



异染色质相关蛋白 TRIM28 调控锌指蛋白和原钙黏蛋白家族基因的转录

张翔宇* 卜佳晨

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 目的 TRIM28 是一种异染色质相关蛋白, 通过和 SETDB1、HP1 相互作用参与 H3K9me3 修饰的建立, 本文旨在更深入地研究 TRIM28 的相关功能。方法 本文利用 CRISPR/Cas9 技术、染色质免疫共沉淀技术、免疫印迹技术和实时荧光定量 PCR 技术, 建立 HEK293F *Trim28* 基因敲除细胞系, 分析一系列实验数据结果。结果 *Trim28* 主要抑制内源表达水平较低的基因转录, 进一步分析发现 *Trim28* 调控锌指蛋白家族基因和原钙黏蛋白 β 家族基因的转录。在 *Trim28* 敲除细胞系中, 锌指蛋白家族基因 H3K27ac 修饰、H3K4me1 修饰和 H3K4me3 修饰都显著上升, H3K9me3 修饰下降。原钙黏蛋白 β 家族基因的 H3K4me3 修饰显著上升, H3K9me3 修饰下降。结论 这些结果提示 TRIM28 通过改变染色质的开放程度调控锌指蛋白和原钙黏蛋白 β 家族基因的转录, 为更深入研究 TRIM28 的功能提供了新的思路。

关键词 TRIM28, 异染色质, H3K9me3, 原钙黏蛋白 β 家族, 锌指蛋白家族

中图分类号 Q75

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0263

TRIM28 (TRiPartate motif-containing protein 28), 又称为 KAP1 (KRAB-associated protein1) 或者 TIF1 β (transcription intermediary factor 1 β), 它由 N 端的 RBCC 区域和 C 端的 PHD、BROMO 和 NHD 等结构域组成^[1]。既往研究发现, TRIM28 具有 E3 活性, 通过 SUMO 通路招募 SETDB1 和 HP1 等异染色质相关因子, 在靶基因上建立 H3K9me3 修饰, 抑制基因的转录^[2]。此外, 还有研究发现, TRIM28 通过调控 RNA 聚合酶 II 在 *Hspal1b* 等基因启动子区域的转录延伸活性调控基因的表达^[3]。

为了更深入地研究 TRIM28 的功能, 本文通过建立 *Trim28* 基因敲除细胞系, 发现 *Trim28* 主要抑制内源表达量较低基因的转录, 进一步分析发现 *Trim28* 抑制锌指蛋白家族基因和原钙黏蛋白 β 家族基因的转录, ChIP-seq 数据证明 TRIM28 通过影响染色质高级结构的改变调控锌指蛋白家族基因和原钙黏蛋白 β 家族基因的转录。

原钙黏蛋白家族基因 (protocadherin, PCDH) 分为 PCDH α 、PCDH β 和 PCDH γ 3 个类别, 在神经细胞中具有较高的表达水平。原钙黏蛋白对神经元突触的发育具有重要作用, 能够影响神经细胞对

“自我”和“非我”身份识别过程^[4]。已有文章报道, 染色质高级结构的改变能够影响原钙黏蛋白家族基因的表达^[5-6], 但是对于特定的激活 PCDH α 基因、PCDH β 基因或者 PCDH γ 基因的转录活性机制并不清楚。

本文通过生物组学的方法首次发现了 TRIM28 与原钙黏蛋白家族基因转录调控之间的关系, 并证明了两之间的联系, 对于 TRIM28 的分子机理的进一步的研究提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 *Trim28* 基因敲除细胞系和 *Trim28* 回补细胞系的构建

根据实验室之前设计向导 RNA (gRNA) 的方法^[7-9], 设计靶向 *Trim28* 基因第一个外显子起始密码子下游的两对小向导 RNA (sgRNA), gRNA1: 5'-caccgggctccgcgccggcagcct-3' 和 gRNA1: 5'-aaa-caggctgccgcccggaggccc-3'; gRNA2: 5'-caccggcg-

* 通讯联系人。

Tel: 15811513628, E-mail: zhangxy332@163.com

收稿日期: 2021-09-05, 接受日期: 2021-11-05

acccgagagggagcccc-3'和gRNAR2: 5'-aaacggggctccctctcggtcgcc-3'。将经过退火的引物连接到pLentiCas9V2质粒上,原核培养提取质粒。根据转染试剂Vigofect说明书转染质粒至HEK293F细胞中,96孔板分单克隆。使用DNA提取液快速提取细胞DNA,DNA提取液成分是:100 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L KCl、0.01% 明胶、0.45% NP-40、0.45% 吐温。设计引物检测阳性克隆,引物序列是Test F: 5'-agttggccgtgccgtacagcgctcc-3'和Test R: 5'-gccctaagcaggcactacaggccg-3'。PCR产物送测序公司测序,测序结果和野生型相比较,有DNA序列的突变即是阳性克隆。

利用pCMV-cTrim28-mCherry载体和转座子转染体系,在Trim28基因敲除细胞系中共转Piggyback转座酶表达载体,转座酶可促使pCMV-cTrim28-mCherry上相应Trim28cDNA片段整合到转染的细胞基因组中,转座成功的细胞,通过

CMV启动子表达mCherry荧光,使用流式细胞分选仪分选出对应的细胞。

1.2 mRNA反转录与实时荧光定量PCR

根据说明书推荐的使用方法,用TRIzol®裂解液(ThermoFisher, 15596-026)裂解细胞提取RNA,NanoDrop 2000C分光光度计(Thermo Scientific公司)测定RNA浓度,采用HiScript®II RT SuperMix for qPCR试剂盒(南京诺唯赞生物公司,R122-01)的操作步骤,大约1~2 µg RNA作为模板,反转录完成后稀释10倍。PCR反应体系是:10 µl 2×Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物公司,Q712-02),0.4 µl 10 mmol/L引物,5 µl cDNA模板,4.2 µl dd H₂O。在7500 Fast Real-Time PCR System(ABI公司)仪器上按照预变性95°C 30 s,循环反应95°C 10 s,60°C 30 s,40周期,溶解曲线95°C 15 s,60°C 60 s,95°C 15 s设定程序,进行荧光定量PCR反应。引物序列见表1。

