sodium dodecyl sulfate, sodium salt	十二烷基硫酸钠
TSC1/2	tumor-suppressor complex	肿瘤抑制因子复合物
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	三羟甲基氨基甲烷

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
英文缩略词表.....	V
第一章 绪论	1
1. 脆性 X 综合征概述	1
1.1 <i>FMR1</i> 基因简介.....	1
1.2 FMR 蛋白简介.....	1
1.3 <i>FMR1</i> 基因的可变剪接.....	2
1.4 <i>FMR1</i> 基因可变剪接的意义.....	2
2. FMR 蛋白抑制翻译的机制	3
2.1 靶 mRNA 调控 FMRP 参与的翻译.....	3
2.2 核糖体调控 FMRP 参与的翻译.....	4
2.3 磷酸化调控 FMRP 参与的翻译.....	4
3. FMR 蛋白参与的关键信号通路	4
3.1 mGluR-LTD 信号通路.....	5
3.2 mGluR-LTP 信号通路.....	6
3.3 DA 受体和 GABA 受体相关信号通路.....	6
3.4 其它分子相关信号通路.....	7
4. 本研究的目的和意义	7
第二章 材料和方法	8
1. 实验材料.....	8
2. 实验方法.....	12
第三章 结果和分析	28
1. <i>FMR1</i> 基因含新型隐匿外显子在正常人外周血中的表达丰度	28
1.1 <i>FMR1</i> 基因新型隐匿外显子 RNA 在健康人外周血中的表达丰度.....	28
1.2 <i>FMR1</i> 基因新型隐匿外显子蛋白在健康人外周血中的表达丰度.....	28

1.3 讨论.....	29
2. 含新型隐匿外显子转录本在 HEK293T 细胞中的表达.....	30
2.1 人 <i>FMR1</i> 基因真核表达载体的鉴定.....	30
2.2 HEK293T 细胞系 Western blot 法检测.....	32
2.3 HEK293T 细胞系免疫荧光检测.....	32
2.4 讨论.....	33
3. 含新型外显子转录本真核过表达及其机制的探讨.....	35
3.1 <i>FMR1</i> 基因含新型隐匿外显子慢病毒过表达载体的鉴定.....	35
3.2 HEK293T 细胞系 Western blot 法检测.....	36
3.3 HEK293T 细胞系免疫荧光检测.....	36
3.4 RNA 提取质量分析.....	37
3.5 <i>FMR1</i> 含新型隐匿外显子过表达基因芯片检测.....	38
3.6 差异表达基因实时荧光定量 PCR 验证.....	43
3.7 讨论.....	43
第四章 结论.....	48
参考文献.....	49
硕士期间发表交流论文.....	59
致 谢.....	60

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Abbreviation	V
Chapter I: Preface	
1. Overview on fragile X syndrome	1
1.1 Introduction of <i>FMR1</i> gene.....	1
1.2 Introduction of FMR protein.....	1
1.3 The alternative splicing of <i>FMR1</i> gene.....	2
1.4 The significance of <i>FMR1</i> alternative splicing.....	2
2. Mechanisms of FMRP translational repression	3
2.1 mRNA targets regulate FMRP-mediated translation.....	3
2.2 polyribosomes regulate FMRP-mediated translation.....	4
2.3 Phosphorylation regulates FMRP-mediated translation.....	4
3. The involvement of FMRP signaling pathways	4
3.1 mGluR-LTD signaling pathway.....	5
3.2 mGluR-LTP signaling pathway.....	6
3.3 DA and GABA receptors signaling pathways.....	6
3.4 Related molecular signaling pathways.....	7
4. Purpose and significance of the present study	7
Chapter II: Materials and Methods	
1. The experimental materials	8
2. The experimental methods	12
Chapter III: Results	
1. Expression of the novel cryptic exon of <i>FMR1</i> gene in normal individuals	28
1.1 RNA expression of the novel cryptic exon of <i>FMR1</i> gene in normal individuals.....	28

1.2 Protein expression of the novel cryptic exon of <i>FMRI</i> gene in normal individuals.....	28
1.3 Discussion.....	29
2. Expression of the novel cryptic exon in HEK293T cells.....	30
2.1 Identification of eukaryotic expression vector of <i>FMRI</i> gene.....	30
2.2 Detection of HEK293T cells with Western blot.....	32
2.3 Detection of HEK293T cells with Immunofluorescence.....	32
2.4 Discussion.....	33
3. Overexpression of the novel cryptic exon of <i>FMRI</i> gene and exploration of its mechanisms.....	35
3.1 Identification of lentiviral overexpression vector of <i>FMRI</i> gene.....	35
3.2 Detection of HEK293T cells with Western blot.....	36
3.3 Detection of HEK293T cells with Immunofluorescence.....	36
3.4 The quality analysis of RNA extraction.....	37
3.5 Detection of lentiviral overexpression vector of <i>FMRI</i> gene with microarray assay.....	38
3.6 Identification of differentially expressed genes with quantitative real-time RT-PCR.....	42
3.7 Discussion.....	43
Chapter IV: Conclusion	
Reference.....	49
Publications.....	59
Acknowledgement.....	60

