

研究论文

利用FRET技术研究小鼠PU.1和KLF7蛋白相互作用

李雯 邵淑丽 张珍珠 谭茗 金钊 李金炜 孙婴宁*

(齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 齐齐哈尔 161006)

摘要 *PU.1*和*KLF7*基因在多个组织中的表达具有相关性。在前脂肪细胞分化过程中,两个转录因子都可以通过抑制PPAR γ 的表达而抑制脂肪形成。然而两者是否存在蛋白水平相互作用还不清楚。为了验证*PU.1*和*KLF7*在前脂肪细胞中的关系,该研究构建了重组表达载体pECFP-N1-*PU.1*和pEYFP-N1-*KLF7*,并瞬时转染到3T3-L1前脂肪细胞系中。利用激光共聚焦显微镜,观察到*PU.1*和*KLF7*蛋白共定位于3T3-L1细胞核中。荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)实验分析显示,*PU.1*和*KLF7*之间有明显的能量共振转移。实验结果证实,*PU.1*和*KLF7*之间存在直接的相互作用关系,为脂肪生成的调控机制研究提供新思路。

关键词 荧光共振能量转移; *PU.1*; *KLF7*; 3T3-L1

The Study of Mouse *PU.1* and *KLF7* Protein Interaction by FRET Technology

LI Wen, SHAO Shuli, ZHANG Zhenzhu, TAN Ming, JIN Zhao, LI Jinwei, SUN Yingning*

(College of Life Science and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract The expressions of *PU.1* and *KLF7* genes are significantly positively correlated in multiple tissues. Both the two transcription factors inhibit adipogenesis through repressing PPAR γ expression during preadipocyte differentiation. However, little is known about their interaction. To verify the relationship between *PU.1* and *KLF7* in preadipocytes, in the present study, recombinant overexpression vector pECFP-*PU.1* and pEYFP-*KLF7* were constructed and transfected into 3T3-L1 cell lines. Laser confocal microscope was used to observe their colocalization in the nuclei of 3T3-L1 cell lines. The FRET (fluorescence resonance energy transfer) analysis revealed a significant energy resonance transfer between *PU.1* and *KLF7*. These results confirm that there is a direct interaction between *PU.1* and *KLF7*, which provides a new idea for the mechanism of regulating adipogenesis.

Keywords fluorescence resonance energy transfer; *PU.1*; *KLF7*; 3T3-L1

荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)技术在生物学研究中得到了广泛的应用,利用该技术可研究蛋白质^[2-4]、糖类^[5]、核酸^[6]等生物大分子的结构和功能^[1],且可进行免疫分

析^[7]。该技术是目前用于研究蛋白质生物大分子相互作用的一项较新的技术,被喻为“光学分子尺”,具有操作简便、分析快速、选择性好、灵敏度高、无污染或污染小等优点。利用该技术,人们可在细胞

收稿日期: 2021-02-04 接受日期: 2021-06-25

国家自然科学基金(批准号: 31402061)、黑龙江省自然科学基金(批准号: YQ2019C025)和黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(植物性食品加工技术特色学科专项)(批准号: YSTSXX201875)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13796882551, E-mail: SunYN@qqhru.edu.cn

Received: February 4, 2021 Accepted: June 25, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31402061), the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (Grant No.YQ2019C025), and the Basic Scientific Research Operating Expenses of Heilongjiang Provincial Institutions of Higher Learning in 2018 (Special Subject of Plant Food Processing Technology) (Grant No.YSTSXX201875)

*Corresponding author. Tel: +86-13796882551, E-mail: SunYN@qqhru.edu.cn

水平上精确地观察到活细胞内的基因表达情况、蛋白质分子间相互作用,且当分子距离小于10.0 nm时,可观察到荧光能量由供体向受体转移。

PU.1是ETS(E26-transformation-specific)转录因子家族成员,主要在免疫应答^[8-9]、调节髓系基因的转录^[10-12]、影响造血系统的分化^[13]、抑制脂肪形成^[14]等方面发挥功能。KLF7(Krüppel-like factor)为Krüppel样转录因子家族(Krüppel like factor, KLF)成员^[15],广泛表达于各组织中,在脂肪形成^[16-17]、脂肪组织炎症反应^[18]、抑制肌肉再生^[19]、神经系统发育^[15]和癌症放疗化疗康复^[20]等生物学过程中发挥重要作用。

在哺乳动物脂肪形成过程中,转录因子PU.1和KLF7均负调控前脂肪细胞分化。实验室前期研究结果显示,在调控前脂肪细胞分化中两个基因表达呈极显著正相关,然而两者是否存在相互作用尚未报道^[21]。本研究以3T3-L1前脂肪细胞为研究对象,建立pECFP-N1-PU.1和pEYFP-N1-KLF7质粒的过表达体系,通过激光共聚焦显微镜观察到两者共定位,利用FRET技术分析验证两种蛋白之间存在能量共振转移现象。本研究为揭示哺乳动物脂肪形成的分子机制提供理论依据,也将为有效控制脂肪过度沉积提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 限制性核酸内切酶购自NEB生物公司;无内毒素质粒小提中量试剂盒、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自天根生化科技有限公司;逆转

