

Gata4 转录后蛋白共价修饰

俞立玮 综述 桂永浩 审校

(复旦大学附属儿科医院, 上海 201102)

[摘要] Gata4 是心脏发育重要的转录因子,其转录活性和 DNA 亲和力受转录后蛋白共价修饰的调节,并影响下游目的基因和相关转录因子表达,胚胎干细胞分化,心肌细胞生长和心脏发育。该文总结 Gata4 转录后蛋白共价修饰对其转录活性的影响,寻找其与心脏发育和先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)的关系。结果发现乙酰化、磷酸化、SUMO 化使其转录活性和 DNA 亲和力升高,下游基因表达上升,促进胚胎干细胞分化等呈正性调节;去乙酰化和甲基化下调 Gata4 转录活性,呈负性调节。因此,Gata4 蛋白共价修饰对研究先天性心脏病及其他一些心脏疾病有重要的临床意义。
[中国当代儿科杂志,2012,14(10):800-803]

[关键词] 蛋白共价修饰;心脏发生;先天性心脏病

[中图分类号] R541.1; Q527.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)10-0800-04

Post-transcriptional protein modification of Gata4

YU Li-Wei, GUI Yong-Hao. Children's Hospital of Fudan University, Shanghai 201102, China (Gui Y-H, Email: yhgui@shmu.edu.cn)

Abstract: Gata4 is an important transcription factor in heart development. Gata4 post-transcriptional protein modification regulates transcriptional activity and DNA binding, which in turn affects expression of downstream genes and transcription factors, differentiation of embryonic stem cells and cardiogenesis. This article summarizes the effect of post-transcriptional protein modification on transcriptional activity of Gata4 and the relationship between this effect and congenital heart disease. It was shown that acetylation, phosphorylation and SUMOylation upregulate transcriptional activity, DNA binding, downstream gene expression and embryonic stem cell differentiation. On the other hand, methylation and deacetylation downregulate Gata4 transcriptional activity. Post-transcriptional protein modification of Gata4 is very important in clinical research on congenital and other heart diseases.

[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(10):800-803]

Key words: Protein modification; Cardiogenesis; Congenital heart disease

Gata4 是心脏发育重要的转录因子,是心脏前体细胞最早期标志之一^[1]。Gata4 的转录活性和 DNA 亲和力受转录后蛋白共价修饰的调节,并指导下游目的基因和相关转录因子表达、胚胎干细胞分化、心肌细胞生长和心脏发育,因此对整个心脏发育以及胚胎发育都非常重要,人们对 Gata4 的研究从未间断,而表观遗传学研究的进展使我们对该转录因子的作用机制有了新的认识。

表观遗传主要包括 DNA 共价修饰、蛋白质共价修饰、染色体重塑和非编码 RNA 调控四方面内容。本文总结 Gata4 转录后蛋白共价修饰的四种类型,包括乙酰化、甲基化、磷酸化、SUMO 化,分析蛋白共价修饰改变对 Gata4 的转录活性的影响和各种修饰

之间的相互影响并联系临床分析 Gata 4 蛋白共价修饰与先天性心脏病 (congenital heart disease, CHD) 的关联性。

1 Gata4 的结构及其表达

Gata4 是 Gata 家族的成员之一,其中 Gata5、Gata6 也与心脏发育有关。Gata4 有 6 个外显子,编码 442 个氨基酸。Gata4 有 2 个不同的锌指结构域和 1 个位于 C 端的细胞核定位序列,锌指结构域是 Gata4 与 DNA 结合的区域,细胞核定位序列则引导 Gata4 蛋白进入细胞核发挥调控作用,三者在一起组成 DNA 结合和蛋白质相互作用的结构^[2],也是蛋白共价修饰的区

[收稿日期]2012-04-23;[修回日期]2012-05-29

[项目基金]国家自然科学基金面上项目;批准号:81170147

[作者简介]俞立玮,女,硕士研究生。

域。胚胎早期, Gata4 在心脏发生部位——侧板中胚层表达, 心脏外形和内部分隔基本完成之后, Gata4 在心房心室小梁网、房间隔、室间隔、房室瓣均有表达, 其中室间隔中表达最强, 且表达水平随胚胎发育时间逐步升高。另外, Gata4 作为发育早期的调控因子, 处于调控机制的顶端, Pu 等^[3]发现心脏发育对 Gata4 的浓度非常敏感, 浓度轻微改变就会引起显著的下游信号波动, 在正常情况下能指导心脏发育, 在异常情况下则引起心脏发育畸形。

