

Rad21基因位点的遗传修饰抑制骨骼肌干细胞分化

刘勤瑶¹ 高庆² 张潜英¹ 汪瑞婷¹ 张勇^{1,2*} 朱大海^{1,2*}

(¹中国医学科学院基础医学研究所, 北京协和医学院基础学院, 北京 100005;

²生物岛实验室, 广州再生医学与健康广东省实验室, 广州 510005)

摘要 细胞谱系分化受到遗传、表观遗传、三维基因组结构的复杂调控。在真核细胞三维基因组结构中, 黏连蛋白(cohesin)复合物介导染色质成环和拓扑相关结构域的形成。为了探讨Cohesin复合物介导的染色质高级结构是否调控成体干细胞分化及其相关基因表达, 该研究选择了Cohesin复合物的一个亚基RAD21, 制备了可诱导型RAD21蛋白降解的基因敲入小鼠模型(auxin-inducible degron, AID)。当auxin存在时, 泛素连接酶OsTIR1降解含有AID标签的RAD21蛋白。小鼠制备策略是: 在*Rad21*基因3'端引入了Loxp-Stop-Loxp-AID-EGFP-P2A-OsTIR1元件(*Rad21*^{Aid/+}), 与骨骼肌成体干细胞特异的Cre工具鼠(*Pax7-Cre*)配繁, 通过auxin诱导, 在骨骼肌成体干细胞中特异降解RAD21蛋白, 从而探究RAD21蛋白缺失对骨骼肌成体干细胞分化及相关基因表达的影响。该研究取得意外的结果: *Rad21*基因敲入的纯合子小鼠(*Rad21*^{Aid/Aid}, Hom)比野生型小鼠(WT)出生率显著降低; 出生的Hom小鼠较WT小鼠的体型小且体质量轻; 出生的Hom小鼠骨骼肌重量降低, 骨骼肌纤维直径减小; Western blot定量分析表明, 在没有配繁*Pax7-Cre*, 也没有auxin诱导的条件下, 与WT相比, Hom小鼠的骨骼肌干细胞中RAD21蛋白水平显著降低。以上研究结果表明: *Rad21*基因位点的遗传修饰导致RAD21蛋白表达水平显著降低。进一步分离骨骼肌干细胞诱导分化, 与WT相比, Hom小鼠的骨骼肌干细胞分化能力显著减弱, 这表明Rad21蛋白表达异常显著抑制骨骼肌干细胞分化。总之, 该研究发现*Rad21*基因位点修饰导致其表达异常, 进而影响小鼠发育和骨骼肌干细胞分化。

关键词 黏连蛋白; *Rad21*; 可诱导型蛋白降解子; 骨骼肌干细胞; 细胞分化

Genetic Manipulation of *Rad21* Gene Locus Compromises Differentiation of Skeletal Muscle Stem Cells

LIU Qinyao¹, GAO Qing², ZHANG Qianying¹, WANG Ruiting¹, ZHANG Yong^{1,2*}, ZHU Dahai^{1,2*}

(¹Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences,

School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China;

²Bioland Laboratory (Guangzhou Regenerative Medicine and Health Guangdong Laboratory), Guangzhou 510005, China)

Abstract Eukaryotic genome is dynamically organized to three-dimensional structure through hierarchical folding, which is important for regulating cell lineage differentiation during development. The cohesin complex is an essential regulator for chromatin looping and topological associated domain formation and consists of 4 subunits, one of which is the kleisin protein RAD21. To investigate whether cohesin-mediated high order chromatin structure regulates adult stem cell differentiation, an inducible *Rad21* degron knockin mouse line was generated using AID

收稿日期: 2023-04-21 接受日期: 2023-05-23

国家自然科学基金重大研究计划(批准号: 91540206)和“173”基础加强计划重点基础研究项目(批准号: 2020-JCJQ-ZD-264)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-65105081, E-mail: dhzhu@pumc.edu.cn; yongzhang@ibms.pumc.edu.cn

Received: April 21, 2023 Accepted: May 23, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.91540206) and the 173 Basic Research Projects of Basic Strengthening Program (Grant No.2020-JCJQ-ZD-264)

*Corresponding authors. Tel: +86-10-65105081, E-mail: dhzhu@pumc.edu.cn; yongzhang@ibms.pumc.edu.cn

(auxin-inducible degron) (*Rad21*-Loxp-Stop-Loxp-AID-EGFP-P2A-OsTIR1, *Rad21*^{Aid/+}). By crossing the *Rad21*^{Aid/+} mice with skeletal muscle stem cell specific Cre mice (*Pax7*-Cre), the RAD21 protein would be specifically degraded in skeletal muscle stem cells once treated with auxin. However, protein levels of RAD21 were significantly decreased in skeletal muscle stem cells from the both homozygotes (Hom) of *Rad21*^{Aid/Aid} and *Pax7*-Cre; *Rad21*^{Aid/Aid} even in absence of auxin, compared to wild-type littermates (WT), suggesting genetic manipulation of the *Rad21* gene locus leads to dysregulation of its expression. Phenotypically, the homozygous mice had lower birth rate, less body weight and muscle mass, and smaller myofiber diameters, compared with WT littermates. Moreover, the significant reduction of RAD21 protein in skeletal muscle stem cells of the homozygous mice lead to compromised myogenic cell differentiation, which might account for their abnormal muscle growth and development. Together, the findings suggest RAD21 is critical regulator of development and stem cell differentiation in mice.

