

Stable oncogenic silencing *in vivo* by programmable and targeted *de novo* DNA methylation in breast cancer

---

第四组

# 目录

## CONTENTS

---



### Introduction

选题背景  
研究意义



### RESULTS

研究结果说明



### DISCUSSION

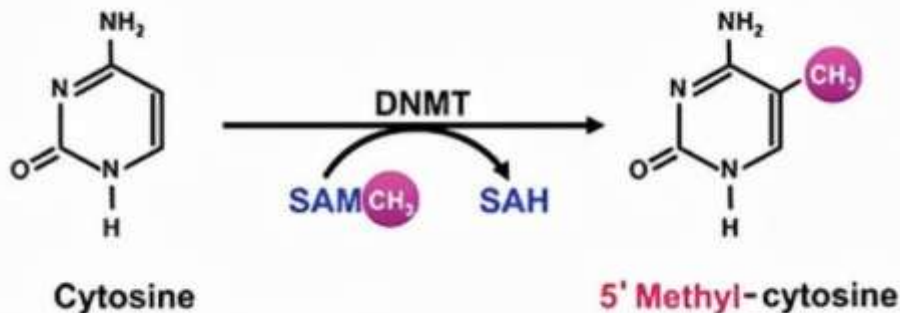
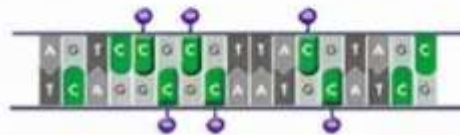
研究目标  
应用前景

# 01 Introduction

选题背景  
研究意义

## DNA Methylation

Methylating the cytosine of a CpG motif silences genes



哺乳动物 DNA 中的胞嘧啶甲基化被认为是一种关键的表观遗传修饰，控制着印迹、反转录转座子沉默和细胞分化等重要过程。DNAm 在癌细胞中的异常掺入或移除会导致全基因组范围的基因表达改变，包括抑癌基因的失活和癌基因的重新激活，值得注意的是，DNAm 模式的改变是乳腺癌不同固有亚型的特征。

> The High Mobility Group oncogenic TF *SOX2* is normally expressed in embryonic stem cells(干细胞) and neural progenitor cells(神经前体细胞), where it maintains self-renewal. [DNAmE in the \*SOX2\* promoter and enhancer regions functions as an epigenetic switch, which forces cells to activate multiple differentiation pathways. \*SOX2\* is therefore not expressed in most normal adult tissues.](#) Moreover, aberrant reactivation of *SOX2* has been detected in~ 43% of basal-like breast cancers and in several other malignancies, including glioblastoma, lung, skin, prostate and ovarian carcinomas. [SOX2 overexpression in tumor specimens has been associated with both promoter hypomethylation relative to adjacent normal tissue and copy number amplifications.](#) The overexpression of *SOX2* in breast cancer has been shown to directly activate *CYCLIN D1*, resulting in an increased mitotic index and proliferation. The downregulation of *SOX2* by RNA interference decreased the tumorigenic phenotype in the lung, breast and ovarian cancers.

- *SOX2* 启动子和增强子区域的 DNAmE 起表观遗传开关的作用，激活细胞分化途径。
- *SOX2* 在大多数正常成人组织中不表达。
- *SOX2* 在肿瘤标本中的过表达与启动子相对于邻近正常组织的低甲基化和拷贝数扩增有关。
- 乳腺癌中 *SOX2* 的过表达被证明与细胞的加速增殖有关；*SOX2* 下调可以减少乳腺癌、肺癌和卵巢癌的致瘤表型。

> ..., we reasoned that artificial incorporation of de novo DNAm in the *SOX2* promoter would confer stable oncogenic silencing, resulting in a sustained blockade of cell growth, faithfully propagated in successive cell generations.

>此外，由于 DNAm 由内源蛋白读取和写入，并在细胞分裂过程中忠实地传递，我们推测在 *SOX2* 启动子中人工引入从头 DNAm 可以实现稳定的致癌沉默，导致持续的细胞生长阻滞，并在连续几代细胞中有规律地繁殖。

>Herein we took advantage of previously characterized artificial TFs targeting the *SOX2* promoter made of six zinc finger (6ZF) domains, recognizing 18 base pair (bp) sites in the core promoter. These 6ZFs were linked to the catalytic domain of DNA methyltransferase 3A (DNMT3A), an enzyme that catalyzes *de novo* DNAm, to correct the aberrant methylation state of *SOX2* in cancer cells.

...

Our results indicate that the engineering of artificial DNA-binding domains (DBDs) linked to DNMT3A can be utilized to promote **long-lasting *SOX2* silencing** and represents a promising therapeutic approach to minimize tumor relapse.

