

系统研究转录因子结合和增强子活性对基因的表达的影响

安美景

Systematic dissection of genomic features determining transcription factor binding and enhancer function

Sharon R. Grossman^{a,b,c}, Xiaolan Zhang^a, Li Wang^a, Jesse Engreitz^{a,d}, Alexandre Melnikov^a, Peter Rogov^a, Ryan Tewhey^{a,e,f}, Alina Isakova^{g,h}, Bart Deplancke^{g,h}, Bradley E. Bernstein^{a,i,j}, Tarjei S. Mikkelsen^{a,k,l}, and Eric S. Lander^{a,b,m,1}

^aBroad Institute, Cambridge, MA 02142; ^bDepartment of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139; ^cHealth Sciences and Technology, Harvard Medical School, Boston, MA 02215; ^dDivision of Health Sciences and Technology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139; ^eFaculty of Arts and Sciences Center for Systems Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138; ^fDepartment of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138; ^gInstitute of Bioengineering, CH-1015 Lausanne, Switzerland; ^hSwiss Institute of Bioinformatics, CH-1015 Lausanne, Switzerland; ⁱDepartment of Pathology, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA 02114; ^jCenter for Cancer Research, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA 02114; ^kHarvard Stem Cell Institute, Harvard University, Cambridge, MA 02138; ^lDepartment of Stem Cell and Regenerative Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138; and ^mDepartment of Systems Biology, Harvard Medical School, Boston, MA 02215

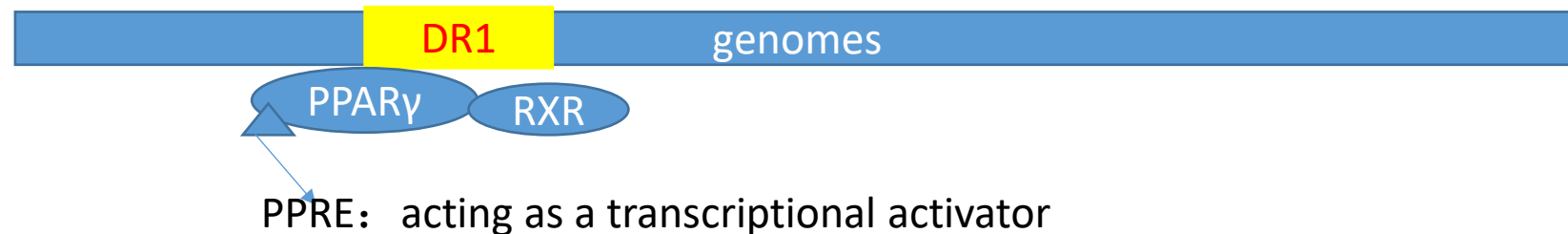
Contributed by Eric S. Lander, December 25, 2016 (sent for review December 7, 2016; reviewed by Eran Segal and Itai Yanai)

问题

- 现在已经发现很多转录因子(TF)在细胞中可以行使功能，并且可以mapping到基因组上的结合位点。基因组上成千的增强子活性对基因的表达起作用。
- 但是很多TFBSs在真核中的实际潜在功能还不知道，不同的细胞，不同的环境TF的作用也是有差别的。而且在转录过程中只25~50%的TFBSs能够行使其功能。
- 本文以在脂肪合成中起关键作用的转录因子PPAR γ 为例，为系统的研究TF和增强子对基因表达提供了一种新方法。

背景

- PPAR γ : 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ
- PPRE: 是PPAR γ 的应答元件
- RXR: 类视黄醇X受体
- DR1 motif: 存在于细胞核内的受体蛋白



