

组蛋白 H4 第 20 位赖氨酸突变阻滞细胞周期

槐焕想 张田甜

摘要 **目的** 研究组蛋白 H4 第 20 位赖氨酸突变对细胞可能存在的影响并探究其分子机制,期望寻找作用于该位点的特异性蛋白,比如 H4K20me3 去甲基化酶。**方法** 建立能够表达羧基(C)末端带 Flag-HA 标签的组蛋白 H4 及其突变体 H4K20M(赖氨酸突变为蛋氨酸),H4K20A(赖氨酸突变为丙氨酸)的 HeLa S3 细胞系。通过病毒感染法获得能够表达目的蛋白的细胞,碘化丙啶(PI)染色后进行流式细胞(FACS)周期分析。制备单个核小体(mono nucleosome, mono-N),通过免疫共沉淀的方法得到相互作用蛋白复合物成分,银染观察蛋白组分的差异,将差异蛋白条带切割后进行质谱分析。**结果** 在病毒感染大约 72h 过表达 K20M 的 HeLa S3 细胞表型异常,主要表现为细胞体积和细胞核体积明显增大,并停止生长,不再分裂。FACS 结果显示过表达 H4K20M 的细胞被阻滞在 G₂/M 期,质谱结果表明在过表达 K20M 的细胞中 RBBP4/7 的表达量增高。**结论** 组蛋白 H4 第 20 位赖氨酸突变为蛋氨酸会阻滞细胞周期,而这种阻滞很可能由 RBBP4/7 所引起。

关键词 H4K20 甲基化 K20M 突变 细胞周期阻滞

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.01.008

Mutation of Histone H4 Lysine 20 Blocks Cell Cycle. Huai Huanxiang, Zhang Tiantian. Department of Biochemistry & Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Abstract **Objective** To study the effects of missense mutation of H4 Lysine 20, explore the molecular mechanisms, and find some specific interaction proteins, such as H4K20me3 demethyltransferase. **Methods** Stable HeLaS3 cell line expressed H4 or H4 mutations that fuses a Flag-HA tag to carboxyl(C)-terminal was established by virus infection. Mutations include lysine mutates to methionine and alanine. Harvested cells expressed purpose protein. Staining with propidium iodide (PI) and analyze cell cycle analysis by fluorescence activating cell sorter (FACS). Prepare mono nucleosome (mono-N) of three cells samples and purify associated protein complex by immunoprecipitation assay. Distinguish protein differences by Silver staining and cut different protein bands for mass spectrometry analysis. **Results** HeLa S3 overexpressed H4K20M exhibit abnormal phenotype when transfected virus 72h, mainly show abnormal cell and nuclei volume increases, stop growing and no longer split. FACS shows cells overexpressed H4K20M were blocked in G₂/M period. Mass spectrometry data shows the expression of PRBP4/7 increases in cells overexpressed H4K20M. **Conclusion** Histone H4 lysine 20 mutation to methionine block cell cycle, this block is likely to be caused by protein PRBP4/7.

Key words Histone H4K20 methylation; Lysine mutates to methionine; Cell cycle block

真核生物基因组 DNA 以高度凝集的染色质形式存在于细胞核中。核小体是染色质的基本组成单位,由 147 bp DNA 缠绕核心八聚体组成。组蛋白的 N 端上有多种修饰,例如甲基化(methylation)、磷酸化(phosphorylation)、乙酰化(acetylation)、泛素化(ubiquitination)等。组蛋白的不同修饰作为重要的表观遗传调控因子,可以调控多种生物学进程,包括复制、转录、DNA 损伤、肿瘤发生、细胞凋亡及细胞周期的调控等。

组蛋白 H4 在进化过程中高度保守,迄今为止尚未发现 H4 变体的存在。组蛋白 H4 的 N 端有 5 个赖氨酸残基,1969 年在小牛组蛋白化学测序中首次发现 H4 第 20 位赖氨酸的甲基化,在大多数哺乳动物细胞中组蛋白 H4 只有第 20 位赖氨酸可以被甲基化^[1]。目前已知哺乳动物有 3 种 H4K20 甲基化酶,主要包括 PR-Set7 和 Suv4-20h1/h2,都属于 SET domain 家族,PR-Set7 只催化生成 H4K20me1,而 Suv4-20h1/h2 则以 H4K20me1 为底物分别负责 H4K20me2-me3 的生成^[2]。H4K20 甲基化参与多种生物学过程。H4K20 甲基化参与胚胎早期发育:PR-Set7 基因缺陷型小鼠,H4K20me1 整体水平下降,在胚胎着床前死亡^[3]。高表达 Suv-20h2 会增加