>利用先前针对 *SOX2* 启动子的人工转录因子(six zinc finger, 6ZF), 识别核心启动子中 18bp 的位点, 6ZF 与 DNA 甲基转移酶3A (DNMT3A)的催化结构域相连。结果表明, 与 DNMT3A 相连的人工 DNA 结合域(DBD)的靶向 DNAm 可以用来促进 *SOX2* 的**长时间沉默**, 这是一种很有前途的治疗方法, 可以最大限度地减少肿瘤的复发。

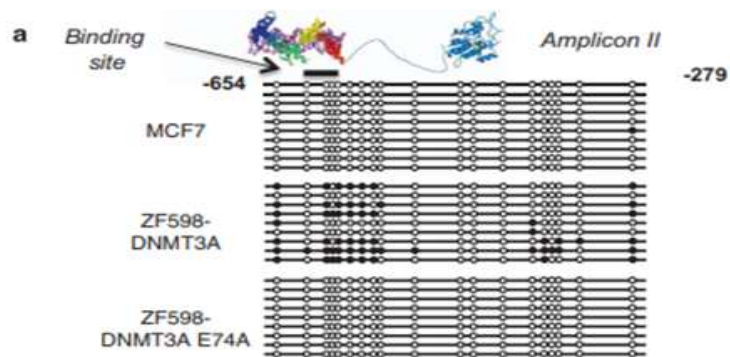
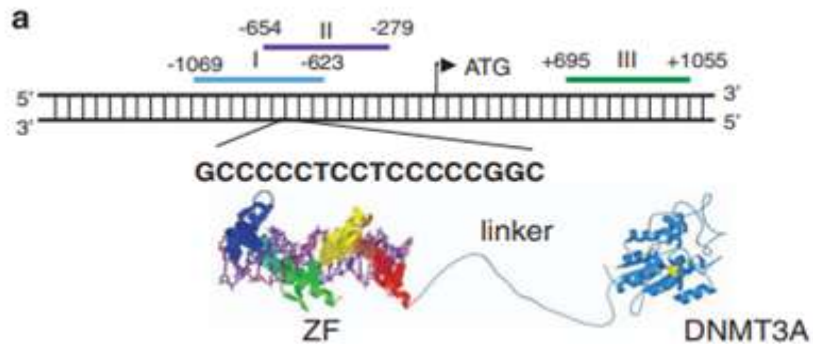
# 02

# RESULTS

✓研究结果说明

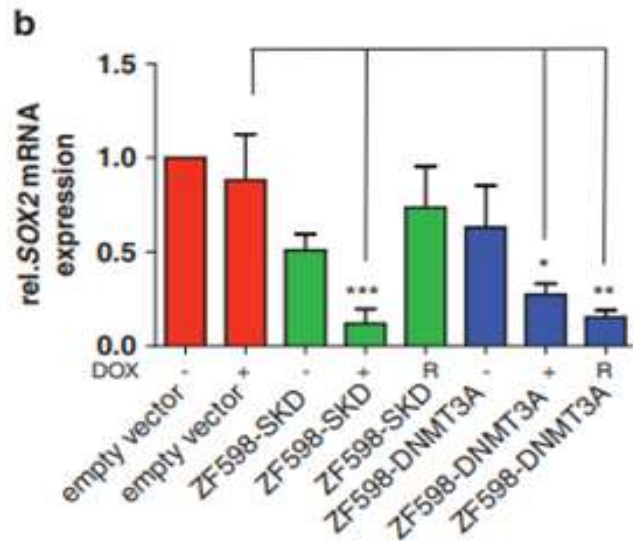
## ZF598-DNMT3A 启动 *SOX2* 下调并稳定抑制癌细胞生长

为了在 *SOX2* 位点诱导靶向 DNAmE，将人 DNMT3A 的催化结构域移植到先前鉴定的 6ZF 结构域的 C 末端，产生了 **ZF598-DNMT3A** 和 ZF552-DNMT3A。选择 MCF7 乳腺癌细胞作为模型细胞进行研究 (图2a)。然后诱导 6ZF-合成物进入 MCF7 细胞，获得了稳定的克隆，合成产物 ZF598-DNMT3A 和 ZF598-SKD 的瞬时表达受多西环素(Dox)处理的调控。



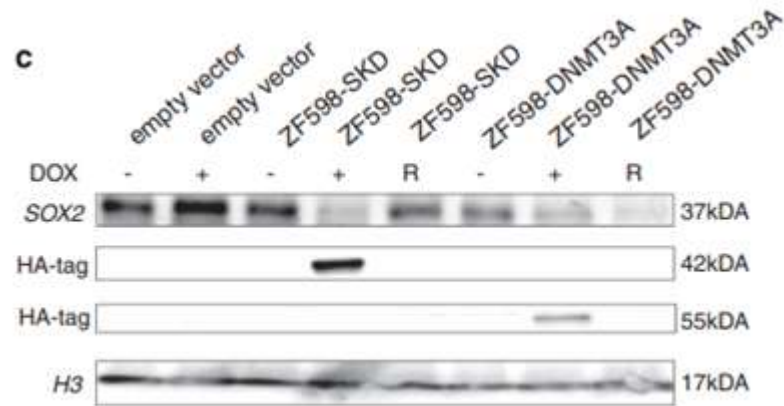
## ZF598-DNMT3A 启动 *SOX2* 下调并稳定抑制癌细胞生长

在 Dox(+Dox) 诱导下，ZF598-DNMT3A 和 ZF598-SKD 表达后，与对照(空载体)转导细胞相比，*SOX2* mRNA 水平分别降低了 90% 和 73%(图1b)。当从培养基中去除 Dox 长达 8 天时，转导 ZF598-SKD 的细胞 *SOX2* 表达恢复到与未诱导细胞相似的水平，而表达 ZF598-DNMT3A 的细胞在去除 Dox 后 *SOX2* 表达持续下降(图1b)。



