

本科毕业论文



论文题目:神经包涵体疾病(NIID)模型建立与致病蛋白降解机制探索

- 姓 名:罗寅堃 学 号: 20307110177
- 院 系: 生命科学学院
- 专 业: 生物科学
- 指导教师:鲁伯埙 职 称:研究员
- 单 位:复旦大学生命科学学院
- 完成日期: 2024 年 5 月 17 日

神经包涵体疾病(NIID)模型建立 与致病蛋白降解机制探索

完成人 罗寅堃

指导小组成员 鲁伯埙 教授

摘要
Abstract Il
一、前 言 1
1.1 研究背景1
2.1 立题依据及研究主要内容 3
二、材料与方法 4
2.1 实验材料与仪器 4
2.2 试剂5
2.3 实验方法6
三、研究结果
3.1 NOTCH2NLC 型神经元包涵体病质粒的设计与扩增 10
3.2 NOTCH2NLC 型神经元包涵体病细胞模型的构建与验证10
3.3 NOTCH2NLC 型神经元包涵体病果蝇模型的构建15
四、讨论
参考文献
致谢

摘要

神经远核内包涵体病(Neuronal Intranuclear Inclusion Disease, NIID)是一种 神经退行性疾病,该疾病患者的典型病理征状是在其神经系统、内脏器官或皮肤 组织等组织细胞中出现广泛的嗜酸性核内包涵体。其中 NOTCH2NLC 中的 GGC 片段重复在 2019 年被鉴定为 NIID 的一种致病原因,但其调控机制尚不清楚。本 论文使用 293 细胞系建立 NOTCH2NLC 型 NIID 的细胞模型,通过蛋白质免疫印 迹和免疫荧光染色的方法对该细胞模型中表达出的 NOTCH2NLC-(GGC)98 蛋白 进行检验,确定了细胞模型中 polyG 聚集体的产生。利用此细胞模型,我们还检 测了 polyG 蛋白质的降解途径,在对该细胞进行免疫荧光染色我们发现 polyG 聚集体与 p62 和泛素存在共定位,确认细胞模型中的 polyG 蛋白的降解与自噬 和蛋白酶体途径均有关。此外,本论文还使用 GAL4/UAS 系统建立了在果蝇中 枢神经系统中表达 polyG 聚集体的果蝇模型。

根据上述的实验结果,NOTCH2NLC型 NIID 中 polyG 蛋白的调控与自噬高度相关,因此利用上述建立的细胞与果蝇模型从自噬通路角度出发进行研究可以进一步筛选出 polyG 致病蛋白的调控基因,而这可以加深我们对于该疾病分子机制的理解,有助于推进该疾病的临床治疗。

关键词:神经退行性疾病,polyG,细胞模型,果蝇模型

Abstract

Neuronal intranuclear inclusion disease (NIID) is a neurodegenerative disorder characterized by the presence of eosinophilic intranuclear inclusions in various tissue cells, including those of the nervous system, visceral organs, or skin. GGC repeats in the *NOTCH2NLC* gene was identified in 2019 as a causative factor for NIID. To gain better understanding of NIID, this work established a cell model of *NOTCH2NLC*-type NIID using the 293 cell line. Protein immunoblotting and immunofluorescence staining were employed to examine the expression of NOTCH2NLC-(GGC)98 protein in this cell model and to detect polyG aggregates. Based on this cell model, we investigated the degradation pathway of polyG protein, and found co-localization of polyG aggregates with p62 and ubiquitin, suggesting the degradation of polyG

protein via the autophagy and ubiquitin-proteosome pathway. Additionally, a *Drosophila* model expressing polyG aggregates in the central nervous system was established using the GAL4/UAS system.

According to the above results, the regulation of polyG protein in NOTCH2NLCtype NIID is highly correlated with autophagy. Therefore, starting from autophagy pathway using the established cell and *Drosophila* models can further screen for regulatory genes of pathogenic polyG protein, deepening our understanding of the molecular mechanisms of this disease and facilitating clinical treatments.

Key words: neurodegenerative disorder, polyG, cell model, Drosophila model

一、前 言

1.1 研究背景

神经元核内包涵体病(Neuronal Intranuclear Inclusion Disease, NIID)又称神 经元核内透明包涵体病(Neuronal Intranuclear Inclusion Disease, NIHID)或核内 包涵体病(Intranuclear Inclusion Body Disease, INIBD),是一种缓慢进展的神经 退行性疾病,该疾病在东亚范围内表现出高发态势。已知该疾病是由于细胞内的 多聚甘氨酸链扩展(polyG)引起的,其特征是患者的中枢、外周和自主神经系 统细胞以及内脏器官细胞中出现嗜酸性透明质核内包涵体^[1]。

NIID 最早在 1968 年被发现于一名儿童时期就患有进行性痉挛和共济失调的 智力迟钝的 28 岁男性中^[2]。在这位患者的整个大脑和内脏器官中广泛存在嗜酸 性粒细胞核内包涵体。患 NIID 的病例中常常包含锥体和锥体外系症状、小脑性 共济失调、痴呆、惊厥、神经病变和自主神经功能障碍等广泛的临床表现^[3,4]。而 在病理学层面,研究者发现患者几乎所有细胞类型均存在嗜酸性粒细胞核内包涵 体。在免疫组织化学上, NIID 中的嗜酸性粒细胞核内包涵体对 p62 和泛素呈现 出共定位的特点^[5]。除此之外,许多成人 NIID 的发病发展表型谱系与帕金森病 与阿尔兹海默症一致^[6–8]。



图 1 NIID 患者中的大脑损伤(左)与核内包涵体电镜图像(右)^[2]

NIID 作为一种常染色体显性遗传病^[9],具有另一特征——即 NIID 在东亚人 群中高发,Sone 等人在 2002 报告了 2 个没有血缘关系的日本大家庭中至少跨越 2 代的多人患有 NIID;研究者在长达十几年的时间内报道了大量来自日本的 NIID 病例^[10-15]; Tian 等人在 2019 报告了 9 名 NIID 患者^[16]。大量文章中有关 NIID 的报道似乎都仅出现在中国、日本或马来西亚及相关族裔的人群中。因此, NIID 的发病机制似乎具有一定的种族差异性。

