

(CAG)_n 重复序列对蛋白翻译影响的机制研究

冯欣然¹

指导教师：鲁伯坝^{1,2}

(1.复旦大学生命科学学院 2.华山医院)

摘要：蛋白质翻译是细胞进行一系列生命活动的蛋白质的重要过程。据报道，细胞内蛋白质翻译的缺陷可能与多种疾病相关联。亨廷顿舞蹈症（HD）是一种单基因常染色体显性遗传的神经退行性疾病，其主要由亨廷顿基因（*HTT*）突变引起：变异 *HTT* 基因的 1 号外显子（exon 1）内(CAG)_n 重复数增加，导致其编码的突变亨廷顿蛋白(mutant Huntingtin, mHTT)中的多聚谷氨酰胺（polyQ）序列过度扩张，病理表现为病人纹状体等脑区的神经元退行死亡。但其退行的机制不明。本课题研究了亨廷顿病对蛋白质翻译可能的影响。我们发现在永生纹状体神经前体细胞系中，亨廷顿突变细胞相对野生型细胞，全局蛋白翻译速度明显降低，翻译保真度有所降低。进一步的机制研究表明，此变化部分来源于翻译起始障碍，可能由真核起始因子 eIF4E 在疾病型细胞中表达降低所导致。更重要的是，补充表达 eIF4E 能够挽救亨廷顿病细胞在压力条件下的凋亡，提示蛋白质翻译异常可能参与疾病发生，并为亨廷顿病治疗提供了新的切入点。

关键词：亨廷顿舞蹈症；蛋白质翻译；翻译起始；eIF4E；变异亨廷顿蛋白；polyQ

The expanded CAG repeats reduce global protein synthesis rates

Xinran Feng¹

Advisor: Boxun Lu^{1,2}

(1. School of Life Sciences, Fudan University 2. Huashan Hospital)

Abstract: Protein translation is a vital process by which cells synthesize proteins that maintain a wide range of critical cellular activities. Defects in protein translation has been reported to be associated with various diseases. Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant monogenic neurodegenerative disease, which is caused by the mutant Huntingtin gene (*HTT*). The mutant *HTT* gene contains an expanded (CAG)_n repeat tract in its exon 1, encoding the mutant Huntingtin protein (mHTT), which possesses an expanded polyglutamine (polyQ) stretch and becomes toxic, leading to neurodegeneration in specific brain regions, mainly the striatum. Meanwhile, the mechanism underlying the neurodegeneration in HD remains unclear. In this study, we investigated the potential

defects of protein translation in HD cells. In the immortalized striatal neuronal precursor cells STHdh, we discovered that global protein translation rate was dramatically reduced whereas the translation fidelity was moderately reduced in HD cells compared to wild-type controls. Further mechanistic experiments revealed that the translation defects were at least partly due to the translation initiation deficiency, which was possibly caused by a lower expression of eukaryotic initiation factor eIF4E in HD cells. Importantly, expression of eIF4E in HD cells rescued their apoptosis induced by cellular stress, suggesting that the protein translation defects may contribute to the pathogenesis in HD. Our study provides novel insights into HD mechanisms and potential entry points for therapeutic intervention.

Keywords: Huntington's disease; protein synthesis; translation initiation; eIF4E; mutant Huntingtin; polyQ

1 引言

神经退行性疾病（Neurodegenerative disorders）是一类引起中枢神经元进行性死亡进而使神经系统功能障碍的疾病，多发于中老年人。并造成巨大的社会负担。随着中国老龄化的趋势，神经退行性疾病研究的重要性也与日俱增。

神经退行性疾病中研究较多的有帕金森氏症和阿兹海默症以及亨廷顿舞蹈症。亨廷顿舞蹈症的研究优势之一是具拥有清晰的遗传背景，是一种单基因常染色体显性遗传的疾病，也是突变多聚谷氨酰胺蛋白疾病之一[1]。HD 于 1872 年首次由医生乔治·亨廷顿（George Huntington）系统性描述并命名。亨廷顿医生通过对一个亨廷顿病家系几代人的医疗记录的研究，准确而细致地阐述了其符合常染色体显性遗传规律的表现，而这甚至早于孟德尔遗传定律被“重新发现”[2]。之后近百年，科学家试图揭示 HD 的遗传学原因，并最终于 1993 年确定该疾病主要由位于人四号染色体的亨廷顿基因（HTT）的突变引起，HTT 一号外显子中有一段 CAG 重复序列（(CAG)_n），野生型基因中重复数为 6~35 的序列，当重复数多于 40 后，即成为突变 HTT 基因，携带突变基因的细胞将产生携带过度扩张的多谷氨酰胺序列的突变亨廷顿蛋白[1]。

亨廷顿蛋白是一种广泛表达的，主要为功能未知的细胞质蛋白质，可在大脑中的神经元中找到。在亨廷顿病人体内中，正常和突变等位基因都被表达（杂合子）。目前研究认为，突变亨廷顿蛋白具有蛋白质水平的毒性以及正常亨廷顿蛋白的功能丧失（loss of function），因此导致亨廷顿病[3]。

HD 的临床症状主要表现为舞蹈样不自主动作（晚期则运动能力逐渐丧失）、精神障碍和进行性认知障碍，病理表现为纹状体神经元退行萎缩。亨廷顿基因如何突变如何导致特定神经元功能障碍以及退行死亡，这一直是研究者希望解答的问题，这个机制对为亨廷顿舞蹈症有力缓解甚至根治的方法有着重要意义。

目前已有研究发现亨廷顿病细胞中突变亨廷顿蛋白的降解障碍在疾病发病机制中起作用，即突变亨廷顿蛋白有毒性的末端片段被释放后富集在人类和动物以及细胞模型中的细胞核，细胞质中形成蛋白质聚集体（Huntingtin aggregates）能够泛素化然后螯合其他蛋白质，如伴侣蛋白，蛋白酶体蛋白，正常亨廷顿蛋白和转录因子[4, 5, 6]。可溶性突变亨廷顿蛋白（soluble mHtt protein）在细胞质中也可以与其他蛋白质和线粒体发生病理性相互作用。最近的证据表明，突变亨廷顿蛋白能够损害快速轴突运输，而这可能与早期神经病理相关，并且似乎发生在转录功能障碍之前，而后者也与 HD 的特征性的凋亡和细胞死亡相关[7, 8, 9]。

此外，突变亨廷顿蛋白或其片段也可以间接触发一系列破坏性和补偿性分子和遗传过程。这些将导致功能逐渐缺陷的神经元更易受压力影响。这些应激包括氧化损伤，兴奋毒性应激，增强炎症信号的表达，激活半胱天冬酶 8 和半胱天冬酶 3 的促凋亡信号，蛋白质分解失效，转谷氨酰胺酶活性增加和能量耗竭。这些过程中的每一个都可能影响 HD 中的神经元死亡，但同时也是更远端的治疗靶点[3]。

