

## 研究论文

# 果蝇组蛋白去乙酰化酶HDAC1和HDAC3选择性 调控形态发生素靶基因转录

曹俊 李民 石伟杰 黄勤竹\* 林鑫华\*

(温州医科大学眼视光学院, 温州 325027)

**摘要** 在真核细胞中, 组蛋白的乙酰化状态对于基因转录的正常进行具有重要的调控作用。组蛋白的乙酰化修饰由组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferases, HATs)执行, 这种修饰是动态的、可逆的, 负责去乙酰化修饰的酶是组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs), 推测HDACs可能通过影响组蛋白的乙酰化状态在基因的转录过程中发挥调控作用。该文以组蛋白去乙酰化酶HDAC1和HDAC3为对象, 研究了它们在果蝇翅膀发育过程中对Wg(Wingless)、Hh(Hedgehog)以及Dpp(Decapentaplegic)信号通路下游靶基因转录的调控作用。结果发现, HDAC1功能缺失可导致Dpp下游靶基因*Omb*(optomotor-blind)和Hh下游靶基因*Ptc*(patched)的表达上调。Real-time quantitative PCR(RT-qPCR)结果显示, 在*HDAC1*基因敲除的果蝇中, *Ptc*、*Ci*(cubitus interruptus)以及*Omb*的转录水平增加。HDAC3缺失导致*Sal*(spalt)的表达上调。RT-qPCR结果证实了*HDAC3*基因敲除果蝇的*Sal*转录增加, 同时发现*Vg*(vestigial)的转录下降。而过表达*HDAC1*或*HDAC3*对下游靶基因的表达则没有影响。综上所述, 该研究表明, HDAC1和HDAC3可以选择性地调控形态发生素下游靶基因的转录。

**关键词** 果蝇; HDAC1; HDAC3; 形态发生素; 基因转录

## *Drosophila* Histone Deacetylases 1 and 3 Selectively Regulate the Transcription of Morphogens Target Genes

Cao Jun, Li Min, Shi Weijie, Huang Qinzhu\*, Lin Xinhua\*

(School of Optometry, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China)

**Abstract** In eukaryotic cells, histone acetylation plays an important role in the process of RNA transcription. The histone acetylation status is mainly regulated by two classes of enzymes: histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs). Histone acetylation is carried out by HATs, and this modification is dynamic and can be reversed by HDACs. Thus, we can easily infer that HDACs may render some impact on gene transcription by controlling histone deacetylation. In the current study, we explored the potential

收稿日期: 2015-01-07 接受日期: 2015-04-08

国家基础计划(批准号: 2011CB943901、2011CB943902)、温州医科大学人才启动项目(批准号: QTJ08012)、温州医科大学科研基金重大项目(批准号: XNK07005)和温州市科技局计划项目(批准号: Y20140143)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0577-88067914, E-mail: huangqinzhu@hotmail.com; Tel: 0577-88067914, E-mail: xinhua.lin@ioz.ac.cn

Received: January 7, 2015 Accepted: April 8, 2015

This work was supported by the National Basic Research Program of China (Grant No.2011CB943901, 2011CB943902), Research Foundation for Advanced Talents of Wenzhou Medical University (Grant No.QTJ08012) and Wenzhou Medical University Research Grant (Grant No.XNK07005) and the Wenzhou Municipal Science and Technology Program (Grant No.Y20140143)

\*Corresponding authors. Tel: +86-577-88067914, E-mail: huangqinzhu@hotmail.com; Tel: +86-577-88067914, E-mail: xinhua.lin@ioz.ac.cn

网络出版时间: 2015-06-01 16:06 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150601.1606.009.html>

role of HDAC1 and HDAC3 in the transcription of several target genes of Wg, Hh and Dpp during *Drosophila* wing development. Our results showed that Dpp target gene *Omb* (optomotor-blind) and Hh target gene *Ptc* (patched) were dramatically increased upon loss of HDAC1. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) results showed up-regulation of *Ptc*, *Ci* (cubitus interruptus) and *Omb* transcription in *HDAC1* mutant fly. As to HDAC3, our data indicated that HDAC3 knock-out resulted in increased expression of Dpp target gene *Sal* (spalt). RT-qPCR results showed up-regulation of *Sal* and down-regulation of *Vg* transcription in *HDAC3* mutant fly. However, either over-expression of HDAC1 or HDAC3 had no effect on the target genes expression of Wg, Hh and Dpp. Altogether, our results indicated that HDAC1 and HDAC3 selectively regulated the transcription of morphogens target genes.

**Keywords** *Drosophila*; HDAC1; HDAC3; morphogen; gene expression

组蛋白乙酰化是发生在核小体组蛋白N端尾部赖氨酸残基上的乙酰化修饰作用,它在基因转录调控中的作用很早就被提及<sup>[1-4]</sup>。组蛋白乙酰化修饰作用由组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferases, HATs)执行,这种修饰作用是动态的、可逆的,而负责去除乙酰化修饰作用的则是组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)。组蛋白乙酰化与基因转录激活相关,如某些辅转录因子PCAF(p300/CBP associating factor)、CBP(CREB-binding protein)以及p300(E1A binding protein p300)本身就具有组蛋白乙酰化酶的活性<sup>[2,5]</sup>。而组蛋白去乙酰化通常与基因转录抑制相关,如去乙酰化酶HDAC1被认为是一种辅转录抑制因子<sup>[6-8]</sup>。在真核细胞中,组蛋白乙酰化酶与去乙酰化酶的相互作用和动态平衡一方面影响核小体乃至染色质整体结构的动态变化,另一方面又影响一些转录因子的介入<sup>[9]</sup>。基于以上两方面的作用,组蛋白乙酰化状态被认为是染色质活化与基因转录激活的一个重要开关<sup>[10]</sup>。