Keywords cohesin; *Rad21*; AID (auxin-inducible degron); skeletal muscle stem cells; cell differentiation

真核细胞基因组DNA形成三维空间结构, 高度有序地组装在直径仅有10 μm的细胞核中^[1]。研究表明, 细胞谱系特异的三维基因组(3D genome)结构对发育过程中细胞命运决定和细胞谱系分化至关重要^[2-3]。同时, 3D基因组结构在基因转录^[4]、DNA复制、细胞分裂、减数分裂^[2]、维持基因组稳定性^[5-6]等重要的生命活动中发挥调控作用。

3D基因组结构的复杂有序, 依赖于它的分层级组装^[6-7], 包括染色质疆域、区室、拓扑相关结构域、染色质环^[1-2]。对于染色质环形成的分子机制, 人们提出由黏连蛋白(cohesin)复合物和CCCTC结合因子(CTCF)介导的“环挤出”模型^[8-9]: 当cohesin被加载到染色质上, 它会沿着染色质移动, 并挤出染色质环; cohesin滑动过程中遇到结合在基因组DNA上的CTCF时, 滑动可能被阻挡, 从而形成染色质环的边界^[10-13]。

Cohesin是一个环状蛋白复合物^[13], 被加载到染色质上发挥多种重要功能。除了介导染色质成环外, 还能介导姐妹染色单体联会, 确保细胞分裂过程中染色体的正确分离^[14], 参与DNA双链断裂的同源重组修复^[15-16]。Cohesin复合物的核心是由进化上保守的亚基组成的环状异四聚体^[17]: 两个染色体结构维持蛋白SMC1和SMC3^[18]、kleisin蛋白RAD21^[16]、基质抗原STAG1或STAG2其中之一^[19]。SMC蛋白是二聚化的长链多肽, 经RAD21蛋白连接, 形成一个环状结构。STAG1或STAG2结合在RAD21上, 为其他调节因子提供对接位点^[13]。

本实验室前期研究发现, 骨骼肌细胞谱系特异的转录因子MyoD作为3D基因组“组织者”介导骨骼肌细胞谱系特异的染色质环, 骨骼肌干细胞分化过程中MyoD富集在染色质环锚点与cohesin共定位^[20]。

为了探讨cohesin介导的染色质成环对骨骼肌干细胞分化的影响, 本研究选择cohesin复合物的一个亚基RAD21, 制备了基因敲入(knockin)小鼠模型。该小鼠模型在*Rad21*位点敲入了一个AID(auxin-inducible degron)标签及泛素连接酶OsTIR1。在有auxin存在时, 泛素连接酶OsTIR1降解含有AID标签的RAD21蛋白。基因敲入小鼠*Rad21*-Loxp-Stop-Loxp-AID-EGFP-P2A-OsTIR1(*Rad21*^{Aid/+})与骨骼肌干细胞特异的Cre(*Pax7*-Cre)配繁, auxin诱导在骨骼肌干细胞中特异降解RAD21蛋白。研究结果发现: *Rad21*基因位点的遗传修饰导致RAD21蛋白表达水平显著降低, 进而影响小鼠发育和骨骼肌干细胞分化。本研究揭示了RAD21对于个体发育和细胞谱系分化发挥十分重要的调控功能。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本研究设计的RAD21蛋白降解子的基因敲入小鼠, 由江苏集萃药康有限公司制备。所有动物操作程序均获北京协和医学院基础学院动物伦理委员会批准(ACUC-A01-2022-017)。所有实验用小鼠均在SPF级动物房饲养、繁殖, 室内温度控制在19~24 °C, 湿度为50%~60%, 12 h明暗交替。小鼠饲料、垫料均经高温消毒处理, 饮水经高温高压灭菌处理。饲养过程中, 密切观察小鼠生长情况, 垫料每周换一次, 饲料和饮水每日补充。

1.2 原代骨骼肌细胞分离培养

2~3周龄C57BL/6J小鼠, 颈椎脱臼处死, 剥离骨骼肌, PBS清洗剪碎。加入新鲜配制的消化液(12.8 mg II型胶原酶和20 mg分散酶溶于10 mL PBS), 消化1 h, 过

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	用途 Application	序列(5'→3') Sequences (5'→3')
<i>Cre</i> -F	Genotyping	TGC TGT TTC ACT GGT TAT GCG G
<i>Cre</i> -R	Genotyping	TTG CCC CTG TTT CAC TAT CCA G
<i>Rad21</i> -F1	Genotyping	TTG CGT CAA AGA TGC CGA TG
<i>Rad21</i> -F2	Genotyping	AGC TCA CTT TGA CCA GTG CCA A
<i>Rad21</i> -R	Genotyping	AAA GTC TTC TGG GTT CTT GGG C
<i>GAPDH</i> -F	RT-PCR	AAT GTG TCC GTC GTG GAT CTG
<i>GAPDH</i> -R	RT-PCR	TAG CCC AAG ATG CCC TTC AGT
<i>MyoG</i> -F	RT-PCR	CCA TTC ACA TAA GGC TAA CAC
<i>MyoG</i> -R	RT-PCR	CCC TTC CCT GCC TGT TCC
<i>Myod</i> -F	RT-PCR	CAA CGC CAT CCG CTA CAT
<i>Myod</i> -R	RT-PCR	GGT CTG GGT TCC CTG TTC T