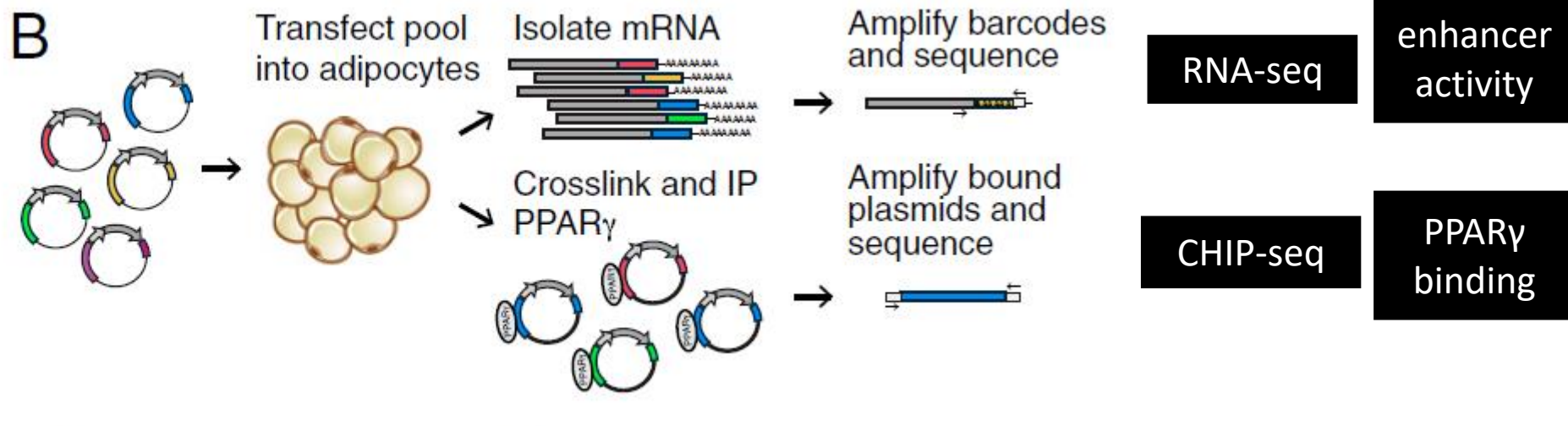
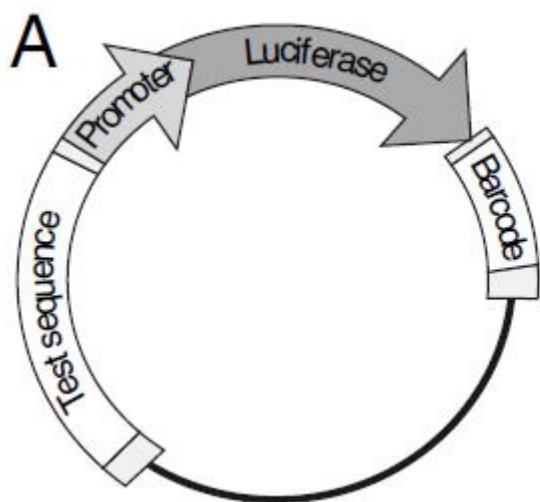
motif: 基元, 基序[构成任意一种特征序列或结构的基本单位]

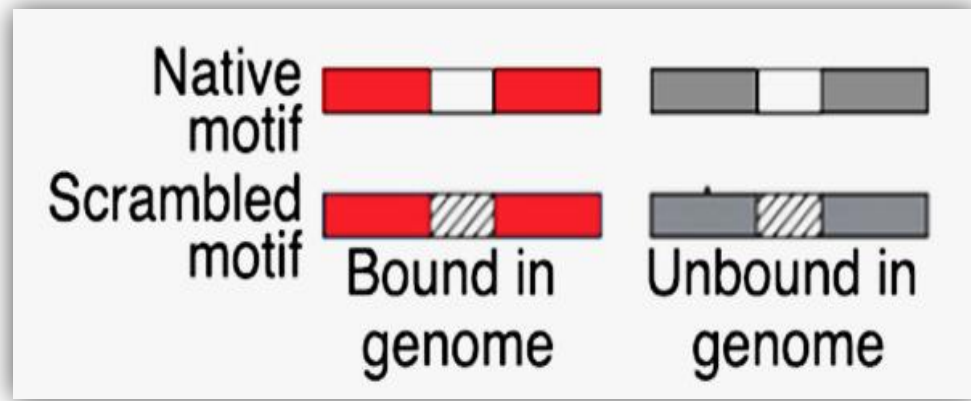
Protein sequence motifs.

signatures of protein families and can often be used as tools for the prediction of protein function.