人类共有18个HDACs,根据与酵母中组蛋白去乙酰化酶蛋白序列及功能相似性情况,主要可归为四类:第一类与酵母Rpd3(reduced potassium dependence 3)同源,包括HDAC1、HDAC2、HDAC3和HDAC8;第二类与酵母Hda1(histone deacetylase 1)同源,包括HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC9和HDAC10;第三类与酵母Sir2(silent information regulator 2)同源,包括Sirt1、Sirt2、Sirt3、Sirt4、Sirt5、Sirt6和Sirt7;第四类为HDAC11<sup>[11-13]</sup>。在果蝇系统中,则只有5个HDACs,包括HDAC1、HDAC3、HDAC 4、HDAC6以及Sir2。由于参与基因转录调控,它们对细胞周期调控、细胞凋亡以及细胞生长等众多生物学过程都具有重要作用<sup>[14-15]</sup>,因此与很多疾病及癌症的发生有着密切关系。目前已有大量研究报

道证实,利用HDAC抑制剂(HDAC inhibitors)可治疗癌症、心脏疾病以及神经退行性疾病<sup>[16-21]</sup>。

在个体发育过程中,各组织中细胞的分化都依赖其特定的位置信息,这种位置信息是由形态发生素的浓度梯度来设定的。果蝇作为一种经典的模式生物,在有关形态发生素的研究中得到广泛应用。在果蝇体系中,Wg、Hh和Dpp是最典型、研究最广泛的三个形态发生素分子。目前,国内外已有很多关于它们生物学功能及其作用机制的研究,大致可分为三个方面:一是有关形态发生素的合成与分泌及其浓度梯度的形成机制;二是形态发生素分子作用于细胞的方式,即其在细胞内的信号转导机制;三是形态发生素的信号接收细胞如何控制其靶基因表达。关于前两个问题,研究者们已做了大量细致的研究,而关于形态发生素下游靶基因表达调控的问题,由于更多涉及基因转录调控领域,目前还没有得到很详尽的解答。

HDAC1和HDAC3同属于第一类HDACs。有报道称在果蝇系统中,它们是参与基因转录调控最主要的两个HDACs<sup>[22-24]</sup>。HDACs通常作为辅转录抑制因子,参与形成不同的蛋白复合体,从而实现其转录抑制作用。例如,HDAC1参与形成Sin3复合体、Mi2/NuRD(Mi2/nucleosome-remodeling and deacetylation)复合体以及CoREST(corepressor for RE1 silencing transcription factor)复合体,而HDAC3则参与形成SMRT/NCOR(silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors/nuclear receptor corepressor)复合体。这些蛋白复合体被不同的序列特异性DNA结合蛋白(如某些转录因子)招募到特定的靶基因,发挥相应的转录调控作用<sup>[25-26]</sup>。在果蝇中,目前已有研究报道了HDAC1与HDAC3在形态发生素分子Wg、Hh以及Dpp下游靶基因转录过程中的作用。如在Arm(Armadillo)缺失的情况

下, 转录因子Tcf(T-cell factor)行使转录抑制因子的功能, 并招募辅转录抑制因子Gro(Groucho)抑制Wg下游靶基因的表达<sup>[27]</sup>。Gro与HDAC1有直接的相互作用, 报道显示, Gro介导的转录抑制与HDAC1的组蛋白去乙酰化作用密切相关<sup>[28-29]</sup>。而Zhang等<sup>[30]</sup>报道, 果蝇HDAC1和Atro(Atrophin)复合体作为转录抑制因子Ci<sup>R</sup>(repressor form of Ci)的一个辅转录抑制因子, 会被Ci<sup>R</sup>招募到Hh下游靶基因Dpp转录调控元件的Ci结合位点上, 通过改变其乙酰化状态而抑制Dpp的转录, 并且这种转录抑制过程在斑马鱼中也是保守的。但是有关HDAC1在Dpp下游靶基因转录过程中的作用还不清楚, 而HDAC3与Wg、Hh以及Dpp下游靶基因转录关系的研究也还未见系统报道。

本文以果蝇翅膀成虫盘(wing disc)为模型, 初步探索了在果蝇翅膀发育过程中, 组蛋白去乙酰化酶HDAC1和HDAC3对Wg、Hh以及Dpp这三个形态发生素下游靶基因表达的调控作用, 结果显示, HDAC1和HDAC3可以选择性地调控形态发生素下游靶基因的转录。

## 1 材料与方法

### 1.1 果蝇品系

*ptc-lacZ*、*omb-lacZ*、*dll-lacZ*/CyO、*y w hsflp*; *Sp*/CyO; *Act>y<sup>+</sup>>Gal4 UAS-CD2-GFP/TM6B*、*y w hsflp122 Tub-Gal4 UAS-GFP*; *Tub-Gal80 FRT<sup>82B</sup>/TM6B*。

*w<sup>\*</sup>*; *Rpd3<sup>def24</sup> FRT<sup>2A</sup> FRT<sup>82B</sup>/TM6B Tb<sup>1</sup>*、*y<sup>1</sup> w<sup>\*</sup>*; *UAS-Rpd3-V5*、*w<sup>\*</sup>*; *Wg<sup>Sp-1</sup>/CyO*; *FRT<sup>2A</sup> FRT<sup>82B</sup> HDAC3<sup>N</sup>/TM6B Tb<sup>1</sup>*、*y<sup>1</sup> w<sup>\*</sup>*; *UAS-HDAC3-V5/CyO*; *MKRS/TM6B Tb<sup>1</sup>*购买于印第安纳大学Bloomington果蝇中心。

