

DOI: 10.13376/j.cblls/2017138

文章编号: 1004-0374(2017)10-1040-06



蓝斐, 复旦大学教授, 博导, 附属中山/儿科医院兼职教授。分别于1999年和2002年在复旦大学获生物化学学士学位和肿瘤分子生物学硕士学位, 2008年获得美国哈佛大学细胞发育学博士学位。入选“青年千人”, 上海市“千人”, 东方学者, 获“上海市优秀学术带头人”称号及“谈家桢生命科学奖(创新奖)”。现任复旦大学医学表观遗传和分子代谢国际合作基地副主任, 中国生物化学与分子生物学会基因专业委员会副主任, 细胞学会染色质分会主委。在表观遗传领域组蛋白甲基化的可逆调控以及识别机制方向做出重要贡献, 成果入选“2016年十大医学进展”, 并参与了两类FDA(一期)表观遗传药物的开发, 发表37余篇SCI论文, 总被引用频次8000余次。

旁粒组分Nono在小鼠胚胎干细胞中的转录调控机制

胡昊麟, 叶宣伽, 蓝斐*

(复旦大学生物医学研究院表观遗传实验室, 医学表观遗传与分子代谢国际科技合作基地, 上海200032)

摘要: 旁粒及其组分在肿瘤发生和诸多正常的生物学功能中都扮演了重要的角色, 但对于其具体的作用机制仍然缺乏了解。在人和小鼠的胚胎干细胞中, 旁粒的关键结构组分长链非编码RNA *NEATI_v2* 并不表达, 只表达其短变体 *NEATI_v1* 和3种旁粒蛋白组分——NONO、SFPQ和PSPC1, 提示这些组分可能具有独立于经典旁粒结构之外的功能。蓝斐课题组依托国家基金委“细胞编程和重编程的表观遗传机制”重大研究计划, 在此方向上开展了系统性的研究, 并获得了进展: 首次发现旁粒蛋白组分Nono和Erk相互作用, 共同结合在小鼠胚胎干细胞的双价结构域基因(bivalent genes)的启动子区, 并参与Mek/Erk信号途径调控靶基因的待激活状态; 研究还发现, Nono缺失的mESC具有更强的自我更新能力, 对于胚胎干细胞的体外培养有重要的参考价值。对本领域的最新进展以及复旦大学蓝斐课题组的相关原创性工作进行综述。

关键词: 旁粒; NONO; 胚胎干细胞; 双价结构域基因; 自我更新

中图分类号: Q254; Q813 **文献标志码:** A

The transcription regulation mediated by paraspeckle component Nono in mouse embryonic stem cells

HU Hao-Lin, YE Xuan-Jia, LAN Fei*

(Key Laboratory of Metabolism and Molecular Medicine, Ministry of Education, Department of Cellular and Genetic Medicine, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: Paraspeckle and its components play important roles in various biological processes, and their malfunction could lead to diseases such as cancer. In human and mouse embryonic stem cells (ESCs), lncRNA *NEATI_v2*, the key structural component of paraspeckle stays transcriptionally silent; while its short isoform *NEATI_v1* and three paraspeckle protein components, NONO, SFQP and PSPC1, are well expressed, indicating

收稿日期: 2017-09-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(91419306)