Gata4 转录因子结合在 DNA 序列上, 通过改变转录活性和 DNA 亲和力, 指导胚胎发育。而蛋白共价修饰就是改变 Gata4 转录活性的一个重要途径, Gata4 的锌指结构和细胞核定位序列则是蛋白修饰的重要区域。蛋白共价修饰后, Gata4 转录活性发生改变, 从而影响干细胞分化、心肌增生、细胞保护、心肌损伤后修复等过程, 蛋白共价修饰是 Gata4 指导心脏正常发育的基础。

2 Gata4 转录后蛋白共价修饰

2.1 乙酰化

Gata4 的乙酰化位点是赖氨酸残基, 在 Gata4 第二个锌指结构处有 4 个赖氨酸残基, 位于 311、318、320 和 322, 均能发生乙酰化^[4]。组蛋白乙酰化酶 (histone acetyltransferases, HATs) 介导乙酰化修饰, p300 是 HATs 的一种, 也是转录因子的辅助激活蛋白; 组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases, HDACs) 介导去乙酰化修饰, 尽管两者是组蛋白酶, 但都可以作用于非组蛋白。

乙酰化的 Gata4 参与胚胎干细胞向心肌细胞分化^[5], 被 p300 乙酰化后, Gata4 与 DNA 的亲和力增加, 表达量随胚胎干细胞向心肌分化而增加, 并呈时间依赖性, 且较未乙酰化有显著的差别。p300 自胚胎 7.5 d 就开始大量表达, p300 纯合型敲除小鼠在胚胎期 9 ~ 11.5 d 死亡, 并有心脏发育缺陷, 说明 Gata4 乙酰化对心脏早期发育非常重要。另外, 用 HDACs 抑制剂 TSA 处理小鼠胚胎干细胞, 由于去乙酰化作用被抑制, Gata4 的乙酰化程度增加, 并发现 Nkx2.5/GFP 阳性细胞为处理前的 3 ~ 6.5 倍^[6]。Nkx2.5 也是心脏发育重要的转录因子, 因此乙酰化修饰加强了 Gata4 与 Nkx2.5 的相互作用^[7], 对心脏发育是必需的。

尽管 Gata4 乙酰化修饰对心脏发育很重要, 但去乙酰化作用的负性调节也是不可或缺的。HDACs 缺乏的小鼠, Gata4 被高度乙酰化, 心肌细胞显著增

生, Gata4 下游目的基因表达也随之上调, 胎鼠围产期就发生死亡^[8]。因此, 乙酰化和去乙酰化修饰的正常水平对心脏发育都很关键。

2.2 磷酸化

苯肾上腺素诱导 Gata4 磷酸化使 Gata4 的转录活性和 DNA 亲和力增加^[9], ERK-RSK 级联信号参与该蛋白共价修饰。RSK2 过量表达导致 Gata4 261 位丝氨酸磷酸化显著增加, 转录活性和 DNA 亲和力也随之上升。磷酸化还加强了 Gata4 与 NKX2.5 和 p300 的相互作用, 是 Gata4 与其他转录因子共同作用的机制之一。实验进一步证明, RSK 抑制剂 SLO101 能抑制 Gata4 261 位丝氨酸的磷酸化, 并出现胎儿心脏基因表达抑制^[9]。

Gata4 105 位丝氨酸通过 ERK1/2 途径磷酸化, Hu 等^[10]发现磷酸化加强了 Gata4 与 Sp1 的亲和力, 与心肌细胞增生和心脏肥厚有关, 但该位点磷酸化修饰不是心脏生成所必需的^[11-12]。另有不少证据表明, ERK1/2 介导的磷酸化能保护心肌细胞免受炎症反应损伤^[13-14], EPO 介导的 Gata4 磷酸化可显著改善缺血再灌注损伤, 也有心肌细胞保护作用^[15]。可见, 两处磷酸化修饰的作用有不同的侧重, 但两种磷酸化存在相互影响, 105 位丝氨酸突变导致 261 位磷酸化程度减弱^[9]。

