



Ash2l-1调控小鼠卵黄囊早期造血*

王晓晴^{1,2)} 卢绪坤²⁾ 向云龙²⁾ 李磊^{1,2)**}⁽¹⁾ 中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230026; ⁽²⁾ 中国科学院动物研究所, 干细胞与生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 作为甲基转移酶MLL/SET1复合体的核心成分之一, ASH2L能够促进组蛋白H3K4me3修饰的形成,并在小鼠早期胚胎发育过程中行使重要功能. 在小鼠中,由于启动子的选择性使用, *Ash2l*会转录成两种不同长度的转录本并形成两种蛋白质亚型: ASH2L-1和ASH2L-2. 目前有关该基因在小鼠胚胎发育中的作用机制及不同亚型的功能还不清楚. 本文利用CRISPR/Cas9技术特异敲除*Ash2l-1*并研究该亚型的生理学功能. 研究结果发现,当*Ash2l-1*缺失时,小鼠胚胎在E9.5~E10.5时发生致死. 特别是*Ash2l-1*^{-/-}E9.5胚胎的卵黄囊血管和早期造血发育存在明显缺陷. 转录组测序结果显示, *Ash2l-1*的缺失影响红细胞发育和成熟、血管发生和形成相关基因的表达. H3K4me3的CUT&RUN结果显示,在一些表达下调关键基因的启动子区, H3K4me3修饰水平出现下降. 以上结果表明, *Ash2l-1*在小鼠卵黄囊的早期造血和血管形成过程中是必不可少的,它可能是通过调控关键基因启动子区的H3K4me3修饰水平而控制这些基因的表达,从而在相关过程中行使功能.

关键词 *Ash2l*, H3K4me3, 早期胚胎发育, 卵黄囊, 早期造血, MLL/SET1复合体**中图分类号** Q3, Q7**DOI:** 10.16476/j.pibb.2020.0237

红细胞在氧气运输以及血管形态发生过程中具有非常重要的作用. 哺乳动物的造血发生是一个很复杂的过程,随着胚胎的发育,造血发生的场所也在不断地发生变化. 小鼠中的第一次造血发生在E7.5卵黄囊的血岛上,由特异性的原始造血祖细胞发育成成熟的原始红细胞(primitive erythroid, EryP),这个阶段被称为原始造血(primitive hematopoiesis). 卵黄囊的血岛是原始造血发生的唯一场所,在这个时期的卵黄囊上也出现了巨噬细胞和巨核细胞祖细胞^[1-3]. EryP的特点是细胞有核、胞体较大,并表达胚胎型血红蛋白(HBB-Y, HBB-BH1)^[4]. EryP维持时间较短^[5],随着胚胎的发育会发生去核^[6]. 在E8.25后出现的红细胞被称为永久红细胞(definitive erythroid, EryD), EryD最早发生的场所也是卵黄囊^[1]. 直到E10.5时,才在主动脉性腺中肾区发现与成体小鼠活性相同的造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs),随后HSCs种植于胎肝中并大量扩增,最后进入骨髓,成为成体造血的主要来源^[7-8].

在哺乳动物中,MLL/SET1家族甲基化转移酶对基因启动子H3K4的甲基化具有催化作用. SET1

家族至少包含6种多蛋白质复合体,分别是MLL1/MLL、MLL2、MLL3、MLL4、Set1A、Set1B^[9]. 这些甲基化转移酶具有相同的亚基:WDR5、RBBP5、ASH2L和DPY30,并称为WRAD,即SET1家族甲基化转移酶的核心成分^[10-12]. MLL自身是一个单甲基化转移酶^[13],需要WRAD的协助才具有二或三甲基化的作用^[14]. 作为SET1家族甲基化转移酶核心成分之一,ASH2L对H3K4三甲基化具有重要作用^[15]. 在小鼠和人类中,通过可变启动子的选择, *Ash2l*基因在RNA水平上可以产生两种亚型: *Ash2l-1*和*Ash2l-2*,进一步翻译成两种长度不同的蛋白质:ASH2L-1和ASH2L-2^[16-17].

*Ash2l*在小鼠胚胎发育、胚胎干细胞的多能性维持和体外红细胞的分化中都是必不可少的. *Ash2l*缺失的小鼠在胚胎早期(E3.5~E8.5)发生致死^[18]; *Ash2l*通过Wnt信号通路影响小鼠神经发育^[19]; *Ash2l*对维持小鼠胚胎干细胞的多能性和染

* 国家重点研发计划(2018YFC1004500)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-64807865, E-mail: lil@ioj.ac.cn

收稿日期: 2020-07-17, 接受日期: 2020-08-20

色体的开放状态具有重要的作用^[20]; 在体外红细胞分化过程中, ASH2L蛋白通过NF-E2与 β -globin基因结合并调控其H3K4的三甲基化^[21]. 然而, 目前有关*Ash2l*在小鼠胚胎发育和体内造血的作用机制还不清楚.

本文的研究结果显示, *Ash2l-1*缺失的小鼠在E9.5~E10.5时发生致死, 进一步观察发现卵黄囊上血管形态和红细胞数量出现了明显异常. E8.5卵黄囊转录组测序分析显示血管发生与早期造血关键基因出现显著下调, 同时期的卵黄囊CUT&RUN结果显示一些表达下调的关键基因启动子区H3K4me3修饰水平降低, 提示*Ash2l-1*可能通过调控这些关键基因启动子区域H3K4me3修饰水平进而调控相关基因表达, 从而在血管形成和红细胞发生中行使重要作用.

1 材料与方法

1.1 *Ash2l-1*敲除小鼠的构建与饲养

根据实验室之前的研究方法^[22], 利用在线设计网站 (<http://crispr.mit.edu/>) 设计靶向*Ash2l-1*第一个外显子起始密码子下游67 bp位置的sgRNA, F: 5'-TAGGCTCTCGGTCCTCCGCCGT-TG-3', R: 5'-AAACCAACGGCGGAGGACCGA-GAG-3'. 将gRNA克隆到pUC57载体上, 经过转化扩增后体外转录. 以pX330为模板, 将T7启动子添加到Cas9编码区, 扩增后体外转录. 将100 mg/L Cas9 mRNA、50 mg/L sgRNA混合液注射到小鼠合子细胞中, 移植到假孕雌鼠输卵管中. 根据gRNA靶位点设计鉴定引物, F: 5'-CCCCTTAA-GAGCGCCGT-3', R: 5'-TTGCAAGAGGGATC-AGCGAG-3'. 本实验中使用的鼠均在中国科学院动物研究所无特定病原体级别饲养条件下饲养.

1.2 血红蛋白着色

浓储液: 邻联茴香胺 (Sigma, D9143-5G) 溶于70%乙醇中, 浓度为2 g/L. 工作液成分为: 2 ml浓储液, 500 μ l pH 4.5的0.1 mol/L醋酸钠, 2 ml去离子水, 以及100 μ l 30%过氧化氢, 混匀, 现配现用. 避光条件下染色15~30 min.

1.3 HE染色

将样品组织在4% PFA中4 $^{\circ}$ C固定过夜, 经过30%乙醇-50%乙醇-70%乙醇-80%乙醇-95%乙醇-无水乙醇-无水乙醇脱水后用石蜡包埋, 包埋后的组织切成厚度为5 μ m的组织片, 固定在载玻片上烘干后, 脱蜡复水, 依次用苏木精和伊红染细胞核

和细胞质.