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31471209)

作者单位:100005 北京,中国医学科学院基础医学研究所生化系

通讯作者:张田甜,电子信箱:ztt365@163.com

H4K20me3 的含量,导致小鼠早期胚胎发育阻滞在二细胞期^[4]。在斑马鱼早期发育过程中发现敲除 Suv - 20h2 会使 oct25 相关基因沉默,从而促进神经外胚层的多向分化潜能^[5]。

H4K20me3 与细胞的静止沉默息息相关,在静止期和增殖期中的初级成纤维细胞中的组蛋白修饰分析显示,在静止期 H4K20me2 和 H4K20me3 的含量会大量增加^[6]。最新的研究在卤虫胚胎中发现了新的 H4K20 甲基化酶 SETD4,只催化 H4K20me3 的生成,该蛋白只在静止期的胚胎中表达,用 RNAi 的方式降低该蛋白的表达后,H4K20me3 水平显著降低,胚胎在这个时候处于非静止期状态但是却不能进行正常分裂。在胃癌细胞 MKN45 中过表达 SETD4,会抑制细胞的正常分裂^[7]。H4K20me3 参与结构性异染色质的形成,主要与转录抑制有关,在小鼠胚胎成纤维细胞中敲除 Suv - 20h 后,发现位于端粒和亚端粒区域的 H4K20me3 信号减弱,并加大了端粒重组的概率以及延长端粒的长度,但其他异染色质标志物如 H3K9me3 并未发现明显变化^[8]。H4K20me3 还被认为与肿瘤的发生相关,在乳腺肿瘤组织和在其他类型的肿瘤癌变区均检测到 H4K20me3 的减少。以 H4K20me3 减少为标记的乳腺癌患者的预后较差,H4K20me3 的减少可能会增加乳腺癌细胞侵袭能力^[9]。

随着表观遗传学研究的深入,发现组蛋白的错义突变、组蛋白修饰酶异常等在疾病的发生、发展及治疗中发挥重要作用。DNA 全基因组测序法在儿童胶质瘤中首次发现了与人类疾病相关的组蛋白错义突变即 H3. 3K27M (27 位赖氨酸突变为蛋氨酸)^[10]。组蛋白 H3 的另一突变位点 K36M,能够阻断干细胞向软骨和脂肪方向分化,该突变会在小鼠体内形成小儿肉瘤(结缔组织发生的癌症)^[11]。而最新研究以拟南芥为模型,发现 H3K36M 突变会造成植物分支和早期开花异常,通过改变代谢相关基因的表达来驱动植物的发育^[12]。H4K20 甲基化重要的生物学功能以及赖氨酸向蛋氨酸突变在疾病中的发现,为进一步探究 H4K20me3 的生物学功能和其分子机制提供的思路 and 方向,本研究拟构建 H4K20 的不同突变 H4K20M,来探讨突变所带来的生物学效应以及期望寻找可以作用于位点的特异性蛋白。

材料与方法

1. 材料:(1)质粒及细胞:大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , HEK293T, HeLaS3 细胞和质粒 PGEX - 4T -

1 - H4WT 菌种由中国医学科学院基础医学研究所生物化学与分子生物学系梅品超课题组保存。pWPXL - FLAG - HA - H4WT/H4K20M/H4K20A 真核表达质粒由本研究笔者构建。(2)主要仪器:奥林巴斯显微镜购自日本尼康公司;荧光显微镜购自蔡司公司;细胞培养孵箱购自美国 Thermo 公司;超净工作台购自苏州净化设备有限公司;PCR 仪购自美国 Bio - Rad 公司;超速/高速离心机购自美国 Thermo 公司;金属加热混匀器购自德国 Eppendorf 公司;DNA 电泳仪购自北京君意东方电泳设备有限公司;蛋白质电泳仪购自美国 Bio - Rad 公司;BD Accuri C6 流式细胞仪购自芯起点基因科技有限公司。(3)主要试剂:蛋白酶抑制剂购自瑞士 Roche 公司;Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 购自瑞士 Roche 公司;DNA 柱式凝胶回收试剂盒购自美国 Axygen 公司;T4 DNA 连接酶、EcoR I、Sa II、Dpn I 购自美国 NEB 公司,PrimeSTAR、micrococcal nuclease 购自日本 TaKaRa 公司;质粒小提试剂盒购自中天博通公司;Vigofect 转染试剂购自威格拉斯;Puromycin、0.25% Trypsin、DMEM 购自美国 Invitrogen 公司;新生牛血清、Flag - M2 抗体、Flag - M2 珠子购自美国 Sigma 公司。

