

红鳍东方鲀结合CCL25b核心启动子区转录因子的鉴定

尚凤芹^{1,2}, 李岩¹, 陆芸¹, 王秀利¹, 刘洋^{1*}

¹大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连

²大连海洋大学海洋科技与环境学院, 辽宁 大连

收稿日期: 2021年9月22日; 录用日期: 2021年10月22日; 发布日期: 2021年10月29日

摘要

基因转录调控一直是生物信息学研究的一个重要内容, 转录因子与启动子区域上的特异性调控元件的结合在基因表达和调控中具有重要意义, 是构建基因调控网络的一个核心问题。趋化因子配体25 (chemokine 25, CCL25)是一种属于CC趋化因子家族的小细胞因子, 在免疫细胞调节和炎症过程如T细胞归巢和慢性组织炎症中均发挥重要作用。为了探究CCL25在表达过程中受到的转录调控机制, 本实验我们初次采用聚合酶链式反应(PCR)扩增出红鳍东方鲀CCL25b的核心启动子区, 并利用DNA pull down方法对结合在该序列的蛋白质进行富集, 最后结合质谱鉴定数据及GO富集分析初步筛选出6个转录因子(C1QBP、PURA、ARHGAP35、NME2、RAP2C和DRG1), 这些初步结果将有助于推进对与CCL25表达调节机制有关的潜在生物学过程的理解。

关键词

启动子, 转录因子, DNA pull down, 质谱鉴定

Identification of Transcription Factors Binding the Core Promoter Region of CCL25b in *Takifugu rubripes*

Fengqin Shang^{1,2}, Yan Li¹, Yun Lu¹, Xiuli Wang¹, Yang Liu^{1*}

¹College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian Liaoning

²College of Marine Technology and Environment, Dalian Ocean University, Dalian Liaoning

Received: Sep. 22nd, 2021; accepted: Oct. 22nd, 2021; published: Oct. 29th, 2021

*通讯作者。

文章引用: 尚凤芹, 李岩, 陆芸, 王秀利, 刘洋. 红鳍东方鲀结合 CCL25b 核心启动子区转录因子的鉴定[J]. 海洋科学前沿, 2021, 8(4): 69-81. DOI: 10.12677/ams.2021.84008

Abstract

Gene transcriptional regulation has been an important element of bioinformatics research. The binding of transcription factors to specific regulatory elements on promoter regions is important in gene expression and regulation, and is a central issue in the construction of gene regulatory networks. Chemokine ligand 25 (CCL25) is a small cytokine belonging to the CC chemokine family that plays an important role in immune cell regulation and inflammatory processes such as T cell homing and chronic tissue inflammation. In order to investigate the transcriptional regulation mechanism of CCL25 in its expression, Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the core promoter region of CCL25b in *Takifugu rubripes*, and then DNA pull down was used to enrich the proteins bound to this sequence. Finally, we combined the mass spectrometry identification data with GO enrichment analysis to initially identify six transcription factors (*C1QBP*, *PURA*, *ARHGAP35*, *NME2*, *RAP2C* and *DRG1*), and these results will help advance the understanding of the underlying biological processes associated with the regulatory mechanism of CCL25 expression.

Keywords

Promoter, Transcription Factor, DNA pull down, Mass Spectrometry Identification

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

趋化因子配体 25 (chemokine 25, CCL25)是一种属于 CC 趋化因子家族的小细胞因子, 也称为胸腺表达的趋化因子(TECK)。研究表明 CCL25 在 T 细胞的发育中起作用[1]。在豚鼠骨关节炎模型中也被证实, 关节内注射 CCL25 联合透明质酸可保护软骨免受蛋白多糖丢失和与膝关节软骨破坏相关的形态恶化[2]。多项研究表明, 趋化因子受体 9 (chemokine receptor 9, CCR9)及其专用配体 CCL25 在多种恶性肿瘤中过表达, 并与肿瘤的增殖、凋亡、侵袭、迁移和耐药密切相关[3]。综上, CCL25 在免疫细胞调节和炎症过程如 T 细胞归巢和慢性组织炎症中发挥重要作用。因此, 全面了解 CCL25 表达及其活性的调控机制具有重要意义。

基因的转录是由被称为启动子的上游调控 DNA 的结构决定的。理解真核生物和原核生物的转录调控, 需要对与感兴趣的启动子结合的调控蛋白进行鉴定。转录因子与启动子区域上的特异性调控元件的结合在基因表达和调控中至关重要[4]。激活转录这一活动需要与 DNA 结合的反式激活子募集转录共激活因子或抑制子, 以及众多与基础转录因子相互作用的相关蛋白, 因而分析这些与 DNA 结合的大型蛋白质复合物是阐明调节基因表达机制的重要步骤[5]。转录因子一般由两个功能结构域组成, 一是 DNA 结合结构域, 二是转录活化结构域。根据作用效果的差异, 转录因子可分为转录抑制因子和转录激活因子两大类。当细胞中没有诱导物时, 转录抑制因子可以与调控序列结合并使附近的启动子失去转录活性。一旦诱导物出现, 抑制因子即从靶 DNA 区域脱离, 同时启动子的转录活性恢复。而转录激活因子一般需与效应配体相互作用才能实现其激活功能。根据启动子 DNA 结合位点的不同, 抑制因子和激活因子之间是可以转化的[6]。

目前, 已有多种方法可用于 DNA 结合蛋白的检测和分离, 比如: 凝胶迁移实验(EMSA)、足迹实验

(Foot-printing Assay)、干扰实验(Interference Assays)、染色质免疫共沉淀(ChIP)、DNA-蛋白质印迹杂交(Southwestern Blot)和 DNA pull down 等。而相较于以上所有的分离方法, DNA pull down 的优点在于可以同时分析复合物中的大量蛋白质。Wu-Guo Deng 等人将环氧合酶-2 启动子作为探针, 与核提取物孵育, 最后通过免疫印迹评估复合物中的蛋白质, 检测到一系列转录因子[7]。为了探究蛋白混合物中的结合蛋白, 质谱技术可以对蛋白质复合物进行更加深入地定量分析。Diem Hong Tran 等人将 DNA pull down 与二维凝胶电泳和质谱分析相结合, 鉴定了六种与人 D-氨基酸氧化酶基因 5'侧翼区域结合的蛋白质[8]。该方法在确定反激活因子 p300/CBP 和相关蛋白与环氧合酶-2 (COX-2)启动子结合的调控方面同样被证明是有用的。