录试剂盒、ExFect2000转染试剂、一步法克隆试剂盒购自Vazyme公司;Trizol试剂盒购自TaKaRa公司;培养基DMEM购自美国Gibco公司;胎牛血清购自以色列Biological Industries公司;青霉素-链霉素溶液(P/S)购自碧云天生物技术有限公司。

1.1.2 载体与细胞系 pECFP-N1及pEYFP-N1质粒购自武汉淼灵生物科技有限公司;pCMV-Myc-KLF7及pCMV-HA-PU.1载体为本实验室留存。小鼠3T3-L1前脂肪细胞系由东北农业大学动物科学技术学院惠赠。

1.2 PCR扩增及纯化

根据实验室前期构建的pCMV-Myc-KLF7及pCMV-HA-PU.1载体序列,利用Primer Premier 5.0设计引物PU.1-clone、KLF7-clone(表1),采用定向克隆的方法构建载体,引物上均带有15 bp左右的载体序列。以实验室前期构建的pCMV-Myc-KLF7及pCMV-HA-PU.1载体为模板,使用高保真聚合酶Phanta[®] Max Super-Fidelity DNA Polymerase (Vazyme)进行PCR扩增,反应体系25 μ L:上、下游引物各1 μ L,0.5 μ L酶,0.5 μ L dNTP Mix,12.5 μ L Buffer,2.5 μ L模板DNA,7 μ L ddH₂O。PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性30 s;95 $^{\circ}$ C变性15 s,54.5 $^{\circ}$ C退火15 s(两对引物均可在此温度下扩增出目的片段),72 $^{\circ}$ C延伸1 min,30个循环;72 $^{\circ}$ C终延伸5 min。PCR产物电泳后,采用普通琼脂糖凝胶DNA(天根)回收试剂盒进行纯化。

1.3 连接与转化

使用一步克隆试剂盒ClonExpress[®]化One Step Cloning Kit(Vazyme)构建重组质粒pECFP-N1-PU.1

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	序列(5'→3') Sequences (5'→3')
PU.1-clone	F: cta ccg gac tca gat <u>CTC GAG</u> ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC R: cga ctg cag aat tcg <u>AAG CTT</u> GTG GGG CGG GAG GCG C
KLF7-clone	F: cta ccg gac tca gat <u>CTC GAG</u> ATG GCA TCA ATG CAG AAG CTG A R: cga ctg cag aat tcg <u>AAG CTT</u> GAT ATG TCT CTT CAT ATG GAG CGC
PU.1-qPCR	F: GAG CTA TAC CAA CGT CCA ATG R: GTG CGG AGA AAT CCC AGT
KLF7-qPCR	F: TGT CCA CGA CAC CGG CTAC R: CAG TCC AAG TCC TCA CCA AAG
PPAR γ -qPCR	F: TGC TGT TAT GGG TGA AAC TCT R: CGC TTG ATG TCA AAG GAA TGC

小写字母为同源臂,下划线表示酶切位点,大写字母为引物序列。

The lower case letters are homologous arms, the underscores are restriction sites, and the upper case letters are primer sequences.

和pEYFP-N1-KLF7, 连接体系为: 4 μ L 5 \times CE buffer、1 μ L PCR产物(插入片段)、3 μ L线性化载体、2 μ L Exnase II, 10 μ L ddH₂O。PCR产物5'和3'末端都含有和线性化克隆载体克隆位点两端互补配对的序列(15~20 bp), 该序列能使目的片段被引入线性化克隆载体的末端。质粒转化后, 挑取单菌落至4 mL LB培养液(氨苄青霉素抗性)中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min摇床培养10 h, 使用质粒DNA小量试剂盒(天根)对剩余菌液进行质粒抽提, 按照试剂盒说明书操作。将质粒送至天津金唯智生物科技有限公司进行测序鉴定。

1.4 细胞培养与转染

将3T3-L1前脂肪细胞置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中, 在含有10%胎牛血清的DMEM培养基中培养。传代时将20%~30%细胞移入新的激光共聚焦培养皿并补充培养基至2 mL继续培养。接种至激光共聚焦培养皿培养6 h或过夜后, 观察细胞贴壁情况并记录细胞代次。

待3T3-L1前脂肪细胞汇合度达65%~70%时进行转染, 利用ExFect2000转染试剂将抽提获得无内毒素空载pECFP-N1、pEYFP-N1以及构建成功的pECFP-N1-PU.1和pEYFP-N1-KLF7转染至3T3-L1前脂肪细胞中。转染后6 h, 更换为Dulbecco改良的10% DMEM中继续培养, 转染48 h后使用激光共聚焦显微镜(型号SP8, Leica)观察。