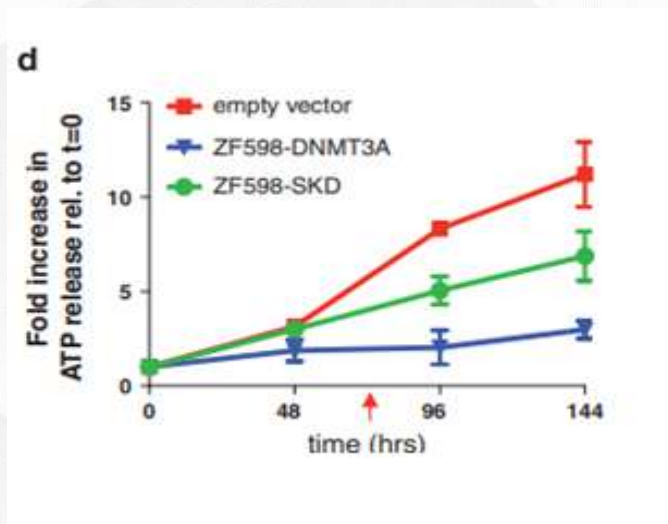
## ZF598-DNMT3A 启动 *SOX2* 下调并稳定抑制癌细胞生长

这些结果表明，ZF598-DNMT3A 合称物在目标 *SOX2* 位点上赋予转录记忆。ZF598-DNMT3A 诱导的 *SOX2* 转录沉默伴随着 *SOX2* 蛋白表达的显著降低。这种抑制在 DOX 去除条件下持续存在，甚至使 *SOX2* 沉默的水平比 +Dox 条件下的细胞更强，如 Western blot 所示(图1c)。



## ZF598-DNMT3A 启动 *SOX2* 下调并稳定抑制癌细胞生长

在去除 Dox 的条件下保持对肿瘤细胞生长的抑制：监测了与诱导和随后去除 ZF 蛋白表达相关的细胞活性随时间的变化(图1d)。以空载体转导的细胞作为对照，用 Dox 诱导 ZF598-SKD 或 ZF598-DNMT3A 稳定转导的 MCF7 细胞 ZF 蛋白表达 72 小时，后去除 Dox(图1d, 红色箭头)，并在接下来的 144 小时内监测细胞活力。





## ZF598-DNMT3A 通过起始有规律地甲基化实现 *SOX2* 的沉默

通过亚硫酸氢钠测序法，在含有 ZF598-DNMT3A 结合位点的扩增子中的甲基化水平(如扩增子II，图2a)。Dox 诱导 ZF598-DNMT3A 的表达导致特定 CpG二核苷酸的 DNAm<sub>e</sub> 增加高达 90%。

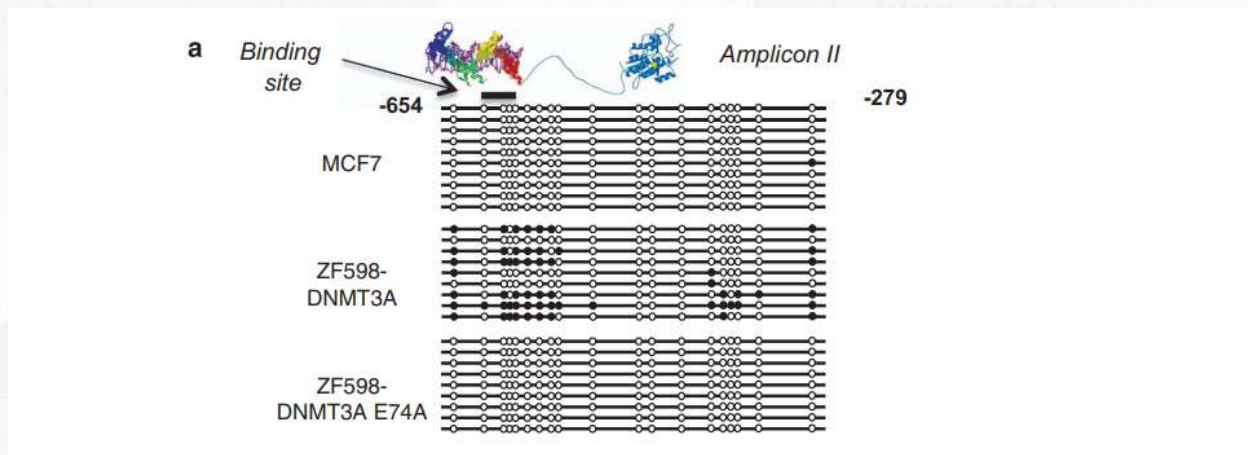


Figure.2 Expression of the ZF598-DNMT3A induces targeted DNA methylation in the *SOX2* promoter.