本实验中, 我们使用 PCR 技术扩增获得了 CCL25b 的启动子序列, 并成功制备了红鳍东方鲀脑和鳃组织总蛋白。通过 DNA pull down 技术获得了与 CCL25b 基因的启动子序列相互作用的蛋白, 这些蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测并进行质谱鉴定分析。我们的结果首次报道了 CCL25b 基因启动子序列相互作用蛋白, 这可能成为进一步研究 CCL25b 基因表达调控因子的潜在靶点之一。

2. 材料与方法

2.1. 引物设计

本实验以红鳍东方鲀基因组 DNA 为模板, 在 NCBI 数据库中检索 CCL25b 基因序列, 确定出 CCL25b 的核心启动子区域, 选取基因转录起始位点上游 2000 bp 及下游 500 bp 为靶序列进行巢式 PCR 反应以克隆启动子片段, 利用 Primer Primer5.0 设计两对引物(表 1), 其中 CCL25bF1 和 CCL25bR1 为 CCL25b 巢式 PCR 的外引物, CCL25bF2b 和 CCL25bR2U 为 CCL25b 巢式 PCR 的内引物, UPL 为具有生物素标记的特异性通用引物。CCL25bF1 和 CCL25bR1 引物委托上海捷瑞生物工程有限公司合成并纯化, CCL25bF2b、CCL25bR2U 和生物素标记的特异性通用引物委托华大基因合成并纯化。不同引物在基因 CCL25b 核心启动子区的定位如图 1 所示, 其中 TSS 为转录起始位点。

Table 1. Primer sequences

表 1. 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	Tm (°C)
CCL25bF1	GGTGTCTGTCGTTATGAATCG	52.59
CCL25bR1	CAGGCTCACGTACATGCAG	54.12
CCL25bF2b	GCAGTAGCGCGCAGTCGT	60.00
CCL25bR2U	CCAGCGGCTTGACTGTCTGTGCAGCTTGTGGTG	71.57
UPL	AGAGCATTGCGACCAGCGGCTTGAC	66.51

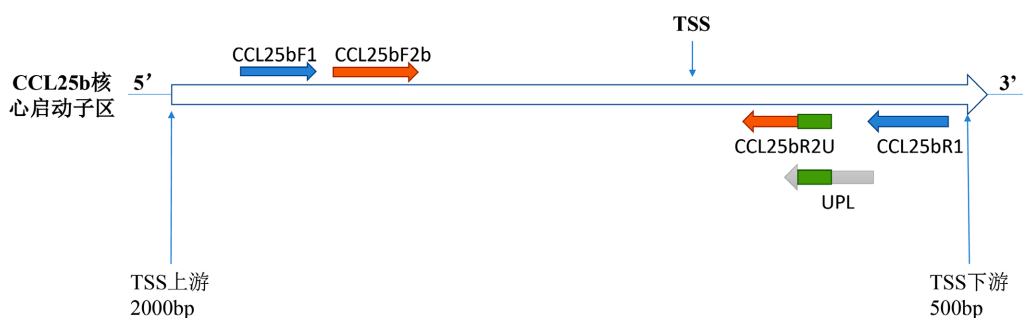


Figure 1. Cloning strategy of promoters

图 1. 启动子的克隆策略

2.2. 基因组 DNA 的提取及启动子片段的标记

取适量红鳍东方鲀的肌肉组织, 使用天根生化科技(北京)有限公司的 DNA 提取试剂盒(目录号: DP324)提取基因组 DNA, 提取的 DNA 置于 -20°C 冰箱保存备用。

以红鳍东方鲀基因组 DNA 为模板, 使用外引物对进行普通 PCR 反应以克隆启动子片段, 反应体系(20 μL)如表 2。

Table 2. PCR reaction system
表 2. PCR 反应体系

试剂名称	体积
10 \times buffer	2 μL
dNTPs	1.5 μL
Primers	0.5 μL
Template DNA	0.2 μL
rTaq	0.2 μL
ddH ₂ O	up to 20 μL

反应条件: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 59°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min 10 s, 共进行 34 个循环; 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存。

用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物条带大小是否正确, PCR 产物条带检测合格后, 使用天根生化科技(北京)有限公司的 DNA 凝胶回收试剂盒(目录号: DP209)回收纯化正确条带, 实验步骤参照试剂盒所提供方法。

将回收到的基因片段作为二次 PCR 的模板, 进行降落 PCR 反应以克隆带有生物素标记的启动子片段, 反应体系(20 μL)如表 3。

Table 3. Touchdown PCR reaction system
表 3. 降落 PCR 反应体系

试剂名称	体积		
	长片段	短片段	阴性对照
2 \times phanta buffer	10 μL	10 μL	10 μL
dNTPs	0.4 μL	0.4 μL	0.4 μL
CCL25bF2b	1 μL	1 μL	1 μL
CCL25bR2U	1 μL	1 μL	-
UPL	1 μL	-	1 μL
模板 DNA	1 μL	1 μL	1 μL
Phanta 酶	0.4 μL	0.4 μL	0.4 μL
ddH ₂ O	up to 20 μL	up to 20 μL	up to 20 μL

反应条件: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 72°C 退火与延伸 1 min 30 s, 共进行 5 个循环; 94°C 变性 30 s, 68°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min 10 s, 共进行 5 个循环; 94°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min 10 s, 共进行 25 个循环; 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存。

用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物条带大小是否正确, 在检测产物条带大小正常的情况下, 收集带有生物素标记的启动子片段并用天根生化科技(北京)有限公司普通 DNA 产物纯化试剂盒(目录号: DP204)进行纯化, 实验步骤参照试剂盒所提供方法。将纯化后带有生物素标记的启动子片段送至北京六合华大基因科技有限公司进行测序, 使用 NanoDrop2000 (Thermo Scientific, USA)进行浓度测定并置于 -20°C 保存以备下游实验。

