

UHRF1依赖自身的甲基化修饰调控 HIF-1 α 的蛋白水平

王迪 高超 王孟冬 肖成路* 唐军*

(兽医公共卫生安全全国重点实验室, 中国农业大学动物医学院, 北京 100193)

摘要 缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)在低氧应答中起着关键作用。HIF-1是由HIF-1 α 和HIF-1 β 两种亚基组成的异二聚体转录因子。该研究探讨了缺氧条件下, 泛素样含PHD和环指域1(ubiquitin-like with PHD and RING finger domains 1, UHRF1)对HIF-1 α 蛋白水平的影响。利用UHRF1靶向小干扰RNA抑制UHRF1的表达后, 分别通过Western blot和qRT-PCR检测HIF-1 α 蛋白及mRNA的表达水平。在HeLa和HepG2细胞中过表达UHRF1, 通过Western blot检测HIF-1 α 的蛋白表达水平。同时过表达或抑制包含SET结构域的组蛋白甲基转移酶7/9(SET domain containing histone lysine methyltransferase 7/9, SET7/9)及UHRF1, 用Western blot检测HIF-1 α 蛋白表达水平。利用免疫共沉淀的方法检测UHRF1及其不同截短蛋白与HIF-1 α 蛋白之间的相互作用。将UHRF1的第385位赖氨酸突变为精氨酸, 利用免疫共沉淀检测该突变蛋白与HIF-1 α 蛋白之间的相互作用。研究发现, 在低氧条件下, 抑制UHRF1的表达能够上调HIF-1 α 的蛋白水平, 且不影响HIF-1 α 的mRNA水平; 单独过表达UHRF1并不影响HIF-1 α 的蛋白水平, 但是当同时过表达UHRF1和SET7/9时, HIF-1 α 蛋白水平降低; 并且同时抑制UHRF1和SET7/9的表达会挽救单独抑制UHRF1表达时HIF-1 α 蛋白水平增加的现象。进一步发现, UHRF1和HIF-1 α 蛋白相互作用, 两者之间的相互作用关系依赖于UHRF1的第385位赖氨酸甲基修饰, 且该甲基化修饰受到SET7/9的调控。UHRF1可依赖SET7/9介导的自身蛋白甲基化修饰与HIF-1 α 相互作用, 并影响HIF-1 α 的蛋白水平。

关键词 低氧; HIF-1 α ; UHRF1; SET7/9

UHRF1 Regulates the Protein Level of HIF-1 α Dependents on Its Own Methylation Modification

WANG Di, GAO Chao, WANG Mengdong, XIAO Chenglu*, TANG Jun*

(National Key Laboratory of Veterinary Public Health Security, College of Veterinary Medicine,
China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) plays a key role in hypoxia response system. HIF-1 is a heterodimer transcriptional factor formed by HIF-1 α and HIF-1 β . This study aimed to explore the effect of UHRF1 (ubiquitin-like with PHD and RING finger domains 1) on HIF-1 α protein under hypoxic conditions. UHRF1-targeted small interfering RNA was used to inhibit the expression of UHRF1. Western blot and qRT-PCR were used to detect the expression levels of HIF-1 α protein and mRNA respectively. UHRF1 was overexpressed in HeLa and HepG2 cells, and the protein expression level of HIF-1 α was detected by Western blot. SET7/9 (SET domain con-

收稿日期: 2023-04-13 接受日期: 2023-06-05

国家自然科学基金(批准号: 31872834)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-62733484, E-mail: 2019203@cau.edu.cn; Tel: 010-62733484, E-mail: jtang@cau.edu.cn

Received: April 13, 2023 Accepted: June 5, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31872834)

*Corresponding authors. Tel: +86-10-62733484, E-mail: 2019203@cau.edu.cn; Tel: +86-10-62733484, E-mail: jtang@cau.edu.cn

taining histone lysine methyltransferase 7/9) and *UHRF1* were overexpressed or knocked down synchronously, and the expression level of HIF-1 α protein was detected by Western blot. The interaction between full length UHRF1 or different truncated UHRF1 proteins and HIF-1 α protein was detected by co-immunoprecipitation. The 385th lysine of UHRF1 was mutated to arginine, and the interaction between the mutant protein and HIF-1 α protein was detected by co-immunoprecipitation. The results showed that inhibition of *UHRF1* expression could upregulate the protein level of HIF-1 α under hypoxic conditions, but had no effect on the mRNA level of *HIF-1 α* . *UHRF1* overexpression didn't affect HIF-1 α protein level. However, when *UHRF1* and *SET7/9* were overexpressed synchronously, the protein level of HIF-1 α decreased. In addition, simultaneous inhibition of *UHRF1* and *SET7/9* expression could rescue the increased HIF-1 α protein level when *UHRF1* expression was inhibited. It was further found that UHRF1 and HIF-1 α could interact with each other, and this interaction depended on the 385th lysine methyl modification of UHRF1, and the methylation modification was regulated by SET7/9. SET7/9 mediated methyl modification of UHRF1 is necessary for its interaction with HIF-1 α and its effect on the protein level of HIF-1 α .

Keywords hypoxia; HIF-1 α ; UHRF1; SET7/9

缺氧常见于多种类型的实体肿瘤中,肿瘤细胞的迅速增殖,导致肿块周围的血管受到阻塞或挤压,进而阻碍了正常的血液供应,从而影响了肿瘤细胞的供血和供氧,造成了肿瘤中心区域不同程度的缺氧^[1]。这些低氧区域的肿瘤细胞通过激活一些低氧应答通路来适应低氧应激,缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)的激活被普遍认为是缺氧细胞应答低氧刺激至关重要的环节^[2]。HIF-1是由HIF-1 α 和HIF-1 β 两种亚基组成的异二聚体转录因子,后者在各类细胞中的表达相对稳定,而HIF-1 α 是一种氧敏感的蛋白,其蛋白水平受氧浓度调控,在低氧条件下,HIF-1 α 在胞质内得以稳定存在,并随后被转移到细胞核内,与HIF-1 β 亚基结合形成异二聚体HIF-1, HIF-1结合到下游靶基因的低氧应答元件上从而参与其转录激活,这些被激活的靶基因参与调控多种生物学过程,例如葡萄糖代谢、细胞增殖和迁移、血管生成和免疫反应等^[3-4],从而全方位地调控肿瘤细胞的生存和肿瘤的发生发展^[5]。由此可见,HIF-1 α 蛋白的稳态维持对于HIF-1转录因子行使正常功能至关重要。

调控HIF-1 α 蛋白活性和累积的方式有多种。在常氧环境中,HIF-1 α 被脯氨酸-4-羟化酶(prolyl-4-hydroxylases, PHDs)羟化修饰后,接着被泛素蛋白酶体系识别并降解,因而在常氧环境中HIF-1 α 蛋白始终处于较低水平,其半衰期为5 min左右。而在低氧环境中,PHD酶失去活性,HIF-1 α 得以在胞质中稳定存在并转移到核内^[6-7]。此外HIF-1 α 的蛋白水平及活性还受到蛋白磷酸化^[8]、乙酰化^[9]、SUMO化^[10]、泛素化及甲基化^[11]等修饰的调控。

