

论著·基础研究

赖氨酸乙酰转移酶7的冷冻电镜全长结构分析

郑国培¹, 曹 骏², 沈键锋¹

1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院眼科, 上海 200011; 2. 上海交通大学生命科学技术学院Bio-X研究院, 上海 200030

[摘要] **目的**·利用冷冻电镜技术分析人源性赖氨酸乙酰转移酶7 (lysine acetyltransferase 7, KAT7) 的全长蛋白结构, 获得人源KAT7的轮廓信息。**方法**·使用pGEX-4T1载体和人源KAT7全长基因构建重组蛋白表达质粒pGEX-4T1-GST-KAT7, 在原核蛋白表达体系BL21 (DE3) 中表达KAT7蛋白, 使用GST亲和层析获得GST-KAT7重组蛋白; 在利用TEV蛋白酶去除GST蛋白标签后, 通过HiLoad 16/600 Superdex 75 pg体积排阻色谱进一步分离纯化KAT7蛋白。将获取的蛋白样品利用蛋白质印迹法 (Western blotting) 对KAT7进行鉴定, 使用负染电镜筛选样品并初步观察蛋白形貌; 使用冷冻电镜收集数据, 利用冷冻电镜数据分析软件CryoSparc挑选蛋白颗粒并分析KAT7全长蛋白的空间结构; 通过UCSF Chimera软件将蛋白质数据库 (Protein Data Bank, PDB) 中KAT7的MYST结构域模型 (5GK9)、AlphaFold预测模型与生成的结构模型进行匹配分析。**结果**·利用亲和层析成功纯化人源性KAT7的全长蛋白, 并通过体积排阻色谱获得高纯度的KAT7蛋白; 在通过Western blotting鉴定KAT7后, 利用负染电镜、冷冻电镜及单颗粒重构技术初步解析了KAT7全长蛋白的空间结构, 并通过三维优化处理获得了分辨率为10 Å的初步三维结构模型; KAT7全长蛋白空间结构呈不规则的半环状, 已有的MYST结构域模型 (PDB: 5GK9) 可匹配入KAT7全长模型的C端部分, 调整后的AlphaFold预测模型也可匹配KAT7全长结构模型。**结论**·利用冷冻电镜技术初步分析了人源性KAT7的全长蛋白空间结构模型。

[关键词] 赖氨酸乙酰转移酶; 蛋白质翻译后修饰; 乙酰化; 冷冻电镜技术

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.09.004 **[中图分类号]** Q518.2; R34 **[文献标志码]** A

Structural analysis of full-length lysine acetyltransferase 7 by cryo-electron microscopy

ZHENG Guopei¹, CAO Qin², SHEN Jianfeng¹

1. Department of Ophthalmology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 2. Bio-X Institutes, Key Laboratory for the Genetics of Developmental and Neuropsychiatric Disorders, Ministry of Education, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China

[Abstract] **Objective**·To analyze the full-length protein structure of human-derived lysine acetyltransferase 7 (KAT7) using cryo-electron microscopy (Cryo-EM) and to obtain the profile information of human-derived KAT7. **Methods**·The recombinant protein expression plasmid pGEX-4T1-GST-KAT7 was constructed by using the pGEX-4T1 vector and the full-length gene of human-derived KAT7, and the KAT7 protein was expressed in the prokaryotic protein expression system BL21 (DE3). The GST-KAT7 recombinant protein was obtained by using GST affinity chromatography. After removing the GST protein tag with TEV protease, KAT7 was further isolated and purified by HiLoad 16/600 Superdex 75 pg volume exclusion chromatography. The obtained protein samples were identified by Western blotting, and the samples were screened. The protein morphology was observed under negative-stain electron microscopy, and data were collected by using Cryo-EM. The protein particles were selected and the spatial structure of the full-length KAT7 was analyzed with the Cryo-EM analysis software CryoSparc. The MYST structural domain model (5GK9) in the Protein Data Bank (PDB) and AlphaFold prediction model of KAT7 were matched with the generated structural model by UCSF Chimera software. **Results**·The full-length protein of human-derived KAT7 was successfully purified by affinity chromatography, and high purity KAT7 was obtained by volume exclusion chromatography. After identifying KAT7 by Western blotting, the spatial structure of KAT7 full-length protein was initially resolved by Cryo-EM and single-particle reconstruction techniques, and a preliminary three-dimensional structure model with a resolution of about 10 Å was obtained by three-dimensional optimization. The spatial structure of KAT7 full-length protein was irregular and semi-loop-shaped, and the existing MYST domain model (PDB: 5GK9) can be matched into the C-terminal part of the KAT7 full-length model. The adjusted AlphaFold prediction model can also

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (81972667); 上海交通大学医学院“双百人”项目 (20191817)。

[作者简介] 郑国培 (1996—), 男, 硕士; 电子信箱: zhengguopei@sjtu.edu.cn。

[通信作者] 沈键锋, 电子信箱: jfshen@shsmu.edu.cn。

[Funding Information] General Program of National Natural Science Foundation of China (81972667); “Two-hundred Talents” Program of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (20191817).

[Corresponding Author] SHEN Jianfeng, E-mail: jfshen@shsmu.edu.cn.



match the KAT7 full-length structure model. **Conclusion** · A preliminary analysis of the spatial structure model of full-length protein of human-derived KAT7 is performed by using Cryo-EM.