第一章 绪论

智力障碍是一个严重的社会问题，更是危害儿童身心健康的一类世界性疾病，常给家庭带来巨大压力。据统计，全世界约有 1.5 亿智障患者。随着人才竞争的日趋激烈和社会的飞速发展，各国对智力问题倍加关注。但如何预防及治疗智力低下疾病仍是世界所面临的巨大挑战。

1. 脆性 X 综合征的概述

脆性 X 综合征 (fragile X syndrome, FXS) 是一种常见的遗传性智力缺陷疾病，临床表现为严重程度不等的智力低下及一些相关自闭行为。其它常见的特征尚有身材高大、下颌大而突出、高腭弓、下唇突出、巨睾症等^[1]。该病发病具有明显的性别差异，其在男性中的发病率约为 1/4000，女性约为 1/6000。约 99%FXS 的发病机制是由于 X 染色体长臂上 *FMR1* (fragile X mental retardation gene 1) 基因 5'非翻译区 CGG 序列异常扩增，重复数超过 200 时，引起 DNA 上游的 CpG 岛发生甲基化和靶基因转录沉默，导致基因产物脆性 X 智力低下蛋白 (fragile X mental retardation protein, FMRP) 表达减少或缺失^[2,3]。

1.1 *FMR1* 基因简介

FMR1 基因为脆性 X 综合征的致病基因，该基因在 1991 年首次被克隆，定位于 Xq27.3，全长 38Kb，由 17 个外显子和 16 个内含子组成，编码一种分别能与 RNA、蛋白质和核糖体结合的选择性蛋白，称 FMRP。研究表明，*FMR1* 基因 CGG 重复数与疾病的关系密切。当 CGG 重复数超过 200 时，导致脆性 X 综合征；CGG 重复数在 55 到 200 之间时，称为前突变，引起男性共济失调和女性卵巢早衰^[4]；CGG 重复数低于 26 时，可能与儿童智障、女性卵巢功能不全及乳腺癌的发病相关^[5]；CGG 重复数在灰色区域 (35~54) 时，与卵巢早衰和男性帕金森病也有一定关系^[6,7]。*FMR1* 基因在物种间高度保守，因此已建立多种动物模型来研究 FXS，例如在 *FMR1* 基因敲除小鼠中观察与 FXS 病人类似的疾病表型。

1.2 FMRP 简介

脆性 X 智力低下蛋白 (FMRP) 表达减少或缺失在脆性 X 综合征 (fragile X syndrome, FXS) 的发病机制中起重要作用。该蛋白质是一种 RNA 结合蛋白，与 RNA 的转录、剪接及细胞凋亡等过程密切相关，主要在突触可塑性与神经信

号的转导方面起重要作用^[8]。FMRP 在哺乳动物的组织中都有表达，以人的大脑和睾丸最为丰富^[9]。FMRP 含有几个 RNA 结合功能域：2 个 KH 结构域（K Homology domains, KH），分别由外显子 7-9 和外显子 9-13 编码，主要与含有“kissing complex”的 RNA 结合或与含有“ACUK/WGGA”序列的 RNA 结合^[10,11]；1 个 RGG 盒（arginine-glycine-glycine, RGG），由外显子 15、16 编码，是 FMRP 结合 mRNA 形成 G 四联体结构的关键区域^[12]；一个核定位信号（nuclear localization signal, NLS）和一个核输出信号（nuclear export signal, NES）^[13]，分别位于 FMRP 的第 115-150 氨基酸序列内以及外显子 14 编码的氨基酸序列内，通过磷酸化和甲基化作用参与翻译后修饰。