2.3 SUMO 化

Gata4 的 366 位和 445 位的赖氨酸都能发生 SUMO 化, 当这两处赖氨酸分别更换为精氨酸后, Gata4 的细胞核结合力均下降, 说明这两个 SUMO 化位点具有特异性。研究表明 PIAS1 和 SUMO-1 可诱导 Gata4 SUMO 化^[16-17], 蛋白修饰后其转录活性明显增加, 心脏基因表达上升, 效率较修饰前提高 50 倍。不仅如此, 在 SUMO-1 和/或 PIAS1 存在的情况下, Gata4 能激活多能成纤维细胞的心脏发育基因^[18]。说明 Gata4 的 SUMO 化对细胞分化和心脏形成有作用。另外, Gata4 是 Myocadin 的辅助因子, Myocadin 启动心肌特异基因表达, 比如心脏 α 肌动蛋白, α 肌球蛋白重链的表达^[17]。Myocadin 是一个重要的心脏发育转录因子, 在流出道表达更高^[19], 这同时也是 Gata4 表达较高的区域。Gata4 445 位 SUMO 化后, Myocadin 的活性显著增加, 说明 Gata4 SUMO 化修饰与 Myocadin 有相互影响, 既能直接影响心脏基因表达, 诱导干细胞分化, 也能通过辅助 Myocadin 的表达指导心脏发育。

SUMO 化也有负性调节机制, SUMO 化特异蛋白酶 2 (SUMO-specific protease 2, SENP2) 可下调 Gata4 的 SUMO 化水平^[20]。体外细胞培养显示, SENP2 有

广泛的去 SUMO 化 (de-SUMOylation) 活性。SENP2 将 Pc2/CBX4 去 SUMO 化,防止 SUMO 化的 Pc2/CBX4 堆积,占居 PRC 目的基因的启动子,阻碍 PRC 发挥抑制下游基因表达的作用。在 SENP2 缺乏的小鼠胚胎,Gata4 转录活性下降并出现心脏畸形。

2.4 甲基化

最近研究表明,Gata4 被 PRC2 (polycomb-repressive complex 2) 甲基化后,转录活性被抑制^[21]。甲基化由 PRC2 的催化亚单位 EZH2 介导,EZH2 将 Gata4 299 位赖氨酸甲基化,是心脏发育所必需的。无论在体外或胎儿心脏中,PRC2 将 Gata4 甲基化后,转录活性都被抑制。另外,PRC2 还削弱了 p300 对 Gata4 的乙酰化作用,并且抑制 p300 归巢至核染色质。该实验证实,p300 和 PRC2 与 Gata4 的结合位点并不重叠,不存在竞争性,从而允许 PRC2 对已经发生乙酰化的 Gata4 进行转录活性调节,下调下游目的基因的相关转录因子的表达水平以及指导心脏发育和心肌细胞分化。

3 四种蛋白共价修饰的相互作用

蛋白共价修饰对 Gata4 的调节作用可以分成两个层面。第一,蛋白共价修饰对 Gata4 转录活性的影响:乙酰化、磷酸化、SUMO 化修饰使 Gata4 转录活性和 DNA 亲和力上升^[5, 9, 18];甲基化和去乙酰化使 Gata4 转录活性和 DNA 亲和力下降,起到一个负性调节的作用,但对于心脏发育也是极其重要的^[21]。第二,由于 Gata4 转录活性的改变影响下游基因和其他转录因子表达,指导心脏发育:乙酰化的 Gata4 诱导胚胎干细胞向心肌细胞分化,上调转录因子 Nkx2.5 表达^[5-6];磷酸化的 Gata4 加强与 Nkx2.5 和 p300 的相互作用,还增强了 p300 的乙酰化作用,并抑制心肌细胞凋亡^[9, 12, 18];SUMO 化的 Gata4 诱导成纤维细胞分化及该细胞心脏基因表达^[18];甲基化的 Gata4 抑制 Gata4 下游基因表达,并抑制 p300 的乙酰化作用^[21]。

各蛋白共价修饰之间还存在相互作用,也可以分成两个层面。第一,同一种蛋白共价修饰可有多个修饰位点,双重或多重修饰有相互辅助的作用:Gata4 可以发生双重磷酸化修饰,Gata4 105 位丝氨酸突变后,导致 261 位丝氨酸磷酸化水平下降,因此 105 位磷酸化对 261 位磷酸化起辅助作用^[9];Gata4 还能发生双重 SUMO 化^[17];另外 Gata4 存在 4 个潜在的乙酰化位点,也可能发生多重乙酰化修饰,调节 Gata4 的转录活性。第二,不同蛋白共价修饰间存