1.4 蛋白质免疫印迹

根据细胞的数量或组织的大小, 加入适量的RIPA裂解液和蛋白酶抑制剂充分裂解, RIPA裂解液成分为: 50 mmol/L Tris-HCl, 1%脱氧胆酸钠, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 5~10 mmol/L NaF. 利用BCA蛋白质浓度检测试剂盒 (碧云天, P0012S) 测出蛋白质浓度, 并将样品调整至同样浓度. 配制浓度为10%、厚度为1.5 mm的SDS-PAGE胶板. 相同体积点样后, 120 V电泳1.5~2 h, 200 mA转PVDF膜2 h, 5%脱脂牛奶室温封闭1 h, 加一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜, PBST洗3遍后, 加二抗室温孵育2 h. PBST洗3遍后, 加显影液Pierce ECL substrate (Thermo Fisher Scientific, #34080), 在Quantity One software (Bio-Rad Laboratories) 仪器上显影并拍照.

1.5 小鼠胚胎干细胞的建系及培养

冲出孕鼠子宫中E3.5囊胚, 接种在MEF细胞上, 用15%KSR/2iLif培养基培养, 培养基成分为: DMEM basic (Gibco, C11995500BT)、15% KSR (Gibco, 10828-028)、1 \times GlutaMAX (Gibco, 35050061)、1 \times NEAA (Gibco, 11140050)、1 \times Penicillin-Streptomycin (Gibco, 15140122)、1 \times beta 2- 巯基乙醇 (Invitrogen, 21985-023)、CHIR99021 (LC Laboratories, C-6556)、LIF (Millipore, ESG1107)、PD0325901 (LC Laboratories, P-9688). 培养1周后, 用口吸管挑出克隆, 用胰酶替代物 (Gibco, 12605-010) 消化成单细胞后, 接种在明胶包被的培养皿中, 用2iLif培养基培养. 生长至3~4 d后, 用0.25%胰酶 (Gibco, 25200072) 消化成单细胞后传代, 之后每隔2~3 d传代.

1.6 拟胚体诱导

参考之前的研究方法^[23], 小鼠胚胎干细胞(mESCs)克隆消化成单细胞后, 按照5 000个/ml的密度接种在细菌级别的10 cm培养皿中悬浮培养, 培养基为5% KSR/N2B27, 成分为: 5% KSR、DMEM/F12 (Gibco, 11330032)、Neurobasal Medium (Gibco, 21103049)、1 \times GlutaMAX、1 \times NEAA、1 \times Penicillin-Streptomycin、0.1 mmol/L β -巯基乙醇、B27 supplement (Gibco, 17504044)、N2 (Gibco, 17502048). 悬浮培养5 d形成拟胚体球时, 转移至明胶包被的培养皿中, 用含15% FBS

(Millipore, ES-009-B) 的 DMEM basic 贴壁培养, 48 h 后, 拟胚胎克隆出现跳动.

1.7 畸胎瘤实验

小鼠胚胎干细胞消化成单细胞后, 用 DMEM basic 培养基稀释至 10^6 个/200 μ l. 分别在 6 周龄的雄性裸鼠左右腹股沟位置注射对照组和实验组胚胎干细胞, 4 周后, 用脱臼法处死小鼠并取材.

1.8 实时荧光定量 PCR

根据试剂盒推荐方法, 用 RNAzol 裂解液 (MRC, RN190-200) 裂解细胞或组织后提取

mRNA, 经过 NanoDrop (malcom) 测定浓度以后, 采用 PrimeScript RT Reagent Kit 试剂盒 (TaKaRa, RR037A) 的操作步骤, 以大约 500 ng mRNA 为模板反转录成 cDNA, 反转录完成后, 稀释 10 倍. PCR 体系为: 2 μ l cDNA 样品、5 μ l $2\times$ qPCR MasterMix (abm, MasterMix-S)、0.4 μ l 引物、2.6 μ l 去离子水. 在 Light Cycler 480 instrument (Roche) 仪器上测出各个样品的 C_t 值之后, 根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算每个基因的相对表达量. 引物序列见表 1.

Table 1 Primers for real-time quantitative PCR

Genes	Primer sequences (5' → 3')
<i>Ash2l-1</i>	F: GAGGACCGAGAGACAGAGCC; R: AGTTTGCATCCCCACTTTTCG
<i>Ash2l-2</i>	F: ATGAAGGAGGAGGCCAGGAC; R: CCGCCTGGGTATCCATCAC
<i>Hbb-y</i>	F: CAATGTTGAAGAGGTTGGTGGTG; R: GGACAAGTCCCAAAGCTGTCA
<i>Hbb-bh1</i>	F: ATGGACAACCTCAAGGAGACCT; R: TGGCAAAATGAGTAGAAAGGACA
<i>Hbb-b1</i>	F: ACATAGTTGTGTGACTCACAAACC; R: AACTTCATCGGAGTTCACCTTTC
<i>Hbb-b2</i>	F: AGTCTGTTGTGTGACTTGCAACTT; R: TTCATCGGGGTTTACCTTTG
<i>Colla2</i>	F: GTAACCTTCGTGCCATGCAACA; R: CCTTTGTCAGAATACTGAGCAGC
<i>Sox18</i>	F: CGTTTCCCAATCCTCTGTC; R: CCAAAGGTCGGCGGTAG
<i>Pdgfrb</i>	F: CACCAGCGAGGTTTCAC; R: GTCCACTTCCCTGTCCC
<i>Gja4</i>	F: ATCTCCCTGGTGCTCAAC; R: GTCCCTTCGTGCCTTTA
<i>Klf1</i>	F: CAAGTGGTGGCGGTCTG; R: GGGTCCTCCGATTTCAG
<i>Tall</i>	F: GCAGCAGAATGTGAATGGG; R: ATGGCAAGGCGGAGGA
<i>Plxnd1</i>	F: CGGCTCAGTGATGTGG; R: CTCCTCTGAAACGGTGTAT
<i>Eng</i>	F: AACTGACGACCATCTTG; R: AGCCTGACGGGAAACT
<i>Ramp2</i>	F: TTTGATTAGCAGGCATTAC; R: AAGGGATTGGGAAGC
<i>Angptl6</i>	F: CTGGGCCGTCGTGTAGTAG; R: CAGTCCTCTAGGAGTATCAGCAG
<i>Rhag</i>	F: AGCCTGGAAGTTGCTATGATTG; R: ACTTGAGGTGTTACCCTGCTG
<i>Ank1</i>	F: ACTGGACTGGGATAAACA; R: CGTGACCTCCTCTTGC
<i>Dmt1</i>	F: TGTGGGCTACAAGGAT; R: GGAGGAATAGGTTAAAGTG
<i>Colla1</i>	F: GCTCCTCTTAGGGGCCACT; R: CCACGTCTACCATTGGGG

1.9 免疫荧光

收集细胞, 用 PBS 洗一次后加入 4% PFA, 在室温条件固定 15 min, 用 0.5% Triton-X100 打孔 30 min, 1% BSA 在室温条件封闭 1 h, 加入一抗在 4°C 条件下孵育过夜. 第二天用 PBS 洗 3 遍, 加入荧光二抗在室温条件下孵育 2 h, 在荧光显微镜下观察并拍照.

实验中使用的一抗及货号: ASH2L 抗体 (Cell signaling technology, #5019)、H3K4me3 抗体 (Millipore, #04-745)、SOX2 抗体 (Cell signaling technology, #4900)、NANOG 抗体 (Abcam, ab80892)、OCT4 抗体 (Santa, sc8628)、 β -actin

抗体 (Sigma -Aldrich, A2228) .