Table 1 Primers for real-time quantitative PCR

Genes	Primer sequences (5'→3')
Gapdh	F: TCAGGCGTCTGTAGAGGCTT R: ATGCACATCCTTCGATAAGAC
PCDHB15	F: CCCTACACGAAGCACCAGAC R: GCGTCGCCTGGAGATTCATC
PCDHB5	F: AACGGTTTCAGCTGCCTCTA R: TTTGGGTCACCTGAACTTCC
PCDHB6	F: CAGTCCAACCGAGCAGTAA R: CCCTTGCTTTGCGATTGGTT
PCDHB7	F: CGCTGGAGATTGGGCG R: CGGCACACGTAGCCTTC
PCDHB9	F: GGCTCCTCTTTCTTCGGTGA R: GGCTGGAGAGATTGCTG
PCDHB11	F: CGTTGACGCCTTCCTTCTTCT R: CACATAGTGATTCTATAGCT
PCDHB13	F: AGCACGGGACTTACCATG R: GCCTCAGGAAGAATGAAG
PCDHB12	F: ATCAGCCTATCTGAAGGCC R: CAGTCTGGGTCACCTTAC
ZNF208	F: CTCTAGTATAGTCAACTAGT R: GGGTCTTATCTCCCAGCAT
ZNF844	F: CGAAGTACGCGGCCCTTTGTGTC R: GTCAGGGAGAAGGGAGAG
ZNF878	F: CGCGCCCTTCCAACTAATTAT R: CGTGTCTATTACTAGTTG
ZNF679	F: GGCGCAGCCTGAGTCATTAG R: GCCTCCTGTTGAGGACAAG
ZNF829	F: GGGGTAAGTTTCTCCGTTTGC R: CCCTTAATATAACTTCGTAT
ZNF253	F: ACCAAGGCGGCTCGGAGG R: GCCTCCTGTTGAGGACAAG
ZNF723	F: CCTCGGTGTCAGCCATCTTC R: AGCGGCTTTGTAGCCAGTT
ZNF442	F: TGGCTCTGAGAGAGATCCGT R: GGATGTCTTTGGGCATGATG
ZNF727	

1.3 免疫印迹

根据细胞的数量加入适量的细胞裂解液和蛋白酶抑制剂混匀后充分裂解细胞,细胞裂解液成分是:100 mmol/L Tris-HCl pH 6.8,4% SDS,20%甘油,200 mmol/L DTT,0.2% 溴酚蓝。利用蛋白质浓度检测试剂盒(碧云天公司,P0012S)测出各个样品浓度,将样品调至相同浓度,20 mA电泳1.5~2 h,250 mA转PVDF膜,一抗过夜孵育,

TBST洗膜3次,每次15 min,二抗孵育1 h,加显影液(Millipore公司),利用X光片(Kodak公司)经过洗片机(102型,Kodak公司)处理后显影。

1.4 细胞超声和染色质免疫共沉淀

细胞超声和染色质免疫共沉淀所需要的试剂及配制方法参考文献[9]配制。取适量细胞,向培养基中加入37%甲醇溶液至终浓度为1%,室温孵育10 min,加入2 mol/L甘氨酸至终浓度为

0.125 mol/L, 室温孵育 10 min, 终止交联。用冷的 PBS 溶液清洗细胞 3 遍, 加入适量裂解缓冲液 1 (140 mmol/L NaCl, 50 mmol/L HEPES pH 7.9, 1 mmol/L EDTA, 0.5% NP-40, 0.25% Triton-X100, 10% 甘油), 冰上孵育 10 min, 离心; 加入适量裂解缓冲液 2 (10 mmol/L Tris-HCl pH 7.9, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L EGTA), 冰上孵育 10 min; 用裂解缓冲液 3 (10 mmol/L Tris-HCl pH 7.9, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L EGTA, 0.1% 脱氧胆酸钠, 0.5% 月桂酰基氨基酸) 重悬。用 Covaris M220 超声仪进行细胞超声 30 min。取适量染色质加入适量抗体, 4°C 摇床结合过夜。取适量 protein A 或者 protein G Dynabeads (Invitrogen, 10002D), 用裂解缓冲液 (50 mmol/L HEPES pH 7.9, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% 脱氧胆酸钠) 重悬。4°C 摇床孵育 1~2 h。依次用高盐缓冲液 (50 mmol/L HEPES pH 7.9, 500 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% 脱氧胆酸钠)、LiCl 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl pH 7.9, 250 mmol/L LiCl, 2 mmol/L EDTA, 0.5% P-40, 0.5% 脱氧胆酸钠)、TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl pH 7.9, 2 mmol/L EDTA) 冲洗 Dynabeads, 再用洗脱液 (0.1% 十二烷基磺酸钠, 10 mmol/L NaHCO₃) 重悬, 60°C 振荡孵育 1 h, 解交联保存, 用 KAPA Hyper Prep Kit (KAPA biosystems, KK8504) 建 ChIP-seq 库。

1.5 DNA文库构建

根据 KAPA Hyper Prep Kit 推荐的使用方法^[10]分为末端修复和末端加“A”、连接“Y”形接头、片段纯化及片段大小筛选、PCR 扩增、纯化 DNA 片段、DNA PAGE 胶检测文库质量步骤。文库构建完成, 公司测序, ChIP-seq 文库采用双端测序获得数据。

1.6 Surveyor 实验

Surveyor 核酸内切酶对于 DNA 双链中的碱基错配情况具有很强的特异识别能力, 在含有错配的 DNA 双链经过 Surveyor 核酸酶处理后, 经过琼脂糖凝胶电泳呈现出两条大小不同的条带, 当基因组被 gRNA 在特异位点编辑后, 扩增该区域经解链-退火步骤则会在重新随机退火后新的 DNA 双链中形成碱基错配现象, 用 Surveyor 核酸内切酶处理退火后的产物可以对 Cas9 蛋白的切割效率作出评估。

在 *Trim28* 基因组的第一个外显子上下游

600 bp 设计引物 SUVRYOR-F: 5'-cagcagttggcgg-cgagcgcgtct-3' 和 SUVRYOR-R: 5'-tcctctcgcccagg-tggcatcctcat-3'。使用常规 PCR 扩增方法和 JumpStart™Taq Ready Mix (Sigma 公司) 分别在 WT、gRNA1+gRNA2 pool、gRNA3+gRNA4 pool 基因组 DNA 样品中扩增目的条带, 设计退火程序: -0.3°C/s, 从 95°C 退火至 25°C, 使用 Surveyor®Mutation Detection Kits (Integrated DNA Technologies 公司) 加入 0.5 µl Surveyor Enhancer S 和 Surveyor Nuclease S, 放于 42°C 水浴锅孵育 30 min, 利用琼脂糖凝胶电泳评估 gRNA 切割效果。

1.7 生物信息学分析

野生型和基因敲除型 RNA-seq 样品各有 3 个生物学重复, 生物信息学分析的标准化参数在每个 IGV 示意图的左上部分。测序数据经过 FastQC^[11] 检验后, 经过 Trimmol/Lomatic^[12] 软件处理去掉接头及低质量序列。RNA-seq 数据通过 Tophat^[13] 软件比对到人 hg38 基因组, ChIP-seq 数据通过 Bowtie2^[14] 软件比对到人 hg38 基因组。Htseq-count^[15] 软件用来计算 RNA-seq 数据中各样品比对上的序列数目, DESeq2^[16] 和 R 用来计算差异表达基因和基因的 RPKM (reads kilobases per million reads) 值。差异表达倍数 2 倍以上并且 padj (p-adjusted) < 0.05 的基因被定义为显著上调或下调的差异基因。ChIP-seq 数据比对后, 取唯一比对的序列, 并且去掉冗余的序列进行后续的分析。IGV^[17] 软件用来数据的可视化, MACS2^[18] 软件进行数据峰值计算。文中热图 (Heatmap) 及线图通过 R 软件绘制。