### 1.2 试剂及仪器

PBS溶液、0.1% PBST溶液(1×PBS+0.1% Triton X-100)按分子生物学实验指南自行配制, Triton X-100购自AMRESCO公司, 37%甲醛、普通马血清(normal horse serum, NHS)购自Sigma公司。

激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss, LSM710, 德国); 果蝇25 °C培养箱(宁波江南仪器厂, HWS智能型); 恒温摇床、涡旋振荡器(其林贝尔仪器制造有限公司); 水浴锅(江苏荣华仪器制造有限公司)。

免疫荧光所用的一抗分别为: Chicken anti LacZ(1:1 000)购自Abcam公司, Mouse anti V5购自

美国Sigma公司, 其他的抗体包括Guinea pig anti Sens、Rat anti Ci、Rabbit anti Sal以及Rabbit anti Vg均来自本实验室。荧光偶联二抗: Chicken anti Cy3、Guinea pig anti Cy3、Rat anti Cy3、Rabbit anti Cy3和Mouse anti Cy5均购自美国Invitrogen公司。

### 1.3 MARCM克隆技术以及Flip-out实验技术

MARCM克隆的制作流程如下: 首先将与FRT82B重组好的HDAC1或HDAC3突变体果蝇(*w<sup>\*</sup>*; *Rpd3<sup>def24</sup> FRT<sup>2A</sup> FRT<sup>82B</sup>/TM6B Tb<sup>1</sup>*或*w<sup>\*</sup>*; *Wg<sup>Sp-1</sup>/CyO*; *FRT<sup>2A</sup> FRT<sup>82B</sup> HDAC3<sup>N</sup>/TM6B Tb<sup>1</sup>*)与工具蝇*y w hsflp122 Tub-Gal4 UAS-GFP*; *Tub-Gal80 FRT<sup>82B</sup>/TM6B*杂交并置于25 °C培养箱饲养, 然后分别在48 h和72 h于37 °C水浴锅将F1代热击1 h, 继续于25 °C培养箱饲养到幼虫长到三龄用于解剖。

Flip-out实验技术流程如下: 将HDAC1或HDAC3的过表达转基因果蝇(*y<sup>1</sup> w<sup>\*</sup>*; *UAS-Rpd3-V5*或*y<sup>1</sup> w<sup>\*</sup>*; *UAS-HDAC3-V5/CyO*; *MKRS/TM6B Tb<sup>1</sup>*)与工具蝇*y w hsflp*; *Sp/CyO*; *Act>y<sup>+</sup>>Gal4 UAS-CD2-GFP/TM6B*杂交并置于25 °C培养箱饲养, 然后在48 h于37 °C水浴锅将F1代热击1 h, 热击结束后继续置25 °C培养箱饲养至三龄用于解剖。

### 1.4 免疫荧光染色

免疫荧光染色的方法参考文献[31]。取相应基因型的三龄幼虫于预冷的1×PBS中解剖, 获得的组织于4%多聚甲醛中固定15 min, 然后用0.1% PBST

表1 RT-qPCR引物序列

Table 1 The primer sequences of RT-qPCR

引物名称 Primer names	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')	目的基因 Target genes
Rp 49-S	AGA TCG TGA AGA AGC GCA CCA AG	<i>Rp49</i>
Rp 49-A	CAC CAG GAA CTT CTT GAA TCC GG	
Omb-S	CTA ACG CAA CGA CCC ACT GA	<i>Omb</i>
Omb-A	TGA AAC GGC CAC GAG ATT GTT	
Vg-S	TGC CCC GAA GTT ATG TAC GG	<i>Vg</i>
Vg-A	TGG TTG AAC CTC TCA TAC TGG TA	
Sal-S	CAC TGG ACA GGG TGG AGT TAG	<i>Sal</i>
Sal-A	GAT CCG ACA GGA CTT CCG TAA	
Sen-S	CCG AAA AGG AGC ATG AAC TC	<i>Sen</i>
Sen-A	CGC TGT TGC TGT GGT GTA CT	
Ci-S	GAT TTT CGC CAA ACT CTT TAG CC	<i>Ci</i>
Ci-A	ACA TGG GAT TAA GGG CGG TAG	
Dll-S	GGA GCA CCT ATC AGC ATT TCG	<i>Dll</i>
Dll-A	CGC ACT TAT CGG AGA TGG AGA	
Ptc-S	TGC ACC TCT ACG ACA CCG AA	<i>Ptc</i>
Ptc-A	GCC TGG TAT AAC GAC CGC T	

