

· 综述 ·

增强子调控异常与恶性肿瘤的关系研究进展

汪徐春, 孙玉洁*

南京医科大学基础医学院细胞生物学系, 江苏省人类功能基因组学重点实验室, 江苏 南京 211166

[摘要] 增强子是真核生物基因组中一类特殊的转录调控元件, 真核生物的基因组中分布着大量增强子元件。增强子可通过形成染色质环结构与靶基因的启动子相互作用, 从而与启动子共同调控靶基因的转录。大量研究表明, 遗传变异、表观修饰改变及转录因子异常均会直接或间接导致增强子功能失调或基因组增强子重塑, 并与恶性肿瘤的发生和恶性进展密切相关。近年来高通量测序技术和数据库的快速发展有力推进了增强子研究的深度和广度。本文对增强子的结构特征、调控模式, 及其在肿瘤发生和发展过程中调控异常的形成机制、增强子鉴定的主要技术手段和常用数据库等进行了简要的介绍和概括。

[关键词] 增强子; 增强子调控异常; 恶性肿瘤

[中图分类号] R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)10-1432-10

doi: 10.7655/NYDXBNS20231017

Research advances of the correlation between abnormal regulation of enhancer and malignant tumor

WANG Xuchun, SUN Yujie*

Department of Cell Biology, School of Basic Medicine, Nanjing Medical University, Key laboratory of Human Functional Genomics of Jiangsu Province, Nanjing 211166, China

[Abstract] The enhancer is a special class of transcriptional regulatory elements in eukaryotic genomes. There are a large number of enhancer elements in eukaryotic genomes. Enhancers can interact with the promoters of target genes through the formation of chromatin loop, and regulate the transcription of target genes together with the promoters. A large number of studies have shown that genetic variations, epigenetic modifications and abnormal transcription factors can directly or indirectly lead to enhancer dysfunction or genome enhancer remodeling that are closely correlation to the occurrence and progression of malignant tumor. In recent years, the rapid development and update of high-throughput sequencing technology and database have strongly enhanced the depth and breadth of enhancer research. In this review, we briefly introduced and summarized the structural characteristics and the regulation mode of enhancers, and the formation mechanism of abnormal regulation in the process of tumorigenesis and development, as well as the main technical means of enhancer identification and common databases.

[Key words] enhancer; abnormal regulation of enhancer; malignant tumor

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(10): 1432-1440, 1478]

增强子最早于1981年由Banerji等^[1]在猿猴空泡病毒SV40的DNA序列5'端发现, 它能使HeLa细胞中兔血红蛋白 $\beta 1$ 基因表达增加200倍。之后, Gillies等^[2]在哺乳动物免疫球蛋白重链基因中也发现增强子的存在, 并且该增强子的功能与序列方向、

靶基因启动子的位置无关。近年来, 人类基因组DNA元件百科全书(encyclopedia of DNA elements, ENCODE)^[3]和表观遗传组学蓝图计划^[4]揭示了基因组中分布着大量潜在的增强子调控元件。

基因的转录失调是肿瘤发生和发展的重要机制^[5], 而增强子调控异常在其中发挥重要作用^[6]。在肿瘤的发生和发展过程中, 增强子在基因组中的分布发生动态变化, 即基因组增强子重塑。增强子

[基金项目] 国家自然科学基金(82072580)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yujiesun@njmu.edu.cn

重塑包括新增增强子的形成或原有增强子的消失,进而形成新的增强子分布^[7-8]。此外,肿瘤细胞中原有增强子的活性也会异常升高或减弱。无论是增强子重塑还是原有增强子活性的异常,均有可能促进癌基因的转录激活以及抑癌基因的异常失活,成为肿瘤发生和发展的重要驱动因素。

本文简述了增强子的结构特征、调控模式,在肿瘤发生和发展过程中增强子调控异常的形成机制、增强子鉴定的技术手段及常用数据库,这将有助于从一个不同的视角理解肿瘤发生发展的病理机制,并为增强子的深入研究提供新视野。

1 增强子的结构特征

增强子是一段能显著增强靶基因转录效率的DNA序列,长度100~2 000 bp^[9]。增强子具有特征性组蛋白修饰特征,依据修饰种类被分为3种状态^[10]:①预激活状态,仅有H3K4me1(H3 lysine 4 monomethylation)修饰;②活性状态,既包含H3K4me1又存在H3K27ac(H3 lysine 27 acetylation)修饰;③静止状态,同时存在H3K4me1和H3K27me3(H3 lysine 27 trimethylation)修饰。预激活和静止状态的增强子均无法发挥促进转录的作用,只有转变为活性状态才能发挥调控功能。

增强子序列中含有不同转录因子的结合基序。大多数转录因子结合在染色质开放区域,能够招募增强子相关组蛋白修饰酶等改变增强子活性。有些转录因子作为先驱转录因子在沉默的染色质区域结合,开放染色质后招募其他转录因子形成增强子,调控胚胎发育和细胞分化等生物学过程^[11]。

相当一部分增强子具有细胞特异性,只在特定细胞类型或细胞生长发育的特定阶段发挥调控功能,这是由细胞中特异性的蛋白决定的。如心血管谱系特异性转录因子GATA4(GATA binding protein 4)作为先驱因子打开沉默的染色质区域,募集NKX2-5(NK2 homeobox 5)和ETS1(ETS proto-oncogene 1)形成对心脏发育至关重要的增强子^[12]。

2 增强子的调控模式

增强子通过与靶基因启动子形成染色质环结构上调靶基因表达。目前,已报道有多种关键因子参与染色质环的形成,如转录因子CCCTC结合因子(CCCTC-binding factor,CTCF)、癌基因c-myc的产物MYC蛋白以及核基质结合蛋白1(SATB homeobox 1,SATB1)等。基因组中相距一定距离的两个CTCF