2.3. 活性组织总蛋白的制备

使用上海生工的《一步法动物组织活性蛋白提取试剂盒》(产品编号: C500006)提取红鳍东方鲀脑、鳃组织总蛋白。将提取得到的组织活性总蛋白用 biosharp 的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(产品编号: BL521A)及紫外分光光度计进行蛋白标准曲线的绘制并计算所提蛋白浓度, 实验步骤参照试剂盒所提供方法。最后将所提活性蛋白分装并置于 -80°C 保存备用。

2.4. 启动子 - 磁珠的结合

按照 Streptavidin Magnetic Beads (New England BioLabs, USA. 目录号: S1420S)说明书中的磁珠与核酸的结合容量, 每 1 mg 磁珠可结合 500 pmol 以上的单链 25 bp 生物素标记的寡核苷酸, 结合 2.2 中测得的带有生物素标记的启动子片段浓度, 将磁珠与生物素标记的启动子片段共孵育。首先取出于 4°C 存放的磁珠并涡旋振荡使磁珠彻底悬浮, 然后取 30 μL 磁珠置于 1.5 mL 无菌无酶的离心管中, 向其中加入 200 μL Wash/Binding Buffer, 并涡旋以悬浮磁珠, 置于磁力架上静置 2 min, 去上清, 重复三次; 接着向洗涤后的磁珠中加入 520 μL 生物素标记的 CCL25b 启动子片段(按照磁珠结合核苷酸标准的 1.5 倍原则加入), 涡旋以悬浮磁珠, 4°C 过夜, 然后将磁珠与启动子片段的复合物置于磁力架上静置 2 min, 去上清; 向所得沉淀中加入 500 μL Wash/Binding Buffer, 涡旋以悬浮磁珠, 置于磁力架上静置 2 min, 去上清, 重复三次; 向上述所得沉淀中加入 100 μL TE 并用移液器轻轻吹吸混匀, 得启动子 - 磁珠复合物。

2.5. DNA pull down

根据 2.3 中所测得的红鳍东方鲀脑、脑组织总蛋白的浓度, 按照每 30 μL 磁珠加入 500 μg 组织总蛋白的标准, 制备启动子 - 磁珠 - 蛋白复合物。首先将活性组织总蛋白从 -80°C 取出并置于冰盒内缓慢复温, 取 110 μL 脑组织蛋白样品、170 μL 鳃组织蛋白样品分别向其中加入 2 μL 蛋白酶抑制剂、2 μL DTT, 混匀后加入到过夜孵育后的启动子 - 磁珠复合物中并置于 4°C 孵育 5 h。然后将孵育后的复合物置于磁力架上静置 2 min, 去除上清液, 收集磁珠。用冰冷 PBS (500 μL) 洗涤上述收集到的磁珠, 重复三次, 尽可能去除上清, 收集沉淀, 得到启动子 - 磁珠 - 蛋白复合物。向上述所得复合物中加 72 μL PBS 悬浮, 取出 15 μL 用于 SDS-PAGE 垂直电泳检测, 剩余 57 μL 置于磁力架上加磁力 2 分钟, 弃上清, 沉淀置于 -80°C 保存用于质谱鉴定。

2.6. 银染

SDS-PAGE 垂直电泳完毕后, 我们使用上海生工的低背景银染试剂盒(产品编号: C510027)对凝胶进行染色, 实验步骤参照试剂盒所提供方法, 染色完毕后进行拍照。

2.7. 质谱检测

为了分析 DNA pull down 得到的 CCL25b 启动子结合蛋白的种类, 我们将步骤 2.5 中得到的启动子 - 磁珠 - 蛋白复合物送到上海拜谱生物科技有限公司进行质谱分析(QE 鉴定)。质谱测试数据用 MaxQuant1.6.1.0 软件检索 Uniprot Protein Database 数据库。基于强度定量法(Intensity based absolute

quantification, iBAQ)对鉴定的蛋白质进行定量[9],其基本原理为每个蛋白质鉴定到的全部肽段曲线下的面积之和(AUCs)与此蛋白的理论酶切肽段数(N)之比为此蛋白的表达量(AUCs/N)。

2.8. GO 富集分析

将质谱结果分析后,通过 R 语言包 clusterProfiler v3.18.1 [10]对鉴定得到的蛋白进行 GO 富集分析,以此确定质谱检测到的蛋白质行使的主要生物学功能。其中 adjusted *P*-values < 0.05 的 GO 术语即为质谱检测到的蛋白质显著富集的 GO term。

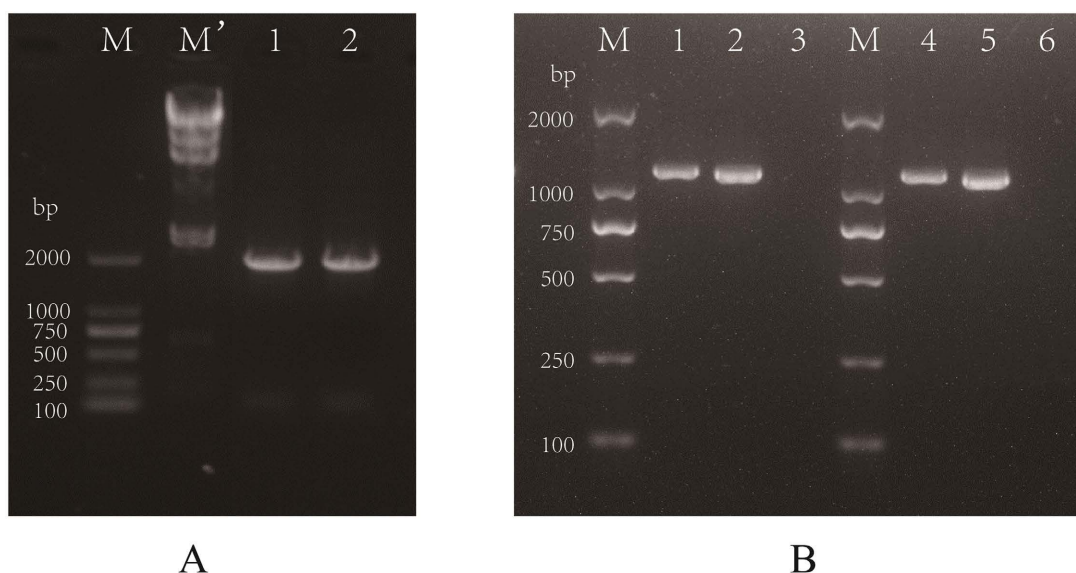
2.9. 蛋白质相互作用分析

结合 GO 富集分析结果以及 UniProt (<https://www.uniprot.org/>)和 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)网站对蛋白基本功能的注释,我们将富集到“核酸结合”和“核苷结合”术语上的关键蛋白导入到 STRING v11.0 数据库(<https://string-db.org/>)中,筛选可信度(combined score ≥ 0.15)较高的蛋白质互作网络(Protein-protein interaction network, PPI),之后将数据导入到 Cytoscape v3.7.1 (<https://cytoscape.org/>)进行可视化输出。