[Key words] lysine acetyltransferase; post-translational protein modification; acetylation; cryo-electron microscopy

组蛋白乙酰化是一种普遍存在的蛋白质翻译后修饰;当组蛋白乙酰化后,染色质结构和动力学改变,从而影响细胞周期、基因转录、信号转导和细胞代谢等各种细胞生命活动^[1-2]。组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferase, HAT)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)分别对组蛋白添加或去除乙酰化修饰,两者共同调控组蛋白的乙酰化水平^[3-4]。HAT根据不同的结构特点分为4个主要家族:Gcn5/PCAF、MYST、p300/CBP和Rtt109^[5-6]。赖氨酸乙酰转移酶7(lysine acetyltransferase, KAT7)是MYST家族的典型成员;KAT7通常也被称作HBO1、HBOA、MYST2或ZC2HC7,其主要对组蛋白H3和H4进行乙酰化修饰,进而调控基因复制或转录^[7-8]。KAT7具有多种功能,除参与组蛋白乙酰化外,还可以对蛋白质进行丙酰化^[9]和泛素化修饰^[10]。此外,KAT7还具有促进组织特异性基因表达^[11]、促进T细胞发育^[12]、调控细胞衰老^[7]等功能。正常情况下,KAT7介导组蛋白乙酰化,使转录因子结合染色质并调节转录起始^[13],或KAT7复合物占据编码区并在转录延伸中起直接作用^[14]。KAT7也可使复制因子乙酰化,改变DNA复制起始复合物中的蛋白质-蛋白质相互作用,从而影响DNA复制^[15]。目前对于KAT7乙酰转移酶复合物在转录激活或抑制中的确切作用机制尚不清楚,KAT7本身的乙酰转移酶活性调节在基因复制或转录中的影响仍需进一步阐明。

人源性KAT7具有611个氨基酸残基,主要由2个结构域组成:N端结构域包含1个短的锌指DNA结合域,它主要与MCM2(minichromosome maintenance complex component 2)和ORC1(origin recognition complex subunit 1)相互作用;C端为MYST乙酰基转移酶结构域,主要负责结合乙酰辅酶A并催化对应的乙酰化反应^[16]。MYST结构域是MYST家族共有的乙酰转移酶结构域,其在多种HAT蛋白如MYST1(MOF/KAT8)、MYST2(HBO1/KAT7)和MYST3(MoZ/KAT6A)中高度保守^[17]。HAT通常与支架蛋白和其他辅助蛋白相互作用,形成HAT复合物并发挥功能^[18]。已经鉴定的KAT7复合物主要由辅助蛋白

MEAF6(MYST/esa1 associated factor 6)、ING4(inhibitor of growth family member 4)或ING5(inhibitor of growth family member 5)以及2种与染色质结合的支架蛋白JADE(jade family PHD finger)和BRPF(bromodomain and PHD finger)组成^[19]。支架蛋白是KAT7和辅助蛋白的连接点,其相互作用可以调节HAT复合物的底物特异性和活性;KAT7通过与不同的支架蛋白结合形成多种HAT复合物,调控不同组蛋白的乙酰化。例如KAT7-JADE复合物可以使染色质中的组蛋白H3和H4乙酰化,但对H4更有特异性,而KAT7-BRPF复合物则更倾向于乙酰化组蛋白H3^[20-21]。

目前已有多项晶体结构研究^[16,22-23]阐明了KAT7的MYST结构域,但KAT7的全长蛋白结构仍未被解析。研究^[24]表明,全长KAT7的乙酰化活性低于单独的MYST结构域,说明KAT7的N端结构域可能对KAT7的活性具有调节功能。KAT7具有乙酰化酶活性,其自身也可被乙酰化修饰,如KAT7的Lys199、Lys277和Lys432等位点已被证实可发生乙酰化修饰,并与转录调节功能有关^[25]。目前仍不清楚哪些乙酰转移酶可使KAT7发生乙酰化,KAT7的乙酰化修饰也可能是其自身的内在调节,进而导致KAT7空间结构变化并影响酶活性^[26]。KAT7的N端结构域与MYST结构域的相互作用可能阻碍了其乙酰转移酶活性,而乙酰化、磷酸化、辅因子结合等蛋白质构象变化会使N端结构域和MYST结构域分离并释放MYST结构域的活性。因此,解析全长KAT7的分子结构将有利于揭示KAT7活性调节的机制。

多项研究^[9-12]表明,KAT7在DNA复制、基因转录、免疫调节、癌症与衰老等方面具有重要功能。然而,关于KAT7乙酰转移酶激活的机制及其底物特异性,尤其是N端结构域在KAT7酶活性调节中的作用还需要进一步的研究。KAT7的全长结构对于破译KAT7的激活机制、N端与MYST结构域之间的相互作用、辅因子的结合以及基于结构的药物设计至关重要。通过解析KAT7的全长结构,有助于扩展人们对KAT7功能调控的认知,并对药物研发与疾病治疗具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂与仪器 DNA聚合酶、限制性核酸内切酶、DNA连接酶、三羧乙基磷、Tris碱(Thermo Fisher Scientific, 美国), 盐酸(Adamas, 中国), 氯化钠、十二烷基硫酸钠、二硫苏糖醇、无水乙醇、异丙醇、LB液体培养基、LB固体培养基、磷酸缓冲盐溶液、GST预装色谱柱(生工生物工程上海有限公司), HiLoad 16/600 Superdex 75 pg层析柱(Cytiva, 美国), 鼠源抗KAT7单克隆抗体(Proteintech, 美国), 质粒抽提试剂盒(南京诺唯赞医疗科技有限公司), 乙酸双氧铀、碳膜铜网(北京中镜科仪技术有限公司)。微量分光光度计(Implen, 德国), 120 kV透射电镜(型号Talos L120C G2)、200 kV冷冻透射电镜(型号Glacios)、300 kV冷冻透射电镜(型号FEI Titan Krios G3i)均来自Thermo Fisher Scientific(美国)。