在上述病理机制涉及之外，蛋白质翻译机器（protein translation machinery）也在细胞的生命活动中扮演着重要的角色。蛋白翻译的保真度（translation fidelity），翻译的效率（translation efficiency），合成与降解（protein synthesis and turnover）的平衡，这些过程的失调都可能造成病理作用[11]。同时，多种疾病中都被研究发现其细胞翻译有着不同程度的缺陷或者异常。例如，瑞特综合征（RTT）是由 MECP2 的突变引起的，近年研究显示，在人类胚胎干细胞模型中，MECP2 在神经元中起全局激活剂的作用，MECP2 缺乏表现为 AKT / mTOR 通路活性的严重缺陷，意味着神经元转录减少，同时新生蛋白质合成显著减少，而通过外源性生长因子激活 AKT / mTOR 信号或通过减少 PTEN 表达促进蛋白质合成并挽救突变型神经元中的疾病表型[10]。

亨廷顿舞蹈症作为神经发育与退行疾病的一种，其蛋白翻译的功能同样很有研究价值。并且，根据转录谱研究和蛋白翻译相关文献的对比筛查，我们发现亨廷顿病细胞内不乏核糖体蛋白，核糖体加工，翻译起始，翻译延伸等基因的表达水平发生了变化。尽管在此之前有少量研究认为某些亨廷顿病细胞模型中核糖体 RNA 转录以及核仁功能有所异常[12, 13, 14]，但在全局蛋白翻译速度、翻译保真性、翻译过程本身的研究仍属空白。因此，我们愈发希望在蛋白质翻译这一方向对亨廷顿病细胞展开探索，以期找到崭新的病理机制和治疗策略。

本课题由于合作的机缘巧合，我们从翻译保真性出发，从终止密码子（stop codon read-through）读通入手，兼顾了甲硫氨酸错酰化（Methionine misacylation），发现亨廷顿病细胞中翻译保真性有所降低，又由于翻译保真性与翻译速度的联系，转而着重关注亨廷顿病蛋白翻译的速度，以及蛋白翻译速度变化背后的机制。

2 研究结果

2.1 亨廷顿病神经前体细胞终止密码子读通率的测定

永生化的小鼠纹状体神经前体细胞系 $STHdh^{Q7/Q7}$, $STHdh^{Q7/Q111}$, $STHdh^{Q111/Q111}$, 简称 Q7/7, Q7/111, Q111/111, 是经典的亨廷顿舞蹈症细胞模型, 分别为野生型, 杂合疾病型和纯合疾病型。获取 psi-Check2 系列三个真核表达载体, 称为 p-TGA, p-TTT, p-WT, 分别为无义突变, 失活突变, 正常型, 转染铺于 96 孔板的三种鼠纹状体神经前体细胞系。用 Promega Dual-luciferase Kit (不可使用 Dual-Glo Kit, 背景信号会掩蔽实验信号) 对细胞进行收样和两种荧光素酶表达量进行测定。计算 Firefly 荧光素酶量与 Renilla 荧光素酶量的比值, 然后用转染 p-WT 和 p-TTT 分别作为 100% 和 0% 归一化 p-TGA 的信号值, 即得到每组细胞中终止密码子 UGA 的相对错误读通率。10 μ M Ataluren 可以人为增加错误读通率^[15]。如图 1。

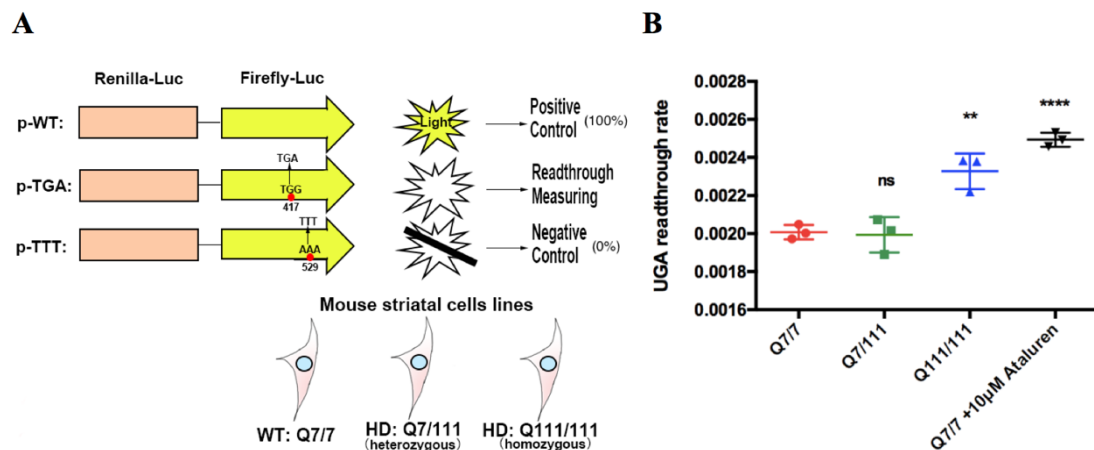


图 1 终止密码子 UGA 相对错误读通率测定

A: 翻译延伸保真性—终止密码子读通测定原理示意图。两个荧光素酶基因启动子不同, 不会互相干扰。p-TGA 在关键位点突变出终止密码, 则仅在终止密码读通时产生第二种荧光素酶信号。三种报告质粒分别作为 100%, 实验组, 和 0%, 通过归一化最终可以得到相对错误读通率。B: 三种神经前体细胞系 UGA 错误读通率的统计图, 其中每点为一个复孔, 即每组三个生物学重复。10 μ M Ataluren 可以人为增高先熟 (pre-mature) 终止密码子读通率, 为阳性对照

每个点为一个孔, 互为生物学重复。可以看出, 在纯合疾病型细胞 (Q111/111) 中终止密码子 UGA 的错误读通有显著的上升, 因此该现象可能是其他改变的下游影响。根据最近研究, 某种压力条件下原核细胞 mRNA 翻译的减慢, 并伴随终止密码子读通率的上升^[16]。于是, 我们转为研究细胞中的蛋白翻译速度。

2.2 亨廷顿病细胞总蛋白合成速度测定

为了借用非放射性实验方法标记和追踪新生蛋白的合成, 我们用甲硫氨酸类似物 L-AHA 取代细胞培养环境中的 L 型甲硫氨酸, 以此达到标记特定时间内新合成的肽链的目的。在不同时间点收取细胞后, 通过生物素为中介, 通过点击化学反应, 最终对 L-AHA 进行标

记，电泳，转膜，HPR 结合与发光。从图 2 中胶图可以看出，0-9 小时内野生型鼠神经前体细胞（Q7/7）内新合成的蛋白量显著且大幅高于疾病型神经前体细胞（Q7/111, Q111/111）。