3. 结果与分析

3.1. 生物素标记启动子片段的制备

使用外引物对通过 PCR 扩增技术、琼脂糖凝胶电泳、切胶纯化并回收,获得一次 PCR 产物(图 2(A))。为保证所回收启动子片段的纯度及特异性,再以一次 PCR 产物为模板,使用内引物对进行降落 PCR 扩增技术、琼脂糖凝胶电泳、普通 DNA 产物纯化并回收,即获得目标启动子片段(图 2(B)),图 2 表明目标启动子片段纯度较高,无杂带污染。测序结果同样显示启动子片段能够很好的比对到红鳍东方鲀基因组上。



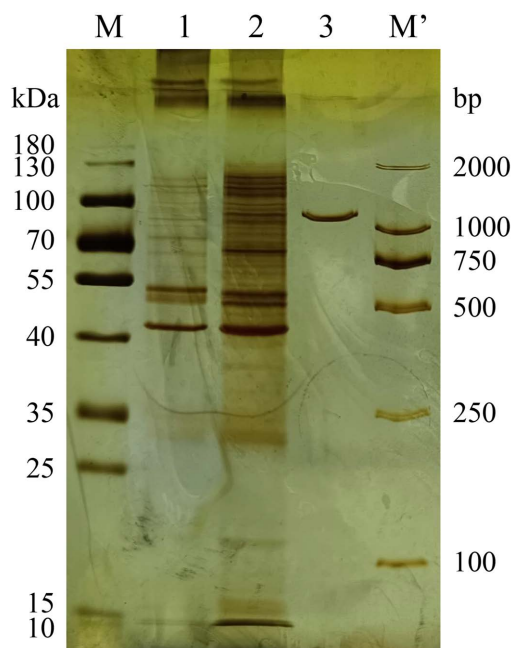
(A) M. DL2000 DNA Marker; M'. λ DNA-HindIII Digest DNA Marker; 1, 2. CCL25b 启动子片段(213 bp); (B) M. DL2000 DNA Marker; 1, 4. 生物素标记的 CCL25b 启动子片段(1145 bp); 2, 5. 未被生物素标记的 CCL25b 启动子片段(1120 bp); 3, 6. 阴性对照(无条带)

Figure 2. Preparation of biotin-labeled promoter fragments

图 2. 生物素标记的启动子片段的制备

3.2. DNA pull down

根据步骤 2.5 中的实验操作, 将制备的启动子-磁珠复合物分别与脑、鳃组织总蛋白孵育, 纯化后将特异结合的蛋白进行 SDS-PAGE 垂直电泳及银染, 银染结果如图 3 所示。



M. 蛋白质分子量标准; 1. CCL25b 启动子在脑中钓取的蛋白(转录因子); 2. CCL25b 启动子在鳃中钓取的蛋白(转录因子); 3. 生物素标记的 CCL25b 启动子片段; M'. DL2000 DNA Marker

Figure 3. Silver staining results of DNA pull down products

图 3. DNA pull down 产物 SDS-PAGE 后银染

3.3. 质谱结果分析与转录因子筛选

完成样品胰酶酶解等前处理、二维色谱上机分析以及单次数据检索分析, 质谱结果显示在脑中鉴定得到 1705 个蛋白质, 在鳃中共鉴定得到 2458 个蛋白质。将这些鉴定得到的蛋白通过 R 语言包 clusterProfiler v3.18.1 进行 GO 富集分析, GO 富集分析结果显示有 56 个编码生物学功能与核酸结合相关的差异性蛋白质的基因 ID, 有 144 个编码生物学功能与核苷结合相关的差异性蛋白质的基因 ID (图 4)。在 UniProt 和 GeneCards 网站依据蛋白的基本功能分别对上述 200 个差异性蛋白质的基因 ID 进行检索, 结果显示富集到“DNA 结合”这一术语上的蛋白包括 RNA 聚合酶、转录调控蛋白和其它结合蛋白, 我们从中筛选出 6 个生物学功能与转录过程相关的蛋白质, 其在脑和鳃中的 iBAQ 值如表 4。

3.4. 蛋白质相互作用分析

经 STRING 数据库及 Cytoscape 软件构建的可视化 PPI 网络如图所示(图 5)。整个网络包含两种类型的互动: DNA pull down 实验验证和来自文献的互作关系。主网络中共包含 22 种蛋白质, 经实验验证得到的潜在转录因子有 6 个, 包括 *PURA*、*ARHGAP35*、*NME2*、*RAP2C*、*CIQBP* 和 *DRG1*。其中 *ARHGAP35* (9) 的度最高。与上述转录因子以及靶基因 CCL25b 存在直接或间接相互作用的蛋白有 15 个。其中 *CDH1* (13)、*RASA1* (10) 和 *RHOA* (10) 的度相对较高。