UHRF1也常被称为NP95或ICBP90^[12],具有多种功能,主要参与调节DNA甲基化修饰、DNA损伤修复和细胞增殖等过程^[13-15]。UHRF1最主要的功能是维持DNA的甲基化修饰,该功能的发挥是通过其5个结构域之间的协同互作实现的,其结构域包括泛素样结构域(ubiquitin-like domain, UBL)、串联都铎结构域(tandem tudor domain, TTD)、植物同源结构域(plant homeodomain, PHD)、SET和RING相关结构域(SET and RING-associated domain, SRA)以及RING指结构域(RING finger domain)^[16]。在正常生理状态下,UHRF1仅在活跃增殖的细胞中表达,并且其蛋白水平受到严格的调控。需要注意的是在多种癌细胞中,调控UHRF1蛋白水平的精准模式受到破坏^[17]:例如在前列腺癌^[18]、结直肠癌^[19]、肝癌^[20]和胃癌^[21]等细胞中,UHRF1呈现出过度表达的现象,并对肿瘤发生和癌症的进展产生巨大的影响。UHRF1蛋白的功能、稳定性和细胞定位等也受到翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)的调控^[22],例如,UHRF1特定残基的磷酸化^[23]或甲基化^[24-26]修饰可影响UHRF1的生物学活性,泛素化修饰可调控UHRF1蛋白的稳定性^[27]。研究表明,UHRF1蛋白的甲基化修饰受SET7/9和赖氨酸特异性组蛋白去甲基化酶1A(lysine-specific histone demethylase 1A, LSD1)的调节^[24-26]。

调控HIF-1 α 蛋白活性及累积的分子机制并不完全清楚,本研究旨在探究缺氧刺激后期UHRF1对HIF-1 α 蛋白水平的影响。研究结果表明,在低氧条件下,UHRF1负调控HIF-1 α 的蛋白水平,并且可以与HIF-1 α 相互作用,SET7/9通过甲基修饰UHRF1的第

385位赖氨酸影响UHRF1对HIF-1 α 蛋白的调节。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 HeLa、HepG2、Hep2、H1299和293T细胞系均购于美国ATCC细胞库,并由本实验室自存。

1.1.2 主要试剂 DH5 α 感受态细胞购于苏州金唯智生物科技有限公司;胎牛血清购于美国Hyclone公司;DMEM液体培养基、GenOpti培养基和0.25%胰蛋白酶购于北京中科迈晨科技有限公司;青霉素和链霉素购于美国AMRESCO公司;jetPRIME细胞转染试剂购于美国Polyplus公司;RNAiMAX购于美国Invitrogen公司;chemifect细胞转染试剂购于北京丰锐生物技术有限公司;Western blot相关试剂购于美国Amresco公司;M-MLV反转录相关试剂购于美国Promega公司;UltraSYBR Premix购于北京康为世纪生物科技有限公司;PrimeSTAR HS DNA聚合酶、Taq plus DNA聚合酶以及同源重组酶均购于宝日医生物技术(北京)有限公司;T5 Direct PCR试剂盒购于北京擎科生物科技股份有限公司;T4 DNA连接酶购于美国NEB公司;DNA胶回收试剂盒和质粒中提试剂盒购于美国GeneMark公司。相关抗体包括: α -Tubulin(PM054, MBL, 1:10 000)、Anti-Flag(F1804, Sigma, 1:1 000)、Anti-GFP(sc-9996, Santa Cruz, 1:1 000)、HIF-1 α (D1S7W, CST, 1:1 000)、SET7/9(2813S, CST, 1:1 000)、UHRF1(ab213223、ab57083, Abcam, 1:10 000)、CXCR4(ab181020, Abcam, 1:5 000)、mono-methyl lysine(14679, CST, 1:1 000)、HRP标记山羊抗小鼠IgG和HRP标记山羊抗兔IgG(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)。

UHRF1靶向siRNA[si-UHRF1#1: 5'-AUG UGG GAU GAG ACG GAA UUG-3', si-UHRF1#2: 5'-AAA CAG AUG GAG GAC GGC CA-3', si-UHRF1#3: 5'-GAG AGC GAG AGA AGG AGA ACA GCA A-3'; SET7/9靶向siRNA: si-SET7/9: 5'-GGG AGU UUA CAC UUA CGAAGA-3'; 阴性对照siRNA(si-NC): 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3']均由苏州吉玛基因股份有限公司设计并合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将HeLa、HepG2、Hep2、H1299和293T细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,并接种到6孔细胞培养板中,然后进行质粒或

siRNA转染处理。当细胞密度达到70%~80%(需低氧处理时,细胞密度保持在50%左右)时采用jetPRIME转染试剂进行质粒转染,转染前用无菌PBS轻柔清洗,尽量避免细胞脱落。当细胞密度为30%~40%时,采用RNAiMAX转染试剂转染siRNA,转染前用PBS轻柔清洗细胞3次,然后加入1 mL GenOpti培养基,并加入预混的siRNA溶液饥饿培养6 h,弃上清液后更换为含10%胎牛血清的DMEM培养基。低氧处理细胞时,根据实验需求,在收取细胞样品前特定时间点,将细胞放入低氧小室中,充入三元气(包含94%的N₂、5%的CO₂和1%的O₂),充气3 min左右用测氧仪检测氧气含量,保持氧气浓度在1.0%~2.5%,然后将密封好的低氧小室放入37 °C恒温培养箱中。

1.2.2 质粒构建 本研究使用的质粒采用酶切或同源重组的方式完成构建。HeLa野生型细胞传代培养12 h后,提取全细胞总RNA并反转录成cDNA。通过PCR扩增的方法获取目的基因片段,通过同源重组的方法将其与N-端带有Flag-或HA-标签的pRK5真核表达载体,或带有GFP-标签的pEGFP-C1真核表达载体连接,然后转化到DH5 α 感受态细胞中,并进行单克隆培养,通过测序筛选出序列正确的质粒,利用Western blot检测相应蛋白是否被正确表达。UHRF1不同突变体和截短体的基因序列来自于野生型UHRF1基因序列,利用上述方法将其连接构建到载体中。其中,用于获得Flag-UHRF1-K385R突变体序列的引物序列为5'-AAG AAG GCG AGG ATG GCC TCG-3',这里的突变体是野生型UHRF1序列上第385位编码赖氨酸(AAG)的序列突变为编码精氨酸(AGG)的序列;用于获得Flag-UHRF1-simt突变体序列的引物序列为5'-CTG GCC AAC CGA GAA AGA GAA AAA GAA AAT TCC AAG AGG GAG GAG-3',这里的突变是野生型UHRF1序列中siRNA靶向序列(5'-GAG AGC GAG AGA AGG AGA ACA GCA A-3')的突变;UHRF1截短体序列包括Flag-UHRF1 1-723、Flag-UHRF1 286-723、Flag-UHRF1 286-793,这里的数字代表UHRF1蛋白的氨基酸序号。

1.2.3 Western blot检测蛋白表达水平 用PBS清洗细胞,用裂解液裂解细胞,全程在冰上进行,尽量缩短收样时间。裂解物经超声处理后于100 °C水浴加热10 min,然后于-80 °C冷冻保存。制备好的样品用10%的SDS-PAGE进行电泳,然后将其转移到PVDC

膜上,用5%脱脂乳室温封闭1 h, PBST冲洗后放入对应一抗稀释液中4 °C孵育过夜, PBST清洗3次,应用HRP偶联的二抗溶液(1:10 000稀释)室温孵育1 h, PBST清洗后,在化学发光凝胶成像系统(Tanon5200)上用化学发光法检测蛋白质条带。

1.2.4 蛋白免疫共沉淀 将HeLa细胞铺于6孔板中,培养12 h后转染质粒,6~8 h后换液,低氧处理24 h后收集细胞。用PBS清洗细胞后,在每孔中加入200 μ L配制好的细胞裂解液(1 mL裂解液中加入10 μ L PIC和10 μ L DTT),用细胞刮刀将裂解物全部收集到1.5 mL EP管中,将超声波细胞破碎仪的功率设定为10%,超声工作2 s,停顿1 s,重复以上超声步骤6次后冰上孵育15 min,4 °C、13 000 r/min离心15 min,收集上清到无RNA酶的1.5 mL EP管中,混匀后取出30 μ L作为INPUT,将剩余裂解物用裂解液补足到1 mL后向每个样品中加入10 μ L的M2磁珠,置于4 °C旋转摇床上孵育6 h进行免疫沉淀。孵育结束后取出样品于冰上静置3 min,3 000 r/min、4 °C离心3 min,小心吸走上清,注意勿触及M2磁珠,加入1 mL细胞裂解液(含0.5% DTT),置于旋转摇床上4 °C孵育清洗3 min,静置3 min后,3 000 r/min、4 °C离心3 min,弃掉上清,此清洗步骤重复3次,最后一次吸走上清时需剩余20 μ L细胞裂解液,然后加入4 μ L的6 \times 样品稀释液,100 °C金属浴加热10 min,将制备好的样品于-80 °C冷冻保存或直接进行Western blot检测。

