

· 基础研究 ·

人FAT1基因启动子的克隆鉴定及其功能浅析

乔春敏, 乔笑芹, 周国平*

南京医科大学第一附属医院儿科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的: 克隆人脂肪非典型钙黏蛋白1(FAT atypical cadherin 1, FAT1)基因启动子, 找到核心启动子区域并对其转录调控机制进行初步分析。方法: 通过PCR方法获得人FAT1基因5'上游1 163 bp(-1 029~+134 bp)的片段, 亚克隆至pGL3-basic载体; 通过步移缺失构建不同缺失片段的重组质粒。双荧光素酶报告活性分析检测各重组质粒在A549细胞和HEK293T细胞中的活性, 找到核心启动子区域。利用生物信息学方法预测核心区域的转录因子结合位点。结果: 经测序、酶切鉴定, 成功构建了人FAT1启动子荧光素酶活性报告基因重组质粒。与pGL3-basic质粒相比, 人FAT1启动子重组质粒的相对荧光素酶活性增加($P < 0.05$)。通过生物信息学软件预测人FAT1启动子区域(-233~-110 bp)可能含有TFAP2C、KLF5等转录因子结合位点。结论: 成功构建人FAT1启动子不同缺失片段的荧光素酶报告基因重组质粒。通过荧光素酶活性比较, 推测人FAT1的核心启动子区域位于-233~+134 bp区域, 其中可能含有若干转录因子结合位点。

[关键词] 脂肪非典型钙黏蛋白1; 启动子; 转录调控

[中图分类号] Q78

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)06-862-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20190614

Identification and primary function of human FAT1 gene promoter

Qiao Chunmin, Qiao Xiaoqin, Zhou Guoping*

Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To clone the promoter sequences of fat atypical cadherin 1 (FAT1), and to preliminarily analyze the transcriptional regulatory mechanism of the promoter. **Methods:** Promoter region was constructed by bioinformatic methods, and the application of 1 163 bp(-1 029~+134 bp) fragment of 5' upstream sequence of FAT1 gene by PCR was conducted, followed by cloning to pGL3-basic vector to establish the luciferase report gene recombinant plasmid. Another four recombinant plasmids of different lengths were obtained through walking deletion and then cloned to pGL3-basic plasmid as before. The resultant plasmids were transfected into A549 cells and HEK293T cells respectively together with pGL3-basic vector. After this their activities were detected via dual-luciferase reporter assay. Bioinformatic methods was performed to predict the sequences of the potential transcriptional factor binding sites of the core region found in the promoter. **Results:** The luciferase reporter gene recombinant plasmids of human FAT1 promoter were successfully constructed. The relative luciferase activities of recombinant promoters, in contrast to pGL3-basic vector, were much higher($P < 0.05$). Note the sequences of the binding sites such as TFAP2C, KLF5 were possibly included in the promoter region(-233~-110 bp) of FAT1 gene, which could be predicted through bioinformatic means. **Conclusion:** The construction of the luciferase report recombinant plasmids of FAT1 gene were successfully done, and four of these plasmids had strong luciferase activities in A549 cells and HEK293T cells, comparing to the activities of pGL3-basic plasmid. Through this the core region was probably found. It is concluded the core promoter region of FAT1 gene was possibly located in the(-233~+134 bp) region, in which may preserve potential important transcriptional binding sites.

[Key words] FAT1; promoter; transcriptional regulation

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(06):862-866]

[基金项目] 江苏省“科教强卫”工程创新团队(领军人才)项目(CXTDA2017018)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: guopzhou@126.com

在真核生物中,异常的细胞内环境可以诱导钙黏蛋白的病理调节,导致细胞病变,如肾脏疾病和自身免疫性疾病^[1]。细胞黏附在多细胞生物的发育和动物形态发生过程中起着重要作用。脂肪非典型钙黏蛋白1(FAT atypical cadherin 1, FAT1)是一种钙离子依赖性黏附蛋白,属于单跨膜受体。研究表明,FAT1通过其细胞质尾部特定的蛋白-蛋白质相互作用来调节细胞的迁移和生长控制^[2]。FAT1在肾小球上皮细胞表达尤其丰富,肾小球上皮细胞也叫足细胞,小鼠的FAT1基因缺失导致这些富含肌动蛋白的足细胞发育异常^[3]。FAT1的缺失还会减少成纤维细胞和足细胞的细胞黏附和迁移,导致足突消失和狭缝膜完整性的破坏,进而导致激素抵抗型肾病综合征^[4]。