可通过凝集素复合物“挤压”形成柔性染色质环,使处于CTCF结合位点之间的增强子与靶基因启动子物理距离接近,再募集中介复合物促进增强子和启动子接触,向启动子传递转录信号^[13]。CTCF和凝集素还是拓扑关联结构域(topologically associated domain,TAD)的重要组成部分。TAD是染色质结构单元,平均大小约1 Mb,能够限制染色质环的范围^[14]。最近研究发现,远端增强子与靶基因启动子的染色质环是动态变化的。在小鼠胚胎干细胞中,凝集素释放因子WAPL(WAPL cohesin release factor)形成游离的蛋白库,通过循环的凝集素蛋白与染色质的结合和释放介导增强子和启动子之间动态的相互作用^[15]。而在骨肉瘤细胞中,增强子和启动子相互作用区域MYC的累积可以加强染色质相互作用,增加染色质接触频率,进而驱动重塑致癌染色质^[16]。此外,本课题组研究发现,核基质结合蛋白SATB1可以介导BCL2基因3'-UTR内的增强子元件与BCL2基因启动子区的染色质环形成,通过上调BCL2基因表达调节细胞凋亡^[17]。SATB1还可通过形成启动子-增强子染色质环,调节参与T细胞发育的重要基因BCL6的表达^[18]。

近年来的研究发现,不仅启动子可以招募RNA聚合酶II(RNA polymerase II,RNAP II)起始基因转录,部分活性增强子区域也能够募集RNAP II转录形成非编码RNA发挥调控作用,即增强子RNA(enhancer RNA,eRNA)^[19]。eRNA序列通常小于200 bp,非多聚腺苷酸化,具有半衰期短和不稳定的特点。由于eRNA能够促进增强子和启动子的相互作用,eRNA的表达水平与增强子的活性高度相关。如在雌二醇处理的乳腺癌细胞中,雌激素受体(estrogen receptor,ER)反应性增强子转录的eRNA可与凝集素相互作用,稳定增强子与靶基因启动子之间形成的染色质环,上调靶基因表达发挥促癌作用^[20]。

增强子的活性受到众多因素影响,遗传变异、表观修饰异常以及转录因子异常均可能造成增强子的活性升高或者降低。此外,表观修饰异常以及转录因子异常还能导致基因组中增强子的重塑,同时改变多个下游靶基因的表达水平,从而在肿瘤的发生和发展中发挥重要作用。

3 遗传变异改变增强子活性

3.1 单核苷酸多态性(single nucleotide variants,SNP)与增强子活性

增强子序列的遗传变异包括单核苷酸多态性

和结构变异。单核苷酸多态性是人类可遗传变异中最常见的一种。近年来,针对肺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌和胰腺癌等不同恶性肿瘤的全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)^[21]发现了大量肿瘤风险遗传变异^[22-23],其中多数位于增强子元件内部^[3]。研究显示,增强子遗传变异能够改变增强子与转录因子的结合能力,进而增强或削弱其对靶基因的调控,导致靶基因表达失调,是恶性肿瘤发生发展的重要遗传基础之一^[24-26]。本课题组研究发现,在13q12.12染色质区存在1个肺组织特异性增强子,而其中与肺癌风险SNP rs753955 (A>G)强连锁的3个SNP可显著降低该增强子与p53的结合能力及其对p53蛋白的反应性,进而抑制其对下游靶基因的调控活性,促进肺特异性致癌物诱导的支气管上皮细胞恶性转化^[27]。转录因子NK3同源盒1(NK3 homeobox 1, NKX3.1)和YY1结合基序分别与前列腺癌风险SNP rs11672691和其强连锁的SNP位点重叠。NKX3.1和YY1与野生型SNP结合后使相应SNP所在区域启动子活性升高,激活长链非编码RNA前列腺癌转录本19(prostate cancer associated transcript 19, PCAT19)短亚型的转录。这两个SNP位点的突变使NKX3.1和YY1结合减弱,导致短亚型的启动子活性下降,而作为促癌转录本PCAT19长亚型的增强子发挥功能,从而促进前列腺癌进展^[28]。

此外,某些SNP变异能够使增强子与转录因子的结合能力增强,提高增强子活性。如位于19q13侵袭性前列腺癌染色质区域的增强子内部SNP变异增强了转录因子同源框A2(homeobox A2, HOXA2)与增强子的结合,升高增强子活性,上调PCAT19和CEA细胞粘附分子21(CEA cell adhesion molecule 21, CEACAM21)基因的转录,进而促进前列腺癌细胞的侵袭和迁移能力^[29]。SNP也可能在增强子区域引入新的结合位点,导致活性增强子形成。如神经母细胞瘤保护性SNP变异可增进转录因子GATA的结合,促进H3K27ac修饰形成活性增强子,增强致癌靶基因转录发挥促癌作用^[30]。

3.2 基因组结构变异与增强子活性

基因组结构变异通常是指基因组长片段(>50 bp)的序列和位置改变,包括长片段的插入和缺失、基因拷贝数变异、染色体内部或染色体间的易位等不同类型。基因组片段的缺失可破坏细胞拓扑关联结构域边界,使增强子和原癌基因之间的边界消失,促进癌基因表达^[31]。增强子的拷贝数变异可增

加癌基因的表达,促进头颈部鳞状细胞癌、肺腺癌等恶性进展^[32]。

此外,增强子结构变异还会造成“增强子劫持”,即将某一特定的增强子“劫持”到基因组中的其他位置,失去对原有靶基因的调控,而使新的靶基因表达明显增加的现象。2014年, Northcott等^[33]研究发现3亚型髓母细胞瘤的基因组中9q34染色质区域发生长片段缺失、染色体重排等不同类型的结构变异。无论变异类型如何,都会使原本调控DEAD盒蛋白31(DEAD-box helicase 31, DDX31)基因的增强子被劫持到生长因子非依赖性1B转录抑制因子(growth factor independent 1B transcriptional repressor, GFI1B)基因约31 kb范围内,激活GFI1B癌基因转录促进3亚型髓母细胞瘤的发生。2021年, Montefiori等^[34]研究发现染色体重排驱动BCL11转录因子B(BCL11 transcription factor B, BCL11B)基因与造血祖细胞中活性增强子在基因组中位置并列,劫持的增强子上调BCL11B基因表达驱动急性白血病发生。