2. 方法:(1)pWPXL - FLAG - HA - H4WT/K20M/K20A 真核表达质粒构建:以 PGEX - 4T - 1H4 质粒为模板设计引物将 H4 第 20 位赖氨酸分别突变为蛋氨酸 M 和丙氨酸 A, K20M 上游引物:5' - GCGCTAAGCGCCACCGCATGGTCTTGAGAGACA - 3';下游引物:5' - CTGAATGTTGTCTCTCAAGACCAT - GCGGTGGCGCTTAGCGC - 3';K20A 上游引物:5' - GCGCTAAGCGCCACCGCGCGGTCTTGAGAGACAAC - ATTCAGA - 3';下游引物:5' - GCGCTAAGCGCCAC - CGCGCGGTCTTGAGAGACAACATTCAG - 3'。反应体系:PGEX - 4T - 1 H4 质粒 20ng,上下游引物各 10 μ mol/L,PrimeSTAR HS DNA 聚合酶 1 μ l, 10 $\times$ PCR buffer, 5 μ l ddH₂O 5 μ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C 5min, 95 $^{\circ}$ C 30s, 65 $^{\circ}$ C 60s, 68 $^{\circ}$ C 45s, 共 15 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 5min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,Dpn I 37 $^{\circ}$ C 消化 30min,消化产物转化入 *E. coli* DH5 α 大肠杆菌感受态中涂在带有氨苄抗性的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 细菌培养箱中培养过夜。次日挑选出菌落,摇菌,测序,小提。将测序结果正确的质粒和真核表达载体 pWPXL 用 EcoR I 和 Sa II 双酶切。反应体系:质粒 1 μ g, EcoR I 0.5 μ l 和 Sa II 0.5 μ l, 10 $\times$ buffer 1 μ l, ddH₂O 7 μ l。反应条件:37 $^{\circ}$ C 1h。1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,用

DNA 纯化回收试剂盒回收目的片段和载体,T4 DNA 连接酶连接目的片段和载体,反应体系:目的片段 8 μ l,载体 2 μ l,T4DNA 连接酶 1 μ l,10 $\times$ buffer 1.5 μ l, ddH₂O 2.5 μ l。反应条件:室温 2h。转化,在氨苄抗性的 LB 平板过夜培养,摇菌,用质粒小提试剂盒分别提取质粒。用限制性核酸内切酶 EcoR I 和 Sa II 双酶切鉴定正确后送北京擎科生物工程有限公司测序,测序正确的质粒-80℃保留菌种并入库。(2)稳定细胞系建立:用威格拉斯公司 Vigofect 高效转染试剂进行细胞病毒包装,产生病毒感染 HeLaS3 细胞。感染 48h 后用含终浓度 3 μ g/ml 的嘌呤霉素的 DMEM 筛选病毒感染后的 HeLaS3 细胞,48h 后将细胞消化成单个细胞,待细胞长到肉眼可见的单个克隆时,通过免疫荧光挑选出 100% 带有 FLAG 阳性信号细胞克隆,同时通过 Western blot 法检测蛋白相对分子质量的大小。(3)细胞培养细胞培养:用含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基贴壁培养 HEK293T 细胞和 HeLaS3 细胞,培养条件 5% CO₂,37℃。(4)FACS 流式细胞术:提前 24h 接种 1 $\times$ 10⁶ 细胞至新的培养皿,过夜并保证细胞贴壁状态良好,胰酶消化细胞成单个细胞悬液,转移至新的 15ml 管中,4℃,500g,离心 5min。冰浴 PBS 洗两次。用 500 μ l PBS 将细胞沉淀悬起,保证单细胞悬液。逐滴加入 5ml 预冷的 75% 乙醇固定,4℃ 孵育过夜。4℃ 固定过夜的细胞离心,去上清。冰 PBS 洗两次。425 μ l PBS 重悬细胞为单细胞悬液,加入 25 μ l PI(20 $\times$),50 μ l RNase(10mg/ml),37℃ 避光孵育染色 30min,上机检测。(5)Mono-N 制备:分别收取(6 $\times$ 10)⁶ 皿过表达 H4 WT 及 mutations 的细胞,冰浴 buffer-N(10mmol/L Tris-HCl pH 8.0,250mmol/L sucrose,60mmol/L KCl,15mmol/L NaCl,5mmol/L MgCl₂,1mmol/L CaCl₂)洗两次,用 30ml Mono-N lysis buffer(buffer N,0.5% triton $\times$ 100)重悬裂解细胞,补加 25XPI,冰浴 10min;600 $\times$ g,4℃,5min,去上清,得到细胞核。用冰浴 Buffer N 重悬细胞核,用 2 μ l micrococcal nuclease 于