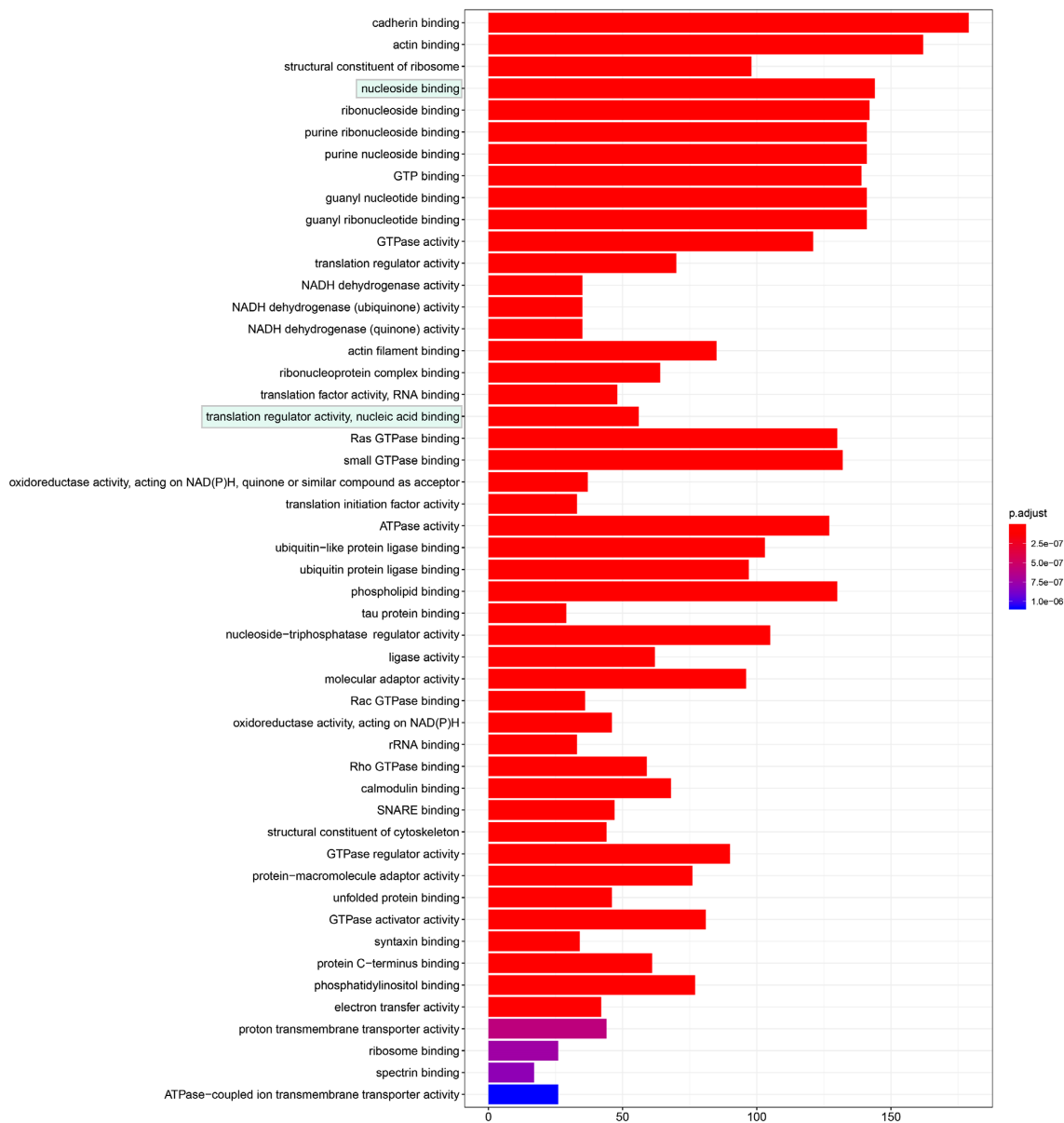


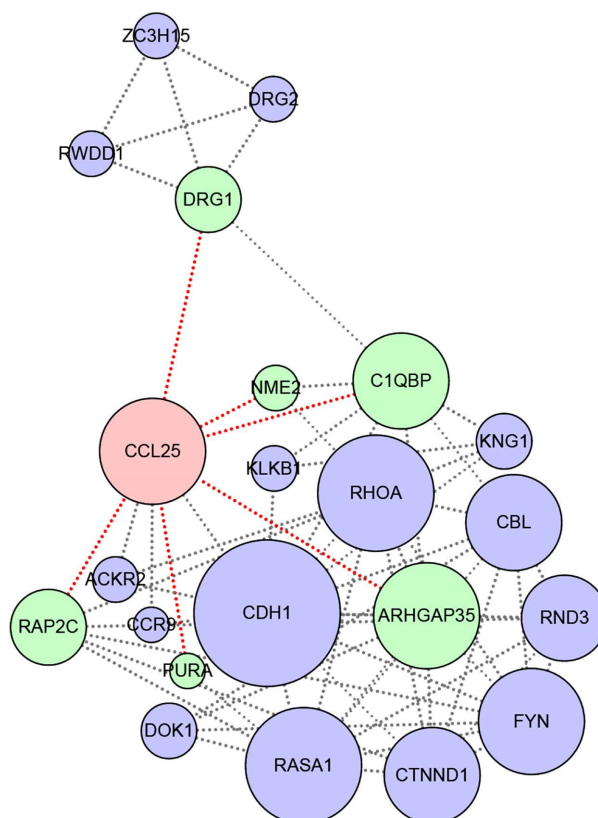
Figure 4. GO enrichment analysis

图 4. GO 富集分析

Table 4. Transcriptional regulators obtained by mass spectrometry identification (6)

表 4. 质谱鉴定获得的转录调控因子(6 个)

uniprot_id	gene_id	iBAQ_脑	iBAQ_鳃
A0A3B5KAS0	<i>PURA</i>	31,132,000	671,670
H2U1U6	<i>ARHGAP35</i>	99,725	0
H2SQ30	<i>NME2</i>	1,526,700	10,165,000
A0A674N6S9	<i>RAP2C</i>	5,216,600	0
A0A674PBX6	<i>CIQBP</i>	7,062,300	0
H2TJR7	<i>DRG1</i>	11,143,000	8,848,700



注：不同的颜色代表不同类型的互作关系。每个节点都是一个蛋白。节点的大小代表节点的度值。红色表示靶基因 CCL25b，绿色表示经实验验证得到的潜在转录因子，蓝色表示与靶基因以及潜在转录因子相互作用的蛋白。

Figure 5. Protein interaction network diagram

图 5. 蛋白质相互作用网络图

4. 讨论

遗传信息传递的过程较为复杂，主要涉及染色质激活、转录起始、转录后修饰、转录产物在细胞内的转运、翻译起始、翻译后修饰等诸多步骤，而针对基因表达的调控可发生于上述的任一环节。转录作为基因组表达的第一步，是真核细胞所有生命活动的基础，参与细胞的生长和分裂、基因组结构和修复，与炎症和癌症等疾病发生发展也有密切关系，因而发生在转录水平的调节，尤其是转录起始水平的调节，对基因表达有着至关重要的作用[4]。真核生物转录起始需要 RNA 聚合酶对起始点上游 DNA 序列进行识别和结合，生成转录前起始复合体，而这种识别和结合依靠于转录因子。转录因子是一种可以调控基因表达功能的蛋白质分子，也称为反式作用因子。