4 表观遗传修饰异常改变增强子活性

4.1 组蛋白修饰与增强子活性

组蛋白H3K4me1修饰是增强子的标志。H3K4me1修饰由赖氨酸甲基转移酶2C(lysine methyltransferase 2C, KMT2C, 又称MLL3)和KMT2D(又称MLL4)催化完成。而赖氨酸去甲基转移酶1A(lysine demethylase 1A, KDM1A)和KDM1B介导H3K4去单甲基化。此外,组蛋白H3K27me3修饰是无活性静止状态增强子的标志, KDM6A和KDM6B介导H3K27去三甲基化。因此,这些修饰酶基因的缺失或表达异常增高会导致增强子调控的异常,使细胞的转录模式发生改变,进而促进肿瘤的形成和发展。值得关注的是,虽然KMT2C和KMT2D是特异性的H3K4me1修饰酶,但是研究发现这两个基因的缺失均能够造成增强子区域H3K4me1和H3K27ac信号的同时减弱,提示KMT2C和KMT2D的修饰功能存在相互依存。在ER阳性的乳腺癌中, KMT2C缺失导致ER α 结合的促癌增强子H3K4me1和H3K27ac丢失,抑制乳腺癌细胞增殖^[35]。KMT2D缺失使前列腺癌^[36]和黑色素瘤^[37]细胞全基因组中H3K4me1和H3K27ac信号减弱,发挥致癌作用。

此外,在前列腺癌细胞中, KDM1A表达下降会破坏FOXA1与染色质结合,进而下调雄激素受体(androgen receptor, AR)介导的增强子活性及相应基

因转录,显著降低癌细胞生长能力^[38]。研究发现KDM6A能够通过H3K27me3去甲基化酶活性非依赖性的方式招募MLL3/4和p300,实现对增强子活性的调节。以骨髓恶性肿瘤为例^[39],尽管KDM6A缺失后全基因组H3K27me3改变不明显,但是H3K27ac和染色质可及性发生了显著变化。从机制上说,KDM6A抑制致癌因子ETS与DNA结合,当KDM6A缺失后基因组中ETS结合增加,ETS通过招募组蛋白乙酰转移酶促进H3K27ac修饰,升高增强子活性发挥促癌效应。与KDM6A有所不同,KDM6B通过抑制H3K27me3修饰以稳定增强子-启动子相互作用,上调癌基因MYCN和c-myc转录,在神经母细胞瘤中发挥肿瘤促进作用^[40]。

除了组蛋白甲基化修饰,增强子活性还受组蛋白乙酰化修饰的调节。其中,H3K27ac修饰与增强子的调控活性显著正相关。研究较多的组蛋白乙酰转移酶是p300(也称为KAT3B)和环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)的结合蛋白(CREB binding protein, CBP,也称KAT3A)。CBP由CREBBP基因编码,p300由EP300基因编码。CBP和p300具有高度保守的结构。它们的乙酰转移酶结构域、乙酰赖氨酸结合溴结构域几乎相同。有研究报道p300缺失会使基因组中H3K27ac信号减弱,进而重塑增强子,使参与细胞分化和白血病转化的基因表达受限,从而加速骨髓增生异常综合征的进展^[41]。另外,有研究报道在急性淋巴细胞白血病中,CBP和MYB结合的增强子共定位,促进H3K27ac富集,上调增强子活性驱动癌基因表达^[42]。

4.2 DNA甲基化修饰异常与增强子活性

DNA甲基化是在基因序列不改变的前提下,通过DNA甲基转移酶介导,以S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,将甲基添加到胞嘧啶的第5位碳原子上,形成5-甲基胞嘧啶的过程。相比于正常组织,肿瘤组织细胞中基因组DNA甲基化修饰水平发生显著变化^[43-44]。研究发现,在肿瘤的进展过程中,增强子始终是甲基化改变最大的区域^[45]。肿瘤细胞中增强子区域异常低甲基化上调下游靶基因表达,而异常高甲基化则导致下游靶基因表达下调,并且增强子甲基化与癌症基因失调之间的相关性显著高于启动子甲基化与基因失调的相关性^[46]。

已知增强子区域的低甲基化有助于转录因子结合进而提高增强子的活性。例如,ER阳性的乳腺癌细胞中增强子区域的异常低甲基化,可增加

ER α 、FOXA1和GATA结合蛋白3(GATA binding protein 3, GATA3)与增强子的结合,激活雌激素依赖性的肿瘤生长基因表达,发挥促癌作用^[47]。Yang等^[48]发现在急性髓性白血病细胞中,DNA甲基转移酶3A(DNA methyltransferase 3 alpha, DNMT3A)的缺失导致增强子区域的DNA低甲基化,并促进ETS转录因子FLI1(Fli-1 proto-oncogene, ETS transcription factor)与增强子的结合,增加其调控活性,上调促T细胞增殖的靶基因转录从而促进白血病的发生和发展。此外,增强子的低甲基化还可通过促进eRNA转录,稳定增强子与启动子的相互作用,发挥促癌作用^[49]。

4.3 染色质重塑因子与增强子活性

真核细胞中的染色质重塑因子包含哺乳动物转换/蔗糖非发酵(switch/sucrose non-fermentable, SWI/SNF)、模拟转换(imitation switch, ISWI)、染色质域解螺旋酶DNA结合(chromodomain helicase DNA-binding, CHD)、人INO80(INOitol requiring 80, INO80)4个家族^[50],每个家族分别形成多亚基复合物,依赖ATP水解产生的能量,使核小体位置移动暴露DNA序列,改变染色质可及性实现染色质重塑。