实验方法

- massively parallel reporter assays (MPRAs)





Bound in genome: 在已知的6835中PPAR γ motif sites随机挑750个可以结合到genome上的序列

Unbound in genome: 在Bound in genome的基础上加上相同的16bp PPAR γ motif

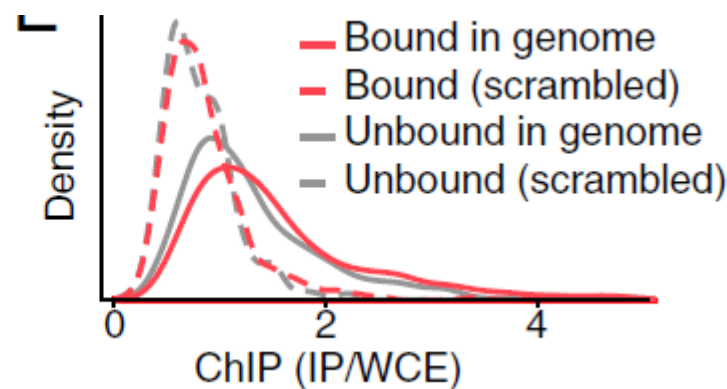
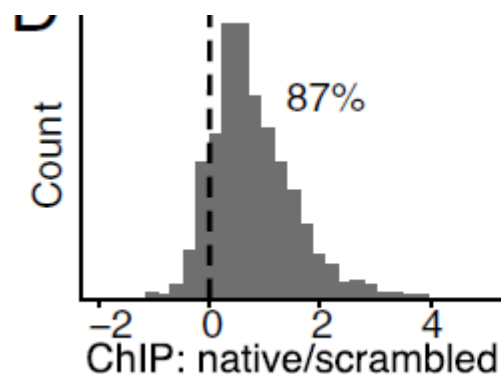
Native motif: 145 bp core PPAR γ motif

Scrambled motif: 通过swapping A \leftrightarrow T and G \leftrightarrow C 扰乱145bp

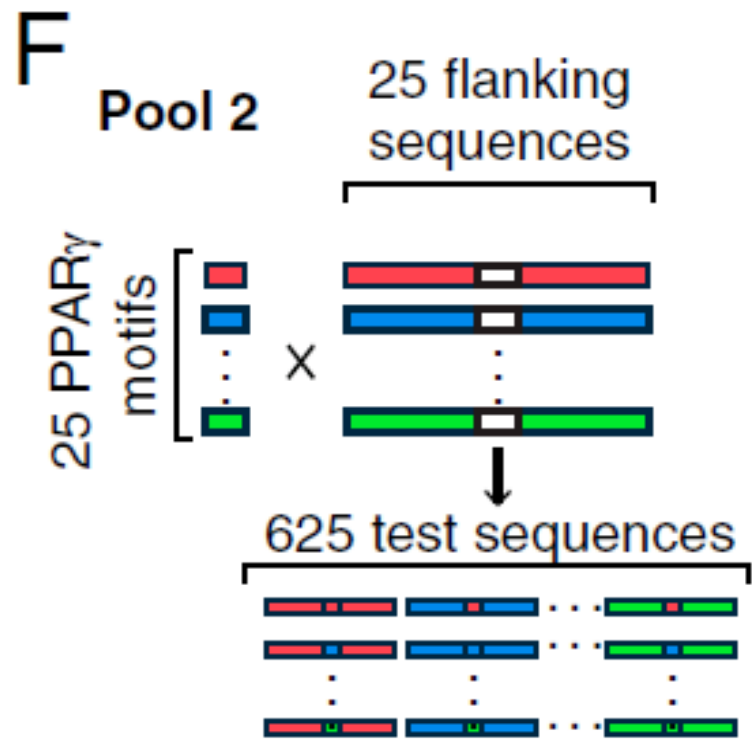
Result

1.在体内，RRAR γ 能否结合到质粒上是受core PPAR γ motif控制的。

发现native motif 与scrambled motif相比PPAR γ 的结合能力提高了87%。同时惊奇的是在bound和unbound之间结合能力并没有明显的差别。