在 2019 年,由 Hiroyuki Ishiura 等人鉴定出 NIID 的致病基因之一是非编码 GGC 扩增后的 NOTCH2NLC^[17,18]。2021 年由 Boivin, Manon 等人确定 NIID 致病 蛋白是由 GGC 翻译出的多聚甘氨酸^[19]。NOTCH2NLC 属于三个 NOTCH2 N 端样 (NOTCH2NL) 旁系同源物 (NOTCH2NLA、NOTCH2NLB 和 NOTCH2NLC) 之 一,它们仅在人类基因组中发现。从进化上讲,NOTCH2NL 基因来源于 NOTCH2 的基因复制和基因转化,仅在人类物种的皮质神经发生中发挥作用。遗传分析表 明,NOTCH2NLC 中致病性 GGC 重复的程度范围约为 60 至 500 次^[20,21],该 GGC 重复会在生物的细胞中产生具有神经元毒性的聚甘氨酸 (polyG)、聚丙氨酸 (polyA) 或聚精氨酸 (polyR),从而引发退行性神经疾病^[16]。

在 2022 年来自中南大学的唐北沙团队构建了第一个表达 NOTCH2NLC 基因的外显子 1,具有扩展的 GGC 重复序列转基因小鼠模型^[22]。在这种小鼠模型中, NOTCH2NLC 中的 GGC 重复扩增通过 AUG 依赖性翻译产生了多种多肽(polyG、 polyA 或 polyR 的蛋白质),这些多肽导致了神经元毒性。NOTCH2NLC 型 NIID 的小鼠表现出严重的神经退行性变、运动功能障碍和认知缺陷,忠实地再现了与 NIID 相关的临床和病理特征。他们也发现 NIID 疾病模型中出现了选择性剪接 事件的改变。被称为选择性剪接调控因子的 RNA 结合蛋白 hnRNPM 被 NOTCH2NLC 中的 GGC 重复扩增的 polyG 蛋白质相互作用,并在细胞核中隔 离,继而引发选择性剪接事件的改变^[22,23]。

NIID 中的 polyG 聚集体在免疫组织化学层面既与泛素又与 P62 存在共定位的现象,因此 NIID 中 polyG 致病蛋白的清除或许同时与自噬途径和蛋白酶体途径有关。同时,大量的 GGC 重复片段作为 CpG 岛存在于细胞的基因组中,而 CpG 岛会导致 DNA 甲基化的发生,或许会在表观遗传的层面对 polyG 致病蛋白的翻译造成影响^[24];GGC 重复同时也会对 DNA 复制时形成的复制叉结构造成影响,或许也会导致 GGC 片段重复的数量在遗传过程中造成差异^[25,26]。目前尽管已有的研究已经鉴定出 *NOTCH2NLC* 第一外显子中的 GGC 片段重复翻译出的 polyG 蛋白造成 *NOTCH2NLC* 型 NIID 的发生,但对于 NIID 中 polyG 致病蛋的

2

降解等途径目前仍缺乏足够的了解,因此建立更加符合疾病状态的更多 NIID 模型有利于我们更全面地研究 NIID 的致病机制与 polyG 蛋白的调控机制。

1.2 立题依据及研究主要内容

由于 NIID 的致病原因是由于 NOTCH2NLC 中非编码 GGC 扩增导致的,该 基因仅在人类基因组中出现,并且仅在人类皮质神经的发生中发挥作用。目前报 导的小鼠模型在较早发育阶段就已死亡^[19],因此该构建模型难以模拟疾病在人 类中的致病情况,同时,采用 CRISPR 对该疾病的调控基因进行筛选需要对小鼠 进行大量遗传操作,难度大且成本过高。因此本项目将采在 293 细胞系中转入非 编码 GGC 扩增的 NOTCH2NLC 基因构建细胞模型。同时,本项目也将利用 GAL4/UAS 系统,在果蝇的中枢神经系统中复现 NIID 的表型,以构建 NIID 的 果蝇疾病模型。

二、材料与方法

2.1 实验材料与仪器

2.1.1 实验材料

HEK293 细胞

GMR57C10-GAL4 果蝇

UAS-GFP 果蝇

UAS-NOTCH2NLC-GFP 果蝇

UAS-polyG-GFP 果蝇

DH-5a 感受态细菌

2.1.3 实验仪器

表1	实验仪器列表
1X I	大型以前の収

组成	公司
倒置荧光显微镜	Zeiss
CO2 培养箱	Thermo Fisher Scientific
超低温冰箱	Thermo Fisher Scientific
-20°C冰箱	美菱
低温高速离心机	Eppendorf
低速台式离心机	湘仪
低温高速离心机(大容量台式)	Eppendorf
蛋白质电泳仪	Invitrogen
蛋白质转膜仪	Invitrogen
接触式化学发光成像仪	e-Blot
细胞计数仪	Thermo Fisher Scientific
移液枪	Eppendorf

正置荧光共聚焦显微镜	Leica
倒置荧光共聚焦显微镜	Zeiss
净水装置	Millipore
摇床	Dlab
金属浴	Dlab
多模式微孔板检测仪	EnVision
超净工作台	Hamilton Scientific
体视镜	Motic
摩天轮式旋转混匀仪	Kylin-Bell
恒温培养箱	一恒

2.2 实验试剂

表 2 实验试剂列表		
组成	公司	
LB 培养基	自配	
活细胞计数染料	Thermo Fisher Scientific	
10% DMEM	Thermo Fisher Scientific	
TryPLE 胰蛋白酶	Glico	
PBS 缓冲液	自配	
果蝇解剖盘	Dow	
DAPI	碧云天	
无内毒素质粒抽提试剂盒	Tiangen	

Lipofetamine 2000 转染试剂	Thermo Fisher Scientific
TBST 缓冲液	雅酶
MOPS 电泳缓冲液	Invitrogen
防淬灭封片液	碧云天
防淬灭封片液(含 DAPI)	Thermo Fisher Scientific
显影液	圣尔生物
iBlot 3 转印膜组	Invitrogen
SDS-PAGE 预制胶	Invitrogen