为了研究红鳍东方鲀 CCL25b 基因在细胞中的表达调控机制，本研究中，我们首次通过 DNA pull down 技术对结合在红鳍东方鲀 CCL25b 启动子区域的转录因子进行了富集。将组织活性总蛋白、5'末端被生物素标记的双链 DNA 启动子片段和带有链霉亲和素标记的磁珠共同孵育后，由于生物素与链霉亲和素的极高亲和力，复合物可被下拉[11]。随后我们将下拉产物进行银染，观察到有特异性条带之后将下拉产物送质谱检测。将质谱鉴定得到的蛋白进行 GO 富集分析，富集分析结果表明有 56 个编码蛋白的基因富集到“translation regulator activity, nucleic acid binding”这一术语上，有 144 个编码蛋白的基因富集到“nucleoside binding”这一术语上。此外，富集结果分析表明许多经质谱鉴定到的基因还富集到了与翻译、酶结合、核糖体形成等相关的 GO 术语上，我们猜测造成这种现象的原因可能有两点：其一可能是

由于在整个 pull down 过程中特别是在提取活性组织总蛋白时没有进行相应的 RNaseA 的处理, 导致大量的 mRNA 会与启动子片段下游(能转录产生 mRNA 的部分)产生杂交, 继而将与 mRNA 相结合的核糖体钩取出来。其二可能是由于本次实验中我们采用的蛋白是组织总蛋白, 胞质中的蛋白可能会对实验结果产生一定的影响。

本实验中我们基于 iBAQ 对鉴定的蛋白质进行定量。根据蛋白质 iBAQ 值的高低以及在 UniProt 和 NCBI 等数据库中进行的文献调研和生物信息学分析结果, 本文选择了 DNA 结合蛋白 *CIQBP*、*PURA*、*ARHGAP35*、*NME2*、*RAP2C*、*DRG1* 进行后续的分析。

研究表明基因 *PURA* 在人类中编码 Pur-alpha 蛋白[12], Pur-alpha 是高等生物中发现的第一个序列特异性单链 DNA 结合蛋白[12]。它与单链和双链 DNA 都有结合, 在其结合部位的富含嘌呤的链上与 G 残基进行接触。Pur-alpha 属于由四个成员组成的 Pur 蛋白家族, 其中还包括 Pur-beta (GenBank AY039216.1; GI:14906267) [12]和两种形式 Pur-gamma (变体 A, GenBank AF195513.2; 变体 B, GenBank AY077841) [13]。从细菌到人类的 Pur 蛋白质序列都包含一个高度保守的氨基酸片段[12] [14] (参见 NCBI smart00712)。人类的 Pur-alpha 包含这个 Pur 结构域的三个重复, 细菌的 Pur-alpha 只包含一个[12] [15]。这种进化上的保守性意味着这个结构域的特定序列对整个生物体光谱中的大多数物种的生存都很重要。由于 Pur-alpha 在低等生物和人类中的功能差别很大, 因此 Pur 结构域的这种基本性质引起了人们的关注。研究表明 Pur-alpha 对哺乳动物的大脑和血细胞发育至关重要[16], 在我们的研究中也发现转录因子 *PURA* 在红鳍东方鲀脑中的 iBAQ 值要远远高于鳃中的, 这与之前的研究结果保持一致。在人类中, Pur-alpha 的功能是激活细胞核中的转录, 促进细胞质中的 RNA 运输, 并在细胞周期中调节 DNA 复制[14]。在某些功能中, Pur-alpha 与家族成员 Pur-beta 相互作用[17] [18]。一些细胞周期调控功能可能是通过 Pur-alpha 与 Cyclin/Cdk 蛋白激酶的结合来实现的, Cyclin/Cdk 蛋白激酶对调节细胞周期转换点的蛋白质进行磷酸化[19] [20]。所有生物体对 Pur-alpha 的要求都是通过 Pur-alpha 与核酸结合的能力以及与调节和运输蛋白的相互作用来实现的。

ARHGAP35, 也称为 *GRLF1*, 其在人体中编码糖皮质激素受体的 DNA 结合因子 1。研究表明人糖皮质激素受体 DNA 结合因子与糖皮质激素受体基因(hGR 基因)的启动子区相关联, 是糖皮质激素受体转录的阻遏物。此外, 生物化学分析表明, *ARHGAP35* 的相互作用具有序列特异性, *ARHGAP35* 的转录功效是通过其与特定序列基序的相互作用来调节的, 其表达水平受糖皮质激素调节。研究发现糖皮质激素是大脑正常发育所必需的, 它启动终端成熟, 重塑轴突和树突, 并影响细胞的生存[21], 也可能在海马发育中发挥作用。这与我们的研究结果保持一致, 我们的质谱鉴定数据表明在红鳍东方鲀的脑中鉴定到了 *ARHGAP35*, 而在红鳍东方鲀的鳃中没有发现 *ARHGAP35*。此外, 糖皮质激素通过与糖皮质激素受体结合影响细胞, 被激活的糖皮质激素受体-糖皮质激素复合物在细胞核中上调抗炎蛋白的表达(这一过程被称为转录激活), 并通过阻止其他转录因子从细胞核中转录到细胞内, 抑制细胞内促炎蛋白的表达(转录抑制)[22]。糖皮质激素也被证明在 T 淋巴细胞的发育和稳态中起作用, 这在 T 细胞系对糖皮质激素的敏感性增加或降低的转基因小鼠中得到了证明[23]。有趣的是, 目标基因 *CCL25* 也被认为在 T 细胞的发育中发挥作用[1]。鉴于功能上的相关性, 我们推测 *ARHGAP35* 很有可能作为 *CCL25* 的转录因子而发挥作用。