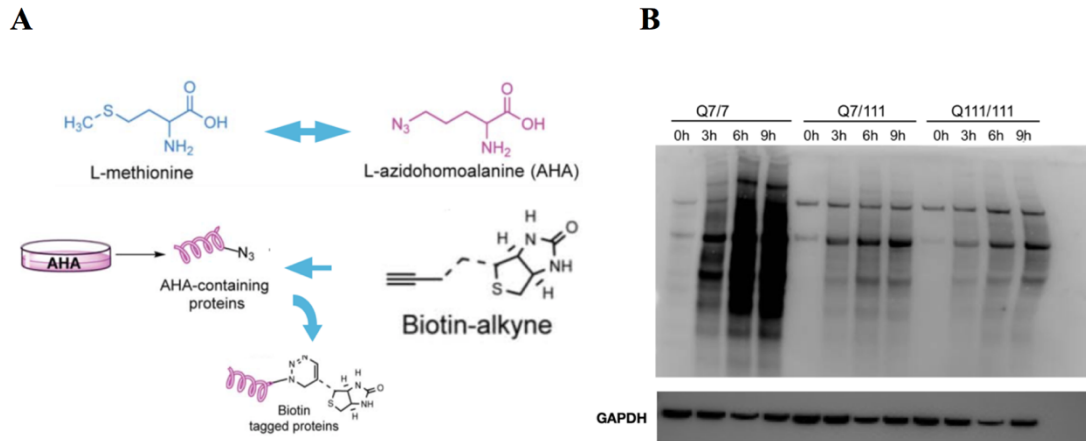


图 2. 细胞新生蛋白标记实验

A. L-AHA 置换标记新生蛋白原理示意图。用甲硫氨酸类似物 L-AHA 取代细胞培养环境中的 L-Met，再通过通过生物素为中介，点击化学反应，最终对 L-AHA 进行标记，电泳，转膜，HPR 结合与发光 B. 三种模型细胞系在 0-9 小时内细胞全局蛋白合成情况，可见野生型细胞合成蛋白量显著快于疾病型细胞。

2.3 报告 mRNA 实验测定蛋白翻译速度

为了进一步确定 L-AHA 标记实验中看到的蛋白合成速度差异是否来自 mRNA 翻译速度，如图 3 所描绘，我使用体外 mRNA 转录试剂盒，合成了加帽的海肾荧光素酶 mRNA，等量转染入三种细胞，分不同时间点对平行孔进行裂解收样，标定荧光素酶产物的量，用体系 DNA 量进行归一化（picogreen 标定），绘制曲线。

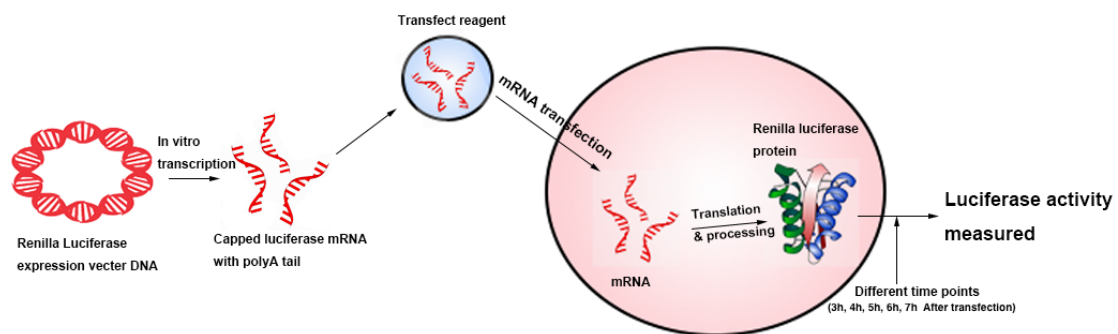


图 3. 荧光素酶报告 mRNA 转染法测定细胞翻译速率示意图

从左至右可以看到，使用携带 T7 启动子的线性化质粒为模板，体外转录合成报告 mRNA, lipo2000 将等量 mRNA 转染细胞，设置不同平行孔，在转染后不同时间点对平行孔细胞进行裂解，测定荧光素酶信号，由此得到细胞对外源蛋白的翻译曲线

结果如图 4，在转染 mRNA 后一段时间内，野生型细胞（Q7/7）相比 HD 疾病型细胞，对外源报告 mRNA 翻译为报告蛋白的速度显著更快。每点为三个技术性重复，阴性对照组的处理为加入 CHX 阻断翻译。由此，我们可以得到 HD 疾病型鼠纹状体神经前体细胞对 mRNA 翻译的速度慢于对应野生型细胞的结论。

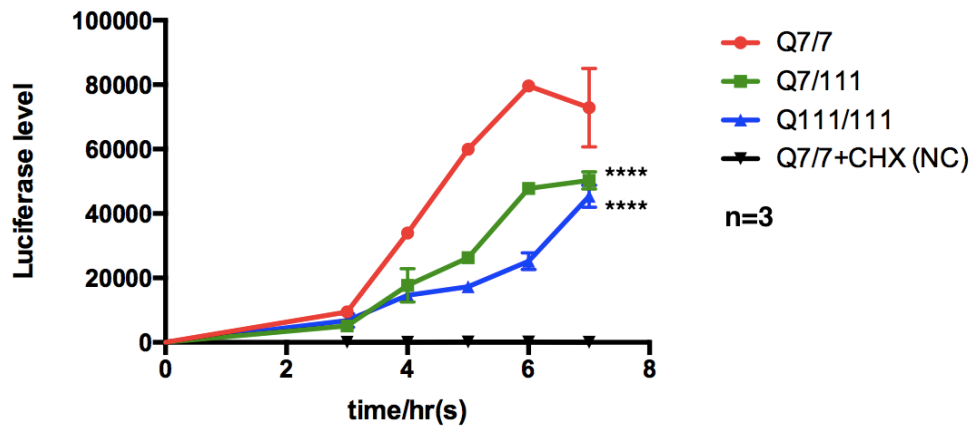


图 4. 转染报告 mRNA 后 0-7 小时内三种模型细胞系报告蛋白的合成量曲线

转染荧光素酶 mRNA 后 3h-7h 间荧光素酶蛋白的水平变化曲线。每点为三个技术性重复，阴性对照组的处理为加入 CHX 阻断翻译。统计显示两条疾病型细胞的变化曲线和野生型细胞相比差异非常显著

2.4 突变(CAG)_n 重复序列的相关产物对蛋白翻译的影响

在明确 HD 模型细胞 mRNA 翻译慢于野生型细胞，并表征为总蛋白合成减慢后，我们接下来证明了此现象与突变 Htt 基因的存在的因果性，并确定突变 Htt 基因的哪一下游产物能发挥这一作用。

如图 5，在鼠纹状体神经前体细胞中过表达突变 Htt 蛋白或者超过突变阈值的多谷氨酰胺蛋白，均能使细胞总蛋白合成速度降低；而敲低疾病型细胞中的突变 Htt 和敲低 polyQ，均能使疾病型细胞蛋白翻译速度回升。由此我们可以得到结论，过长而突变的多谷氨酰胺（polyQ）蛋白能够导致我们的神经前体细胞模型翻译速度减慢。