因此,研究FAT1基因对激素抵抗型肾病综合征有重要的理论指导意义。但是目前对FAT1的研究主要集中在信号通路及其与蛋白的相互作用上,对于FAT1自身的转录调控机制研究较少。本实验旨在通过构建人FAT1启动子荧光素酶报告重组质粒并分别瞬时转染A549细胞和HEK293T细胞,分析其在这2种细胞中的荧光素酶活性来推测FAT1启动子的核心区域,旨在为进一步研究人FAT1的转录调控机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

腺癌人类肺泡基底上皮细胞(A549细胞)、人源胚胎肾细胞(HEK293T细胞)、pGL3-basic质粒、pRL-TK(海肾荧光素酶报告质粒)为本实验室保存。胎牛血清、Opti-MEM培养基(Gibco公司,美国);DMEM培养基(Thermo Scientific公司,美国);大肠杆菌*E.coli* DH5 α (北京擎科生物科技有限公司);基因组DNA提取试剂盒、切胶回收试剂盒、小量质粒提取试剂盒(Omega公司,美国);限制性内切酶*Kpn* I和*Xho* I、T4 DNA连接酶、TaKaRa Ex Taq保真酶、DL5000 Marker(TaKaRa公司,日本);琼脂糖(Gene公司,西班牙);质粒转染试剂LipofectamineTM 2000脂质体(Invitrogen公司,美国);双荧光素酶检测试剂盒(Promega公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和基因组DNA的提取

A549细胞和HEK293T细胞用含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基培养,置于37℃、5% CO₂培养箱中,2~3 d传代1次。采用对数期生长细胞进行实

验操作。A549细胞全基因组DNA通过基因组DNA提取试剂盒提取,按照使用说明书具体操作。

1.2.2 生物信息学分析

人FAT1基因序列(GenBank编号:NC_000004.12)从美国国立生物技术中心数据库NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)获得,通过UCSC网站(<http://genome.ucsc.edu/>)对比获得人基因组序列,找到起始密码子ATG上游约1 163 bp片段序列。用JASPAR软件(<http://jaspar.genereg.net/>)预测转录因子结合位点。

1.2.3 克隆人FAT1基因启动子区域

通过Primer Premier 5.0软件设计人FAT1 5'端缺失片段引物(由南京擎科生物科技公司合成),上游:5'-CGGGGTACCCCTCGGAAT-TTCACGCTGTT-3'(下划线部分为*Kpn* I酶切位点),下游5'-CC-GCTCGAGCCTAACCAGA-GTGCCAACG-3'(下划线部分为*Xho* I酶切位点)。以人A549细胞基因组DNA为模板,通过PCR扩增人FAT1基因5'侧翼区长度约1 163 bp序列,PCR反应条件:98℃ 10 s,60℃ 15 s,68℃ 90 s,35个循环。将PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳实验,并用小量切胶回收试剂盒回收扩增的DNA。

1.2.4 人FAT1启动子荧光素酶报告基因重组质粒的构建与鉴定

用限制性内切酶*Kpn* I、*Xho* I双酶切PCR产物和pGL3-basic质粒,双酶切后的片段经回收纯化后用T4连接酶连接,转入大肠杆菌*E.coli* DH5 α ,37℃摇床摇菌,1 h后涂布在含氨苄青霉素的LB固体培养基上,置于37℃培养箱培养过夜,次日挑取单克隆进行菌落PCR验证,取阳性单克隆菌落送测序,测序结果正确者扩大培养并37℃摇床过夜,次日提取质粒。对质粒进行双酶切,进行1%琼脂糖凝胶验证。通过测序和双酶切鉴定正确者,命名为pFAT1-1。以pFAT1-1 DNA为模板,通过步移缺失构建不同长度的FAT1启动子序列(引物见表1),通过PCR扩增获得相应产物。用同样的方法构建不同缺失片段的人FAT1启动子荧光素酶报告基因重组质粒,分别命名为pFAT1-2、pFAT1-3、pFAT1-4、pFAT1-5。

1.2.5 质粒转染和荧光素酶活性检测

A549细胞和HEK293T细胞于96孔细胞培养板中铺板培养,次日待细胞生长至密度为50%~70%时进行人FAT1荧光素酶报告基因重组质粒与pGL3-basic质粒、pRL-TK质粒共转染,采用Lipo-