研究表明 *NME2* 作为 *MYC* 基因的转录激活剂, 能够非特异性结合 DNA [24] [25]。与 *MYC* 基因启动子的核酸酶超敏元件(NHE) III (1)区域内的单链鸟嘌呤和富胞苷链结合而不与双链 NHE III (1)结合[25]。而 Myc 蛋白作为转录因子, 又可以通过结合增强子盒序列(E-boxes)和招募组蛋白乙酰转移酶(HATs)来激活许多促增殖基因的表达。研究表明 Myc 的功能是通过招募转录延伸因子来调控活跃转录基因的转录延伸[26]。它也可以作为转录抑制因子, 通过结合 Miz-1 转录因子并置换 p300 共同激活因子, 抑制 Miz-1 目标基因的表达。此外, myc 在控制 DNA 复制方面有直接作用[27], 这种活动可能有助于癌细胞的 DNA 扩增。

RAP2C 基因编码的蛋白质是 Ras GTPase 超家族的 Ras 相关蛋白亚家族的成员。该家族的成员是小的 GTP 酶，它们充当分子开关来调节细胞增殖、分化和凋亡。据报道，该蛋白质可激活血清反应元件的体外转录活性。可能在 SRE 介导的基因转录中起作用[28]。研究表明基因 *CIQBP* 可能参与调节 FOXC1 转录活性和 NFY/CCAAT 结合因子复合物介导的转录[29] [30]。有趣的是，我们的质谱数据显示 *RAP2C* 蛋白和 *CIQBP* 蛋白只在红鳍东方鲀的脑组织中鉴定到，这可能与转录因子的组织特异性相关。

Drg1 是一种人类 GTPase, 属于 Obg 家族, 在古生菌和真核生物中发现, 但在真细菌中未发现[31] [32]。*DRG1* 通过水解 GTP 中的 γ -磷酸键, 催化 GTP 向 GDP 的转化, 具有内在的 GTP 酶活性[33] [34]。我们猜测这可能与转录因子的活性相关。

尽管转录领域的研究在过去的半个世纪里取得了重大的进展, 但理解转录的机制和调控对生命科学来说仍然是一个巨大的挑战, 具有核心的重要性。本实验的质谱鉴定获得了多个候选的 DNA 结合蛋白, 其中不乏非特异结合蛋白。虽然这些蛋白在调控 *CCL25b* 基因表达中的实际功能尚不清楚, 但我们为寻找 *CCL25b* 的 DNA 相互作用蛋白提供了新的思路。这些初步结果将有助于我们进一步了解与 *CCL25b* 表达调控机制相关的潜在生物学过程。

基金项目

国家重点研发计划资助(编号: 2018YFD0900301-10)。

参考文献

- [1] Vicari, A.P., Figueroa, D.J., Hedrick, J.A., Foster, J.S., Singh, K.P., Menon, S., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A. and Ba Con, K.B. (1997) TECK: A Novel CC Chemokine Specifically Expressed by Thymic Dendritic Cells and Potentially Involved in T Cell Development. *Immunity*, **7**, 291-301. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80531-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80531-2)
- [2] Ringe, J., Hemmati-Sadeghi, S., Fröhlich, K., Engels, A. and Sittlinger, M. (2019) CCL25-Supplemented Hyaluronic Acid Attenuates Cartilage Degeneration in a Guinea Pig Model of Knee Osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*, **37**, 1723-1729. <https://doi.org/10.1002/jor.24312>
- [3] Xu, B.P., Deng, C., Wu, X., Ji, T., Zhao, L., Han, Y.H., Yang, W.W., Qi, Y.T., Wang, Z., Yang, Z., et al. (2020) CCR9 and CCL25: A Review of Their Roles in Tumor Promotion. *Journal of Cellular Physiology*, **235**, 9121-9132. <https://doi.org/10.1002/jcp.29782>
- [4] Cramer, P. (2019) Eukaryotic Transcription Turns 50. *Cell*, **179**, 808-812. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.018>
- [5] Nagore, L.I., Nadeau, R.J., Guo, Q., Jadhav, Y.L.A., Jarrett, H.W. and Haskins, W.E. (2013) Purification and Characterization of Transcription Factors. *Mass Spectrometry Reviews*, **32**, 386-398. <https://doi.org/10.1002/mas.21369>
- [6] Ishihama, A. (2000) Functional Modulation of Escherichia Coli RNA Polymerase. *Annual Review of Microbiology*, **54**, 499-518. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.499>
- [7] Deng, W.G., Ying, Z., Montero, A. and Wu, K.K. (2003) Quantitative Analysis of Binding of Transcription Factor Complex to Biotinylated DNA Probe by a Streptavidin-Agarose Pulldown Assay. *Analytical Biochemistry*, **323**, 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.08.007>
- [8] Tran, D.H., Shishido, Y., Chung, S.P., Trinh, H., Yorita, K., Sakai, T. and Fukui, K. (2015) Identification of DNA-Binding Proteins That Interact with the 5'-Flanking Region of the Human D-Amino Acid Oxidase Gene by Pull-Down Assay Coupled with Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, **116**, 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.031>
- [9] Schwanhuser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W. and Selbach, M. (2013) Global Quantification of Mammalian Gene Expression Control. *Nature*, **495**, 126-127. <https://doi.org/10.1038/nature11848>
- [10] Yu, G., Wang, L.G., Han, Y. and He, Q.Y. (2012) clusterProfiler: An R Package for Comparing Biological Themes among Gene clusters. *Omics—A Journal of Integrative Biology*, **16**, 284-287. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>
- [11] Wu, K.K. (2006) Analysis of Protein-DNA Binding by Streptavidin-Agarose Pulldown. *Methods in Molecular Biology*, **338**, 281-290. <https://doi.org/10.1385/1-59745-097-9:281>
- [12] Bergemann, A.D., Ma, Z.W. and Johnson, E.M. (1992) Sequence of cDNA Comprising the Human Pur Gene and Sequence-Specific Single-Stranded-DNA-Binding Properties of the Encoded Protein. *Molecular Cellular Biology*, **12**, 5673-5682. <https://doi.org/10.1128/MCB.12.12.5673>