37℃ 酶切 30min,2% 琼脂糖凝胶电泳检测是否为 Mono-N,若酶切不完全,可适当增加酶切时间,或者同时采用超声的方法得到 Mono-N。加入终浓度 20mmol/L EDTA 终止酶切,于冷冻离心机 4℃,13000 $\times$ g 离心 30min,上清即为得到的 mono-N。(6)免疫共沉淀:在 mono-N 中加入 30 μ l Flag-M2 beads,将蛋白混和物于 4℃ 旋转仪上混匀过夜。孵育结束后,500 $\times$ g,4℃,离心 3min。将上清转移至另一离心管,计为“FT”-80℃ 保存。加入预冷的 RIPA 洗涤 beads。500 $\times$ g,4℃,离心 5min。重复洗 3 次。将 beads 转到 1.5ml 离心管,500 $\times$ g,4℃,离心 1min。1.5ml EP 管中加入 30 μ l FLAG-peptide 洗脱液,于 4℃ 金属混匀器上,1000r/min,振荡 1h。50 $\times$ g,4℃ 离心 1min,收集洗脱液。共洗脱 2 次。(7)银染:取 8 μ l 洗脱液中加入 5 $\times$ SDS,100℃ 煮沸 5min,将蛋白样品用 13% SDS-PAGE 胶进行电泳分离。电泳结束后,将 SDS-PAGE 胶浸没在固定液中,在摇床上室温孵育 30min,以下所有步骤都在摇床上进行。用 100ml 去离子水洗涤 SDS-PAGE 胶两次,每次 5min。加入 100ml 浸泡液,室温孵育 30min。用 100ml 去离子水洗涤 SDS-PAGE 胶 3 次,每次 5min。洗涤后,加入 100ml 银染液,避光室温孵育 10min。银染后,用去离子水快速漂洗 3 次。迅速加入 100ml 显色液,将 SDS-PAGE 胶浸没在显色液中,室温孵育,并时刻观察,当出现的蛋白条带达到合适的颜色时,迅速加入 3ml 乙酸,在摇床上孵育 5min 终止显色。用去离子水漂洗 SDS-PAGE 胶 3 次后扫描银染胶。(8)质谱分析:将目的蛋白条带切割,送由中国医学科学院中心实验室进行质谱分析。

结 果

1. 表达载体的构建和鉴定:pWPXL-H4WT/K20A/K20M 质粒经 EcoR I 和 Sal I 双酶切,电泳可见约 450bp 片段。经测序鉴定,DNA 序列与预期相同,20 位赖氨酸成功突变,证明构建成功(图 1)。