1.2.5 双荧光素酶报告基因实验 在NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)网站中搜寻 human-*HIF-1 α* 完整基因序列,截取 human-*HIF-1 α* 启动子序列(0~1 000 bp),将其构建到pGL3(E1751, Promega)荧光素酶报告基因载体中以得到pGL3-HIF-1 α -promoter-luciferase质粒。将HeLa、Hep2细胞铺至24孔板中,待细胞密度达到50%后采用chemifect真核细胞转染试剂进行转染,每孔加入0.5 μ g pGL3-HIF-1 α -promoter-luciferase报告基因质粒、20 ng pRL-TK以及1 μ g pRK5-Flag-UHRF1质粒,设置pRK5空载对照组,转染16 h后低氧处理细胞,不同时间点收集样品后,用荧光素酶报告实验系统试剂盒(E2980, Promega)处理细胞,并用发光检测仪(E6080, Promega)检测细胞裂解物的荧光素酶活性。

1.2.6 qRT-PCR 用RNA提取试剂盒(R4011-03, Magen)提取细胞总RNA。使用M-MLV逆转录

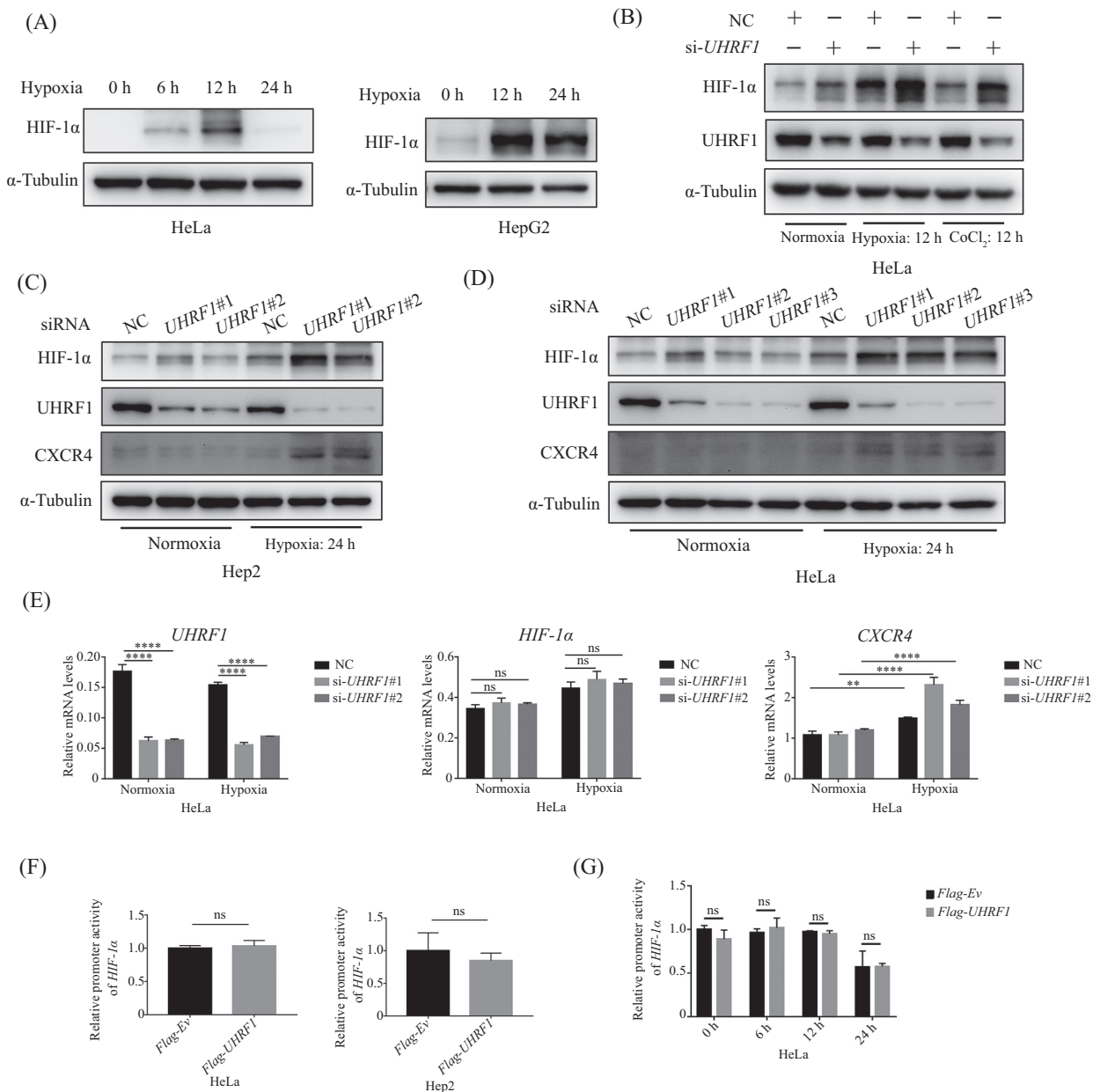
酶(M1701, Promega)逆转录总RNA(0.8 μ g)以得到cDNA。将cDNA稀释8倍后,取10 μ L cDNA模板分别加入1 μ L上/下游引物(10 μ mol/L)及8 μ L 2 \times Ultra-SYBR Premix,将20 μ L反应体系放于荧光定量96孔板中,封膜后置于水平离心机1 000 r/min离心1 min。置于荧光定量PCR仪中进行检测。该分析使用了以下引物: *UHRF1*-F 5'-CGA CGG AGC GTA CTC CCT AG-3', *UHRF1*-R 5'-TCA TTG ATG GGA GCA AAG CA-3'; *H-18S*-F 5'-CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA-3', *H-18S*-R 5'-GCT GGA ATT ACC GCG GCT-3'; *HIF-1 α* -F 5'-GGC GCG AAC GAC AAG AAA AA-3', *HIF-1 α* -R 5'-GTG GCA ACT GAT GAG CAA GC-3'; *CXCR4*-F 5'-ACT ACA CCG AGG AAA TGG GCT-3', *CXCR4*-R 5'-CCC ACA ATG CCA GTT AAG AAG A-3'; *H-18S*作为内源性对照。

1.2.7 统计学分析 用GraphPad Prism 8.3.0软件对结果进行分析及作图,用多重比较或 t 检验分析样本之间是否具有显著性差异。 $*P<0.05$; $**P<0.01$; $***P<0.001$; $****P<0.0001$ 。