在相互协同和拮抗作用:Gata4 磷酸化后能加强 p300 介导的乙酰化作用,两者都能上调 Gata4 的转录活性,表现为协同作用^[9];而 Gata4 甲基化后能直接抑制乙酰化,下调转录活性,表现为拮抗作用^[21]。因此,Gata4 蛋白的共价修饰有一个完整的调节网络。

4 Gata4 蛋白共价修饰的临床意义

CHD 是人类最常见的出生缺陷之一,统计结果显示,存活新生儿中 CHD 的发病率为 19% ~ 75%^[22],是新生儿非感染性死亡的首要因素^[23]。Gata4 是调节心脏发育重要的转录因子,也是心脏前体细胞最早期标志之一,与多种常见的 CHD 有关。

首先,蛋白共价修饰调节 Gata4 的转录活性,指导心脏正常发育。一方面乙酰化等途径是高效上调转录活性的机制,满足胚胎心脏发育需要,另一方面,也存在多种下调机制。很多研究都表明,这些机制对心脏正常发育至关重要。通过查阅文献发现,有不少在目前已知的 Gata4 蛋白修饰位点附近的突变发生 CHD 的报道^[24-26],这些突变导致的蛋白质空间结构改变很可能影响 Gata4 转录后修饰及其转录活性。在 CHD 家系研究中,一些有代表性的突变位点将有助于诊断和预测 CHD 的发生。

其次,Gata4 在侧板中胚层表达,参与诱导心脏发生。实验表明,蛋白修饰介导了 Gata4 参与该过程。当然,蛋白共价修饰还加强了 Gata4 与其他转录因子,例如 NKX2.5 的协同作用。目前已经公认,CHD 是多基因型多表型的疾病,单基因致病的理论已经不足以解释 CHD 的病因。一些研究着力分析几个重要的转录因子,如 Gata4、Nkx2.5、Mef2c、Srf 等构成的转录因子网络在心脏发育中的作用^[27]。揭示转录因子间的相互作用将是 CHD 发病机制研究方向之一。

最后,蛋白修饰后的 Gata4 参与一些保护机制^[13-15],防止细胞凋亡、损伤修复等。Gata4 蛋白修饰主要涉及抗心肌细胞凋亡、代偿性心肌肥厚和缺血再灌注损伤修复等,为某些疾病的预防和治疗提供可参考的靶点。

综上所述,本文概括了 Gata4 转录后蛋白共价修饰的 4 种类型,分别阐述了其对 Gata4 转录活性的影响及其作用机制。联系了不同蛋白共价修饰之间的关系,以及它们如何调节 Gata4 的转录活性,总结了 Gata4 蛋白共价修饰的临床意义,并为更好地了解 Gata4 转录后蛋白共价修饰及其与 CHD 的关系提供了参考。

[参 考 文 献]