	(1)	1	10	20	30	40	55
H4WT	(1)	ATGTC	CGGCAGAGGAAAGGGCGGAAAAGGCTTAGGC	AAAGGGGGCGCTAAGCGCC			
H4K20M	(1)	ATGTC	CGGCAGAGGAAAGGGCGGAAAAGGCTTAGGC	AAAGGGGGCGCTAAGCGCC			
H4K20A	(1)	ATGTC	CGGCAGAGGAAAGGGCGGAAAAGGCTTAGGC	AAAGGGGGCGCTAAGCGCC			
Consensus	(1)	ATGTC	CGGCAGAGGAAAGGGCGGAAAAGGCTTAGGC	AAAGGGGGCGCTAAGCGCC			
							Section 2
	(56)	56	70	80	90	100	110
H4WT	(56)	ACCGCAAGG	TCTTGAGAGACAACATTCAGGGCATCACCAAGCCTGCCATTTCGGCG				
H4K20M	(56)	ACCGCAATG	GCTTGAGAGACAACATTCAGGGCATCACCAAGCCTGCCATTTCGGCG				
H4K20A	(56)	ACCGCGCGG	TCTTGAGAGACAACATTCAGGGCATCACCAAGCCTGCCATTTCGGCG				
Consensus	(56)	ACCGCA	GGTCTTGAGAGACAACATTCAGGGCATCACCAAGCCTGCCATTTCGGCG				
							Section 3

图 1 质粒测序结果

红色方框所示为突变位点

2. 稳定细胞系的建立:通过免疫荧光(IF)和 Western blot 法检测细胞中 Flag - HA - H4WT/K20A/K20M 的表达。IF 显示筛选的细胞系中所有细胞均带有 Flag - M2 信号,Western blot 法表明所构建的稳定细胞系表达了 Flag 标签融合蛋白。证明 Flag - HA - H4WT/K20A HeLa S3 稳定细胞系的构建成功,于此同时发现在病毒感染 72h 后过表达 K20M 的 HeLa S3 细胞表现出表型异常,主要表现在同一物镜下与过表达 H4WT 和 H4K20A 的细胞相比细胞体积和细胞核体积异常增大,并停止生长,不再进行分裂,因此无法建立 H4K20M 过表达的稳定细胞系(图 2)。

3. FACS 检测细胞周期:由于在建立细胞系的过程中笔者发现过表达 K20M 过表达的 HeLa S3 细胞表型异常,并停止生长,猜测可能是由于细胞周期异常所致,在细胞感染病毒 72h 且细胞表现出异常表型时,同时收取过表达 H4WT 及 H4K20M 样品,用 PI 染色后利用 FACS 检测两种样品的细胞周期情况,如图所示与过表达 H4WT 的细胞相比,过表达 K20M 的细胞被明显阻滞在 G_2/M 期,不能进入下一细胞周期

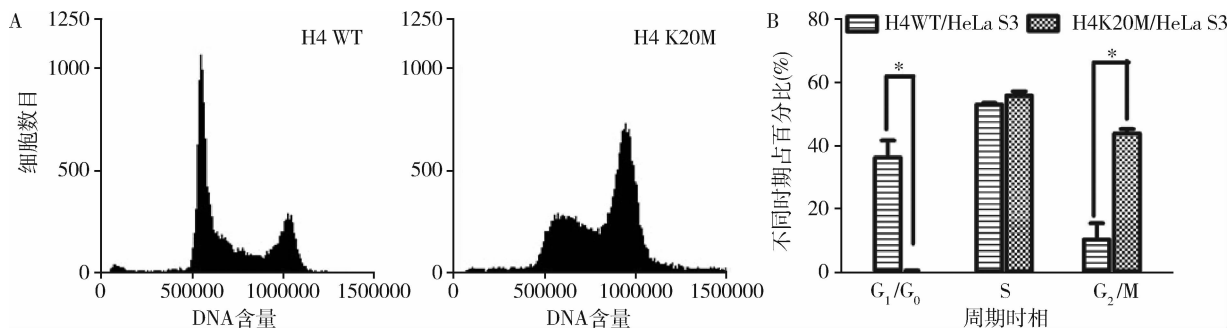


图 3 过表达 H4K20M 阻滞细胞周期

A. PI 染料染色 FACS 细胞流式分析细胞周期;B. 不同细胞周期的细胞比例, * $P < 0.05$

4. IP 样品银染:针对过表达 K20M 后 HeLa S3 出现的细胞周期阻滞现象,为了探究过表达 H4K20M 阻滞细胞周期的分子机制,笔者将过表达 3 种 H4 的细胞收集,制备 mono - N 进行 Flag - IP 实验得到 IP 复合物样品。银染对比分析每个组分的蛋白成分差异,发现过表达 H4K20M 的细胞核小体复合物中与 H4WT/K20A 相比有个别高表达蛋白成分 1、2 的存在(图 4)。