*通信作者: E-mail: fei_lan@fudan.edu.cn

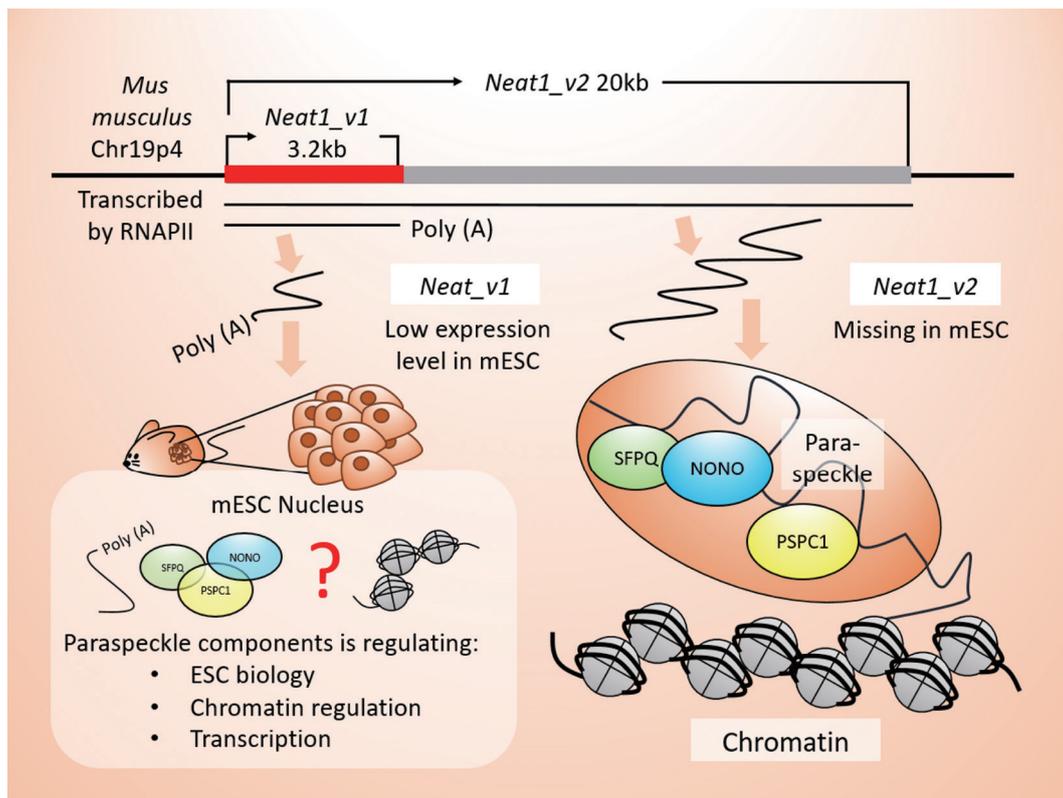
paraspeckle independent functions. Supported by a NSFC grant focusing on “The Epigenetic Mechanisms of Cell Programming and Reprogramming”, our study uncovered a role of Nono in interacting with Erk and regulating the poised state of RNA polymerase II at bivalent genes in mESCs. Importantly, Nono loss led to an impaired activation of Erk signaling and robust self-renewal of mESC. These findings reveal a previously underappreciated function of paraspeckle components in regulating transcription in chromatin environment and provide alternative approaches to obtain ESCs with robust self-renewing ability. Here, we will debrief the recent advancement in the area and summarize our major findings from the project.

Key words: paraspeckle; NONO; embryonic stem cells; bivalent domain; self-renewal

1 核内的亚细胞器及旁粒简述

对于真核生物而言, 很多重要的细胞功能, 如DNA复制、RNA合成和加工等都在细胞核内完成。随着生命体的进化, 这些生物学过程的效率不断提高, 相应通路中的部分组件和功能在形态和结构上趋于融合, 细胞核也进一步细分出各个亚细胞核结构, 如核散斑(nuclear speckles)、Cajal小体(Cajal bodies)以及核仁(nucleoli)等等^[1]。近年来的研究表明, 这些细胞核内的亚细胞结构是由其蛋白质组分和RNA分子通过分子间的相互作用而组成的稳定且有序的功能单位, 而非RNA与蛋白质的简单

堆砌, 但目前对于其功能的研究依然相当有限。旁粒(paraspeckle)就是一类这样的核内亚细胞器, 该结构在2002年被发现, 因其大多分布在核散斑近旁的染色质间区域而得名^[2]。其主要的蛋白组分为P54NRB/NONO(Non-POU domain-containing octamer-binding protein), 另外两种重要的旁粒核心蛋白是PSPC1(paraspeckle protein 1)和SFPQ/PSF(splicing factor, proline-and-glutamine-rich)^[3-4](图1)。NONO、PSPC1和SFPQ同属DBHS(*Drosophila* behavior/human splicing)蛋白家族, 序列同源性超过50%, 结构上都包含两个具有潜在RNA结合能力的RRM(RNP-type RNA recognition)结构域, 结构研究证明这3



旁粒的主要蛋白组分为同属DBHS蛋白家族的三个蛋白NONO、PSPC1以及SFPQ; 主要核酸成分为NEAT1, NEAT1基因座能够产生两个lncRNA产物——短链的Neat1_v1及长链的Neat1_v2。在小鼠胚胎干细胞(mESC)中, 只表达少量的Neat1短变体。