实验中使用到的抗体及货号: TRIM28 抗体 (Active Motif, 61174)、H3K27ac 抗体 (Abcam, ab4729)、H3K4me1 抗体 (Abcam, ab8895)、H3K4me3 抗体 (Abcam, ab8580)、H3K9me3 抗体 (Abcam, ab8898)、PCDHB14 抗体 (Abgent, A-AP12321a)、TUBULIN 抗体 (ABclonal, AC008)、ZNF93 抗体 (Abgent, A-AP20006A)。

2 结 果

2.1 成功构建 *Trim28* 基因敲除细胞系和 TRIM28 回补细胞系

利用 CRISPR/Cas9 技术, 设计靶向 *Trim28* 起始密码子下游第一位外显子分别切割不同位置的 gRNA1、gRNA2、gRNA3 和 gRNA4。将 4 种不同

的 gRNA 分为两组, gRNA1 和 gRNA2 为一组, gRNA3 和 gRNA4 为一组, 两组 HEK293F 细胞系分别转染两组 gRNA 质粒 (图 1a), 分别提取野生型 HEK293F 细胞系、gRNA1+gRNA2 pool 和 gRNA3+gRNA4 pool 细胞系的基因组 DNA, Surveyor 实验检测 gRNA 切割效率。根据琼脂糖凝胶电泳结果, 与野生型 HEK293F 细胞系比较, 发现 gRNA1+gRNA2 pool 和 gRNA3+gRNA4 pool 细胞系 DNA 条带底部具有箭头所示的弥散状条带 (图 1b), 证明 Cas9-gRNA 切割 DNA 片段导致基因组 DNA 碱基产生错配。96 孔板分单克隆, 利用 SUVROR-F 和 SUVROR-R 引物进行常规 PCR, PCR 产物进行 Sanger 测序, 测序结果和野生型对比, 获得两株

Trim28 基因组产生移码突变的细胞系, 其中一株碱基缺失 193 bp, 称为 TRIM28 KO1 细胞系, 另一株碱基缺失 412 bp, 称为 TRIM28 KO2 细胞系 (图 1c)。利用免疫印迹技术对比野生型 HEK293 细胞系 TRIM28 蛋白表达量, 结果证明在 *Trim28* 基因缺失的细胞系中 *Trim28* 完全敲除, 蛋白质表达显著降低 (图 1d)。通过构建 *Trim28* cDNA 质粒在 *Trim28* 基因敲除细胞系中回补 *Trim28* 基因, 免疫印迹结果证明回补的 TRIM28 蛋白量和野生型 HEK293F 细胞系 TRIM28 蛋白表达量基本一致 (图 1e), 这些结果表明 *Trim28* 基因敲除细胞系和 TRIM28 回补细胞系被成功构建。

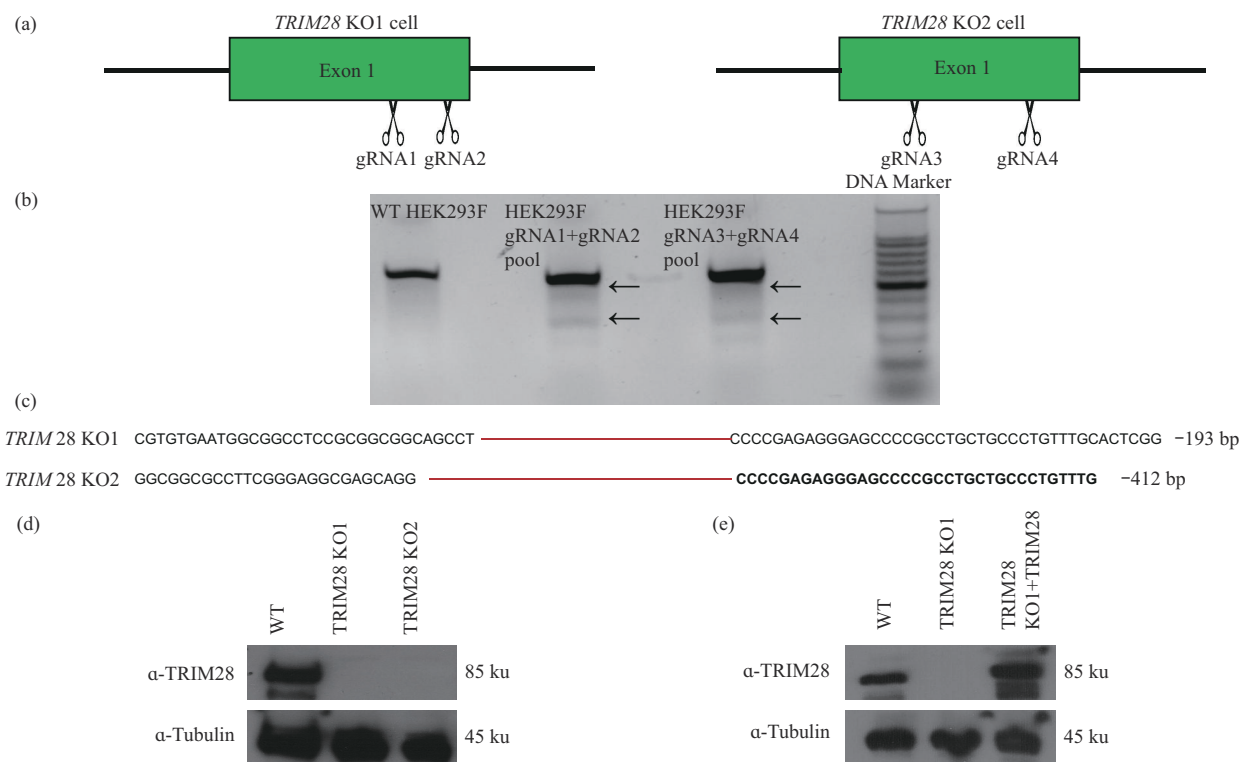


Fig. 1 Generation of *Trim28* gene knockout cell line and TRIM28 rescue cell line

(a) Schematic representation of the knockout targeting strategy, the targeting region located in exon 1. (b) Surveyor assay result shows Cas9 gRNA efficiency. Arrows at the bottom of main band indicate the smear band reflecting the efficiency of Cas9 gRNA. (c) *Trim28* genomic DNA was deleted in *Trim28* KO1 and *Trim28* KO2 cell lines. (d) Knockout efficiency was detected by Western blot in HEK293 cell line. (e) Rescue efficiency was detected by Western blot.