1.5 Western blot

将空载pCMV-HA、pCMV-Myc以及重组质粒pCMV-HA-PU.1及pCMV-Myc-KLF7瞬时转染到3T3-L1细胞中, 转染48 h后收集细胞。在6孔板中加入裂解液60 mL/孔, 置于冰上裂解30 min, 待裂解后, 用细胞刮刀刮下细胞, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心5 min, 将上清液转移至新离心管中, 加入上样缓冲液, 煮沸5 min。点样后, 50 V电泳30 min, 随后120 V电泳75 min, 150 mA转膜50 min。室温封闭1 h后, 再分别室温孵育anti-KLF7(南京恩晶生物科技有限公司)或anti-PU.1抗体(Cell Signaling Technology) 2 h(稀释比例1:1 000), 二抗(稀释比例1:2 000)(LI-COR)室温孵育1 h, 然后转至PVDF膜。使用一抗、二抗去除液清洗30 min, 室温封闭1 h, 4 $^{\circ}$ C孵育anti- β -actin(碧云天)内参抗体(稀释比例1:1 000)过夜, 室温孵育二抗(稀释比例1:5 000), PBS清洗4次, 5 min/次, 然后转至PVDF膜。

1.6 总RNA提取、反转录及qRT-PCR

1.6.1 3T3-L1前脂肪细胞总RNA提取及反转录 诱导

3T3-L1前脂肪细胞分化, 分别于第0、3、5、7和14天提取RNA。总RNA提取使用Trizol(TaKaRa)法^[22]。

反转录按照HiScript[®] II Q Select RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper, Vazyme)说明书操作。首先去除基因组的DNA, 反应体系为: 0.5 μ g总RNA, 2 μ L 4 \times gDNA wipe Mix, 再加入RNase free ddH₂O至总体积为8 μ L。上述体系用移液器轻轻吹打混匀, 42 $^{\circ}$ C反应2 min。反转录时向上述反应体系中直接加入2 μ L 5 \times HiScript[®] II qRT SuperMix II, 用移液器吹打均匀, 25 $^{\circ}$ C 10 min, 50 $^{\circ}$ C 30 min, 85 $^{\circ}$ C 5 min, 再置于-20 $^{\circ}$ C冰箱中保存。

1.6.2 qRT-PCR 分别以第0、3、5、7和14天的cDNA为模板, 使用表1所示引物(*PU.1*-qPCR、*bKLF7*-qPCR和*PPAR γ* -qPCR), 利用ChamQTM SYBR[®] qPCR Master Mix (Vazyme)试剂盒进行qRT-PCR。反应体系: 10 μ L 2 \times ChamQ SYBR qPCR Master Mix, 2 μ L cDNA模板, 上、下游引物(10 μ mol/L)各0.4 μ L, 7.2 μ L ddH₂O。反应程序: 95 $^{\circ}$ C预变性30 s; 95 $^{\circ}$ C变性10 s, 55 $^{\circ}$ C退火延伸30 s, 共40个循环。每个样品设置3个重复, 利用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}算法将原始Ct值转换为基因相对表达量。

1.7 FRET信号测定

FRET过程参考LeicaSP8激光共聚焦显微镜说明书进行。当在普通光下检测到细胞后, 再在相对应的激光[青色荧光ECFP(enhanced cyan fluorescent protein)、黄色荧光EYFP(enhanced yellow fluorescent protein)]下检测发亮细胞形态的细胞。在电脑上扫描出细胞形态后, 选择FRET-AB, 打开供体(Donor)通道, 激发光波长为458 nm, 同时将受体(Acceptor)通道激发光波长由514 nm调至0 nm, 关闭YFP通道, 扫描细胞。打开受体通道, 激发光波长为514 nm, 同时将供体通道激发光波长由458 nm调至0 nm, 关闭CFP通道, 扫描细胞。观察是否过曝光, 选择漂白(Bleach)区域, 开始漂白, 漂白结束后出现FRET效应值。

2 结果

2.1 PU.1和KLF7真核表达载体构建及鉴定

本研究使用一步克隆法试剂盒构建表达重组质粒pECFP-HA-PU.1、pEYFP-Myc-KLF7。双酶切鉴定结果显示外源片段大小符合预期, 测序结果显示pECFP-HA-PU.1和pEYFP-Myc-KLF7重组质

粒外源基因片段分别与GenBank数据库中*PU.1*序列(NM32370.1)和*KLF7*序列(NM_033563.2)一致,表明载体成功连接外源片段(图1)。

为了验证构建的载体能否成功表达目的蛋白,将空载pCMV-HA、pCMV-Myc以及构建成功的重组质粒pCMV-HA-*PU.1*及pCMV-Myc-*KLF7*瞬时转染到3T3-L1细胞中,转染48 h后收集细胞,制备蛋白样品。经12%聚丙烯酰胺凝胶电泳及Western blot后,再采用anti-*PU.1*和anti-*KLF7*单克隆抗体检测蛋白表达情况。结果显示,*PU.1*融合蛋白分子量约为31.36 kDa(图2A),*KLF7*蛋白分子量约为33.34 kDa,与预计大小一致(图2B)。表明上述构建的重组质粒转染后可成功表达蛋白。