图1 旁粒结构组分示意图

个蛋白之间可以形成同(异)二聚体^[5-6]。旁粒还有一个非常重要的长链非编码RNA组分 *NEAT1* (nuclear enriched autosomal transcript 1), 起到结构骨架的作用^[7](图1)。*NEAT1* 在哺乳动物细胞中广泛存在, 有两个异构体: *NEAT1_v1* (短变体, 人 3.7 kb; 小鼠 3.2 kb) 和 *NEAT1_v2* (长变体, 人 22.7 kb; 小鼠 20 kb); 两条异构体都是 RNAPII (RNA polymerase II) 的转录产物, 共用同一启动子和转录起始位点, 在 5' 端序列上完全相同^[8]。*NEAT1_v2* 可以直接结合 NONO 和 PSPC1, 并促使其定位于旁粒上^[7]。研究表明, *NEAT1* 长短变体的调控和功能并不相同, 特别是在小鼠胚胎干细胞 (mESC) 中, 长变体 *NEAT1_v2* 完全不表达, 只存在低水平表达的短变体 *NEAT1_v1*。因此, 虽然 3 种 DBHS 蛋白在 mESC 中均有表达, 但在小鼠胚胎干细胞中却无法组装成完整的旁粒结构^[9-10](图1)。这暗示了 DBHS 蛋白在胚胎干细胞中可能具有独立于经典旁粒结构之外的功能, 同时, 也提示它们在胚胎干细胞以及分化后的细胞中参与不同的调控作用。

2 旁粒组分参与RNA加工以及转录调控

对于旁粒的功能性研究学界尚未有最后的定论。在发现之初, 旁粒结构被认为主要参与调控 RNA 的成熟。旁粒的主要功能是调控细胞核的 RNA 滞留 (RNA retention), 该过程由 NONO 蛋白识别 mRNA 内含子以及 3'UTR 区域中的 Alu 原件, 从而阻止未成熟的 dsRNA 进入胞浆^[4,11]。2017 年, Jiang 等^[12] 研究还表明, NONO/SFPQ 异二聚体可与 pri-miRNA 结合, 进而引导其通过 Drosha-DGCR8 完成加工; 这些功能都有 NEAT1 的参与, 说明旁粒结构在这些过程中十分重要。研究还发现, 旁粒蛋白组分还可能具有独立于旁粒结构的功能。例如, 在 DNA 双链损伤 (DSB) 的修复过程中, NONO 被 DNA 损伤应激蛋白 PARP-1 的催化产物 PAR 结合并招募, 随后进一步与 SFPQ 结合, 介导非同源性末端重组修复途径 (NHEJ) 的起始^[13-15]。而在生物节律调控中, NONO 可与生物钟调节蛋白 PER 节律性动态结合^[16-17]。

越来越多研究发现, 旁粒各组分可直接结合在染色质上并参与转录调控, 如在 cAMP 信号转导途径中, NONO 与 TORC 蛋白结合, 介导了下游靶基因的激活^[18-19]。而在 MCF7 和 HeLa 细胞中的全基因组定位研究中发现, SFPQ 和 *NEAT1_v2* 结合在大量活化基因的启动子附近^[20]。此外, Emili 等^[21]

的报道表明, NONO 和 SFPQ 能够直接结合 RNAPII 的 C 末端结构域 (CTD domain)。这些结果提示了旁粒组分可与 RNAPII 结合, 在染色质环境中直接参与转录调控, 不过其具体的机制仍不清晰。

3 旁粒与疾病

旁粒结构与疾病也有很高的相关性。例如, HSV-1 (herpes simplex virus-1) 会利用旁粒完成自身基因组的转录和复制, 从而加速侵染宿主的进程^[22]。而在肿瘤发生发展方面, NONO 与转录因子 SREBP-1a 促进了相关脂类合成蛋白的转录, 引起乳腺癌细胞中脂类代谢的失调^[23]。而在前列腺癌中, *NEAT1* 受到 ER α 信号的激活促进下游基因转录, 加剧肿瘤的恶性程度^[24]。值得注意的是, 肿瘤基因组计划研究发现, 8% 的乳腺癌和 22% 的肝癌患者携带有 *NEAT1* 的高频率突变, 其中数类突变可导致 *NEAT1* 表达水平下调^[25]。此外, 2017 年, Mello 等^[26] 研究还发现, *NEAT1* 是 TP53 的下游基因, 敲低 *NEAT1* 的肿瘤细胞对于化疗药物更加敏感, 提示了 *NEAT1* 具有成为药物靶标的潜力。总而言之, 旁粒参与了大量生物学过程, 显示了其重要的功能性, 然而, 对于其具体的机制的研究目前才刚刚起步。