1.3 *FMR1* 基因的可变剪接

目前研究者们发现在多种组织中可同时存在几种不同形式的 *FMR1* 基因可变剪接体，最为常见的是外显子 15、17 剪接受点选择和外显子 12、14 保留与否^[14]，但是仅有 5 种蛋白剪接异构体在各种组织中被检测，且各种剪接异构体的生理活性都有差异。FMRP 蛋白异构体 1 型（ISO1）即为 *FMR1* 基因编码的全长蛋白脆性 X 智力障碍蛋白，研究者们关注最多的为此型在脆性 X 综合征中发生机制。但相关研究表明，在脑组织中主要以 ISO17，即外显子 17 第二剪接受体位点选择的剪接产物为主（占 54%），而 ISO1 型剪接产物表达丰度较低，仅占 7%。同时，Ding 等人也通过克隆-测序技术分析了脑组织 *FMR1* 基因可变剪接转录本，结果发现，*FMR1* 基因外显子 12 的选择性可变剪接占 99%，而 *FMR1* 基因 ISO1 型编码的蛋白仅占 1%。Sittler 和 Gibilisco 则发现 ISO17 和 ISO1 在人体中表达丰度均较高^[14,15]。其它对 *FMR1* 基因可变剪接产物分析的相关研究表明，在胎儿脑组织中，*FMR1* 基因的剪接产物都含有外显子 12，而在成人脑组织中，最为常见的剪接方式则是发生了外显子 12 的跳跃^[16]，这提示不同时段发育的脑组织，其可变剪接方式也主要涉及外显子 12 的保留与否以及外显子 17 受体位点的选择。因此，*FMR1* 基因在不同组织中分布比例均不相同，这些可变剪接转录本可能与人体大脑发育密切相关。

1.4 *FMR1* 基因可变剪接的意义

FMR1 基因的可变剪接可能调控 FMRP 相关生物学功能，与脆性 X 综合征发病相关。如 ISO2 型与 ISO3 型剪接位点接近 RGG 盒区域，而这一区域是 FMRP 蛋白与含有 G 四联体 mRNA 结合的关键部位。且 ISO2 型剪接位点发生

于第 15 个外显子处, 丢失了关键的磷酸化位点 (Ser-499), 引起 FMRP 与相应的 mRNA 结合能力下降。ISO3 型则丢失了参与蛋白甲基化的关键氨基酸, 造成 FMRP 构象发生改变。ISO4-6 型与 ISO10-12 型发生了外显子 14 的跳跃, 导致核输出信号丢失, 这六种 FMRP 蛋白异构体保留在细胞核里, 可能引起蛋白翻译修饰异常。FMRP ISO7-9 型则发生了外显子 12 的缺失, 影响了 KH 结构域与 RNA 的结合。此外, ISO1-6 型, 编码 KH2 结构域延伸区域, 影响 FMRP 与 RNA 结合的特异性和亲和力^[11,14,17,18]。不同的 FMRP 剪接异构体有不同的 RNA 结合能力, 相关蛋白的表达可能会引起相应的信号转导失调, 暗含了潜在的生物学意义。50%-75% 与神经系统相关基因的可变剪接会影响离子通道活性^[19]、突触可塑性^[20]、树突棘形成^[21]以及神经递质传递^[22]。而人类的 *FMR1* 基因正是神经系统中的关键基因, 通过可变剪接能够产生 20 多种结构类似但功能有所不同的 FMRP 剪接异构体^[14]。*FMR1* 基因的可变剪接会影响 FMRP 结构域的改变, 而这些剪接异构体对 FMRP 生理功能的影响以及参与 FXS 疾病发生的分子机制仍不清楚。

2. FMRP 抑制翻译的机制

2.1 靶 mRNA 调控 FMRP 参与的翻译

利用基因芯片和酵母三杂交实验已经鉴定了 400 多种可以和 FMRP 结合的 mRNA^[23,24]。研究发现, FMRP 与 mRNA 结合主要通过以下 2 种方式抑制翻译:

(1) 抑制翻译起始复合物 eIF4A-eIF4G-eIF4E (eIF4F) 形成。翻译起始前真核生物的 mRNA 需要在 5'端添加 mGpppG 结构, 随后 m7G 帽子结构就会结合翻译起始因子 4E (eIF4E) 形成含帽的 eIF4F 复合物, 招募核糖体开始蛋白质的合成^[25]。FMRP 向靶 mRNA 募集 CYFIP1, 促使 eIF4E 与之结合, 形成 FMRP/CYFIP1/eIF4E 复合物, 阻止翻译的起始。研究表明, eIF4E 和 CYFIP1 的结合与翻译水平呈负相关, 当 FMRP 的靶 mRNA 如 MAP1B、Camk2a 及 APP 等蛋白质表达增加时, 所募集的 CYFIP1 的数量会减少^[26]。(2) 形成 MiRNA-RISC/FMRP 复合物。这一过程是通过 RNAi 路径来介导。FMRP 与 miRNA 结合的结构域还未见报道, 但 FMRP 可与 RISC 家族中 Argonaute2 和 Dicer 结合, 调控并稳定 miRNA-RISC 复合体形成, 进而直接裂解转录本抑制翻译^[27]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库