表1 扩增人FAT1启动子区片段引物序列

Table 1 Primers designed for amplifying for promoter segments of human FAT1 gene

引物	位置(bp)	序列(5'→3')	目的片段大小(bp)
FAT1-1F	-1 029~+134	CGGGGTACCCCTCGGAATTCACGCTGTT	1 163
FAT1-2F	-612~+134	CGGGGTACCACAAAGACCACGAAGAGCATAA	746
FAT1-3F	-377~+134	CGGGGTACCAGACGCAGCCGAAGGAGGA	511
FAT1-4F	-233~+134	CGGGGTACCCGCCAGCCGGAGAATCC	367
FAT1-5F	-110~+134	CGGGGTACCGAAAGAGGCAGCGAGTC	244
FAT1-R		CCGCTCGAGCCTAACAGAGTGCCAACG	

酶切位点用下划线标出,上游酶切位点为限制性内切酶Kpn I,下游酶切位点为限制性内切酶Xho I。

fectamine™ 2000 试剂进行瞬时转染,培养 24 h 后收集细胞,吸掉培养基用 PBS 洗 1 次,然后用细胞裂解液裂解细胞,震荡 15 min 后收取细胞,采用双荧光素酶试剂盒在双荧光素酶报告分析系统中进行荧光素酶活性检测。计算各荧光素酶重组报告质粒及 pGL3-basic 质粒和内参 pRL-TK 质粒的荧光素酶活性的比值,即相对荧光素酶活性。

1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计分析软件对数据进行统计学分析。实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

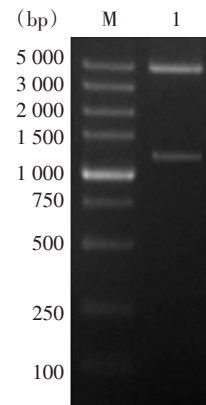
2.1 生物信息学分析

从 NCBI 数据库中获得人 FAT1 基因序列,截取从翻译起始位点 ATG 后 134 bp 至上游 1 029 bp 的序列。JASPER 软件分析其内大量转录因子结合位点。此序列为本实验的最大长度启动子区域。

2.2 人 FAT1 基因启动子荧光素酶报告基因重组质粒的构建和鉴定

以 A549 细胞的全基因组 DNA 作为模板,用引物 FAT1-F/FAT1-R 进行 PCR 扩增,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,目测与目的片段大小基本一致,进行回收。将回收的 PCR 产物和 pGL3-basic 质粒分别用限制性内切酶 Kpn I、Xho I 进行双酶切后连接转化摇菌涂板,挑取单克隆进行菌落 PCR 验证,目测与目的片段大小一致者为阳性菌落,送测序,测序结果比对正确者即目的重组质粒的阳性单克隆菌液。将相应菌液进行扩大培养并提取质粒,并将获得的质粒用限制性内切酶 Kpn I、Xho I 进行双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳后可见 2 条片段,一条约 5 000 bp,即 pGL3-basic 载体片段;另一条片段大小约 1 200 bp,与目的基因大小片段一致(图 1)。经过测序和双酶切鉴定后,构得人 FAT1 基因启动子

荧光素酶报告基因重组质粒,命名为 pFAT1-1。



M: DL5000 Maker; 1: pFAT1 重组质粒双酶切产物。

图 1 pFAT1 质粒鉴定

Figure 1 Identification of pFAT1 recombinant plasmid

2.3 人 FAT1 基因启动子 5'侧翼区缺失突变体的构建

以 pFAT1-1 DNA 为模板,用同样方法通过步移缺失构建出不同长度的 FAT1 启动子缺失突变体。将测序结果正确者所对应的阳性单克隆菌液进行扩大培养并提取质粒。提取出相应质粒后进行双酶切,2% 核酸琼脂糖凝胶电泳显示出相应大小的各不同缺失片段(图 2)。获得的相应重组质粒分别命名为 pFAT1-2、pFAT1-3、pFAT1-4、pFAT1-5。

2.4 人 FAT1 启动子活性的检测

将构建的人 FAT1 启动子荧光素酶报告重组质粒及 pGL3-basic 质粒和内参 pRL-TK 质粒共转染至生长密度 50%~70% 的 A549 细胞中,24 h 后进行荧光素酶活性检测。结果显示,在 A549 细胞中与对照组 pGL3-basic (1.00±0.00) 相比,重组质粒相对荧光素酶活性分别是 22.33±5.33、21.58±3.39、46.48±3.11、57.34±1.884、5.66±1.02,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3); 在 HEK293T 细胞中,与对照组 pGL3-basic (1.00±0.00) 相比,重组质粒相对荧光素酶活性分别是 20.06±4.34、25.59±3.77、34.19±6.38、