2 结果

2.1 抑制UHRF1的表达导致HIF-1 α 的蛋白水平上调

首先对低氧环境中HIF-1 α 蛋白表达水平进行了检测,Western blot检测结果显示,低氧处理HeLa和HepG2细胞12 h后,HIF-1 α 蛋白水平明显上调,24 h后HIF-1 α 蛋白量有降低趋势(图1A)。为了检验UHRF1对HIF-1 α 蛋白水平的影响,使用UHRF1靶向小干扰RNA处理HeLa细胞,与对照siRNA处理组相比,UHRF1 siRNA处理组中的HIF-1 α 蛋白水平在常氧、低氧(12 h)或CoCl₂(模拟低氧环境)处理条件下均上调(图1B)。使用不同序列的UHRF1靶向小干扰RNA(siRNA *UHRF1*#1、siRNA *UHRF1*#2、siRNA *UHRF1*#3)处理Hep2和HeLa细胞,结果同样显示,在低氧条件处理细胞24 h的情况下,UHRF1的表达受到抑制后,HIF-1 α 及下游靶标CXCR4的蛋白水平明显上调(图1C和图1D)。为了检测UHRF1是否影响*HIF-1 α* 的转录水平,使用UHRF1靶向小干扰RNA处理HeLa细胞,低氧处理细胞18 h后,利用qRT-PCR检测*HIF-1 α* 及下游靶基因*CXCR4*的mRNA水平,结果如图1E所示,UHRF1表达受到抑制以后,*HIF-1 α* 的mRNA水平没有受到影响,而*CXCR4*的



A: 用Western blot检测HeLa和HepG2细胞中不同低氧处理时间条件下HIF-1 α 蛋白表达情况; B~D: 小干扰RNA抑制UHRF1表达, Western blot检测Hep2和HeLa细胞中HIF-1 α 及下游靶标CXCR4的蛋白表达水平, 低氧条件: 细胞在缺氧小室中培养24 h, 氧浓度维持在1.0%~2.5%; E: 在HeLa细胞中, 用小干扰RNA抑制UHRF1表达, qRT-PCR检测UHRF1、HIF-1 α 及下游靶基因CXCR4的mRNA水平, 低氧条件: 细胞在缺氧小室中培养18 h, 氧浓度维持在1.0%~2.5%; F: 荧光素酶报告基因实验检测HeLa和Hep2细胞中外源转染的Flag-UHRF1对HIF-1 α 启动子启动的荧光素酶活性的影响, 低氧条件: 氧浓度维持在1.0%~2.5%; G: 荧光素酶报告基因实验检测HeLa细胞中, 外源转染的Flag-UHRF1对HIF-1 α 转录活性的影响, 低氧分别处理细胞0 h、6 h、12 h和24 h。^{ns} P >0.05, ^{**} P <0.01, ^{****} P <0.000 1。

A: HIF-1 α protein expression in HeLa and HepG2 cells under different hypoxia treatment times was detected by Western blot; B-D: small interfering RNA inhibited the expression of UHRF1, the protein expression levels of HIF-1 α and the downstream target gene CXCR4 in Hep2 and HeLa cells were detected by Western blot, hypoxic conditions: the cells were cultured in a hypoxic chamber for 24 h, and the oxygen concentration was maintained at 1.0%-2.5%; E: in HeLa cells, small interfering RNA inhibited the expression of UHRF1, qRT-PCR was used to detect the mRNA levels of UHRF1, HIF-1 α and the downstream target gene CXCR4, hypoxic conditions: the cells were cultured in a hypoxic chamber for 18 h, and the oxygen concentration was maintained at 1.0%-2.5%; F: dual-luciferase reporter assay was used to detect the effect of exogenous transfection of Flag-UHRF1 on luciferase activity driven by HIF-1 α promoter in HeLa and Hep2 cells. Hypoxia condition: the oxygen concentration was maintained between 1.0% and 2.5%; G: luciferase assay was used to detect the effect of Flag-UHRF1 on the transcriptional activity of HIF-1 α in HeLa cells. Cells were treated with hypoxia for 0 h, 6 h, 12 h and 24 h, respectively. ^{ns} P >0.05, ^{**} P <0.01, ^{****} P <0.000 1.

图1 抑制UHRF1表达后HIF-1 α 的蛋白水平增加

Fig.1 HIF-1 α protein level increases after inhibiting UHRF1 expression

mRNA水平上调(图1E)。另外,使用荧光素酶报告基因系统,检测外源转染UHRF1后HIF-1 α 的转录活性的变化,结果显示外源转染UHRF1不能改变HIF-1 α 启动子启动的荧光素酶活性(图1F);且在HeLa细胞中,在低氧处理的不同阶段,外源转染UHRF1均不能改变HIF-1 α 的转录活性(图1G)。以上结果提示,在低氧环境中抑制UHRF1的表达可促进HIF-1 α 蛋白水平提升。

2.2 UHRF1蛋白与HIF-1 α 蛋白相互作用

为了探究UHRF1与HIF-1 α 是否可以相互作用,在不同细胞系中进行蛋白免疫共沉淀实验。如图2A所示,在293T细胞中,细胞内源的UHRF1与HIF-1 α 蛋白之间可以相互作用。如图2B所示,外源过表达的UHRF1可与常氧或低氧条件培养的HeLa细胞内源的HIF-1 α 蛋白相互作用。在低氧处理的HepG2细胞中,同样检测到了外源UHRF1与HIF-1 α 蛋白的相互作用(图2C)。

2.3 UHRF1的结构域影响其与HIF-1 α 相互作用

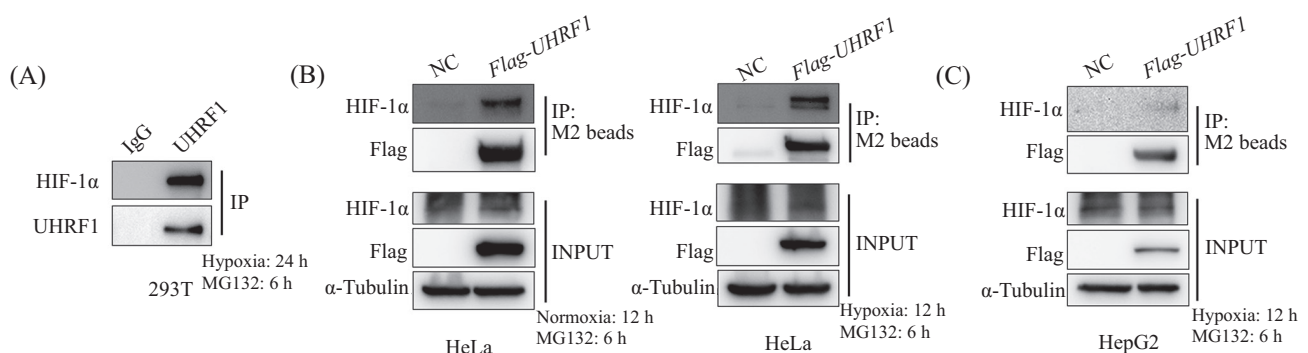
已知UHRF1是一种多功能蛋白,且具有多个结构域^[28],为了检测这些功能结构域对UHRF1与HIF-1 α 蛋白之间相互作用的影响,我们构建了不同UHRF1截短体的质粒(图3A, 1-723、286-723、286-793,数字编号代表UHRF1蛋白氨基酸的位置编号)。在HeLa细胞中分别转染不同截短体的质粒,低氧处理后检测它们与细胞内源HIF-1 α 的免疫共沉淀情

况,结果如图3B所示,可知UHRF1中UBL、TDD和RING结构域对UHRF1和HIF-1 α 之间的相互作用至关重要。

2.4 SET7/9参与UHRF1对HIF-1 α 蛋白水平的调控过程

为了进一步探究UHRF1调节HIF-1 α 蛋白水平变化的机制,在HeLa细胞中转染带有Flag-UHRF1序列的质粒,以便过表达UHRF1,低氧处理细胞24 h后利用Western blot检测HIF-1 α 蛋白表达变化。如图4A所示,与对照组相比,在常氧或低氧环境中,UHRF1过表达组中HIF-1 α 蛋白水平没有明显变化,且该现象在HepG2细胞中也得到进一步验证。该结果提示有其他因素参与UHRF1对HIF-1 α 的蛋白水平的影响。已知UHRF1的蛋白活性受翻译后修饰的影响,并且研究发现,在细胞抵抗DNA损伤修复过程中,SET7/9介导的UHRF1蛋白甲基化修饰是不可或缺的^[24-26]。为了检测甲基修饰蛋白SET7/9是否参与UHRF1对HIF-1 α 的蛋白水平的调控,在HeLa细胞中,同时过表达Flag-UHRF1和GFP-SET7/9,利用Western blot检测HIF-1 α 蛋白水平的变化,如图4B所示,在常氧和低氧条件下,仅过表达UHRF1或SET7/9并不影响HIF-1 α 的蛋白水平,但同时过表达UHRF1和SET7/9可以明显降低HIF-1 α 的蛋白水平。该结果提示,SET7/9参与UHRF1对HIF-1 α 蛋白水平的调节。