2.2 TRIM28抑制内源表达量较低的基因的转录

为了深入研究 TRIM28 的功能, 本文使用 mRNA-seq 测序技术分析野生型 HEK293F 细胞系和 *Trim28* 基因敲除细胞系中转录组的变化。根据结果发现, 和野生型 HEK293F 细胞系相比, 在 *Trim28* 基因敲除细胞系中大部分基因的转录水平上

升 (图 2a)。将 HEK293F 野生型细胞系和 *Trim28* 基因敲除细胞系中基因的 RPKM 值取对数处理后分别分为 3 个小组, 其中 All WT 和 All KO 表示在野生型细胞系和 *Trim28* 基因敲除细胞系中所有基因的表达水平, Down KO 和 Down WT 表示在 *Trim28* 基因敲除细胞系中转录水平下降的那些基因

和它们在野生型中的表达水平, Up KO和Up WT表示在 *Trim28* 基因敲除细胞系中转录水平上升的那些基因和它们在野生型中的表达水平。将 Up KO和Up WT组进行比较, 发现在 *Trim28* 基因敲除

细胞系中转录水平上升的那些基因在野生型属于低表达基因 (图2b), 这些结果说明 TRIM28 主要抑制内源表达水平较低的基因转录。

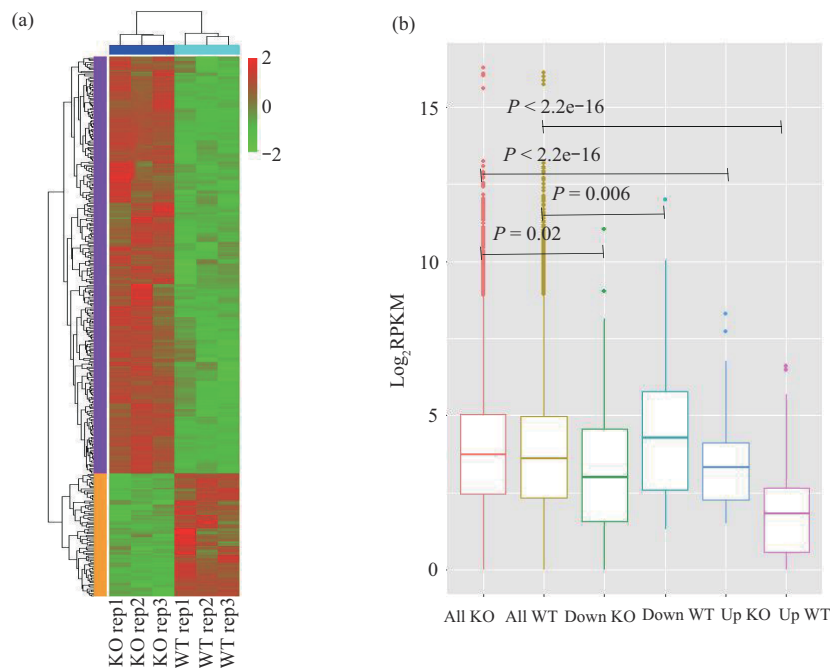


Fig. 2 Up regulated genes by Trim28 KO are low expressed genes in HEK293F cells

(a)The heatmap shows the up and down genes in *Trim28* KO cell line. (b) Box plot shows the up regulated genes in WT (Up WT) are low expressed genes compared to other groups.

2.3 TRIM28抑制锌指蛋白和原钙黏蛋白基因的转录

为了进一步研究 TRIM28 的功能, 将 *Trim28* 基因敲除细胞系中转录水平上升的基因进行分类, 根据 GO 分类结果发现, TRIM28 主要抑制两类基因的转录, 一类是锌指蛋白 (ZNF) 基因, 另一类是原钙黏蛋白 β (PCDH β) 基因 (图3a)。锌指蛋白指的是由一类含有大约 30 个氨基酸的环和一个与环上的 4 个半胱氨酸或 2 个半胱氨酸和 2 个组氨酸配位的锌离子构成的结构像手指状的蛋白质, 锌指蛋白通过和 DNA 或者 RNA 相互作用在生物体内参与细胞分化、信号传导、细胞迁移等多种生物学功能^[19]。在锌指蛋白家族中, 有一类 N 端由 KRAB (Kruppel-associated box) 结构域组成的锌指蛋白^[20]。既往报道发现, TRIM28 在 B 细胞中能够抑制含有 KRAB 结构域的锌指蛋白转录^[21], 这和本文的实验结果一致 (图3a)。

原钙黏蛋白分为 α 、 β 和 γ 3 个亚单元, 根据 mRNA-seq 和 GO 分析结果 (图3a, b) 发现, TRIM28 能够抑制原钙黏蛋白 β 基因的转录, 敲除

Trim28 基因后转录水平显著升高的主要是 β 家族基因。原钙黏蛋白在神经细胞中高表达, 是一种依赖钙离子的黏附分子, 分布于神经细胞膜表面, 主要是参与信号传导作用, 帮助神经细胞参与识别“自我”和“非我”功能^[22]。原钙黏蛋白群在大脑神经网络发育中起到重要作用, 若通过基因敲除或下调原钙黏蛋白, 可导致神经细胞发育异常、彼此不分, 并诱发凋亡^[4]。既往研究集中在 DNA 甲基化和染色质高级结构与原钙黏蛋白转录调控之间的关系^[6, 23], 这是首次发现 TRIM28 和 PCDH β 家族转录调控之间的联系。

2.4 在Trim28基因敲除细胞系中锌指蛋白家族和原钙黏蛋白家族的蛋白质水平升高

本文发现在 *Trim28* 基因敲除细胞系中部分锌指蛋白和原钙黏蛋白 β 的转录水平显著上升, 选择锌指蛋白 ZNF93 和原钙黏蛋白 PCDH β 14 这两个基因作为代表, 检测它们的蛋白质表达水平是否发生变化。免疫印迹 (图4a) 的结果表明, 和野生型 HEK293F 细胞系中 ZNF93 和 PCDH β 14 的蛋白质表达水平相比, 在 *Trim28* 基因敲除细胞系中这两种