表 3 实验抗体列表

抗体类型	公司
Anti-GFP	ProteinTech
Anti-Ubiquitin	ProteinTech
Anti-SQSTM1	Abcam

2.3 实验方法

2.3.1 细胞培养与转染

细胞使用 10%DMEM 进行培养,在 T75 中扩增培养。传代时使用 TryPLE 胰 蛋白酶进行消化。消化后进行 1200g, 3min 进行离心。而后加入 10%DMEM 重 悬细胞,而后取 10µl 细胞重选液进行细胞计数,根据细胞数量进行传代。

先将培养好的细胞分装至 6 孔板,每个孔中 2 mL 细胞培养液,每株细胞 3 个平行组。将培养基、脂质体、质粒三种成分按照一定比例混合: Opti-MEM 培养基 200 μL、Lipo 2000 5 μL、质粒 (2000/C) μL。混合后,放在室温 25 °C,15 min 左右,使得脂质体完全包裹质粒。

将孵育好的脂质体混合物取出,利用移液枪吸取 200 μL 加入到 2 mL 的细胞 培养液中。脂质体需要分次滴加到培养液中,滴加完毕后进行水平和垂直方向轻 轻晃动培养液,使其与细胞培养液混合均匀。加入脂质体培养 8 小时后需要尽快 换液。如果是用于荧光显微镜成像则培养 48 小时,如果是用于分离纯化蛋白则 需要培养 72 小时。

2.3.2 果蝇的培养与杂交

GAL4/UAS 系统是果蝇中一种常用的遗传工具,用于进行基因表达的定向控制。这个系统包括两个主要组成部分:GAL4 转录因子和 UAS 响应元件。 GAL4 是一种源自于酵母的转录因子,能够结合到 UAS 响应元件序列上,激活 下游的基因的转录。通过将 GAL4 转录因子与研究的目的组织与细胞类型相关 联,将 UAS 序列与要研究的基因相关联,可以实现对该基因在特定组织或细胞 类型中的定向表达。GAL4/UAS 系统在果蝇模型的建立中被广泛应用,因为相关 基因的表达具有高度的空间和时间分辨率。

GMR57C10-GAL4 果蝇为实验室保有的果蝇,*GMR57C10*-GAL4 的目的是为 了在果蝇的中枢神经系统中表达目的基因。UAS-GFP 果蝇、UAS-NOTCH2NLC-GFP 果蝇和 UAS-polyG-GFP 果蝇来自于北京大学第一附属医院王朝霞课题组^[27]。 果蝇在 25℃培养箱中培养,相对湿度维持在 60%并保持 12h 的光照与 12h 的黑 暗环境。培养果蝇使用的培养基为玉米淀粉培养基。

果蝇处女蝇在每日进行挑取,判断处女蝇的标准为果蝇的形态与腹部未排出 胎粪。将处女蝇与相应的果蝇品系进行杂交。在杂交后,根据果蝇平衡染色体上 携带的标记基因基因对表达目的基因的果蝇进行挑选。解剖果蝇幼虫时挑选果蝇 三龄幼虫,果蝇的三龄幼虫会从玉米淀粉培养基中爬至管壁上,同样根据标记基 因的特征进行筛选。

2.3.3 蛋白质免疫印迹

将细胞以 25w/ml 的密度培养在六孔板中,而后每孔加入 500µl TryPLE 胰蛋 白酶处理 5min 将细胞悬浮。在悬浮细胞后,收集悬浮液到 1.5ml EP 管中,每个 空再加入 500µl PBS 清洗收集剩余细胞。将收集到的细胞悬浮液在离心机中以 12000g 离心 2min,弃去上清即为所需细胞样本。然后向细胞样本中加入 100µl

RIPA 裂解液(己加入 PSMF 蛋白酶体抑制剂及超级核酸酶)裂解细胞,冰上静置 30min。裂解完成后将细胞裂解液进行超声处理,处理后再将细胞裂解液使用离心机进行 12000g 离心 2min,使得裂解后剩余的 DNA 集中在管底的沉淀中。而后取上清进行 BCA 处理。

将所有的细胞裂解样品取 8µl 加入 96 孔板中用 PBS 进行 10 倍稀释,再将 BSA 标准蛋白溶液按照浓度梯度以 80µl 的体系加入六孔板中,而后使用电排枪 将每个 80µl 的体系转移到 3 个平行孔中,每孔 20µl。将以上取 BCA 工作液 A 液 与 B 液按 50: 1 的比例混合均匀,在每个平行孔中加入 200µl 混合后的 BCA 工 作液,在 37℃培养箱中反应 30min 后使用超灵敏度酶标仪中测定 A560nm,并通 过标准曲线与样品吸光度来测量蛋白质的浓度。

根据蛋白浓度,使用占总体系 35%的 LDS+DTT 和水将蛋白浓度标平,而后在 95℃金属浴中煮样 10min 使得蛋白质可以以蛋白质单体的形式存在于体系中,保障跑胶结果。

将完成煮样的样品按照 15µl/孔的量加入 SDS-PAGE 预制胶(Invitrogen 公司 NuPAGE Bis-Tris 4%-12%),使用 MOPS Running Buffer 作为电泳缓冲液,以电 压 120V 进行 90min 电泳。

在电泳完成后,将 SDS-PAGE 胶取出,使用 iBlot3 Western Blot 转印系统进 行转膜,以 22V 电压进行转膜 7min,使得蛋白条带转移到硝酸纤维膜上。在转 膜后,使用 5%脱脂牛奶对硝酸纤维膜进行封闭 30min,使得抗体不易与膜结合 降低背景。完成封闭加入一抗,过夜孵育。完成孵育后,回收一抗,并使用 TBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 5min。而后加入二抗在室温下进行孵育 1h,而后使用 TBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 5min。使用显影液与定影液以 1:1 混合,浸湿膜 纸,进行显色拍照。

