

表观调控 rDNA 转录的研究进展 *

程香荣¹⁾ 魏艳军²⁾ 黄星卫¹⁾ 王楠¹⁾ 姜琦¹⁾ 刘惠¹⁾ 雷蕾^{1)**}

(¹⁾ 哈尔滨医科大学组织学与胚胎学教研室, 哈尔滨 150081; ²⁾ 哈尔滨医科大学生物信息科学与技术学院, 哈尔滨 150081)

摘要 rDNA 是控制细胞核糖体生物合成的串联重复基因, 影响着整体蛋白质的翻译水平, 与细胞生长代谢息息相关。由于 rDNA 序列具有多拷贝的重复特征, 其转录除了受一般转录机制的调节外, 还受多重表观调控机制的调节, 精细调控着 rDNA 的转录状态。一般认为 rDNA 分为活跃和沉默两种状态, 分别与活跃染色质标记和异染色质标记相关。近些年来, 发现一种平衡态 rDNA 的存在, 更加丰富了 rDNA 表观机制的研究。H3.3 是一种 H3 组蛋白变体, 是近些年的研究热点, 已有报道 H3.3 可能在分子伴侣 HIRA 的介导下整合进入活跃 rDNA, 然而沉默 rDNA 的维持是否也与 H3.3 的作用相关需要更多的探索。CTCF 是 rDNA 重复单元间的绝缘子成分, 与 H3.3 相关但并不清楚是否也调控着 rDNA 的转录。该综述讨论了几种调控 rDNA 表观状态的机制, 并对可能参与该过程的新机制提出了设想。

关键词 rDNA, 表观遗传调控, H3.3, 分子伴侣, CTCF

学科分类号 R34

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0423

rDNA(rRNA 基因)是控制细胞核糖体生物合成的串联重复基因, 从而控制着细胞整体的蛋白质翻译。许多研究表明 rDNA 的调节紊乱与癌症密切相关, 如 rDNA 的过表达将导致过多的蛋白质合成, 从而促进恶性转化^[1]。不仅如此, 在胚胎重编程过程中 rDNA 是合子基因组激活 (zygotic genome activation, ZGA) 时首先开始转录表达的一批基因。体细胞核移植 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 较正常受精过程具有重编程效率低的问题, 对小鼠重编程过程中 rDNA 状态的研究表明, rDNA 没能被完全激活可能是重编程效率低下的一个重要原因, 且核移植效率与 rDNA 启动子区的甲基化程度密切相关^[2]。而在诱导多潜能干细胞 (induced pluripotent stem cell, iPSC) 重编程过程中, 通过血清饥饿的方式刺激 rDNA 转录表达可以显著提高 iPSC 的建系效率^[3]。rDNA 序列以一种多拷贝、成簇分布的形式存在, 主要分为活跃状态和沉默状态。活跃和沉默状态间的比例受细胞表观机制的调控, 如在卵子发生过程中, 几乎所有 rDNA 都是转录活跃的, 以满足大量核糖体和蛋白质合成的需求, 而在大部分已分化细胞中 (如成纤维细胞) 2 种状态的 rDNA 各占 1/2^[4]。

表观调控是涉及 DNA、组蛋白修饰和染色质构象改变和 DNA 编码序列不改变, 从而影响基因表达的一种调控机制。组蛋白修饰是指参与核小体构成的核心组蛋白经历各种翻译后修饰, 包括乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化、ADP 核糖基化等, 大部分修饰都发生在组蛋白的 N 端和 C 端的特定位置。赖氨酸的乙酰化一般与染色质可接近性和转录活性相关, 而赖氨酸的甲基化不仅与修饰位点, 还与染色质环境相关。一般而言, H3K4me3 (H3 组蛋白第 4 位置的赖氨酸发生三甲基化) 与活跃基因相关, 而 H3K9me3 和 H3K27me3 与异染色质化、转录沉默的基因相关, 这些组蛋白修饰与 rDNA 序列的表达状态密切相关^[5]。

1 rDNA 的特征及转录过程

细胞生长需要持续合成 rRNA 来产生核糖体, 以满足大量蛋白质合成的需求。rRNA 基因重复序

* 国家自然科学基金面上项目 (31671545) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 15104581872, E-mail: leiys2002@yahoo.com

收稿日期: 2017-11-14, 接受日期: 2018-02-07

列(rDNA)成簇分布于细胞核的核仁位置,核仁是核糖体产生的重要场所(有关核仁的介绍请参见综述^[6-7]).rDNA重复序列的拷贝量因物种而异,人基因组中包含400~600拷贝量不等的rDNA序列,成簇分布于13、14、15、21、22号染色体短臂异染色质区,而鼠包含的300~400拷贝量的序列成簇分布于12、15、16、17、18、19号染色体.鼠的典型rDNA序列单元大约45 kb长,其中13~14 kb长的编码区由RNA聚合酶I(RNA polymerase I, RP I/Pol I)转录合成pre-rRNA,指导合成大量核糖体以满足生命代谢所需^[7],编码区之间是30 kb长的基因间隔区(intergenic spacer, IGS),又叫非编

码区,该区域的长度和序列信息因物种不同而差异很大,该区域包含有各种调控元件(图1),其中大部分序列都是简单重复序列和转座子,造成ChIP-seq高通量数据的生物信息分析的困难^[8].活跃态rDNA的占比与细胞生长代谢需求息息相关.多个因素从不同方面来控制rDNA转录产量,如生长因子、应激、细胞周期相关因子在转录的不同阶段调控着本已活跃的rDNA的转录效率^[9],而其他一些因素则通过影响rDNA的表观状态,即改变活跃rDNA的比例来调控rRNA的合成速率,从而与细胞的生长代谢需求相协调.