滤400 ×g室温离心8 min, 弃上清。PBS重悬细胞沉淀, 400 ×g室温离心8 min, 去上清。增殖培养基重悬细胞沉淀, 置于培养皿, 在37 °C培养箱中差速贴壁30 min, 将上清的细胞转移至提前用鼠尾胶原包被的培养皿中, 37 °C培养2天。0.25%胰酶在37 °C培养箱中消化1 min, 收集细胞, 再次差速贴壁两次, 每次10 min。最后, 将细胞种在细胞培养孔板中开展后续的实验。

增殖培养基包含: F-10培养基[(中科迈晨(北京)科技有限公司)、20%胎牛血清(澳大利亚 Ausbian公司)、1%青霉素和链霉素、1%谷氨酰胺、10 ng/mL成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF2)(北京义翘神州科技股份有限公司)。分化培养基包含: DMEM培养基(Gibco公司)、2%马血清(Gibco公司)、1%青霉素和链霉素、1%谷氨酰胺。

1.3 细胞总蛋白提取和Western blot分析

终止细胞培养, 吸去培养基, PBS洗一次。加入含蛋白酶抑制剂Cocktail(Roche公司)的细胞裂解液, 刮取细胞, 转移至1.5 mL离心管中, 冰上裂解15 min。15 000 ×g、4 °C离心10 min, 将上清转移至新的1.5 mL离心管中, BCA法测蛋白浓度。取30 μg总蛋白, 10% SDS-PAGE胶分离, 将蛋白质转移至PVDF膜上。5%脱脂奶室温封闭1 h后, 加入RAD21抗体(Abcam, 1:500), 4 °C过夜。TBST洗膜三次, 加入偶联辣根过氧化酶的二抗(1:2 000), 室温孵育1 h。TBST洗膜三次, ECL试剂显色显影。

1.4 RNA提取和实时荧光定量PCR

终止细胞培养, 吸去培养基, 采用 TRIzol试剂

(Invitrogen)提取细胞总RNA, NanoDrop 2000测浓度。采用逆转录酶(Thermo Fisher Scientific公司)逆转录获得cDNA。采用SYBR Green试剂(Bio-Rad Laboratories)经Roche384仪器进行实时定量PCR分析。实验中设置3个重复孔, 以*GAPDH*基因表达水平作为内参, 引物序列见表1。

1.5 免疫荧光染色

终止细胞培养, PBS洗一次, 加入4%多聚甲醛, 室温固定15 min, PBS洗三次。0.1% TritonX-100透膜处理15 min; PBS洗三次, 3% BSA室温封闭2 h后, 加入MyoG抗体(DSHB, 1:200), 4 °C过夜。室温平衡1 h, PBS洗三次, FITC标记的荧光二抗(1:1 000)室温孵育1 h, PBS洗三次。最后, DAPI染色, PBS洗三次, 封片显微镜观察照相。

1.6 软件及统计学分析

用ImageJ软件处理Western blot结果, 用LASX软件处理免疫荧光染色结果。实验结果采用Excel软件分析, 组间数据差异分析采用配对样本 t 检验。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

2 结果

2.1 Rad21蛋白降解小鼠模型设计与鉴定

基因敲入小鼠的设计思路是: 采用CRISPR/Cas9技术, 在*Rad21*基因3'端引入Loxp-Stop-Loxp-AID-EGFP-P2A-OsTIR1等元件。其中, AID元件为植物生长素诱导蛋白降解子; P2A元件保障核糖体翻译的多肽正确分割, 确保EGFP和OsTIR1翻译成独立的蛋白; OsTIR1是水稻E3泛素连接酶, 其活性受

auxin诱导。获得杂合子小鼠, 记作 $Rad21^{Aid/+}$ 。杂合子小鼠 $Rad21^{Aid/+}$ 与骨骼肌干细胞特异的Cre配繁得到 $Pax7-Cre;Rad21^{Aid/Aid}$ 纯合小鼠(图1A)。 $Pax7-Cre$ 阳性的纯合子小鼠的骨骼肌干细胞中会特异性表达AID标签的融合蛋白RAD21-AID和auxin诱导的E3泛素连接酶OsTIR1。分离其骨骼肌干细胞, 采用auxin诱导, auxin作用于OsTIR1蛋白, 使其结合到AID标签的RAD21上, 进而激活E3泛素连接酶降解系统, 实现RAD21-AID融合蛋白的降解。

针对敲入片段(约4.3 Kb), 设计小鼠基因型鉴定的正向引物(forward primer, F1和F2)和反向引物(reverse primer, R), 如图1B和表1。分别利用这两对引物进行PCR鉴定, 纯合子因只含敲入片段而得到单

一的F1和R扩增的目标条带, 野生型因不含敲入片段而得到单一的F2和R扩增的目标条带, 杂合子则能得到两种条带(图1B)。1~9号小鼠(图1C)中, 1号和8号小鼠的基因型为 $Rad21^{Aid/Aid}$, 2~4号为 $Rad21^{Aid/+}$, 5和6号为 $Pax7-Cre;Rad21^{Aid/+}$, 7号为 $Pax7-Cre$, 9号为 $Pax7-Cre;Rad21^{Aid/Aid}$, 表明小鼠模型构建成功。