- [13] Hong, L. and Johnson, E.M. (2002) Distinct Proteins Encoded by Alternative Transcripts of the PURG Gene, Located Contrapodal to WRN on Chromosome 8, Determined by Differential Termination/Polyadenylation. *Nucleic Acids Research*, **30**, 2417-2426. <https://doi.org/10.1093/nar/30.11.2417>
- [14] Johnson, E.M. (2003) The Pur Protein Family: Clues to Function from Recent Studies on Cancer and AIDS. *Anticancer Research*, **23**, 2093-2100.
- [15] Almut, G., Stéphane, R., Dirk, K., Johannes, S., Dierk, N. and James, H.N. (2010) Of Bits and Bugs—On the Use of Bioinformatics and a Bacterial Crystal Structure to Solve a Eukaryotic Repeat-Protein Structure. *PLoS ONE*, **5**, e13402. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013402>
- [16] Khalili, K., et al. (2003) Pur Is Essential for Postnatal Brain Development and Developmentally Coupled Cellular Proliferation as Revealed by Genetic Inactivation in the Mouse. *Molecular Cellular Biology*, **23**, 6857-6875. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.19.6857-6875.2003>
- [17] Hariharan, S., Kelm, R.J. and Strauch, A.R. (2014) The Pura/Pur β Single-Strand DNA-Binding Proteins Attenuate Smooth-Muscle Actin Gene Transactivation in Myofibroblasts. *Journal of Cellular Physiology*, **229**, 1256-1271. <https://doi.org/10.1002/jcp.24564>
- [18] Kelm, R.J., Elder, P.K., Strauch, A.R. and Getz, M.J. (1997) Sequence of cDNAs Encoding Components of Vascular Actin Single-Stranded DNA-Binding Factor 2 Establish Identity to Puralpha and Purbeta. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 26727-26733. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.42.26727>
- [19] Barr, S.M. and Johnson, E.M. (2001) Ras-Induced Colony Formation and Anchorage-Independent Growth Inhibited by Elevated Expression of Puralpha in NIH3T3 Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, **81**, 621-638. <https://doi.org/10.1002/jcb.1099>
- [20] Liu, H., Barr, S.M., Chu, C., Kohtz, D.S., Kinoshita, Y. and Johnson, E.M. (2005) Functional Interaction of Pura α with the Cdk2 Moiety of Cyclin A/Cdk2. *Biochemical Biophysical Research Communications*, **328**, 851-857. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.01.038>
- [21] Lupien, S.J., Mcewen, B.S., Gunnar, M.R. and Heim, C. (2009) Effects of Stress throughout the Lifespan on the Brain, Behaviour and Cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, **10**, 434-445. <https://doi.org/10.1038/nrn2639>
- [22] Rhen, T. and Cidlowski, J.A. (2005) Antiinflammatory Action of Glucocorticoids—New Mechanisms for Old Drugs. *The New England Journal of Medicine*, **353**, 1711-1723. <https://doi.org/10.1056/NEJMra050541>
- [23] Pazirandeh, A., Xue, Y., Prestegard, T., Jondal, M. and Okret, S. (2002) Effects of Altered Glucocorticoid Sensitivity in the T Cell Lineage on Thymocyte and T Cell Homeostasis. *The FASEB Journal*, **16**, 727-729. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0891fje>
- [24] Postel, E., Berberich, S., Flint, S. and Ferrone, C. (1993) Human c-myc Transcription Factor PuF Identified as nm23-H2 Nucleoside Diphosphate Kinase, a Candidate Suppressor of Tumor Metastasis. *Science*, **261**, 478-480. <https://doi.org/10.1126/science.8392752>
- [25] Dexheimer, T.S., Carey, S.S., Zuohe, S., Gokhale, V.M., Hu, X., Murata, L.B., Maes, E.M., Weichsel, A., Sun, D. and Meuillet, E.J. (2009) NM23-H2 May Play an Indirect Role in Transcriptional Activation of c-myc Gene Expression But Does Not Cleave the Nuclease Hypersensitive Element III1. *Molecular Cancer Therapeutics*, **8**, 1363-1377. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-1093>
- [26] Rahl, P.B. and Young, R.A. (2014) MYC and Transcription Elongation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **4**, a020990. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020990>
- [27] Dominguez-Sola, D., Ying, C.Y., Grandori, C., Ruggiero, L., Chen, B., Li, M., Galloway, D.A., Gu, W., Gautier, J. and Dalla-Favera, R. (2007) Non-Transcriptional Control of DNA Replication by c-Myc. *Nature*, **448**, 445-451. <https://doi.org/10.1038/nature05953>
- [28] Guo, Z., Yuan, J., Tang, W., Chen, X., Gu, X., Luo, K., Wang, Y. and Yu, W.L. (2007) Cloning and Characterization of the Human Gene *RAP2C*, a Novel Member of Ras Family, Which Activates Transcriptional Activities of SRE. *Molecular Biology Reports*, **34**, 137-144. <https://doi.org/10.1007/s11033-006-9023-9>
- [29] Chandrani, C., David, H., Ryuji, K. and Maity, S.N. (2004) Human p32, Interacts with B Subunit of the CCAAT-Binding Factor, CBF/NF-Y, and Inhibits CBF-Mediated Transcription Activation *In Vitro*. *Nucleic Acids Research*, **32**, 3632-3641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh692>
- [30] Huang, L.J., Chi, J., Berry, F., Footz, T.K., Sharp, M.W. and Walter, M.A. (2008) Human p32 Is a Novel FOXC1-Interacting Protein That Regulates FOXC1 Transcriptional Activity in Ocular Cells. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, **49**, 5243-5249. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1625>
- [31] Li, B. and Trueb, B. (2000) DRG Represents a Family of Two Closely Related GTP-Binding Proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1491**, 196-204. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00025-7](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00025-7)
- [32] Leipe, D.D., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. and Aravind, L. (2002) Classification and Evolution of P-Loop GTPases and Related ATPases. *Journal of Molecular Biology*, **317**, 41-72. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5378>

-
- [33] Markolovic, S., Zhuang, Q., Wilkins, S.E., Eaton, C.D., Abboud, M.I., Katz, M.J., McNeil, H.E., Lesniak, R.K., Hall, C., Struwe, W.B., *et al.* (2018) The Jumonji-C Oxygenase JMJD7 Catalyzes (3S)-lysyl Hydroxylation of TRAFAC GTPases. *Nature Chemical Biology*, **14**, 688-695. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0071-y>
- [34] Perez-Arellano, I., Spinola-Amilibia, M. and Bravo, J. (2013) Human *Drg1* Is a Potassium-Dependent GTPase Enhanced by Lerepo4. *FEBS Journal*, **280**, 3647-3657. <https://doi.org/10.1111/febs.12356>