1.10 CUT&RUN

参考之前的文献^[24-25], E8.5 的卵黄囊消化成单细胞后, 取 10 000 个细胞用 PBS 洗一遍后, 加入 60 μ l 清洗缓冲液 (20 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.5; 150 mmol/L NaCl; 0.5 mmol/L Spermidine) 和 10~20 μ l 结合缓冲液 (20 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.9; 10 mmol/L KCl; 1 mmol/L CaCl₂; 1 mmol/L MnCl₂) 重悬的刀豆素 A 磁珠, 室温孵育 10 min. 加入 50 μ l 抗体缓冲液 (H3K4me3, 1:100) (H3K4me3 抗体由清华大学颀伟老师馈赠) 重悬, 4°C 过夜孵育. 于磁力架上用清洗缓冲

液清洗两遍, 加入 50 μ l 含有 pA-MNase 的清洗缓冲液重悬, 4 $^{\circ}$ C 孵育 3 h. 洗 3 遍后冰置 2 min, 加入 2 μ l 100 mmol/L CaCl_2 , 冰上孵育 20 min. 加入 100 μ l 终止缓冲液 (340 mmol/L NaCl; 20 mmol/L EDTA, pH 8.0; 4 mmol/L EGTA, pH 8.0; 50 mg/L RNase A; 100 mg/L 肝糖原 (glycogen); 0.005% 毛地黄苷 (digitonin)) 终止反应. 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, 以释放片段. 在样品中加入 1 μ l 20% 的 SDS、2 μ l 蛋白酶 K 和 10 ng 载体 RNA (Qiagen, 1068337) 消化, 56 $^{\circ}$ C 反应 45 min. 用苯酚-氯仿-异戊醇 (25 : 24 : 1) 和乙醇纯化 DNA. 纯化后的 DNA 用 KAPA Hyper Prep Kit (KAPA biosystems, KK8502) 建 Tru-seq 库.

CUT&RUN 文库采用双端测序获得数据, 测序数据比对到 mm9 参考基因组. 通过计算 100 bp 序列框的 rpkm 值对数据进行可视化. 在做 spike-in 标准化分析时, 终止缓冲液中加入终浓度为 2 ng/L 的酵母 DNA 作为 spike-in. 得到的测序数据同时比对到小鼠和酵母基因组. 不同样品之间利用比对到酵母基因组的 reads 数和样品细胞数对可能由于测序深度和细胞总数不同造成的信号差异进行标准化分析.

2 结 果

2.1 *Ash2l-1* 敲除小鼠的构建与鉴定

利用 CRISPR/Cas9 技术, 设计靶向 *Ash2l-1* 起始密码子下游 67 bp 位置的 gRNA (图 1a). 将 gRNA/Cas9 mRNA 混合液注射进合子细胞并移植到小鼠输卵管内, 测序结果显示产生一条等位基因上缺失 47 个碱基的杂合后代, 通过设计的鉴定引物, 用 PCR 扩增出两条长度不同的条带, 其中一条 526 bp (野生型), 另一条 479 bp (敲除型) (图 1b). 观察发现杂合敲除小鼠可以正常发育且可育, 但是杂合鼠之间交配却得不到纯合敲除的后代, 分析不同天数的胚胎基因型发现 *Ash2l-1* 纯合敲除的小鼠在 E9.5~E10.5 时发生了致死, E9.5 纯合敲除胚胎明显小于野生型胚胎, 心脏和体节发育异常^[26]. 利用实时荧光定量 PCR 和免疫印迹技术对比野生型与 *Ash2l-1* 缺失的 E9.5 胚胎 *Ash2l-1* 表达量, 结果证明在纯合缺失的胚胎中 *Ash2l-1* 能够被有效地敲除 (图 1c, d). 同时, 结果显示 *Ash2l-2* 的 mRNA 水平在 *Ash2l-1* 纯合缺失胚胎中出现一定程度的上调 (图 1e). 这些结果表明 *Ash2l-1* 特异敲除小鼠被成功构建.

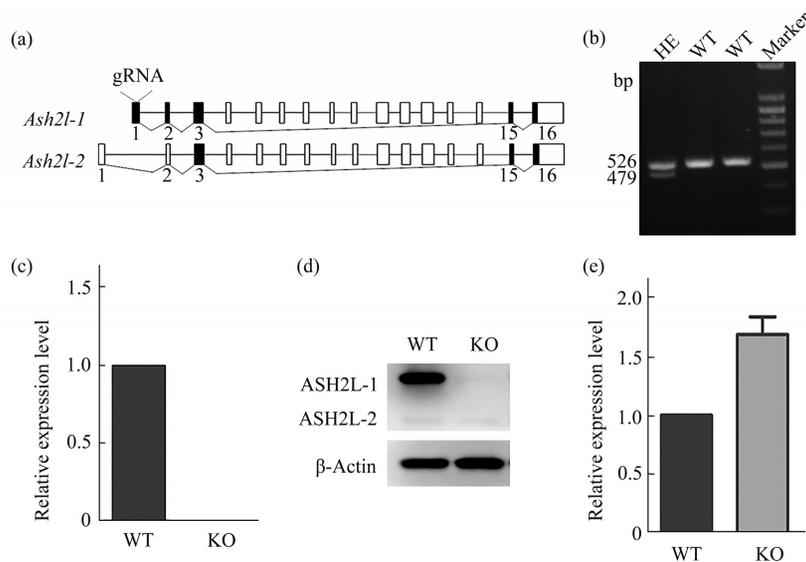


Fig. 1 Generation of *Ash2l-1* gene knockout mice

(a) Schematic representation of the knockout targeting strategy, the targeting region located in exon 1. (b) Genomic PCR analysis of wild-type (WT) and heterozygosis (HE). (c) RT-qPCR analysis of *Ash2l-1* expression in wild-type and knockout (KO) E9.5 embryos. (d) Knockout efficiency was detected by Western blot (ASH2L-1: 80 ku; ASH2L-2: 65 ku) in E9.5 embryos. (e) RT-qPCR analysis of *Ash2l-2* expression in WT and KO E9.5 embryos.

2.2 *Ash2l-1*调控卵黄囊的血管形成与早期造血

为了分析小鼠胚胎致死的原因,分别取不同时期的小鼠胚胎进行观察,发现*Ash2l-1*的缺失明显影响了胚外组织-卵黄囊上的血管形态与造血发生.在正常小鼠E9.5胚胎的卵黄囊上可以观察到有明显的卵黄管和毛细血管,但在*Ash2l-1*敲除的卵黄囊上几乎观察不到血管(图2a).用邻联茴香胺(o-dianisidine)进行血红蛋白着色实验,结果发

现,在*Ash2l-1*缺失的卵黄囊上虽然有红细胞的存在,但是红细胞数量明显减少(图2b).为进一步研究卵黄囊发育,我们取E9.5的卵黄囊进行切片并染色.HE染色结果显示*Ash2l-1*敲除的卵黄囊上红细胞排列散乱(图2b),内皮标记蛋白PECAM-1的免疫荧光染色表明*Ash2l-1*缺失导致卵黄囊上的血管发生明显异常(图2c).这些结果表明*Ash2l-1*参与卵黄囊的血管形成与早期造血.