2.3.4 免疫荧光染色

将圆形盖玻片放置在 12 孔板中,以 3w/孔的浓度培养细胞。取出 12 孔板弃 去培养基,用 500μL 1×PBS 轻轻清洗细胞一遍,弃去;每孔加入 500μL 4%多聚 乙醛溶液(PFA)或细胞固定液固定细胞,固定 10 min;吸走 PFA,并用 1×PBS 清洗细胞后弃去;每孔加入 500μL 0.5% Triton X-100 处理 10min,穿透细胞膜和 核膜;每孔加入 500µL 4%牛血清白蛋白 (BSA) 溶液孵育 30min,进行封闭 (可 以不用洗,弃去就行);一抗按 1:200 溶解于 4% BSA 溶液中,加入配置好的一 抗溶液,4℃孵育过夜;用 1×PBS 清洗细胞后弃去;加入二抗 (4% BSA 配置), 继续孵育 1h,完整过程中需要注意避光;用 1×PBS 清洗细胞 3 次对于需要对细 胞核染色的材料加入 DAP1 染料染色 5min;用 1×PBS 清洗细胞 2 次;在载玻片 上滴一小滴封片剂 (棕色瓶)。利用针头将 12 孔板中制备好的盖玻片取出,反向 扣在载玻片上,使细胞面向内。利用指甲油轻轻涂抹在载玻片周围,注意不能挪 动载玻片,否则会导致细胞移动影响实验结果。避光条件下静置 10min,指甲油 凝固后即为封片完成。

果蝇的免疫染色则需要通过解剖果蝇幼虫或成虫将其大脑取出后加入组织 细胞固定液,在转盘混匀仪中固定 35min,弃去固定液,加入 PBST 缓冲液 (PBS 中加入 TritonX-100 配置)清洗 3 次,每次 10min。完成组织处理后,将果蝇幼 虫/成虫大脑附着器官清理干净,而后进行免疫荧光染色与封片 (同细胞)。

三、研究结果

3.1 NOTCH2NLC型神经元包涵体病质粒的设计与扩增

通过查阅文献,我们发现来自中南大学的 Qiong Liu 等人从 NIID 患病者的基因组 DNA 中分别克隆并成功提取了含有 17 个和 98 个 GGC 重复的 NOTCH2NLC 第一外显子片段,并在该致病片段后加上 green fluorescent protein-hemagglutinin (GFP-HA)标记对致病 GGC 重复的翻译产物进行研究。因此我们采用来源于该团队的 NOTCH2NLC-EGFP-HA 质粒,该质粒的 GGC 重复片段会翻译形成 polyG 毒性蛋白。而后我们将该质粒加入感受态细菌,将转入质粒的细菌添加到 LB 培养机中进行震荡过夜培养后使用无内毒素质粒大提试剂盒进行质粒抽提。将抽提后的质粒进行测序与质粒的原本序列一致,说明此次抽提的质粒可以用于后续的实验。

(GGC)_{17 or 98}

图 1. 细胞模型构建质粒主要组成[22]

该质粒采用 pcDNA3.1(+)骨架,使用 CMV 启动子,包含 NOTCH2NLC 的第一外显子 与 GFP 片段,对照组与实验组 GGC 片段重复分别为 17 与 98

3.2 NOTCH2NLC型神经元包涵体细胞模型的构建与验证

3.2.1 NOTCH2NLC型 NIID 的蛋白质免疫印记验证

将抽提获得的 NOTCH2NLC-(GGC)17 与 NOTCH2NLC-(GGC)98 的 NOTCH2NLC 质粒使用 Lipofectamine 2000 转染试剂对 293 细胞进行细胞转染构 建 NOTCH2NLC 型 NIID 细胞模型。在转染完成后 72h 取细胞进行蛋白质免疫印 记,我们分别测定了 NOTCH2NLC-(GGC)17 与 NOTCH2NLC-(GGC)98 细胞模型 中的 polyG 蛋白表达量。我们使用 GFP 抗体作为一抗,在转入了 NOTCH2NLC-(GGC)17 的细胞中检测到其的特异性条带,出现在 35kDa 左右;在转入了 NOTCH2NLC-(GGC)98 的细胞中检测到相应的特异性条带,出现在 40kDa 左右, 如图 2.A 所示。而后,我们采用 siRNA 敲降了 GFP 的表达水平,可见在 40kDa 左右的条带在敲除后消失,因此足以说明该条带为转染成功的目的条带,见图 2.B。



图 2. NOTCH2NLC-(GGC)98 的 SDS-PAGE 分析

A 图中泳道 1 为蛋白质 marker WJ103,各条带分子量如图所示,泳道 2 为 NOTCH2NLC-(GGC)₁₇细胞裂解液,泳道 3 围殴 NOTCH2NLC-(GGC)₉₈细胞裂解液; B.泳道 1 为蛋白质 marker WJ103,各条带分子量如图所示,泳道 2 为 NOTCH2NLC-(GGC)₉₈细胞裂解液,其余泳道为使用 siRNA 敲降 GFP 的 NOTCH2NLC-(GGC)₉₈细胞 裂解液;C图中,泳道 1 为蛋白质 marker WJ103,各条带分子量如图所示,其余 NOTCH2NLC-(GGC)₉₈细胞裂解液;D图中泳道 1 为蛋白质 marker WJ103,各条带分 子量如图所示,泳道 2 为 NOTCH2NLC-(GGC)₁₇细胞裂解液,其余泳道的样品依次采 用强度 40% 10min,强度 60%的 5min、10min,强度 80%的 2min、5min 和 10min 超

声处理

在进一步对 NOTCH2NLC-(GGC)98 的 293 细胞进行蛋白质免疫印记时,我 们发现虽然在使用 GFP 抗体作为一抗时,存在 NOTCH2NLC-(GGC)98-GFP 在 40kDa 处的特异性条带,但是在 SDS-PAGE 凝胶的胶孔泳道存在较强信号,推测 为 polyG 毒性蛋白在细胞内形成了聚集体,而该聚集体的结合过于紧密使得其无法进入蛋白凝胶进行泳动,从而滞留在硝酸纤维膜的上端,见图 2.C。