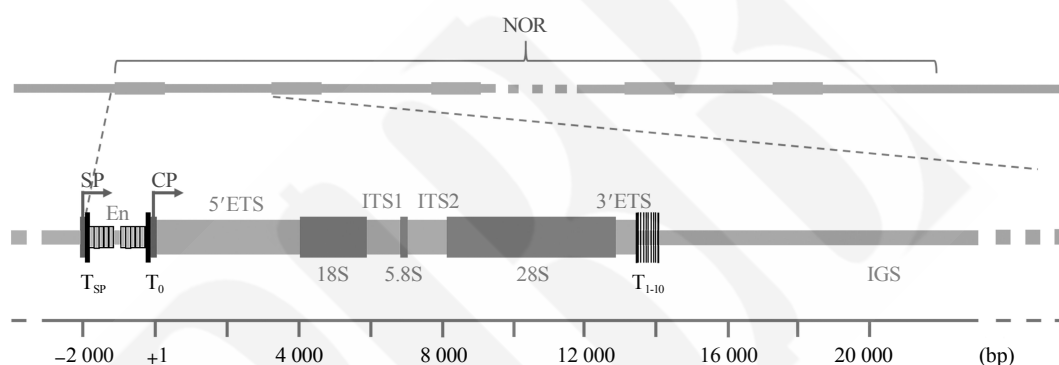


Fig. 1 The structure of rDNA in mammalian cell

图1 哺乳动物细胞中rDNA的结构

数百个rRNA基因成簇分布于各核仁组织区内(NOR),每个rDNA序列单元由转录区和基因间隔区(IGS)构成.转录区(编码45S pre-rRNA)包含5'端外转录间隔区(external transcribed space, 5'ETS)、3'ETS、内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS1/2)及18S、5.8S、28S.IGS区包含有间隔启动子(spacer promoter, SP)、增强子(En)、核心启动子(CP)、及转录终止子 T_{sp} 、 T_0 、 T_{1-10} 、和大量SINE、LTR等转座子成分.

rDNA首先由特异的RNA聚合酶I转录合成初产物45S pre-rRNA,随后被切割产生成熟的28S、18S、5.8S rRNA,之后经过一系列转录后修饰,与5S rRNA(5S rDNA也是串联重复成簇分布,由RNA聚合酶III合成)及核糖体蛋白组装后被转运到细胞核外^[6].Pol I至少由以下3种转录因子募集到rDNA启动子上并组装成起始前复合物(preinitiation complex, PIC):上游结合因子(upstream binding factor, UBF)、核心启动子结合因子(selectivity factor 1, SL1/TIF-1B)以及RNA聚合酶I特异的转录起始因子RRN3/TIF-1A^[10].转录终止因子1(transcription termination factor 1, TTF-1)是DNA特异结合蛋白,结合在rDNA转录单元的下流位置,能阻止延伸过程中的Pol I,介

导转录终止和复制叉停滞,另外在表观调控中也起着重要作用.因为转录活跃的rDNA结合着Pol I及相关转录因子UBF、SL1/TIF-1B、TTF-1,Pol I转录机器的成员包含酸性嗜银性区域,所以主要由活跃rDNA组成的活跃核仁组织区(nucleolus organizer regions, NOR)可以被硝酸银着色,又称Ag-NOR^[7,11].

2 rDNA表观状态的调控机制

rDNA最显著的特点就是具有大量重复的基因拷贝,所以rDNA的表达除了受常规的转录翻译机制调节外,还受另一套表观机制的调控,即调控活跃和沉默rDNA之间比例以满足细胞生长代谢的需求.早期的基于甲基化敏感的限制性内切酶消化实

验(*Hpa* II /*Sma* I)、重亚硫酸盐测序及补骨脂素交联实验等分析哺乳动物细胞, 发现 rDNA 序列中大约一半是活跃状态, 另一半是沉默状态^[9]. 最近使用 Epi-combing 方法在单个 DNA 链上研究甲基化模式发现, 不管是正常细胞还是肿瘤细胞, 一些活跃 NOR 中的活跃 rDNA 序列间也散布着沉默 rDNA 序列^[12]. 活跃 rDNA 序列的特征是 CpG 呈现低甲基化、具有与转录活跃的染色质特征相关的组蛋白修饰(比如 H3K4me2/3 和 H3K9ac), 而沉默 rDNA 是高甲基化的、标记有 H3K27me3 和 H4K20me3 的异染色质特征^[5, 7-8, 13-14].

2.1 CSB、NoRC 及 NuRD 对 rDNA 状态的精细调控

活跃与沉默 rDNA 存在不同的 DNA 甲基化模式、组蛋白修饰方式和核小体位置. 当 TTF-1 结合到 T0 位置时(转录起始位点的上游 170 bp 处), 募集科卡因综合征蛋白 B(cockayne syndrome protein B, CSB)、核仁重塑复合物(nucleolar remodeling complex, NoRC)或核小体重塑及去乙酰化酶复合物(nucleosome remodeling and deacetylase, NuRD), 分别建立起表观上活跃、沉默或平衡态(poised)的 rDNA^[5, 7](图 2). CSB 是一种能扰乱蛋白质-DNA 互作的 ATP 酶, 属于 SWI/SNF2 样家族, 在转录激活和伴随转录的 DNA 修复过程中起作用. 过表达 CSB 将促进 rDNA 转录, 而干扰 CSB 会损害转录复合物形成, 从而抑制 pre-rRNA 的合成^[15]. 如果 TTF-1 和 CSB 都过表达, 会使 Pol I 的转录激活更加明显, TTF-1 和 CSB 的相互依赖提示了二者协同地以一种基于染色质结构改变为基础的方式调控着 rDNA 转录(图 2a). CSB 募集组蛋白乙酰基转移酶(p300/CBP associated factor, PCAF), 在 rDNA 启动子区诱导组蛋白 H4 和组蛋白 H3K9 的乙酰化^[16]. 另外 CSB 还募集 G9a, G9a 是一种组蛋白甲基转移酶, 负责 H3K9 的一、二甲基化, 并且促进与 HP1 γ (异染色质蛋白 1 γ)的结合, 促进转录延伸^[15]. H3K9 的甲基化和 HP1 γ 一般认为是在异染色质化中起作用的, 然而此时 H3K9me2 和 HP1 γ 同时存在于活跃 rDNA 序列的转录区, 说明跟许多蛋白质一样, HP1 γ 的功能并不是唯一的^[17], 组蛋白标记也比想象中更加复杂, 具体功能还取决于环境中其他组蛋白的修饰情况.