清洗以及5% NHS封闭, 室温下一抗及二抗孵育 1.5~2 h, 最后取翅膀成虫盘铺片及激光共聚焦显微镜观察。

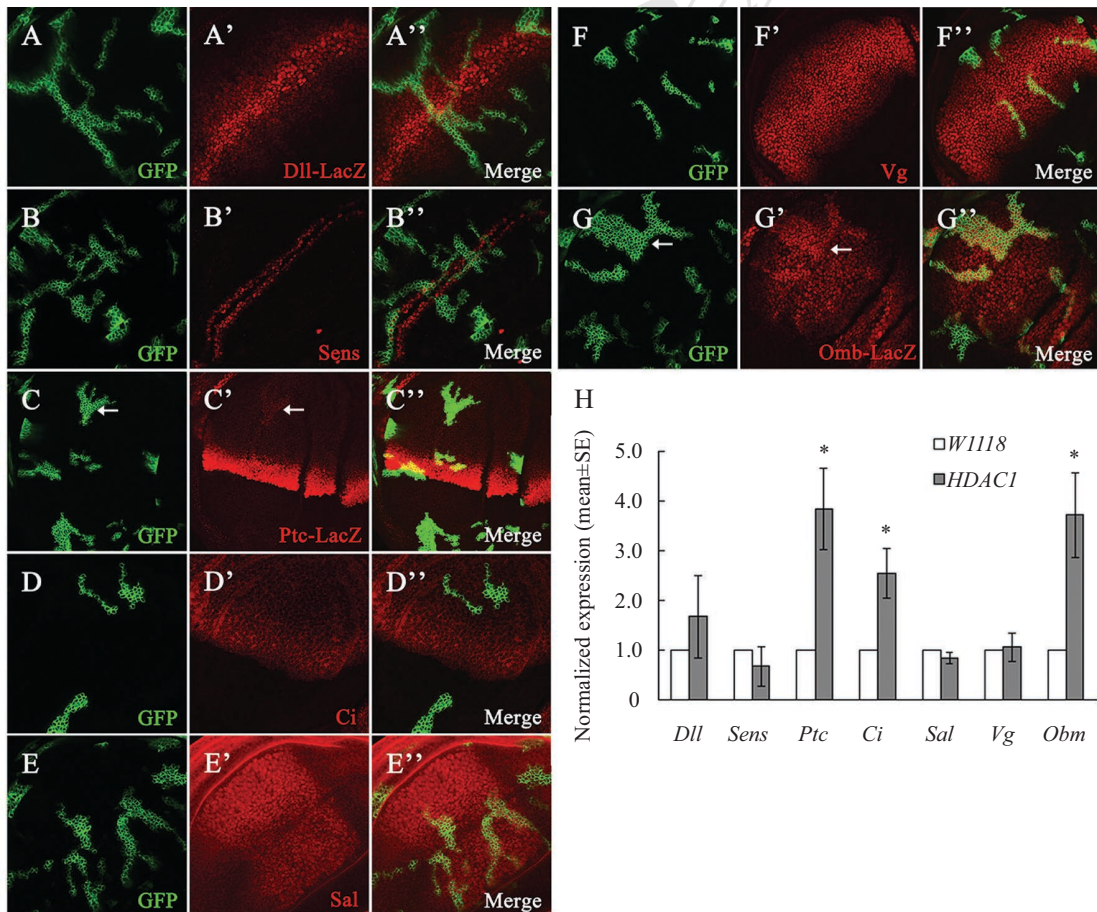
### 1.5 RT-qPCR检测

由于HDAC1和HDAC3的突变体果蝇都是二龄后期致死, 根据Tm6B、tub平衡子的表型挑取纯合的HDAC1和HDAC3突变体二龄幼虫各50只, 以W1118的二龄幼虫为正常对照。Promega试剂盒提取总RNA并反转录为cDNA, 使用Go-Taq® PCR Master Mix和CFX96 PCR扩增仪(BioRad)进行扩增, 并获得数据。重复3次, 结果用独立样本t检验进行分析(SPSS 10.0)。所用的引物序列如表1所示。

## 2 结果

### 2.1 HDAC1的缺失对形态发生素靶基因表达的影响

我们首先观察了HDAC1缺失对Wg、Hh以及Dpp信号通路下游靶基因表达的影响, 结果发现, 与野生型细胞(即没有GFP标记的细胞)相比, HDAC1突变细胞中的Wg下游靶基因Sens和DII-LacZ的表达量都没有变化, 说明HDAC1不影响Wg下游靶基因Sens和DII-LacZ的表达(图1A~图1B'')。同样地, 我们又检测了Hh下游靶基因Ptc和Ci的表达情况, 发现HDAC1突变细胞中Ptc-LacZ的表达上升, 但Ci的表达量没有变化(图1C~图1D''), 说明HDAC1可能参

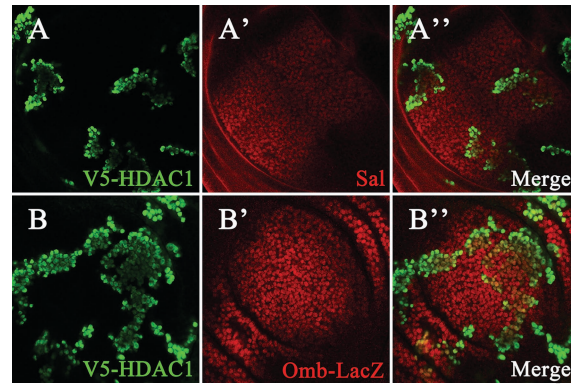


A~G'': 免疫荧光染色检测各基因的表达。A~G: GFP标记HDAC1基因敲除的组织。A': 在突变组织中, DII-LacZ的表达水平没有变化; B': 在突变组织中, Sens的表达水平没有变化; C': 在突变组织中, Ptc-LacZ的表达水平增加(箭头); D': 在突变组织中, Ci的表达水平没有变化; E': 在突变组织中, Sal的表达水平没有变化; F': 在突变组织中, Vg的表达水平没有变化; G': 在突变组织中, Omb-LacZ的表达水平增加(箭头)。A''~G'': 为对应的合成图。H: RT-qPCR检测各基因的表达水平(\* $P < 0.05$ , 与W1118组比较)。

A~G'': immunofluorescence to detect various genes expression. A~G: GFP marked the HDAC1 knock-out tissues. A': the expression of DII-LacZ was normal in HDAC1 mutant clones; B': the expression of Sens was normal in HDAC1 mutant clones; C': Ptc-LacZ expression was increased (arrow); D': Ci level was not altered in HDAC1 mutant clones; E': the expression of Sal was normal in HDAC1 mutant clones; F': Vg staining remained normal in HDAC1 mutant clones; G': Omb-LacZ expression was increased (arrow). A''~G'': the merged images. H: RT-qPCR to examine the mRNA levels of each gene (\* $P < 0.05$  compared with W1118 group).