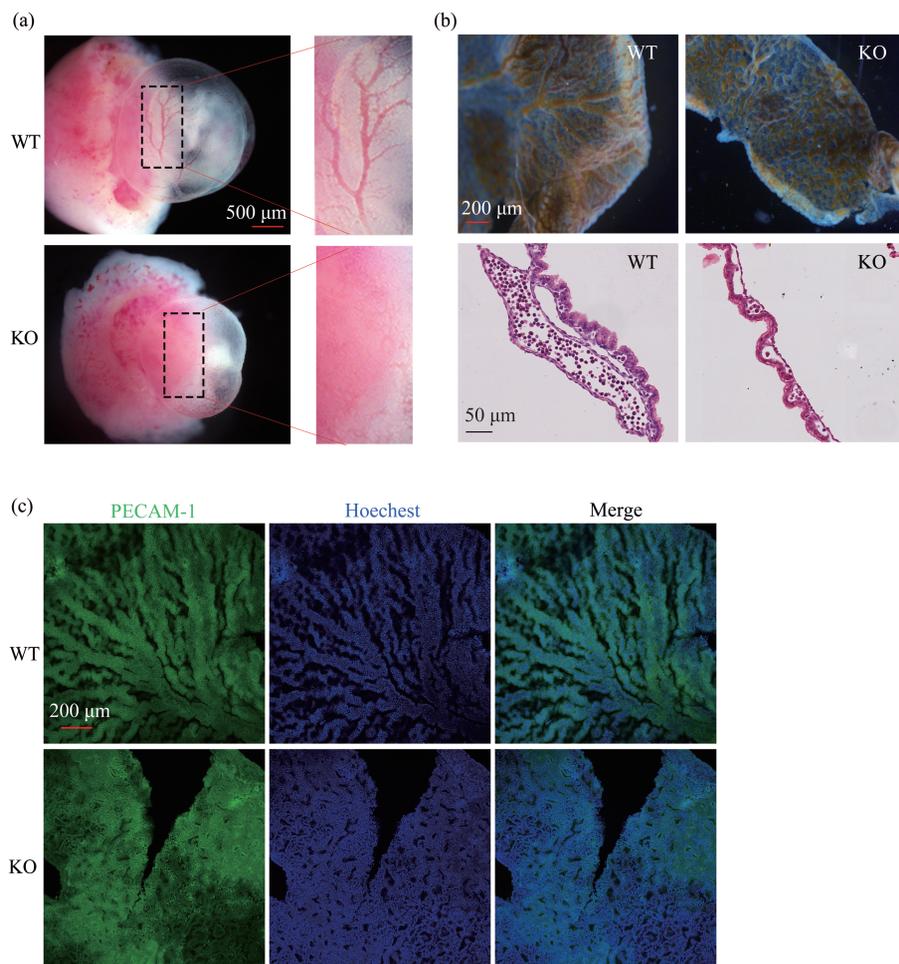


Fig. 2 Vascular and hematopoiesis defects in *Ash2l-1*^{-/-} E9.5 yolk sacs

(a) Morphology of wild-type(WT) and knockout (KO) yolk sac at E9.5. (b) O-dianisidine staining of hemoglobin in erythrocytes and HE staining of E9.5 yolk sacs. (c) Immunostaining with endothelial specific marker PECAM-1.

2.3 *Ash2l-1*调控血管和早期造血发生相关基因表达

造血发生是胚胎发育成功的关键过程,原始造血是所有造血发生的前提^[27].本研究对正常和敲除组小鼠的卵黄囊进行测序,以探讨*Ash2l-1*调控血管与造血的分子机制.为了减少基因敲除产生的次级影响,选取在形态上没有明显差异的E8.5卵

黄囊,经过基因型鉴定以后,进行转录组测序分析.与对照组相比,*Ash2l-1*敲除的卵黄囊上调的基因105个,下调的基因220个(Fold change \geq 1.5).GO分析结果表明上调基因主要参与胎盘发育(Tex19.1、Cdkn1c、Gjb3)、端粒维持(Smc6、Rad50)、MAPK的激活(Spag9、Frs2、Ghr)等过程(图3a).而下调基因主要参与血管发育和红细胞

胞形成(图3b)。值得注意的是,其中下调基因中包括6个血管发育基因(*Coll1a1*、*Coll1a2*、*Sox18*、*Pdgfrb*、*Epha2*、*Gja4*),12个血管生成基因(*Acvrl1*、*Plxnd1*、*Mmp2*、*Mmrn2*、*Casp8*、*Ramp2*、*Eng*、*Mmp14*、*Angptl6*、*Tal1*、*Sox18*、*Epha2*),4个红细胞成熟基因(*Klf1*、*Tal1*、*Epb42*、*Hba-x*),7个红细胞发育基因(*Hba-a1*、

Hba-a2、*Dmtn*、*Ank1*、*Bpgm*、*Klf1*、*Rhag*),5个血红蛋白基因(*Hba-x*、*Hba-a1*、*Hba-a2*、*Hbb-bh1*、*Hbb-y*) (图3b, c)。实时荧光定量PCR进一步验证了重要功能基因在正常与敲除卵黄囊中的表达(图3d)。*Hbb-bh1*和*Hbb-y*是原始红细胞特异性表达的基因,这两者的表达下调说明小鼠卵黄囊可能在初级造血时就发生了异常。

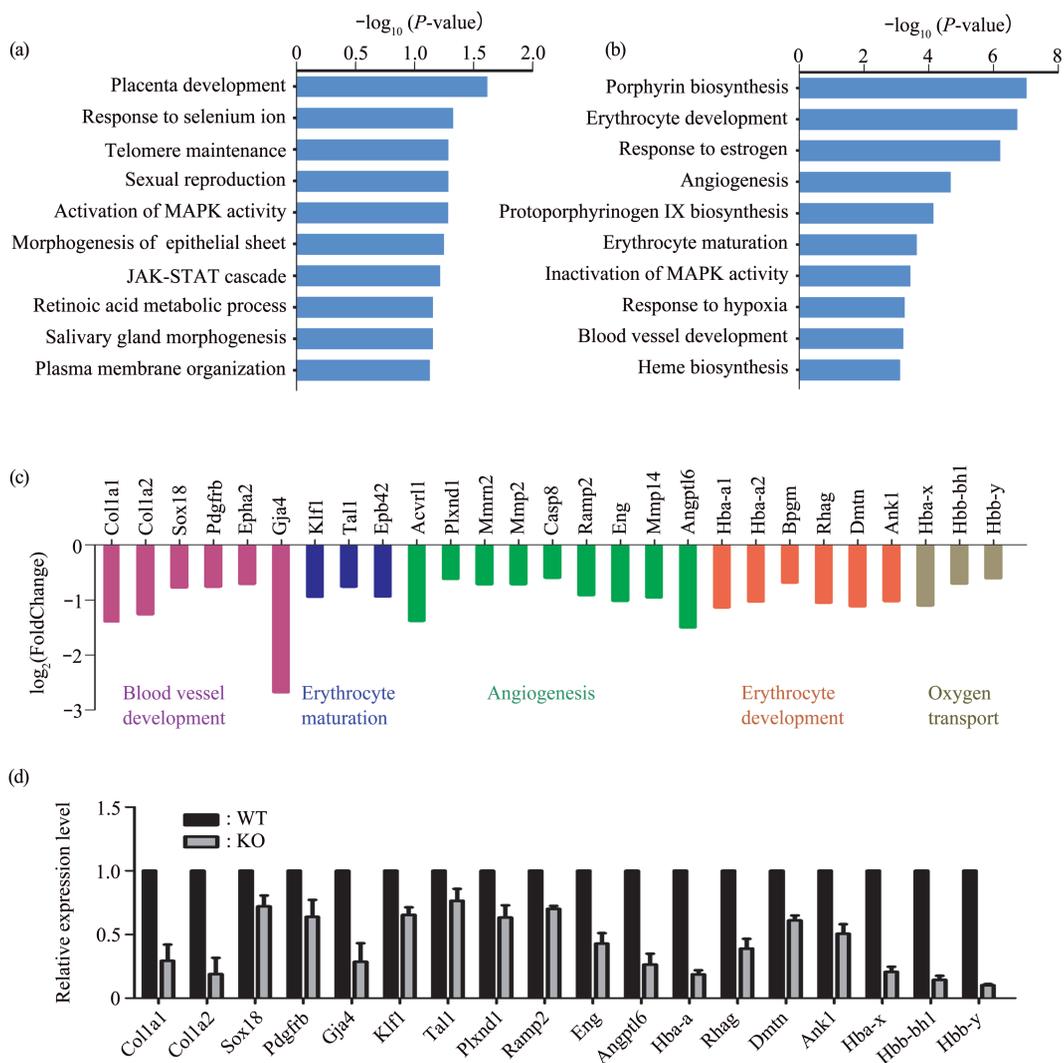


Fig. 3 RNA-seq analysis of E8.5 *Ash2l-1*^{-/-} yolk sac

(a) Gene ontology analysis of top *Ash2l-1* null up-regulated genes ($-\log_{10}(P\text{-value}) \geq 1$). (b) Gene ontology analysis of top *Ash2l-1* null down-regulated genes. (c) Differential expression of select top downregulated genes from different functional categories. (d) RT-qPCR analysis of some down-regulated genes expression.

