

SENPI 启动子 G-四链体鉴定及其作用研究*

周炎鑫 韩 梦 刘娜女 黄伟伟**

(西北农林科技大学生命科学院 杨陵 712100)

摘要 目的:研究 G-四链体(G4)对 SUMO 特异性蛋白酶 1(SUMO-specific proteases 1, SENPI)基因的转录调控作用。方法:克隆不同的 SENPI 启动子片段构建 SENPI 启动子报告质粒,通过报告基因检测鉴定 SENPI 启动子核心转录调控区;分析 SENPI 启动子核心转录调控区序列,并进行 G4 形成序列预测;合成 G4 形成序列寡核苷酸,利用圆二色谱分析检测 G4 形成序列寡核苷酸的拓扑结构;通过 G4 配体 TMPyP4 处理和过表达 G4 解旋酶 G4R1 结合报告基因检测和 Western blot 鉴定启动子 G4 对 SENPI 转录表达的调控作用。结果:发现-910 ~ +226 区域是 SENPI 启动子的核心转录调控区,序列富含 G/C;生信分析发现 SENPI 启动子核心区存在 G4 形成序列;圆二色谱分析证实 SENPI 启动子 G4 形成序列能够形成 G4 结构;报告基因检测和 Western blot 检测发现启动子 G4 对 SENPI 转录表达具有抑制作用。结论:SENPI 启动子核心转录调控区存在 G4 结构并对其转录表达具有抑制作用,为揭示 SENPI 在生理和病理过程中的作用机制提供新的研究思路和试验线索。

关键词 SENPI G-四链体 TMPyP4 G4R1

中图分类号 Q291

蛋白质翻译后修饰在细胞组装和众多生理活动中发挥重要调控作用。SUMO 化(SUMOylation)是一种类泛素化蛋白修饰,由活化酶 E1、结合酶 E2 和连接酶 E3 依次作用将类泛素蛋白 SUMO (small ubiquitin-related modifier) 共价结合到靶蛋白的赖氨酸残基上,从而调控蛋白质的结构、定位、互作、活性,在核质转运、DNA 复制和损伤修复、基因转录等生理过程发挥重要作用^[1-2]。SUMO 化是一个可逆的修饰过程。细胞中存在 SUMO 特异性蛋白酶(SENPs),通过切断 SUMO 与靶蛋白之间的异肽键介导去 SUMO 化^[1]。SENPI 是首个发现的 SENP 蛋白,具有广泛的底物特异性,能够催化 SUMO1-3 蛋白所修饰的靶蛋白去 SUMO 化,是细胞中主要的去 SUMO 化酶^[3]。SENPI 还通过剪切 SUMO 前体蛋白 C 端的延长链促使 SUMO 蛋白成熟,暴露 C 端连续甘氨酸残基的成熟 SUMO 才能参与 SUMO 化修

饰^[3]。因此,SENPI 具有促进 SUMO 蛋白成熟和去 SUMO 化的双重作用。

由于在 SUMO 化和去 SUMO 化过程中均发挥重要作用,SENPI 功能状态决定了细胞中的 SUMO 化修饰水平,在细胞正常生理活动中发挥重要作用。SENPI 基因突变或敲除造成转基因鼠发育异常如胎盘发育缺陷、红细胞生成性贫血等而引起胚胎早期死亡^[4-6]。Cheng 等^[4]发现在缺氧条件下 SENPI 通过去 SUMO 化调节缺氧诱导因子 HIF1a 的稳定性调控红细胞生成素(EPO)产生。此外,SENPI 还参与细胞衰老^[7]、血管内皮生长因子产生和血管生成^[8]、线粒体基因表达调控和线粒体发生^[9]等生理过程。SENPI 功能异常与肿瘤和心血管疾病等密切相关。已发现 SENPI 在前列腺癌^[10]、肝细胞癌^[11]、非小细胞肺癌^[12]、骨肉瘤^[13]和三阴性乳腺癌中过表达^[14],并与前列腺癌^[10]、非小细胞肺癌^[12]和透明细胞肾细胞癌^[15]的病理分期、恶性程度、复发或转移等显著相关。沉默 SENPI 能够抑制上述肿瘤细胞的增殖、迁移和上皮间充质转化,并促进癌细胞凋亡^[10-14]。因此,SENPI 可能是一个有效的肿瘤

收稿日期:2019-05-05 修回日期:2019-07-31

* 国家自然科学基金(31300654)、陕西省自然科学基金(2014JQ3098)资助项目

**通讯作者,电子邮箱:whuang0210@163.com

诊断标记物和治疗靶点。

SENPI 表达异常与肿瘤等疾病发生紧密联系。研究 *SENPI* 表达调控有助于揭示其在生理和病理过程中的作用机制。目前对于 *SENPI* 的转录表达调控研究报道较少。Bawa-Khalfe 等^[16]发现雄激素能够增强 *SENPI* 转录,通过分析 *SENPI* 启动子发现存在雄激素响应元件(ARE),雄激素受体通过结合 ARE 促进 *SENPI* 的转录表达。Xu 等^[8]发现缺氧的血管内皮细胞中 *SENPI* 表达升高,主要是由于低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1, HIF-1 α)通过结合 *SENPI* 启动子缺氧应答元件(HRE)促进其转录,而沉默 HIF-1 α 则阻断缺氧引起的 *SENPI* 表达。此外,miR-145^[17]、miR-1236^[18]和 miR-133A-3p^[19]在 mRNA 水平调控 *SENPI* 表达。因此,本研究拟对 *SENPI* 的转录表达调控进行深入研究,通过对 *SENPI* 启动子核心区的鉴定和序列分析,发现 *SENPI* 启动子存在 G-四链体(G4)形成序列,提示 *SENPI* 的转录可能受到 G4 的调控。