- [1] 陈名武, 刘唐威, 庞玉生. 转录因子 GATA-4 在心血管系统中作用的研究进展[J]. 中华心血管病杂志, 2008, 38(1): 85-87.
- [2] Molkentin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(50): 38949-38952.
- [3] Pu WT, Ishiwata T, Juraszek AL, Ma Q, Izumo S. GATA4 is a dosage-sensitive regulator of cardiac morphogenesis[J]. *Dev Biol*, 2004, 275(1): 235-244.
- [4] Takaya T, Kawamura T, Morimoto T, Ono K, Kita T, Shimatsu A, et al. Identification of p300-targeted acetylated residues in GATA4 during hypertrophic responses in cardiac myocytes[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(15): 9828-9835.
- [5] Kawamura T, Ono K, Morimoto T, Wada H, Hirai M, Hidaka K, et al. Acetylation of GATA-4 is involved in the differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(20): 19682-19688.
- [6] Kaichi S, Takaya T, Morimoto T, Sunagawa Y, Kawamura T, Ono K, et al. Cyclin-dependent kinase 9 forms a complex with GATA4 and is involved in the differentiation of mouse ES cells into cardiomyocytes[J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(1): 248-254.
- [7] Sun H, Yang X, Zhu J, Lv T, Chen Y, Chen G, et al. Inhibition of p300-HAT results in a reduced histone acetylation and down-regulation of gene expression in cardiac myocytes[J]. *Life Sci*, 2010, 87(23-26): 707-714.
- [8] Trivedi CM, Zhu W, Wang Q, Jia C, Kee HJ, Li L, et al. Hox and Hdac2 interact to modulate Gata4 acetylation and embryonic cardiac myocyte proliferation[J]. *Dev Cell*, 2010, 19(3): 450-459.
- [9] Li T, Liu Z, Hu X, Ma K, Zhou C. Involvement of ERK-RSK cascade in phenylephrine-induced phosphorylation of GATA4[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1823(2): 582-592.
- [10] Hu X, Li T, Zhang C, Liu Y, Xu M, Wang W, et al. GATA4 regulates ANF expression synergistically with Sp1 in a cardiac hypertrophy model[J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(9): 1865-1877.
- [11] Gallagher JM, Komati H, Roy E, Nemer M, Latinkic BV. Dissociation of cardiogenic and postnatal myocardial activities of GATA4[J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(12): 2214-2223.
- [12] Kitta K, Day RM, Kim Y, Torregroza I, Evans T, Suzuki YJ. Hepatocyte growth factor induces GATA-4 phosphorylation and cell survival in cardiac muscle cells[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(7): 4705-4712.
- [13] Kehat I, Molkentin JD. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling in cardiac hypertrophy[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1188: 96-102.
- [14] Muslin AJ. MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2008, 115(7): 203-218.
- [15] Shan X, Xu X, Cao B, Wang Y, Guo L, Zhu Q, et al. Transcription factor GATA-4 is involved in erythropoietin-induced cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Int J Cardiol*, 2009, 134(3): 384-392.
- [16] Belaguli NS, Zhang M, Garcia AH, Berger DH. PIAS1 is a GATA4 SUMO ligase that regulates GATA4-dependent intestinal promoters independent of SUMO ligase activity and GATA4 sumoylation[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35717.
- [17] Wang J, Li A, Wang Z, Feng X, Olson EN, Schwartz RJ. Myocardium sumoylation transactivates cardiogenic genes in pluripotent 10T1/2 fibroblasts[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(2): 622-632.
- [18] Wang J, Feng XH, Schwartz RJ. SUMO-1 modification activated GATA4-dependent cardiogenic gene activity[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 49091-49098.
- [19] Chen JF, Wang S, Wu Q, Cao D, Nguyen T, Chen Y, et al. Myocardium marks the earliest cardiac gene expression and plays an important role in heart development[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2008, 291(10): 1200-1211.
- [20] Kang X, Qi Y, Zuo Y, Wang Q, Zou Y, Schwartz RJ, et al. SUMO-specific protease 2 is essential for suppression of polycomb group protein-mediated gene silencing during embryonic development[J]. *Mol Cell*, 2010, 38(2): 191-201.
- [21] He A, Shen X, Ma Q, Cao J, Von Gise A, Zhou P, et al. PRC2 directly methylates GATA4 and represses its transcriptional activity[J]. *Genes Dev*, 2012, 26(1): 37-42.
- [22] Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease[J]. *Nature*, 2008, 451(7181): 943-948.
- [23] Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39(12): 1890-1900.
- [24] Chen Y, Han ZQ, Yan WD, Tang CZ, Xie JY, Chen H, et al. A novel mutation in GATA4 gene associated with dominant inherited familial atrial septal defect[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2010, 140(3): 684-687.
- [25] Granados-Riveron JT, Pope M, Bu Lock FA, Thornborough C, Eason J, Setchfield K, et al. Combined mutation screening of NKX2-5, GATA4, and TBX5 in congenital heart disease: multiple heterozygosity and novel mutations[J]. *Congenit Heart Dis*, 2012, 7(2): 151-159.
- [26] Zhang W, Li X, Shen A, Jiao W, Guan X, Li Z. GATA4 mutations in 486 Chinese patients with congenital heart disease[J]. *Eur J Med Genet*, 2008, 51(6): 527-535.
- [27] Schlesinger J, Schueler M, Grunert M, Fischer JJ, Zhang Q, Krueger T, et al. The cardiac transcription network modulated by Gata4, Mef2a, Nkx2.5, Srf, histone modifications, and microRNAs[J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(2): e1001313.

(本文编辑: 邓芳明)