为了进一步验证SET7/9在UHRF1调控HIF-1 α

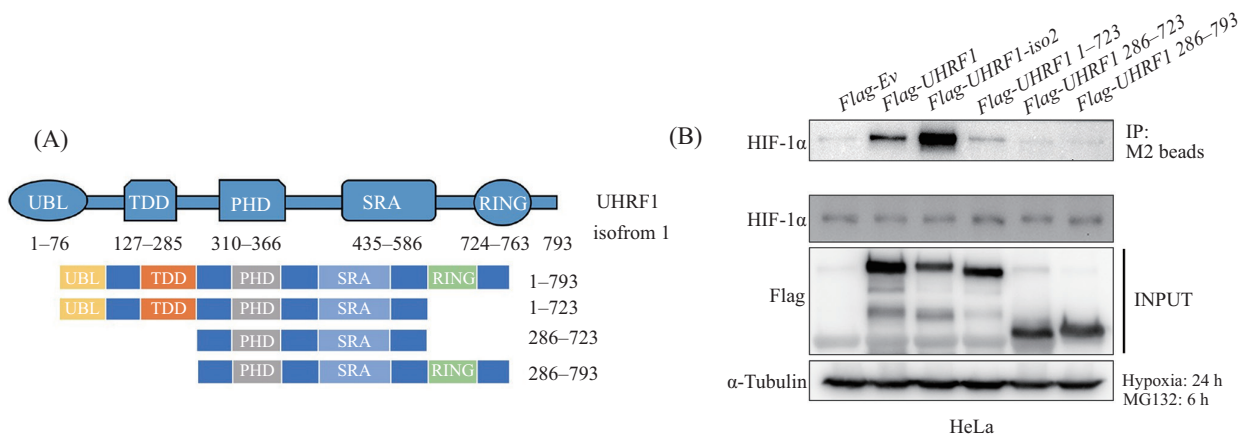


A: 利用免疫共沉淀(Immunoprecipitation)和Western blot检测293T细胞中内源UHRF1与HIF-1 α 蛋白之间的相互作用,用阴性对照IgG抗体和UHRF1抗体分别对内源HIF-1 α 进行免疫沉淀; B、C: Immunoprecipitation和Western blot检测HeLa和HepG2细胞中外源过表达的UHRF1与内源HIF-1 α 的蛋白互作,用M2磁珠免疫沉淀HIF-1 α ,低氧小室培养细胞,收集细胞样品前6 h添加MG132以便抑制泛素降解反应。

A: the interaction between endogenous UHRF1 and HIF-1 α protein in 293T cells was investigated by Immunoprecipitation and Western blot analysis. HIF-1 α was immunoprecipitated by negative control IgG antibody and UHRF1 antibody respectively. B,C: Immunoprecipitation and Western blot were used to detect the interaction between exogenously overexpressed UHRF1 and endogenous HIF-1 α in HeLa and HepG2 cells. M2 beads were used to pull-down HIF-1 α , cells were cultured in hypoxic chamber, and MG132 was added 6 h before cell sample collection to inhibit ubiquitin degradation.

图2 UHRF1与HIF-1 α 蛋白相互作用

Fig.2 UHRF1 protein interacts with HIF-1 α protein

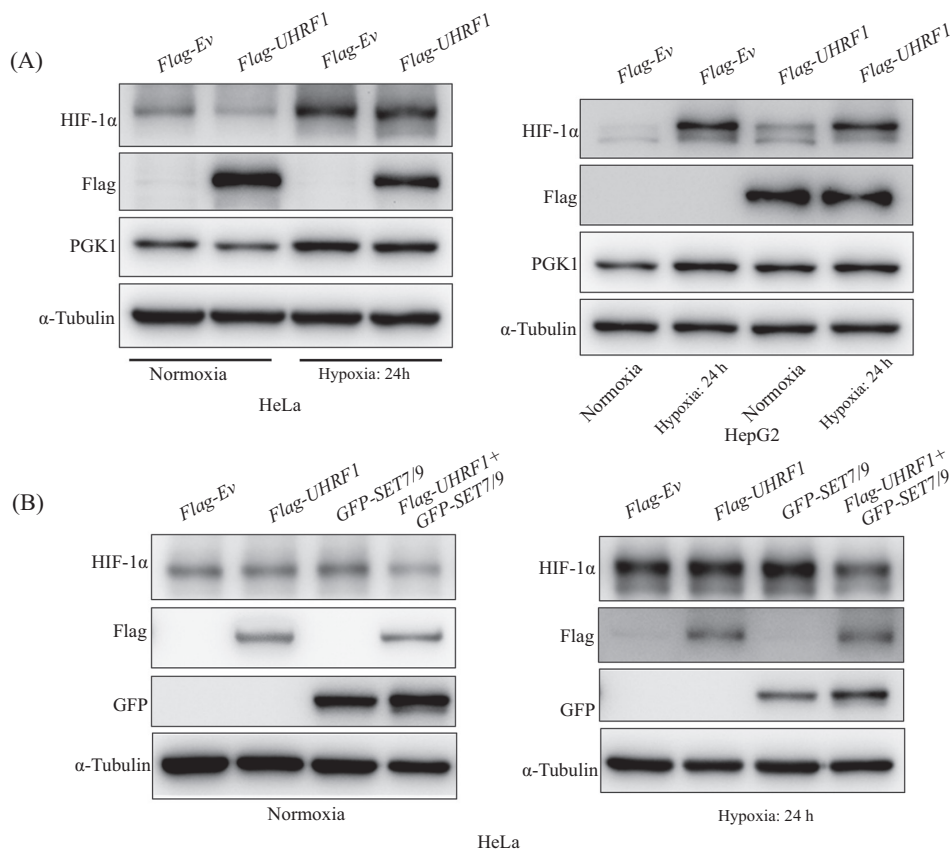


A: UHRF1不同截短体的示意图; B: Immunoprecipitation检测HeLa细胞中外源转入的全长及不同截短体UHRF1与内源HIF-1 α 蛋白的相互作用, 用M2磁珠免疫沉淀HIF-1 α , Western blot检测蛋白表达变化情况。*Flag-UHRF1-iso2*是UHRF1同源异构体2基因序列的简称。

A: schematic diagram of different truncations of *UHRF1*; B: Immunoprecipitation assay was used to detect the interaction between exogenously transferred different truncations of UHRF1 and endogenous HIF-1 α protein in HeLa cells. M2 beads was used to precipitate HIF-1 α , and the indicated protein was detected by Western blot. *Flag-UHRF1-iso2* was the abbreviation for the *UHRF1* homologue 2 gene sequence.

图3 UHRF1的不同截短体与HIF-1 α 之间的相互作用

Fig.3 The interaction between different truncations of UHRF1 with HIF-1 α



A: Western blot检测常氧和低氧条件培养的HeLa、HepG2细胞中HIF-1 α 蛋白表达水平; B: HeLa细胞中转染如图标记的质粒, Western blot检测细胞中内源HIF-1 α 的蛋白表达水平。低氧条件: 细胞在缺氧小室中培养24 h, 氧浓度维持在1%~2.5%。

A: Western blot was used to detect HIF-1 α protein expression in HeLa and HepG2 cells cultured under normoxia and hypoxia conditions; B: HeLa cells were transfected with different plasmids represented in the figure, and the protein expression level of endogenous HIF-1 α was detected by Western blot. Hypoxia condition: the cells were cultured in anoxic chamber for 24 h, and the oxygen concentration was maintained between 1.0% and 2.5%.