46.64±1.89、4.39±1.15, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图3), 表明人FAT1启动子荧光素酶报告重组质粒转染至A549细胞和HEK293T细胞后均具有启动子活性。比较这5个不同缺失片段的重组质粒之间的相对荧光素酶活性, 其中pFAT1-4的活性最强, 而pFAT1-5的相对荧光素酶活性较pFAT1-4降低约90%, 两者差异有统计学意义($P < 0.001$), 故推测人FAT1启动子的核心区域可能位于-233~+134 bp区域; 在A549细胞, pFAT1-1和pFAT1-2的相对荧光素酶活性分别与pFAT1-3和pFAT1-4的相比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图3), 提示相关启动子区域可能含有转录抑制因子。

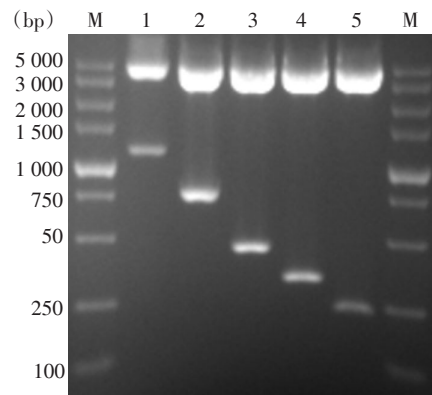
2.5 人FAT1启动子核心区域转录因子结合位点预测

根据上述人FAT1启动子重组质粒的荧光素酶活性检测分析, 提示-233~-110 bp区域内可能存在明显影响启动子活性的转录因子结合位点, 应用JASPAR软件对该区域进行分析, 获得可能的转录因子结合位点。预测结果显示该序列区域内可能含有TFAP2C、KLF5等转录因子结合位点(图4)。

3 讨论

真核生物在其转录水平的调控仍然是真核生物调控基因表达非常重要的机制。转录水平的调控主要通过调控转录起始部位一些特殊的调控序列如启动子和作用于启动子区的一些转录因子。本研究为确定人FAT1基因启动子核心区域的可能位置, 构建了5条不同缺失片段的FAT1启动子荧光素酶基因报告重组质粒, 并通过瞬时转染和荧光素酶活性检测, 推测其核心启动子区域可能位于5'侧翼区-233~+134 bp区域内。通过重组质粒pFAT1-4和pFAT1-5相对荧光素酶活性比较, 进一步推测在5'侧翼区-233~-110 bp核酸序列中可能含有多个关键转录因子结合位点, 提示FAT1基因可能受这些转录因子的调控。

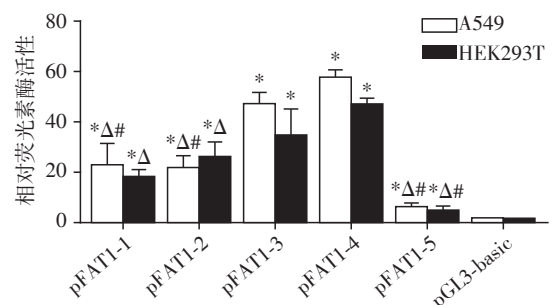
FAT1是一种钙离子依赖性黏附蛋白, 对调控肌动蛋白动力学、细胞极化、细胞黏附和迁移等起重要作用, 通过多种信号通路及蛋白与蛋白的相互影响起作用^[5-8]。如在其胞内区, FAT1和肌萎缩蛋白(atrophin)直接相互作用, 调节细胞的转移。两者还通过平面细胞极性途径(the planar cell polarity pathway, the PCP pathway)起作用, 影响细胞的极性^[1, 9-10]。FAT1通过结合Ena/VASP蛋白调控细胞动力学和细胞极化, 进而影响到细胞的黏附和迁移^[2-3, 10]。另外, FAT1还通过RHO/RAC1/CDC42信



M: DL5000 Maker; 1: pFAT1-1 重组质粒双酶切产物, 插入片段大小 1 163 bp(-1 029~+134 bp); 2: pFAT1-2 重组质粒双酶切产物, 插入片段大小 746 bp(-612~+134 bp); 3: pFAT1-3 重组质粒双酶切产物, 插入片段大小 511 bp(-337~+134 bp); 4: pFAT1-4 重组质粒双酶切产物, 插入片段大小 367 bp(-233~+134 bp); 5: pFAT1-5 重组质粒双酶切产物, 插入片段大小 244 bp(-110~+134 bp)。

图2 人FAT1启动子荧光素酶报告基因重组质粒双酶切鉴定

Figure 2 Identification of luciferase report gene recombinant plasmids of human FAT1 gene promoter by double enzyme digestion



与pGL3-basic比较, * $P < 0.05$; 与pFAT1-4比较, $\Delta P < 0.05$; 与pFAT1-3比较, # $P < 0.05$ ($n=3$)。