1.1.2 菌株与载体 pGEX-4T1质粒来自北京擎科生物科技有限公司, 大肠埃希菌DH5 α 菌种和BL21(DE3)菌种来自生工生物工程上海有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 引物合成和DNA序列测定 实验所用引物均由北京六合华大基因科技有限公司合成, DNA序列测定由上海铂尚生物技术有限公司完成。

1.2.2 质粒构建 利用PCR从人宫颈癌细胞系(HeLa)的cDNA文库中获得人源性KAT7全长序列(氨基酸残基: 1~611)。利用双酶切方法将基因插入含有GST蛋白标签的pGEX-4T1载体中, 获得pGEX-4T1-GST-KAT7重组蛋白表达质粒; 使用DH5 α 菌种扩增纯化质粒, 并通过测序确认序列无误。

1.2.3 蛋白质表达 将pGEX-4T1-GST-KAT7重组蛋白表达质粒转化入BL21(DE3)菌种, 并将菌种涂布到含氨苄青霉素抗性的LB平板上, 于37 $^{\circ}$ C培养12 h。挑取单克隆加入10 mL含氨苄青霉素抗性的LB液体培养基进行菌体扩增, 于37 $^{\circ}$ C、220 r/min培养12 h, 再将菌液加入1 L相同培养基中继续培养, 直到在600 nm波长处的吸光度值达到0.6~0.8。将培养温度降低至16 $^{\circ}$ C, 并在培养基中加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG), 180 r/min培养12 h, 培养完毕后在4 $^{\circ}$ C下通过离心收集菌体。同时表达仅含GST

蛋白标签的pGEX-4T1作为对照。

1.2.4 KAT7蛋白质纯化 按如下条件配制平衡缓冲液: 20 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L三羧乙基磷(tris 2-carboxyethyl phosphine, TCEP), pH 7.4。将收集的菌体在平衡缓冲液中进行超声破碎。于4 $^{\circ}$ C、17 000 \times g下离心30 min并收集上清液, 在GST亲和层析色谱柱上用含20 mmol/L谷胱甘肽的平衡缓冲液进行纯化。用10%(φ)丙烯酰胺凝胶通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对馏分进行检测, 电泳结束后进行考马斯亮蓝染色, 并使用KAT7抗体进行蛋白印迹法(Western blotting)分析。在蛋白样品中加入烟草蚀刻病毒(tobacco etch virus, TEV)蛋白酶切除GST蛋白标签, 使用体积排阻色谱HiLoad 16/600 Superdex 75 pg对蛋白样品进一步纯化并收集峰值样品。利用Western blotting检验蛋白纯度, 使用截留相对分子质量为100 000的浓缩管将蛋白浓缩后于液氮中冻存。

1.2.5 电镜样品制备 将纯化后的KAT7全长蛋白溶液使用PBS分别稀释至0.2 mg/mL、2 mg/mL, 并置于冰上备用。使用辉光放电仪对蛋白载网(碳膜铜网)进行亲水处理。吸取浓度为0.2 mg/mL的蛋白样品2.6 μ L悬空滴加到铜网上, 静置3 min后用滤纸从铜网边缘吸除多余样品。吸取3.3 μ L乙酸铀染液滴加到铜网上, 并用滤纸吸除多余染液, 重复此操作1次。将铜网静置5 min, 使铜网液体蒸发完全。将负染完成的蛋白铜网样品于常温干燥储存。吸取浓度为2 mg/mL的蛋白样品2.6 μ L, 在冷冻制样系统中使用液态乙烷进行冷冻电镜蛋白样品制备。将制作完成的样品于液氮中冷冻保存。

1.2.6 数据收集与模型构建 使用120 kV透射电镜观察蛋白铜网样品, 并确认蛋白颗粒体积与形貌。通过200 kV冷冻透射电镜观察蛋白形貌, 并挑选分散度和均一性适宜的样品进行数据收集。使用300 kV冷冻透射电镜进行蛋白收集, 相关参数为: 像素尺寸=0.525 \AA /像素, 电子剂量=40 e/ \AA^2 , 曝光时间=5.5 s。进行24 h数据收集, 共获得3 336张蛋白冷冻电镜图像。

1.2.7 蛋白结构分析 使用冷冻电镜数据处理软件CryoSparc进行图像处理并生成相应的三维结构。用傅里叶空间中不同分辨率壳层中2个独立的计算结构的相关性估计三维结构的分辨率; 通常将获得的空间分辨率定义为傅里叶壳层关联函数(Fourier shell correlation, FSC)=0.143时的空间频率的倒数。