2.2 纯合子小鼠的出生率低、体重显著减少

*Rad21*基因敲入小鼠制备成功以后, 首先分析了*Rad21*基因位点修饰是否影响小鼠的繁殖和生长发育。本研究统计了 $Rad21^{Aid/+}$ 杂合子小鼠自交, 及其与 $Pax7-Cre;Rad21^{Aid/+}$ 小鼠杂交的生育情况, 发现子代中野生型(WT):杂合子(Heterozygote, Het):纯合子(Hom)的比例为1.95:2.42:1(表2), 显著偏离孟德

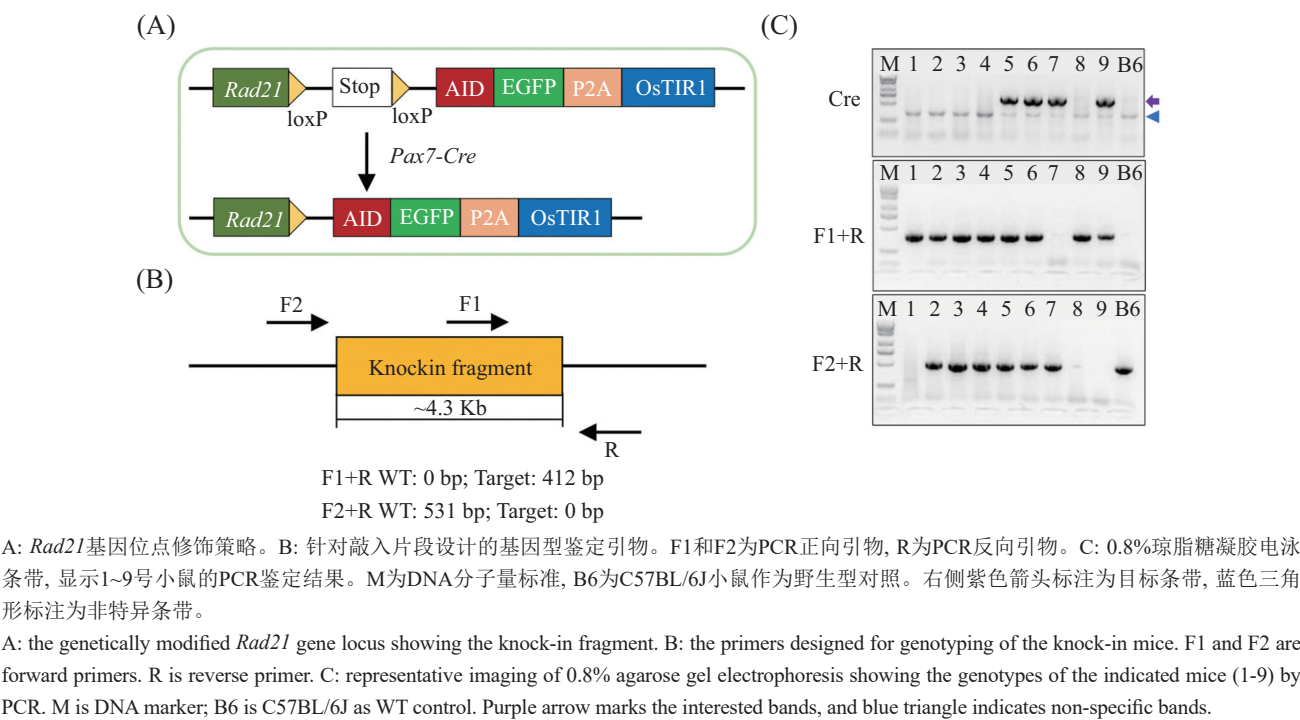


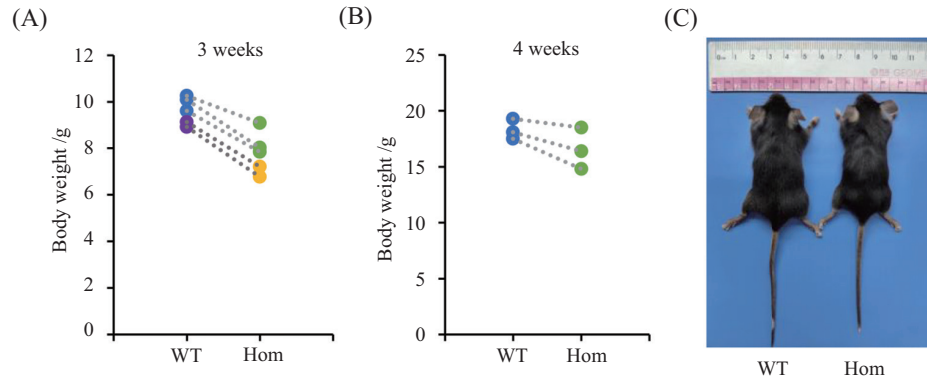
图1 *Rad21*蛋白降解小鼠模型设计与鉴定
Fig.1 Design and genotyping of the RAD21-degron mice

表2 纯合子小鼠的出生率降低

Table 2 The homozygous mice with lower birth rate		
标记	基因型	数量
Label	Genotype	Number
WT	$Rad21^{+/+}$	164
	$Pax7-Cre;Rad21^{+/+}$	
Het	$Rad21^{Aid/+}$	203
	$Pax7-Cre;Rad21^{Aid/+}$	
Hom	$Rad21^{Aid/Aid}$	84
	$Pax7-Cre;Rad21^{Aid/Aid}$	

尔比例1:2:1, 其中纯合小鼠的出生率显著降低(表2)。与WT相比, Hom小鼠体质量减轻, 雌雄表型一致。图2A和图2B分别展示了3周龄和4周龄小鼠的

体质量。与WT相比, Hom小鼠的体质量轻(图2A和2B), 体型小(图2C)。进一步分析发现, Hom小鼠骨骼肌重量显著降低(图3A和图3B), 骨骼肌纤维直径