聚集体蛋白滞留在泳道使得通过蛋白质免疫印迹对 polyG 蛋白的定量无法进行,因此在查阅文献后,在对 α- synuclein 进行蛋白质免疫印迹时研究者常采用 长时间高强度的超声将具有一定黏性的 PFF 以及 polyQ 聚集体打散后进行检测, 因此我们参考此方法尝试对 polyG 蛋白质的蛋白质免疫印记条件进行优化。在尝 试改变转膜条件等不同因素均无结果后,我们尝试改变对细胞裂解液进行处理的 超声强度与时间以及是否对细胞裂解液进行离心处理,来探究该条件是否可以减 少胶孔中滞留的 polyG-GFP 蛋白聚集体量,大量 polyG-GFP 蛋白仍停留在胶孔 中,并未进入蛋白胶,见图 2.D。因此我们难以对在胶孔中滞留的 polyG 蛋白进 行定量分析。因此对细胞模型中的

3.2.3 NIID 细胞模型探究 polyG 蛋白降解途径

蛋白酶体途径和自噬途径是细胞内两个主要的蛋白质降解途径,它们在维持 细胞内环境稳态和蛋白质质量控制中发挥着关键作用。蛋白酶体途径可以通过泛 素连接酶将蛋白质泛素化,然后通过蛋白酶体将这些蛋白质降解。自噬途径则是 形成自噬小体来包围细胞内的蛋白质、细胞器和其他大分子,在与溶酶体结合后 降解这些生物分子。这两种途径发生功能障碍会导致细胞内毒性蛋白的积累,与 神经退行性疾病的发展密切相关。

在通过多次实验确认了 98G-GFP 蛋白质条带的位置与其通常残余在胶孔中的特点,我们使用 MG132、EPO 两种通过抑制蛋白酶体功能的蛋白酶体途径抑制剂,BafA1、CQ 和 NH4Cl 三种自噬抑制剂,其中 BafA1、CQ 抑制自噬小体与溶酶体结合,NH4Cl 抑制溶酶体酸化与 NOTCH2NLC-(GGC)98 进行处理,在进行免疫蛋白印迹实验后我们得到如下图结果:;而 CQ、BfA、NH4Cl 阻断 NOTCH2NLC-(GGC)98 的降解的效果强于 MG132 和 EPO。从结果来看,使用蛋白酶体抑制剂对细胞中 NOTCH2NLC-(GGC)98 蛋白质的降解存在一定影响,同样使用自噬抑制剂对 NOTCH2NLC-(GGC)98 蛋白质的降解存在一定影响,同样使用自噬抑制剂对 NOTCH2NLC-(GGC)98 处理后可见 NOTCH2NLC-(GGC)98 蛋白质的含量有显著增加。此外,部分样品在 35 到 40kDa 的出现了两个条带出现,或许是 polyG 蛋白存在磷酸化或一些赖氨酸的乙酰化修饰等情况,可以进行更进一步的探究。由此结果,我们可以推测 NOTCH2NLC-(GGC)98 蛋白质可能更

依赖自噬途径进行降解,NIID 中 polyG 蛋白的调控基因或许与自噬存在关联。 自噬途径中的部分基因对 polyG 蛋白存在一定的调控作用。但是由于蛋白酶体抑 制剂与自噬抑制剂对于细胞正常生理过程的影响机制各不相同,因此仅仅采用抑 制剂干预无法完成对 polyG 蛋白真正的降解途径进行解释。后续实验需要在 ATG 等自噬基因敲除的细胞系中进行检测或通过 Cycloheximide (CHX)处理来对 polyG 蛋白降解途径进行进一步探究。





泳道中均为的 NOTCH2NLC-(GGC)₉₈ 细胞裂解液; DMSO 处理为对照组, MG132 与 EPO 为蛋白酶体抑制剂, BfA1、CQ 与 NH4Cl 为自噬抑制剂, 所有处理时间均为 24h, 蛋白免疫印迹使用抗体为 GFP 抗体

3.2.2 NOTCH2NLC型 NIID 的免疫荧光染色验证

在 NIID 患者的病理组织切片中, NIID 中的嗜酸性粒细胞核内包涵体对 p62 和泛素呈现出共定位的特点,已发表文献中的免疫荧光染色结果也表明 NOTCH2NLC-(GGC)₉₈中的聚集体与 p62 和泛素存在共定位的现象。我们还对该模型细胞进行了免疫荧光染色,以验证该细胞模型是否能够成功地还原正常状态下的疾病表型。首先,为了验证 NOTCH2NLC-(GGC)₉₈ 的 293 细胞是否会形成聚 集体,我们制作了该细胞类型的爬片,并在 DAPI 染色细胞核后使用共聚焦显微 镜对其进行了拍摄。在荧光图片中,我们可以观察到 NOTCH2NLC-(GGC)₉₈ 293 细胞中存在亮度较高的绿色荧光信号,并且在细胞中呈现出聚集体的形式。而在 NOTCH2NLC-(GGC)₁₇ 293 细胞中绿色荧光呈现出弥散分布,且总强度较弱,见 图 3。因此,该 NOTCH2NLC-(GGC)₉₈ 293 细胞忠实的再现了 NOTCH2NLC 型 NIID 中出现的聚集体。但是从图中可以观察到的是,NOTCH2NLC-(GGC)₉₈ 293 293 细胞中 polyG-GFP 聚集体的绿色荧光信号与 DAPI 信号并无共定位信号,聚集体 出现在细胞核周围而并未入核。该聚集体细胞定位的表型与实际疾病中核内包涵 体聚集体出现的细胞定位并不一致,因此该细胞模型并未完全反应 NIID 中的核 内包涵体表型。



图 4. NOTCH2NLC-(GGC)98 细胞的荧光定位分析

上为 NOTCH2NLC-(GGC)₁₇在 DAPI 染色后的荧光图像,下为 NOTCH2NLC-(GGC)₉₈在 DAPI 染色后的荧光图像,其中箭头所指为 NOTCH2NLC-(GGC)₉₈形成的 polyG 聚集体,

标尺长度为 20µm

在检验 NOTCH2NLC-(GGC)98 细胞中 GFP 的聚集情况后,我们针对 NIID 患 者细胞中核内包涵体与 Ubiquitin、P62 共定位的组织学特点进行进一步验证。我 们使用 Ubiquitin 与 P62 的一抗对 NOTCH2NLC-(GGC)17 和 NOTCH2NLC-(GGC)98 分别进行了免疫荧光染色,而后使用 DAPI 对细胞核进行染色。染色结 果表明,polyG 聚集体的形成在某种程度上导致了泛素与 p62 的聚集,其中 p62 与 polyG 的聚集体存在较为明显的共定位,这与文献中的内容一致,也说明了 polyG 蛋白质的聚集对蛋白酶体与自噬途径均存在一定程度的影响。