与 CSB 作用相反的是染色质重塑复合物 NoRC, 它由 ATP 酶 SNF2h 和 TTF-1 互作蛋白 5 (TTF-1 interacting protein 5, TIP5)两部分组成, 负

责建立异染色质化的沉默 rDNA(图 2b). 沉默 rDNA 与卫星 DNA 共同组成核仁外周致密的异染色质结构, 围绕着活跃或沉默 NOR, 导致核仁结构的球心难以被染色, 形成黑色空洞^[7], 这表明, 即使一些 NOR 缺少银染信号也可能是转录活跃的^[18]. 异染色质不仅与建立特殊核仁结构相关, 还阻止 rDNA 序列的同源重组, 因此保护了核仁结构和 rDNA 序列的稳定性^[5]. NoRC 介导 rDNA 的沉默是通过募集 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)、组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)、组蛋白甲基转移酶(histone methyltransferase, HMT)到启动子区, 发生 H4 去乙酰化、H3K9 二甲基化、DNA 甲基化等过程, 从而建立起异染色质的结构特征^[19-21]. NoRC 的作用会受到 DNMTs 抑制剂或组蛋白去乙酰化酶抑制剂(例如 aza-dC 和 TSA)的干扰. 说明细胞组蛋白修饰、DNA 甲基化和转录活跃/沉默各个事件之间是紧密联系在一起的, 而染色质重塑复合物, 如 NoRC, 在其中协调各个表观事件以达到转录沉默的目的. NoRC 除了在诱导表观修饰变化过程中起着脚手架作用外, 还能将启动子区结合的核小体由活跃位置(-157 bp~-2 bp 区域, *NucU*)往下游移动 25 bp 到沉默位置(-132 bp~+22 bp 区域, *NucD*)^[22]. 核小体所在位置的改变导致核心启动子区不易接受转录因子(如 TIF- I B/SL1 和 UBF)的结合, 从另一途径建立了一种关闭的染色质结构, 阻碍转录起始复合物的形成. 因此, 通过调控 NoRC 就可调控 rDNA 的状态, 例如, BEN 结构域蛋白 3 (BEN domain-containing protein 3, BEND3)通过稳固 NoRC, 起着抑制 rDNA 转录的作用, 丢失 BEND3 将会增加 H3K4me3 水平、降低 rDNA 启动子区的 DNA 甲基化水平, 从而促进转录^[23].

最近发现了一种 rDNA 新的表观状态: 平衡态(图 2c). 平衡态 rDNA 启动子是未甲基化的、存在二价组蛋白修饰(H3K4me3 和 H3K27me3 共标记)、同时有“关闭”状态的核小体位置(*NucD*), 启动子结合着转录起始前复合物 PIC 但没有 Pol I 和 TIF- I A 的结合, 所以不能转录, 是一种转录激活的准备状态^[24]. NuRD 复合物负责建立和维持平衡态的 rDNA. 与多潜能细胞相比, 已分化细胞中具有更高比例的平衡态 rDNA, 细胞内 rDNA 结合着更多的 NuRD, 重新激活该状态 rDNA 的转录过程需要 CSB 将核小体由沉默位置 *NucD* 移动到活跃位置 *NucU*^[24]. CSB、NoRC 或 NuRD 都与 TTF-1

作用, 且各自建立起一种状态的 rDNA, 决定和选择建立哪种状态 rDNA 的分子机制是什么, 需要人们进行更多的探索. 另外, 除了 CSB、NoRC 和 NuRD 三者调控着 rDNA 的转录状态外, 其他因素, 如 pRNA、UBF 等也参与 rDNA 转录的调控过程^[4-5].

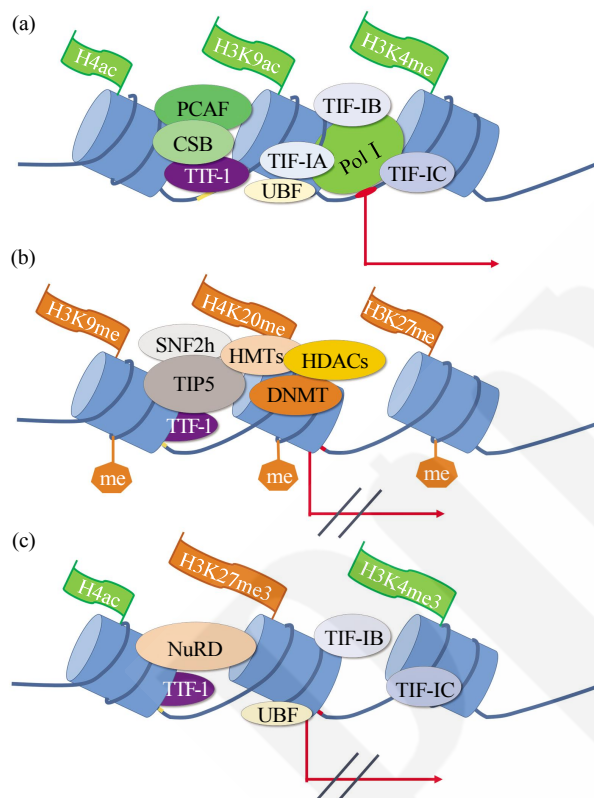


Fig. 2 The chromatin remodeling complexes establish and maintain the epigenetic states of rDNA