图3 人FAT1启动子荧光素报告基因重组质粒分别在A549细胞和HEK293T细胞中相对荧光素酶活性

Figure 3 Analysis of relative luciferase activities of five promoter luciferase report gene recombinant plasmids of human FAT1 gene in A549 cells and HEK293T cells respectively

TGGCGCGCCAGCCGGAATCCCGTCCGCGCCCGGG
GCGGGGGCGAGCGGGGCGTGACGTCACCTCCCCT
KLF5
CCCCACCGCTCCAAGGGGAGGGAGTG
TFAP2C

转录因子结合位点用下划线标出。

图4 运用JASPAR软件预测转录因子结合位点

Figure 4 Prediction of binding sites of transcriptional factors by JASPAR

号通路影响管腔结构的形成以及细胞的迁移。RAC1和CDC42是RHO GTP酶,而RHO GTP酶信号通路对慢性肾脏病起着重要作用^[4,11-13]。因此,调控FAT1自身的表达也可以通过有关蛋白以及各种信号通路直接或间接起作用,并为后续进一步的研究提供了方向。

转录因子是一类可以和基因上游启动子区序列结合从而调控相关基因表达的蛋白质。在正常组织,KLF5在很大程度上调控多个细胞进程,如移动、凋亡^[14]。高表达的TFAP2C通过促进细胞增殖严重影响着肺癌、乳腺癌等多种疾病的预后,考虑其可能减少细胞之间的黏附进而使增殖的细胞转移扩散^[15]。结合转录因子结合位点预测的结果,推测KLF5及TFAP2C可能通过与FAT1启动子的特殊序列结合参与细胞的发生发展等过程。人FAT1的转录调控是否受到上述转录因子的影响,尚需进一步验证。总之,本研究成功构建了人FAT1启动子荧光素酶报告重组质粒,并预测了FAT1启动子区可能含有的关键转录因子结合序列,为进一步研究FAT1转录调控机制奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Sadeqzadeh E, De Bock CE, Thorne RF. Sleeping giants: emerging roles for the fat cadherins in health and disease [J]. *Med Res Rev*, 2014, 34(1): 190-221
- [2] Zhang X, Liu J, Xiao L, et al. History and progression of Fat cadherins in health and disease [J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 7337-7343
- [3] Moeller MJ, Soofi A, Braun GS, et al. Protocadherin FAT1 binds Ena/VASP proteins and is necessary for actin dynamics and cell polarization [J]. *EMBO J*, 2004, 23(19): 3769-3779
- [4] Gee HY, Sadowski CE, Aggarwal PK, et al. FAT1 mutations cause a glomerulotubular nephropathy [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10822
- [5] Kim KT, Bo -Sung Kim, Kim JH . Association between FAT1 mutation and overall survival in patients with human papillomavirus -negative head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Head Neck*, 2016, 38 (S1) : E2021-E2029
- [6] Hu X, Zhai Y, Shi R, et al. FAT1 inhibits cell migration and invasion by affecting cellular mechanical properties in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(5): 2136
- [7] Neumann M, Seehawer M, Schlee C, et al. FAT1 expression and mutations in adult acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood Cancer J*, 2014, 4(6): e224
- [8] Valletta D, Czech B, Spruss T, et al. Regulation and function of the atypical cadherin FAT1 in hepatocellular carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(6): 1407-1415
- [9] Hou R, Sibinga NES. Atrophin proteins interact with the fat1 cadherin and regulate migration and orientation in vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(11): 6955-6965
- [10] Qi C, Zhu YT, Hu L, et al. Identification of Fat4 as a candidate tumor suppressor gene in breast cancers [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(4): 793-798
- [11] Gee HY, Saisawat P, Ashraf S, et al. ARHGDI1 mutations cause nephrotic syndrome via defective RHO GTPase signaling [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(8): 3243-3253
- [12] Scott RP, Hawley SP, Ruston J, et al. Podocyte-specific loss of Cdc42 leads to congenital nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(7): 1149-1154
- [13] Choi SY, Chaconheszele MF, Huang L, et al. Cdc42 deficiency causes ciliary abnormalities and cystic kidneys [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(9): 1435-1450
- [14] Ma D, Chang LY, Zhao S, et al. KLF5 promotes cervical cancer proliferation, migration and invasion in a manner partly dependent on TNFRSF11a expression [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15683
- [15] Park JM, Wu T, Cyr AR, et al. The role of Tcfap2c in tumorigenesis and cancer growth in an activated Neu model of mammary carcinogenesis [J]. *Oncogene*, 2015, 34(50): 6105-6114

[收稿日期] 2018-12-07