A

B

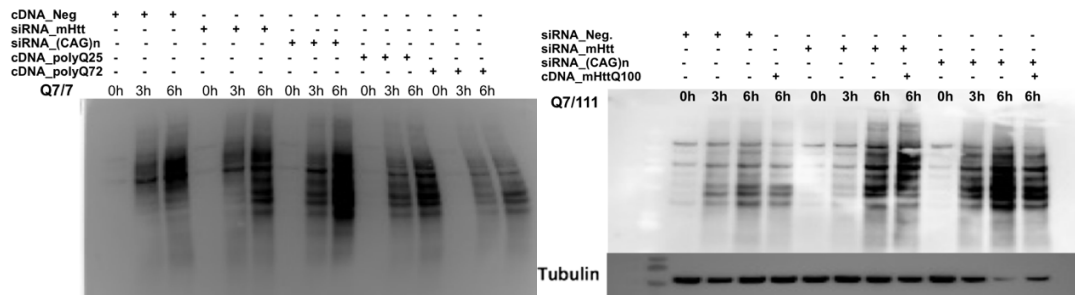


图 5. 鼠神经前体细胞系敲低或过表达 Htt 蛋白或 polyQ 蛋白对全局蛋白翻译的影响

对细胞进行过表达或者敲低处理，48h 后进行 A-LHA 标记实验。在不同时间点（0h，3h，6h）收取细胞后，通过生物素为中介，通过点击化学反应，最终对 L-AHA 进行标记，电泳，转膜，HPR 结合与发光。内参为 anti-Tubulin。（实验由潘宇寅完成）

2.5 多核糖体图谱反映细胞中翻译核糖体状态与透射电镜照片

在明确了突变 Htt 蛋白与细胞总蛋白翻译减慢的因果性之后，我们下一步应当解决的问题是，突变 Htt 蛋白，或者说过长的 polyQ 蛋白，究竟通过影响 mRNA 翻译机器（translation machinery）的哪个部分，减慢了总蛋白的翻译。

为了探索蛋白翻译减慢的机制，我们首先完成了野生型细胞和疾病型细胞的多核糖体图谱（polysome profiling），即将细胞中正在翻译的核糖体固定在对应的 mRNA 上，然后抽提出来，利用蔗糖梯度离心和吸光度连续取样测定，绘制核糖体分布曲线（图 6）。可以看出，野生型细胞（Q7/7）相比疾病型细胞（Q7/111），多核糖体（polysome）丰度高，与之对应的，疾病型细胞单核糖体（monosome）和核糖体亚基（subunits）水平较高。这一结果指向了疾病型细胞的翻译起始功能可能存在障碍和缺陷。

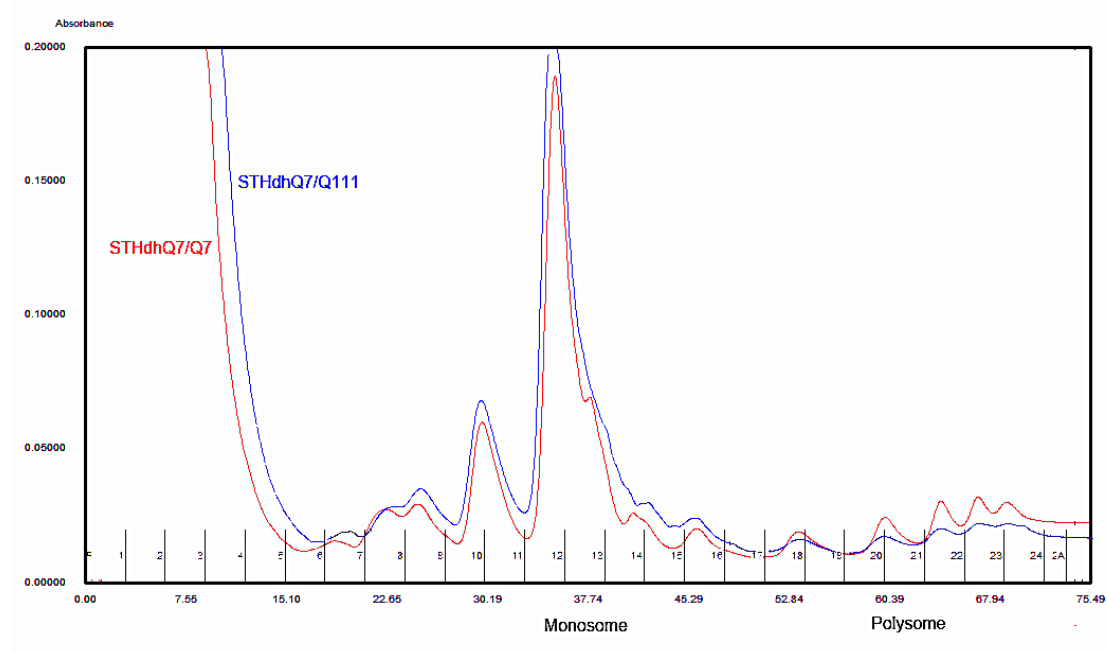


图 6. 野生型和杂合疾病型细胞的多核糖体图谱

多核糖体图谱利用蔗糖梯度（15%-45%）对细胞中核糖体状态和水平进行了拉开，从左至右为游离 mRNA，核糖体亚基，单核糖体和多核糖体。纵轴为表征 RNA 浓度的吸光度（254nm 下）。对 Q7/7 和 Q7/111 细胞进行了测绘和叠加对比。（实验由潘宇寅完成）

为了更直接地得到细胞中核糖体状态的信息，我送样获取了几种细胞的透射电镜（transmission electronic microscope）照片（图片未展示），以粗面内质网为主要参考，观察细胞中核糖体的丰度和聚集形态，并做了双盲实验。我们基本确定疾病型和野生型细胞中核糖体数目没有显著差异，但野生型细胞中聚集成串形态的核糖体（即多核糖体）相比纯合疾病型细胞更为多见。

2.6 亨廷顿病细胞总 RNA 在核内外丰度与新生 RNA 标记

尽管多核糖体图谱和透射电镜照片均不支持细胞核糖体生成或出核装配障碍的可能，但由于有文献在其他 polyQ 细胞模型中发现 rRNA 转录异常，且核糖体本身的缺陷确实是造成如此大的翻译速度差异的重要潜在可能机制，因此我完成了等细胞数的三种细胞的总 RNA 抽提以及凝胶电泳，发现三种细胞 28S 与 18S rRNA 水平没有明显差异；接下来我进行了细胞核质分离，然后分别进行 RNA 抽提，发现三种细胞的胞质 rRNA 丰度也没有明显差异。（如图 7）