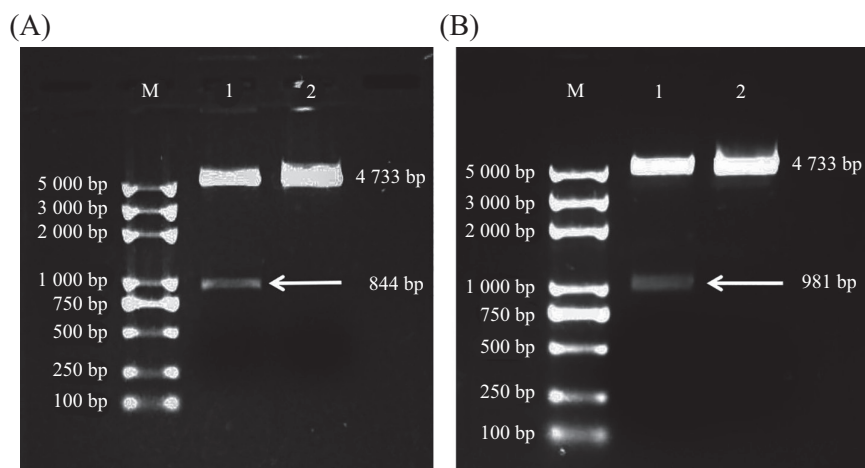
2.2 *PU.1*、*KLF7*及*PPAR γ* 基因在3T3-L1细胞成脂过程中表达模式均互呈正相关

为了探究转录因子*KLF7*和*PU.1*以及*PPAR γ* 在功能上是否相关,我们对3T3-L1前脂肪细胞脂肪形

成相关基因*PU.1*、*KLF7*和*PPAR γ* 的表达进行了检测(图3),表达相关性分析如表2所示。在小鼠3T3-L1细胞诱导分化过程中,第0、3、5、7天时,*PU.1*、*KLF7*和*PPAR γ* 基因的mRNA表达水平随时间增加而升高,第14天时,*PU.1*、*KLF7*和*PPAR γ* 基因的mRNA表达水平降低。皮尔森相关性分析结果显示,在检测到的表达中,*PU.1*和*KLF7*基因表达呈显著正相关($R=0.620$, $P=0.032$);*KLF7*和*PPAR γ* 基因表达呈极显著正相关($R=0.939$, $P=0.000\ 006$);*PU.1*和*PPAR γ* 基因表达呈显著正相关($R=0.589$, $P=0.044$)(表2)。

2.3 *PU.1*与*KLF7*蛋白共定位于细胞核

向3T3-L1前脂肪细胞中共转染表达pECFP-N1+pEYFP-N1, pECFP-HA-*PU.1*+pEYFP-Myc-*KLF7*,转染后48 h通过激光共聚焦显微镜观察显示,与转染荧光蛋白空载体对照组相比,pECFP-HA-*PU.1*与pEYFP-Myc-*KLF7*存在明显的共定位,大量的pECFP-HA-*PU.1*与pEYFP-Myc-*KLF7*共定位于细

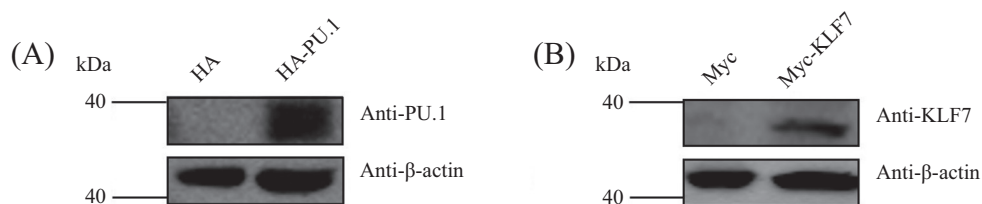


A: *PU.1*真核表达载体的验证; M: Marker; 1: 重组质粒pECFP-HA-*PU.1*; 2: 空载pECFP-N1。B: *KLF7*真核表达载体的验证; M: Marker; 1: 重组质粒pEYFP-Myc-*KLF7*; 2: 空载pEYFP-N1。

A: verification of eukaryotic expression vector of *PU.1*; M: Marker; 1: recombinant plasmid pECFP-HA-*PU.1*; 2: empty vector of pECFP-N1。B: verification of eukaryotic expression vector of *KLF7*; M: Marker; 1: recombinant plasmid pYFP-Myc-*KLF7*; 2: empty vector of pEYFP-N1。

图1 *PU.1*与*KLF7*真核表达载体构建

Fig.1 Construction of eukaryotic expression vector of *PU.1* and *KLF7*

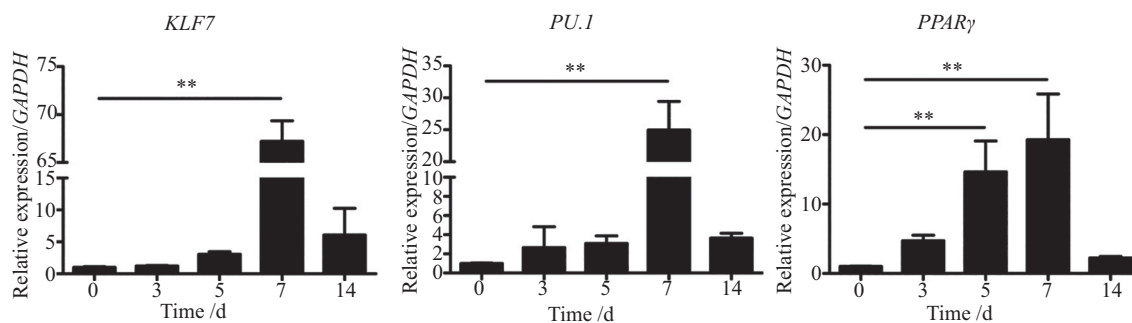


Western blot检测3T3-L1细胞中*PU.1*(A)和*KLF7*(B)蛋白表达水平。

The expression levels of *PU.1* (A) and *KLF7* (B) in 3T3-L1 cells were detected by Western blot.