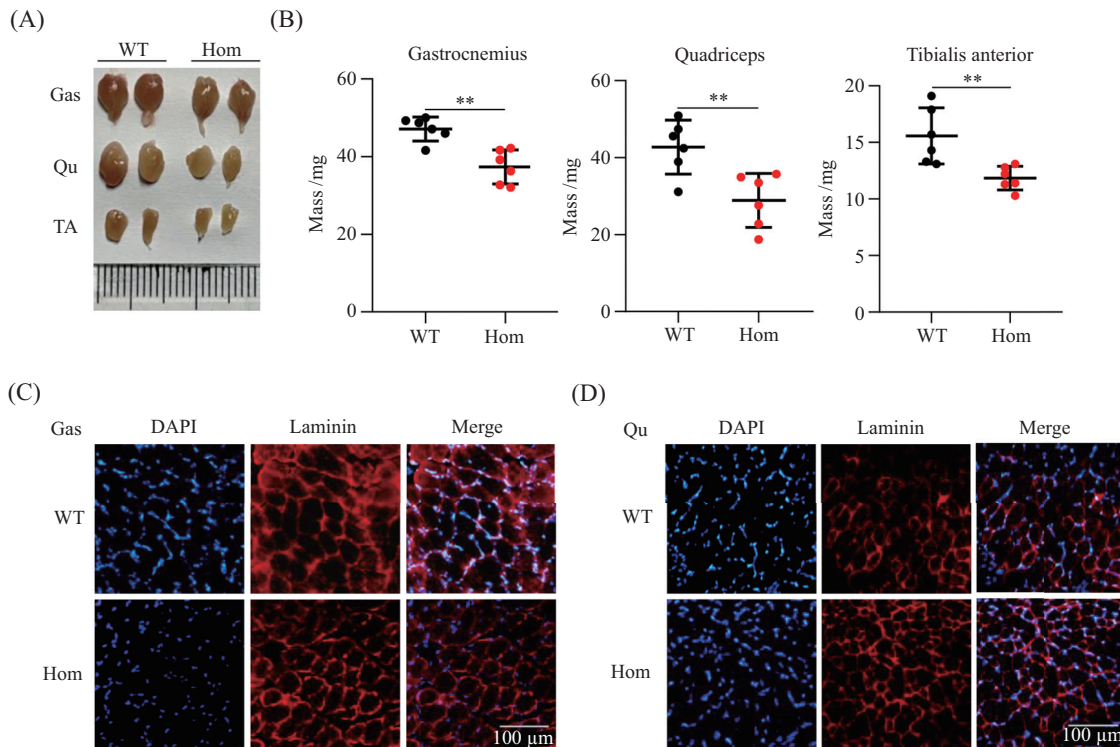


A: Hom和WT小鼠3周龄体质量, 每组各5只; 蓝色和绿色为雄性, 紫色和黄色为雌性。B: Hom和WT雄性小鼠4周龄体质量, 每组各3只。C: Hom和WT雄性小鼠4周龄体型代表性照片。

A: body weight of 3-week-old homozygous and wild-type littermates. $n=5$ mice in each genotype. Male: blue and green. Female: purple and yellow. B: body weight of 4-week-old male homozygous and wild-type littermates. $n=3$ mice in each genotype. C: representative mouse photo of 4-week-old male homozygous and wild-type littermates.

图2 纯合子小鼠体型小、体质量低

Fig.2 The homozygous knock-in mice with a smaller size and less body weight than wild-type littermates



A: 3周龄WT和Hom小鼠的骨骼肌组织代表性照片。Gas代表腓肠肌, Qu为股四头肌, TA为胫骨前肌。B: 3周龄WT和Hom小鼠的腓肠肌、股四头肌和胫骨前肌的重量。C、D: 3周龄WT和Hom小鼠腓肠肌(C)、股四头肌(D)的冰冻切片laminin免疫荧光染色(红色)代表性照片, DAPI染色显示肌纤维核(蓝色)。

A: representative photo of skeletal muscle tissues from 3-week-old Hom mice and their WT littermates. Gas: gastrocnemius, Qu: quadriceps, TA: tibialis anterior. B: muscle mass from 3-week-old Hom mice and their WT littermates. $**P<0.01$. C,D: representative immunostaining of laminin (red) on cryo-section of skeletal muscle Gas (C) and Qu (D) from 3-week-old Hom mice and their WT littermates. DAPI staining (blue) served to visualize nuclei.