SWI/SNF家族成员的基因突变或表达水平异常可导致增强子活性异常,使下游靶基因转录失调进而产生致癌效应。虽然SWI/SNF家族蛋白在所有癌症中的平均突变率约为20%^[51],但是单个亚基的突变频率在不同肿瘤类型中的差异很大。如催化亚基染色质亚家族B调节因子1(SWI/SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin subfamily B member 1, SMARCB1)基因在恶性横纹肌肿瘤中突变率约95%,主要表现为双等位基因缺失。野生型SMARCB1蛋白不仅可与p300相互作用促进H3K27ac修饰^[52],还可促进经典BRG/BRM相关因子复合物(canonical Brg/Brahma-associated factors, cBAF)的稳定性,维持基因组中抑癌功能增强子的活性,进而抑制横纹肌肿瘤的发生^[53]。然而,含ARID结构域的1A(AT-rich interaction domain 1A, ARID1A)基因在乳腺癌中的突变率仅为5%。野生型ARID1A能在ER结合的潜在增强子处富集,通过募集组蛋白去乙酰化酶1(histone deacetylase 1, HDAC1)发挥转录抑制作用。在ARID1A基因发生失活突变后,HDAC1不再结合在增强子区域,使该区域BRD4结合增加,乙酰化修饰增强,促进肿瘤细胞生长^[54]。有别于SMARCB1和ARID1A的作用机制,SMARCE1基因在透明细胞脑膜瘤中的失活

突变,能够降低全基因组中远端增强子 cBAF 结合率和 DNA 可及性,产生脑膜瘤特征性的转录图谱,促进肿瘤进展^[55]。另外,SWI/SNF 家族成员催化亚基染色质肌动蛋白依赖性调节因子 4(SWI/SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin subfamily A member 4, SMARCA4) 的异常高表达促进 PAX3-FOXO1 融合阳性横纹肌肉瘤恶性进展。SMARCA4 通过促进转录因子 MYCN 与增强子的结合,升高 MYCN 反应性增强子的 H3K27ac 水平,驱动靶基因转录发挥促癌作用^[56]。

CHD 家族成员的基因缺失或异常高表达也会改变增强子的活性,发挥促癌作用。其中,CHD1 基因在约 15% 的前列腺癌患者中缺失。野生型 CHD1 与 AR 在前列腺细胞特异性增强子上共定位。在 CHD1 基因丢失后,全基因组中 AR 结合分布改变,使其更倾向于结合在同源盒蛋白 B13(homeobox B13, HOXB13) 反应性增强子,驱动致癌途径激活相关基因的表达^[57]。CHD8 在前列腺癌细胞中异常高表达,通过与 AR 直接相互作用,在跨膜丝氨酸蛋白酶 2(transmembrane serine protease 2, TMPRSS2) 基因的增强子区域共定位,发挥促癌效应^[58]。在横纹肌肉瘤细胞中异常高表达的 CHD4 蛋白与 PAX3-FOXO1 蛋白协同作用,激活增强子上调癌基因表达^[59]。

5 转录因子异常改变增强子活性

转录因子在调节增强子活性中发挥重要作用。转录因子的突变、表达水平异常以及染色体易位形成融合基因后编码的嵌合转录因子能够通过不同机制,使增强子活性发生异常,甚至形成增强子重塑现象^[60]。

5.1 转录因子突变与增强子活性

转录因子突变可影响其与增强子序列及共转录因子结合的能力,进而改变增强子活性以及基因组增强子重塑。例如,急性髓性白血病中 CCAAT 增强子结合蛋白 α (CCAAT enhancer binding protein alpha, CEBP α) 的突变使其与 DNA 结合能力受损,导致 UL16 结合蛋白 2(UL16 binding protein 2, ULBP2), ULBP5 和 ULBP6 基因的增强子活性下降,使肿瘤细胞逃避自然杀伤细胞介导的细胞裂解^[61]。转录因子 p53 DNA 结合域的突变使之在基因组中的结合分布发生改变,通过招募与增强子形成相关的蛋白,形成新的增强子。在结直肠癌中, R273H 突变型 p53 能够与 p65 直接相互作用并在 p65 反应元件处富集,促进新的增强子形成并响应肿瘤坏死

因子 α 信号。从机制上说,一方面由于突变型 p53 能够与 MLL4 直接相互作用,促进基因组中 p65 结合区域 H3K4me1 修饰^[62]。另一方面,突变型 p53 可与含溴结构域 4(bromodomain containing 4, BRD4) 蛋白直接相互作用,富集 p65 结合区域 H3K27ac 信号^[63]。此外,突变型 p53 可募集 RNAP II 到新的增强子区域转录 eRNA,激活癌基因的转录促进结直肠癌细胞的侵袭^[64]。

5.2 转录因子异常表达与增强子活性

肿瘤细胞中转录因子的异常高表达可改变增强子组蛋白修饰调控增强子活性或者造成增强子重塑。例如,先驱转录因子叉头框蛋白 1(forkhead box A1, FOXA1) 在 ER 阳性乳腺癌中异常高表达,通过与 MLL3 相互作用,使基因组中 ER 结合区域 H3K4me1 修饰增加,形成新的增强子致使转录激活,促进乳腺癌细胞增殖^[65]。HOXA9 异常高表达招募 CEBP α 和 MLL3/MLL4 复合物,通过形成新的增强子促进白血病形成^[66]。p63 的 N 末端亚型 Δ Np63 可通过招募 p300 重塑肺干细胞的增强子,驱动肺腺癌和鳞癌发生^[7]。此外,转录因子异常高表达还能够显著增加增强子与癌基因启动子的相互作用频率,促进肿瘤进展^[16]。

5.3 染色体易位与增强子活性

染色体易位形成融合基因后所编码的嵌合转录因子,可通过获得异常的转录活性调节增强子的活性。例如,正常肌生成早期的转录因子配对盒基因(paired box, PAX) 家族成员和晚期调节因子肌源性因子 4(myogenin, MYOG) 在肌肉发育过程中的表达相互排斥。但是,基于染色体易位形成的融合基因 PAX3-FOXO1,除了转录活性比野生型 PAX3 高 10~100 倍之外,还与 MYOG 等肌源性转录因子在横纹肌肉瘤中同时高表达。二者通过招募 BRD4 蛋白增强 H3K27ac 信号,形成活性增强子,使肌源性转录失调促进肿瘤发生^[67]。