4 本实验室发现在mESC中Nono结合于双价(Bivalent)结构域基因处, 并调控细胞的自我更新状态

为了阐明 DBHS 家族蛋白的旁粒非依赖性功能以及其参与基因转录调控的机制, 我们选用了 *NEAT1_v2* 不表达的小鼠胚胎干细胞模型。在单敲除实验中, 我们意外地发现 Nono 缺失显著促进了干细胞的自我更新能力。在机制研究中, 我们发现 Nono 与 Erk 蛋白共同结合在染色质的双价结构域上, 操控发育分化相关基因的待命状态^[27]。这提示了双价结构域基因的转录待激活状态对于胚胎干细胞的多能性至关重要。

4.1 Nono缺失的mESC具有更强的自我更新能力, 其分化能力呈现下降的趋势

体外培养的小鼠胚胎干细胞存在两种常见的自我更新状态, 即 Primed 状态 (倾向于分化) 和 2i 加 LIF 培养条件下维持的 Naïve 状态 (倾向于维持全能性; 2i, 即加入 Mek/Erk 信号通路抑制物 PD03 和 GSK3 β 信号通路抑制物 CHIR)。而常用的血清加 LIF 培养条件下的 mESC 则介于这两种状态之间^[28-31]。一般认为 2i 条件下培养的 mESCs 更接近

于真实状态下的胚胎干细胞系, 且具有更好的全能性。

我们的研究还发现, Nono 敲除的 mESC 的 Mek/Erk 通路活化明显受阻, 并且比对照细胞具备更强的自我更新能力, 其基因表达谱以及表观遗传特征 (更低的全局 DNA 甲基化) 更加接近于 2i 诱导下的全能性状态。例如在敲除 Nono 的 mESC 中, 干性标志蛋白 Nanog、Klf4 和 Oct4 的水平均有 2~3 倍的上升, 且这些干性标志蛋白的表达更加均质 (图 2)。同时, 在 AP 染色和细胞克隆形成实验中, Nono 敲除细胞系具有比 WT 细胞系更高比例的未分化细胞。

此外, 基于分化实验的结果, 我们发现 Nono 缺失导致的自我更新可能是由于分化受阻造成的: 在拟胚体和 NSC (neural stem cell) 分化模型中 (图 2), 我们发现, 敲除 Nono 的细胞与野生型相比出现了明显的分化受阻, 分化标记物表达延迟, 而全能性相关蛋白标记物不能关闭; 而在畸胎瘤实验中, Nono KO 细胞形成的畸胎瘤在 4 周后依然有高比例的 Oct4 阳性细胞, 但在 WT 中几乎难以再观察到 Oct4 的表达。