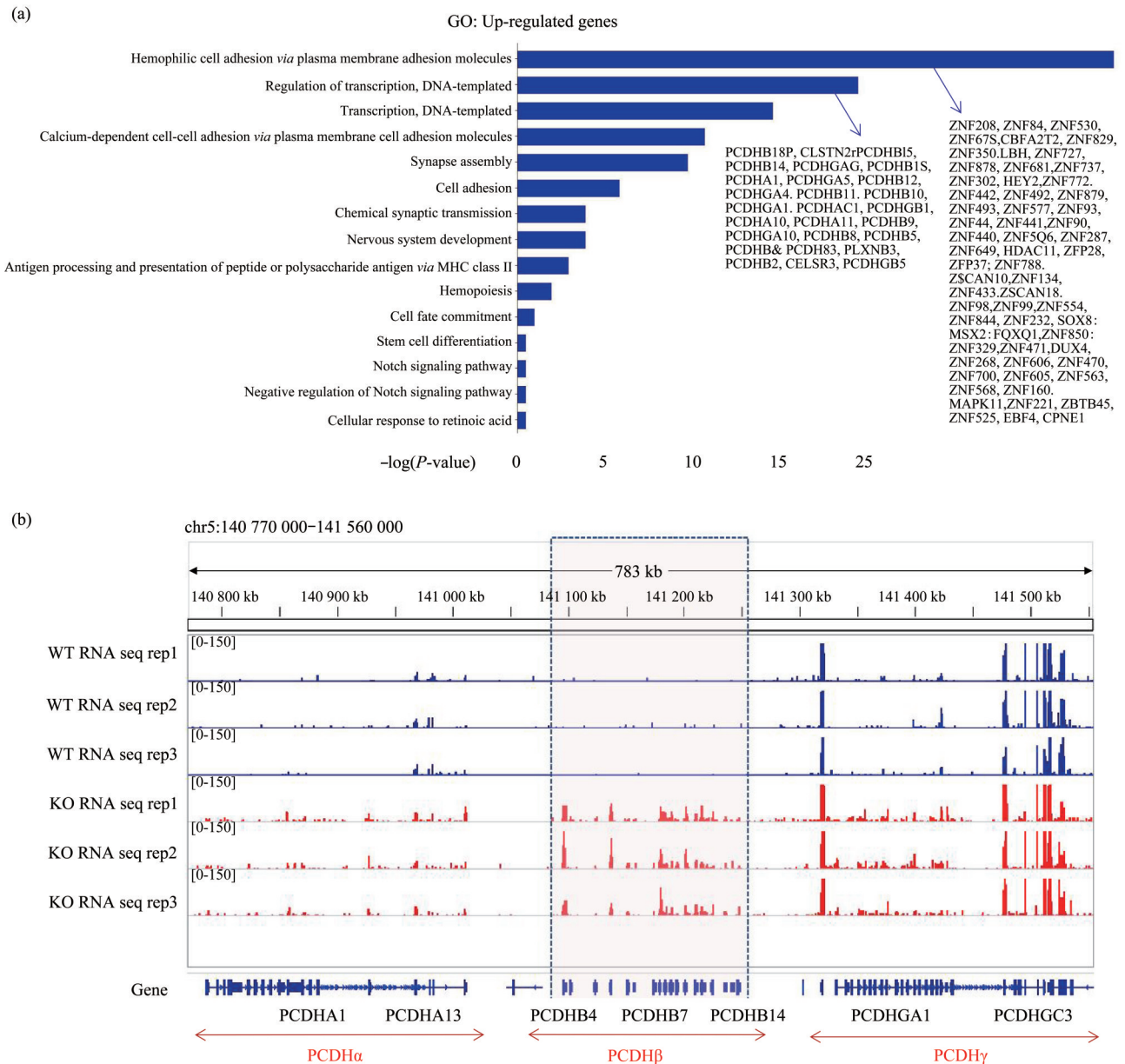


Fig. 3 TRIM28 mainly suppresses the transcription of ZNF family genes and PCDHβ family genes

(a) GO analysis shows up-regulated genes. (b) RNA-seq signal shows the increased of PCDHβ family genes in *Trim28* KO cell line.

蛋白质的表达水平显著上升。由于mRNA-seq数据的RPKM值(图4b)在一定程度上能够反映出mRNA水平,因此认为TRIM28抑制锌指蛋白和原钙黏蛋白的转录活性。当*Trim28*基因敲除后,这两类基因的转录水平显著上升,蛋白质表达水平和野生型相比显著升高。

2.5 *Trim28*基因敲除导致基因组组蛋白修饰发生改变

已经证明TRIM28抑制基因的转录,在*Trim28*基因敲除细胞系中转录水平上升的基因数量大于转录水平下降的基因。为了更深入地研究TRIM28与组蛋白修饰的染色质高级结构之间的关系,本文进

行了H3K4me1修饰、H3K4me3修饰、H3K9me3修饰、H3K27ac修饰、RNA Pol II和TRIM28的染色质免疫共沉淀实验。根据实验结果(图5b)发现,TRIM28主要富集在有H3K9me3修饰、H3K4me3修饰和H3K27ac修饰的位点上。H3K9me3修饰是异染色质的标志,和基因沉默具有相关性,H3K4me3修饰和H3K27ac修饰是启动子与增强子的标志物^[24],这说明TRIM28不仅参与异染色质的建立,还通过远端调控元件调控基因的转录。根据这些修饰在野生型细胞系和*Trim28*基因敲除细胞系中的变化(图5a),发现TRIM28主要参与异染色质的建立过程,敲除*Trim28*导致全基因组范

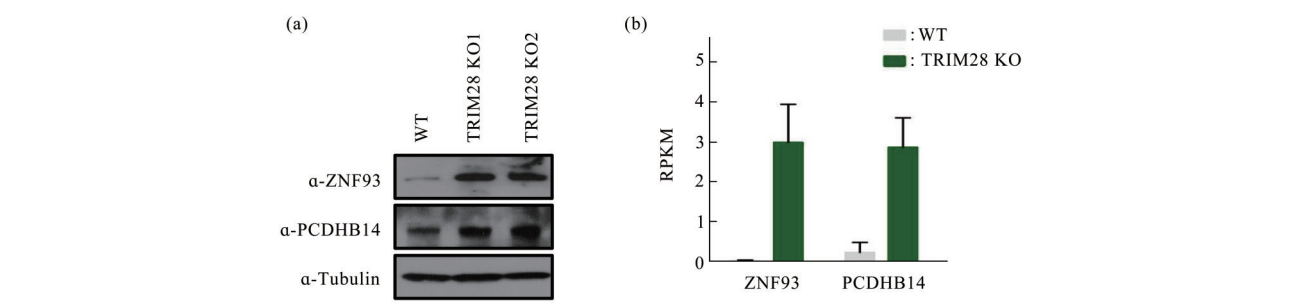


Fig. 4 The protein levels of ZNF and PCDHB increased in *Trim28* knockout cell lines
(a) Protein level was detected by Western blot in HEK293 cell line and *Trim28* KO cell line. (b) RPKM of ZNF93 and PCDHB14 are shown in WT and *Trim28* KO cell line.