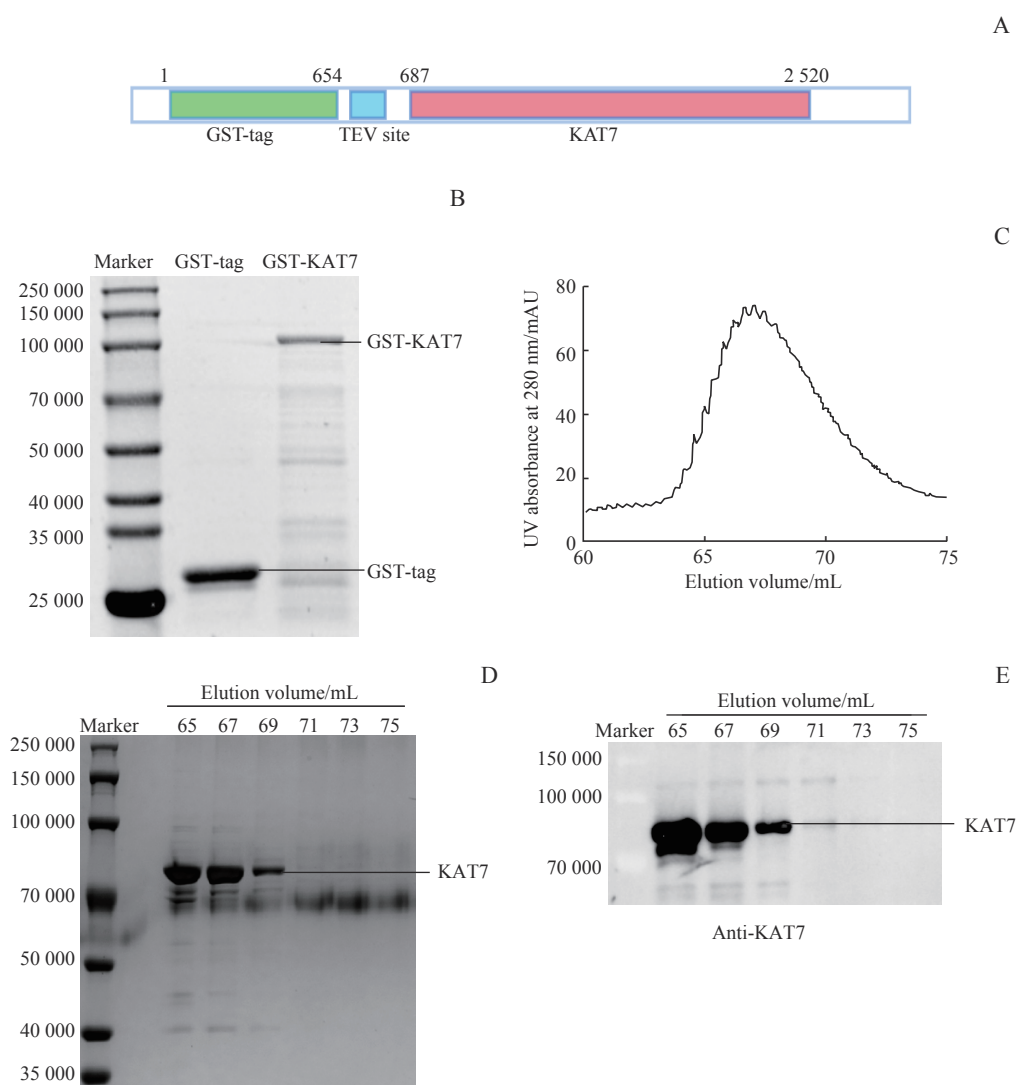
使用UCSF Chimera软件将KAT7模型与蛋白质数据库 (Protein Data Bank, PDB) 中的KAT7蛋白C端MYST结构域模型5GK9以及人工智能系统AlphaFold预测模型进行匹配分析。

2 结果

2.1 KAT7的表达与纯化

通过查阅资料和实验检验, 最终决定使用携带GST蛋白标签的pGEX-4T1质粒构建人源性全长

KAT7的重组蛋白表达质粒 (图1A)。将pGEX-4T1-GST-KAT7转化入大肠埃希菌蛋白表达体系BL21 (DE3) 中进行KAT7蛋白表达, 使用GST亲和层析初步纯化携带GST标签的KAT7蛋白, 将纯化得到的蛋白通过SDS-PAGE分离及考马斯亮蓝染色进行鉴定, 目的条带与GST-KAT7 (相对分子质量约100 000) 位置相符 (图1B)。获得纯度较高的GST-KAT7后, 使用TEV蛋白酶切除GST蛋白标签, 再次通过体积排阻色谱法获得纯度较高的KAT7蛋白 (图1C), 蛋白出峰位置为65~70 mL。该位置介于相



Note: A. KAT7 recombinant protein expression plasmid construction. GST-KAT7 recombinant protein expression plasmid containing GST protein tag with TEV protease restriction site was constructed by using pGEX-4T1 plasmid. B. Expression and purification of GST-KAT7 protein. The recombinant protein GST-KAT7 was expressed by *Escherichia coli*. BL21 (DE3), and the protein was purified by using GST affinity chromatography, while expressing the GST tag alone was taken as a negative control. C. Purification of KAT7 protein using volume exclusion chromatography. The KAT7 protein after excision of the GST tag was purified by using volume exclusion chromatography HiLoad 16/600 Superdex 75 pg, and peak samples were collected. D. KAT7 samples were separated by SDS-PAGE and determined by Coomassie brilliant blue staining, and the gels were photographed by using visualizer. E. Western blotting assay was performed on KAT7 samples to determine the purity and specificity.