图1 HDAC1基因敲除对Wg、Hh以及Dpp下游靶基因表达水平的影响

Fig.1 Effects of HDAC1 knock-out on the expressions of Wg, Hh and Dpp downstream target genes

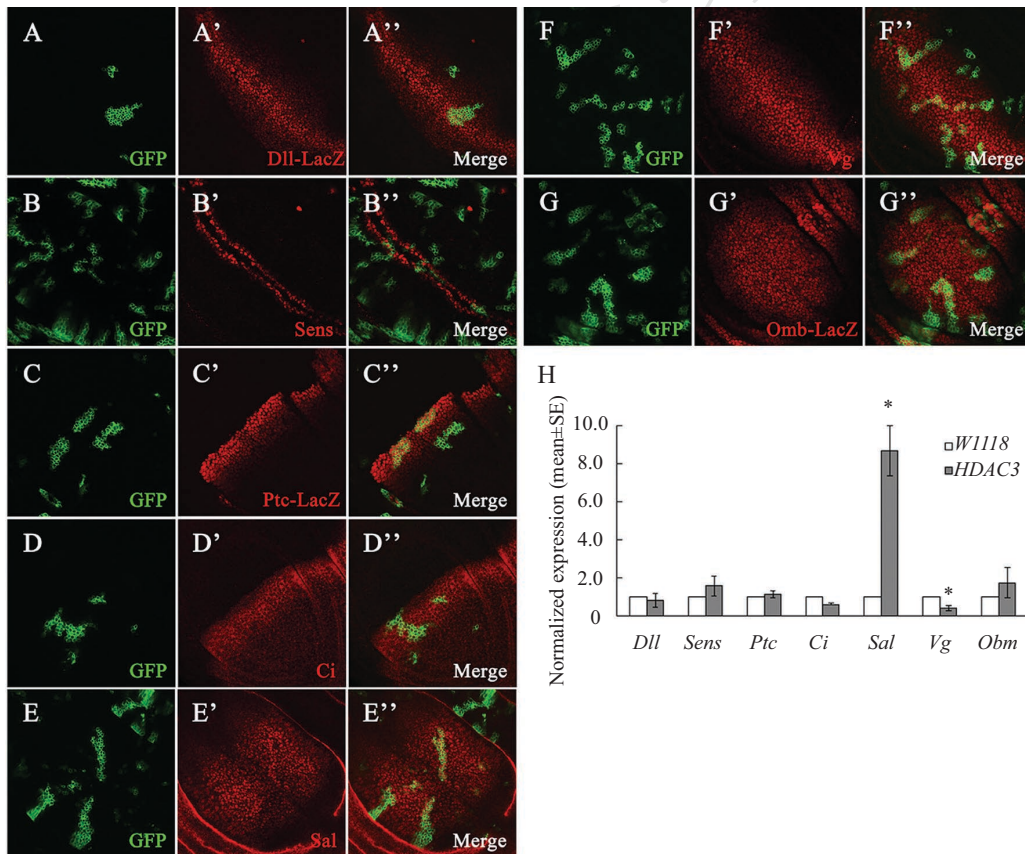


A, B: GFP标记的组织为V5-HDAC1过表达的区域。A': 在V5-HDAC1过表达的组织中, Sal的表达水平没有变化; B': 与不表达GFP的正常组织相比, 过表达V5-HDAC1组织中的Omb-LacZ表达水平没有变化。A'', B'': 为对应的合成图。

A,B: GFP marked the area where V5-HDAC1 was over-expressed. A': in V5-HDAC1 over-expressed tissues, the expression level of Sal was normal; B': compared with the GFP-negative tissue, Omb-LacZ staining was not altered in V5-HDAC1 over-expressed tissues. A'',B'': the merged images.