## ZF598-DNMT3A 通过起始有规律地甲基化实现 *SOX2* 的沉默

MassARRAY 也验证了相似的结果(图2b): 对照细胞或表达催化突变体 ZF598-DNMT3A-E74A 的细胞没有发现 CpG 甲基化增加, 表明 DNAm 的诱导中催化活性的必要。

此外, 其他靶向 *SOX2* 的 DBD 也能起到相同效果, 非靶向或异位过表达不能下调 *SOX2* 的 mRNA 水平。

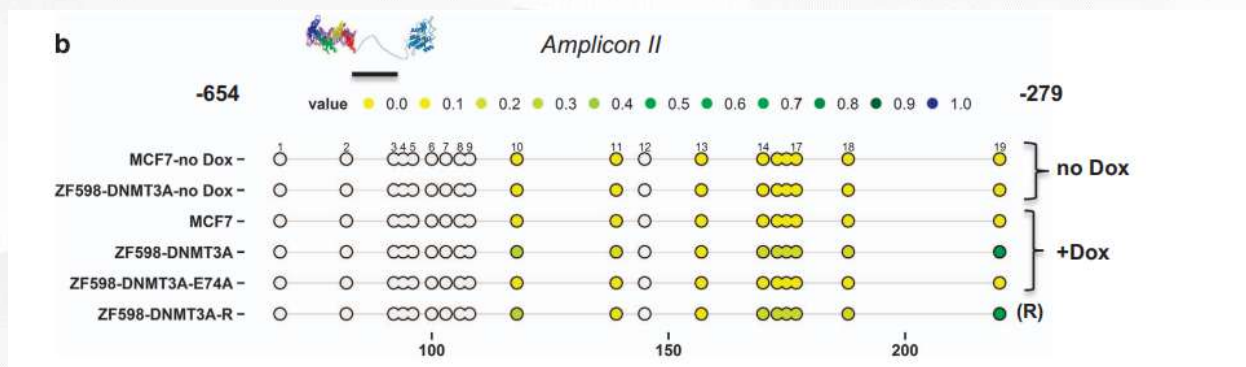
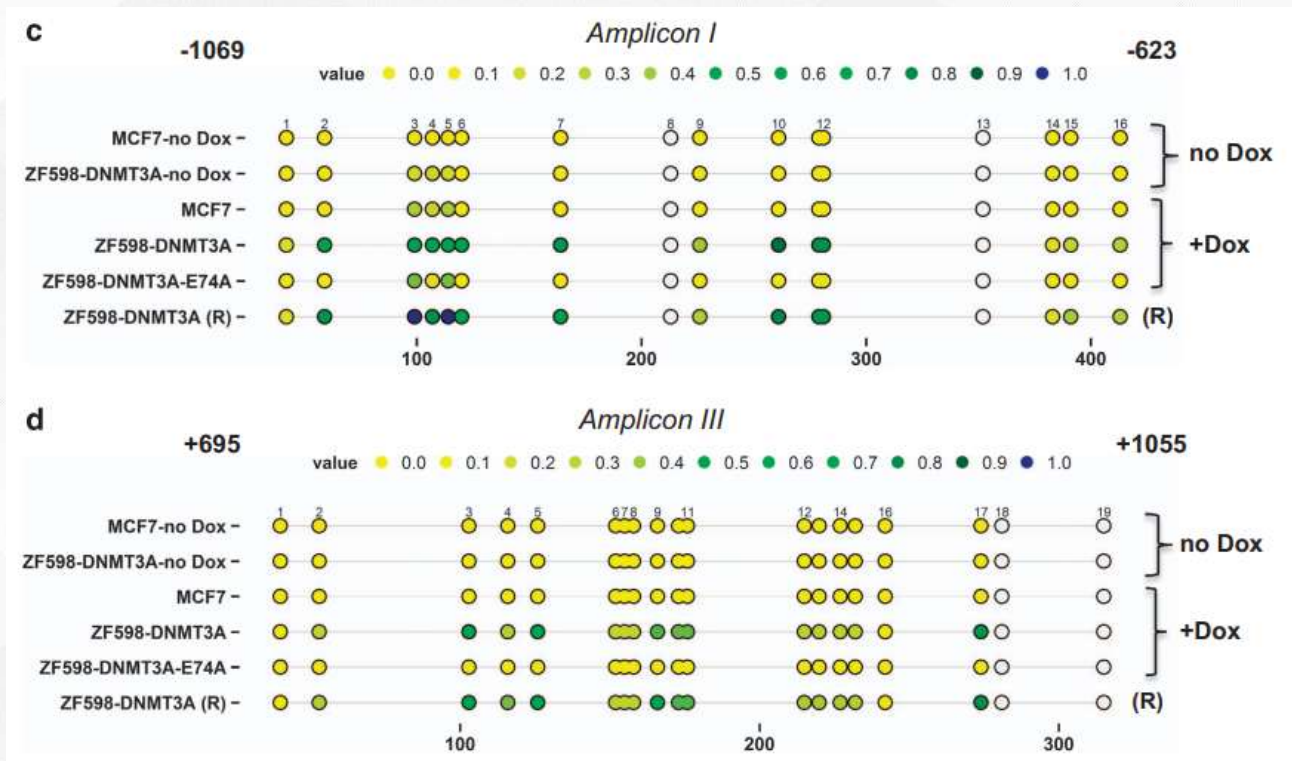


Figure.2 Expression of the ZF598-DNMT3A induces targeted DNA methylation in the *SOX2* promoter.