猜测：PPAR γ 的结合主要依赖的是core PPAR γ motif与周围的element直接相互作用的关联性小。

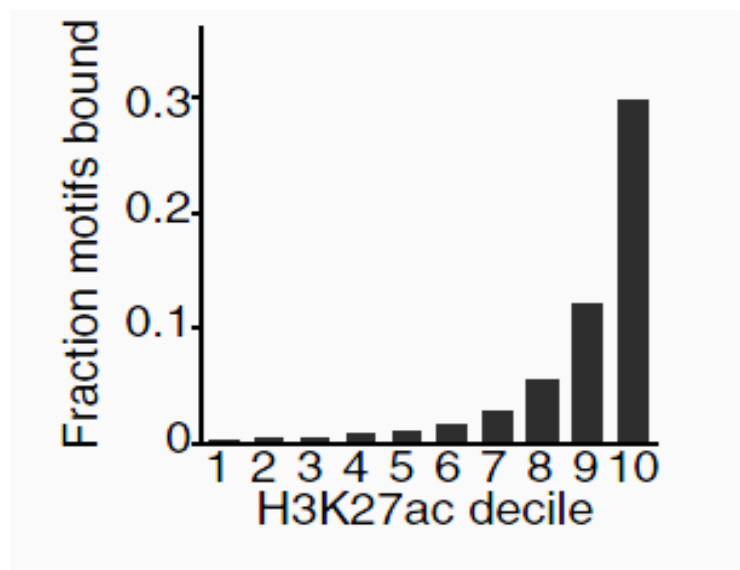


the plasmid pool strongly depended on the precise sequence of the core PPAR γ motif site rather than on the flanking sequence

2.PPAR γ 结合到基因组的PPAR γ motif 与染色质的状态有关

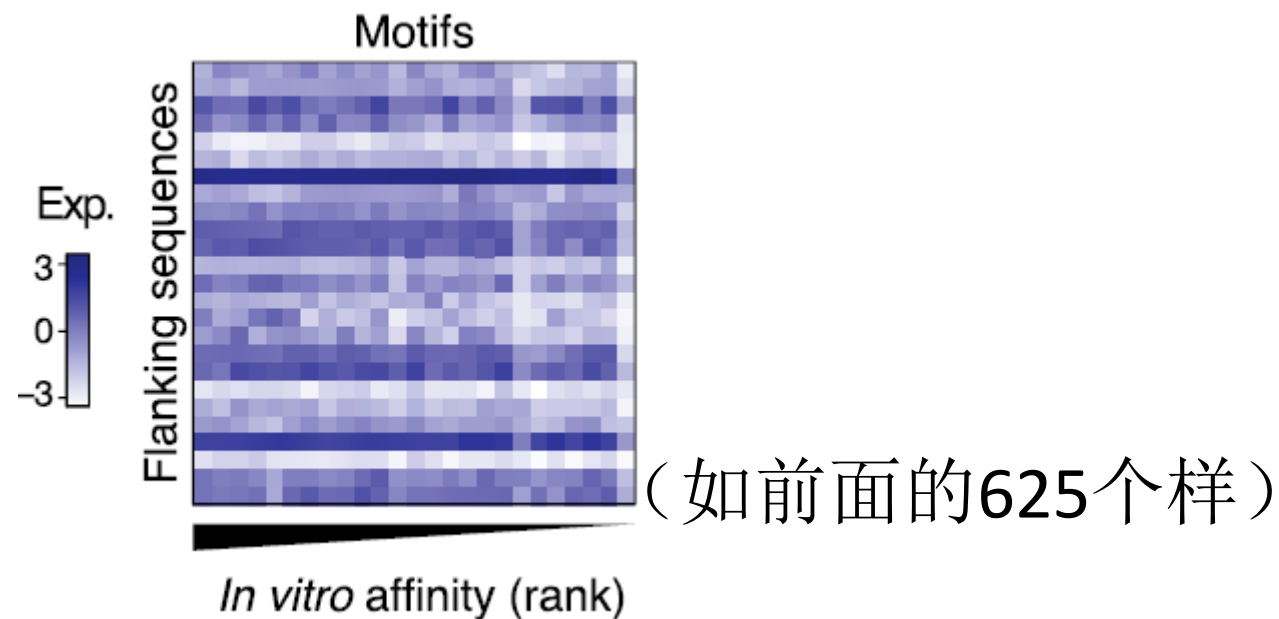
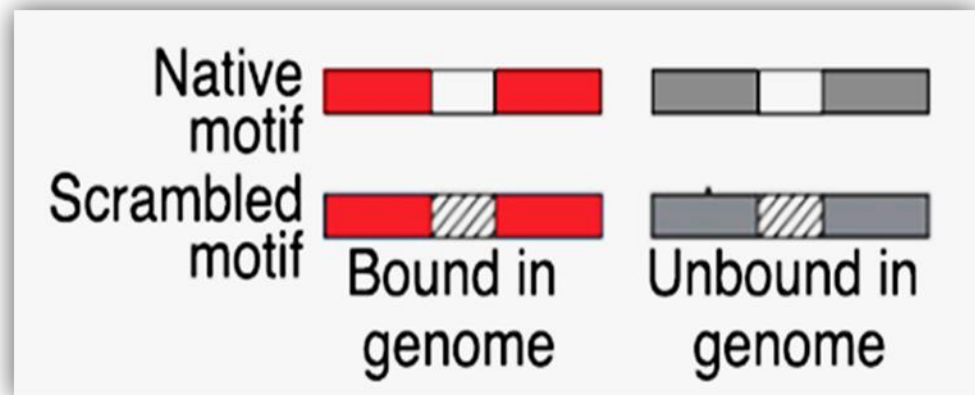
问题：为什么不同的core PPAR γ motif 之间对PPAR γ 的结合是有差别的。