图4 同时过表达UHRF1和SET7/9对HIF-1 α 蛋白水平的影响

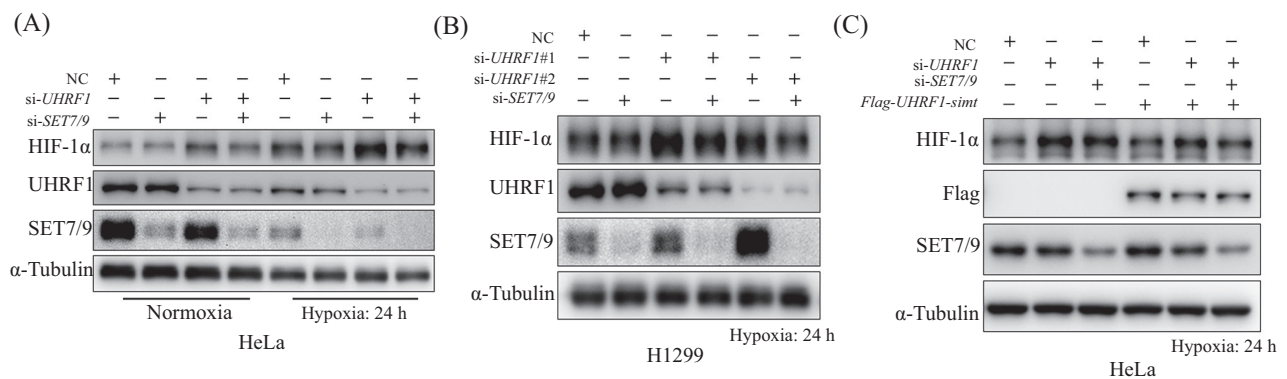
Fig.4 The influence of overexpression of UHRF1 and SET7/9 on HIF-1 α protein

蛋白水平过程中的功能, 在HeLa细胞中, 用 *UHRF1* 和 *SET7/9* 靶向小干扰RNA同时抑制 *UHRF1* 和 *SET7/9* 的表达后, 用 Western blot 检测 HIF-1 α 的蛋白水平的变化。如图5A所示, 与对照组相比, *SET7/9* siRNA 处理组中 HIF-1 α 蛋白水平没有发生变化, 但同时抑制 *UHRF1* 和 *SET7/9* 表达时, HIF-1 α 的蛋白水平与单独敲低 *UHRF1* 表达时相比有明显下调现象, 且在 H1299 细胞中也得到类似的结果(图5B)。此外, 我们对敲低 *UHRF1* 表达的细胞进行了 *UHRF1* 回补处理, 将对数生长期的 HeLa 细胞用 *UHRF1* siRNA 处理 12 h 后, 再将 *Flag-UHRF1-simt* (*UHRF1* 序列中 siRNA 序列位点被突变) 突变体质粒转染到细胞中以实现 *UHRF1* 表达的回补, 低氧处理 24 h 后, 利用 Western blot 检测 HIF-1 α 蛋白表达水平的变化, 如图5C所示, 与单独敲低 *UHRF1* 组相比, *UHRF1* 回补组中 HIF-1 α 的蛋白水平明显下调。此外, 与同时敲低 *UHRF1* 和 *SET7/9* 相比, 同时抑制 *UHRF1* 和 *SET7/9* 的表达并回补 *UHRF1* 后, HIF-1 α 的蛋白水平同样表现出下调的趋势。由此可见, 当 *SET7/9* 的表达受到抑制时, 由 *UHRF1* 表达受到抑制所导致的 HIF-1 α 蛋白水平的上调现象得到了缓解。

2.5 UHRF1 依赖其自身的蛋白甲基化修饰影响 HIF-1 α 的蛋白水平

我们进一步检测了 *SET7/9* 在 *UHRF1* 与 HIF-1 α 相互作用以及调控 HIF-1 α 的蛋白水平过程中的作

用机制。已知 *SET7/9* 在体内外均可甲基化 *UHRF1* 的 K385^[24-26], 进而影响 *UHRF1* 的蛋白功能, 我们猜测 *UHRF1* 对 HIF-1 α 的蛋白水平的的影响可能与 *SET7/9* 介导的 *UHRF1* 甲基化修饰有关。因此我们构建了 *UHRF1* 第385位赖氨酸突变体 (*Flag-UHRF1-K385R*) 质粒以使得 *UHRF1* 的 385 位赖氨酸甲基化修饰缺失, HeLa 细胞中分别转染了野生型 (*Flag-UHRF1-WT*) 和突变型 (*Flag-UHRF1-K385R*) 质粒, 常氧或低氧条件处理细胞后利用免疫共沉淀实验检测野生型 *UHRF1* 和突变型 *UHRF1* 与 HIF-1 α 蛋白之间的相互作用, 如图6A所示, 在低氧条件下, K385R 突变的 *UHRF1* 与 HIF-1 α 的相互作用明显减弱。为了验证 *SET7/9* 与 *UHRF1* 的 K385 甲基化修饰的关系, 用免疫共沉淀结合 Western blot 的方法检测了 *UHRF1* 的甲基修饰, 实验数据表明, 与仅转染 *Flag-UHRF1* 质粒相比, 同时转染 *Flag-UHRF1* 和 *GFP-SET7/9* 质粒后, 单甲基化修饰的 *UHRF1* 蛋白水平明显增多, 并且同时转染 *Flag-UHRF1-K385R* 和 *GFP-SET7/9* 质粒后, 单甲基化修饰的 *UHRF1* 蛋白水平明显降低(图6B)。与单独转染 *Flag-UHRF1* 质粒组相比, 同时转染 *Flag-UHRF1* 和 *GFP-SET7/9* 质粒组中 *UHRF1* 与 HIF-1 α 之间的相互作用明显增强了(图6C)。此外, 与对照组相比, 同时转染 *Flag-UHRF1* 和 *GFP-SET7/9* 质粒组中 HIF-1 α 蛋白水平降低; 但是与转染对照质粒相比, 同时转染