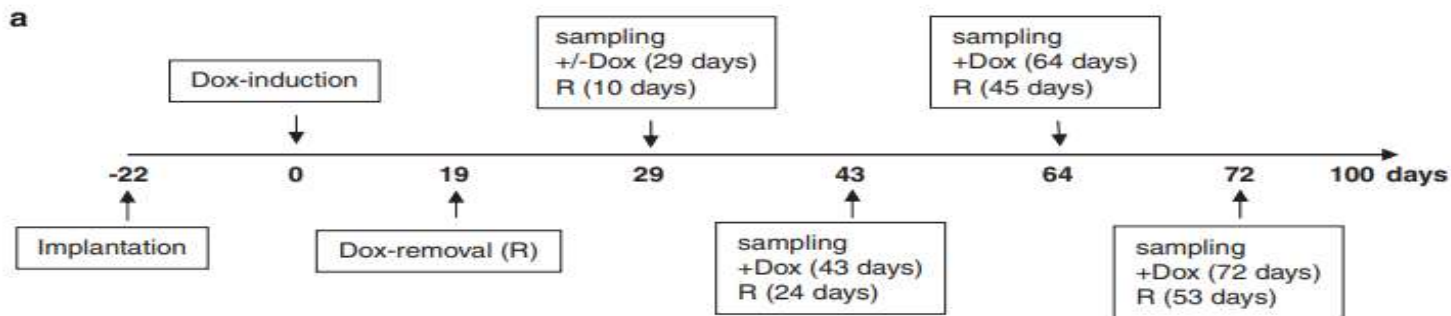
# ZF598-DNMT3A 通过起始和有规律地甲基化实现 *SOX2* 的沉默

分析诱导 *SOX2* 从头甲基化起始位点的情况：对 6ZF 结合位点两侧的两个额外的扩增片段(扩增子 I 和 III) 进行 MassArray 分析，覆盖起始位点约 1 kbps 范围。



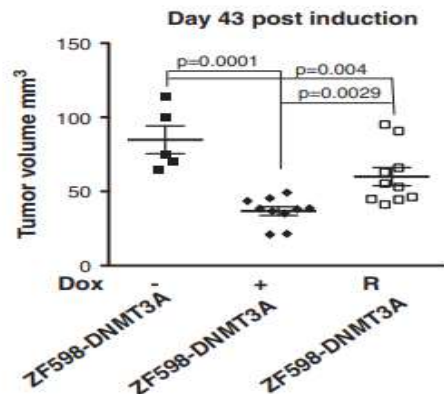
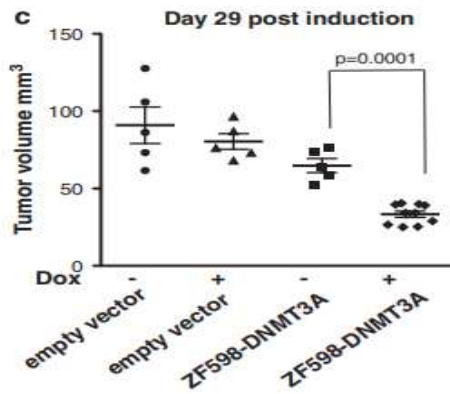
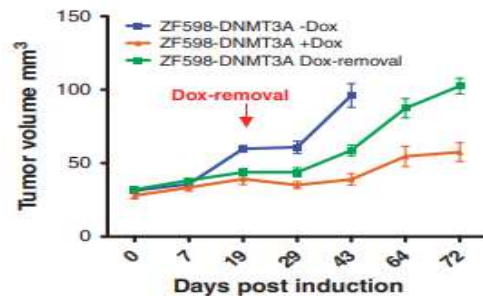
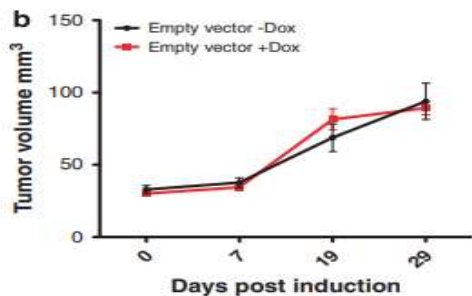
## ZF598-DNMT3A 表达增强裸鼠乳腺癌移植瘤的抗癌记忆和抑制肿瘤生长