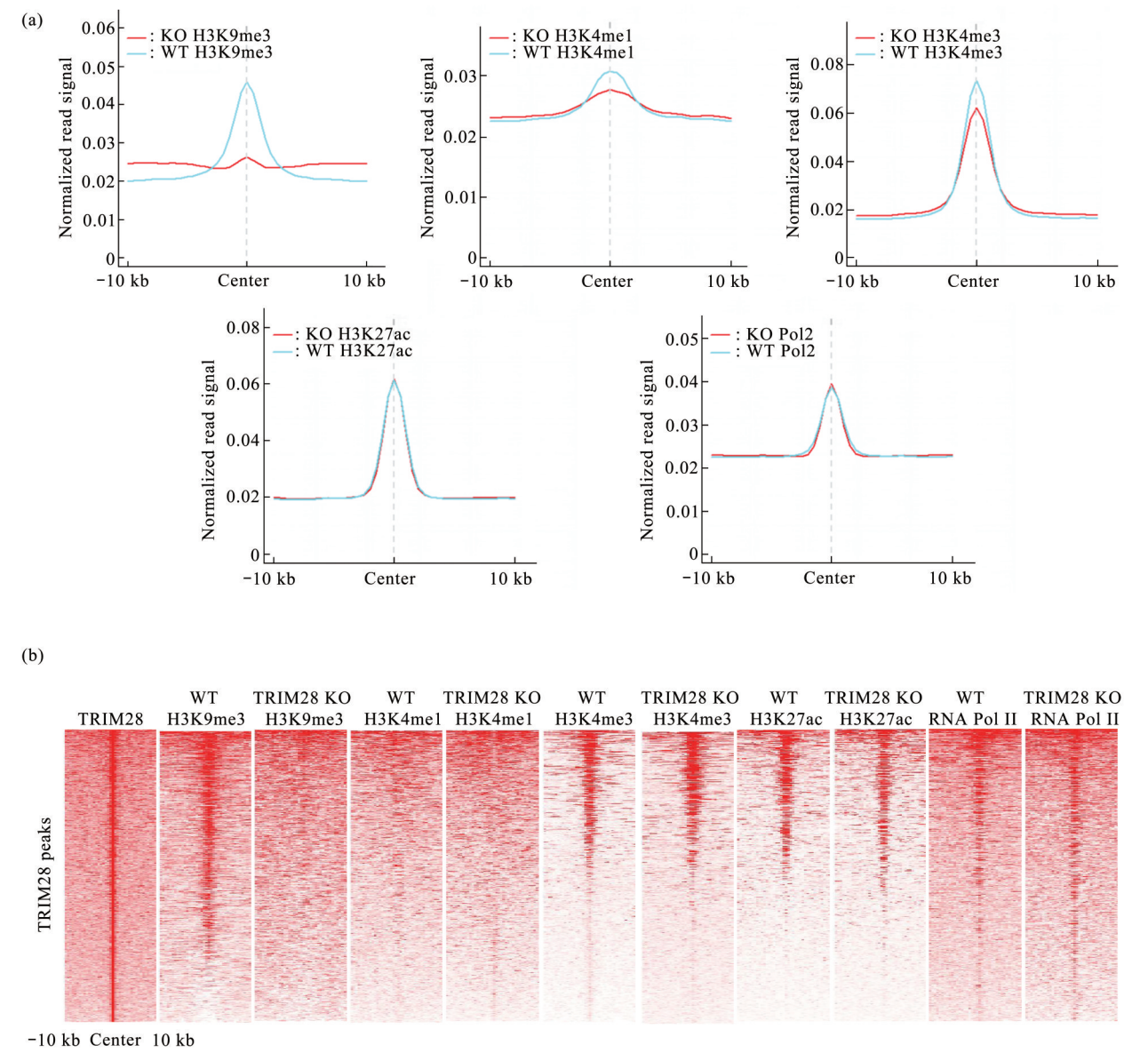


Fig. 5 TRIM28 KO-mediated histone changes at TRIM28 binding sites
(a) Line plots show the histone modification enrichment at TRIM28 binding sites. (b) The heatmap shows the histone modification enrichment at TRIM28 binding sites.

围的 H3K9me3 修饰大幅度降低, H3K4me1 修饰和 H3K4me3 修饰只有部分降低。根据实验结果, 认为 TRIM28 不仅参与其位点的 H3K9me3 修饰的建立也会参与 H3K4me3 修饰的建立。

2.6 Trim28 基因敲除导致锌指蛋白和原钙黏蛋白基因组蛋白修饰发生改变

为了更深入地研究 TRIM28 抑制锌指蛋白和原

钙黏蛋白的机制, 本文分析了这两类基因上组蛋白修饰的变化, 发现 H3K9me3 修饰和野生型 HEK293F 相比大幅度降低, 在锌指蛋白家族基因上 H3K4me1、H3K4me3 和 H3K27ac 都大幅度升高, 这说明染色质的状态由致密变得松散, 还发现锌指蛋白是 TRIM28 的直接靶基因。根据实验结果 (图 6a) 认为, TRIM28 通过参与锌指蛋白基因区

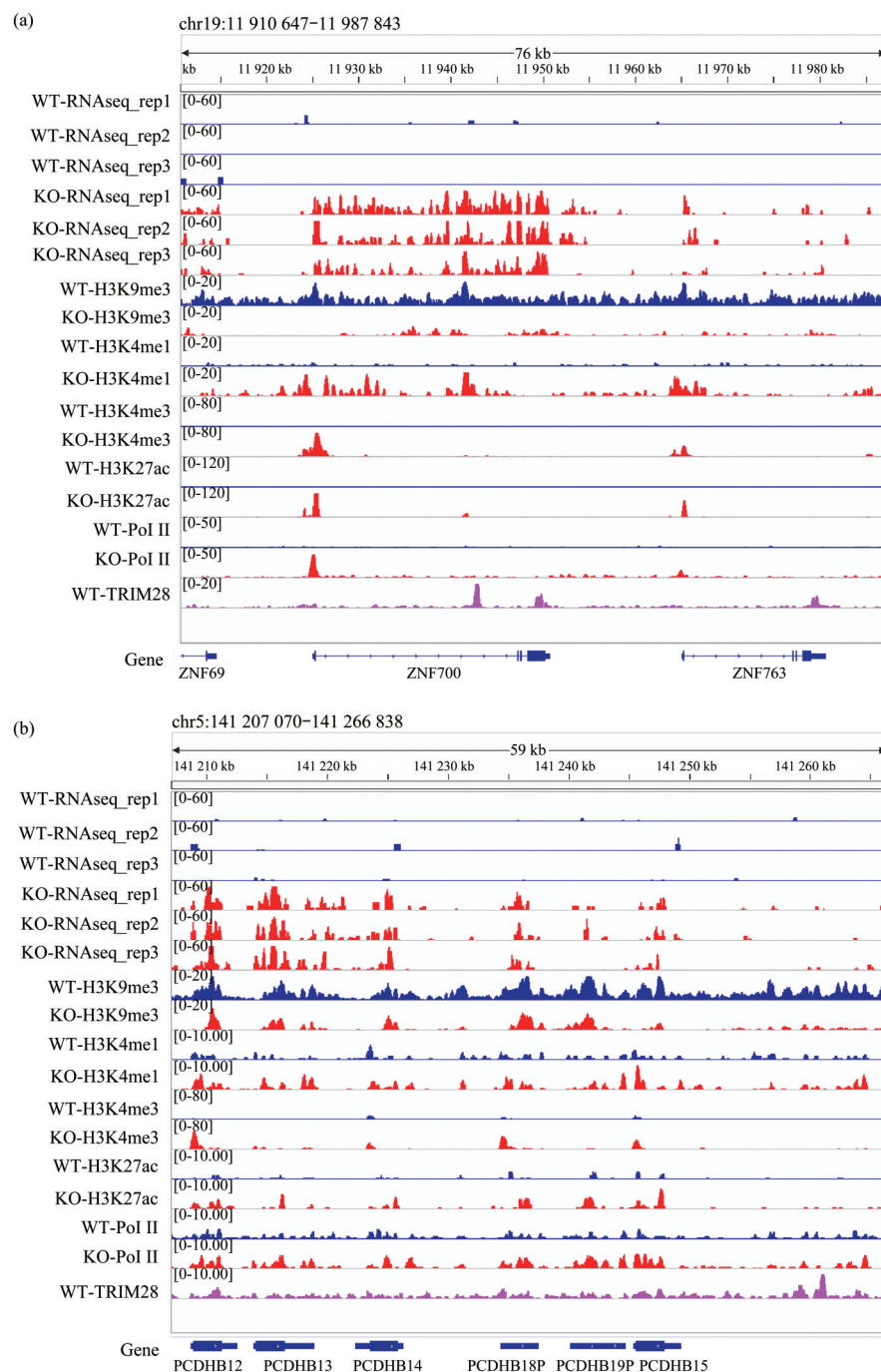


Fig. 6 TRIM28 KO-mediated histone changes

(a) Genome browser tracks show the distribution of histone modification at ZNF genomic region. (b) Genome browser tracks show the distribution of histone modification at PCDHβ genomic region.