图2 过表达HDAC1对Dpp下游靶基因表达的影响

Fig.2 Effects of HDAC1 over-expression on the Dpp downstream target genes

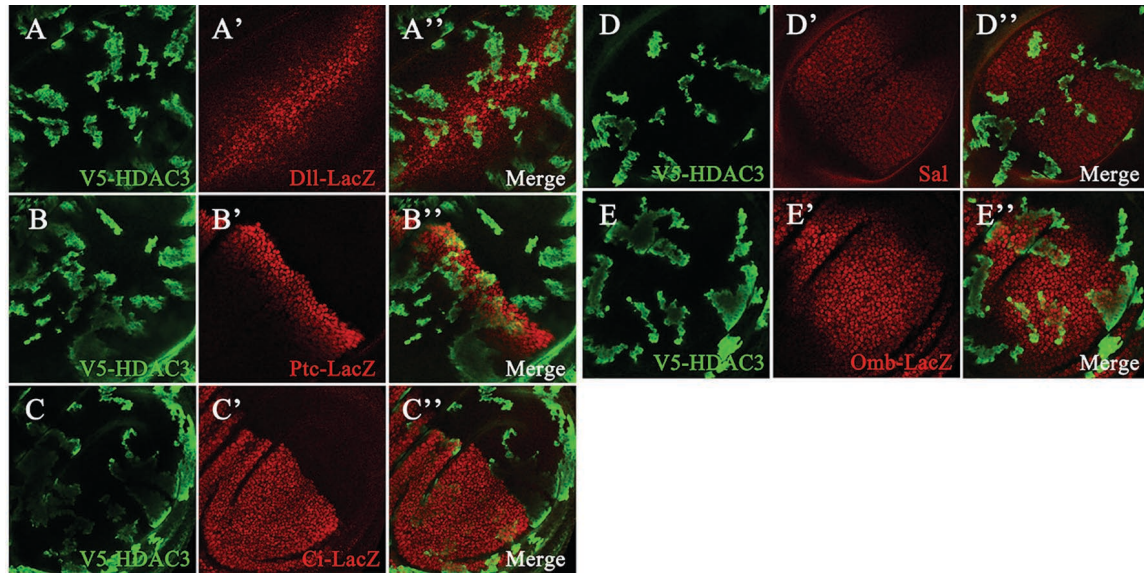


A~G'': 免疫荧光染色检测各基因的表达。A~G: GFP标记HDAC3基因敲除的组织。A': 在突变组织中, Dll-LacZ的表达水平没有变化; B': 在突变组织中, Sens的表达水平没有变化; C': 在突变组织中, Ptc-LacZ的表达水平没有变化; D': 在突变组织中, Ci的表达水平没有变化; E': 在突变组织中, Sal的表达水平增加; F': 在突变组织中, Vg的表达水平没有变化; G': 在突变组织中, Omb-LacZ的表达水平没有变化。A''~G'': 为对应的合成图。H: RT-qPCR检测各基因的表达水平(\* $P < 0.05$ , 与W1118组比较)。

A~G'': immunofluorescence to detect various genes expression. A~G: GFP marked the HDAC3 knock-out tissues. A': the expression of Dll-LacZ was normal in HDAC3 mutant clones; B': the expression of Sens was also normal; C': Ptc-LacZ expression was not altered in HDAC3 mutant clones; D': Ci level remained normal in HDAC3 mutant clones; E': the expression of Sal was increased in HDAC3 mutant clones; F': Vg staining was normal in HDAC3 mutant clones; G': there was no increase or reduction in Omb-LacZ expression in HDAC3 mutant clones. A''~G'': the merged images. H: RT-qPCR to verify the mRNA levels of each gene (\* $P < 0.05$  compared with W1118 group).

图3 HDAC3基因敲除后Wg、Hh以及Dpp下游靶基因的表达水平

Fig.3 Levels of Wg, Hh and Dpp downstream target genes in the background of HDAC3 knock-out



A~E: GFP标记的位置为V5-HDAC3过表达的区域。A': 在V5-HDAC3过表达的组织中, Dll-LacZ的表达水平没有变化; B': Ptc-LacZ的表达水平没有变化; C': 与不表达GFP的正常组织相比, 过表达V5-HDAC1组织中的Ci-LacZ表达水平没有变化; D': 在V5-HDAC3过表达的组织中, Sal的表达水平没有变化; E': Omb-LacZ的表达水平没有变化。A''~E'': 为对应的合成图。

A~E: GFP marked the area where V5-HDAC3 was over-expressed. A': in V5-HDAC3 over-expressed tissues, the expression level of Dll-LacZ was normal; B': there was no change in Ptc-LacZ staining; C': compared with the GFP-negative tissue, the expression of Ci-LacZ was not altered in V5-HDAC1 over-expressed tissues; D': in V5-HDAC3 over-expressed tissues, the expression level of Sal was normal; E': the expression of Omb-LacZ was not altered. A''~E'': the merged images.

图4 过表达HDAC3不影响Wg、Hh以及Dpp下游靶基因的转录

Fig.4 Over-expression of HDAC3 had no effect on Wg, Hh and Dpp downstream target genes

与调节Ptc的转录, 但不影响Ci的表达。进一步检测了HDAC1缺失对Dpp信号通路靶基因Omb、Sal以及Vg的表达的影响, 结果发现, HDAC1突变细胞中Omb-LacZ的表达增加, 而Sal和Vg的表达量则没有变化(图1E~图1G'')。因为除Ptc-LacZ和Omb-LacZ检测基因的转录水平外, 其他基因检测的都是蛋白水平, 因此我们采用RT-qPCR的方法进一步验证以上蛋白的转录水平是否发生变化。结果如图1H所示: HDAC1基因敲除果蝇的Ptc、Ci以及Omb的转录增加( $P < 0.05$ )。以上结果表明, HDAC1参与了形态发生素靶基因的Ptc、Ci及Omb的转录调控。

## 2.2 过表达HDAC1对形态发生素靶基因表达的影响

HDAC1缺失能够影响某些形态发生素靶基因的转录调控, 那么过表达HDAC1是不是具有相反的作用呢? 我们以Dpp信号通路为例, 在果蝇翅膀成虫盘中过表达HDAC1检测其下游靶基因的表达, 结果发现, 与野生型细胞相比, HDAC1过表达的细胞中, Dpp下游靶基因Sal和omb的表达量均没有明显变化(图2)。说明过表达HDAC1对Dpp下游靶基因的表达没有影响。