图2 Western blot检测*PU.1*和*KLF7*过表达效果

Fig.2 Detection of *PU.1* and *KLF7* overexpression by Western blot



脂肪形成相关基因KLF7、PU.1及PPAR γ 基因的mRNA表达量, ** $P < 0.01$ 。

The mRNA expression levels of adipogenesis-related genes KLF7, PU.1 and PPAR γ , ** $P < 0.01$.

图3 PU.1、KLF7及PPAR γ 在小鼠前体脂肪细胞3T3-L1诱导分化过程中的表达分析

Fig 3 Expression analysis of PU.1, KLF7 and PPAR γ in mouse preadipocyte 3T3-L1 differentiation

表2 在小鼠前体脂肪细胞3T3-L1中的KLF7、PU.1和PPAR γ 表达相关性分析

Table 2 The correlation analysis of KLF7, PU.1 and PPAR γ expression in mouse preadipocyte 3T3-L1

基因 Gene	R值 R value	P值 P value
PU.1 and KLF7	0.620	0.032
KLF7 and PPAR γ	0.939	0.000
PU.1 and PPAR γ	0.589	0.044

胞核中(图4)。

2.4 PU.1与KLF7在蛋白水平相互作用

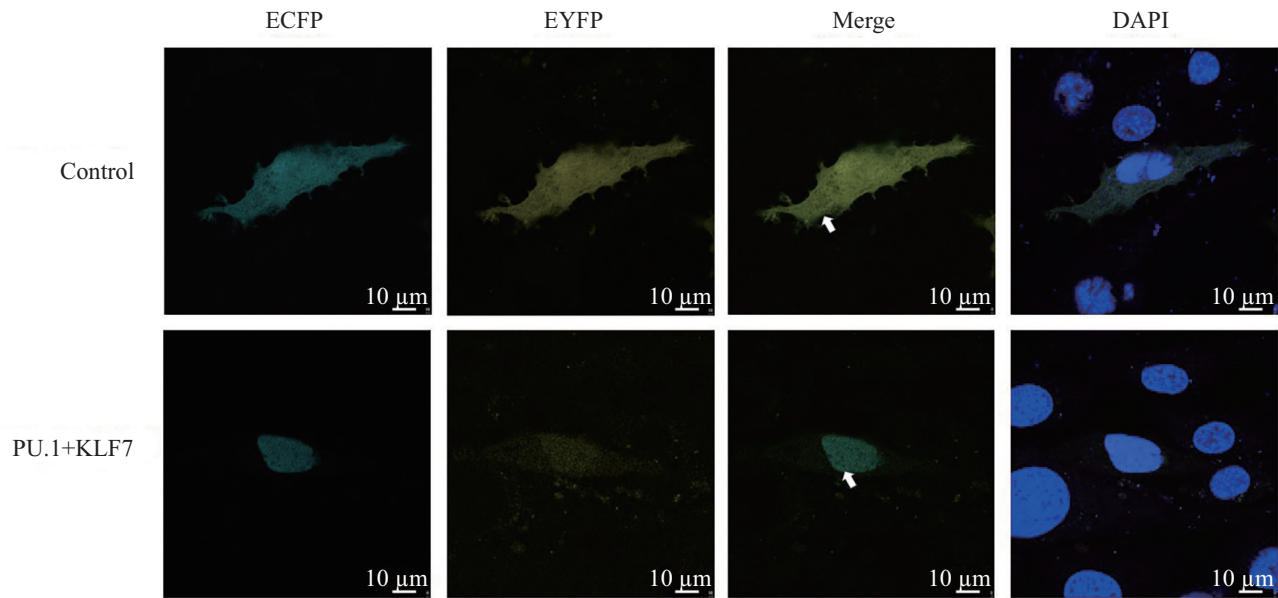
为进一步确认pECFP-HA-PU.1与pEYFP-Myc-KLF7在生理状态下的前脂肪细胞中是否存在相互作用关系, 通过FRET技术检测pECFP-HA-PU.1与pEYFP-Myc-KLF7分子间的相互作用。结果显示, 与对照组相比, HA-PU.1与Myc-KLF7之间存在明显能量共振转移, FRET效率显著高于对照组(图5A和图5B)。

3 讨论

随着生命科学理论与方法的不断发展, 应用领域不断扩大, 蛋白质与蛋白质的相互作用被认为是与生命现象发生机制有关的重要因素。FRET技术克服了以往研究蛋白质分子相互作用实验技术不能检测活细胞的缺点, 加之具有高灵敏度等特点, 因此能够实时观察蛋白质分子间的动态变化^[2-4]。在目前FRET相关的研究中, 常用的一对荧光蛋白是ECFP和EYFP, ECFP(最大激发光波长为453 nm, 最大发射光波长为486 nm)作为供体, EYFP(最大激发波长为531 nm, 最大发射波长为540 nm)作为受体。通常在分子距离小于10.0 nm时, 供体及受体荧光蛋白分