图1 KAT7的表达与纯化

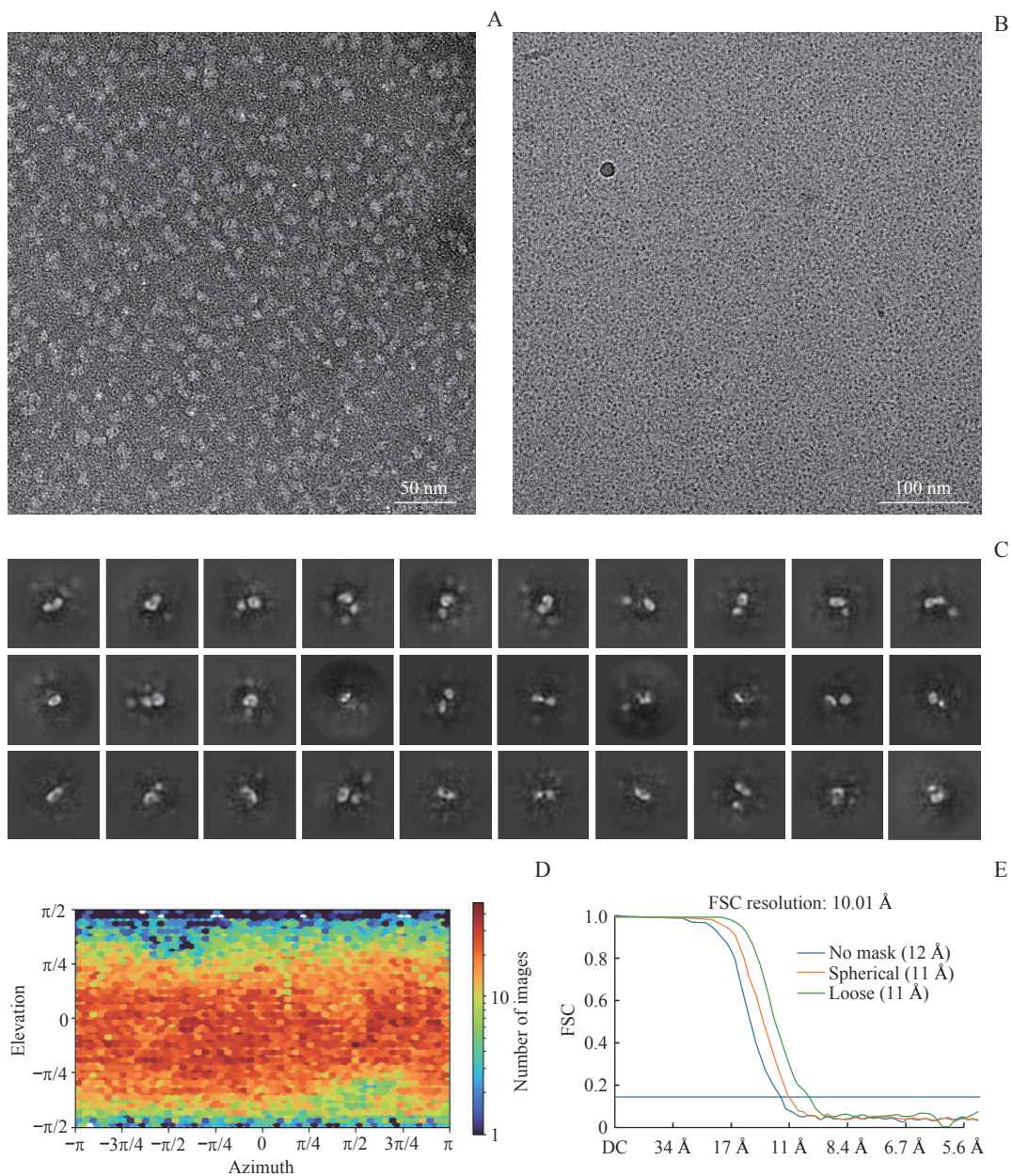
Fig 1 Expression and purification of KAT7

对分子质量 44 000 与 158 000 的球状蛋白之间, 与 KAT7 蛋白的预测大小 (约 80 000) 相符。对收集的蛋白样品进行 SDS-PAGE 分离及考马斯亮蓝染色 (图 1D), 并使用 KAT7 抗体进行 Western blotting 检测 (图 1E), 证实目的条带为 KAT7 全长蛋白。

2.2 KAT7 的电镜数据收集与三维模型构建

在获得纯度较高的 KAT7 全长蛋白后, 使用透射电镜筛选并使用冷冻电镜技术及单颗粒分析获得

KAT7 的三维结构模型。对碳膜铜网进行亲水化处理, 使 KAT7 蛋白吸附到碳膜表面, 并使用乙酸铀进行染色。通过 120 kV 透射电镜可观察到 KAT7 蛋白颗粒的分散度较好, 但均一性较差, 颗粒直径为 7~10 nm (图 2A), 略大于 KAT7 的预期体积。确认 KAT7 全长蛋白的透射电镜形貌不佳后, 通过液态乙烷进行蛋白冷冻制样, 并使用 200 kV 冷冻电镜观察 KAT7, 可见 KAT7 在冷冻状态下直径为 4~6 nm, 分散度与均一性比透射电镜更佳, 并与预期体积相符



Note: A. The representative negative-staining electron micrograph image of KAT7. B. The representative cryo-electron microscopy micrograph image of KAT7. C. Representative two-dimensional class averages obtained from electron microscopy particles of KAT7. D. Angular distributions of particles for the final reconstruction of KAT7. E. The FSC curves corresponding to the KAT7 three-dimensional structural model. The DC term is 0 Hz and is equivalent to the average of all the samples in the window.