G4 是由富含串联重复鸟嘌呤的核酸链折叠形成的一种四链核酸结构,由三个平面四联体在金属阳离子的参与下相互堆叠形成的,具有很强的热稳定性^[20]。一般认为典型的 G4 形成序列为 $G_3 + N_{1-7} + G_3 + N_{1-7} + G_3 + N_{1-7} + G_3$ (N 代表任意核苷酸)^[21]。生信分析显示 G4 形成序列广泛存在于动植物中,在人类基因组中至少存在 30 万个 G4 形成序列,表明 G4 在染色体稳定和核酸代谢中发挥重要作用^[22]。DNA 和 RNA 均能够形成 G4, G4-DNA 和 G4-RNA 在基因组代谢过程中发挥不同的作用。染色体末端的单链简单重复端粒序列(TTAGGG)中含有丰富的 G4 形成序列,试验证实端粒序列在体内外均能够形成 G4^[23]。端粒 G4 具有稳定端粒结构,协助染色体锚定,并抑制端粒酶的端粒序列合成功能^[20]。50% 的人类基因启动子区含有 G4 形成序列,而且癌基因和细胞增殖调控基因启动子区出现 G4 形成序列的概率要高于看家基因和抑癌基因^[24]。目前已在 *c-Myc*^[25]、*Bcl-2*^[26]、*KRAS*^[27] 等多个癌基因启动子中发现存在 G4,对基因转录表达具有抑制作用。由于具有抑制端粒酶活性和癌基因转录表达的作用,G4 被认为可能是一种新的抗癌靶点^[28]。此外,约有 3 000 个基因所转录的 mRNA 5'-UTR、CDS 或 3'-UTR 区存在 G4,参与调控 mRNA 翻译和稳定^[29]。因此,本研究在发现 *SENPI* 启动子 G4

形成序列的基础上,利用报告基因检测和圆二色谱分析鉴定 *SENPI* 启动子 G4 形成序列是否形成 G4 结构,并检测 G4 对 *SENPI* 转录表达的调控作用,为揭示 *SENPI* 在生理和病理过程中的作用提供新的研究思路和试验线索。

1 材料与方法

1.1 细胞

Hep-2 细胞购于国家实验细胞资源共享服务平台(北京总部),用添加有 10% 的胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 100U/ml 的青霉素/链霉素的高糖 DMEM 培养液置于 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养。

1.2 试剂

引物和 DNA 寡核苷酸、Lipofectamine 2000 (11668-019)及 ECL 显色液(34080)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。PrimeSTAR[®] HS DNA 聚合酶(R044A)和 Taq DNA 聚合酶(R001WZ)购自宝生物工程(大连)有限公司;核酸内切酶 *EcoR* I、*Bam* H I、*Hind* III、*Sal* I 和 T4 DNA 连接酶购自 NEB(北京)有限公司;TMPyP4 (A5014-100MG)购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司。*SENPI* 抗体 C-12 (sc-271360)购自圣克鲁斯生物技术;蛋白酶抑制剂(04693132001)购于 Roche Diagnostics 有限公司。RIPA 裂解液(P0013B)和 Flag 抗体(AF519)购于碧云天生物技术公司。 β -actin 抗体(CW0096A),辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 抗体(CW0102)购于北京康维世纪生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 质粒构建 根据从 GenBank 数据库查询的 *SENPI* 基因启动子区序列,设计合成特异性 *SENPI* 启动子 PCR 引物,并分别引入 *EcoR* I 和 *Bam* H I 酶切位点,引物序列见表 1。以 PC-3 细胞基因组 DNA 为模板,利用引物 F1 和 R3 扩增 *SENPI* 启动子 -2572 ~ +1553 片段,插入经 *EcoR* I 和 *Bam* H I 双酶切的 pGluc Basic 载体中,以构建 *SENPI* 启动子报告质粒 SP1。再以测序正确的 SP1 质粒为模板,利用 F1、F2 和 R1、R2、R3 分别配对扩增 *SENPI* 启动子的不同片段,同样插入 pGluc Basic 载体中,以构建不同的 *SENPI* 启动子报告质粒,将其依次命名为 SP2~6。以 HeLa 细胞 cDNA 为模板,利用特异性引物扩增解旋酶 G4R1 基因片段,插入经 *Bam* H I 和 *Xho* I 双酶切的 pCMV-N-Flag 质粒中,以构建 Flag-G4R1 真核表达质粒。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primers sequences

Gene	Forward Primer(5'→3')	Reverse Primer(5'→3')
SENPI	F1: CCGGAATTCACAATTTCCAGATGATCCATCC	R1: CGCGGATCCCAATGTTAGCTTTATCCAGG ACC
	F2: CCGGAATTCCTTCTACATCTTGCCAGAGTCTAG	R2: CGCGGATCCATGCAAGTCAACAACATGCATTCC
		R3: CGCGGATCCCGAGCTTCCCGGTGAAAACA
G4R1	CGCGGATCCATGAGTTATGACTACCATCAGAACTGG	CCGCTCGAGTCAGCTGTAATATCCATCCTGGAA

1.3.2 细胞转染 取生长状态良好的 Hep-2 细胞接种到 24 孔培养板,隔天用 Lipofectamine 2000 转染试剂按照使用说明进行细胞转染。将 200ng SENPI 启动子报告质粒及 5ng 参照质粒 pCMV-SEAP 稀释到 50 μ l Opti-MEM[®] 培养液中。取 0.5 μ l Lipofectamine 2000 稀释到 50 μ l Opti-MEM[®] 培养液中,室温静置 5min 后将两种稀释溶液混合,再室温静置 20min,然后将混合物加入 24 孔板,置于培养箱中培养,6h 后 24 孔板换回正常培养基。

1.3.3 萤光素酶报告基因检测 将 200ng SENPI 启动子报告质粒转染 Hep-2 细胞 24h 后,用不同浓度 TMPyP4 (0 μ mol/L、25 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L) 处理转染细胞;或将 200ng SENPI 启动子报告质粒与不同 DNA 量的 Flag-G4R1 真核表达质粒(0ng、200ng、400ng、600ng)共转 Hep-2 细胞。每孔细胞同时转染 5ng 参照质粒 pCMV-SEAP。药物处理或转染 48h 后吸取一定量的细胞培养液,用 Secrete-Pair[™] Dual Luminescence Assay Kit 检测培养液样品中萤光素酶 (Gluc) 和分泌性碱性磷酸酶 (SEAP) 活性。每组转染设置三个重复,每个样品重复测定三次,并计算 Gluc 与 SEAP 的比值,结果取平均值。

1.3.4 圆二色谱分析 取 20 μ l 人工合成的 DNA 寡核苷酸(100 μ mol/L)用 180 μ l 含 50mmol/L KCl 的 TE 缓冲液稀释后,90 $^{\circ}$ C 退火 5min,缓慢冷却至室温。用含 50mmol/L KCl 的 TE 缓冲液将经退火的寡核苷酸稀释至 500 μ l,加入到 0.5mm 光程的石英加样室,放置到偏振光谱仪中进行光谱检测,检测波长范围为 200 ~ 350nm,检测温度为 25 $^{\circ}$ C。用各样品的光谱值减去 TE 缓冲液的光谱值,以校准的光谱值为纵坐标,以波长为横坐标作图。