子光谱重叠, 供体荧光蛋白分子诱发受体荧光蛋白分子发出荧光, 因此可在供体荧光蛋白分子与受体荧光蛋白分子间检测FRET效率^[23-24]。本研究利用ECFP、EYFP荧光蛋白载体, 分别与目的基因PU.1、KLF7相连, 成功构建了表达载体pECFP-HA-PU.1和pEYFP-Myc-KLF7, 并且在3T3-L1细胞中验证了PU.1和KLF7重组蛋白的表达。通过激光共聚焦显微镜观察并发现了大量的PU.1和KLF7蛋白共定位于3T3-L1细胞核上。同时, 本研究评估了这些蛋白在小鼠前脂肪细胞中瞬时表达荧光的效率。根据FRET实验分析显示, 在共转染表达pECFP-HA-PU.1和pEYFP-Myc-KLF7两种过表达质粒的3T3-L1细胞中, PU.1和KLF7之间具有明显的能量共振转移现象, 从而证明了PU.1和KLF7之间具有直接相互作用关系。

PU.1在不同的细胞中, 能够与不同的转录因子形成复合物, 从而调控组织发育特异性基因的表达。免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, co-IP)和染色质免疫共沉淀-测序(chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq)分析证实, PU.1在骨髓来源的巨噬细胞中能够与IRF8形成转录复合物调控下游基因, 而在破骨细胞中则与EOMES和MITF结合成

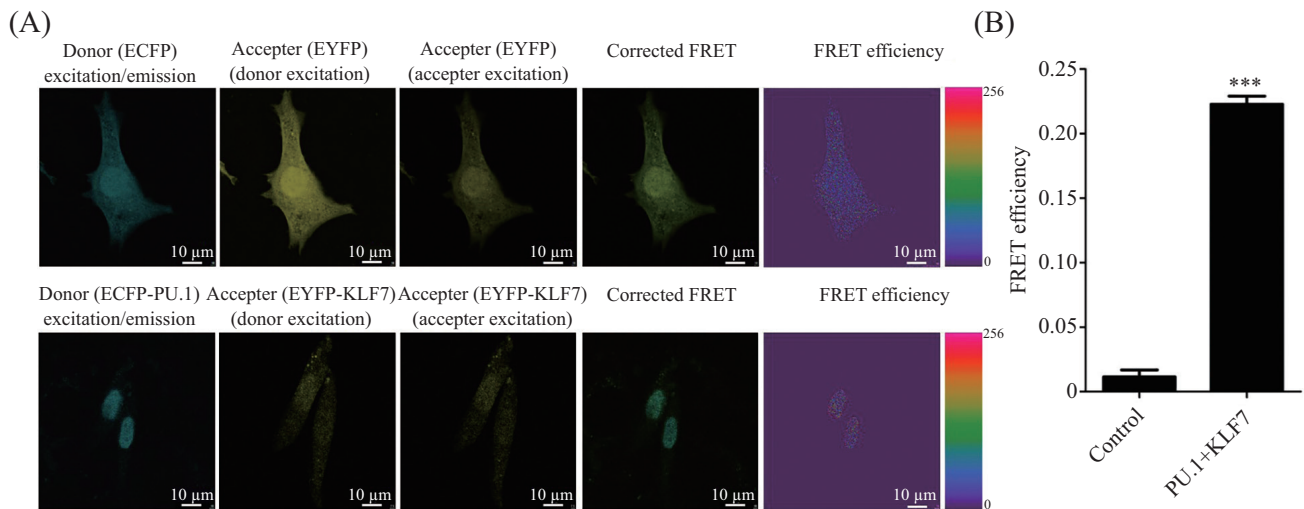


激光共聚焦显微镜观察PU.1和KLF7蛋白在3T3-L1细胞内共定位。Control组共转染空载pECFP-N1、pEYFP-N1, PU.1+KLF7组共转染pECFP-HA-PU.1、pEYFP-Myc-KLF7, 在458 nm激发光时激发青色荧光(ECFP), 在514 nm激发光时激发黄色荧光(EYFP), 在400 nm激发光时激发DNA荧光染料蓝色荧光。白色箭头表示共定位区域。

The laser confocal microscope was used to observe the co-localization of PU.1 and KLF7 proteins in 3T3-L1 cells. Control group was co-transfected with empty pECFP-N1, pEYFP-N1, PU.1+KLF7 group was co-transfected with pECFP-HA-PU.1, pEYFP-Myc-KLF7. The ECFP (enhanced cyan fluorescent protein) is excited at 458 nm excitation light, the EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) is excited at 514 nm excitation light, and the DNA fluorescent dye blue fluorescence is excited at 400 nm excitation light. The white arrow indicates the co-location area.