5. 质谱分析:为确定 H4K20M IP 复合物中高表达蛋白成分,笔者对 IP 复合物中特异高表达蛋白 1 进行质谱分析,发现 1 中主要含有 RBBP 家族中的 RBBP7 和 RBBP4 两种成员。RBBP4/7 即 RbAp48/

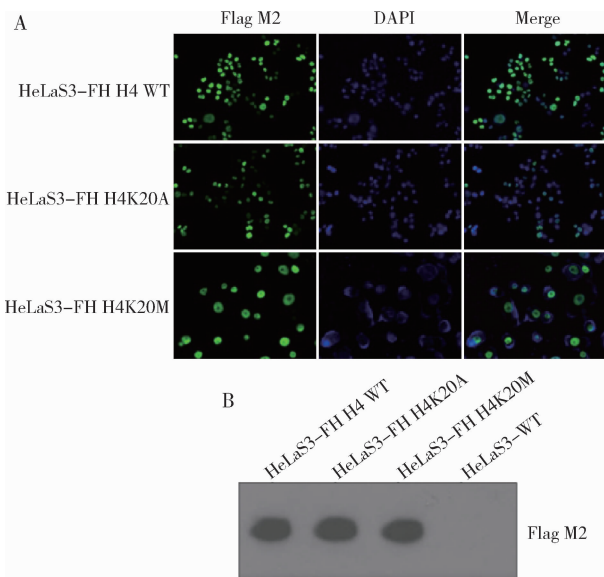


图 2 Flag - HA H4WT/K20A/K20M 在 HeLaS3 的表达
A. 4% 多聚甲醛固定后免疫荧光检测蛋白表达及细胞内定位 (DAPI 显示为蓝色荧光,Flag 显示为绿色荧光),图片均在 20 倍物镜下拍摄;B. Western blot 法检测蛋白的表达

的 G_1 期且无法进行细胞分裂,随着时间的延长,细胞逐渐死亡(图 3)。

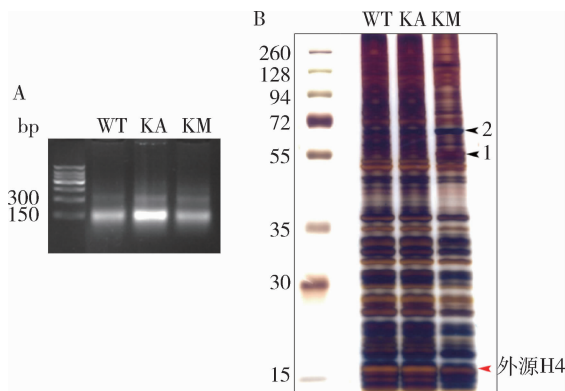


图 4 K20M 过表达细胞中个别蛋白表达量增高

A. 制备 mono - N, DNA 大小均在 150bp;B. IP 复合物银染图,黑色箭头所示高表达蛋白,红色箭头所示外源 H4 条带

RbAp46 是一种视网膜母细胞瘤结合蛋白家族,是一种具有肿瘤抑制作用的核蛋白,又叫做染色质重塑因子,在建立和维持染色质的结构方面发挥重要作用。有研究表明 RBBP7 蛋白是一种广泛表达的核蛋白,属于高度保守的 WD-repeat 蛋白家族(表 1)。

表 1 特异蛋白质谱分析

蛋白序列号	名称	肽段数
A2AFI9	RBBP7	29
Q60972	RBBP4	27
Q9D8E6	60Sribosomal protein L4	12

讨 论

表观遗传信号尤其是组蛋白的修饰在不同的生物过程中发挥了重要作用。组蛋白赖氨酸突变为蛋氨酸会影响相关组蛋白甲基转移酶的活性,并且被认为会促进肿瘤的发生,并影响肿瘤的预后与治疗。然而这种影响到底是如何发生的并不十分清楚。