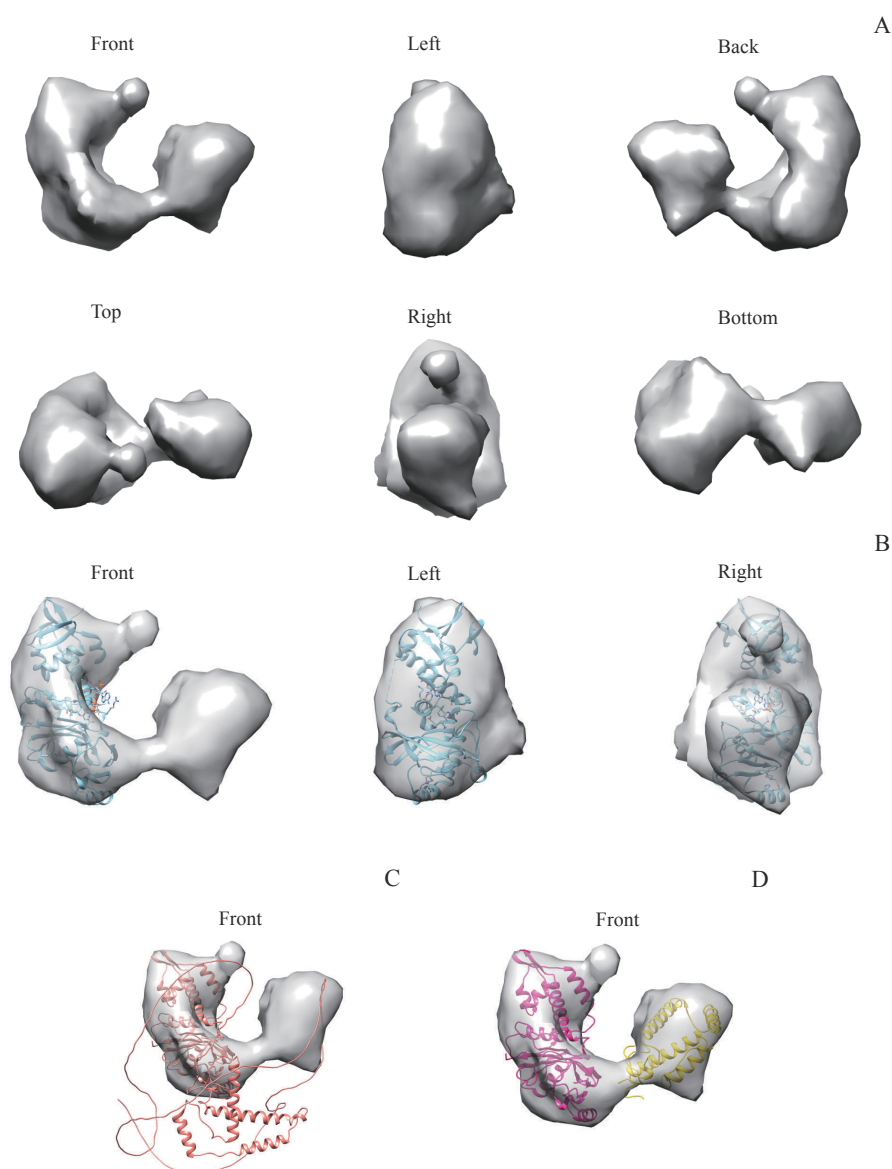
图2 KAT7的冷冻电镜分析

Fig 2 Cryo-electron microscopy analysis of KAT7

(图2B)。进一步使用300 kV冷冻电镜进行蛋白图像数据收集,共收集3 336张蛋白图像;使用CryoSparc软件对收集到的数据进行二维分类和三维重建分析。在二维分类下,KAT7全长蛋白的结构特征较为明显,基本表现为两球相连的C形(图2C)。通过挑选颗粒使三维重构的颗粒数据在空间各向上分布均匀(图2D),经过三维重建与进一步优化,最终获得分辨率约为10 Å的KAT7全长蛋白三维结构模型(图2E)。

2.3 KAT7全长结构的初步分析

对生成的KAT7全长结构模型进行分析,KAT7蛋白的大小约为70 Å×60 Å×40 Å,整体表现为C型结构,连接处较细而两端较粗(图3A)。通过UCSF Chimera软件将KAT7模型与PDB数据库中的KAT7蛋白C端MYST结构域模型5GK9进行匹配,可以看到5GK9与KAT7全长模型局部形状与大小均一致(图3B)。再将KAT7模型与AlphaFold预测模型相匹配,可见两者的C端部分结构相符,而N端部分无法匹配,同时预测模型N端的无序结构无法在全长模型



Note: A. Surface view of the electron micrograph density map of KAT7 shown in six orthogonal views. The three-dimensional model size of KAT7 is denoted on the left. B. The crystal structure of MYST motif (5GK9) was docked into corresponding mass of KAT7 shown in three orthogonal views. C. The AlphaFold prediction structure of KAT7 was docked into full-length KAT7 model. D. The N-terminal structural domain (amino acid residues 183–335, yellow) and MYST domain (amino acid residues 336–611, red) of the AlphaFold prediction model were docked to the full-length KAT7 model separately.