图 2 染色质重塑复合物对 rDNA 表观状态的建立和维持
(a) TTF-1 结合到启动子近端的终止子 T0 位置, 募集 CSB. CSB 能将核小体移位, 从平衡态的 *NucD* 位置移动到活跃态的 *NucU* 位置, 另外, CSB 募集乙酰基转移酶 PCAF, 建立和维持组蛋白的乙酰化状态. UBF 结合于活跃 rDNA 上, Pol I 在辅助因子 RRN3 (TIF- I A)、SL1(TIF- I B)等的作用下组装成起始前复合物 PIC, 开始 pre-rRNA 的转录过程. (b) TTF-1 还能与 NoRC 复合物(TIP5 亚基)相互作用, NoRC 募集 DNA 甲基转移酶(DNMT)、组蛋白去乙酰化酶(HDAC)、组蛋白甲基转移酶(HMT), HDAC 使组蛋白 H3 和 H4 发生去乙酰化, HMT 使 H3K9、H3K20、H3K27 发生甲基化, DNMT 使-133 位置的 CpG 发生甲基化, 从而建立起异染色质的结构特征. 异染色质组蛋白修饰可能作为一种信号, 促使 ATP 酶 SNF2h 将启动子区结合的核小体由 *NucU* 位置移动到 *NucD* 位置, 因此不利于起始前复合物 PIC 的形成. 另外, -133 位置的 CpG 甲基化也会损害 UBF 的结合和起始前复合物 PIC 的组装. (c) TTF-1 与 NuRD 复合物互动, 建立和维持平衡态 rDNA. 平衡态 rDNA 是种中间状态, 既具有活跃染色质标记特征: 未甲基化的 DNA、H3K4me3 标记, 又有异染色质的特征: *NucD* 位置的核小体和 H3K27me3 标记. 具有 PIC 复合物的结合, 但没有 Pol I 和 TIF- I A 的参与, 是一种转录激活的准备状态.

2.2 DNA 甲基化与 rDNA 状态的关系

影响活跃 rDNA 占比的表观因素很多, DNA 甲基化就是其中很重要的一个因素. 哺乳动物中, CpG 二核苷酸胞嘧啶残基的甲基化是与基因沉默相关的表观标记, 是保护重复序列免受异常转录和同源重组的主要方式之一. CpG 甲基化主要由 DNA 甲基转移酶 DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b 建立. 鼠 rDNA 序列-133 位置的 CpG 二核苷酸的甲基化就足以损害 UBF 与 rDNA 的结合, 阻止转录复合物的组装, 说明细胞可能通过介导 DNA 甲基化的方式来调控 rDNA 状态, 即未甲基化与 rDNA 转录活跃相关, 而甲基化与 rDNA 转录沉默相关^[5]. 由于该位点的甲基化能在一定程度上代表 rDNA 的状态, 所以基于甲基敏感的限制性酶切与 qPCR 相结合的方法可用于检测活跃 rDNA 的占比, 或将甲基敏感的限制性内切酶 *Hpa* II 和 *Sma* I 与 ChIP 实验相结合(ChIP-Chop)还能检测某种蛋白结合的 rDNA 甲基化状态^[25]. 人类 rDNA 的甲基化模式更加复杂, 25 个 CpG 残基的甲基化水平共同决定了 rDNA 的状态^[5, 25]. 在多种肿瘤中都发现了 rDNA 的低甲基化伴随活跃 rDNA 的数量增加而沉默 rDNA 减少的现象, 例如人肝癌细胞与周围正常肝细胞相比, rDNA 启动子区表现出低甲基化的表观修饰, 与其高水平 rRNA 合成和快速增殖特性是一致的^[26]. 小鼠核移植研究中也提示, 重编程效率与 rDNA 启动子区甲基化程度密切相关^[2].

DNA 甲基化常与组蛋白修饰互作, 共同调控基因转录. 然而在细胞正常的调控机制中, 是 DNA 甲基化先起作用而后发生组蛋白修饰改变, 还是先有组蛋白修饰改变而后伴随 DNA 甲基化? 在 NoRC 介导 rDNA 沉默过程中, 各种表观事件具有一定时空顺序, 抑制组蛋白去乙酰化过程能阻止 DNA 的甲基化, 然而抑制 DNA 甲基化并不影响组蛋白修饰^[21]. 也有研究表明 CpG 位置的 DNA 甲基化能特异地募集一些阻遏蛋白、DNMTs 与一些 DNA 结合蛋白, 这些蛋白质再与组蛋白去乙酰化酶抑制蛋白和组蛋白甲基转移酶发生互作^[27], 进一步影响表观修饰和改变染色质结构, 从而影响转录活性. 另外, 在 DNA 甲基化水平较低时, 组蛋白分子伴侣 ATRX/DAXX 复合物 (α -thalassaemia/mental retardation X-linked syndrome protein, ATRX; death domain-associated protein, DAXX) 更倾向于募集甲基转移酶 SUV39H(suppressor of variegation 3-9 homolog, SUV39H), 介导建立

H3K9me3 以保护重复序列^[28], 说明在低甲基化时, 组蛋白修饰可作为一种补偿机制维持重复序列的稳定. 不管怎样, DNA 甲基化与组蛋白修饰之间是密不可分的, 作为完整的表观调控机制的成员, 共同塑造了 rDNA 的状态.