2.4 *Ash2l-1*^{-/-}小鼠胚胎干细胞的建立

小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)具有自我更新、多向分化以及无限传代的特征,因此是体外研究早期胚胎发育和分化很好的

模型^[28]。通过取体内E3.5的囊胚,建立对照组(WT)和实验组(1#-KO和2#-KO)mESCs。接种当天记为第0天,每个3.5 cm培养皿接种细胞数量为 10^4 个,对不同生长天数的细胞进行计数,与对

对照组相比, *Ash2l-1*^{-/-}的mESCs生长速度没有明显变化(图4a). 实时荧光定量PCR与免疫荧光的结果显示 *Ash2l-1*^{-/-} mESCs的 *Oct4*、*Nanog* 和 *Sox2* 的 mRNA 和蛋白质表达与正常对照组相比没有明显差

异(图4b, c). *Ash2l-1*^{-/-} mESCs的碱性磷酸酶活性也没有明显变化(图4d). 这些结果说明 *Ash2l-1* 的缺失可能对mESCs的生长速度和多能性没有影响.

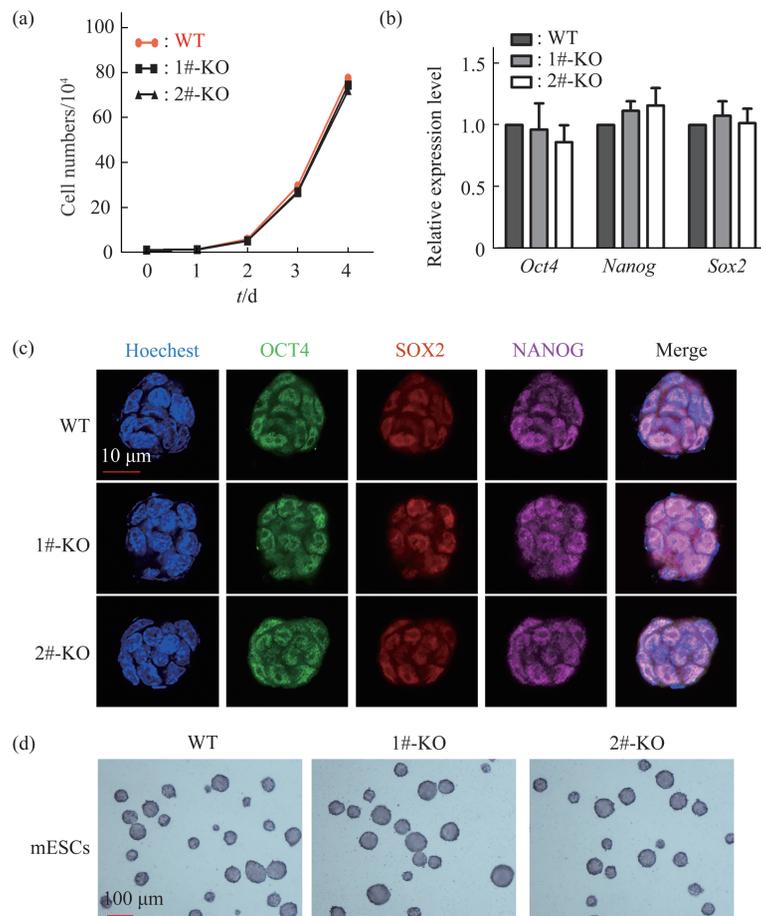


Fig. 4 Pluripotency characterization of *Ash2l-1*^{-/-} mESCs

(a) Growth rates of mESCs from day 0 to day 4. (b) RT-qPCR of *Oct4*, *Sox2* and *Nanog* in mESCs. (c) Immunostaining with Hoechst, OCT4, SOX2 and NANOG in mESCs. (d) Alkaline phosphatase assay of mESCs.

2.5 *Ash2l-1*^{-/-}小鼠胚胎干细胞的分化

体外诱导拟胚体(embryoid bodies, EBs)可以模拟胚胎发育,包括胚胎早期的血管和红细胞的形成^[29-30].为了进一步研究 *Ash2l-1* 在血管和造血发育过程中的重要作用,分别将对照组和敲除组的mESCs向EBs分化.悬浮培养5 d时,与对照组相比, *Ash2l-1*^{-/-} EBs球形状偏小,并且其EBs大小差别更加显著(图5a).在贴壁培养48 h后,EBs克隆出现心肌细胞样跳动,其中野生型比例约为98%,而 *Ash2l-1*^{-/-}跳动的比例明显减少(56%)(图5b).用实时荧光定量PCR技术分别检测血红蛋

白、红细胞发育以及血管发生相关基因的表达,结果显示,在 *Ash2l-1* 缺失的EBs克隆中,这些基因的表达均出现了明显的下降(图5c).

利用畸胎瘤实验研究 *Ash2l-1* 的缺失对mESCs分化的影响,结果显示:由于 *Ash2l-1* 的缺失,导致畸胎瘤的形态和重量明显变小(图5d, e). *Ash2l-1*^{-/-}的畸胎瘤切片HE染色结果中,观察到有外胚层、中胚层、内胚层来源的组织,但是中胚层来源的红细胞数量明显变少(图5f).

以上结果再一次表明 *Ash2l-1* 的缺失可能影响了血管和红细胞的发育.