图4 KLF7与PU.1亚细胞定位分析

Fig.4 Subcellular localization analysis of KLF7 and PU.1



A: 激光共聚焦显微镜成像分析3T3-L1细胞系中共转染pECFP-HA-PU.1和pEYFP-Myc-KLF7的结果, 供体pECFP-HA-PU.1呈青光(458 nm), 受体pEYFP-Myc-KLF7呈黄色(514 nm), 两通道叠加图像以及校正的FRET图像在最右侧。B: FRET效率统计分析。数据来自10个随机选取的区域。*** $P < 0.001$, 与对照组比较; $n = 10$ 。

A: Co-transform pECFP-HA-PU.1 and pEYFP-Myc-KLF7 into 3T3-L1 cells are detected by laser confocal microscope. pECFP-HA-PU.1 provides donor, and the fluorescence is cyan (458 nm); pEYFP-Myc-KLF7 provides acceptor, and the fluorescence is yellow (514 nm). Two-channel superimposed image and the corrected FRET image are on the right of image. B: statistical analysis of FRET efficiency. *** $P < 0.001$ compared with the control group; $n = 10$.

图5 FRET分析KLF7和PU.1的相互作用

Fig.5 FRET analysis of interaction between KLF7 and PU.1

复合物调控下游基因^[25-26]。本实验室前期结果同样显示, 两个基因在多个组织中的表达呈极显著正相关^[21]。本研究发现, PU.1与KLF7在成脂分化的过程中表达呈显著正相关, 两者共定位于细胞核, 并且通过FRET实验证实, 这两个蛋白质之间能够发生相互作用, 因此, 我们可以推测在3T3-L1前脂肪细胞中, 转录因子PU.1与KLF7可能形成复合物, 从而调控下游基因的表达。另外, 脂肪形成的关键促进因子PPAR γ 与KLF7及PU.1的表达也呈显著正相关, 据文献报道, 过表达PU.1会占据大量PPAR γ 转录因子结合位点^[27]。因此, 我们推测在前脂肪细胞分化过程中, PU.1与PPAR γ 并非存在蛋白水平相互作用, 而是因为相互竞争结合位点, 所以两者的表达呈显著正相关。

在3T3-L1细胞中过表达PU.1抑制前脂肪细胞的分化, 而PU.1反式激活域的删除则消除了这种作用, PU.1对脂肪细胞分化的抑制作用通过抑制C/EBP α 和C/EBP β 的转录活性来实现^[14]。转录因子KLF7在脂肪细胞和各种人体组织包括胰腺、肝脏和骨骼肌中表达。KLF7是前脂肪细胞分化的抑制因子, 在人的脂肪组织中表达量较高, 是糖尿病和肥胖症候选基因, 参与调控脂肪生成^[28]。在哺乳动物和禽类研究中的结果显示, KLF7同样可以通过抑制C/EBP α 的表达而抑制脂肪形成^[28-29]。结合上述报道, 在脂肪生成过程中, PU.1与KLF7功能相似, 本研究发现在3T3-L1前脂肪细胞中PU.1与KLF7存在蛋白水平相互作用。PU.1通过与GATA-1的DNA拮抗共存, 相互抑制活性, 从而改变周围的染色质结构^[12]。不同转录因子频繁与PU.1相互作用, 结合本文的研究结果, 可以推测在前脂肪细胞分化早期, PU.1一方面通过与KLF7相互作用, 另一方面通过与GATA-1拮抗改变周围染色质结构, 抑制脂肪细胞分化的关键因子C/EBP家族成员, 最终抑制前脂肪细胞分化。

综上所述, 本研究利用FRET技术证实PU.1与KLF7蛋白可在细胞核中直接发生相互作用。研究结果为研究脂肪生成的调控机制提供新思路, 也为控制脂肪过度沉积提供参考。

参考文献 (References)