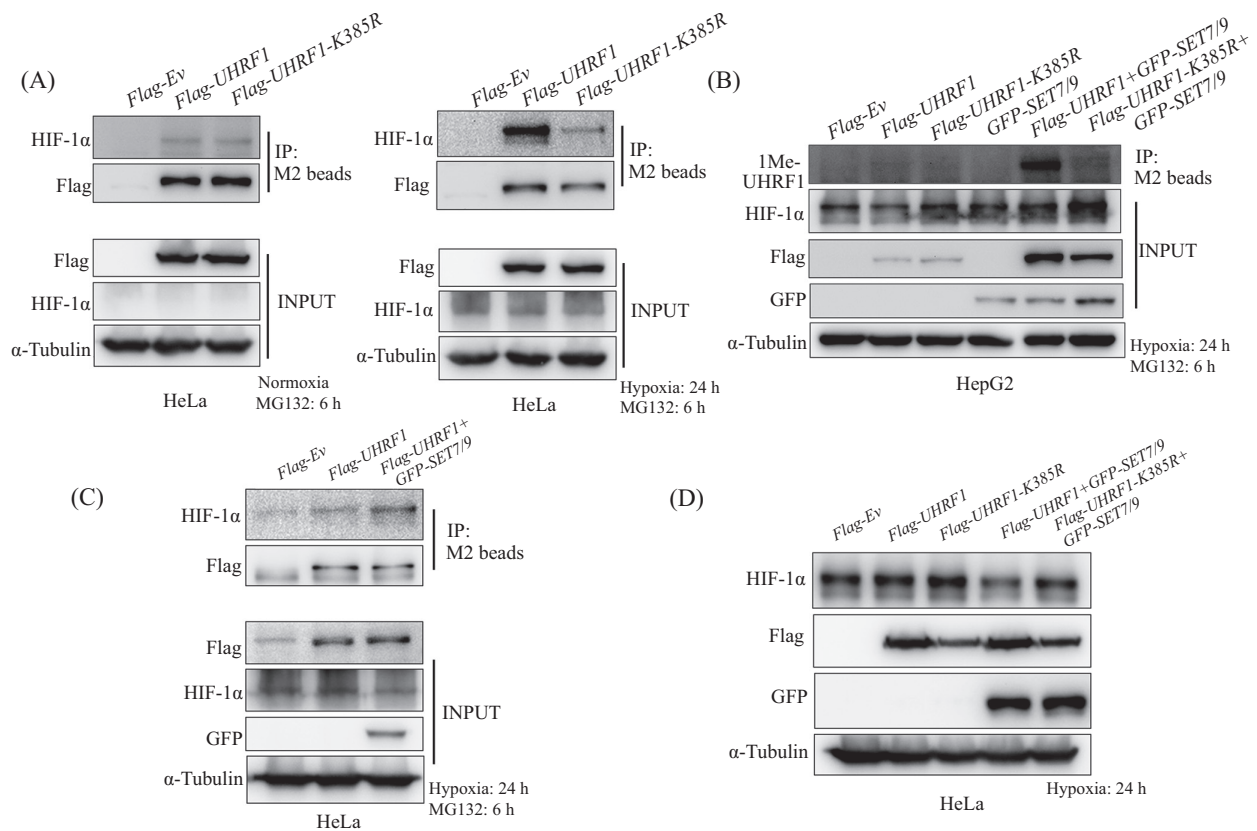


A、B: 转染相应靶基因的siRNA后, Western blot检测HeLa、H1299细胞中HIF-1 α 、UHRF1和SET7/9的蛋白表达水平; C: 转染siRNA敲低目的基因表达后, 外源转染回补突变了siRNA识别序列的突变型 *UHRF1* 质粒 (*Flag-UHRF1-simt*), Western blot检测HIF-1 α 的蛋白表达水平。低氧条件: 细胞在缺氧小室中培养24 h, 氧浓度维持在1.0%~2.5%之间。

A,B: the protein expression levels of HIF-1 α , UHRF1 and SET7/9 in HeLa and H1299 cells were detected by Western blot after transfection of siRNA of corresponding target genes; C: after transfection of siRNA to knock down the expression of target gene, the mutant *UHRF1* plasmid (*Flag-UHRF1-simt*) with mutated siRNA recognition sequence was transfected exogenously. The protein expression level of HIF-1 α was detected by Western blot. Under hypoxia conditions, the cells were cultured in a hypoxia chamber for 24 h, and the oxygen concentration was maintained between 1.0% and 2.5%.

图5 SET7/9参与UHRF1对HIF-1 α 的调控

Fig.5 SET7/9 is involved in the regulation of UHRF1 to HIF-1 α



A: Immunoprecipitation and Western blot detection of HeLa cells, exogenous transfection of wild-type *Flag-UHRF1* and K385R mutant *Flag-UHRF1-K385R* plasmid expressed protein and endogenous HIF-1 α protein interaction, M2 magnetic bead immunoprecipitation HIF-1 α protein, Western blot detection protein expression; B: exogenous transfection of the corresponding plasmid, immunoprecipitation detection of HepG2 cells monomethylated UHRF1 protein (1Me-UHRF1) level, M2 magnetic bead immunoprecipitation of UHRF1, Western blot detection protein expression, mono-methyl-lysine mAb antibody detection of UHRF1 lysine monomethyl modification level; C: simultaneous overexpression of exogenous *Flag-UHRF1* and *GFP-SET7/9*, immunoprecipitation detection of HeLa cells UHRF1 and endogenous HIF-1 α interaction changes, M2 magnetic bead immunoprecipitation of endogenous HIF-1 α protein, Western blot detection of HIF-1 α protein level; D: simultaneous overexpression of *Flag-UHRF1* wild/mutant type and *GFP-SET7/9* synchronously, Western blot detection of HIF-1 α protein level in HeLa cells.

A: Immunoprecipitation and Western blot were used to detect the interactions between proteins expressed by wild-type *Flag-UHRF1* and K385R mutant *Flag-UHRF1-K385R* plasmid transfected exogenously in HeLa cells and endogenous HIF-1 α proteins. M2 beads were used to pull-down HIF-1 α protein, protein expression was detected by Western blot; B: after exogenous transfection of the corresponding plasmid, the level of methyl-modified UHRF1 protein (1Me-UHRF1) in HepG2 cells was detected by immunoprecipitation, and UHRF1 was immunoprecipitated by M2 beads, Western blot was applied to detect UHRF1 monomethyl modification level by incubation with mono-methyl-lysine mAb; C: after overexpression of exogenous *Flag-UHRF1* and *GFP-SET7/9* at the same time, immunoprecipitation was utilized to detect interaction changes between UHRF1 and endogenous HIF-1 α in HeLa cells, using M2 beads to pull-down endogenous HIF-1 α protein, and the HIF-1 α protein level was detected by Western blot; D: after overexpression of *Flag-UHRF1* wild/mutant type and *GFP-SET7/9* synchronously, Western blot was used to detect the protein level of HIF-1 α in HeLa cells.

图6 UHRF1对HIF-1 α 的作用依赖于SET7/9对UHRF1的甲基化修饰

Fig.6 The effect of UHRF1 on HIF-1 α depends on the SET7/9 mediated UHRF1 methylation modification

*Flag-UHRF1-K385R*和 *GFP-SET7/9*质粒,并不能降低HIF-1 α 的蛋白水平(图6D)。综上,SET7/9能对UHRF1上第385位赖氨酸进行甲基化修饰,UHRF1的甲基修饰缺失会减弱UHRF1和HIF-1 α 蛋白之间的相互作用,并影响UHRF1对HIF-1 α 蛋白水平的调节。

3 讨论

缺氧是实体瘤中最常见的现象,癌细胞不受控

制的复制,使得细胞对氧气需求增加,并且会阻碍血管生长,从而造成实体瘤的缺氧,进而导致肿瘤细胞启动低氧应激反应^[29]。与正常组织相比,HIF-1 α 蛋白在各种常见的实体恶性肿瘤中大多呈现过度表达的状态,在这些快速增殖的肿瘤组织中,HIF-1 α 蛋白的精密调节机制也经常是缺失的,因此在肿瘤细胞中,低氧应激反应的中后期阶段,累积的HIF-1 α 被有效地回收或清除对众多肿瘤疾病治疗过程是尤为重要的^[30-32]。本研究旨在探索低氧应答的中后期(低氧

处理 24 h 左右) HIF-1 α 蛋白水平的调控机制。抑制转录激活以及诱导蛋白降解是下调 HIF-1 α 蛋白水平的两种主要途径^[33-35]。在本研究中,我们发现当敲低 *UHRF1*时, HIF-1 α 蛋白水平在低氧条件下显著上升。但UHRF1是通过何种途径调节HIF-1 α 的还有待进一步揭示。