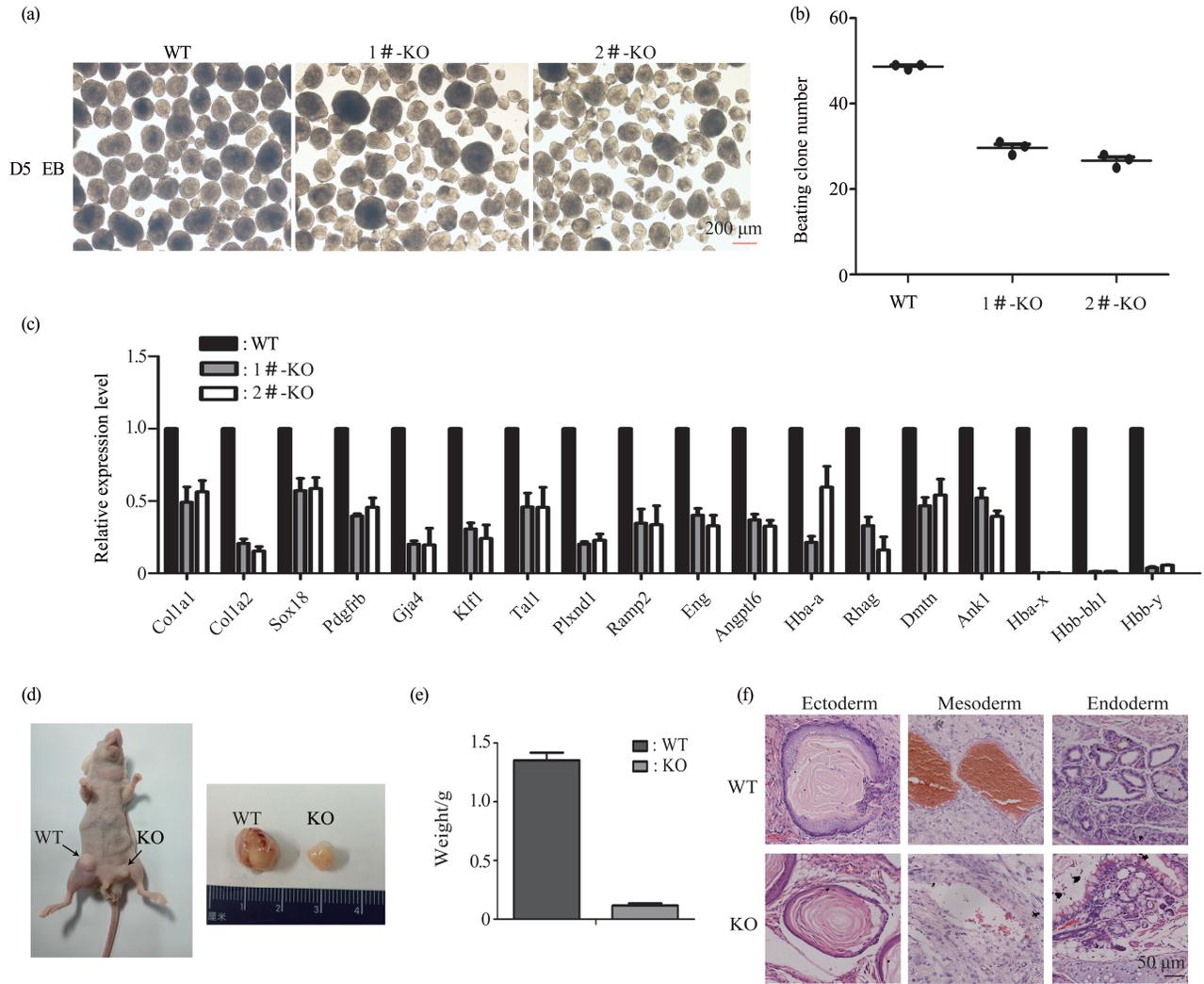


Fig. 5 Vascular and hematopoietic defects in *Ash2l-1*^{-/-} EBs and teratoma

(a) EBs ball morphology observation on day 5. (b) The number of beating clones per 50 EBs on day 7. (c) RT-qPCR of beating EBs. (d) Wild-type versus *Ash2l-1*^{-/-} teratomas in nude mice after 4 weeks. (e) Weight of teratomas. (f) HE staining of paraffin sections of teratomas.

2.6 *Ash2l-1* 通过 H3K4me3 调控血管和红细胞相关基因表达

在以前的报道中显示 ASH2L 与 H3K4 的三甲基化修饰有关^[15]. 检测 E8.5 卵黄囊的 H3K4me3 水平, 免疫印迹结果显示: 由于 *Ash2l-1* 的缺失导致 H3K4me3 在 E8.5 卵黄囊中严重下调 (图 6a); 在 *Ash2l-1*^{-/-} 的 mESC 中, H3K4me3 没有明显变化; 但是随着细胞的分化, H3K4me3 在 EBs 中发生了显著的下调 (图 6a). 同时, 观察到 *Ash2l-1*^{-/-} 缺失的 mESC 中, ASH2L-2 蛋白质水平没有明显下降, 进一步证明本实验特异性敲除 *Ash2l-1* 亚型, 而没有影响 *Ash2l-2* 亚型 (图 6a).

为了进一步研究 H3K4me3 的修饰水平与下游基因表达之间的关系, 取 E8.5 卵黄囊并消化成单细胞, 利用 CUT&RUN 技术检测在正常组和 *Ash2l-1* 敲除组中基因的 H3K4me3 修饰水平, 结果显示全基因组的启动子区 H3K4me3 修饰水平发生显著下降 (图 6b, c). 表达下调的关键基因 (比如 *Gja4*、*Tall*、*Coll1a1*、*Angptl6*、*Rhag*、*Hba-x*) 启动子区域的 H3K4me3 修饰水平也出现了明显下降 (图 6d), 这说明 *Ash2l-1* 有可能是通过调控相关基因启动子区域的 H3K4me3 修饰影响血管和红细胞相关基因的表达.

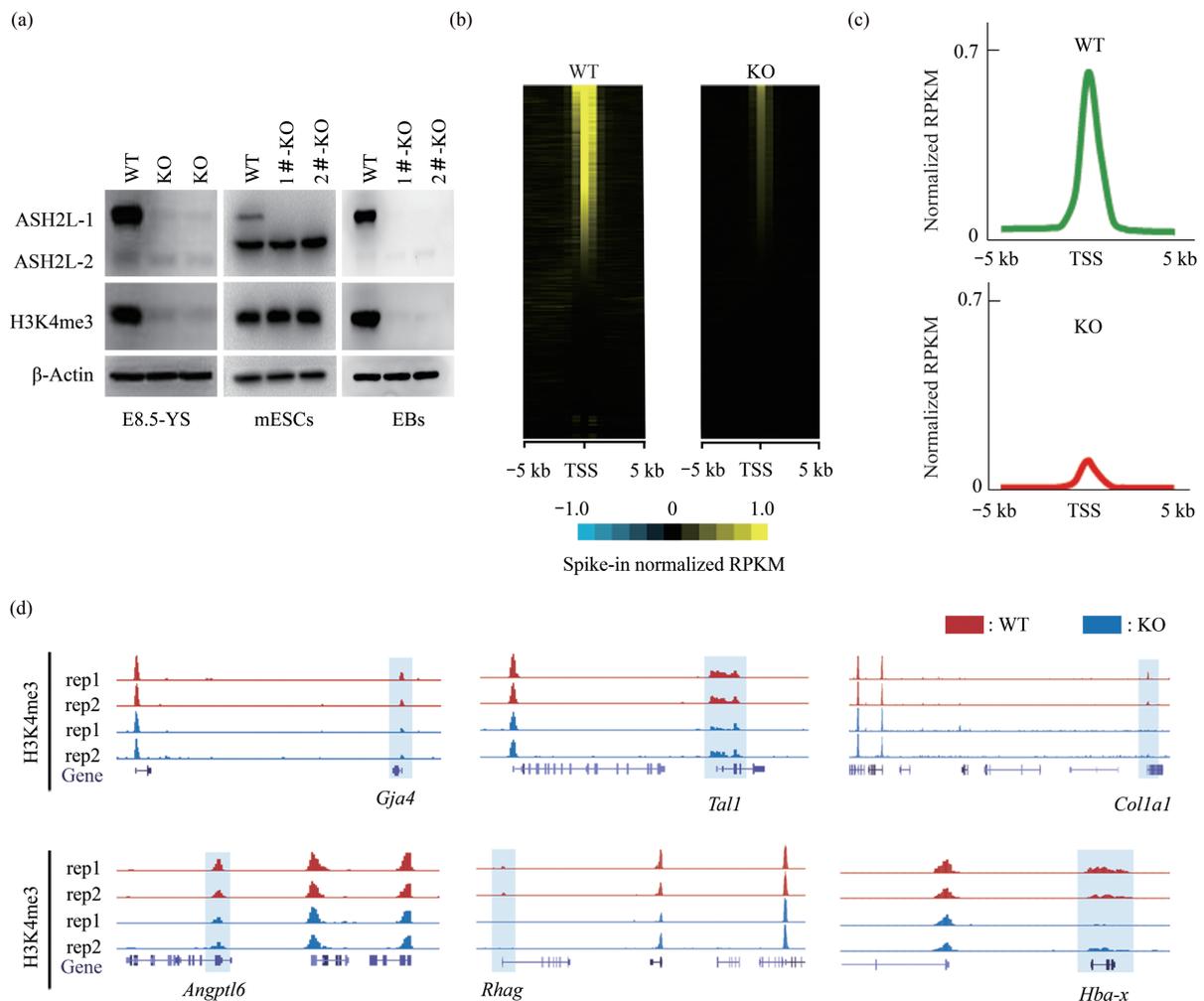


Fig. 6 The effect of *Ash2l-1* knockout on E8.5 yolk sac H3K4me3

(a) Western blot of H3K4me3 in E8.5 yolk sac(YS), mESCs and EBs. (b) The heatmaps showing the H3K4me3 enrichment of genome-wide transcriptional start sites (TSS) in WT and KO yolk sacs, 2 ng/Lyeast DNA termination buffer as Spike-in. (c) Curve graphs showing H3K4me3 for global genes. (d) Snapshots showing the enrichment of H3K4me3 at genes promoter region of *Gja4*, *Tall*, *Colla1*, *Angptl6*, *Rhag*, *Hba-x*.