图3 纯合子小鼠骨骼肌重量降低、骨骼肌纤维直径减小

Fig.3 Reduced skeletal muscle mass and decreased myofiber size in Hom mice compared with WT littermates

减小(图3C和图3D)。这些研究结果表明, Hom小鼠中*Rad21*基因位点的修饰影响了小鼠的繁殖和骨骼肌生长发育。由于骨骼肌占体质量的比例较大, 骨骼肌质量减少可能是Hom小鼠体质量减轻的原因之一。

2.3 纯合子小鼠的骨骼肌干细胞中RAD21蛋白水平显著降低

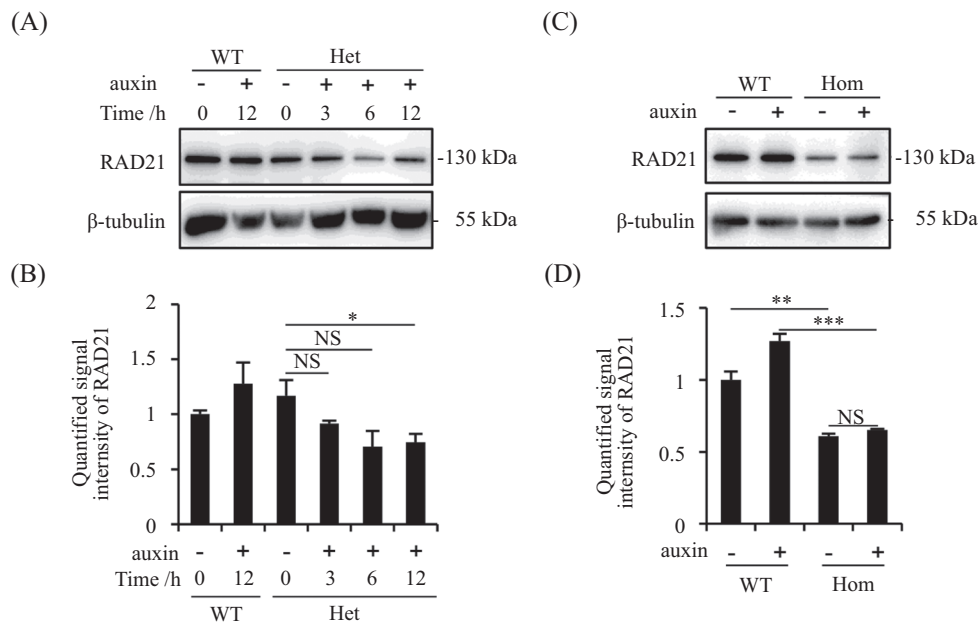
为了探究Hom小鼠的出生率和生长发育异常是否是由于*Rad21*基因位点修饰干扰了其基因表达。本研究首先检测了Het小鼠骨骼肌干细胞中RAD21蛋白水平。分别取基因型为*Pax7-Cre;Rad21^{Aid/+}*的Het小鼠和基因型为*Pax7-Cre;Rad21^{+/+}*的WT小鼠的骨骼肌, 分离骨骼肌干细胞。Western blot分析表明, Het小鼠骨骼肌干细胞中RAD21蛋白水平与WT没有显著差异, 说明杂合子*Rad21^{Aid/+}*没有显著影响*Rad21*基因表达(图4A和图4B)。进一步探索auxin诱导处理的合适时间, auxin剂量参考2017年RAO等^[21]发表的文章。Western blot结果显示, auxin处理3、6、12 h后,

RAD21蛋白水平逐渐降低, 这说明auxin处理成功诱导AID标签的RAD21降解(图4A和图4B)。

在此基础上, 进一步检测Hom小鼠骨骼肌干细胞中RAD21蛋白水平。分别取基因型为*Pax7-Cre;Rad21^{Aid/Aid}*的Hom小鼠和基因型为*Pax7-Cre;Rad21^{+/+}*的WT小鼠骨骼肌, 分离骨骼肌干细胞。Western blot结果显示, 与WT相比, 即使没有auxin处理, Hom小鼠骨骼肌干细胞中RAD21蛋白水平已经显著减少(图4C和图4D)。以上结果表明, 纯合子小鼠, *Rad21*两个等位基因都被修饰, 严重影响了其基因表达, 这可能是纯合子小鼠发育异常的原因。

2.4 纯合子小鼠骨骼肌干细胞中RAD21蛋白减少显著抑制细胞分化

纯合子小鼠RAD21蛋白表达水平显著减少, 是否影响骨骼肌干细胞分化呢? 本研究分别取基因型为*Pax7-Cre;Rad21^{Aid/Aid}*的Hom小鼠和基因型为*Pax7-Cre;Rad21^{+/+}*的WT小鼠骨骼肌, 分离骨骼肌干细胞, 诱导分化24 h, 每6 h更换一次含500 $\mu\text{mol/L}$ auxin的