1.3.5 Western blot 检测 取生长状态良好的 Hep-2 细胞接种到 24 孔培养板,过夜培养后用不同浓度 TMPyP4(0 μ mol/L、25 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L) 处理细胞,或利用 Lipofectamine 2000 将不同量的

Flag-G4R1 真核表达质粒转染细胞。48h 后收集细胞,PBS 洗涤后用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液进行裂解,提取总蛋白质并用 BCA 试剂盒检测样品蛋白质浓度,将不同处理组的蛋白质浓度调整一致,加入适量 5 \times SDS Loading Buffer 混匀,沸水浴 5min。利用 10% SDS-PAGE 凝胶进行蛋白质电泳,利用湿转法将蛋白质转至硝酸纤维素膜,经 5% 脱脂奶粉室温封闭 1h,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜和二抗室温孵育 1h,用 ECL 发光液对目的蛋白进行显影,以 β -actin 作为实验内参。

1.3.6 统计学分析 利用 SigmaPlot 10 进行制图和数据分析。试验数据采用均值 \pm 标准方差 (standard deviation, SD) 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SENPI 核心启动子鉴定

研究报道 SENPI 在前列腺癌等病理组织中表达异常,而目前对于 SENPI 基因的转录表达调控研究较少,为探究 SENPI 基因的转录表达调控机制,我们首先通过报告基因检测鉴定 SENPI 启动子核心转录调控区。从 GenBank 数据库中下载 SENPI 基因启动子上游 -3 000 到转录起始点下游 +2 000 之间的基因组 DNA 序列,参考相关文献,如图 1a 所示设计特异上下游 PCR 引物,克隆不同的 SENPI 启动子片段,酶切后插入 pGluc Basic 质粒中,构建带有不同 SENPI 启动子片段的萤光素酶报告质粒 SP1 ~ 6。将 SP1 ~ 6 启动子报告质粒和 pGluc Basic 空质粒分别转染 Hep-2 细胞,48h 后取细胞培养液检测萤光素酶 Gluc 活性。结果如图 1b 所示,SP6 启动子报告质粒的萤光素酶 Gluc 活性最高,提示启动子 -910 ~ +226 区域是 SENPI 启动子的核心转录调控区。

2.2 SENPI 启动子核心序列分析及 G4 形成序列预测

为揭示 SENPI 基因的转录调控机制,进一步对鉴定的 SENPI 启动子的核心转录调控区序列进行分析,

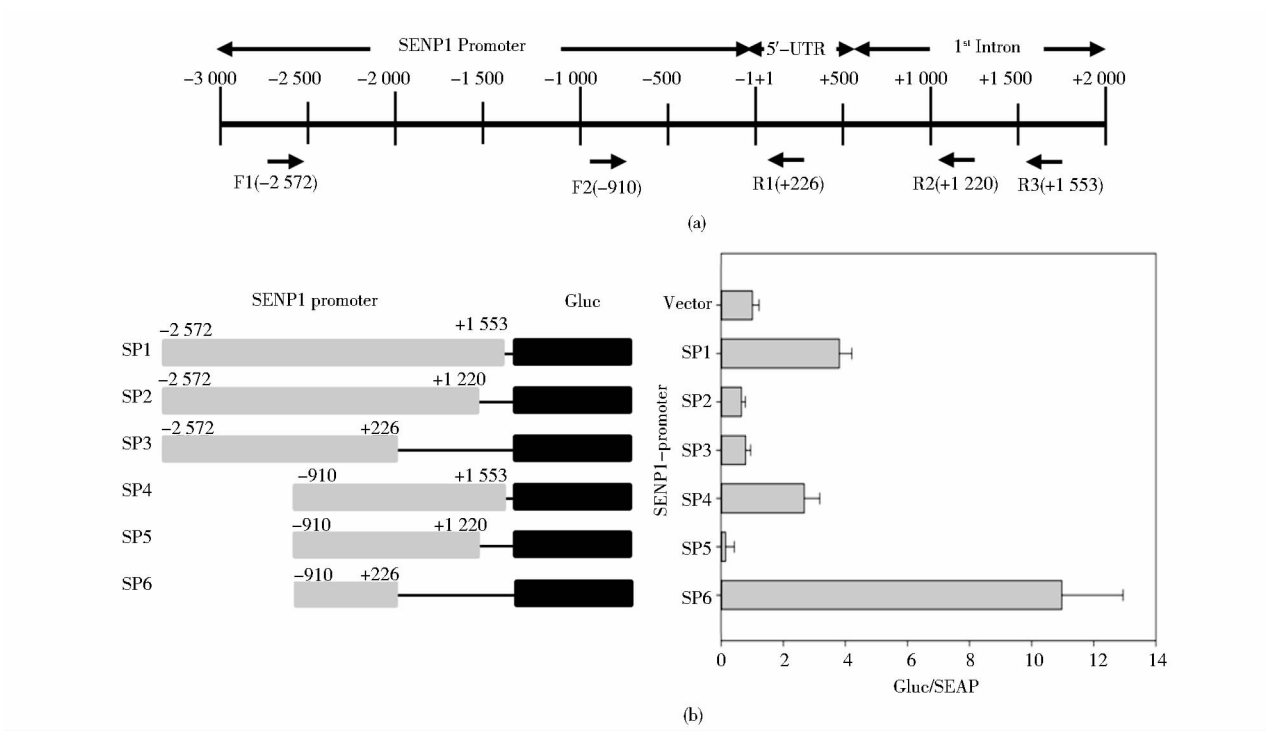


图 1 SENPI 启动子报告质粒及萤光素酶报告基因检测

Fig. 1 SENPI promoter reporter plasmids and reporter assay

(a) Schematic representation of the SENPI promoter and the primers used for SENPI promoter clone (b) The diagram of SENPI promoter reporter constructs and related Gluc activity

结果发现 *SENPI* 启动子核心转录调控区 G/C 含量较高。如图 2a 所示,转录起始点上游 -1 000bp 区域内的 G/C 含量为 56.31%,越接近转录起始点 G/C 含量越高,转录起始点上游 -250bp 区域内的 G/C 含量高达 72.8%,提示 *SENPI* 启动子核心转录调控区可能存在 G4 形成序列。利用在线软件 QGRS Mapper 对 *SENPI* 转录起始点到上游 -1 000bp 的序列进行分析,筛选出 3 条富含串联重复鸟嘌呤序列,符合典型 G4 形成序列特征 ($G_3 + N_{1-7} + G_3 + N_{1-7} + G_3 + N_{1-7} + G_3$) (图 2b),其中 G4 形成序列 SP-1 和 SP-2 的 G-Score 值大于 60,并位于正链的转录起始点上游 -200bp 区域内 (图 2c)。*SENPI* 启动子核心转录调控区的 DNA 序列特征提示在 *SENPI* 启动子的正链中存在多个 G4,因此,*SENPI* 基因转录表达可能受 G4 调控。