4.2 Nono被Erk招募至基因组的双价(bivalent)结构域

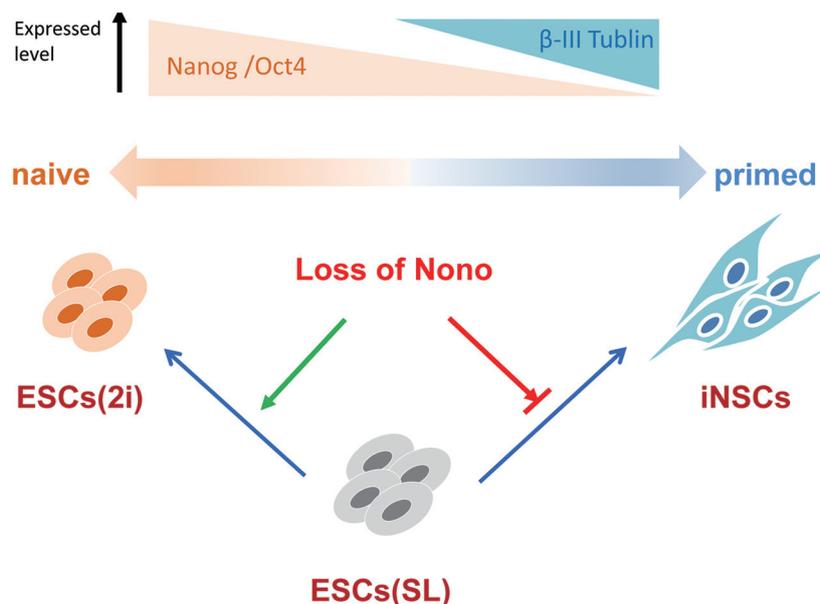
在 mESC 中进行的 Nono 染色质免疫沉淀测序 (ChIP-seq) 的结果表明, 在 Nono 结合的 1 193 个靶

基因中, 其结合位点大多集中分布在这些基因的转录起始位点 (TSS) 附近。同时, GO 分析还显示许多 Nono 的结合基因是转录调控和胚胎发育的关键基因, 如 Pax9、Tbx3、Gata4、Cdx2 和 Hox 家族的基因等。值得注意的是, 63.7% 的 Nono 结合基因具有特殊的双价 (bivalent) 结构域。双价结构域是富集于 ESC 中的一类特殊的染色质结构, 同时具有转录激活的 H3K4me3 修饰和转录抑制的 H3K27me3 修饰^[32], 维持基因的转录待命状态。这提示了 Nono 的调控机制可能与该结构域的特殊染色质环境有关。

在随后探索其机制的过程中, 我们发现 Nono 是与 Erk 蛋白相互作用, 并被招募至双价结构域染色质。我们分别针对 Nono 和 Erk 蛋白进行免疫共沉淀, 证明了两者的相互作用; 同时, Nono 和 Erk 的 ChIP-seq 结果显示这两者在染色质上的定位高度重合, 且共同富集在双价结构域上。

4.3 Nono与Erk共同调控分化发育相关RNAPII的待命状态

结合于双价结构域上的 RNAPII 处于一种等待转录信号的“待命” (poised) 状态, 一旦上游转录信号激活, 其会马上启动对应基因的转录。前期研究表明, Erk1/2 调控了双价结构域基因上 RNAPII 的 CTD domain (C 结构域) 上 5 位丝氨酸的磷酸化,



在血清和 LIF (SL) 培养条件下的 ESCs 呈现一定的 naive 状态。而 Nono KO 细胞系中, 干性标志蛋白 Nanog 和 Oct4 的表达量上升且更加均质化, 显示出类似于 2i 培养条件下更加 Naive 的细胞状态, 以及更强的自我更新能力; 在 mESC 定向神经分化 (NSC 分化) 过程中可见干性标志物 Oct4 表达延迟, 而分化标志物 β -III Tubulin 延迟表达, 表明 Nono 缺失抑制该分化过程。

图2 Nono缺失的mESC细胞自我更新能力增强、分化受阻

从而帮助建立其“待命”状态^[33]。我们发现，在敲除 Nono 之后，虽然 Erk1/2 的染色质结合情况及其蛋白水平未有显著变化，但 Erk1/2 的活性状态——即磷酸化的 Erk1/2 的水平明显降低，这导致了下游的 RNAPII 无法被磷酸化成为“待命”状态，进而导致了其对应的发育相关基因在分化过程中转录受阻，影响细胞干性。

通过上述研究，我们首次发现，在 mESC 中 Nono 结合于染色质的双价结构域处，且对于 Erk 的活化以及双价结构域基因在分化过程中的正常激活至关重要（图 3）。同时，Nono 缺失的 mESC 具有更强的自我更新能力。基于这些发现，我们认为在 mESC 中，虽然双价结构域基因还未完全表达，但是它们的染色质状态对于其在分化过程中的有序激活十分重要，而我们的工作首次发现旁粒蛋白 Nono 参与此重要的生物学过程，拓展了对于旁粒组分的功能理解。同时，Nono 缺失导致的更强的自我更新也可被利用，从而在其他物种中获得更接近 Naïve 状态的 ESC 细胞。