## 2.3 HDAC3缺失对Dpp靶基因Sal表达的影响

前面的实验表明, HDAC1能够特异性地影响某些形态发生素下游靶基因的表达, 那么作为同一蛋白家族的HDAC3是否具有相同的功能? 我们检测了HDAC3突变体果蝇中Wg、Hh以及Dpp信号通路下游靶基因表达的情况。与周围野生型细胞相比, HDAC3突变细胞中Sens和Dll-LacZ的表达量没有变化, 说明HDAC3不影响Wg下游靶基因Sens和Dll的表达(图3A~图3B'')。同样地, HDAC3突变细胞中Hh下游靶基因Ptc-LacZ和Ci的表达量均没有变化(图3C~图3D''), 说明HDAC3不参与调节Ptc和Ci的表达。实验结果还显示, Dpp下游靶基因Sal的表达增加, 但不影响Omb和Vg的表达(图3E~图3G'')。通过RT-qPCR进一步验证以上结果, 显示HDAC3基因敲除果蝇的Sal转录增加, 同时也发现Vg的转录下降(图3H,  $P < 0.05$ )。以上结果说明, HDAC3可选择性调控Sal和Vg的转录, 对其他靶基因的转录则没有作用。

## 2.4 过表达HDAC3对形态发生素靶基因表达的影响

前面的结果表明, HDAC3可能参与调节Dpp下游靶基因Sal的表达, 因此, 我们希望通过过表达

HDAC3来进一步研究HDAC3的生物学功能。在果蝇翅膀成虫盘中过表达HDAC3, 并检测Wg、Hh及Dpp信号通路相应下游靶基因的表达。结果发现, 与周围野生型细胞相比, HDAC3过表达的细胞中, 各通路下游靶基因的表达量均没有变化(图4), 说明过表达HDAC3对Wg、Hh以及Dpp下游靶基因的表达都没有影响。

### 3 讨论

我们的实验结果显示, HDAC1功能缺失导致Hh下游靶基因*Ptc*、*Ci*以及Dpp下游靶基因*Omb*的转录水平上调, 而HDAC3功能缺失后则导致Dpp靶基因*Sal*的转录上调, 说明HDAC1与HDAC3虽然都有组蛋白去乙酰化酶活性, 但是在调节形态发生素靶基因的转录过程中的功能并不完全相同。这可能有两方面的原因: 一是HDAC1与HDAC3在细胞中的定位不完全相同, HDAC1在果蝇细胞中主要存在于细胞核中, 而HDAC3既存在于细胞核中, 也存在于细胞质中<sup>[32]</sup>。因此, HDAC1的功能可能更集中于参与核内某些生物学过程(如转录), 而HDAC3则可能更多地胞质中发挥作用; 二是HDAC1与HDAC3可能参与形成不同的辅转录抑制复合物。如前所述, HDAC1主要参与形成Sin3复合体、Mi2/NuRD复合体以及CoREST复合体, 而HDAC3则主要参与形成SMRT/NCOR复合体。这些蛋白复合体会被不同的序列特异性DNA结合蛋白(如转录因子等)招募到其特定的靶基因, 发挥相应转录调控作用。

我们的结果显示, HDAC1功能缺失导致Dpp下游*Omb*基因的表达上调, 但是不影响*Sal*和*Vg*的表达; 而HDAC3功能缺失则导致*Sal*表达上调和*Vg*的表达下调, 而不影响*Omb*的表达。上述结果提示, HDAC1和HDAC3对基因转录的调控并不是普遍性的, 而是有选择性的, 这可能与各信号通路之间以及同一通路下各基因具体转录机制的差异有关。如Wg、Hh以及Dpp下游靶基因转录需要先激活不同的转录调控因子[如Wg下游靶基因的激活需要Arm/ $\beta$ -Catenin, Hh信号通路需要Ci/Gli, 而Dpp通路则需要pMad(phosphorylated Mothers against Dpp)等], 而这些转录因子发挥调控作用的机制不尽相同, 这就使得它们对组蛋白乙酰化程度的依赖程度也有所差异。而对于同一信号通路下的不同靶基因, 也有类似的情况。例如, 目前已经知道Dpp下游靶基因*Sal*、

*Vg*以及*Omb*的转录需要到转录因子Mad和转录抑制因子Brk(Brinker)的共同作用, 但是在涉及到每个具体靶基因的转录时, 它们发挥作用的方式又不尽相同, 尤其是*Omb*的转录激活是否依赖于Mad与其转录调控元件的直接结合, 目前尚不明确。另外, 虽然Brk对*Sal*、*Vg*和*Omb*的转录都起到抑制作用, 其机制也并不完全相同<sup>[33-36]</sup>。

我们发现, HDAC1功能缺失导致*Omb*、*Ptc*和*Ci*的表达上调。HDAC3功能缺失导致果蝇的*Sal*的转录增加, 但是过表达HDAC1或HDAC3对下游靶基因的表达都没有影响。可能的解释是, HDAC1或HDAC3抑制这些基因的转录需要有其他限制性的辅助因子协同作用, 单独过表达HDAC1或HDAC3不足以产生效果, 例如*Sal*、*Vg*和*Omb*的转录抑制需要Brk的参与<sup>[36]</sup>。