沉默态 rDNA 可以通过主动去甲基化的方式转变为活跃态 rDNA. 如过表达甲基化结合蛋白 3 (methyl-CpG binding domain protein 3, MBD3)可以降低 rDNA 启动子区的甲基化水平, 而敲减 MBD3 会增加 rDNA 启动子区甲基化水平并伴随 RNA 聚合酶 I 的结合减少和 pre-rRNA 的合成减少^[29]. 主动去甲基化酶 Gadd45 α (growth arrest and DNA damage inducible protein 45 α , Gadd45 α)的过表达可以降低哺乳动物细胞整体的 DNA 甲基化水平, 激活甲基化沉默的报告基因. 在 rDNA 的研究中发现, Gadd45 α 由转录起始因子 TF II D 亚基 12 (transcription initiation factor TF II D subunit 12, TAF12)募集、诱导 rDNA 启动子区的去甲基化, 从而建立并维持活跃 rDNA 的低甲基化状态, 过表达 Gadd45 α 将促进 rDNA 的主动去甲基化过程, 增加 pre-rRNA 的合成^[30].

3 组蛋白 H3 变体 H3.3 及组蛋白修饰与 rDNA 状态的关系

3.1 生物信息学分析是揭示 rDNA 上组蛋白修饰情况的重要手段

组蛋白修饰与 rDNA 状态密切相关, 由于 rDNA 属于重复序列, 常规的 ChIP-seq 分析结果并不包含此区域的富集信息. Zentner 等^[8, 14]首次提出分析 rDNA 的生物信息学方法, Mars 等^[31]更加优化了分析过程, 构建包含有 rDNA 序列的比对参考基因组, 对已有的组蛋白修饰全基因组 ChIP-seq 数据进行 rDNA 序列的重注释分析. 由于无法区别转录活跃与沉默态的 rDNA, rDNA 上组蛋白修饰的生物信息分析结果仅能反映整体的平均修饰情况, 所以需要利用其他实验手段, 如 ChIP-reChIP、ChIP-Chop 等实验做进一步的深入研究. rDNA 生物信息学分析结果显示, 组蛋白乙酰化 (如 H3K9ac、H3K27ac)和 H3K4 的甲基化修饰主要与启动子区相关, 而 H3K9me3、H3K27me3、H4K20me1 多与 IGS 区相关, 呈现一种宽泛的富集趋势, 不如活跃组蛋白修饰那样聚集^[8, 14, 32]. 同样的生物信息学分析手段用来研究肝癌细胞中 rDNA

的组蛋白修饰, 结果发现, 与正常肝细胞相比, 肝癌细胞的 H3K4me3 水平更高, 这与癌细胞具有更多活跃 rDNA 的结论是一致的, 然而肝癌细胞 IGS 区的 H3K27me3 水平也呈现更高的富集结果^[32], 这似乎质疑了 H3K27me3 作为异染色质标记的结论. 另外, 肝癌细胞 rDNA 的 IGS 区 H3K4me1 水平明显更高, 但启动子区的 H3K4me1 水平没有差别, 提示虽然 H3K4me1 在 IGS 区的作用未知, 但 H3K4me1 可能在肝癌和正常肝组织中具有不同作用^[32]. IGS 区可能包含一些未识别的转录单元或新的功能元件, 如增强子, 而 H3K4me1 是已知的与增强子相关的组蛋白修饰, 正常肝组织 IGS 区没有而在肝癌组织中显示明显 H3K4me1 富集峰, 提示 IGS 区的 H3K4me1 可能是肝癌疾病发生的一种潜在表观机制^[32]. 在比较了小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cell, mESC)、其来源的神经前体细胞(mESC-derived neural precursor cell, mNPC)和小鼠成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF) rDNA 的组蛋白修饰差异后发现, H3K4me1 在启动子区的富集随着细胞分化而降低, 而作为异染色质标记的 H3K9me3 随细胞分化而逐渐升高^[8], 这与减少的 rDNA 表达是一致的. 但 H3K27me3 富集水平随细胞分化而降低^[8], 再一次质疑了 H3K27me3 作为异染色质化 rDNA 的标记代表, 可能说明沉默态 rDNA 的建立和维持与 H3K27me3 不太相关, 而与 H3K9me3 更加相关. 例如, H3.3K9me3 (在组蛋白变体 H3.3 上发生 K9me3 修饰)被报道在端粒上起着维持基因沉默和染色质稳定的作用^[33]. 通过生物信息学揭示出来的发现, 值得人们进行更深入的探索和实验验证.

3.2 组蛋白 H3 变体 H3.3 及其分子伴侣

近年来, 组蛋白变体在转录调节中的作用受到极大关注, 与典型 H3 组蛋白不同, H3.3 是种与 H3.2、H3.1 分别有 4、5 个氨基酸序列差异的变体组蛋白, 以一种不依赖 DNA 复制的方式沉积到特定区域, 参与表观调控^[34]. H3.3 由 2 套不同的分子伴侣介导沉积到特定位置, 在 Hira 复合物的介导下沉积到活跃基因的启动子和基因体部促进转录, 而在 Atrx/Daxx 复合物的作用下, 沉积在端粒、着丝粒周等异染色质区, 维持基因沉默和异染色质结构的稳定^[34-35]. 这与 H3.3 的分子特性密切相关, H3.3 的高度动态性给予了染色质开放状态, 促进转录, 同时 H3.3 本身也可被修饰, 是 DNA 复制

期以外时期的 H3 来源, 接受表观修饰(如 H3K9me3)。另外, H3.3 与绝缘子相关的转录因子(CCCTC binding factor, CTCF)在全基因组中具有很强的共定位关系。在 CTCF 的诱导作用下, H3.3 擦除绝缘子位置的 H3K27me3 标记, 整合进入的 H3.3 因为其快速替换的组蛋白特性, 所以可以阻止周围抑制性染色质标记的扩散^[36]。