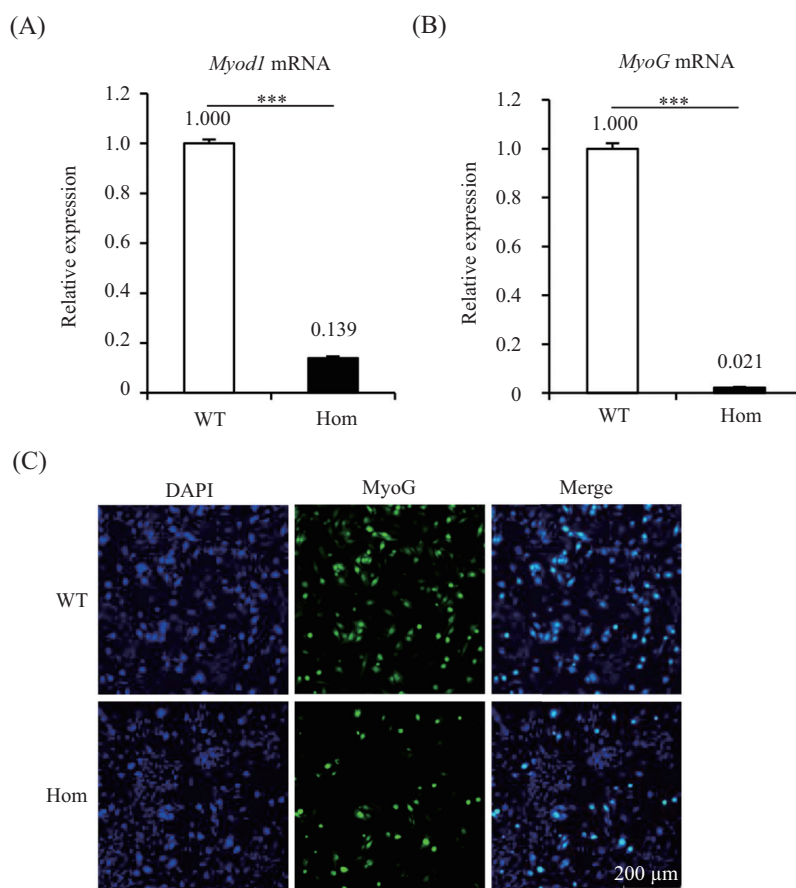


A: Western blot showing protein level of RAD21 in skeletal muscle stem cells (from Het or WT littermates) treated with auxin for the indicated times. The group in absence of auxin⁻ served as a control. B: quantified signal intensity of RAD21 detected by Western blot, described in panel A. $n=4$. C: Western blot showing protein level of RAD21 in skeletal muscle stem cells (from the Hom or WT littermates) treated with auxin for 6 h. The group in absence of auxin⁻ served as a control. D: quantified signal intensity of RAD21 detected by Western blot, described in panel C. $n=4$. NS: not significant. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

A: Western blot showing protein level of RAD21 in skeletal muscle stem cells (from Het or WT littermates) treated with auxin for the indicated times. The group in absence of auxin⁻ served as a control. B: quantified signal intensity of RAD21 detected by Western blot, described in panel A. $n=4$. C: Western blot showing protein level of RAD21 in skeletal muscle stem cells (from the Hom or WT littermates) treated with auxin for 6 h. The group in absence of auxin⁻ served as a control. D: quantified signal intensity of RAD21 detected by Western blot, described in panel C. $n=4$. NS: not significant. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图4 纯合子小鼠的骨骼肌干细胞中RAD21蛋白水平显著降低

Fig.4 Protein level of RAD21 is significantly reduced in skeletal muscle stem cells of the homozygous mice compared with wild-type littermates



A, B: RT-PCR检测诱导分化24 h的Hom和WT小鼠骨骼肌干细胞中*Myod*(A)和*MyoG*(B) mRNA水平(3次重复)。C: 免疫荧光染色检测诱导分化24 h的Hom和WT小鼠骨骼肌干细胞中MyoG蛋白, DAPI染色显示细胞核。

A,B: relative mRNA levels of *Myod* (A) and *MyoG* (B) in the 24 h differentiated skeletal muscle stem cells of the homozygous (Hom) and wild-type littermates (WT), determined by RT-PCR. $n=3$. C: representative immunofluorescence staining of MyoG in the 24 h differentiated skeletal muscle stem cells of the homozygous and wild-type littermates. DAPI staining served to visualize nuclei.

图5 纯合子小鼠骨骼肌干细胞中RAD21蛋白减少显著抑制细胞分化

Fig.5 Differentiation of skeletal muscle stem cells is compromised in the homozygous mice compared to wild type littermates

分化培养基。然后,提取细胞总RNA进行实时荧光定量PCR,或者固定细胞进行免疫荧光染色,检测骨骼肌干细胞分化标志MyoG的表达。结果显示,与WT小鼠相比, Hom小鼠的骨骼肌干细胞分化相关基因*Myod*和*MyoG*的mRNA水平显著降低(图5A和图5B),其MyoG表达阳性的细胞数量显著减少(图5C)。以上结果表明, Hom小鼠骨骼肌干细胞中RAD21蛋白减少显著抑制了细胞分化,这可能是Hom小鼠骨骼肌生长发育异常的原因之一。

3 讨论

黏连蛋白(cohesin)复合物介导染色质成环、姐妹染色单体联会、DNA双链断裂的同源重组修复,在细胞增殖和个体发育过程中发挥重要作用。研究者采用植物生长素auxin诱导的蛋白降解系统,构

建了含有AID标签的*Rad21*基因敲入细胞系,在细胞水平实现可诱导型RAD21蛋白降解和恢复,证明了cohesin对染色质成环是充分必要的^[21]。2017年RAO等^[21]在人的结直肠癌细胞系HCT-116中敲入AID标签的*Rad21*,降解RAD21蛋白导致染色质环消失。另外,2022年GABRIELE等^[22]在小鼠胚胎干细胞系中实现RAD21蛋白的可逆降解。但是,利用AID标签的*Rad21*基因敲入小鼠模型,研究在体水平和原代细胞中RAD21蛋白降解及其对细胞分化的影响未见报道。

本研究设计制备了AID标签的*Rad21*基因敲入小鼠模型,并与骨骼肌干细胞特异的Cre小鼠配繁,基因型鉴定表明小鼠制备成功。*Rad21*基因位点修饰的杂合子小鼠,对RAD21蛋白表达水平没有影响,并且进一步采用auxin处理可以实现在骨骼肌