图3 KAT7全长结构分析

Fig 3 Full-length KAT7 structural analysis

中观察到(图3C)。去除AlphaFold预测模型N端的无序结构(氨基酸残基1~182),同时将N端结构域(氨基酸残基183~335)、C端MYST结构域(氨基酸残基336~611)分别与KAT7模型进行匹配,可以观察到AlphaFold预测模型与KAT7全长模型成功匹配(图3D)。通过将已有的模型和预测模型对KAT7全长模型进行匹配,可以发现KAT7全长蛋白的C端MYST域结构稳定,N端的无序结构在冷冻样品状态下无法被观测到。而全长KAT7的N端结构覆盖了MYST域与BRPF等辅助蛋白的结合位点,这可能与全长KAT7酶活性低于单独MYST域酶活性有关。

3 讨论

作为组蛋白乙酰转移酶MYST家族的典型成员,KAT7在细胞周期与基因转录等方面发挥重要作用,在表观遗传学及肿瘤学领域受到的关注日益增加^[7-8]。KAT7的C端MYST域已有多项蛋白结构数据^[16,22-23],但目前仍缺少对其全长蛋白结构的解析。初步分析KAT7的全长蛋白结构,对于揭示KAT7自身酶活性调节机制与基于结构的药物设计、研究KAT7对DNA复制及基因转录的具体调节机制具有重要意义。

KAT7主要对组蛋白H3、H4进行乙酰化修饰,并调控DNA复制和基因转录,同时还在蛋白质泛素化、免疫调节、细胞发育等过程中发挥多种功能^[9-12]。KAT7乙酰转移酶复合体可以在DNA复制和转录激活/抑制中发挥重要作用,但KAT7发挥不同作用的具体机制,尤其是自身酶活性的调节机制仍不清楚。研究^[24]表明,单独的MYST结构域比KAT7全长蛋白的乙酰转移酶活性更高,这提示KAT7的N端部分可能对其酶活性具有抑制作用;但由于KAT7全长蛋白的结构仍然缺失,蛋白结构变化对KAT7自身酶活性的调节机制难以阐明。既往的KAT7蛋白结构研究^[16,22-23]均为MYST结构域的晶体解析,这可能是由于KAT7具有无序结构及柔性连接,难以通过晶体学进行结构解析,因此我们试图利用近年来逐渐成熟的冷冻电镜技术进行KAT7的全长蛋白结构分析。通过300 kV冷冻电镜收集数

据后,利用CryoSparc软件进行单颗粒三维重构,初步获得了KAT7全长蛋白的结构模型。根据初步的结果分析,KAT7整体表现为C型结构,其N端和C端部分结构膨大,而两部分的连接处结构较细;N端有部分无序结构无法显示。通过将已有的MYST结构域(PDB: 5GK9)和AlphaFold预测结构与KAT7全长模型进行匹配,可以发现MYST域与KAT7全长模型的C端匹配,而N端结构域遮盖了MYST域,这可能阻碍了KAT7与其他辅助蛋白的结合,并使KAT7全长蛋白酶活性低于单独的MYST结构域酶活性^[24]。在后续的研究中,可以通过纯化KAT7截短体蛋白或添加JADE或BRPF等辅助蛋白的方式检验KAT7在不同条件下的酶活性,进一步分析KAT7 N端所发挥的具体功能以及KAT7本身结构变化对酶活性的影响。

KAT7本身相对分子质量较小,且空间结构具有一定的可变性,导致冷冻电镜分析的颗粒挑选等步骤较为困难,可能会丢失部分蛋白结构信息。因此本研究仅为KAT7的初步结构模型,精确的原子结构模型仍有待解析。此外,KAT7的单体结构可能与细胞中发挥作用的KAT7复合体结构不同,应进一步研究KAT7在不同情况下的具体结构变化。后续的研究可通过增加冷冻电镜数据量的方式提高结构的分辨率,也可使用蛋白交联剂稳定KAT7与其结合蛋白、特异性抗体的复合体结构,在提高颗粒均一性的基础上再进行结构分析。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

作者贡献/Authors' Contributions

沈键锋设计并规划了本课题;曹昶指导了本课题的研究;郑国培完成了所有实验及论文写作。所有作者均阅读并同意了稿件的提交。

SHEN Jianfeng designed and planned this study; CAO Qin directed this study; ZHENG Guopei completed all experiments and wrote the paper. All authors have read and agreed to the submission of the manuscript.