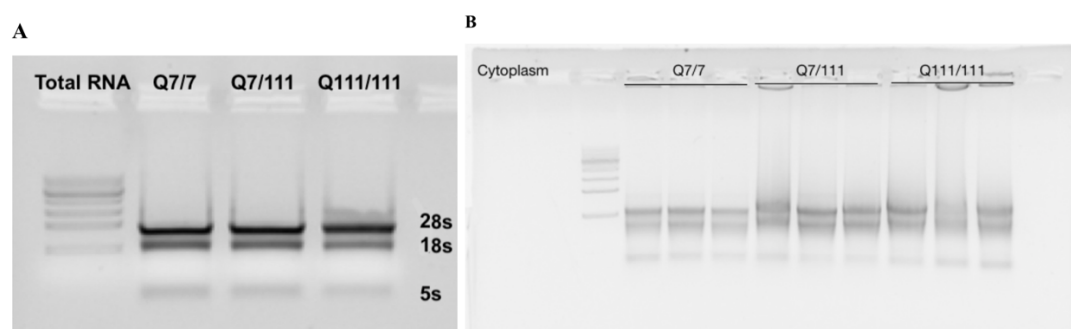


图 7. 总 RNA 抽提电泳结果以及质 RNA 分离后电泳结果

A: 等细胞量的三种神经前体细胞进行总 RNA 抽提并进行琼脂糖凝胶电泳后结果 B: 等细胞量的三种神经前体细胞进行裂解与核质分离，对细胞质单独抽提总 RNA 然后凝胶电泳的结果。每种细胞有三组重复

尽管疾病型细胞 rRNA 稳态丰度以及出核量与野生型细胞相比不存在明显差异，我们仍然希望明确其 RNA 合成和降解（turnover）速度也正常。于是我们使用新生 RNA 标记试剂盒，对三种细胞中 45min（图中未显示）和 90min 内新合成 RNA 进行了荧光标记，阴性对照加入 Actinomycin D 阻断转录。图 8 可以看出，90min 内疾病型细胞新转录出的 RNA 并不少于野生型细胞，并且，由于新转录 RNA 主要存在于核仁，可以看出疾病型细胞核仁数量和形态没有明显异常。

至此，在蛋白翻译减慢的机制上，我们已基本排除了核糖体生成、组装的异常。

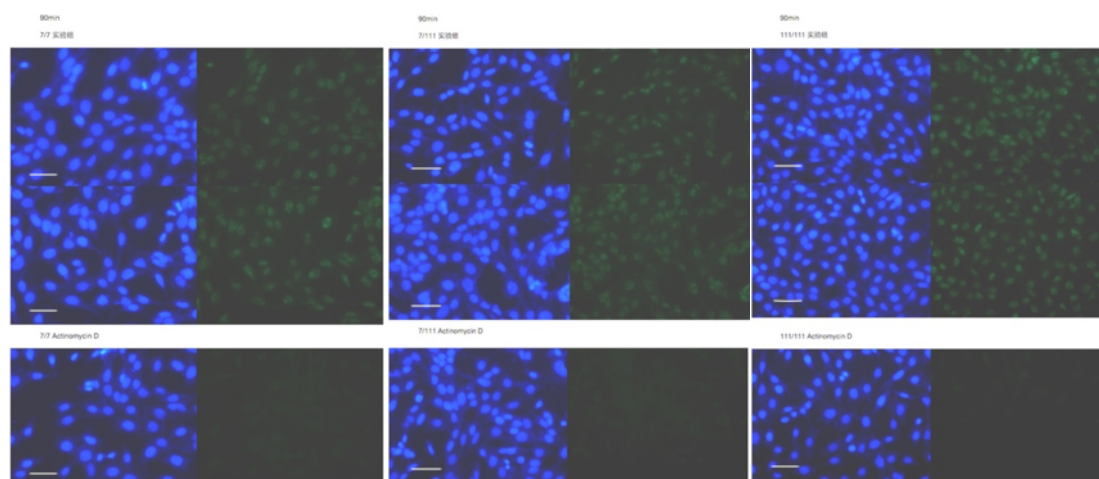


图 8. 细胞新转录 RNA 示踪

三组图分别为 Q7/7, Q7/111, Q111/111 在 90min 内新转录 RNA 标记结果，左边为 DAPI 核染色，右边为标记上绿色（488）荧光基团的新生 RNA，每组的第三对图为加入 Actinomycin D 阻断转录的阴性对照，

Scale Bar: 10 μ m。（实验有潘宇寅参与完成）

2.7 翻译起始相关因子的表达和化合物对亨廷顿病细胞凋亡的影响

在研究导致蛋白翻译减慢的机制的同时，我展开了一系列功能试验，希望恢复（restore）疾病型永生化纹状体神经前体细胞的蛋白合成速度，或者减慢野生型细胞的蛋白翻译速度，分别观察是否挽救了疾病退行表型或者诱发了类似的细胞退行表型。本研究中的三种模型细胞系的重要疾病表型是去血清饥饿下的细胞凋亡。即除去细胞培养条件中的 10%FBS，将培养基换成不含血清但含替代生长因子的 Opti-MEM，野生型细胞（Q7/7）可以正常生存，而亨廷顿病疾病细胞（Q7/111，Q111/111）则将发生凋亡[17]。我们对细胞进行加药或者转染等处理后借助 Caspase-3 荧光染料和长时间动态细胞成像系统，可以得到饥饿一段时间（通常为 48h）内细胞的凋亡水平，以此结果衡量细胞活力。

为了尝试回调疾病型细胞的蛋白翻译速度，我查找文献后总结为三类：过表达翻译相关因子；药物促进翻译相关因子的功能；大分子如亮氨酸、BDNF 促进蛋白合成相关通路。降低野生型细胞蛋白翻译速度的方式更多：敲低翻译相关因子；药物抑制翻译相关因子的功能；药物抑制翻译相关反应的进行。

针对回调蛋白翻译速度，我测试了三种真核起始因子基因和一种靶向 eIF2A 的化合物，发现仅有 eIF4E 的过表达对亨廷顿病模型细胞有挽救作用。如图 9，在三种细胞过表达 eIF4E，两种疾病型细胞的凋亡信号均显著降低，野生型细胞则维持低凋亡水平不变（生物学重复数为 6）。这提示了 eIF4E 的补充表达对亨廷顿病细胞可能有挽救作用。

另外，我用不同浓度的多种翻译起始因子抑制剂处理细胞，均使细胞凋亡加重（未附图）。

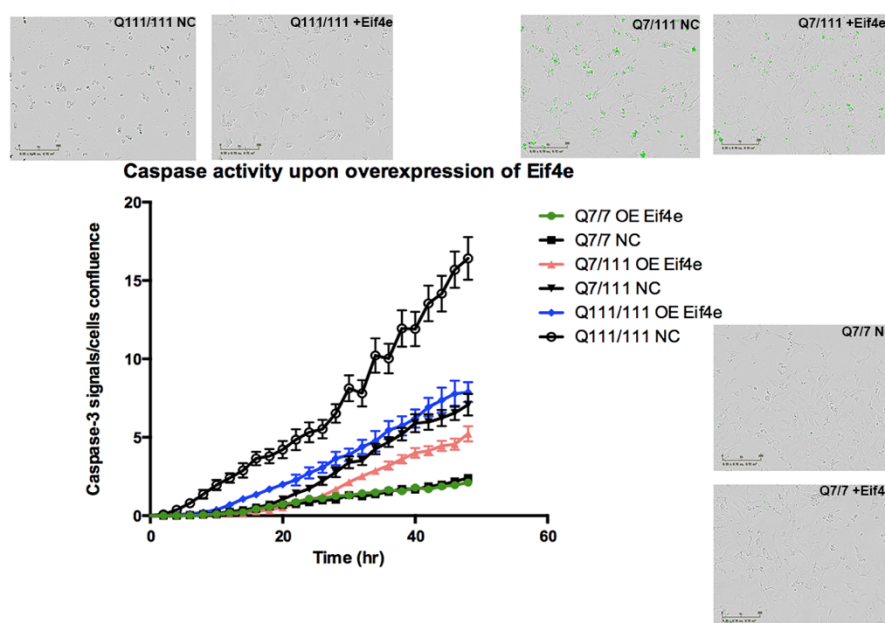


图 9. 过表达 eIF4E 对三种细胞去血清凋亡的影响曲线图与细胞状态照片

曲线图为 Q7/7, Q7/111, Q111/111 与对应过表达 Eif4e 组在去血清饥饿下 Caspase-3 信号的变化曲线。六张图片为六组细胞在同一时刻点的代表性图片，绿色荧光点为 Caspase-3 染色，Scale Bar: 200 μ m