5 将进一步开展关于旁粒其他组分对于 mESC 生物学的调控

在本项目的后续工作中，我们正着力研究旁粒的其他组分，如 Pspc1 和 *Neat1_v1* 在双价结构域的建立和维持，以及干细胞自我更新过程中的功能（图 3）。我们还未发表的数据显示 Pspc1 在 mESC 中与 Nono 和 Erk 在染色质上的定位高度重合。同时，虽然 *Neat1* 的长变体 *Neat1_v2* 在 mESC 中不表达，但是短变体 *Neat1_v1* 还存在一定水平的表达。那么这个短变体是否也参与了这些生物学过程的调

控？此外，该调控机制在其他物种与细胞系中是否保守，特别是在人类以及其他大型哺乳类动物 ESCs 开展相关研究，将会是一个很有意义的研究课题。

6 总结

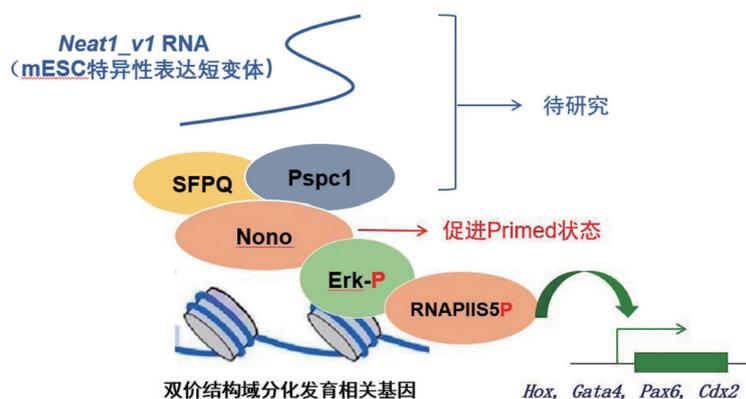
综上所述，传统认为旁粒的主要功能是参与 RNA 转录后的剪切加工，虽然已有研究发现旁粒组分可结合染色质并直接参与转录调控，但是其具体的机制仍不明了。我们在 mESC 中的研究发现，旁粒组分也会直接结合在大量待激活的分化发育基因的启动子区，与 Mek/Erk 通路共同建立并维持 RNAPII 的“待命”状态，从而调控自我更新和分化。本成果拓展了对于旁粒组分在干细胞自我更新过程以及在染色质上的功能认知。更为重要的是，由于旁粒组分参与多种病理病变过程，我们的发现还将有助于进一步了解相关疾病的致病机制，并探索可能的治疗方案。

7 致谢

感谢合作者施扬实验室对本成果做出的贡献，蓝斐实验室主要完成生化、表观遗传相关实验，施扬实验室主要完成表型相关实验。

[参 考 文 献]

- [1] Matera AG. Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol*, 1999, 9: 302-9
- [2] Fox AH, Lam YW, Leung AK, et al. Paraspeckles: a novel nuclear domain. *Curr Biol*, 2002, 12: 13-25
- [3] Andersen JS, Lyon CE, Fox AH, et al. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol*, 2002, 12: 1-11
- [4] Prasanth KV, Prasanth SG, Xuan Z, et al. Regulating gene



在胚胎干细胞中，Nono、Sfpq和Pspc1相互结合，通过Nono定位于双价结构域分化发育相关基因上，并进一步调控RNAPII的待命状态以维持相关基因的转录待激活状态。