### 参考文献 (References)

- 1 Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997; 389(6649): 349-52.
- 2 Mizzen CA, Allis CD. Linking histone acetylation to transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci* 1998; 54(1): 6-20.
- 3 Mizzen CA, Yang XJ, Kokubo T, Brownell JE, Bannister AJ, Owen-Hughes T, *et al.* The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 1996; 87(7): 1261-70.
- 4 Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, *et al.* Tetrahymena histone acetyltransferase A: A homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 1996; 84(6): 843-51.
- 5 Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 81-120.
- 6 Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 1996; 272(5260): 408-11.
- 7 Kadosh D, Struhl K. Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* 1997; 89(3): 365-71.
- 8 Rundlett SE, Carmen AA, Suka N, Turner BM, Grunstein M. Transcriptional repression by UME6 involves deacetylation of lysine 5 of histone H4 by RPD3. *Nature* 1998; 392(6678): 831-5.
- 9 Verdone L, Caserta M, Di Mauro E. Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem Cell Biol* 2005; 83(3): 344-53.
- 10 Eberharter A, Becker PB. Histone acetylation: A switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep* 2002; 3(3): 224-9.
- 11 de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. Histone deacetylases (HDACs): Characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003; 370(Pt 3): 737-49.
- 12 Yang XJ, Gregoire S. Class II histone deacetylases: From sequence to function, regulation, and clinical implication. *Mol*

- Cell Biol 2005; 25(8): 2873-84.
- 13 Yang XJ, Seto E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: From bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(3): 206-18.
- 14 Lv WW, Wei HM, Wang DL, Ni JQ, Sun FL. Depletion of histone deacetylase 3 antagonizes PI3K-mediated overgrowth of *Drosophila* organs through the acetylation of histone H4 at lysine 16. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 22): 5369-78.
- 15 Zhu CC, Bornemann DJ, Zhitomirsky D, Miller EL, O'Connor MB, Simon JA. *Drosophila* histone deacetylase-3 controls imaginal disc size through suppression of apoptosis. *PLoS Genet* 2008; 4(2): e1000009.
- 16 Walkinshaw DR, Yang XJ. Histone deacetylase inhibitors as novel anticancer therapeutics. *Curr Oncol* 2008; 15(5): 237-43.
- 17 Venugopal B, Evans TR. Developing histone deacetylase inhibitors as anti-cancer therapeutics. *Curr Med Chem* 2011; 18(11): 1658-71.
- 18 Soragni E, Xu C, Cooper A, Plasterer HL, Rusche JR, Gottesfeld JM. Evaluation of histone deacetylase inhibitors as therapeutics for neurodegenerative diseases. *Methods Mol Biol* 2011; 793: 495-508.
- 19 Gottesfeld JM, Pandolfo M. Development of histone deacetylase inhibitors as therapeutics for neurological disease. *Future Neurol* 2009; 4(6): 775-84.
- 20 Butler R, Bates GP. Histone deacetylase inhibitors as therapeutics for polyglutamine disorders. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7(10): 784-96.
- 21 Arts J, de Schepper S, van Emelen K. Histone deacetylase inhibitors: From chromatin remodeling to experimental cancer therapeutics. *Curr Med Chem* 2003; 10(22): 2343-50.
- 22 Gallinari P, Di Marco S, Jones P, Pallaoro M, Steinkuhler C. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: From molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Res* 2007; 17(3): 195-211.
- 23 Foglietti C, Filocamo G, Cundari E, De Rinaldis E, Lahm A, Cortese R, *et al.* Dissecting the biological functions of *Drosophila* histone deacetylases by RNA interference and transcriptional profiling. *J Biol Chem* 2006; 281(26): 17968-76.
- 24 Yang XJ, Seto E. Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13(2): 143-53.
- 25 Cunliffe VT. Eloquent silence: Developmental functions of class I histone deacetylases. *Curr Opin Genet Dev* 2008; 18(5): 404-10.
- 26 Li J, Lin Q, Wang W, Wade P, Wong J. Specific targeting and constitutive association of histone deacetylase complexes during transcriptional repression. *Genes Dev* 2002; 16(6): 687-92.
- 27 Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, Roose J, Polevoy GA, Clevers H, *et al.* *Drosophila* Tef and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 1998; 395(6702): 604-8.
- 28 Chen G, Fernandez J, Mische S, Courey AJ. A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev* 1999; 13(17): 2218-30.
- 29 Winkler CJ, Ponce A, Courey AJ. Groucho-mediated repression may result from a histone deacetylase-dependent increase in nucleosome density. *PLoS One* 2010; 5(4): e10166.
- 30 Zhang Z, Feng J, Pan C, Lv X, Wu W, Zhou Z, *et al.* Atrophin-Rpd3 complex represses Hedgehog signaling by acting as a corepressor of CiR. *J Cell Biol* 2013; 203(4): 575-83.
- 31 Belenkaya TY, Han C, Standley HJ, Lin X, Houston DW, Heasman J. pygopus Encodes a nuclear protein essential for wingless/Wnt signaling. *Development* 2002; 129(17): 4089-101.
- 32 Cho Y, Griswold A, Campbell C, Min KT. Individual histone deacetylases in *Drosophila* modulate transcription of distinct genes. *Genomics* 2005; 86(5): 606-17.
- 33 Campbell G, Tomlinson A. Transducing the Dpp morphogen gradient in the wing of *Drosophila*: Regulation of Dpp targets by brinker. *Cell* 1999; 96(4): 553-62.
- 34 Jazwinska A, Kirov N, Wieschaus E, Roth S, Rushlow C. The *Drosophila* gene brinker reveals a novel mechanism of Dpp target gene regulation. *Cell* 1999; 96(4): 563-73.
- 35 Moser M, Campbell G. Generating and interpreting the Brinker gradient in the *Drosophila* wing. *Dev Biol* 2005; 286(2): 647-58.
- 36 Winter SE, Campbell G. Repression of Dpp targets in the *Drosophila* wing by Brinker. *Development* 2004; 131(24): 6071-81.