为了进一步研究 eIF4E 对我们的模型细胞的作用，我用 siRNA 敲低了细胞中 eIF4E，siRNA 信息如下：

	sense (5'-3')	antisense (5'-3')
eIF4E-si	GAGCGGCUCCACCACUAAAdTdT	UUUAGUGGUGGAGCCGCUCdTdT

发现 siRNA 转染后 24-72h 进行去血清饥饿已经凋亡信号跟踪，三种细胞凋亡水平均有上升，且野生型 Q7/7 的凋亡水平上升幅度较大，已经接近了 Q7/111 水平。如图 10，对照为 NC siRNA，阳性对照组为敲低 Htt/mHtt，生物学重复数为 4。

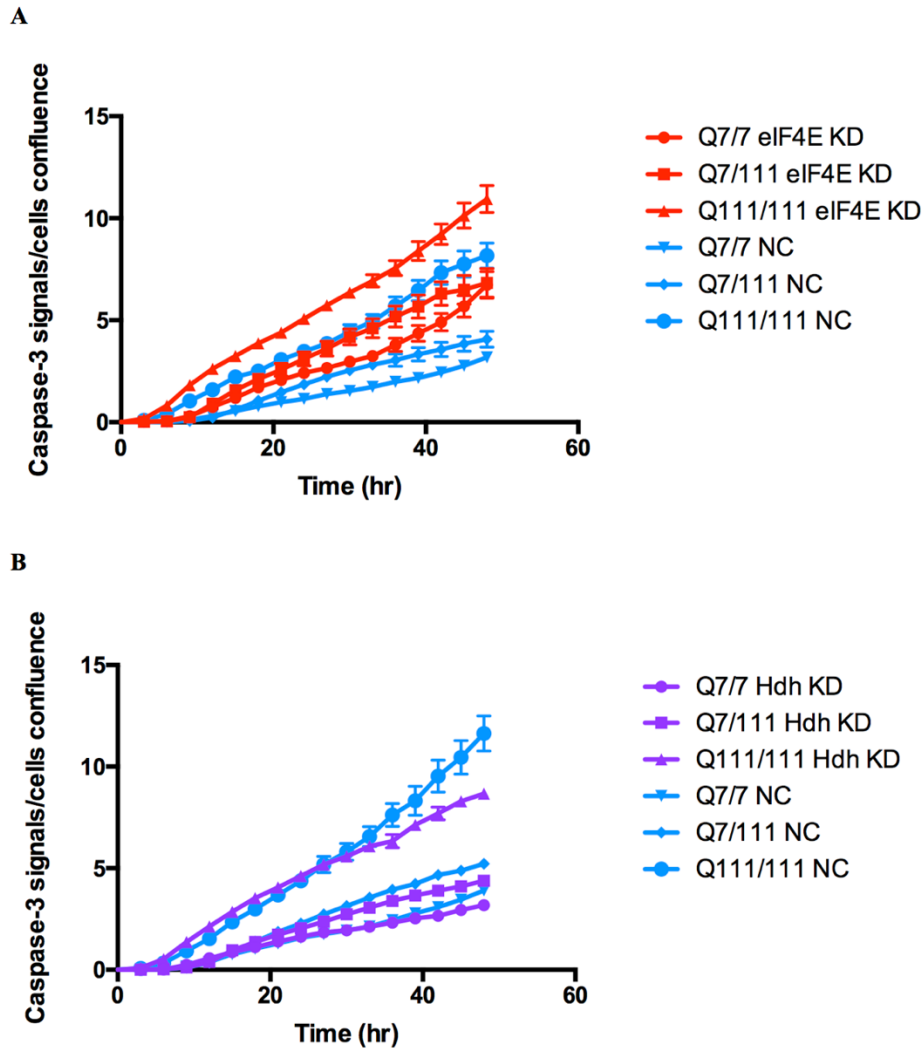


图 10. 敲低 eIF4E 或 Htt/mHtt 对细胞去血清凋亡的影响曲线图

A: 转染 siRNA 敲低 eIF4E 后 24h 开始去血清饥饿并跟踪 Caspase-3 获得的凋亡曲线图，NC 组为转染对应

的 NC siRNA B: 转染 siRNA 同时敲低 Htt 和 mHtt 后 24h 开始去血清饥饿并跟踪 Caspase-3 获得的凋亡曲线图, NC 组为转染对应的 NC siRNA。设置此组目的为验证敲低和去血清凋亡实验的有效性

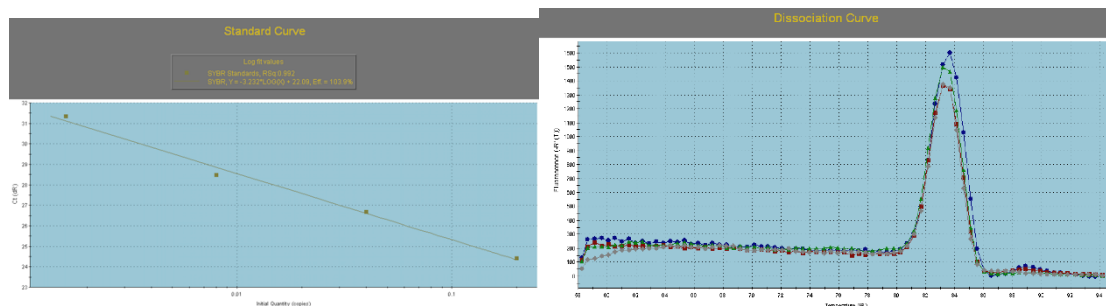
3.8 真核起始因子 4E 在亨廷顿病细胞中的表达水平

由于我们发现 eIF4E 与我们的亨廷顿病永生神经前体细胞的细胞生存能力又重要关联, 于是为了建立功能和机制的联系, 我们首先猜测疾病型细胞中 eIF4E 表达是否被下调。于是我们设计 eIF4E 的 qPCR 引物并对三种细胞内源以及 siRNA 敲低后 eIF4E 水平进行确定。引物信息如下:

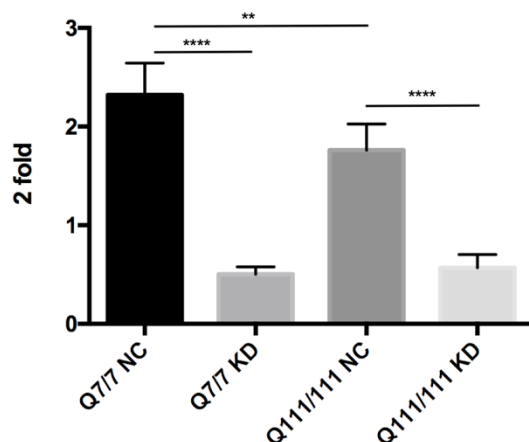
Eif4eqpcr69-F	tgtgaaaacagagatgcagctca
Eif4eqpcr69-R	gcgtgggactgataaccaat

如图 11, 可以看出该引物线性较好, siRNA 敲低 eIF4E 的效率在 80%左右。更重要的结论是, 野生型细胞内源 eIF4E mRNA 水平显著高于两种疾病型细胞 (各组分别为两个生物学重复共六个技术重复, 三个技术性重复)。

A



B



C

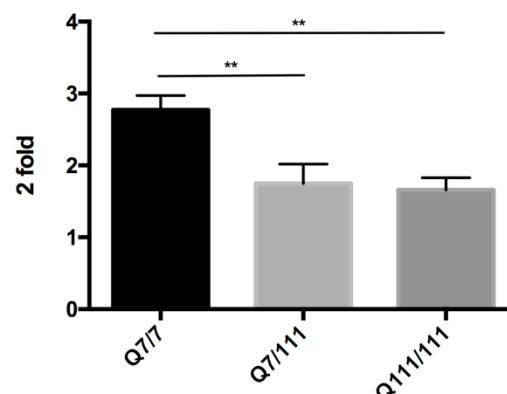


图 11. 三种永生神经前体细胞系中 eIF4E mRNA 相对水平以及 siRNA 敲低效率检验

A: 针对 eIF4E 的 qPCR 引物的标准曲线和熔解曲线 B: Q7/7, Q111/111 细胞以及对应的敲低 eIF4E 48h 的细胞进行 RT-qPCR 的结果, 统计学显著 C: Q7/7, Q7/111 以及 Q111/111 再次进行 qPCR 的结果, 统计学显著。(实验与文学合作完成)

3 结果与讨论

神经退行性疾病是严重影响当代社会而缺少任何根本性治疗手段的一类疾病, HD 作为遗传图景最为明确的神经退行性疾病之一, 在机制及治疗研究方面具有独特优势, 例如具有基因型与表型均与病人吻合的遗传学模型。

尽管如此, 遗憾的是当下 HD 尚无任何根本性治疗手段, 疾病发生及发展机制也不清楚, 我们仍然对这一疾病的致病机理仍然不能拨云见日。也正是因此, 我们难以找到真正治愈疾病的方法。前人研究表明, HTT 很可能通过目前已有证据表明其至少通过脑源性神经生长因子 (BDNF) 的产生和转运、线粒体功能、钙信号、氧化应激、蛋白运输、氨基酸代谢、凋亡信号通路、半胱氨酸合成等多种复杂机制引起神经功能异常或退行。但很少有研究涉及蛋白的翻译系统, 没有研究直接测定细胞总蛋白的合成速度。这正是我们的工作的新颖处和重要意义所在。我们由亨廷顿病翻译错误率出发, 发现了很可能是其上游的变化, 即总蛋白翻译变慢。经过一年的深入研究, 我们可以得到如下结论:

1. 亨廷顿病鼠永生生化纹状体神经前体细胞模型蛋白翻译速度显著且大幅慢于对应野生型细胞。这种差异由突变而过长的 polyQ 蛋白序列的表达导致。这种差异或导致了蛋白质翻译延伸的保真度降低。

2. 从电镜、多核糖体图谱、RNA 新合成速度、细胞核内外总 RNA 定量等实验结果确定, 亨廷顿病细胞中核糖体的生物生成和组装没有明显障碍, 而翻译起始功能有缺陷。

3. eIF4E 在亨廷顿病细胞中转录水平表达偏低, 过表达 eIF4E 可以挽救亨廷顿病细胞去血清饥饿下的凋亡, 相应地, 敲低 eIF4E 会诱发野生型细胞的凋亡。抑制翻译起始的药物在很大浓度范围下都导致神经前体细胞的凋亡。

本课题并没有告一段落: 我们没有在诱导分化的神经元中查看全局蛋白合成速度以及完成 eIF4E 表达对细胞应对去血清饥饿能力的实验, 由于 Eif4e 是一种原癌基因, 在非永生细胞中研究就显得十分重要; 我们尚没有动物模型中拿到结果, 小鼠通过 L-AHA 的饲喂可以做到大脑和全身蛋白被标记, 而验证 eIF4E 是否真的对 HD 有治疗的可能, 下一步也应该对 HD 小鼠注射 AAV 考察脑区神经退休情况和行为学表型。我们没有确定我们看到的差异如此悬殊的全局蛋白合成速度完全来自翻译起始的障碍, 因为多核糖体图谱中 HD 细胞和野生型细胞的差异有限, eIF4E 表达差异也同样没有被完全确定。

尽管如此, 我们课题的推进和已有结果是让人激动和充满展望的。三种 STHdh 细胞系增殖速度差异不大, 尤其是 Q7/7 与 Q7/111, 增殖速度十分接近, 但全局蛋白合成速度出现接近 8 倍的差异, 且经过反复的重复依然有一致的结论, 这足以让人印象深刻。在背后的机制

探索中，虽然我们花了许多实验最终排除了核糖体生成组装的障碍这一重要可能，但也使真正机制看上去更加复杂甚至不为前人了解了。我们认为翻译起始障碍会是机制之一，但不一定是全部的原因，因为过表达 eIF4E 对 HD 细胞蛋白合成速度的回调有限（图片未展示），且 HD 细胞与野生型细胞多核糖体图谱差异称不上非常鲜明。我们还一直在研究其他的可能，如 mRNA 甲基化修饰，翻译核糖体的固着（有丝分裂期全局蛋白合成抑制的机制），tRF-Leu-CAG 水平，核糖体亚基桥（ribosomal subunits' bridge）形成等等。但可以想见真正的机制可能是多因素共同作用的，或者是一个十分有力且崭新的减慢总蛋白翻译的途径。在功能上，我们确定表达 eIF4E 对 STHdh 细胞的病理表型挽救非常可靠，而敲低 eIF4E 对野生型细胞造成更严重的影响也符合我们的预期。我相信就算 eIF4E 不能解释全部的蛋白翻译速度变化，但作为调控蛋白组的重要因子[11]，它仍然作为可能的疾病挽救的提示和策略而具有重大的意义。例如转录谱中 HD 细胞 eIF6 等表达有异常，eIF4E 或许能通过影响或者补偿这些基因的功能挽救发挥细胞疾病表型的作用。