在 H3K4 未甲基化的环境下, ATRX 通过自身的 ADD 结构域识别并结合 H3K9me3, 从而被募集到异染色质区起作用。异染色质蛋白 HP1 也能识别 H3K9me3, 通过分子间互作进一步增强 ATRX 在该区域的募集^[34-35, 37-38]。ATRX 与能特异识别 H3.3 的分子伴侣 DAXX 互作, 从而加速 H3.3 在端粒和着丝粒周异染色质区的沉积, 在组蛋白甲基转移酶 SUV39H1 或 SETDB1(SET domain bifurcated 1, SETDB1)的作用下建立起 H3.3K9me3, 维持基因沉默和染色质稳定^[34-35, 37-38]。人们发现, 除了端粒和着丝粒周结构性异染色质外, 一些兼性异染色质区, 如印记的差异性甲基化区域(differentially methylated regions, DMRs)^[39]、基因内甲基化 CpG 岛^[39]、内源性逆转座子序列^[40]也由 ATRX 介导 H3.3 沉积, 从而建立 H3.3K9me3 修饰以维持该区域的稳定与沉默。

HIRA 介导的 H3.3 沉积参与许多生物事件, 包括受精后雄原核的染色质形成^[41]、核移植后的转录重编程过程^[42]及 DNA 损伤后的转录修复过程等^[43]。敲除 HIRA 将导致全基因组范围的启动子和基因体部 H3.3 沉积减少, 说明 HIRA 是 H3.3 在活跃基因启动子和基因体部沉积和替换的分子伴侣^[35, 44]。然而在很多增强子区域, H3.3 的沉积是不依赖于 HIRA 的, 提示可能存在一种增强子特异的 H3.3 分子伴侣^[35, 44-45]。

3.3 H3.3 在 rDNA 上作用的证据

很多证据表明 rDNA 上确实有 H3.3 的富集^[42, 46-49]。早在果蝇研究中就发现 H3.3 明显富集于 rDNA 序列上, 可能与致密重复的 rDNA 序列有很高转录活性相关^[47]。非洲爪蟾的核移植研究发现, H3.3 被整合进入到 rDNA 是种 Hira 依赖、转录依赖的过程^[42]。在小鼠受精卵中, HIRA 的敲减将严重损害早期发育过程中 rDNA 的转录^[42, 48]。H3.3 的替换速率研究显示, rDNA 上有明显的 H3.3 替换过程, 只稍逊于 tRNA 基因^[46]。在拟南芥的最新研究中发现, ATRX 将 H3.3 沉积在 rDNA 上并调节其基因的表达^[49]。以上结果共同证明 H3.3 可能在分子伴

侣 HIRA 介导下沉积到 rDNA 上, 与 rDNA 转录活性相关。然而近些年来, 越来越多文献报道 H3.3 在异染色质的形成及维持稳定过程中起着关键作用^[50-52], 已分化细胞中逐渐建立的沉默态 rDNA, 其异染色质结构的建立是否也与 H3.3 相关? ATRX/DAXX 复合物与 HIRA 复合物作为 H3.3 的两套分子伴侣参与不同的表观机制, 对 rDNA 状态的建立、维持和调控是否发挥着重要作用? 是否能够通过此类方法改变组蛋白修饰从而影响 rDNA 转录, 进而在重编程、癌症发生等过程中参与作用? 这些问题有待于人们对 rDNA 调控进行更深入的机制研究。另外, 很早就有研究报道 CTCF 依赖的绝缘子元件与表观重塑事件相关^[53]。考虑到 CTCF 与 H3.3 在基因组中具有很强的共定位关系, CTCF 作为绝缘子能阻止异染色质标记的扩散^[6], 而在首尾相连的大量重复的 rDNA 序列中, CTCF 在 rDNA 的间隔启动子区附近富集(转录起始位点的上游)^[32], 因此可能具有分离隔绝重复序列间的不同表观修饰标记的作用。缺少 CTCF 的绝缘作用, 可能导致 NOR 中散在分布的不同状态 rDNA 间出现表观标记扩散的现象, 因此 CTCF 是否也对 rDNA 转录表达具有表观调控的作用值得深入研究。

4 总结与展望

rDNA 的转录水平直接影响着细胞内所有蛋白质的翻译水平, 肿瘤细胞、生殖细胞等快速增殖的细胞明显具有更高的 rDNA 转录需求。rDNA 以一种特殊的基因簇形式存在, 所以具有一般基因所不具备的表观调控方式。如本综述所讨论, CSB、NoRC、NuRD 三大染色质重塑复合物分别建立和维持活跃、沉默、平衡态的 rDNA, 对应着各自特征的组蛋白修饰、甲基化方式和核小体位置。生物信息学分析结果显示 rDNA 上的组蛋白修饰方式符合一般规律, 同时也有特殊、矛盾的情况存在。H3.3 是表观调控机制中的重要组成部分, 其在分子伴侣介导下与组蛋白修饰互相关联, 在 CTCF 建立的绝缘子中发挥重要作用。对此, 未来研究应该更多地聚焦于 rDNA 状态调控的新方式上, 即 H3.3 与分子伴侣或 CTCF 在 rDNA 上作用的机制, 为揭示癌症发生机制、重编程机制等提供更多有用信息。对 rDNA 机制的探讨有助于解决重编程效率低下、肿瘤治疗难题, 对未来的细胞替换治疗、组织器官移植等再生医学和肿瘤治疗的应用提供推动作用。