2.3 SENPI 启动子区 G4 形成序列的圆二色谱分析

通过对 *SENPI* 启动子序列分析发现存在 G4 形成序列,进一步利用圆二色谱分析鉴定这些 G4 形成序列是否能够形成 G4 结构。根据预测的 G4 形成序列,合成野生型寡核苷酸 SP-1 和 SP-2,并通过用腺苷选择性地替换鸟嘌呤以消除串联重复 G 基序设计合成突变型

寡核苷酸 SP-1M 和 SP-2M,同时合成已报道能够形成 G4 结构的 *c-Myc* 启动子 G4 形成序列 pu27 作为阳性对照^[25]。将上述合成的寡脱氧核糖核苷酸 (图 3a) 稀释后在含有 K^+ 的 TE 溶液中 95℃ 退火,用圆二色谱仪检测不同寡核苷酸对圆偏振光的吸收光谱。结果如图 3b 所示,pu27 寡核苷酸在 240nm 处显示负摩尔椭圆度峰值,在 262nm 处显示正摩尔椭圆度峰值,这是典型的平行 G4 结构圆二色谱特征^[30]。寡核苷酸 SP-1 同样在 240nm 处显示负摩尔椭圆度峰值,在 262nm 处显示弱于 pu27 的正摩尔椭圆度峰值,表明 SP-1 形成平行 G4 结构;同时 SP-1 在 295nm 处还显示第二个正摩尔椭圆度峰值,表明 SP-1 也形成反平行 G4 结构。其寡核苷酸 SP-1M 在 240nm 处不显示负摩尔椭圆度峰值,在靠近 280nm/L 处显示弱的正摩尔椭圆度峰值,表明 SP-1M 不能形成 G4 结构。寡核苷酸 SP-2 同样在 240nm 处显示负摩尔椭圆度峰值,但正摩尔椭圆度峰值在 295nm 处,表明 SP-2 形成反平行 G4 结构;其突变寡核苷酸 SP-2M 的正负摩尔椭圆度峰值并不在 240nm 和 295nm 处,表明 SP-2M 不能形成 G4 结构。圆二色谱分析结果表明寡核苷酸 SP-1 能够同时形成平行和反平行

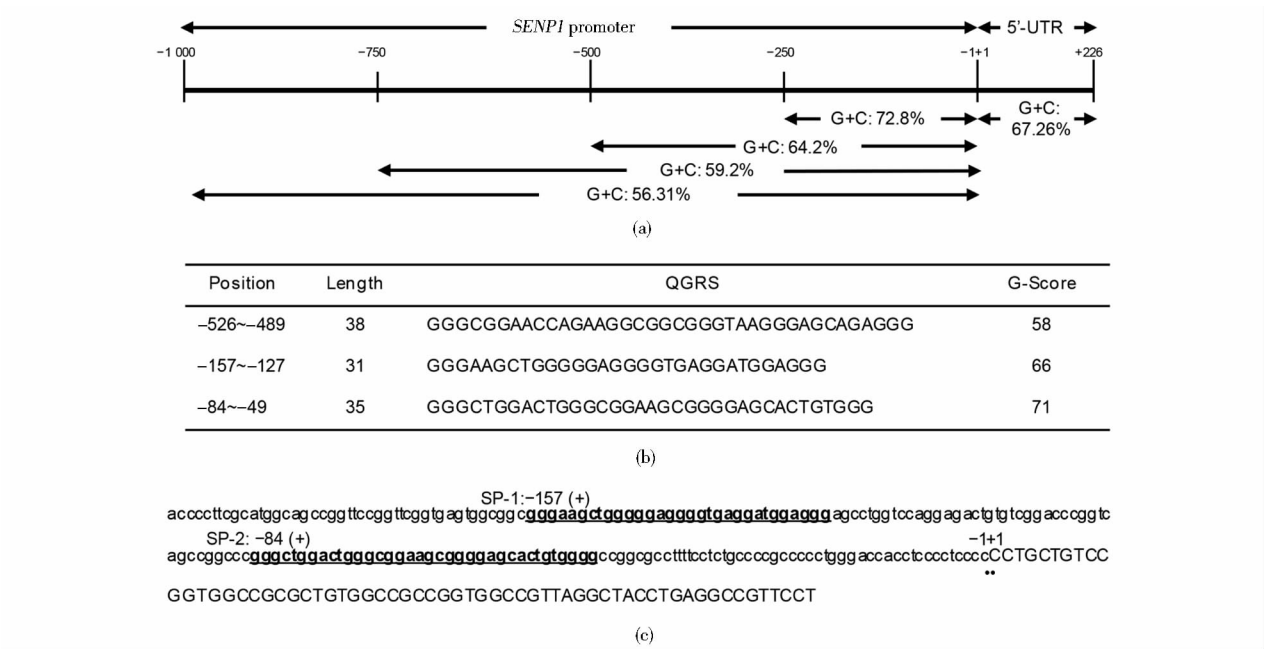


图 2 *SENPI* 启动子序列分析和 G4 形成序列预测

Fig. 2 The sequence analysis and quadruplex forming sequences prediction of *SENPI* promoter

(a) The G/C content of 1 000bp region upstream transcription start site (TSS) of *SENPI* promoter and partial its 5'-UTR. The TSS is designated as +1. (b) The quadruplex forming sequences prediction of *SENPI* promoter. (c) The sequence of -200 ~ +60 region of *SENPI* promoter and predicted quadruplex forming sequences (underlined).