UHRF1作为一种DNA甲基转移酶,其主要作用是维持表观遗传模式,并对一些DNA损伤进行及时的识别和修复^[33-35]。UHRF1的功能、稳定性和细胞内定位主要是通过细胞周期蛋白复合物和去泛素酶网络介导的翻译后修饰来调控的,特定残基的磷酸化或甲基化修饰可影响UHRF1的功能,此外,相同残基的不同修饰也能改变UHRF1的功能,例如在细胞周期S期,UHRF1中385位赖氨酸的甲基化修饰能促进DNA修复,而在G₂期,相同残基可被SET8甲基化修饰,导致UHRF1蛋白降解^[24-26]。UHRF1生物学功能的多样性以及调控UHRF1的多种分子机制还有待进一步挖掘。在本研究中发现,UHRF1与HIF-1 α 在常氧和低氧条件下均能发生互作,且此过程依赖SET7/9对UHRF1中第385位赖氨酸的甲基化修饰。UHRF1的不同结构域在两者互作过程中也起到关键作用,其中UBL结构域、TDD结构域和RING结构域对于两者的互作关系是至关重要的。有趣的是,我们在研究过程中发现,低氧环境中,细胞中存在内源SET7/9蛋白或者外源过表达SET7/9的情况下,内源UHRF1的赖氨酸单甲基化修饰都非常少,该现象提示在低氧应答过程中存在更加复杂的UHRF1甲基化修饰调控机制,并且我们不能完全排除UHRF1通过非自身甲基化修饰依赖的方式对HIF-1 α 进行调控,也不能完全排除SET7/9通过其他方式影响HIF-1 α 蛋白。此外,UHRF1除了K385位甲基修饰位点外,其他位点的甲基修饰是否影响该过程也有待进一步探究;并且,除SET7/9之外,是否还有其他甲基转移酶在低氧应激过程中调控UHRF1的蛋白活性及功能也需进一步研究。

综上,在多种肿瘤细胞中,UHRF1与HIF-1 α 在低氧条件下可相互作用,且该相互作用关系依赖于SET7/9介导的UHRF1甲基化修饰;在低氧条件下,UHRF1在SET7/9的协同作用下,能下调HIF-1 α 的蛋白水平。UHRF1调控HIF-1 α 的蛋白水平的分子机制还有待进一步解析。

参考文献 (References)

- [1] SEMENZA G L. Targeting HIF-1 for cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(10): 721-32.
- [2] SEMENZA G L. HIF-1 and human disease: one highly involved factor [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(16): 1983-91.
- [3] PAPANDEOU I, POWELL A, LIM A L, et al. Cellular reaction to hypoxia: sensing and responding to an adverse environment [J]. *Mutat Res*, 2005, 569(1/2): 87-100.
- [4] SEMENZA G L. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13(2): 167-71.
- [5] KE Q, COSTA M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 70(5): 1469-80.
- [6] IWAI K, YAMANAKA K, KAMURA T, et al. Identification of the von hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(22): 12436-41.
- [7] SHULMAN M, SHI R, ZHANG Q. Von hippel-lindau tumor suppressor pathways & corresponding therapeutics in kidney cancer [J]. *J Genet Genomics*, 2021, 48(7): 552-9.
- [8] DUYN DAM M C, HULSCHER S T, VAN DER WALL E, et al. Evidence for a role of p38 kinase in hypoxia-inducible factor 1-independent induction of vascular endothelial growth factor expression by sodium arsenite [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(9): 6885-95.
- [9] JEONG J W, BAE M K, AHN M Y, et al. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation [J]. *Cell*, 2002, 111(5): 709-20.
- [10] CHENG J, KANG X, ZHANG S, et al. Sumo-specific protease 1 is essential for stabilization of hif1 α during hypoxia [J]. *Cell*, 2007, 131(3): 584-95.
- [11] KIM Y, NAM H J, LEE J, et al. Methylation-dependent regulation of HIF-1 α stability restricts retinal and tumour angiogenesis [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10347.
- [12] MUTO M, FUJIMORI A, NENOI M, et al. Isolation and characterization of a novel human radiosusceptibility gene, NP95 [J]. *Radiat Res*, 2006, 166(5): 723-33.
- [13] GALANTI L, PFANDER B. Right time, right place-dna damage and dna replication checkpoints collectively safeguard s phase [J]. *Embo J*, 2018, 37(21): e100681.
- [14] MURRAY J M, CARR A M. Integrating DNA damage repair with the cell cycle [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2018, 52: 120-5.
- [15] DABIN J, FORTUNY A, POLO S E. Epigenome maintenance in response to DNA damage [J]. *Mol Cell*, 2016, 62(5): 712-27.
- [16] AVVAKUMOV G V, WALKER J R, XUE S, et al. Structural basis for recognition of hemi-methylated dna by the sra domain of human UHRF1 [J]. *Nature*, 2008, 455(7214): 822-5.
- [17] ASHRAF W, IBRAHIM A, ALHOSIN M, et al. The epigenetic integrator UHRF1: on the road to become a universal biomarker for cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(31): 51946-62.
- [18] BABBIO F, PISTORE C, CURTI L, et al. The SRA protein UHRF1 promotes epigenetic crosstalks and is involved in prostate cancer progression [J]. *Oncogene*, 2012, 31(46): 4878-87.
- [19] SABATINO L, FUCCI A, PANCIONE M, et al. UHRF1 coordinates peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARG) epigenetic silencing and mediates colorectal cancer progression [J]. *Oncogene*, 2012, 31(49): 5061-72.

- [20] KIM J H, SHIM J W, EUM D Y, et al. Downregulation of Uhrf1 increases tumor malignancy by activating the CXCR4/AKT-JNK/IL-6/Snail signaling axis in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2798.
- [21] ZHOU L, SHANG Y, JIN Z, et al. UHRF1 promotes proliferation of gastric cancer via mediating tumor suppressor gene hypermethylation [J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(8): 1241-51.
- [22] TAUBER M, FISCHLE W. Conserved linker regions and their regulation determine multiple chromatin-binding modes of Uhrf1 [J]. *Nucleus*, 2015, 6(2): 123-32.
- [23] MA H, CHEN H, GUO X, et al. M phase phosphorylation of the epigenetic regulator Uhrf1 regulates its physical association with the deubiquitylase USP7 and stability [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(13): 4828-33.
- [24] HAHM J Y, KIM J Y, PARK J W, et al. Methylation of UHRF1 by SET7 is essential for DNA double-strand break repair [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(1): 184-96.
- [25] HAHM J Y, KANG J Y, PARK J W, et al. Methylated-UHRF1 and PARP1 interaction is critical for homologous recombination [J]. *BMB Rep*, 2020, 53(2): 112-7.
- [26] ZHANG H, GAO Q, TAN S, et al. SET8 prevents excessive DNA methylation by methylation-mediated degradation of UHRF1 and DNMT1 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(17): 9053-68.
- [27] IBRAHIM A, ALHOSIN M, PAPIN C, et al. Thymoquinone challenges Uhrf1 to commit auto-ubiquitination: a key event for apoptosis induction in cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(47): 28599-611.
- [28] MANCINI M, MAGNANI E, MACCHI F, et al. The multi-functionality of UHRF1: epigenome maintenance and preservation of genome integrity [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(11): 6053-68.
- [29] POWIS G, KIRKPATRICK L. Hypoxia inducible factor-1 α as a cancer drug target [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(5): 647-54.
- [30] CARMELIET P, JAIN R K. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. *Nature*, 2000, 407(6801): 249-57.
- [31] PATIAR S, HARRIS A L. Role of hypoxia-inducible factor-1 α as a cancer therapy target [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2006, 13(Suppl 1): S61-75.
- [32] WU Q, YOU L, NEPOVIMOVA E, et al. Hypoxia-inducible factors: master regulators of hypoxic tumor immune escape [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 77.
- [33] RAPISARDA A, URANCHIMEG B, SCUDIERO D A, et al. Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(15): 4316-24.
- [34] BRUICK R K, MCKNIGHT S L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF [J]. *Science*, 2001, 294(5545): 1337-40.
- [35] JIANG B H, JIANG G, ZHENG J Z, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1 [J]. *Cell Growth Differ*, 2001, 12(7): 363-9.