图 5. NOTCH2NLC-(GGC)98 细胞的泛素与 p62 免疫荧光染色结果

上图为 NOTCH2NLC-(GGC)₁₇ 和 NOTCH2NLC-(GGC)₉₈ 抗泛素染色结果,放大部分为 polyG 聚集体与泛素共定位;下图为 NOTCH2NLC-(GGC)₁₇ 和 NOTCH2NLC-(GGC)₉₈ 抗 p62 染色结果,放大部分为 polyG 聚集体与 p62 共定位部分,标尺长度为 20µm

3.3 NOTCH2NLC 型神经元包涵体果蝇模型的构建

3.3.1 GAL4/UAS 系统在果蝇中枢神经系统中表达 NIID 致病基因

在查阅文献时,我们发现来自北大医院神经内科的王朝霞团队将 NOTCH2NLC GGC 重复微卫星序列在对照条件下嵌入到 AUG 启动的短 uORF 编码中,他们使用上游活性序列 GALactose 调节的上游启动子元件 (GAL4/UAS)系统在果蝇中分别表达绿色荧光蛋白(GFP)对照组、uN2C-GFP 和 uN2CpolyG-GFP 实验组^[27]。他们构建了在果蝇视神经中表达 NIID 表型的果 蝇模型。但是,该果蝇模型中的 polyG 聚集体仅在果蝇的视神经系统中表达。

果蝇的中枢神经系统是研究生物学和神经科学的经典模型之一。蝇脑分为许 多区域,包括视觉中枢、嗅觉中枢、运动控制区等。视觉中枢处理来自复眼的视 觉信息,嗅觉中枢负责处理来自感觉器官的气味信息,而运动控制区则控制果蝇 的运动和行为。果蝇中枢神经系统中的蘑菇体是与学习和记忆密切相关的结构。 蘑菇体分为两个半球,每个半球内部有数千个被称为 Kenyon 细胞的神经元,这 些神经元的突触和突触前细胞与其他神经元连接,形成了复杂的神经网络。因此, 我们使用携带有 *GMR57C10*-GAL4 的品系果蝇与该团队研究结果中的 UAS-GFP、 UAS-uN2C-GFP 和 UAS-uN2CpolyG-GFP 品 系 果 蝇 分 别 进 行 杂 交 ,使用 *GMR57C10* 启动子建立在果蝇中枢神经系统中表达 NIID 致病基因的模型果蝇, 并主要关注与果蝇学习与记忆相关的磨菇体,并希望还原 NIID 患者由于中枢神 经系统中的 polyG 表达引发的认知功能障碍等症状。uN2CpolyG 转基因果蝇与 NIID 患者中枢神经病理学特征更加贴近,可以作为一种有用的动物模型,以揭 示致病机制并研究 NOTCH2NLC 相关疾病的治疗方法。



图 6. 果蝇模型构建质粒主要组成[27]

图中质粒结构分别为 UAS-GFP、UAS-uN2C-GFP 与 UAS-uN2CpolyG-GFP, UASuN2CpolyG-GFP 中 GGC 片段重复的数量为 100

3.3.2 果蝇 NIID 疾病模型的检验

为检验 uN2CpolyG 转基因果蝇模型是否还原 NIID 患者中 polyG 聚集体的出现,我们分别解剖了三种果蝇三龄幼虫与成功的大脑,在使用 DAPI 进行染色后使用共聚焦显微镜对三龄幼虫全脑以及成虫大脑中磨菇体部位进行观察。其中幼虫大脑中的 DAPI 染色效果不佳,无法准确的标记大脑中细胞核的位置;在表达

GFP 与 uN2C-GFP 的果蝇大脑中并未观察到绿色荧光的聚集,在表达 uN2CpolyG-GFP 的果蝇大脑中我们可以观察到其荧光面积更小,且部分细胞内 有绿色荧光聚集。这表明在 uN2CpolyG-GFP 的三龄果蝇幼虫的中枢神经系统神 经细胞中有 polyG 聚集体的形成。



图 7. 果蝇大脑中的 polyG 蛋白表达情况

A 为果蝇三龄幼虫大脑荧光图像,箭头所指为果蝇幼虫大脑中磨菇体; B 和 C 为果蝇 成虫大脑中蘑菇体神经细胞荧光图像, B 为神经细胞胞体、C 为神经细胞轴突,箭头所 指为果蝇蘑菇神经细胞中的 polyG 聚集体 在表达 GFP 与 uN2C-GFP 的成虫大脑的磨菇体部位中存在弥散的绿色荧光 分布,这些绿色荧光信号并未产生聚集;而在表达 uN2CpolyG-GFP 的果蝇大脑 磨菇体的胞体部分中整体绿色背景信号较弱,且存在明显的绿色荧光聚集,而在 磨菇体神经细胞的树突上则无绿色荧光聚集。这表明在 uN2CpolyG-GFP 的果蝇 幼虫和成虫的中枢神经系统神经细胞中有 polyG 聚集体的形成。这说明我们建立 的在中枢神经系统中表达 NIID 的果蝇模型成功再现了 NIID 病理学上聚集体的 发生。

同时,在对杂交后代果蝇进行解剖时,我们发现表达 uN2CpolyG-GFP 的果蝇 数量较少。我们推测 polyG 蛋白对果蝇的发育产生了一定影响。对三种表型的果 蝇出生率进行统计可以进一步验证该模型中 polyG 蛋白存在一定的生理毒性。