6 研究增强子的方法和常用数据库

基因组中增强子的鉴定和功能研究对探讨其在肿瘤中的作用具有重要意义。根据增强子的研究角度将这些研究手段分为两大类:①增强子及其活性鉴定,这些技术包括染色质免疫共沉淀测序(chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq),核酸酶靶向切割与释放(cleavage under targets and release using, CUT&RUN)以及利用转座酶检测染色质可及性测序(assay for transposase accessible

chromatin with high-throughput sequencing, ATAC-seq) 技术,大规模并行报告基因检测(massively parallel reporter assay, MPRA)和自转录活性调控区域测序(self-transcribing active regulatory region sequencing, STARR-seq),新生 RNA 测序(global nuclear run-on sequencing, GRO-seq)等;②增强子的靶基因鉴定及其功能研究,这些技术包括染色质构象捕获(capturing chromosome conformation, 3C)及其衍生技术,间隔成簇短回文重复序列-核酸酶9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated9, CRISPR-Cas9)和 CRISPR-钝化 Cas9(CRISPR-dead Cas9, CRISPR-dCas9)等。

6.1 分析鉴定增强子及其活性的方法

随着对增强子特征的认识和高通量技术的快速发展,近年来人们主要利用增强子的表观修饰特征,结合二代测序的技术方法对全基因组中潜在增强子进行分析和鉴定。最常用的 ChIP-seq 技术是通过富集增强子特征修饰的组蛋白或转录因子结合的 DNA 序列,再通过测序在全基因组鉴定潜在增强子。2017年,Skene等^[68]优化该技术开发出 CUT&RUN, CUT&RUN 通过微球菌核酸酶进行抗体靶向的特定蛋白质-DNA 酶切和纯化,再测序分析,具有细胞起始量低、实验周期短和信噪比高等优点。此外,利用 ATAC-seq 对染色质开放区域的分析有助于增强子的鉴定。Tn5 转座酶与 Tn5 转座子形成转座复合物,通过切割靶 DNA 序列将 Tn5 转座子插入其中。只有 DNA 与组蛋白结合松散时, Tn5 转座酶才能酶切并完成转座。ATAC-seq 利用这一特点,将改造后携带测序接头的 Tn5 转座酶加入细胞核中, Tn5 转座酶首先在染色质开放区域进行酶切,然后再完成已知测序接头的转座,通过建库测序分析染色质可及性。有研究者使用 ATAC-seq 结合 ChIP-seq 对含有间充质型胃癌的特征性增强子进行全基因组分析^[69]。

除了分析鉴定基因组中的增强子,还可利用 MPRA、STARR-seq 和 GRO-seq 等技术直接分析增强子的活性。经典的 MPRA 技术是先给待测增强子标记特有的条形码序列,再分别将每个增强子克隆到 pGL4.23 载体,对应的条形码序列克隆到荧光素酶基因的 3'UTR,通过 RNA-seq 检测条形码序列的丰度来反映增强子的活性。作为 MPRA 的升级版, STARR-seq 技术以增强子序列本身作为条形码序列,通过自转录及丰度检测来反映增强子活性^[70]。这两种方法均是在外源性环境中批量检测全基因

组具有增强子活性的 DNA 序列,因此无法反映内源性染色质环境的增强子活性。GRO-seq 能够定量活性增强子合成的 eRNA。它通过先冻结细胞核内转录过程,再在体外恢复的方法,使体外合成的新生转录本中含有 NTP 类似物 BrU (bromouridine),通过 BrU 抗体富集后建库测序,分析 RNA 体外合成的位置和丰度。2020年,Wang等^[71]通过分析 GRO-seq 数据,在7种肿瘤细胞系中鉴定了活性增强子。

6.2 增强子的靶基因鉴定及其功能研究

确定增强子的靶基因是探讨增强子生物学功能的重要环节。3C 及其衍生技术为鉴定增强子的靶基因提供了重要手段^[72]。3C 技术的基本原理:用甲醛固定活细胞以稳定 DNA 和蛋白质的相互作用后,先用合适的内切酶消化 DNA,再用连接酶连接,然后通过逆交联使 DNA 与蛋白质分离,提取 DNA,最后在连接位点两侧设置引物进行 PCR 反应,从而定性和定量检测一对一的增强子启动子相互作用^[17]。高通量染色体构象捕获(high-resolution chromosome conformation capture, Hi-C)技术的出现,使得从全基因组水平分析染色质相互作用成为可能。Hi-C 是在 3C 技术的连接步骤中加入生物素标记的寡核苷酸,进行平末端连接, DNA 纯化和超声后,对寡核苷酸进行高通量测序^[73]。

利用 CRISPR-Cas9 技术敲除细胞中某段增强子序列或者通过构建 sgRNA 文库随机敲除基因组中的增强子元件已成为研究增强子功能的重要手段。已有研究利用 CRISPR-Cas9 技术敲除调控癌基因表达的增强子,研究增强子在肿瘤发生中的作用机制^[28]。在 CRISPR-Cas9 基础上发展起来的 CRISPR-dCas9 技术,不仅能直接改变基因组序列,还能在特定位置引入表观修饰。基于 CRISPR/dCas9 技术,人们通过增强子 CRISPR 激活(enhancer CRISPR activation, enCRISPRa)和增强子 CRISPR 抑制(enhancer CRISPR interference, enCRISPRi)系统在体内局部重塑增强子,从而研究增强子的调控功能^[74]。

6.3 研究增强子的常用数据库

近年来数据库的开发和应用也为增强子的研究提供了便利,充分利用相关数据库将大大提高研究效率。研究增强子的常用数据库主要包括: ENCODE 数据库(<https://www.encodeproject.org/>)和 Cistrome 数据库(<http://cistrome.org/db/#/>)^[75],其收录了许多正常组织和肿瘤组织中增强子特征性组蛋白修饰及转录因子的 ChIP-seq 和 ATAC-seq 可视化