85%的PPAR γ 结合位点是位于open chromatin区域。通过使用标记基因H3K27ac 发现它的富集程度与PPAR γ 的结合能力有关，结合能力对DNA accessibility有很强的依赖性。



PPAR对染色体状态有要求，同时也影响染色体。已知PPAR γ 在基因上的结合位点在PPAR γ 表达前后对DNase的敏感不同

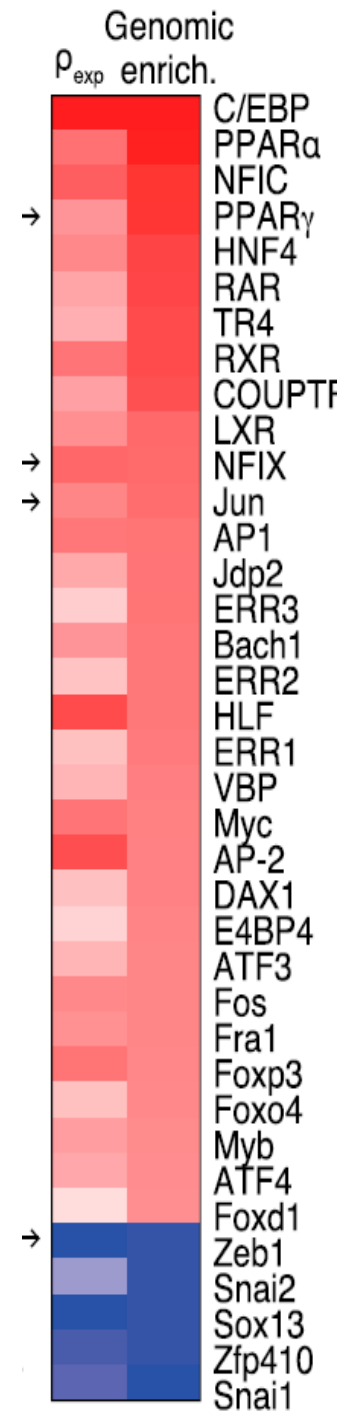