参 考 文 献

- [1] Ruggero D, Pandolfi P P. Does the ribosome translate cancer? *Nature Reviews Cancer*, 2003, **3**(3): 179–192
- [2] Zheng Z, Jia J L, Bou G, *et al.* rRNA genes are not fully activated in mouse somatic cell nuclear transfer embryos. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, **287**(24): 19949–19960
- [3] Zhao Q, Wu Y, Shan Z, *et al.* Serum starvation-induced cell cycle synchronization stimulated mouse rDNA transcription reactivation during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Stem Cell Research & Therapy*, 2016, **7**(1): 112
- [4] Grummt I. Different epigenetic layers engage in complex crosstalk to define the epigenetic state of mammalian rRNA genes. *Human Molecular Genetics*, 2007, **16** Spec No 1: R21–27
- [5] Mcstay B, Grummt I. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2008(24): 131–157
- [6] Boisvert F M, Van Koningsbruggen S, Navascues J, *et al.* The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, **8**(7): 574–585
- [7] Smirnov E, Cmarko D, Mazel T, *et al.* Nucleolar DNA: the host and the guests. *Histochemistry and Cell Biology*, 2016, **145**(4): 359–372
- [8] Zentner G E, Balow S A, Scacheri P C. Genomic characterization of the mouse ribosomal DNA locus. *G3*, 2014, **4**(2): 243–254
- [9] Hung S S, Lesmana A, Peck A, *et al.* Cell cycle and growth stimuli regulate different steps of RNA polymerase I transcription. *Gene*, 2017(612): 36–48
- [10] Herdman C, Mars J C, Stefanovsky V Y, *et al.* A unique enhancer boundary complex on the mouse ribosomal RNA genes persists after loss of Rm3 or UBF and the inactivation of RNA polymerase I transcription. *Plos Genetics*, 2017, **13**(7): e1006899
- [11] Roussel P, Andre C, Comai L, *et al.* The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *The Journal of Cell Biology*, 1996, **133**(2): 235–246
- [12] Zillner K, Komatsu J, Filarsky K, *et al.* Active human nucleolar organizer regions are interspersed with inactive rDNA repeats in normal and tumor cells. *Epigenomics*, 2015, **7**(3): 363–378
- [13] Mckeown P C, Shaw P J. Chromatin: linking structure and function in the nucleolus. *Chromosoma*, 2009, **118**(1): 11–23
- [14] Zentner G E, Saiakhova A, Manaenkov P, *et al.* Integrative genomic analysis of human ribosomal DNA. *Nucleic Acids Research*, 2011, **39**(12): 4949–4960
- [15] Yuan X, Feng W, Imhof A, *et al.* Activation of RNA polymerase I transcription by cockayne syndrome group B protein and histone methyltransferase G9a. *Molecular Cell*, 2007, **27**(4): 585–595
- [16] Shen M, Zhou T, Xie W, *et al.* The chromatin remodeling factor CSB recruits histone acetyltransferase PCAF to rRNA gene promoters in active state for transcription initiation. *Plos One*, 2013, **8**(5): e62668
- [17] Hediger F, Gasser S M. Heterochromatin protein 1: don't judge the book by its cover! *Current Opinion in Genetics & Development*, 2006, **16**(2): 143–150
- [18] Sullivan G J, Bridger J M, Cuthbert A P, *et al.* Human acrocentric chromosomes with transcriptionally silent nucleolar organizer regions associate with nucleoli. *The EMBO Journal*, 2001, **20**(11): 2867–2874
- [19] Zhou Y, Santoro R, Grummt I. The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *The EMBO Journal*, 2002, **21**(17): 4632–4640
- [20] Santoro R, Li J, Grummt I. The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nature Genetics*, 2002, **32**(3): 393–396
- [21] Santoro R, Grummt I. Epigenetic mechanism of rRNA gene silencing: temporal order of NoRC-mediated histone modification, chromatin remodeling, and DNA methylation. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, **25**(7): 2539–2546
- [22] Li J, Langst G, Grummt I. NoRC-dependent nucleosome positioning silences rRNA genes. *The EMBO Journal*, 2006, **25**(24): 5735–5741
- [23] Khan A, Giri S, Wang Y, *et al.* BEND3 represses rDNA transcription by stabilizing a NoRC component *via* USP21 deubiquitinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(27): 8338–8343
- [24] Xie W, Ling T, Zhou Y, *et al.* The chromatin remodeling complex NuRD establishes the poised state of rRNA genes characterized by bivalent histone modifications and altered nucleosome positions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(21): 8161–8166
- [25] Santoro R. Analysis of chromatin composition of repetitive sequences: the ChIP-Chop assay. *Methods in Molecular Biology*, 2014, **1094**: 319–328
- [26] Ghoshal K, Majumder S, Datta J, *et al.* Role of human ribosomal RNA (rRNA) promoter methylation and of methyl-CpG-binding protein MBD2 in the suppression of rRNA gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**(8): 6783–6793
- [27] Klose R J, Bird A P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences*, 2006, **31**(2): 89–97
- [28] He Q, Kim H, Huang R, *et al.* The Daxx/Atrx complex protects tandem repetitive elements during DNA hypomethylation by promoting H3K9 trimethylation. *Cell Stem Cell*, 2015, **17**(3): 273–286
- [29] Brown S E, Szyf M. Epigenetic programming of the rRNA promoter by MBD3. *Molecular and Cellular Biology*, 2007, **27**(13): 4938–4952
- [30] Schmitz K M, Schmitt N, Hoffmann-Rohrer U, *et al.* TAF12 recruits Gadd45a and the nucleotide excision repair complex to the promoter of rRNA genes leading to active DNA demethylation. *Molecular Cell*, 2009, **33**(3): 344–353
- [31] Mars J C, Sabourin-Felix M, Tremblay M G, *et al.* A deconvolution protocol for ChIP-Seq reveals analogous enhancer structures on the mouse and human ribosomal RNA genes. *G3*, 2018, **8**(1): 303–314