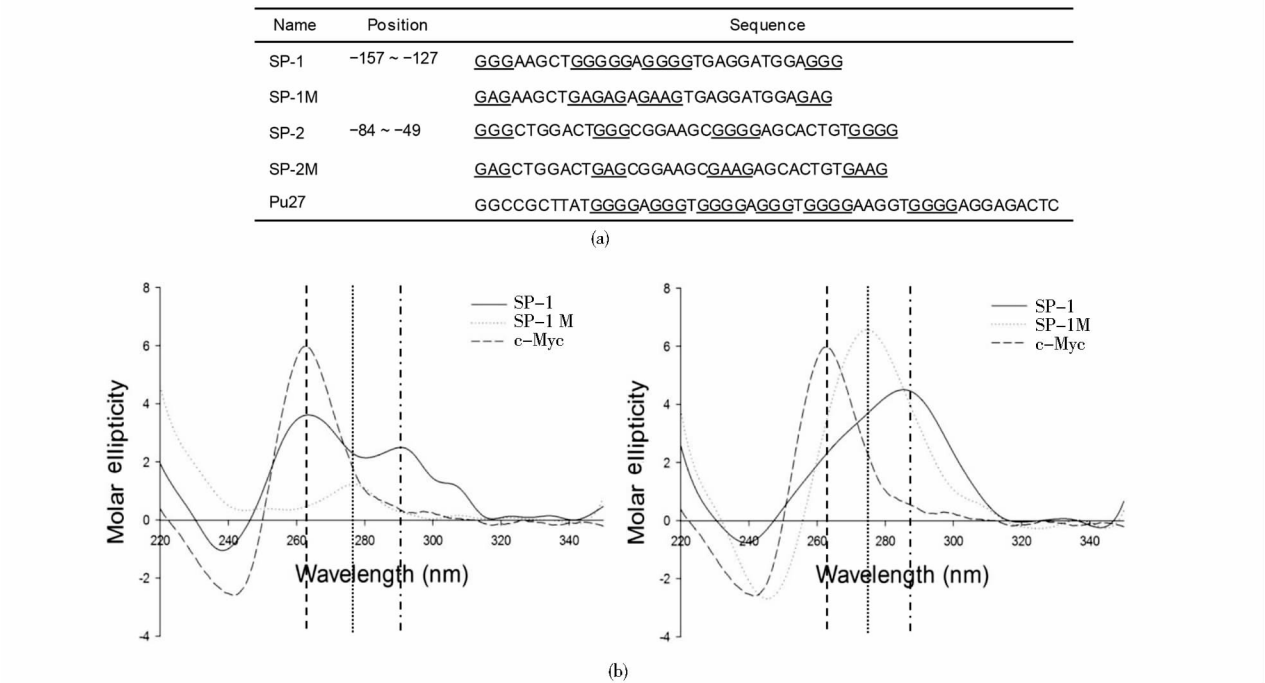


图 3 *SENPI* 启动子 G4 形成序列及圆二色谱分析

Fig. 3 Oligonucleotides of G4 forming Sequences from *SENPI* promoter and circular dichroism (CD) analyses

(a) The oligonucleotides of G4 forming sequences from *SENPI* promoter and their corresponding mutant (M). The G-tracts with G4 structure forming potential are underlined, G in middle of G-tracts were replaced by A in mutant oligonucleotides SP-1M and SP-2M individually. pu27 was used as a positive control, which is a G4 forming sequence in the *c-Myc* promoter and has been characterized to form G4 structure. (b) Circular dichroism spectroscopy analyses of oligonucleotides derived from the *SENPI* promoter. The absorption spectra of different oligonucleotides were analyzed by circular dichroism chromatography after annealing in TE solution containing K^+ at 95°C. The abscissa represents the wavelength of polarized light and the ordinate represents the absorptivity. The vertical line represents the absorption peak.

两种 G4 结构,寡核苷酸 SP-2 主要形成反平行 G4 结构,当其序列中的重复 G 基序的鸟嘌呤被腺嘌呤选择性替换,则导致寡核苷酸 SP-1 和 SP-2 均不能形成 G4 结构。这些结果证实 *SENPI* 启动子中的 G4 形成序列 SP-1 和 SP-2 能够在体外形成 G4 结构。

2.4 G4 配体 TMPyP4 对 *SENPI* 表达的影响

目前已在 *c-Myc*^[25]、*Bcl-2*^[26]、*KRAS*^[27] 等多个癌基因启动子区发现 G4 结构,并对这些基因的转录表达具有重要调控作用。圆二色谱分析结果证实 *SENPI* 启动子中的 G4 形成序列 SP-1 和 SP-2 能够在体外形成 G4 结构,进一步研究启动子 G4 对 *SENPI* 转录表达的影响,发现一些小分子化合物能够通过选择性结合和稳定 G4 结构抑制受 G4 调控癌基因的表达,这类 G4 配体有望开发为新型抗癌药物^[31]。阳离子卟啉衍生物

TMPyP4 是一种高活性的 G4 配体,能够特异性结合和稳定核酸 G4 结构。Siddiqui-Jain 等^[25]报道 TMPyP4 能够结合 *c-Myc* 启动子 G4-Pu27 并下调 *c-Myc* 表达。因此,利用 TMPyP4 研究 G4 结构对 *SENPI* 表达的影响。首先利用报告基因检测 TMPyP4 对 *SENPI* 基因转录的影响。将 *SENPI* 启动子报告质粒转染 Hep-2 细胞,随后用不同浓度 TMPyP4 处理转染细胞,通过检测荧光素酶报告基因 *Gluc* 的活性发现 TMPyP4 处理导致受 *SENPI* 启动子调控的荧光素酶 *Gluc* 活性显著降低,并呈浓度依赖性(图 4a)。进一步利用 Western blot 检测 TMPyP4 对 *SENPI* 蛋白水平的影响,结果与报告基因检测相似,TMPyP4 处理导致细胞中 *SENPI* 蛋白水平也显著降低(图 4b)。这些结果证实启动子 G4 结构对 *SENPI* 的表达具有负调控作用。

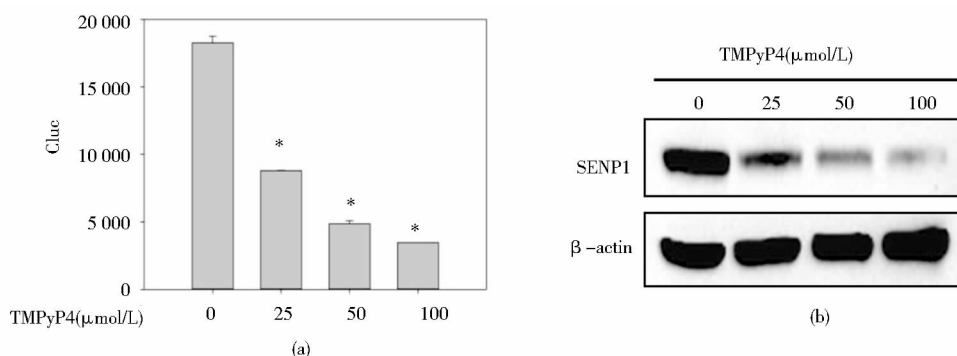


图 4 G4 配体 TMPyP4 对 *SENPI* 表达的影响

Fig. 4 Effects of G4 ligand TMPyP4 on the *SENPI* expression

- (a) Reporter assay to detect the effect of TMPyP4 on *SENPI* transcription The *SENPI* promoter reporter plasmid was transfected into Hep-2 cells. The transfected cells were treated with different dose of TMPyP4 for 48 hours, and then the *Gluc* activity of the culture medium was detected
- (b) Western blot to detect the effect of TMPyP4 on *SENPI* protein level Hep-2 cells were treated with different dose of TMPyP4 for 48 hours. Protein samples were collected for Western blot and beta-actin for control