四、讨 论

NIID 是一种进行性的神经退行性疾病,这种疾病的一大特点就是在患者的 中枢、外周和自主神经系统细胞以及内脏器官细胞出现大量细胞核内包涵体。而 这种包涵体的产生来源于人类特有的 NOTCH2NLC 基因第一外显子中的 AUG 密码子启动产生大量 GGC 片段重复引起的。但是,GGC 片段重复引发 NIID 的 分子机制尚未可知。我们在实验室中建立了 NOTCH2NLC 型细胞模型并以该模 型对 NOTCH2NLC-(GGC)98 细胞表达的致病蛋白进行了免疫蛋白印迹的条件摸 索,确定了 NOTCH2NLC-(GGC)98-GFP 蛋白的条带位置;由于聚集体的形成使 得大量 NOTCH2NLC-(GGC)98-GFP 蛋白的条带位置;由于聚集体的形成使 得大量 NOTCH2NLC-(GGC)98-GFP 蛋白的条带位置;由于聚集体的形成使 得大量 NOTCH2NLC-(GGC)98-GFP 蛋白剂留在蛋白胶上样孔中,因此我们仍无 法通过 GFP 抗体对 NOTCH2NLC-(GGC)98 细胞中致病蛋白进行定量分析,若需 定量分析则需要进行 mRNA 的定量或使用溶剂将滞留在上样孔中的 polyG 蛋白 进一步溶解分散。除了残留在泳道中的 polyG 蛋白外,在进行蛋白免疫印迹实验 中在目的条带的位置存在出现两条条带的情况,这可能说明我们转入细胞中 NOTCH2NLC-(GGC)98 或许存在特定的磷酸化或踩在赖氨酸乙酰化等修饰。探究 这些蛋白质修饰的方式或许可以发现 NIID 中 polyG 蛋白存在的独特调控机制。

在后续的实验中,我们还通过蛋白酶体抑制剂与自噬抑制剂同时对 NOTCH2NLC-(GGC)% 细胞进行处理,并通过定性分析发现阻断蛋白酶体途径和 自噬途径都会对 NOTCH2NLC-(GGC)% 细胞中的 polyG 蛋白水平造成影响。这 说明自噬途径对 NIID 中的 polyG 致病蛋白水平的影响较大,自噬相关的基因可 能对 NIID 中 polyG 蛋白的水平存在调控作用。但是我们采用的蛋白酶体抑制剂 与自噬抑制剂处理对这两种途径的影响较为复杂,无法确切的说明在细胞中 polyG 蛋白的降解途径如何,因此下一步使用 CHX 处理可以更准确地探究出 polyG 蛋白的降解途径如何。在 ATG 敲除的细胞系中进行细胞系的建立并通过 高内涵成像的方式检测 polyG 蛋白的水平与分布可以进一步的验证其降解途径 是否为自噬途径。

在进行免疫荧光染色对 NOTCH2NLC-(GGC)98 细胞模型进行处理后,我们观察到相比于 NOTCH2NLC-(GGC)17 细胞中出现的弥散绿色荧光,NOTCH2NLC-(GGC)98 细胞中出现了明显的聚集体,这说明我们的细胞模型很好的再现了 NIID

细胞中出现的聚集体。在对细胞中的泛素与 P62 进行免疫荧光染色后,我们发现 NOTCH2NLC-(GGC)98 细胞中的聚集体与 P62 存在显著的共定位,而与泛素的共定位水平较低。这也与蛋白免疫印迹的结果相互印证,我们建立的细胞模型中的 NOTCH2NLC-(GGC)98 聚集体与 P62 共定位,与文献报道中一致。

除了细胞模型外,我们还建立了 NOTCH2NLC 型 NIID 的果蝇模型,将 NOTCH2NLC-(GGC)100 在果蝇的中枢神经系统中表达并产生了 polyG 聚集体。 由于表达 NOTCH2NLC-(GGC)100 的果蝇出生率较低,因此我们推测在果蝇大脑 中表达 polyG 造成了果蝇致死,某种程度上也证明了 polyG 聚集体存在一定的生 理毒性。但果蝇模型仍需进一步进行实验验证,我们需要进一步确认果蝇中 polyG 与细胞内泛素和 P62 是否存在共定位,以及通过蛋白免疫印迹的方式来对 果蝇大脑中的 polyG 蛋白进行检测。除此之外,我们计划进一步对果蝇进行行为 学实验,检测其运动能力与认知能力变化,也计划将 polyG 在果蝇的神经肌肉接 头处表达 polyG 蛋白,检测 NIID 中 polyG 蛋白是否存在组织特异性表达等情况。

综上所述,我们成功建立了 NOTCH2NLC型 NIID 的细胞模型和果蝇模型,并通过细胞模型的蛋白免疫印迹以及免疫荧光分析推测 NIID 中 polyG 蛋白的降 解是可能是通过自噬途径进行的。因此,自噬途径中的部分基因对 polyG 蛋白存 在一定的调控作用。我们也建立了在果蝇中枢神经系统中表达 NOTCH2NLC-(GGC)100 的果蝇模型,而果蝇模型是否符合 NIID 真实的病理学特征仍需进一步 验证与确认。而后我们将在细胞与果蝇模型中检测自噬途径对 polyG 蛋白的降解 存在怎样的影响,检测自噬途径中是否存在某些基因对 polyG 蛋白的水平存在影 响,并对其分子机制进行进一步研究。