域H3K9me3修饰的建立抑制其转录活性,当敲除Trim28后H3K9me3修饰降低,染色质状态由致密变得松散,提高了锌指蛋白的转录活性。本文发现在PCDHβ基因上,H3K9me3修饰大幅度减少,H3K4me3修饰显著上升,H3K4me1修饰和H3K27ac修饰没有明显的变化(图6b)。之前对于原钙黏蛋白基因的研究集中在染色质构架蛋白CTCF通过影响染色质高级结构激活特定的原钙黏蛋白启动子调控原钙黏蛋白的转录^[15-16],本文认为,敲除Trim28导致染色质结构松散,染色质高级结构发生改变,原钙黏蛋白β的转录活性也随之

上升。
2.7 在Trim28敲除细胞系中回补Trim28会部分抑制锌指蛋白和原钙黏蛋白的转录活性

本文在Trim28基因敲除细胞系中回补了Trim28,认为在Trim28基因敲除细胞系中染色质的结构已经发生了改变,染色质结构的变化会导致一些染色质相关因子的定位发生变化,即使回补Trim28基因,染色质相关因子的定位可能不会完全恢复,因此在Trim28回补的细胞系中只能部分抑制锌指蛋白和原钙黏蛋白的转录(图7)。

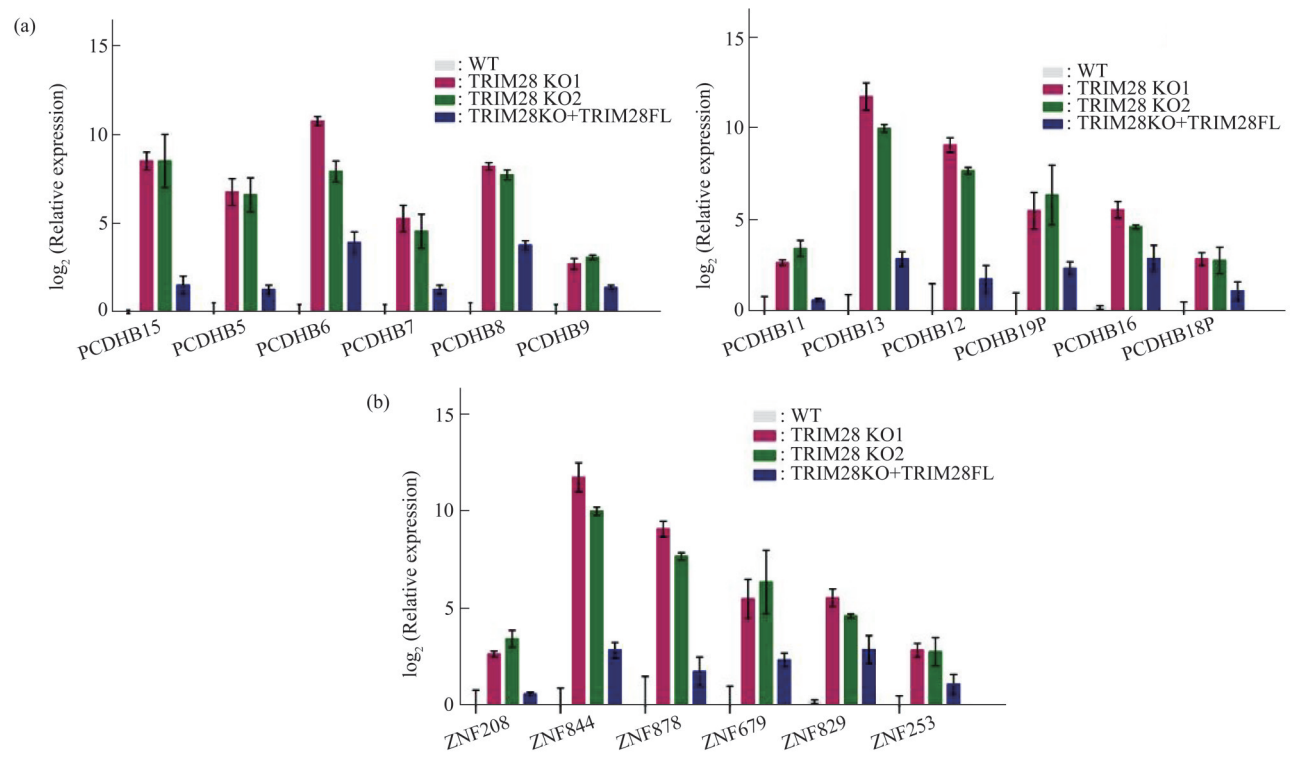


Fig. 7 Reintroduction of TRIM28 full length in Trim28 KO cell line could partially suppress the expression of ZNF family and PCDHβ family
RT-qPCR of PCDHβ and ZNF genes in WT, Trim28 KO and TRIM28 rescue (TRIM28KO+TRIM28FL) cell lines.

3 讨 论

TRIM28最早被鉴定能够抑制锌指蛋白的转录^[1],随后的研究发现TRIM28通过和异染色质相关蛋白HP1、SETDB1相互作用,在靶基因上建立H3K9me3修饰从而抑制基因的转录^[17-18]。对于TRIM28的其他生物学功能并不清楚,为了更深入地研究TRIM28的功能,本文首先建立了Trim28基因敲除细胞系,通过RNA-seq发现TRIM28主要是

抑制内源表达较低基因的转录。然后,通过GO分析发现,TRIM28能够抑制两类基因的转录,锌指蛋白基因和原钙黏蛋白β基因。为了进一步解释其中的机理,本文又进行了染色质免疫共沉淀实验,发现组蛋白修饰和TRIM28之间的关系,在Trim28基因敲除细胞系中,H3K9me3修饰下降,导致染色质结构松散,使得基因的转录活性增强。在锌指蛋白基因区域,TRIM28直接参与异染色质的建立,维持基因的沉默。TRIM28通过间接作用调控

原钙黏蛋白基因的转录活性。

既往对于原钙黏蛋白基因的研究集中在, 染色质构架蛋白 CTCF 通过影响染色质高级结构, 激活特定的原钙黏蛋白启动子, 调控原钙黏蛋白的转录^[25-26]。根据实验结果推测, 在 *Trim28* 基因敲除细胞系中染色质高级结构的改变导致染色质相关因子 CTCF 在原钙黏蛋白区域的分布发生变化, 从而引起启动子区域 H3K4me3 修饰的变化, 增强原钙黏蛋白的转录活性。