2.5 G4 解旋酶 G4R1 对 *SENPI* 表达的影响

G4 具有很强的稳定性,会阻碍 DNA 复制和转录。一些解旋酶能够特异结合并解旋 G4,并以此影响受 G4 调控基因的表达^[32]。G4R1 是细胞中主要 G4 解旋酶,能够解旋 G4-DNA 和 G4-RNA^[33]。我们进一步利用 G4R1 研究启动子 G4 结构对 *SENPI* 转录表达的影响。首先通过报告基因检测 G4R1 对 *SENPI* 基因转录的影响。将 *SENPI* 启动子报告质粒和 Flag-G4R1 表达质粒共转 Hep-2 细胞,通过检测荧光素酶报告基因 *Gluc* 的活性发现过表达 G4R1 导致受 *SENPI* 启动子调控的荧光素酶报告基因 *Gluc* 活性升高(图 5a)。利用 Western blot 检测 G4R1 对内源性 *SENPI* 蛋白水平的影

响,结果与报告基因检测相似,过表达 G4R1 引起细胞中 *SENPI* 蛋白水平升高(图 5b)。这些结果也证实启动子 G4 结构对 *SENPI* 的表达具有负调控作用。

3 讨论

SENPI 作为关键去 SUMO 化酶在众多生理过程中发挥重要作用。*SENPI* 功能异常也与疾病发生密切相关。研究发现 *SENPI* 在前列腺癌^[10]、肝细胞癌^[11]、非小细胞肺癌^[12]等多种肿瘤细胞中异常过表达,并与肿瘤的侵袭、转移,血管生成等过程密切相关,是潜在的抗肿瘤治疗靶点。因此,研究 *SENPI* 表达调控机制有助于揭示 *SENPI* 在生理和病理过程中的作用机制。

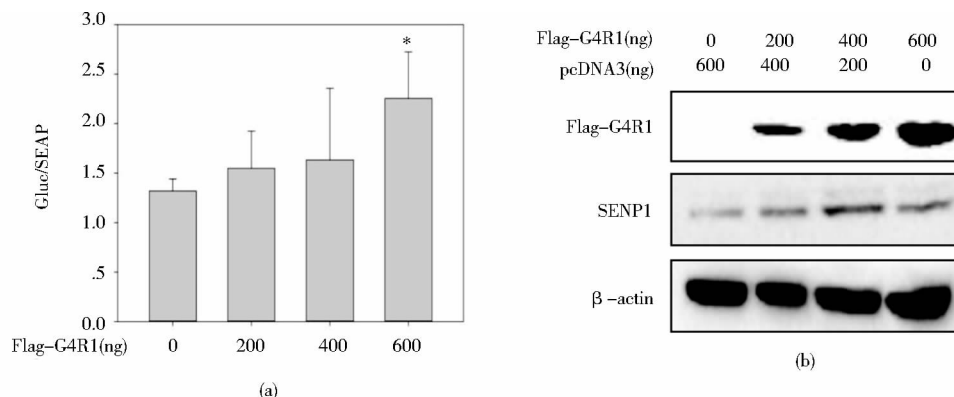


图5 G4解旋酶G4R1对SENP1表达的影响

Fig. 5 The effect of G4R1 on the SENP1 expression

(a) Reporter assay to detect the effect of G4R1 on SENP1 transcriptional expression. The SENP1 promoter reporter plasmid, Flag-G4R1 expression plasmid with different DNA quantities, and SEAP expression plasmid were co-transformed into Hep-2 cells for 48 hours, and the Gluc and SEAP activity of the culture medium were detected. (b) Western blot to detect the effect of G4R1 on SENP1 protein level. Flag-G4R1 expression plasmids with different DNA quantities were transfected into Hep-2 cells, and protein samples were collected for Western blot and beta-actin for control.

本研究首先克隆了不同的 SENP1 启动子片段,通过报告基因检测不同 SENP1 启动子片段的转录活性,鉴定了 SENP1 启动子核心调控区;分析核心调控区序列发现富含 G/C,预测存在 G4 形成序列;通过圆二色谱分析证明 SENP1 启动子 G4 形成序列能够形成 G4 结构;细胞试验证实启动子 G4 结构对 SENP1 转录表达具有负调控作用。

SENP1 启动子的转录调控作用研究报道较少。Bawa-Khalfe 等^[16]克隆了 SENP1 基因转录起始位点上游-2 572 到转录起始位点下游+1 553 之间约 4.1 kb 的 SENP1 启动子片段,构建带有萤光素酶基因的 SENP1 启动子报告质粒,通过检测萤光素酶 Gluc 活性发现 SENP1 启动子报告质粒的萤光素酶活性比空载体高 11 倍,提示 4.1 kb 片段中包含 SENP1 功能启动子。以 4.1 kb 的 SENP1 启动子 SP1P 为模板,构建 SENP1 启动子不同缺失报告基因,通过比较 6 个不同 SENP1 启动子缺失报告质粒的萤光素酶活性发现,与 SP1P 相比,缺失启动子 Del3(-911 ~ +1 553)的萤光素酶活性最高,缺失启动子 Del6(-2 572 ~ +1 220)也要高于 SP1P,提示 SENP1 启动子核心调控区可能位于 -911 ~ +1 220 区间。本研究在此基础上进一步通过报告基因检测比较 SENP1 启动子不同区段的转录活性,结果发现 -910 ~ +226 区段 SENP1 启动子质粒的萤光素酶活性最高,提示 SENP1 启动子的主要转录调控序列存在于 -910 ~ +226 区段。