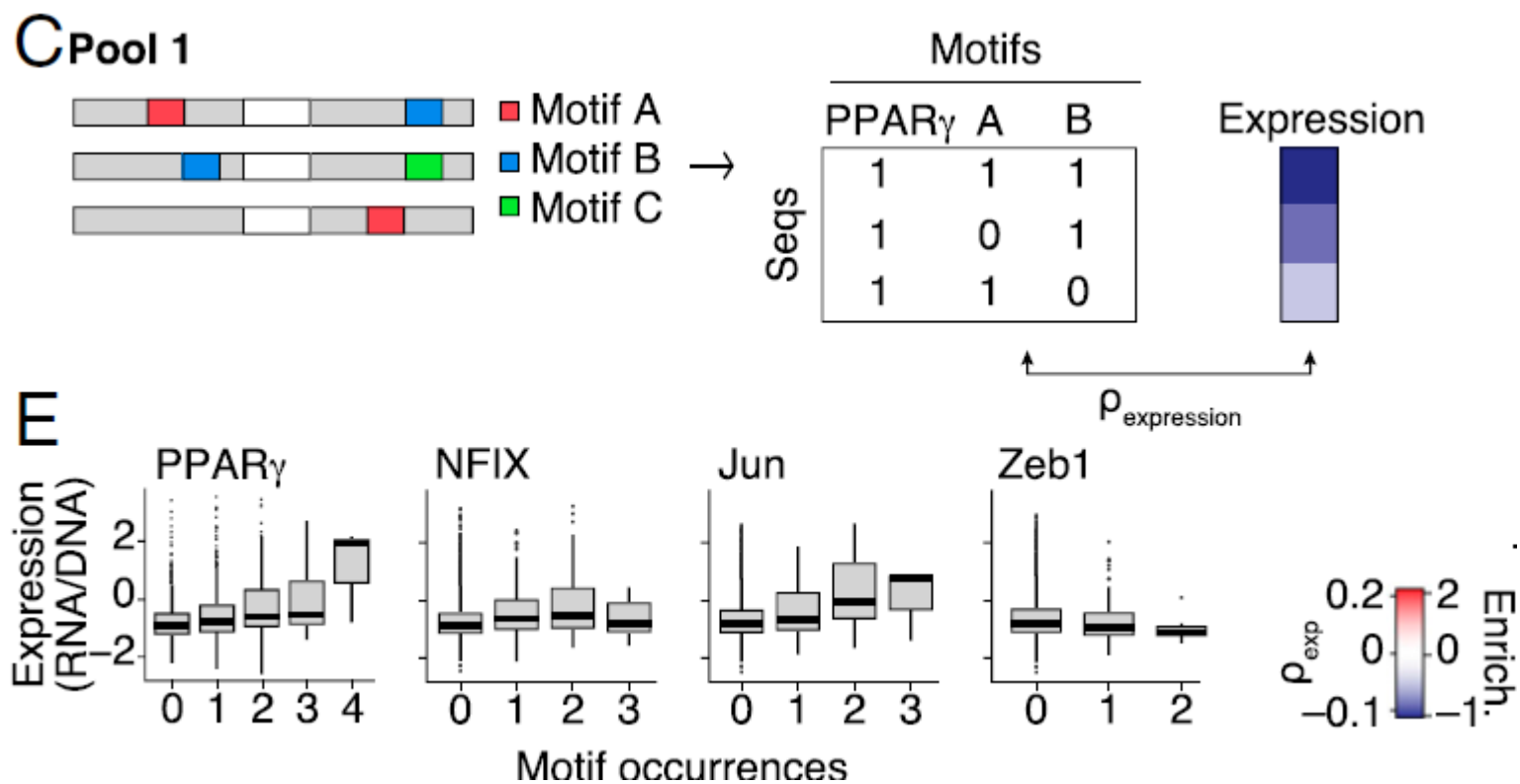
3.PPAR γ motifs对基因表达的影响(RNA-seq)



虽然flanking sequence对PPAR γ 的binding影响不明显但是对基因的表达量的影响很大。结果发现超过一半的bound Sequences行使的表达水平比95%的unbound要高。