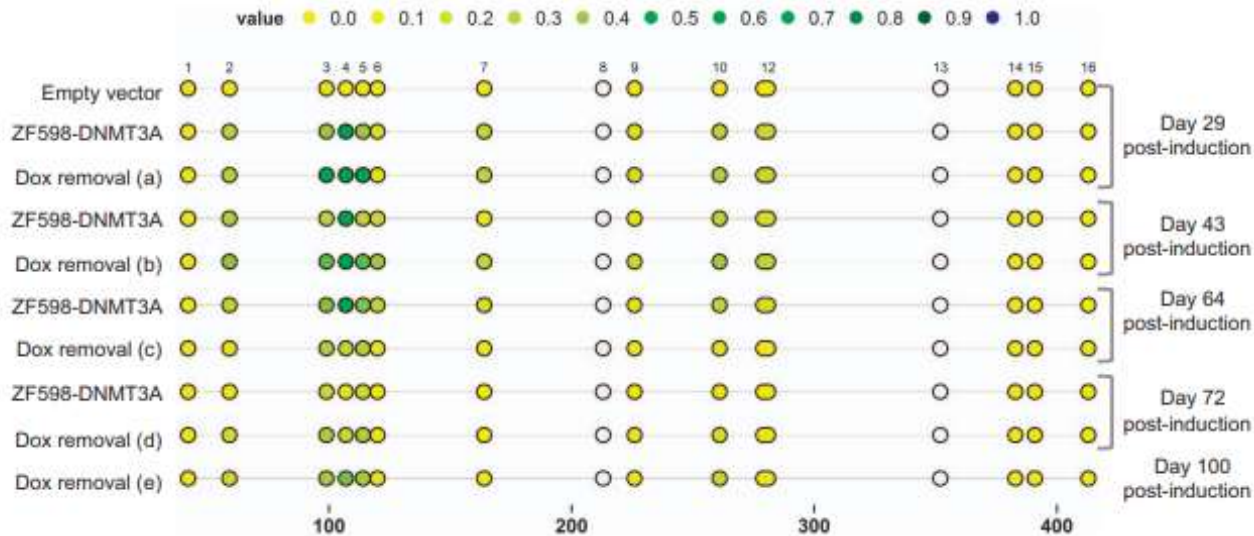
为了在活体中分析 ZF598-DNMT3A 合成物诱导产生的表型记忆效应，使用稳定转导激活了催化活性的 ZF598-DNMT3A或空载体对照的可诱导 MCF7 细胞系，移植到裸鼠中。



# ZF598-DNMT3A 表达增强裸鼠乳腺癌移植瘤的抗癌记忆和抑制肿瘤生长

转导 ZF598-DNMT3A 的小鼠在接受含 Dox 的饲料的小鼠中检测到了肿瘤体积的生长受到显著抑制。为了研究其稳定性，从一半的 ZF598-DNMT3A 小鼠的饲料中去除了 Dox，而另一半保持在加入 Dox 的条件下，可见从饮食中去除 Dox 的小鼠的肿瘤体积显著降低。





扩增子 I:

正向引物 5'-agaagagagGGATAGAGTTTTGGGTTTTAATTT-3'

反向引物 5'-cagtaacgactcactatagagaaggctAAACCAAC CTACCAACCACTAAAA-3'

扩增子 II:

正向引物: 5'-aggaagagagAAAGGTTTTTTAGTGGTTGGTAGGT-3'

反向引物: 5'-agtaatacgcactcactatagggagaaggctAAAAC TCAACTTCTCTCCCTTTCT-3'

扩增子 III:

正向引物: 5'-aggaagagagTTTTGGTATGGTTTTTTGGTTTTATG-3'

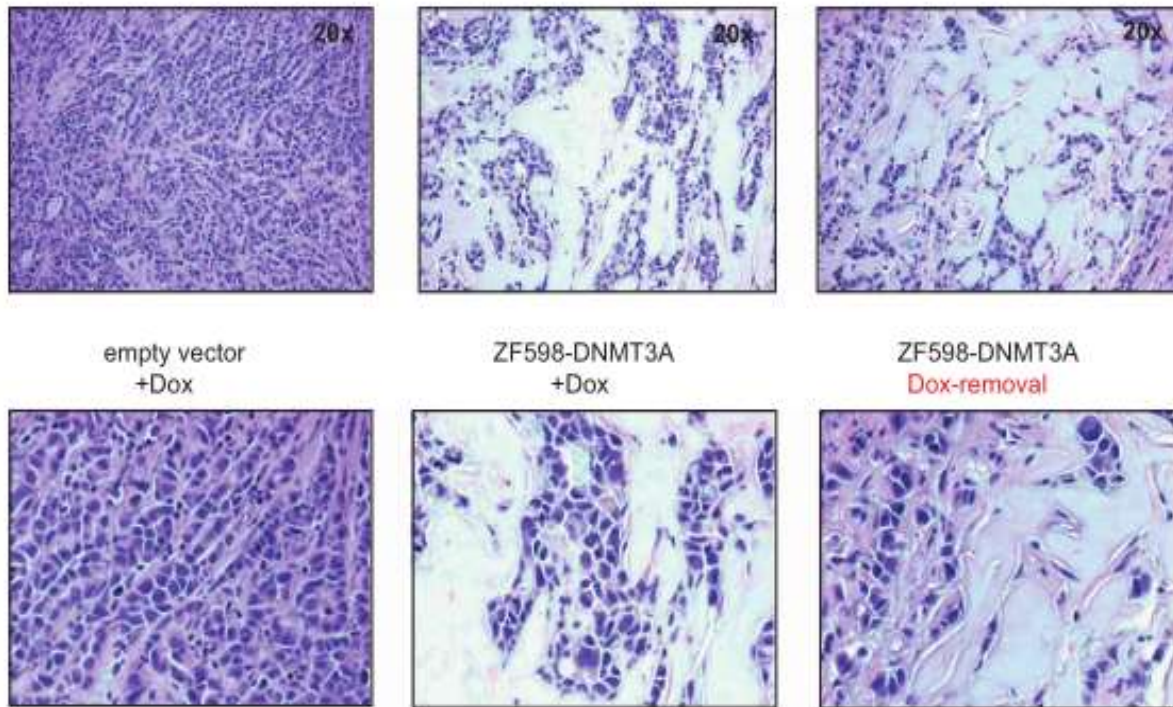
反向引物: 5'-cagtaatacgcactcactatagggagaaggctAATTTTCTCCATACTATTTCTTACTCTCC-3'