- Received: 2023-02-26
- Accepted: 2023-04-10
- Published online: 2023-09-28

参·考·文·献

- [1] SUGANUMA T, WORKMAN J L. Signals and combinatorial functions of histone modifications[J]. *Annu Rev Biochem*, 2011, 80: 473-499.
- [2] KIM M S, CHO H I, PARK S H, et al. The histone acetyltransferase *Myst2* regulates *Nanog* expression, and is involved in maintaining pluripotency and self-renewal of embryonic stem cells[J]. *FEBS Lett*, 2015, 589(8): 941-950.
- [3] BOBDE R C, KUMAR A, VASUDEVAN D. Plant-specific HDT family histone deacetylases are nucleoplasmic[J]. *Plant Cell*, 2022, 34(12): 4760-4777.
- [4] WU Q S, HUANG Q Y, GUAN H L, et al. Comprehensive genome-wide analysis of histone acetylation genes in roses and expression analyses in response to heat stress[J]. *Genes*, 2022, 13(6): 980.
- [5] MARMORSTEIN R, ZHOU M M. Writers and readers of histone acetylation: structure, mechanism, and inhibition[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6(7): a018762.
- [6] XING G F, JIN M S, QU R F, et al. Genome-wide investigation of histone acetyltransferase gene family and its responses to biotic and abiotic stress in foxtail millet (*Setaria italica* [L.] Beauv)[J]. *BMC Plant Biol*, 2022, 22(1): 292.
- [7] WANG W, ZHENG Y X, SUN S H, et al. A genome-wide CRISPR-based screen identifies *KAT7* as a driver of cellular senescence[J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(575): eabd2655.
- [8] HEINLEIN M, GANDOLFO L C, ZHAO K L, et al. The acetyltransferase *KAT7* is required for thymic epithelial cell expansion, expression of *AIRE* target genes, and thymic tolerance[J]. *Sci Immunol*, 2022, 7(67): eabb6032.
- [9] HAN Z, WU H, KIM S, et al. Revealing the protein propionylation activity of the histone acetyltransferase *MOF* (males absent on the first)[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(9): 3410-3420.
- [10] NIIDA H, MATSUNUMA R, HORIGUCHI R, et al. Phosphorylated *HBO1* at UV irradiated sites is essential for nucleotide excision repair[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 16102.
- [11] YAN M S, TURGEON P J, MAN H S J, et al. Histone acetyltransferase 7 (*KAT7*)-dependent intragenic histone acetylation regulates endothelial cell gene regulation[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(12): 4381-4402.
- [12] NEWMAN D M, VOSS A K, THOMAS T, et al. Essential role for the histone acetyltransferase *KAT7* in T cell development, fitness, and survival[J]. *J Leukoc Biol*, 2017, 101(4): 887-892.
- [13] STERNER D E, BERGER S L. Acetylation of histones and transcription-related factors[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64(2): 435-459.
- [14] SAKSOUK N, AVVAKUMOV N, CHAMPAGNE K S, et al. *HBO1* HAT complexes target chromatin throughout gene coding regions via multiple PHD finger interactions with histone H3 tail[J]. *Mol Cell*, 2009, 33(2): 257-265.
- [15] MIOTTO B, STRUHL K. *JNK1* phosphorylation of *Cdt1* inhibits recruitment of *HBO1* histone acetylase and blocks replication licensing in response to stress[J]. *Mol Cell*, 2011, 44(1): 62-71.
- [16] TAO Y, ZHONG C, ZHU J J, et al. Structural and mechanistic insights into regulation of *HBO1* histone acetyltransferase activity by *BRPF2*[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(10): 5707-5719.
- [17] AU Y Z, GU M X, DE BRAEKELEER E, et al. *KAT7* is a genetic vulnerability of acute myeloid leukemias driven by *MLL* rearrangements[J]. *Leukemia*, 2021, 35(4): 1012-1022.
- [18] MCCULLOUGH C E, MARMORSTEIN R. Molecular basis for histone acetyltransferase regulation by binding partners, associated domains, and autoacetylation[J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11(3): 632-642.
- [19] FENG Y P, VLASSIS A, ROQUES C, et al. *BRPF3-HBO1* regulates replication origin activation and histone H3K14 acetylation[J]. *EMBO J*, 2016, 35(2): 176-192.
- [20] YAN K Z, YOU L Y, DEGERNY C, et al. The chromatin regulator *BRPF3* preferentially activates the *HBO1* acetyltransferase but is dispensable for mouse development and survival[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(6): 2647-2663.
- [21] KUEH A J, BERGAMASCO M I, QUAGLIERI A, et al. Stem cell plasticity, acetylation of H3K14, and *de novo* gene activation rely on *KAT7*[J]. *Cell Rep*, 2023, 42(1): 111980.
- [22] MACPHERSON L, ANOKYE J, YEUNG M M, et al. *HBO1* is required for the maintenance of leukaemia stem cells[J]. *Nature*, 2020, 577(7789): 266-270.
- [23] XIAO Y H, LI W J, YANG H, et al. *HBO1* is a versatile histone acetyltransferase critical for promoter histone acetylation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(14): 8037-8059.
- [24] IIZUKA M, SARMENTO O F, SEKIYA T, et al. *Hbo1* links p53-dependent stress signaling to DNA replication licensing[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(1): 140-153.
- [25] XIE C, SHEN H, ZHANG H, et al. Quantitative proteomics analysis reveals alterations of lysine acetylation in mouse testis in response to heat shock and X-ray exposure[J]. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2018, 1866(3): 464-472.
- [26] LAN R F, WANG Q Q. Deciphering structure, function and mechanism of lysine acetyltransferase *HBO1* in protein acetylation, transcription regulation, DNA replication and its oncogenic properties in cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(4): 637-649.

[本文编辑] 崔黎明