- [1] 魏亦男, 李元宗, 常文保, 等. 荧光共振能量转移技术在生物分析中的应用[J]. 分析化学(WEI Y N, LI Z Y, CHANG W B, et al. Application of fluorescence resonance energy transfer technology in Bioanalysis [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry), 1998, 26(4): 477-84.
- [2] GUAN Y, WANG Z, CAO A, et al. Subunit exchange of MjHsp16.5 studied by single-molecule imaging and fluorescence resonance energy transfer [J]. J Am Chem Soc, 2006, 128(22): 7203-8.
- [3] GOSWAMI N, MAKHAL A, PAL S K. Toward an alternative intrinsic probe for spectroscopic characterization of a protein [J]. J Phys Chem B, 2010, 114(46): 15236-43.
- [4] WRUSS J, POLLHEIMER P D, MEINDL I, et al. Conformation of receptor adopted upon interaction with virus revealed by site-specific fluorescence quenchers and FRET analysis [J]. J Am Chem Soc, 2009, 131(15): 5478-82.
- [5] BLAGOI G, ROSENZWEIG N, ROSENZWEIG Z. Design, synthesis, and application of particle-based fluorescence resonance energy transfer sensors for carbohydrates and glycoproteins [J]. Anal Chem, 2005, 77(2): 393-9.
- [6] MARTI A A, PUCKETT C A, DYER J, et al. Inorganic-organic hybrid luminescent binary probe for DNA detection based on spin-forbidden resonance energy transfer [J]. J Am Chem Soc, 2007, 129(28): 8680-1.
- [7] BILL A, BLOCKUS H, STUMPFE D, et al. A homogeneous fluorescence resonance energy transfer system for monitoring the activation of a protein switch in real time [J]. J Am Chem Soc, 2011, 133(21): 8372-9.
- [8] YEH H, IKEZU T. Transcriptional and epigenetic regulation of microglia in health and disease [J]. Trends Mol Med, 2019, 25(2): 96-111.
- [9] CAROTTA S, WU L, NUTT S L. Surprising new roles for PU.1 in the adaptive immune response [J]. Immunol Rev, 2010, 238(1): 63-75.
- [10] GHANI S, RIEMKE P, SCHONHEIT J, et al. Macrophage development from HSCs requires PU.1-coordinated microRNA expression [J]. Blood, 2011, 118(8): 2275-84.
- [11] IWASAKI H, SOMOZA C, SHIGEMATSU H, et al. Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation [J]. Blood, 2005, 106(5): 1590-600.
- [12] NERLOV C, QUERFURTH E, KULESSA H, et al. GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription [J]. Blood, 2000, 95(8): 2543-51.
- [13] DAKIC A, METCALF D, DI RAGO L, et al. PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis [J]. J Exp Med, 2005, 201(9): 1487-502.
- [14] WANG F, TONG Q. Transcription factor PU.1 is expressed in white adipose and inhibits adipocyte differentiation [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 295(1): C213-20.
- [15] LAUB F, ALDABE R, FRIEDRICH V, Jr, et al. Developmental expression of mouse Kruppel-like transcription factor KLF7 suggests a potential role in neurogenesis [J]. Dev Biol, 2001, 233(2): 305-18.
- [16] KANAZAWA A, KAWAMURA Y, SEKINE A, et al. Single nucleotide polymorphisms in the gene encoding Kruppel-like factor 7 are associated with type 2 diabetes [J]. Diabetologia, 2005, 48(7): 1315-22.
- [17] ZOBEL D P, ANDREASEN C H, BURGDORF K S, et al. Variation in the gene encoding Kruppel-like factor 7 influences body fat: studies of 14 818 Danes [J]. Eur J Endocrinol, 2009,

- 160(4): 603-9.
- [18] WANG C, HA X, LI W, et al. Correlation of TLR4 and KLF7 in inflammation induced by obesity [J]. *Inflammation*, 2017, 40(1): 42-51.
- [19] WANG X, SHEN Q W, WANG J, et al. KLF7 regulates satellite cell quiescence in response to extracellular signaling [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(5): 1310-20.
- [20] MILLINO C, MARETTO I, PACCHIONI B, et al. Gene and microRNA expression are predictive of tumor response in rectal adenocarcinoma patients treated with preoperative chemoradiotherapy [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(2): 426-35.
- [21] 孙婴宁, 李雯, 刘阔成, 等. 转录因子PU.1和KLF7在小鼠组织中的基因表达分析[[J/OL]. 基因组学与应用生物学(SUN Y N, LI W, LIU K C, et al. Expression analysis of transcription factors PU.1 and KLF7 in mouse tissue [J/OL]. *Genomics and Applied Biology*][2020-11-18].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.q.20201117.1655.006.html>.
- [22] ZHANG Z, WANG H, SUN Y, et al. Klf7 modulates the differentiation and proliferation of chicken preadipocyte [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2013, 45(4): 280-8.
- [23] KYRYCHENKO A, RODNIN M V, GHATAK C, et al. Joint refinement of FRET measurements using spectroscopic and computational tools [J]. *Anal Biochem*, 2017, 522: 1-9.
- [24] DOAN-XUAN Q M, SZALOKI N, TOTH K, et al. FRET imaging by laser scanning cytometry on large populations of adherent cells [J]. *Curr Protoc Cytom*, 2014, 70: 1-29.
- [25] IZAWA N, KUROTAKI D, NOMURA S, et al. Cooperation of PU.1 with IRF8 and NFATc1 defines chromatin landscapes during RANKL-induced osteoclastogenesis [J]. *J Bone Miner Res*, 2019, 34(6): 1143-54.
- [26] CAREY H A, HILDRETH B E, 3RD, SAMUVEL D J, et al. Eomes partners with PU.1 and MITF to regulate transcription factors critical for osteoclast differentiation [J]. *iScience*, 2019, 11: 238-45.
- [27] DISPIRITO J R, FANG B, WANG F, et al. Pruning of the adipocyte peroxisome proliferator-activated receptor gamma cistrome by hematopoietic master regulator PU.1 [J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(16): 3354-64.
- [28] KAWAMURA Y, TANAKA Y, KAWAMORI R, et al. Overexpression of Kruppel-like factor 7 regulates adipocytokine gene expressions in human adipocytes and inhibits glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cell line [J]. *Mol Endocrinol*, 2006, 20(4): 844-56.
- [29] ZHANG Z, WANG H, SUN Y, et al. Klf7 modulates the differentiation and proliferation of chicken preadipocyte [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2013, 45: 280-8.