本研究通过在新的甲基化位点即 H4K20 引入这种突变,来探究该位点突变所带来的生物学效应,发现该突变会通过阻滞细胞周期而影响细胞表型,抑制细胞分裂,通过质谱结果分析笔者发现这种突变会带来视网膜母细胞瘤结合蛋白家族成员 RBBP7 和 RBBP4,这两种蛋白在作为肿瘤抑制作用蛋白的同时,又是一种在建立和维持染色质结构方面具有重要作用的的高度同源的组蛋白分子伴侣,能够特异识别组蛋白 H4^[13]。研究表明该蛋白可以通过将其他蛋白结合到视网膜母细胞瘤蛋白上,也可以通过与 BRCA1 抑癌基因相互作用,在细胞增殖和分化的调控中发挥作用,通过与 RB 蛋白口袋区的结合控制 RB 蛋白的功能,从而干扰正常细胞的细胞周期和增加凋亡进而抑制肿瘤细胞的转化,在肿瘤细胞中还可以通过调节肿瘤抑制因子 WT1 的表达抑制肿瘤细胞的生长^[14]。笔者的研究揭示了组蛋白 H4K20M 突变对细胞的影响,即能够有效阻滞细胞周期于 G₂/M 期,而这种阻滞很可能是由于 RBBP7 和 RBBP4 所引起的,但具体的分子机制还需要进一步验证。为以后组蛋白修饰尤其是 H4K20 甲基化的功能方面研究提供了思路 and 方向。

参考文献

1 DeLange RJ, Fambrough DM, Smith EL, *et al.* Calf and pea histone

IV. II. The complete amino acid sequence of calf thymus histone IV; presence of epsilon - N - acetyllysine[J]. J Biol Chem, 1969, 244 (2): 319 - 334

2 Pannetier M, Julien E, Schotta G, *et al.* PR - SET7 and SUV4 - 20H regulate H4 lysine - 20 methylation at imprinting control regions in the mouse[J]. Embo Rep, 2008, 9(10): 998 - 1005

3 Oda H, Okamoto I, Murphy N, *et al.* Monomethylation of histone H4 - lysine 20 is involved in chromosome structure and stability and is essential for mouse development[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(8): 2278 - 2295

4 Eid A, Rodriguez - Terrones D, Burton A, *et al.* SUV4 - 20 activity in the preimplantation mouse embryo controls timely replication[J]. Genes Dev, 2016, 30(22): 2513 - 2526

5 Nicetto D, Hahn M, Jung J, *et al.* Suv4 - 20h histone methyltransferases promote neuroectodermal differentiation by silencing the pluripotency - associated Oct - 25 gene[J]. PLoS Genet, 2013, 9(1): e1003188

6 Everts AG, Manning AL, Wang X, *et al.* H4K20 methylation regulates quiescence and chromatin compaction[J]. Mol Biol Cell, 2013, 24(19): 3025 - 3037

7 Dai L, Ye S, Li HW, *et al.* SETD4 regulates cell quiescence and catalyzes the trimethylation of H4K20 during diapause formation in artemia[J]. Mol Cell Biol, 2017, 37(7):371 - 390

8 Schotta G, Lachner M, Sarma K, *et al.* A silencing pathway to induce H3 - K9 and H4 - K20 trimethylation at constitutive heterochromatin[J]. Genes Dev, 2004, 18(11): 1251 - 1262

9 Yokoyama Y, Matsumoto A, Hieda M, *et al.* Loss of histone H4K20 trimethylation predicts poor prognosis in breast cancer and is associated with invasive activity[J]. Breast Cancer Res, 2014, 16(3): 1339 - 1347

10 Lewis PW, Muller MM, Koletsky MS, *et al.* Inhibition of PRC2 Activity by a gain - of - function H3 mutation found in pediatric glioblastoma[J]. Science, 2013, 340(6134): 857 - 861

11 Fang D, Gan HY, Lee JH, *et al.* The histone H3.3K36M mutation reprograms the epigenome of chondroblastomas[J]. Science, 2016, 352(6291): 1344 - 1348

12 Sanders D, Qian S, Fieweger R, *et al.* Histone lysine - to - methionine mutations reduce histone methylation and cause developmental pleiotropy[J]. Plant Physiol, 2017, 173(4): 2243 - 2252

13 Murzina NV, Pei XY, Zhang W, *et al.* Structural basis for the recognition of histone H4 by the histone - chaperone RbAp46[J]. Structure, 2008, 16(7): 1077 - 1085

14 Guan LS, Rauchman M, Wang ZY. Induction of Rb - associated protein (RbAp46) by Wilms' tumor suppressor WT1 mediates growth inhibition[J]. J Biol Chem, 1998, 273(42): 27047 - 27050

(收稿日期:2017 - 03 - 31)

(修回日期:2017 - 05 - 09)