- [32] Yu F, Shen X, Fan L, *et al.* Analysis of histone modifications at human ribosomal DNA in liver cancer cell. *Scientific Reports*, 2015(5): 18100
- [33] Udugama M, Ft M C, Chan F L, *et al.* Histone variant H3.3 provides the heterochromatic H3 lysine 9 tri-methylation mark at telomeres. *Nucleic Acids Research*, 2015, **43**(21): 10227–10237
- [34] Szenker E, Ray-Gallet D, Almouzni G. The double face of the histone variant H3.3. *Cell Research*, 2011, **21**(3): 421–434
- [35] Goldberg A D, Banaszynski L A, Noh K M, *et al.* Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell*, 2010, **140**(5): 678–691
- [36] Weth O, Paprotka C, Gunther K, *et al.* CTCF induces histone variant incorporation, erases the H3K27me3 histone mark and opens chromatin. *Nucleic Acids Research*, 2014, **42**(19): 11941–11951
- [37] Clynes D, Higgs D R, Gibbons R J. The chromatin remodeller ATRX: a repeat offender in human disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 2013, **38**(9): 461–466
- [38] Voon H P, Wong L H. New players in heterochromatin silencing: histone variant H3.3 and the ATRX/DAXX chaperone. *Nucleic Acids Research*, 2016, **44**(4): 1496–1501
- [39] Voon H P, Hughes J R, Rode C, *et al.* ATRX plays a key role in maintaining silencing at interstitial heterochromatic loci and imprinted genes. *Cell Reports*, 2015, **11**(3): 405–418
- [40] Sadic D, Schmidt K, Groh S, *et al.* Atrx promotes heterochromatin formation at retrotransposons. *EMBO Reports*, 2015, **16** (7): 836–850
- [41] Loppin B, Bonnefoy E, Anselme C, *et al.* The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus. *Nature*, 2005, **437**(7063): 1386–1390
- [42] Jullien J, Astrand C, Szenker E, *et al.* HIRA dependent H3.3 deposition is required for transcriptional reprogramming following nuclear transfer to *Xenopus* oocytes. *Epigenetics & Chromatin*, 2012, **5**(1): 17
- [43] Adam S, Polo S E, Almouzni G. Transcription recovery after DNA damage requires chromatin priming by the H3.3 histone chaperone HIRA. *Cell*, 2013, **155**(1): 94–106
- [44] Ray-Gallet D, Woolfe A, Vassias I, *et al.* Dynamics of histone H3 deposition *in vivo* reveal a nucleosome gap-filling mechanism for H3.3 to maintain chromatin integrity. *Molecular Cell*, 2011, **44**(6): 928–941
- [45] Huang C, Zhu B. H3.3 turnover: a mechanism to poise chromatin for transcription, or a response to open chromatin? *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 2014, **36**(6): 579–584
- [46] Kraushaar D C, Jin W, Maunakea A, *et al.* Genome-wide incorporation dynamics reveal distinct categories of turnover for the histone variant H3.3. *Genome Biology*, 2013, **14**(10): R121
- [47] Ahmad K, Henikoff S. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Molecular Cell*, 2002, **9**(6): 1191–1200
- [48] Lin C J, Koh F M, Wong P, *et al.* Hira-mediated H3.3 incorporation is required for DNA replication and ribosomal RNA transcription in the mouse zygote. *Developmental Cell*, 2014, **30**(3): 268–279
- [49] Duc C, Benoit M, Detourne G, *et al.* Arabidopsis ATRX modulates H3.3 occupancy and fine-tunes gene expression. *The Plant Cell*, 2017, **29**(7): 1773–1793
- [50] Hake S B, Garcia B A, Kauer M, *et al.* Serine 31 phosphorylation of histone variant H3.3 is specific to regions bordering centromeres in metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(18): 6344–6349
- [51] Fromental-Ramain C, Ramain P, Hamiche A. The drosophila DAXX-like protein (DLP) cooperates with ASF1 for H3.3 deposition and heterochromatin formation. *Mol Cell Biol*, 2017, **37**(12): e00597–16
- [52] Rapkin L M, Ahmed K, Dulev S, *et al.* The histone chaperone DAXX maintains the structural organization of heterochromatin domains. *Epigenetics Chromatin*, 2015(8): 44
- [53] Ishihara K, Oshimura M, Nakao M. CTCF-dependent chromatin insulator is linked to epigenetic remodeling. *Molecular Cell*, 2006, **23**(5): 733–742

Research Progress on Epigenetic Regulation of rDNA Transcription*

CHENG Xiang-Rong¹⁾, WEI Yan-Jun²⁾, HUANG Xing-Wei¹⁾, WANG Nan¹⁾, JIANG Qi¹⁾, LIU Hui¹⁾, LEI Lei^{1)**}

¹⁾ Department of Histology and Embryology, Harbin Medical University, Harbin 150081, China;

²⁾ College of Bioinformatics Science and Technology, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

Abstract rDNA is an array of tandemly repeated genes controlling cellular ribosomes' biosynthesis, therefore determining translational level of overall proteins and being closely linked with cellular growth and metabolism. Because of the multi-copy feature, the transcription activity of rDNA repeats is not only adjusted by general transcription mechanism, but also finely regulated by multiple epigenetic mechanisms. Generally, rDNA is divided into two epigenetic states, active and silent state, relating to active chromatin marks and heterochromatin marks respectively. In recent years, a poise state has been found, which enriches the research of epigenetic mechanism in rDNA regulation. H3.3, a hot topic in recent years, is a variant of histone H3, which has been reported that might incorporate into active rDNA by its chaperone HIRA. However, more devotion is required to explore whether silent rDNA is maintained by H3.3 as well. Another regulator is CTCF, an insulator component that occupying between repeated rDNA units. Whether CTCF is involved in regulating the transcription of rDNA is still unknown. In this review, we present our current knowledge of the mechanisms in rDNA epigenetic regulation, and propose new hypotheses of regulatory mechanism that might exist in this process.

Key words rDNA, epigenetic regulation, H3.3, chaperone, CTCF

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0423

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (31671545).

**Corresponding author.

Tel: 15104581872, E-mail: leiys2002@yahoo.com

Received: November 14, 2017 Accepted: February 7, 2018