对 SENP1 启动子主要转录调控区序列分析发现 G/C 含量丰富,而且越靠近转录起始点,G/C 含量越高。高 G/C 含量的序列特征一方面提示 SENP1 转录表达可能受到 DNA 甲基化的影响,另一方面也提示 G4 形成序列的存在。利用在线预测工具分析 SENP1 启动子核心区序列,发现 3 条具有串联重复鸟嘌呤的 G4 形成序列。位于 -157 ~ -127 和 -84 ~ -49 的两条 G4 形成序列 SP-1 和 SP-2 的序列结构非常符合典型的 G4 形成序列特征,且预测值 G-Score 高于 60,而已证实能够形成 G4 结构的 c-Myc 启动子 G4 形成序列的 G-Score 仅为 42。这些分析结果提示 SENP1 启动子核心区的 G4 形成序列极有可能形成 G4 结构。位于上游 -526 ~ -489 的 G4 形成序列由于第一个 G3 与第二个 G3 之间的间隔核苷酸达到了 17 个,不符合形成 G4 结构的典型序列特征。因此,本研究只对 SP-1 和 SP-2 进行 G4 鉴定和功能试验。

目前对于 G4 形成序列是否形成 G4 主要利用合成的寡核苷酸在体外通过生化或生物物理学方法进行鉴定,如圆二色谱分析、核磁共振(NMR)、FRET 等^[22]。圆二色谱分析是最常用的 G4 检测方法,通过检测溶液中核酸分子的拓扑结构鉴定是否形成 G4 结构。G4 对圆偏振光的吸收与波长呈一定的函数关系,可以用摩尔椭圆度表示^[34]。以摩尔椭圆度为纵坐标,以波长为横坐标做图,平行拓扑 G4 结构会在 240 nm 和 262 nm 波长处分别形成负的和正的摩尔椭圆度峰值,而反平行

拓扑 G4 结构正摩尔椭圆度峰值会在 295nm 波长处。本研究圆二色谱分析结果显示来自 *SENPI* 启动子 G4 形成序列的寡核苷酸 SP-1 在 240nm 处显示负摩尔椭圆度峰值,在 262nm 处显示的正摩尔椭圆度峰值,同时在 295nm 处还显示第二个正摩尔椭圆度峰值,提示 SP-1 能够形成平行和反平行两种 G4 结构;而寡核苷酸 SP-2 同样在 240nm 处显示负摩尔椭圆度峰值,但是正摩尔椭圆度峰值在 295nm 处,表明 SP-2 形成反平行 G4 结构;而重复 G 基序中鸟嘌呤被腺嘌呤选择性替换的突变寡核苷酸 SP-1M 和 SP-2M 的摩尔椭圆度分布均不符合 G4 特征,证实不能形成 G4 结构。这些结果证实 *SENPI* 启动子 G4 形成序列 SP-1 和 SP-2 能够在体外形成 G4 结构。

启动子区 G4 结构对基因的转录具有重要调控作用。大多数研究报道启动子 G4 主要抑制基因转录。我们前期研究证实在 *YY1* 基因的启动子区和 mRNA 的 5'-UTR 区存在 G4 结构,并且启动子区 G4 抑制 *YY1* 的转录^[35]。也有启动子 G4 正调控基因转录的报道。Renciuk 等^[36]报道 *OCT4* 基因启动子 G4 结构对其转录表达具有促进作用。大多数研究通过突变启动子 G4 序列,比较野生型和突变型之间的差异来研究 G4 的转录调控作用,但这种方法具有技术上的缺陷。启动子通常存在许多调控元件,可能与 G4 形成序列重叠或邻近,而突变 G4 形成序列必然会引起某些调控元件突变,不能真正反映 G4 结构的调控作用。因此,我们采取间接的方式利用 G4 配体 TMPyP4^[37] 稳定 G4 结构或利用 G4 解旋酶 G4R1 解旋 G4 恢复双链结构,结合报告基因试验和基因内源性表达检测研究启动子 G4 对 *SENPI* 转录表达的影响。试验结果显示 TMPyP4 引起 *SENPI* 启动子调控的报告基因和 *SENPI* 内源性蛋白水平降低,而过表达 G4R1 则引起 *SENPI* 启动子调控的报告基因活性升高,并增强内源性 *SENPI* 蛋白水平。正反两方面的试验结果证实启动子 G4 抑制 *SENPI* 表达。

总之,本研究鉴定了 *SENPI* 启动子的核心转录调控区,并发现 *SENPI* 启动子核心区存在 G4;细胞学检测证实启动子 G4 对 *SENPI* 转录表达具有负调控作用。启动子 G4 的发现为 *SENPI* 的表达和功能研究提供新的研究线索,并暗合了 *SENPI* 在肿瘤发生中的癌基因样功能,为开发靶向 *SENPI* 的肿瘤治疗方案提供新的研究方向。

参考文献

- [1] Eifler K, Vertegaal A C O. SUMOylation-mediated regulation of cell cycle progression and cancer. *Trends Biochem Sci*, 2015, 40(12):779-793.
- [2] Yang Y, He Y, Wang X, et al. Protein SUMOylation modification and its associations with disease. *Open Biol*, 2017, 7(10):170167.
- [3] Mukhopadhyay D, Dasso M. Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32(6):286-295.
- [4] Cheng J, Kang X, Zhang S, et al. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1 α during hypoxia. *Cell*, 2007, 131(3):584-595.
- [5] Yamaguchi T, Sharma P, Athanasiou M, et al. Mutation of *SENPI*/SuPr-2 reveals an essential role for desumoylation in mouse development. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(12):5171-5182.
- [6] Yu L, Ji W, Zhang H, et al. *SENPI*-mediated GATA1 deSUMOylation is critical for definitive erythropoiesis. *J Exp Med*, 2010, 207(6):1183-1195.
- [7] Xia N, Cai J, Wang F, et al. *SENPI* is a crucial regulator for cell senescence through deSUMOylation of Bmi1. *Sci Rep*, 2016, 6:34099.
- [8] Xu Y, Zuo Y, Zhang H, et al. Induction of *SENPI* in endothelial cells contributes to hypoxia-driven VEGF expression and angiogenesis. *J Biol Chem*, 2010, 285(47):36682-36688.
- [9] Cai R, Yu T, Huang C, et al. SUMO-specific protease 1 regulates mitochondrial biogenesis through PGC-1 α . *J Biol Chem*, 2012, 287(53):44464-44470.
- [10] Wang Q, Xia N, Li T, et al. SUMO-specific protease 1 promotes prostate cancer progression and metastasis. *Oncogene*, 2013, 32(19):2493-2498.
- [11] Zhang W, Sun H, Shi X, et al. *SENPI* regulates hepatocyte growth factor-induced migration and epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol*, 2016, 37(6):7741-7748.
- [12] Mu J, Zuo Y, Yang W, et al. Over-expression of small ubiquitin-like modifier proteases 1 predicts chemo-sensitivity and poor survival in non-small cell lung cancer. *Chin Med J (Engl)*, 2014, 127(23):4060-4065.
- [13] Wang X, Liang X, Liang H, et al. *SENPI*/HIF-1 α feedback loop modulates hypoxia-induced cell proliferation, invasion, and EMT in human osteosarcoma cells. *J Cell Biochem*, 2018, 119(2):1819-1826.
- [14] Wang Z, Jin J, Zhang J, et al. Depletion of *SENPI* suppresses the proliferation and invasion of triple-negative breast cancer cells. *Oncol Rep*, 2016, 36(4):2071-2078.