作为几乎第一项将亨廷顿病和蛋白质翻译连结起来的研究，我希望接下来能够有更加深入的进展，希望研究的发现和结论最终能够给我们对亨廷顿病机制的认识和亨廷顿病的治疗策略提供重要意义。

参考文献

- [1] Walker FO. Huntington's disease. *Lancet*. 369: 218-28 (2007).
- [2] Bates G. *et al*. Huntington's disease: a historical background. P H, Editor. Oxford University Press, 3rd ed, (2002).
- [3] M. Flint Beal. *et al*. Experimental therapeutics in transgenic mouse models of Huntington's Disease, *Nature Reviews*. 5:373-384 (2004).
- [4] Gutekunst CA. *et al*. Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci*. 19: 2522-34 (1999).
- [5] Behrends C. *et al*. Chaperonin TRiC promotes the assembly of polyQ expansion proteins into nontoxic oligomers. *Molecular cell*. 23: 887-97 (2006).
- [6] Schaffar G. *et al*. Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: mechanism of transcription factor deactivation. *Molecular cell*. 15: 95-105 (2004).
- [7] Leitman J. *et al*. Soluble forms of polyQ-expanded huntingtin rather than large aggregates cause endoplasmic reticulum stress. *Nat Commun*. 4: 2753 (2003).
- [8] Li X. *et al*. Aberrant Rab11-dependent trafficking of the neuronal glutamate transporter EAAC1 causes oxidative stress and cell death in Huntington's disease. *J Neurosci*. 30: 4552-61 (2010).
- [9] Guo X. *et al*. VCP recruitment to mitochondria causes mitophagy impairment and neurodegeneration in models of Huntington's disease. *Nat Commun*. 7: 12646 (2016).

- [10] Yun Li. *et al.* Global Transcriptional and Translational Repression in Human- Embryonic- Stem-Cell-Derived Rett Syndrome Neurons. *Cell Stem Cell*. 13: 446–458 (2013).
- [11] J. Wade Harper. *et al.* Proteome complexity and the forces that drive proteome imbalance. *Nature*. 537: 328-338 (2016).
- [12] Sarah Jesse. *et al.* Ribosomal transcription is regulated by PGC-1alpha and disturbed in Huntington's disease. *Scientific Reports*. 7: 8513 (2017).
- [13] Qian Zhang. *et al.* A peptidyl inhibitor for neutralizing expanded CAG RNA- induced nucleolar stress in polyglutamine diseases. *RNA*. 24: 486-498 (2018).
- [14] Brady P. Culver. *et al.* Proteomic Analysis of Wild-type and Mutant Huntingtin- associated Proteins in Mouse Brains Identifies Unique Interactions and Involvement in Protein Synthesis. *JBC*. 287:21599–21614 (2012).
- [15] Bijoyita Roy. *et al.* Ataluren stimulates ribosomal selection of near-cognate tRNAs to promote nonsense suppression. *PNAS* 2016; 113:12508–12513
- [16] Fan Y. *et al.* Heterogeneity of stop codon readthrough in single bacterial cells and implications for population fitness. *Mol Cell*. 67:1-11 (2017).
- [17] Flavia Trettel. *et al.* Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STHdhQ111 striatal cells. *Human Molecular Genetics*. 9:2799–2809 (2000).

后记（或致谢）：

复旦的生命科学学院是我高二开始向往的象牙塔。三年生科人时光与三年实验室生涯平行等长，我很幸运目前来看并没有辜负我的初心。这一路我要感谢许许多多的人，感谢许许多多的际遇。

笔行至此，我首先要感谢我的导师鲁伯坝教授。三年前的七月底第一次在暑期课程中接触鲁老师的课题组，当时的我对未来的生涯充满迷茫，对生物学科研几乎一无所知。鲁老师和助教老师对我给予了肯定，并接纳我成为实验室的一员。鲁老师在学业规划上给我很多很多帮助，在科研规范上给了我很多很多帮助，在我展开课题研究的过程中，不断给我指导，与我进行不断的交流。没有鲁老师，我不会取得这些科研的阶段性的成就，更不会成长为现在的我。十年树木，百年树人，我将铭记老师的教导，不辜负老师的期望，假以时日，回报老师的栽培和灌溉。

我要感谢我的师兄潘宇寅和文学。尤其是潘宇寅师兄，他在我的主要课题中长期作为我唯一合作者，与我交流，分工，共享，他是一名热情勤奋的年轻科研工作者。而文学师兄，接手了我剩余的工作，并且在 RT-qPCR 等实验上指导和协助我。

我要感谢 UT Health Science Center 的 Jiqiang Ling 教授和中科院生物物理所张晓荣研究员，他们对我的课题有直接的合作或指导。

我要感谢实验室其他成员，如付玉华博士，宋海坤，于梦博士，吴鹏，李贺轩，感谢他们对我作为实验室成员的接纳和指导；感谢生命科学学院的其他老师，蔡亮老师，林金钟老师，王永明老师，王敬强老师对我和我的课题工作给予的帮助。

我要感谢我的父母，他们给予了我生活和接受教育的机会，以及对我出国深造的全力支持。

我要感谢我的学伴和朋友们，尤其是王子悦，叶宣伽，侯嘉文等同学，他们对我的初进实验室和本科课程上给予了热情的帮助。

我要感谢生科院开设的 BIOS 课程和 AIBS 课程，尤其感谢基础学科拔尖计划，它一直陪伴我资助科研的整个过程。感谢复旦望道本科生资助项目，它正好与我自招进校时的望道计划项目同名。

我要感谢其他许许多多给我提供过实质和精神帮助的人们，感谢复旦生科院对我的培养和教育。我已经确定出国攻读 PhD，我将带着老师的期望和复旦精神，继续科研之路，继续人生之路。

情由衷生，意遣笔端，想以一首《水龙吟》作为这篇毕业设计的结尾，给未来的年月、停驻此地的人留一个回味的念想，给已逝的时光、必须向前的少年一个带笑的致意。

总将泪忍樽前，且歌几阙黄昏雨。月沉潮涌，星疏云坠，参商相负。别久天涯，相逢千种，终归歧路。捧卷敲玉子，年光过眼，回风笑、卷残句。

偏向暮烟凋树，叶旋旋、堕入愁雾。棠花飘砌，一夕秋变，惊鸿难遇。皎月薄情，照人易醒，起生无趣。未若恋江柳，飘然如旧，不辞霜露。

指导教师评语

本论文从蛋白质翻译错误出发，揭示了(CAG)_n 扩增引起的翻译速度降低，并初步分析了其机制。该论文创新性强，研究系统深入，是优秀的本科生论文。

指导教师：鲁伯坝

答辩委员会评语

冯欣然同学的论文研究了(CAG)_n 重复序列对蛋白翻译影响的机制。论文选题紧扣学科前沿，结果丰富可靠，为进一步了解其机制提供了有益的线索和基础。答辩过程中表达清晰，回答问题切题。答辩委员会一致认为这是一篇较优秀的论文，建议通过答辩并授予学士学位。

答辩委员会姓名

鲁伯坝 丁颢 薛磊 俞洪波