## ZF598-DNMT3A 表达被清除后，乳腺肿瘤的生长受到抑制

空载体 +Dox 肿瘤切片的组织学分析显示，在诱导后第 29 天，肿瘤细胞密度很高。

ZF598-DNMT3A +Dox 的肿瘤结构发生了非常显著的变化，表型在 ZF598-DNMT3A 表达去除后保持不变(图5a)。

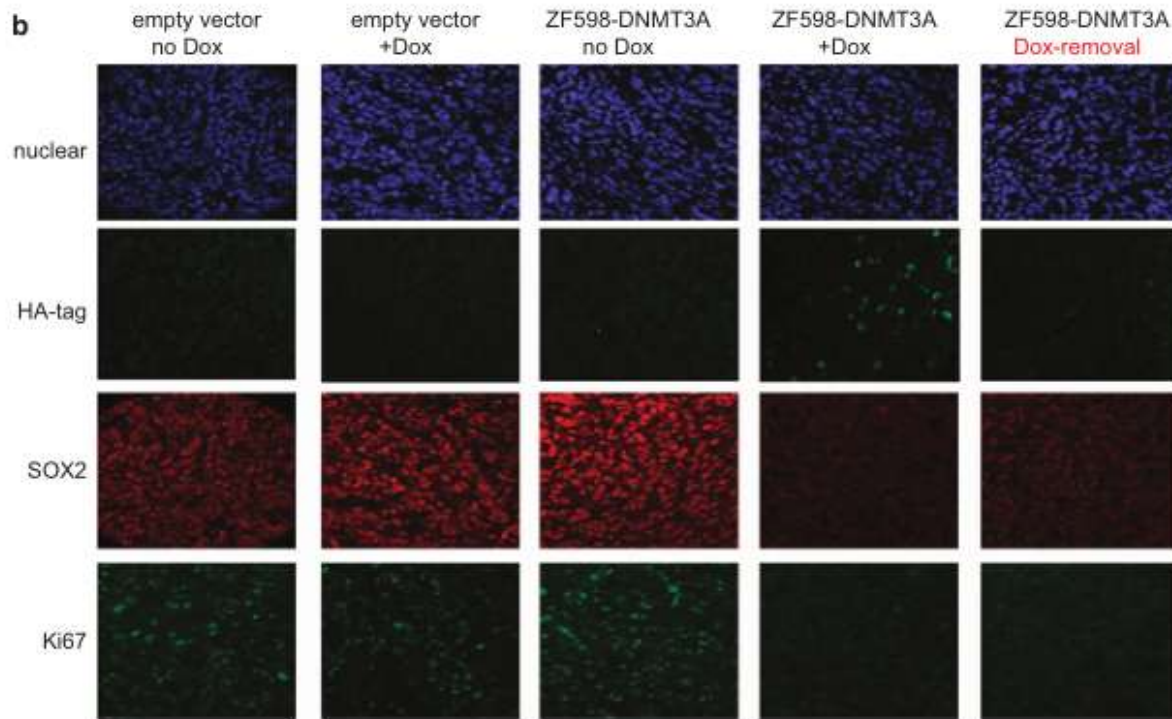
通过RT-PCR定量，肿瘤表型的这种改变伴随着一些间质标志物，如 *SOX2*，*TWIST1* 和 *Vimentin* 的显著下调，以及一些上皮连接蛋白，如 *Claudin 4* 的显著上调。



肿瘤切片（苏木精和伊红染色）的组织学和免疫荧光分析显示表型记忆：诱导 29 天后提取空载体肿瘤切片，诱导 54 天后采集 ZF598-DNMT3A +Dox 切片，Dox 去除 45 天后采集 Dox 移除样本

## ZF598-DNMT3A 表达被清除后，乳腺肿瘤的生长受到抑制

肿瘤切片免疫荧光分析显示 ZF598DNMT3A 蛋白在 +Dox 组有核表达，但在 ZF598-DNMT3A-Dox 动物中未观察到信号(图 5b)。这种甲基转移酶表达的诱导与接受 Dox 的肿瘤中 *SOX2* 的表达显著降低有关，而在对照组(空载体 ± Dox) 和 ZF598DNMT3A-Dox 肿瘤中没有观察到这一现象。去除 Dox 后，ZF598-DNMT3A 在肿瘤切片中不再表达。重要的是，相对于对照或 -Dox 肿瘤，*SOX2* 的表达在去除 Dox 后稳定地维持在活体内。