20

参考文献

- [1] Liufu T, Zheng Y, Yu J, et al. The polyG diseases: a new disease entity[J]. Acta Neuropathologica Communications, 2022, 10(1).
- [2] Lindenberg~ I, I~ubinstein L J, Herman M M, et al. A Light and Electron Microscopy Study of an Unusual Widespread Nuclear Inclusion Body Disease* A Possible Residuum of an Old Herpesvirus Infection[R]., 1968, 10.
- [3] Jiao B, Zhou L, Zhou Y, et al. Identification of expanded repeats in NOTCH2NLC in neurodegenerative dementias[J]. Neurobiology of Aging, 2020, 89: 142.e1-142.e7.
- [4] Liu Y, Li H, Liu X, et al. Frontiers Media S.A., 2022. Clinical and mechanism advances of neuronal intranuclear inclusion disease[J]. Frontiers in Aging Neuroscience, 2022, 14.
- [5] Kimber T E, Blumbergs P C, Rice J P, et al. Familial neuronal intranuclear inclusion disease with ubiquitin positive inclusions[J]. Journal of the Neurological Sciences, 1998, 160(1): 33–40.
- [6] Ma D, Tan Y J, Ng A S L, et al. Association of NOTCH2NLC Repeat Expansions with Parkinson Disease[J]. JAMA Neurology, 2020, 77(12): 1559–1563.
- [7] Liu Y H, Chou Y T, Chang F P, et al. Neuronal intranuclear inclusion disease in patients with adult-onset non-vascular leukoencephalopathy[J]. Brain, 2022, 145(9): 3010–3021.
- [8] Wu W, Yu J, Qian X, et al. Intermediate-length CGG repeat expansion in NOTCH2NLC is associated with pathologically confirmed Alzheimer's disease[J]. Neurobiology of Aging, 2022, 120: 189–195.
- [9] Zannolli R, Gilman S, Rossi S, et al. Hereditary Neuronal Intranuclear Inclusion Disease With Autonomic Failure and Cerebellar Degeneration[J]. Archives of Neurology, 2002, 59(8): 1319.
- [10] Sone J, Hishikawa N, Koike H, et al. Neuronal intranuclear hyaline inclusion disease showing motor-sensory and autonomic neuropathy[J]. Neurology, 2005, 65(10): 1538–1543.
- [11] Yamaguchi N, Mano T, Ohtomo R, et al. An Autopsy Case of Familial Neuronal Intranuclear Inclusion Disease with Dementia and Neuropathy[J]. Internal Medicine, 2018, 57(23): 3459–3462.
- [12] Morimoto S, Hatsuta H, Komiya T, et al. Simultaneous skin-nerve-muscle biopsy and abnormal mitochondrial inclusions in intranuclear hyaline inclusion body disease[J]. Journal of the Neurological Sciences, 2017, 372: 447–449.
- [13] Takumida H, Yakabe M, Mori H, et al. Case of a 78-year-old woman with a neuronal intranuclear inclusion disease[J]. Geriatrics & Gerontology International, 2017, 17(12): 2623–2625.
- [14] Sone J, Mori K, Inagaki T, et al. Clinicopathological features of adult-onset neuronal intranuclear inclusion disease[J]. Brain, 2016, 139(12): 3170–3186.
- [15] Sasaki T, Hideyama T, Saito Y, et al. Neuronal intranuclear inclusion disease presenting with recurrent cerebral infarct-like lesions[J]. Neurology and Clinical Neuroscience, 2015, 3(5): 185–187.
- [16] Tian Y, Wang J L, Huang W, et al. Expansion of Human-Specific GGC Repeat in Neuronal Intranuclear Inclusion Disease-Related Disorders[J]. American Journal of Human Genetics, 2019, 105(1): 166–176.

- [17] Ishiura H, Shibata S, Yoshimura J, et al. Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease[J]. Nature Genetics, 2019, 51(8): 1222–1232.
- [18] Sone J, Mitsuhashi S, Fujita A, et al. Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease[J]. Nature Genetics, 2019, 51(8): 1215–1221.
- [19] Boivin M, Deng J, Pfister V, et al. Translation of GGC repeat expansions into a toxic polyglycine protein in NIID defines a novel class of human genetic disorders: The polyG diseases[J]. Neuron, 2021, 109(11): 1825-1835.e5.
- [20] Suzuki I K, Gacquer D, Van Heurck R, et al. Human-Specific NOTCH2NL Genes Expand Cortical Neurogenesis through Delta/Notch Regulation[J]. Cell, 2018, 173(6): 1370-1384.e16.
- [21] Fiddes I T, Lodewijk G A, Mooring M, et al. Human-Specific NOTCH2NL Genes Affect Notch Signaling and Cortical Neurogenesis[J]. Cell, 2018, 173(6): 1356-1369.e22.
- [22] Liu Q, Zhang K, Kang Y, et al. Expression of expanded GGC repeats within NOTCH2NLC causes behavioral deficits and neurodegeneration in a mouse model of neuronal intranuclear inclusion disease[R]. Science Advances, 2022, 8.
- [23] Guo S, Nguyen L, Ranum L P W. RAN proteins in neurodegenerative disease: Repeating themes and unifying therapeutic strategies[J]. Current Opinion in Neurobiology, 2022, 72: 160–170.
- [24] Cao Y, Tian W, Wu J, et al. DNA hypermethylation of NOTCH2NLC in neuronal intranuclear inclusion disease: a case–control study[J]. Journal of Neurology, 2022, 269(11): 6049–6057.
- [25] Gall-Duncan T, Luo J, Jurkovic C M, et al. Antagonistic roles of canonical and Alternative-RPA in disease-associated tandem CAG repeat instability[J]. Cell, 2023, 186(22): 4898-4919.e25.
- [26] Zeng Y H, Yang K, Du G Q, et al. GGC Repeat Expansion of RILPL1 is Associated with Oculopharyngodistal Myopathy[J]. Annals of Neurology, 2022, 92(3): 512–526.
- [27] Yu J, Liufu T, Zheng Y, et al. CGG repeat expansion in NOTCH2NLC causes mitochondrial dysfunction and progressive neurodegeneration in Drosophila model[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2022, 119(41).

致 谢

白驹过隙,匆匆四年,论文中每一个字符的出现仿佛都在提醒我本科四年的 结束。细细回想,这四年里不乏焦虑与挣扎的时刻,也同样不缺少快乐与兴奋的 瞬间。在邯郸校区的一个个清醒或是沉睡的清晨,一个个阴郁或是灿烂的黄昏都 印入我的记忆中。而当一切尘埃落定,就到了告别的时刻。我们总是在某个平淡 的时刻失去某些事物,发现时总会涌起莫名的伤感。就像某个瞬间突然想起离家 生活已有七年,失去了在遥远县城平静生活的日夜;好友各奔前程,习惯的生活 即将改变,我又将失去。

在这本科四年的告别时刻,首先我想感谢鲁伯埙老师,感谢他的指导与支持。 我想感谢付玉华老师与张柿平老师在实验与理论上给予我的帮助与指导。我还要 感谢张智老师为我的科研之路指引方向。我还要感谢课题组中的同学,他们在实 验与技术层面给予了我很多帮助。此外我还要感谢陪我度过珍贵大学时光的朋友 与同学们。最后我要感谢身处远方的家人们,是他们在背后给予默默的支持。感 谢所有为我毕业论文做出贡献的人们。

再次感谢每一位支持和帮助过我的人,谢谢你们!

23