3 讨 论

以前利用基因捕获敲除小鼠模型表明 *Ash2l* 在小鼠早期胚胎发育中是必不可少的, 该基因捕获方式可能敲除 *Ash2l-2*, 但是由于该基因捕获载体正好插入 *Ash2l-1* 的启动子区域, 可能同时也影响 *Ash2l-1* 的表达^[18]; 此外, 特异敲除 *Ash2l-2* 基因的表现型与该基因捕获敲除小鼠表现型不同^[26]; 因此 *Ash2l* 亚型的生理功能还不清楚. 本研究针对 *Ash2l* 的其中亚型之一 *Ash2l-1* 进行了研究, 发现 *Ash2l-1* 的缺失导致小鼠卵黄囊的 H3K4me3 明显下调, 胚胎在 E9.5~E10.5 期间发生致死, *Ash2l-1*^{-/-} 卵黄囊上血细胞数量变少, 血管结构紊乱. 全基因组测序和

实时荧光定量 PCR 鉴定结果显示, *Ash2l-1* 影响了卵黄囊上的血管发生和形成、红细胞发育和成熟等相关基因的表达. 卵黄囊是原始红细胞发生的唯一场所, 在 E7.5~E8.5 期间, 原始红细胞会在卵黄囊上大量扩增^[31-32]. 值得注意的是, 在 E8.5 *Ash2l-1* 缺失的卵黄囊以及体外诱导的拟胚体中原始红细胞特异性基因 (*Hbb-bh1*、*Hbb-y*) 的表达出现了严重的下调, 这些结果说明 *Ash2l-1* 的缺失可能对小鼠的初级造血就产生了影响.

除了卵黄囊上血管和红细胞发育异常外, 还观察到当 *Ash2l-1* 缺失时, 小鼠胚胎内的器官发育也出现了严重的缺陷: 比如体节和心脏发育异常^[26], 这些器官都是由中胚层分化而来. 在 E7.0~E7.5 时, 组成卵黄囊上血岛的内皮和造血细胞也是来源于中

胚层^[33-34], 所以卵黄囊和器官的发育异常可能是因为 *Ash2l-1* 的敲除影响了中胚层形成. 有关 *Ash2l-1* 如何调控中胚层的分化值得进一步研究.

作为 H3K4 甲基化转移酶核心成分之一, *Ash2l* 主要影响了基因启动子区域的 H3K4 三甲基化水平^[15]. *Ash2l-1* 的缺失对小鼠胚胎干细胞的增殖和多能性没有明显影响, 而且在 *Ash2l-1* 缺失的 mESCs 中 H3K4me3 也没有发生显著变化, 这可能由于 *Ash2l-2* 的功能补偿. 随着细胞的分化, *Ash2l-1* 的缺失影响了拟胚体和畸胎瘤分化过程中血管的形成和红细胞的生成, 并且影响了拟胚体中 H3K4me3 水平. E8.5 卵黄囊 CUT&RUN 的结果显示, 当 *Ash2l-1* 缺失时, 表达下调的功能基因启动子区的 H3K4me3 修饰水平明显下降, 说明 *Ash2l-1* 可能是通过 H3K4me3 的修饰调控红细胞和血管发生相关基因的表达. 有关 *Ash2l-1* 和 *Ash2l-2* 如果阶段性调控小鼠早期胚胎发育值得深入研究.

SET/MLL 家族的 6 种成分在哺乳动物中的造血过程中都发挥着至关重要的作用: MLL1 在小鼠中影响卵黄囊上永久造血祖细胞的分化, 以及胎肝和成体中 HSCs 的分化和自我更新^[7, 35-37]; MLL2 在巨噬细胞中介导细胞因子信号通路^[38]; MLL3 调控造血干细胞的分化^[39]; MLL4 在造血应激反应中是必需的^[40]; Setd1a 作用于造血干细胞和祖细胞的分化^[41-42]; Setd1b 在维持成体造血干细胞的稳态过程中发挥重要作用^[43]. 以前的研究表明, *Ash2l* 可能在红细胞的分化过程中也具有非重要的作用. 例如, 在白血病细胞株中以及在白血病细胞株向红细胞分化的过程中 *Ash2l* 的表达量都处于比较高的水平^[16], *Ash2l* 的缺失会抑制小鼠红白血病细胞的终末分化^[21], *Ash2l* 在小鼠的成体造血干细胞增殖与分化过程中也是必不可少的^[44]. 此外, 临床研究表明, ASH2L 蛋白的低表达与急性白血病患者的存活率相关^[45]. 本研究利用 CRISPR/Cas9 技术特异性敲除 *Ash2l-1*, 证明 *Ash2l-1* 是小鼠早期胚胎发育必需的, 该基因的缺失影响了小鼠卵黄囊上的红细胞和血管发生关键基因的表达, 同时发现 *Ash2l-1* 缺失导致一些关键基因启动子区域 H3K4me3 水平明显下降. 这些结果表明, *Ash2l-1* 可能通过调控启动子区域的 H3K4me3 控制关键基因的表达, 从而参与小鼠卵黄囊早期造血. 因此, 本研究第一次报道了 *Ash2l* 亚型在小鼠胚胎发育中的生理功能, 揭示了 *Ash2l* 在小鼠早期造血中的功能和可能的分子作用机制, 为 *Ash2l* 在哺乳动物早

期胚胎发育和早期造血中的作用机制提供了新的认识.

参 考 文 献

- [1] Palis J, Robertson S, Kennedy M, *et al.* Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development*, 1999, **126**(22): 5073-5084
- [2] Palis J, Yoder M C. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Experimental Hematology*, 2001, **29**(8): 927-936
- [3] Bertrand J Y, Jalil A, Klaine M, *et al.* Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood*, 2005, **106**(9): 3004-3011
- [4] Leder A, Kuo A, Shen M M, *et al.* *In situ* hybridization reveals co-expression of embryonic and adult alpha globin genes in the earliest murine erythrocyte progenitors. *Development*, 1992, **116**(4): 1041-1049
- [5] Brotherton T W, Chui D H, Gauldie J, *et al.* Hemoglobin ontogeny during normal mouse fetal development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**(6): 2853-2857
- [6] Fraser S T, Isern J, Baron M H. Maturation and enucleation of primitive erythroblasts during mouse embryogenesis is accompanied by changes in cell-surface antigen expression. *Blood*, 2007, **109**(1): 343-352
- [7] Ernst P, Fisher J K, Avery W, *et al.* Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene. *Dev Cell*, 2004, **6**(3): 437-443
- [8] Medvinsky A, Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*, 1996, **86**(6): 897-906
- [9] Shilatifard A. Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, **20**(3): 341-348
- [10] Dou Y, Milne T A, Ruthenburg A J, *et al.* Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, **13**(8): 713-719
- [11] Jiang H, Shukla A, Wang X, *et al.* Role for Dpy-30 in ES cell-fate specification by regulation of H3K4 methylation within bivalent domains. *Cell*, 2011, **144**(4): 513-525
- [12] Ang Y S, Tsai S Y, Lee D F, *et al.* Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming *via* the embryonic stem cell core transcriptional network. *Cell*, 2011, **145**(2): 183-197
- [13] Patel A, Vought V E, Dharmarajan V, *et al.* A conserved arginine-containing motif crucial for the assembly and enzymatic activity of the mixed lineage leukemia protein-1 core complex. *J Biol Chem*, 2008, **283**(47): 32162-32175
- [14] Zhang Y, Mittal A, Reid J, *et al.* Evolving catalytic properties of the MLL family SET domain. *Structure*, 2015, **23**(10): 1921-1933
- [15] Steward M M, Lee J S, O'donovan A, *et al.* Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, **13**(9): 852-854
- [16] Wang J, Zhou Y, Yin B, *et al.* ASH2L: alternative splicing and