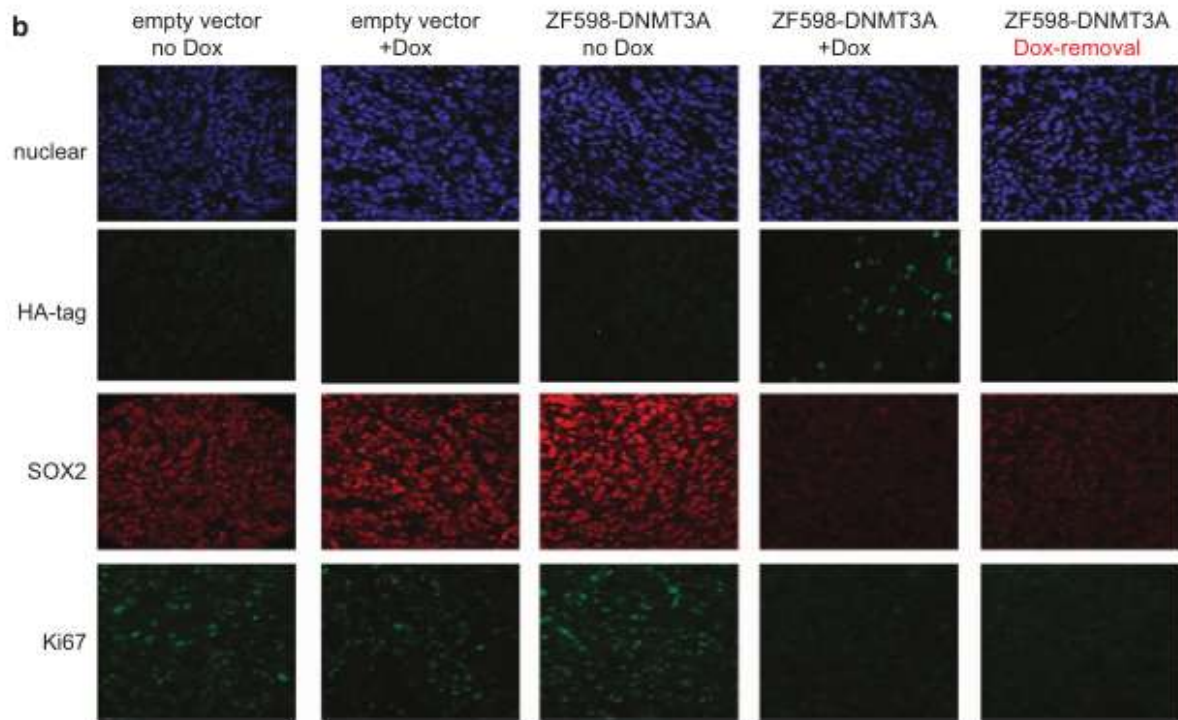


诱导后 29 天，空载体和 ZF598-DNMT3A 肿瘤切片的免疫荧光。检测 ZF598-DNMT3A (HA-tag, 绿色)、*SOX2*(红色)和增殖标记 Ki-67(绿色, 底部) 表达

## ZF598-DNMT3A 表达被清除后，乳腺肿瘤的生长受到抑制



此外，正如Ki-67标记物所显示的那样，*SOX2* 表达下调与肿瘤细胞增殖减少有关，即使在去除ZF598-DNMT3A表达10天后，相对于未诱导的细胞，*SOX2* 表达仍保持下调(图5b)。



诱导后 29 天，空载体和 ZF598-DNMT3A 肿瘤切片的免疫荧光。检测 ZF598-DNMT3A (HA-tag, 绿色)、*SOX2*(红色)和增殖标记 Ki-67(绿色, 底部) 表达

# 03 DISCUSSION



# DISCUSSION



利用两种不同的与 *SOX2* 启动子结合的 6ZF 蛋白(ZF598和ZF552), 证明这两种蛋白都能催化 DNAm, 并诱导细胞生长停滞。这种作用依赖于功能 DBD 和 DNMT3A 的催化功能, 因为非靶向 DNMT3A 构建或催化突变体的表达导致的 DNAm 不能沉默 *SOX2* 或抑制细胞生长。

此外, 在去除 ZF598-DNMT3A 后的 53d 内, 从头甲基化仍然存在, 并伴随着 *SOX2* 表达的持续抑制和肿瘤的生长抑制。使用免疫印迹和免疫荧光仔细验证了长期清除 Dox 后没有甲基转移酶的表达。

## DISCUSSION



启动子 CpG 甲基化在控制基因转录方面起着重要作用，因此参与了许多生物学过程的调控。在癌症中，异常的 DNAm 与恶性疾病的发生和发展有关。像 TF 一样，癌症中的许多诱发癌症驱动因素都是不能给药的，比如小的 GTP 酶 KRAS 和 HRAS。因此，能够在这样的主要致癌驱动因素中编程一种可遗传的靶向沉默状态将是一项具有很高影响力的成就，对癌症治疗具有深远的临床意义。

# DISCUSSION



与 DNMT3A 相比，表达 ZF-SKD 的细胞不能稳定下调 *SOX2*，这表明 ZF-DNMT3A 和 ZF-SKD 启动了机械上不同的表观遗传过程。SKD 通过 KAP1 (Krueppel 相关蛋白 1，异染色质诱导修饰物如 HP1 和甲基转移酶 SETD1 的支架) 的招募来介导靶基因的沉默。但与 DNMT3A 不同的是，SKD 没有内在的酶活性，主要携带招募活性。在我们的研究中，SKD 表达的抑制并没有导致表观遗传记忆。

除了它在癌症治疗中的重要意义外，我们的方法还提供了一个平台来诱导靶向 DNAm，并在体内研究这种表观遗传状态的时空传播及其对基因表达的影响。



# 谢谢聆听

---

第四组