数据; EnhancerAtlas 数据库 (<http://www.enhanceratlas.org/>)^[76]能够提供人、小鼠、果蝇等9个物种的增强子注释; HACER 数据库 (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/AE/HACER/index.html>)^[77]可通过整合 GRO-seq 数据分析 eRNA 鉴定活性增强子。此外, RAEdB 数据库 (<http://www.computationalbiology.cn/RAEdB/enhancer.html>)汇集了 MPRA 和 STARR-seq 数据,可用于筛选具有调控活性的增强子。

7 展望

增强子作为增强基因表达的顺式调控元件,其活性异常在恶性肿瘤发生和发展中的重要作用已成为肿瘤研究领域的焦点之一。然而,尽管增强子研究在过去几十年中取得了显著进展,但这一领域仍有很多未知。例如,导致肿瘤基因组中增强子重塑的因素有哪些? 增强子重塑与肿瘤发生发展有何具体联系? 增强子如何特异性地识别靶基因发挥其调控功能? 不同增强子之间如何相互协调,共同调节下游靶基因的表达? 不同肿瘤组织中增强子调控活性异常的分子机制和生物学效应有何共性和特异性? eRNA 转录本蕴藏的生物学功能究竟有哪些? 超级增强子是如何形成的? 未来需要在充分利用大数据和分子生物学技术的基础上,围绕临床相关的增强子异常,利用体内模型开展深入的研究,从而更好地阐述增强子相关的基础理论和临床问题,这将有助于基础研究向临床转化,更好地促进肿瘤治疗和干预。

[参考文献]

- [1] BANERJI J, RUSCONI S, SCHAFFNER W. Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences[J]. *Cell*, 1981, 27(2 Pt 1):299-308
- [2] GILLIES S D, MORRISON S L, OI V T, et al. A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene[J]. *Cell*, 1983, 33(3):717-728
- [3] DAVIS C A, HITZ B C, SLOAN C A, et al. The encyclopedia of DNA elements (ENCODE): data portal update[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1):D794-D801
- [4] SATTERLEE J S, CHADWICK L H, TYSON F L, et al. The NIH Common Fund/Roadmap Epigenomics Program: successes of a comprehensive consortium[J]. *Sci Adv*, 2019, 5(7):eaaw6507
- [5] BRADNER J E, HNISZ D, YOUNG R A. Transcriptional addiction in cancer[J]. *Cell*, 2017, 168(4):629-643
- [6] ADHIKARY S, ROY S, CHACON J, et al. Implications of enhancer transcription and eRNAs in cancer[J]. *Cancer Res*, 2021, 81(16):4174-4182
- [7] NAPOLI M, WU S J, GORE B L, et al. Δ Np63 regulates a common landscape of enhancer associated genes in non-small cell lung cancer[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):614
- [8] LI Q, LV X, HAN C, et al. Enhancer reprogramming promotes the activation of cancer-associated fibroblasts and breast cancer metastasis[J]. *Theranostics*, 2022, 12(17):7491-7508
- [9] FAGNOCCHI L, POLI V, ZIPPO A. Enhancer reprogramming in tumor progression: a new route towards cancer cell plasticity[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(14):2537-2555
- [10] PANIGRAHI A, O' MALLEY B W. Mechanisms of enhancer action: the known and the unknown[J]. *Genome Biol*, 2021, 22(1):108
- [11] BALSALOBRE A, DROUIN J. Pioneer factors as master regulators of the epigenome and cell fate[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(7):449-464
- [12] ZHOU P, ZHANG Y, SETHI I, et al. GATA4 regulates developing endocardium through interaction with ETS1[J]. *Circ Res*, 2022, 131(11):e152-e168
- [13] BARRAL A, DÉJARDIN J. The chromatin signatures of enhancers and their dynamic regulation[J]. *Nucleus*, 2023, 14(1):2160551
- [14] MOHANTA T K, MISHRA A K, AL-HARRASI A. The 3D genome: from structure to function[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21):11585
- [15] LIU N Q, MARESCA M, VAN DEN BRAND T, et al. WAPL maintains a cohesin loading cycle to preserve cell-type-specific distal gene regulation[J]. *Nat Genet*, 2021, 53(1):100-109
- [16] SEE Y X, CHEN K J, FULLWOOD M J. MYC overexpression leads to increased chromatin interactions at super-enhancers and MYC binding sites[J]. *Genome Res*, 2022, 32(4):629-642
- [17] GONG F R, SUN L, WANG Z D, et al. The BCL2 gene is regulated by a special AT-rich sequence binding protein 1-mediated long range chromosomal interaction between the promoter and the distal element located within the 3'-UTR[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(11):4640-4652
- [18] ZELENKA T, KLONIZAKIS A, TSOUKATOU D, et al. The 3D enhancer network of the developing T cell genome is shaped by SATB1[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):6954
- [19] LEE J H, XIONG F, LI W. Enhancer RNAs in cancer: regulation, mechanisms and therapeutic potential[J]. *RNA*