- downregulation during induced megakaryocytic differentiation of multipotential leukemia cell lines. *J Mol Med (Berl)*, 2001, **79**(7): 399-405
- [17] Lu X, Zhao Z A, Wang X, *et al.* Whole-transcriptome splicing profiling of E7.5 mouse primary germ layers reveals frequent alternative promoter usage during mouse early embryogenesis. *Biol Open*, 2018, **7**(3): bio032508
- [18] Stoller J Z, Huang L, Tan C C, *et al.* Ash2l interacts with Tbx1 and is required during early embryogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2010, **235**(5): 569-576
- [19] Li L, Ruan X, Wen C, *et al.* The COMPASS family protein ASH2L mediates corticogenesis *via* transcriptional regulation of Wnt signaling. *Cell Rep*, 2019, **28**(3): 698-711 e695
- [20] Wan M, Liang J, Xiong Y, *et al.* The trithorax group protein Ash2l is essential for pluripotency and maintaining open chromatin in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2013, **288**(7): 5039-5048
- [21] Demers C, Chaturvedi C P, Ranish J A, *et al.* Activator-mediated recruitment of the MLL2 methyltransferase complex to the beta-globin locus. *Mol Cell*, 2007, **27**(4): 573-584
- [22] Qin D, Gao Z, Xiao Y, *et al.* The subcortical maternal complex protein Nlrp4f is involved in cytoplasmic lattice formation and organelle distribution. *Development*, 2019, **146**(20): dev183616
- [23] He Z Q, Xia B L, Wang Y K, *et al.* Generation of mouse haploid somatic cells by small molecules for genome-wide genetic screening. *Cell Rep*, 2017, **20**(9): 2227-2237
- [24] Xia W, Xu J, Yu G, *et al.* Resetting histone modifications during human parental-to-zygotic transition. *Science*, 2019, **365**(6451): 353-360
- [25] Skene P J, Henikoff J G, Henikoff S. Targeted *in situ* genome-wide profiling with high efficiency for low cell numbers. *Nature Protocols*, 2018, **13**(5): 1006-1019
- [26] 卢绪坤. 可变启动子调控小鼠早期胚胎发育的研究[D]. 北京: 中国科学院大学动物研究所, 2018
- Lu X K. Alternative Promoter Usage Occurs Frequently and Functions During Mouse Early Embryogenesis[D]. Beijing: Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, 2018
- [27] Jollie W P. Development, morphology, and function of the yolk-sac placenta of laboratory rodents. *Teratology*, 1990, **41**(4): 361-381
- [28] Ying Q L, Wray J, Nichols J, *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 2008, **453**(7194): 519-523
- [29] Ng Y S, Ramsauer M, Loureiro R M, *et al.* Identification of genes involved in VEGF-mediated vascular morphogenesis using embryonic stem cell-derived cystic embryoid bodies. *Lab Invest*, 2004, **84**(9): 1209-1218
- [30] Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, *et al.* Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, **13**(1): 473-486
- [31] Belaoussoff M, Farrington S M, Baron M H. Hematopoietic induction and respecification of A-P identity by visceral endoderm signaling in the mouse embryo. *Development*, 1998, **125**(24): 5009-5018
- [32] Ferkowicz M J, Starr M, Xie X, *et al.* CD41 expression defines the onset of primitive and definitive hematopoiesis in the murine embryo. *Development*, 2003, **130**(18): 4393-4403
- [33] Lawson K A, Meneses J J, Pedersen R A. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development*, 1991, **113**(3): 891-911
- [34] Haar J L, Ackerman G A. A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse. *Anat Rec*, 1971, **170**(2): 199-223
- [35] Memahan K A, Hiew S Y, Hadjur S, *et al.* Mll has a critical role in fetal and adult hematopoietic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*, 2007, **1**(3): 338-345
- [36] Jude C D, Climer L, Xu D, *et al.* Unique and independent roles for MLL in adult hematopoietic stem cells and progenitors. *Cell Stem Cell*, 2007, **1**(3): 324-337
- [37] Gan T, Jude C D, Zaffuto K, *et al.* Developmentally induced Mll1 loss reveals defects in postnatal haematopoiesis. *Leukemia*, 2010, **24**(10): 1732-1741
- [38] Austenaa L, Barozzi I, Chronowska A, *et al.* The histone methyltransferase Wbp7 controls macrophage function through GPI glycolipid anchor synthesis. *Immunity*, 2012, **36**(4): 572-585
- [39] Chen C, Liu Y, Rappaport A R, *et al.* MLL3 is a haploinsufficient 7q tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 2014, **25**(5): 652-665
- [40] Santos M A, Faryabi R B, Ergen A V, *et al.* DNA-damage-induced differentiation of leukaemic cells as an anti-cancer barrier. *Nature*, 2014, **514**(7520): 107-111
- [41] Deng C, Li Y, Zhou L, *et al.* HoxB1nc RNA recruits Set1/MLL complexes to activate Hox gene expression patterns and mesoderm lineage development. *Cell Rep*, 2016, **14**(1): 103-114
- [42] Arndt K, Kranz A, Fohgrub J, *et al.* SETD1A protects HSCs from activation-induced functional decline *in vivo*. *Blood*, 2018, **131**(12): 1311-1324
- [43] Schmidt K, Zhang Q, Tasdogan A, *et al.* The H3K4 methyltransferase Setd1b is essential for hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis in mice. *Elife*, 2018, **7**: e27157
- [44] Luscher-Firzlaff J, Chatain N, Kuo C C, *et al.* Hematopoietic stem and progenitor cell proliferation and differentiation requires the trithorax protein Ash2l. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 8262
- [45] Butler J S, Qiu Y H, Zhang N, *et al.* Low expression of ASH2L protein correlates with a favorable outcome in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2017, **58**(5): 1207-1218

Ash2l-1 is Essential in The Early Hematopoietic Development of Mouse Yolk Sac*

WANG Xiao-Qing^{1,2)}, LU Xu-Kun²⁾, XIANG Yun-Long²⁾, LI Lei^{1,2)**}

¹⁾School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

²⁾State Key Laboratory of Stem Cell and Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract *Ash2l* promotes H3K4 trimethylation levels through methyltransferase MLL/SET1 complex, which is essential for mouse embryonic development. *Ash2l* have two isoforms (*Ash2l-1* and *Ash2l-2*) through alternative promoter usage in mouse. However, the mechanism of this gene in mouse embryonic development and the function of different isoforms remain unknown. In this study, we used CRISPR/Cas9 technology to specifically disrupt *Ash2l-1* in mice and investigated the role of *Ash2l-1* in mouse early embryonic development. Disruption of *Ash2l-1* resulted in embryonic lethality at E9.5–10.5. Particularly, E9.5 *Ash2l-1*-deficient embryos exhibited severe growth defects, including developmental defects of yolk sac. Gene expression profiling showed that *Ash2l-1* deficiency affected the expression of specific genes involved in erythropoiesis and vascular formation. CUT&RUN analysis showed that H3K4me3 levels of the promoter of some specific genes involved in erythropoiesis and vascular formation was down-regulated. Taken together, these results indicate that *Ash2l-1* regulates gene expression through H3K4me3 and plays an essential role in the early hematopoiesis of mouse yolk sacs.

Key words *Ash2l*, H3K4me3, early embryonic development, yolk sac, early hematopoiesis, MLL/SET1 complex

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0237

* This work was supported by a grant from National Key Research and Development Program of China(2018YFC1004500).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-64807865, E-mail: lil@ioz.ac.cn

Received: July 17, 2020 Accepted: August 20, 2020