- [15] Dong B, Gao Y, Kang X, et al. SENP1 promotes proliferation of clear cell renal cell carcinoma through activation of glycolysis. *Oncotarget*, 2016, 7(49): 80435-80449.
- [16] Bawa-Khalife T, Cheng J, Wang Z, et al. Induction of the SUMO-specific protease 1 transcription by the androgen receptor in prostate cancer cells. *J Biol Chem*, 2007, 282(52): 37341-37349.
- [17] Wang C, Tao W, Ni S, et al. Tumor-suppressive microRNA-145 induces growth arrest by targeting SENP1 in human prostate cancer cells. *Cancer Sci*, 2015, 106(4): 375-382.
- [18] Chen S Y, Teng S C, Cheng T H, et al. miR-1236 regulates hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and cell migration/invasion through repressing SENP1 and HDAC3. *Cancer Lett*, 2016, 378(1): 59-67.
- [19] Zhou G Q, Han F, Shi Z L, et al. miR-133a-3p targets SUMO-specific protease 1 to inhibit cell proliferation and cell cycle progress in colorectal cancer. *Oncol Res*, 2018, 26(5): 795-800.
- [20] Rhodes D, Lipps H J. G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(18): 8627-8637.
- [21] Huppert J L, Balasubramanian S. Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(9): 2908-2916.
- [22] Kwok C K, Merrick C J. G-Quadruplexes: prediction, characterization, and biological application. *Trends Biotechnol*, 2017, 35(10): 997-1013.
- [23] Schaffitzel C, Berger I, Postberg J, et al. In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Stylonychia lemnae* macronuclei. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 8572-8577.
- [24] Maizels N, Gray L T. The G4 genome. *PLoS Genet*, 2013, 9(4): e1003468.
- [25] Siddiqui-Jain A, Grand C L, Bearss D J, et al. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(18): 11593-11598.
- [26] Dai J, Dexheimer T S, Chen D, et al. An intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel G-strands formed in the human BCL-2 promoter region in solution. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(4): 1096-1098.
- [27] Cogoi S, Xodo L E. G-quadruplex formation within the promoter of the KRAS proto-oncogene and its effect on transcription. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(9): 2536-2549.
- [28] Neidle S, Parkinson G. Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(5): 383-393.
- [29] Bugaut A, Balasubramanian S. 5'-UTR RNA G-quadruplexes: translation regulation and targeting. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(11): 4727-4741.
- [30] Lee J Y, Yoon J, Kihm H W, et al. Structural diversity and extreme stability of unimolecular *Oxytricha nova* telomeric G-quadruplex. *Biochemistry*, 2008, 47(11): 3389-3396.
- [31] Asamitsu S, Obata S, Yu Z, et al. Recent progress of targeted G-Quadruplex-preferred ligands toward cancer therapy. *Molecules*, 2019, 24(3): E429.
- [32] Mendoza O, Bourdoncle A, Boule J B, et al. G-quadruplexes and helicases. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(5): 1989-2006.
- [33] Chen MC, Murat P, Abecassis K, et al. Insights into the mechanism of a G-quadruplex-unwinding DEAH-box helicase. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(4): 2223-2231.
- [34] Paramasivan S, Rujan I, Bolton P H. Circular dichroism of quadruplex DNAs: applications to structure, cation effects and ligand binding. *Methods*, 2007, 43(2): 324-331.
- [35] Huang W, Smaldino P J, Zhang Q, et al. Yin Yang 1 contains G-quadruplex structures in its promoter and 5'-UTR and its expression is modulated by G4 resolvase 1. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(3): 1033-1049.
- [36] Renciuik D, Rynes J, Kejnovska I, et al. G-quadruplex formation in the Oct4 promoter positively regulates Oct4 expression. *Biochim. Biophys. Acta*, 2017, 1860(2): 175-183.
- [37] Grand C L, Han H, Munoz R M, et al. The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth *in vivo*. *Mol Cancer Ther*, 2002, 1(8): 565-573.

Identification and Functional Study of G-quadruplexes in *SENP1* Promoter

ZHOU Yan-xing HAN Meng LIU Na-nv HUANG Wei-wei

(College of Life Science, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract Objective: The regulation effect of G-quadruplexes (G4) on the SUMO-specific proteases 1

(*SENPI*) transcriptional expression was studied. Method: Reporting plasmids of *SENPI* promoter were constructed by cloning different *SENPI* promoter fragments. The core transcriptional regulatory region of *SENPI* promoter was identified by using reporter assay. The sequence of core transcriptional regulatory region of *SENPI* promoter was analyzed and G-quadruplex (G4) formation sequence was predicted. Oligonucleotides of G4 formation sequence from *SENPI* promoter were synthesized, and their topological structure was detected by circular dichroism analysis. G4 ligand TMPyP4 and G4 helicase G4R1 were used to detect the regulatory effect of promoter G4 on *SENPI* transcriptional expression by using reporter assay and Western blot. Result: The -910 ~ +226 region was found to be the core transcriptional regulatory region of *SENPI* promoter. Sequence analysis showed the core region of *SENPI* promoter is rich in G/C and contains G4 formation sequences. Circular dichroism analysis confirmed that the oligonucleotides of G4 formation sequence from *SENPI* promoter form G4 structure. Reporter assay and Western blot showed that promoter G4 inhibited the transcriptional expression of *SENPI*. Conclusion: G4 exist in the core transcriptional regulatory region of *SENPI* promoter and show negative regulation on *SENPI* transcriptional expression, which provides new research ideas and experimental clues for revealing the mechanism of *SENPI* in physiological and pathological processes.

Key words *SENPI* G-quadruplexe TMPyP4 G4R1