- Biol, 2020, 17(11): 1550-1559
- [20] LI W B, NOTANI D, MA Q, et al. Functional roles of enhancer RNAs for oestrogen-dependent transcriptional activation[J]. *Nature*, 2013, 498(7455): 516-520
- [21] BOSSÉ Y, AMOS C I. A decade of GWAS results in lung cancer[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2018, 27(4): 363-379
- [22] HU Z B, WU C, SHI Y Y, et al. A genome-wide association study identifies two new lung cancer susceptibility loci at 13q12.12 and 22q12.2 in Han Chinese[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(8): 792-796
- [23] XU J F, MO Z N, YE D W, et al. Genome-wide association study in Chinese men identifies two new prostate cancer risk loci at 9q31.2 and 19q13.4[J]. *Nat Genet*, 2012, 44(11): 1231-1235
- [24] WANG X C, CHENG H, YANG Y, et al. The enhancer rare germline variation rs548071605 contributes to lung cancer development[J]. *Hum Mutat*, 2022, 43(2): 200-214
- [25] GUAN W, YANG N, ZUO X, et al. Heritable variants in the chromosome 1q22 locus increase gastric cancer risk via altered chromatin looping and increased UBAP2L expression[J]. *Mol Cancer Res*, 2021, 19(12): 1992-2002
- [26] TIAN P, ZHONG M J, WEI G H. Mechanistic insights into genetic susceptibility to prostate cancer[J]. *Cancer Lett*, 2021, 522: 155-163
- [27] SHAO L P, ZUO X L, YANG Y, et al. The inherited variations of a p53-responsive enhancer in 13q12.12 confer lung cancer risk by attenuating TNFRSF19 expression[J]. *Genome Biol*, 2019, 20(1): 103
- [28] HUA J T, AHMED M, GUO H Y, et al. Risk SNP-mediated promoter-enhancer switching drives prostate cancer through lncRNA PCAT19[J]. *Cell*, 2018, 174(3): 564-575
- [29] GAO P, XIA J H, SIPEKY C, et al. Biology and clinical implications of the 19q13 aggressive prostate cancer susceptibility locus[J]. *Cell*, 2018, 174(3): 576-589
- [30] OLDRIDGE D A, WOOD A C, WEICHERT-LEAHEY N, et al. Genetic predisposition to neuroblastoma mediated by a LMO1 super-enhancer polymorphism[J]. *Nature*, 2015, 528(7582): 418-421
- [31] HNISZ D, WEINTRAUB A S, DAY D S, et al. Activation of proto-oncogenes by disruption of chromosome neighborhoods[J]. *Science*, 2016, 351(6280): 1454-1458
- [32] ZHANG X Y, CHOI P S, FRANCIS J M, et al. Somatic superenhancer duplications and hotspot mutations lead to oncogenic activation of the KLF5 transcription factor[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(1): 108-125
- [33] NORTHCOTT P A, LEE C, ZICHNER T, et al. Enhancer hijacking activates GF11 family oncogenes in medulloblastoma[J]. *Nature*, 2014, 511(7510): 428-434
- [34] MONTEFIORI L E, BENDIG S, GU Z H, et al. Enhancer hijacking drives oncogenic BCL11B expression in lineage-ambiguous stem cell leukemia[J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(11): 2846-2867
- [35] GALA K, LI Q, SINHA A, et al. KMT2C mediates the estrogen dependence of breast cancer through regulation of ER α enhancer function[J]. *Oncogene*, 2018, 37(34): 4692-4710
- [36] LV S, WEN H, SHAN X, et al. Loss of KMT2D induces prostate cancer ROS-mediated DNA damage by suppressing the enhancer activity and DNA binding of antioxidant transcription factor FOXO3[J]. *Epigenetics*, 2019, 14(12): 1194-1208
- [37] MAITITUOHETI M, KEUNG E Z, TANG M, et al. Enhancer reprogramming confers dependence on glycolysis and IGF signaling in KMT2D mutant melanoma[J]. *Cell Rep*, 2020, 33(3): 108293
- [38] GAO S, CHEN S, HAN D, et al. Chromatin binding of FOXA1 is promoted by LSD1-mediated demethylation in prostate cancer[J]. *Nat Genet*, 2020, 52(10): 1011-1017
- [39] GOZDECKA M, MEDURI E, MAZAN M, et al. UTX-mediated enhancer and chromatin remodeling suppresses myeloid leukemogenesis through noncatalytic inverse regulation of ETS and GATA programs[J]. *Nat Genet*, 2018, 50(6): 883-894
- [40] D'OTO A, FANG J, JIN H, et al. KDM6B promotes activation of the oncogenic CDK4/6-pRB-E2F pathway by maintaining enhancer activity in MYCN-amplified neuroblastoma[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 7204
- [41] MAN N, MAS G, KARL D L, et al. p300 suppresses the transition of myelodysplastic syndromes to acute myeloid leukemia[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(19): e138478
- [42] MANSOUR M R, ABRAHAM B J, ANDERS L, et al. An oncogenic super-enhancer formed through somatic mutation of a noncoding intergenic element[J]. *Science*, 2014, 346(6215): 1373-1377
- [43] SAGHAFINIA S, MINA M, RIGGI N, et al. Pan-cancer landscape of aberrant DNA methylation across human tumors[J]. *Cell Rep*, 2018, 25(4): 1066-1080
- [44] 唐思敏, 邓雪婷, 李全朋, 等. 胆管癌的表现遗传学进展[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(9): 1322-1325
- [45] BELL R E, GOLAN T, SHEINBOIM D, et al. Enhancer methylation dynamics contribute to cancer plasticity and patient mortality[J]. *Genome Res*, 2016, 26(5): 601-611
- [46] ARAN D, SABATO S, HELLMAN A. DNA methylation of