图3 旁粒组分调控细胞干性和分化的工作模型

- expression through RNA nuclear retention. *Cell*, 2005, 123: 249-63
- [5] Fox AH, Bond CS, Lamond AI. P54nrb forms a heterodimer with PSP1 that localizes to paraspeckles in an RNA-dependent manner. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 5304-15
- [6] Myojin R, Kuwahara S, Yasaki T, et al. Expression and functional significance of mouse paraspeckle protein 1 on spermatogenesis. *Biol Reprod*, 2004, 71: 926-32
- [7] Clemson CM, Hutchinson JN, Sara SA, et al. An architectural role for a nuclear noncoding RNA: RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Mol Cell*, 2009, 33: 717-26
- [8] Li R, Harvey AR, Hodgetts SI, et al. Functional dissection of NEAT1 using genome editing reveals substantial localization of the *NEAT1_1* isoform outside paraspeckles. *RNA: New York*, 2017, 23: 872-81
- [9] Ghosal S, Das S, Chakrabarti J. Long noncoding RNAs: new players in the molecular mechanism for maintenance and differentiation of pluripotent stem cells. *Stem Cell Dev*, 2013, 22: 2240-53
- [10] Fox AH, Lamond AI. Paraspeckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2: a000687
- [11] Scadden D. A NEAT way of regulating nuclear export of mRNAs. *Mol Cell*, 2009, 35: 395-6
- [12] Jiang L, Shao C, Wu QJ, et al. NEAT1 scaffolds RNA-binding proteins and the Microprocessor to globally enhance pri-miRNA processing. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24: 816-24
- [13] Jaafar L, Li Z, Li S, et al. SFPQ•NONO and XLF function separately and together to promote DNA double-strand break repair via canonical nonhomologous end joining. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 1848-59
- [14] Salton M, Wang SY. Involvement of matrin 3 and SFPQ/NONO in the DNA damage response. *Cell Cycle*, 2010, 9: 1568-76
- [15] Krietsch J, Caron MC, Gagné JP, et al. PARP activation regulates the RNA-binding protein NONO in the DNA damage response to DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 10287-301
- [16] Kowalska E, Ripperger JA, Hoegger DC, et al. NONO couples the circadian clock to the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 1592-9
- [17] Torres M, Becquet D, Blanchard MP, et al. Paraspeckles as rhythmic nuclear mRNA anchorages responsible for circadian gene expression. *Nucleus*, 2017, 8: 249-54
- [18] Amelio AL, Miraglia LJ, Conkright JJ, et al. A coactivator trap identifies NONO (p54nrb) as a component of the cAMP-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 20314-9
- [19] Jia YL, Sewer MB. p54nrb/NONO regulates cyclic AMP-dependent glucocorticoid production by modulating phosphodiesterase mRNA splicing and degradation. *Mol Cell Biol*, 2015, 35: 1223-37
- [20] West J, Davis C, Sunwoo H, et al. The long noncoding RNAs NEAT1 and MALAT1 bind active chromatin sites. *Mol Cell*, 2014, 55: 791-802
- [21] Emili A, Shales M, McCracken S, et al. Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54 nrb/nonO bind to the RNA polymerase II CTD. *RNA*, 2002, 8: 1102-11
- [22] Wang Z, Fan P, Zhao Y, et al. NEAT1 modulates herpes simplex virus-1 replication by regulating viral gene transcription. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74: 1117-31
- [23] Zhu Z, Zhao X, Zhao L, et al. p54^{nrb}/NONO regulates lipid metabolism and breast cancer growth through SREBP-1A. *Oncogene*, 2015, 35: 1399-410
- [24] Chakravarty D, Sboner A, Nair SS, et al. The oestrogen receptor α -regulated lincRNA NEAT1 is a critical modulator of prostate cancer. *Nat Commun*, 2014, 5: 5383
- [25] Rheinbay E, Parasuraman P, Grimsby J, et al. Recurrent and functional regulatory mutations in breast cancer. *Nature*, 2017, 547: 55-60
- [26] Mello SS, Sinow C, Raj N, et al. Neat1 is a p53-inducible lincRNA essential for transformation suppression. *Genes Dev*, 2017, 31: 1095-108
- [27] Ma C, Karwacki-Neisius V, Tang H, et al. Nono, a bivalent domain factor, regulates erk signaling and mouse embryonic stem cell pluripotency. *Cell Rep*, 2016, 17: 997-1007
- [28] Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, et al. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*, 2009, 460: 118-22
- [29] Ying QL, Wray J, Nichols J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 2008, 453: 519-23
- [30] Martello G, Smith A. The nature of embryonic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30: 647-75
- [31] Torres-Padilla ME, Chambers I. Transcription factor heterogeneity in pluripotent stem cells: a stochastic advantage. *Development*, 2014, 141: 2173-81
- [32] Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 2006, 125: 315-26
- [33] Tee WW, Shen SS, Oksuz O, et al. Erk1/2 activity promotes chromatin features and RNAPII phosphorylation at developmental promoters in mouse ESCs. *Cell*, 2014, 156: 678-90