4 结 论

本文利用 CRISPR/Cas9 技术, 通过在 HEK293 F 细胞系中建立 *Trim28* 基因敲除型细胞作为实验材料, 通过综合运用生物信息学和蛋白质组学的方法, 鉴定出 TRIM28 抑制锌指蛋白家族基因和原钙黏蛋白家族基因, 初步探讨了组蛋白修饰和 TRIM28 转录抑制基因之间的关系, 发现 TRIM28 主要是通过基因组范围内建立 H3K9me3 修饰抑制基因的转录, 为更深入地研究 TRIM28 和染色质高级结构以及原钙黏蛋白家族基因之间的分子机制提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] Friedman J R, Fredericks W J, Jensen D E, *et al.* KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes Dev*, 1996, **10**(16):2067-2078
- [2] Ivanov A V, Peng H, Yurchenko V, *et al.* PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. *Mol Cell*, 2007, **28**(5): 823-837
- [3] Bunch H, Zheng X, Burkholder A, *et al.* TRIM28 regulates RNA polymerase II promoter-proximal pausing and pause release. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, **21**(10):876-883
- [4] Yagi T. Clustered protocadherin family. *Dev Growth Differ*, 2008, **50**(1):67-70
- [5] Hirayama T, Tarusawa E, Yoshimura Y, *et al.* CTCF is required for neural development and stochastic expression of clustered Pcdh genes in neurons. *Cell Rep*, 2012, **2**(2):345-357
- [6] Guo Y, Xu Q, Canzio D, *et al.* CRISPR inversion of CTCF sites alters genome topology and enhancer/promoter function. *Cell*, 2015, **162**(4):900-910
- [7] Ming X, Zhang Z, Zou Z, *et al.* Kinetics and mechanisms of mitotic inheritance of DNA methylation and their roles in aging-associated methylome deterioration. *Cell Res*, 2020, **30**(11): 980-996
- [8] Shalem O, Sanjana N E, Hartenian E, *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, **343**(6166):84-87
- [9] Xiong J, Zhang Z, Chen J, *et al.* Cooperative action between SALL4A and TET proteins in stepwise oxidation of 5-methylcytosine. *Mol Cell*, 2016, **64**(5):913-925
- [10] Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*, 2008, **26**(9):1135-1145
- [11] Andrew S. A quality control tool for high throughput sequence data. *FastQC*, 2010, **5**(11):980-996
- [12] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmol/Lomatic: a flexible trimmol/Ler for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 2014, **30**(15):2114-2120
- [13] Trapnell C, Pachter L, Salzberg S L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, 2009, **25**(9):1105-1011
- [14] Langmead B, Salzberg S L. Fast gapped-read alignment with bowtie 2. *Nat Methods*, 2012, **9**(4):357-359
- [15] Anders S, Pyl P T, Huber W. HTSeq—a python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 2015, **31**(2):166-169
- [16] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with deseq2. *Genome Biol*, 2014, **15**(12):11-21
- [17] Robinson J T, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, *et al.* Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*, 2011, **29**(1):24-26
- [18] Zhang Y, Liu T, Meyer C A, *et al.* Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol*, 2008, **9**(9):1-9
- [19] Cassandri M, Smirnov A, Novelli F, *et al.* Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov*, 2017, **3**(1):29-35
- [20] Ecco G, Imbeault M, Trono D. KRAB zinc finger proteins. *Development*, 2017, **144**(15):2719-2729
- [21] Tie C H, Fernandes L, Conde L, *et al.* KAP 1 regulates endogenous retroviruses in adult human cells and contributes to innate immune control. *EMBO Rep*, 2018, **19**(10):11-13
- [22] Sano K, Tanihara H, Heimark R L, *et al.* Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *EMBO J*, 1993, **12**(6):2249-2256
- [23] Toyoda S, Kawaguchi M, Kobayashi T, *et al.* Developmental epigenetic modification regulates stochastic expression of clustered protocadherin genes, generating single neuron diversity. *Neuron*, 2014, **82**(1):94-108
- [24] Armstrong L. Epigenetics. Boca Raton: Garland Science, 2014: 15-16
- [25] Zhai Y, Xu Q, Guo Y, *et al.* Characterization of a cluster of CTCF-binding sites in a protocadherin regulatory region. *Hereditas*, 2016, **38**(4):323-336
- [26] Golan-Mashiach M, Grunspan M, Emmanuel R, *et al.* Identification of CTCF as a master regulator of the clustered protocadherin genes. *Nucleic Acids Res*, 2012, **40**(8):3378-3391

Heterochromatin Related-protein TRIM28 Regulates The Transcription of Zinc Finger Protein Family Genes and Protocadherin Protein Family Genes

ZHANG Xiang-Yu*, BU Jia-Chen

(National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract **Objective** TRIM28 (TRiPartate motif-containing protein 28), also called KAP1 (KRAB-associated protein1) or TIF1 β (transcription intermediary factor 1 β), is a heterochromatin related protein, composed of RBCC domain in N terminal and PHD, BROMO, NHD domain in C terminal, which participates in the establishment of H3K9me3 modification and SUMOylation pathway. The present study is to further explore the function of TRIM28. **Methods** We used CRISPR/cas9 technology, chromatin immunoprecipitation assay, Western blot, quantitative real-time assay in HEK293F cell line to further study the function of TRIM28. We knocked out *Trim28* gene in HEK293F cell line by CRISPR/cas9 technology. **Results** By analyzing experimental data, we found that TRIM28 mainly suppresses the transcription of genes with low endogenous expression level. Further analysis by GO bioinformation assay, we found that TRIM28 regulates zinc finger protein family genes and protocadherin protein family genes. According to the results of ChIP-seq, we found that in *Trim28* knockout cell lines, the global distribution pattern of H3K9me3 decreased dramatically and H3K4me3 dropped moderately in TRIM28 target sites, indicating TRIM28 not only regulates the establishment of heterochromatin but also affects *cis*-acting elements. Meanwhile, H3K27ac modification, H3K4me1 modification and H3K4me3 modification in zinc finger protein family genes increased significantly, H3K9me3 decreased dramatically. H3K4me3 modification in protocadherin protein family genes increased significantly, H3K9me3 decreased dramatically. Previous study showed that protocadherin protein family genes mainly engaged in the identification and recognition of axon and dendrites in neuron cell. **Conclusion** In our study, it's the first time to show the relationship between TRIM28 and protocadherin protein family genes. These results suggest that TRIM28 regulates zinc finger and protocadherin β genes by changing the chromatin accessibility and provide a new idea for further study of the relationship between TRIM28 and chromatin higher order structure.

Key words TRIM28, heterochromatin, H3K9me3, protocadherin protein β family, zinc finger protein family

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0263

* Corresponding author.

Tel: 86-15811513628, E-mail: zhangxy332@163.com

Received: September 5, 2021 Accepted: November 5, 2021