- distal regulatory sites characterizes dysregulation of cancer genes[J]. *Genome Biol*, 2013, 14(3):R21
- [47] FLEISCHER T, TEKPLI X, MATHELIER A, et al. DNA methylation at enhancers identifies distinct breast cancer lineages[J]. *Nat Commun*. 2017, 8(1):1379
- [48] YANG L, RODRIGUEZ B, MAYLE A, et al. DNMT3A loss drives enhancer hypomethylation in FLT3-ITD-associated leukemias[J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(6):922–934
- [49] XIONG L, WU F, WU Q, et al. Aberrant enhancer hypomethylation contributes to hepatic carcinogenesis through global transcriptional reprogramming [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):335
- [50] REYES A A, MARCUM R D, HE Y. Structure and function of chromatin remodelers [J]. *J Mol Biol*, 2021, 433(14):166929
- [51] ARNAUD O, LE LOARER F, TIRODE F. BAFfling pathologies: alterations of BAF complexes in cancer [J]. *Cancer Lett*, 2018, 419:266–279
- [52] ALVER B H, KIM K H, LU P, et al. The SWI/SNF chromatin remodelling complex is required for maintenance of lineage specific enhancers [J]. *Nat Commun*, 2017, 8:14648
- [53] NAKAYAMA R T, PULICE J L, VALENCIA A M, et al. SMARCB1 is required for widespread BAF complex-mediated activation of enhancers and bivalent promoters[J]. *Nat Genet*, 2017, 49(11):1613–1623
- [54] NAGARAJAN S, RAO S V, SUTTON J, et al. ARID1A influences HDAC1/BRD4 activity, intrinsic proliferative capacity and breast cancer treatment response [J]. *Nat Genet*, 2020, 52(2):187–197
- [55] ST PIERRE R, COLLINGS C K, SAMÉ GUERRA D D, et al. SMARCE1 deficiency generates a targetable mSWI/SNF dependency in clear cell meningioma[J]. *Nat Genet*, 2022, 54(6):861–873
- [56] LAUBSCHER D, GRYDER B E, SUNKEL B D, et al. BAF complexes drive proliferation and block myogenic differentiation in fusion-positive rhabdomyosarcoma [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):6924
- [57] AUGELLO M A, LIU D, DEONARINE L D, et al. CHD1 loss alters AR binding at lineage-specific enhancers and modulates distinct transcriptional programs to drive prostate tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(4):603–617
- [58] MENON T, YATES J A, BOCHAR D A. Regulation of androgen-responsive transcription by the chromatin remodeling factor CHD8[J]. *Mol Endocrinol*, 2010, 24(6):1165–1174
- [59] MARQUES J G, GRYDER B E, PAVLOVIC B, et al. NuRD subunit CHD4 regulates super-enhancer accessibility in rhabdomyosarcoma and represents a general tumor dependency[J]. *Elife*, 2020, 9:e54993
- [60] YI M, TAN Y, WANG L, et al. TP63 links chromatin remodeling and enhancer reprogramming to epidermal differentiation and squamous cell carcinoma development [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(21):4325–4346
- [61] LIU M, DU M, YU J, et al. CEBPA mutants down-regulate AML cell susceptibility to NK-mediated lysis by disruption of the expression of NKG2D ligands, which can be restored by LSD1 inhibition [J]. *Oncoimmunology*, 2022, 11(1):2016158
- [62] RAHNAMEH H, HONG J, SUN Z, et al. Mutant p53 regulates enhancer-associated H3K4 monomethylation through interactions with the methyltransferase MLL4 [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(34):13234–13246
- [63] RAHNAMEH H, LEE J, SUN Z, et al. RNAs interact with BRD4 to promote enhanced chromatin engagement and transcription activation [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25(8):687–697
- [64] RAHNAMEH H, LU H, DUTTKE S H, et al. Mutant p53 shapes the enhancer landscape of cancer cells in response to chronic immune signaling [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):754
- [65] JOZWIK K M, CHERNUKHIN I, SERANDOUR A A, et al. FOXA1 directs H3K4 monomethylation at enhancers via recruitment of the methyltransferase MLL3 [J]. *Cell Rep*, 2016, 17(10):2715–2723
- [66] SUN Y, ZHOU B, MAO F, et al. HOXA9 reprograms the enhancer landscape to promote leukemogenesis [J]. *Cancer Cell*, 2018, 34(4):643–658
- [67] GRYDER B E, YOHE M E, CHOU H C, et al. PAX3-FOXO1 establishes myogenic super enhancers and confers BET bromodomain vulnerability [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(8):884–899
- [68] SKENE P J, HENIKOFF S. An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites [J]. *Elife*, 2017, 6:e21856
- [69] HO S W T, SHENG T, XING M, et al. Regulatory enhancer profiling of mesenchymal-type gastric cancer reveals subtype-specific epigenomic landscapes and targetable vulnerabilities [J]. *Gut*, 2023, 72(2):226–241
- [70] ARNOLD C D, GERLACH D, STELZER C, et al. Genome-wide quantitative enhancer activity maps identified by STARR-seq [J]. *Science*, 2013, 339(6123):1074–1077
- [71] WANG Y, LI J, LI J, et al. An enhancer-based analysis revealed a new function of androgen receptor in tumor

(下转第1478页)

nerves and arteries of the neck and the top of the thorax [J]. *Edinb Med Surg J*, 1823, 19(77):564-565

[9] MOHAMMED A A, ARIF S H. Two concomitant right nonrecurrent laryngeal nerves encountered during thyroidectomy (type 4 course): reported for the first time [J]. *Ear Nose Throat J*, 2021, 100(9):388-390

[10] WANG T, DIONIGI G, ZHANG D Q, et al. Diagnosis, anatomy, and electromyography profiles of 73 nonrecurrent laryngeal nerves [J]. *Head Neck*, 2018, 40(12):2657-2663

[11] LE V Q, NGO Q D, NGO X Q. Nonrecurrent laryngeal nerve in thyroid surgery: frequency, anatomical variations according to a new classification and surgery consideration [J]. *Head Neck*, 2019, 41(9):2969-2975

[12] KAMANI D, POTENZA A S, CERNEA C R, et al. The nonrecurrent laryngeal nerve: anatomic and electrophysiologic algorithm for reliable identification [J]. *Laryngoscope*, 2015, 125(2):503-508

[收稿日期] 2022-04-15
(责任编辑:蒋莉)

(上接第 1440 页)

cell immune evasion [J]. *Front Genet*, 2020, 11:595550

[72] AKGOL OKSUZ B, YANG L, ABRAHAM S, et al. Systematic evaluation of chromosome conformation capture assays [J]. *Nat Methods*, 2021, 18(9):1046-1055

[73] LAFONTAINE D L, YANG L, DEKKER J, et al. Hi-C 3.0: improved protocol for genome-wide chromosome conformation capture [J]. *Curr Protoc*, 2021, 1(7):e198

[74] LI K, LIU Y, CAO H, et al. Interrogation of enhancer function by enhancer-targeting CRISPR epigenetic editing [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):485

[75] ZHENG R, WAN C, MEI S, et al. Cistrome data browser: expanded datasets and new tools for gene regulatory analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1):D729-D735

[76] GAO T, QIAN J. Enhancer Atlas 2.0: an updated resource with enhancer annotation in 586 tissue/cell types across nine species [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1):D58-D64

[77] WANG J, DAI X, BERRY L D, et al. HACER: an atlas of human active enhancers to interpret regulatory variants [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1):D106-D112

[收稿日期] 2023-05-31
(责任编辑:蒋莉)