这也可能暗示的flanking sequence和core PPAR γ motif对增强子的活性有很大的影响。

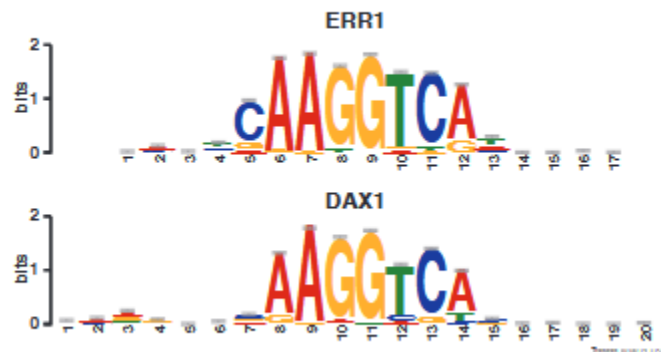
4.特殊的TF motifs与转录活性相关联



四种补充

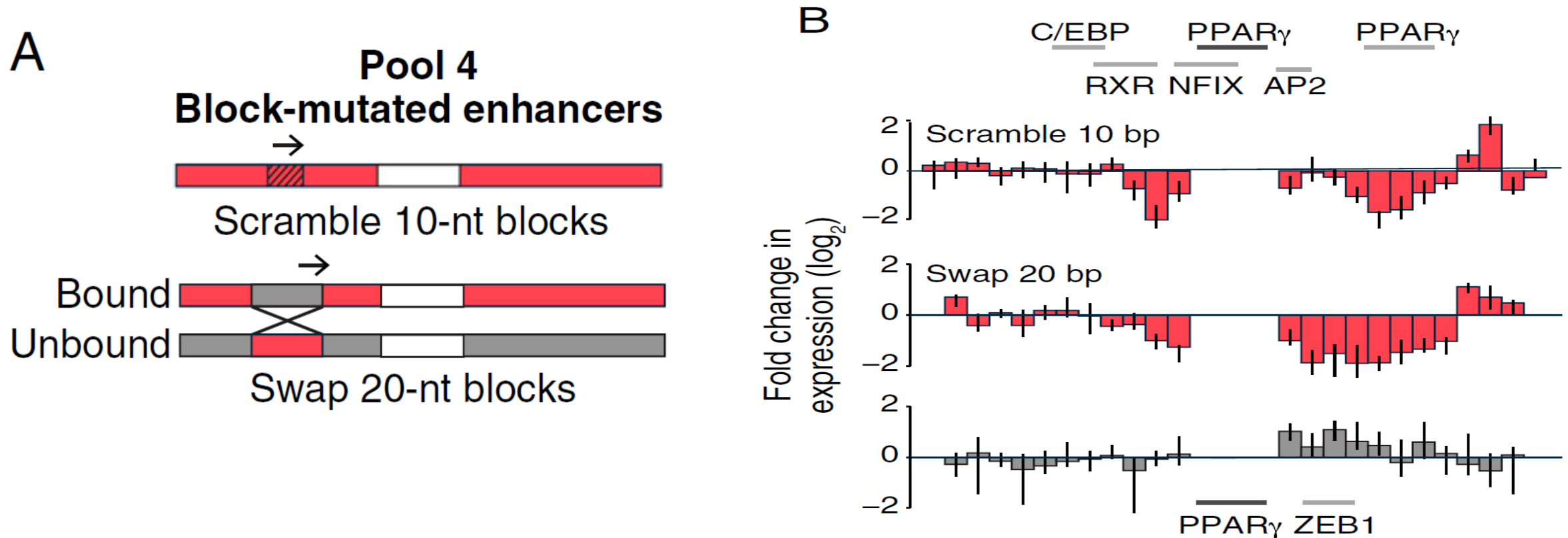
- 1在38种TFs中有三个“nonexpressed” TFs，分别为ERR2、ERR3、DAX-1.与ERR1有高相似性的motif。而其他的TFs在脂肪细胞中都表达。

E

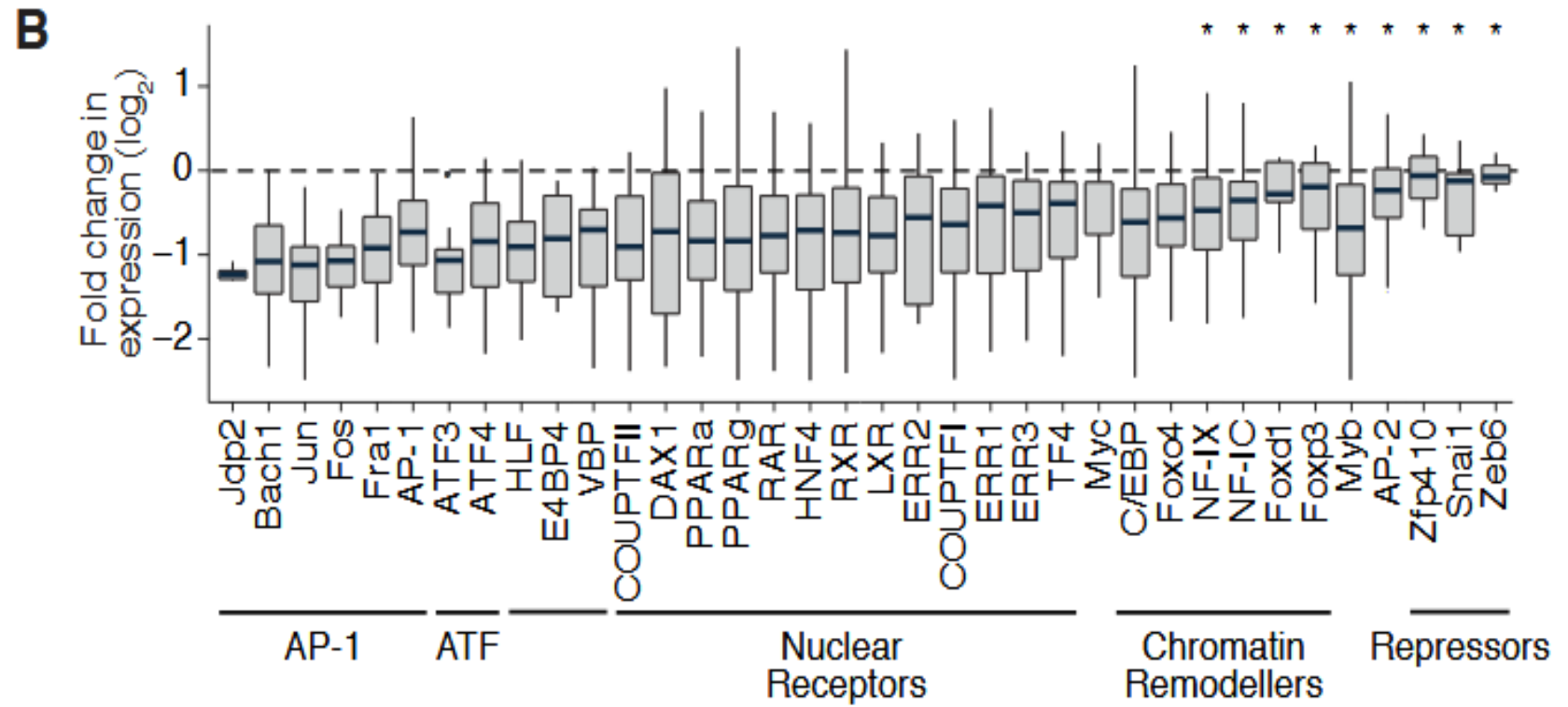
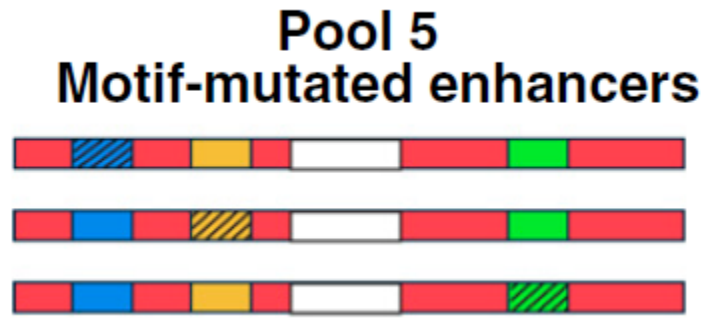


- **2**存在PPAR γ /RXR motif 时比只有单一的motif增强子的活性提高了两倍。这个符合之前对其功能研究的猜想。
- **3**这些具有积极关联的TFs在之前的研究中可知其对脂肪细胞分化具有促进作用。相反，消极关联的TFs是转录抑制因子可以抑制脂肪细胞特异化基因的表达。
- **4**Foxo4和Foxp3两种TFs没有明显的enriched。

5 扰乱 TF Motif 造成表达量的改变



Disrupted positively correlated TF motif sites reduced expression



38 significantly correlated motifs in 375 bound genomic sequences
 Mutating activating transcription factor (ATF) and
 activator protein 1 (AP-1) factors had the largest effect

- 总结
- 1作者通过MPRAs的方法构造各种mutation质粒导入细胞查看其对PPAR γ 结合和转录的影响。
- 2此研究中作者以循序渐进的方法构造出不同的质粒，也凸显了实验设计的严谨性
- 3本文的研究只是针对PPAR γ 在脂肪细胞的研究，其不一定适合其他的TF在其他类细胞的功能。但本文为TF的研究提供了一种具有可行性的方法。