干细胞中特异降解RAD21蛋白。然而, 本研究发现 *Rad21* 基因位点修饰的纯合子小鼠出生率低、体质量显著减少。进一步分析发现, 纯合子小鼠骨骼肌质量显著减少。由于骨骼肌占体质量的比例较大, 骨骼肌质量减少可能是纯合子小鼠体质量减轻的原因之一。RAD21介导染色质成环, 调控三维基因组结构和基因表达, 影响骨骼肌细胞分化命运, 导致纯合子小鼠骨骼肌发育和骨骼肌干细胞分化异常。

与野生型小鼠相比, 在未加auxin进行诱导时, 纯合子小鼠的骨骼肌干细胞中RAD21蛋白水平显著降低。此结果表明, *Rad21* 基因位点的修饰干扰了其基因表达。采用RT-PCR检测*Rad21* mRNA水平, 发现纯合子不影响*Rad21* 的基因转录。因此, RAD21蛋白水平显著降低可能的原因为: (1) *Rad21* 位点敲入的DNA片段太长, 改变了其3'UTR, 影响了RAD21蛋白翻译效率; (2) E3泛素连接酶OsTIR1可能存在于“leaky”活性, 在没有auxin诱导的条件下, 导致RAD21蛋白的部分降解。本研究结果为今后制备小鼠模型提供改进的思路: 可以考虑制备两个小鼠品系, 其中一个品系, 在*Rad21* 基因位点只敲入mAID标签(突变的*AID*, 显著降低leaky的活性), 不会由于引入过长的DNA元件影响其表达; 另一个品系, 制备E3泛素连接酶OsTIR1(F74G)的条件性基因敲入小鼠(*F74G*突变的*OsTIR1*, 显著降低leaky的活性)。以上两个小鼠杂交, 结合组织特异性的Cre, 实现在感兴趣的组织/细胞中特异降解RAD21蛋白。

总之, *Rad21* 基因位点修饰的纯合子小鼠的骨骼肌干细胞分化能力显著减弱, 说明RAD21蛋白, 即cohesin复合物, 是机体正常生长发育和细胞分化必不可少的调控因子。通过进一步制备以上两个品系的小鼠, 结合不同组织/细胞特异的Cre小鼠, 将深入揭示cohesin介导的染色质高级结构在不同细胞谱系分化中的功能及其分子机制。

参考文献 (References)

- [1] MISTELI T. The self-organizing genome: principles of genome architecture and function [J]. Cell, 2020, 183(1): 28-45.
- [2] ZHENG H, XIE W. The role of 3D genome organization in development and cell differentiation [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(9): 535-50.
- [3] ROWLEY M J, CORCES V G. Organizational principles of 3D genome architecture [J]. Nat Rev Genet, 2018, 19(12): 789-800.
- [4] WATRIN E, KAISER F J, WENDT K S. Gene regulation and chromatin organization: relevance of cohesin mutations to human disease [J]. Curr Opin Genet Dev, 2016, 37: 59-66.
- [5] ZHU Z, WANG X. Roles of cohesin in chromosome architecture and gene expression [J]. Semin Cell Dev Biol, 2019, 90: 187-93.
- [6] SZALAJ P, PLEWCZYNSKI D. Three-dimensional organization and dynamics of the genome [J]. Cell Biol Toxicol, 2018, 34(5): 381-404.
- [7] DAVIDSON I F, PETERS J M. Genome folding through loop extrusion by SMC complexes [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(7): 445-64.
- [8] SONG S H, KIM T Y. CTCF, Cohesin, and Chromatin in Human Cancer [J]. Genomics Inform, 2017, 15(4): 114-22.
- [9] NISHIYAMA T. Cohesion and cohesin-dependent chromatin organization [J]. Curr Opin Cell Biol, 2019, 58: 8-14.
- [10] BANIGAN E J, MIRNY L A. Loop extrusion: theory meets single-molecule experiments [J]. Curr Opin Cell Biol, 2020, 64: 124-38.
- [11] DI GIAMMARTINO D C, POLYZOS A, APOSTOLOU E. Transcription factors: building hubs in the 3D space [J]. Cell Cycle, 2020, 19(19): 2395-410.
- [12] MATITYAHU A, ONN I. Hit the brakes—a new perspective on the loop extrusion mechanism of cohesin and other SMC complexes [J]. J Cell Sci, 2021, 134(1): jcs247577.
- [13] SHI Z B, GAO H S, BAI X C, et al. Cryo-EM structure of the human cohesin-NIPBL-DNA complex [J]. Science, 2020, 368(6498): 1454-9.
- [14] KRANTZ I D. Cohesin embraces new phenotypes [J]. Nat Genet, 2014, 46(11): 1157-8.
- [15] HORSFIELD J A. Full circle: a brief history of cohesin and the regulation of gene expression [J]. FEBS J, 2023, 290(7): 1670-87.
- [16] CHENG H, ZHANG N, PATI D. Cohesin subunit RAD21: from biology to disease [J]. Gene, 2020, 758: 144966.
- [17] ISHIGURO K I. The cohesin complex in mammalian meiosis [J]. Genes Cells, 2019, 24(1): 6-30.
- [18] YATSKEVICH S, RHODES J, NASMYTH K. Organization of chromosomal DNA by SMC complexes [J]. Annu Rev Genet, 2019, 53: 445-82.
- [19] PEREA-RESA C, WATTENDORF L, MARZOUK S, et al. Cohesin: behind dynamic genome topology and gene expression reprogramming [J]. Trends Cell Biol, 2021, 31(9): 760-73.
- [20] WANG R, CHEN F, CHEN Q, et al. MyoD is a 3D genome structure organizer for muscle cell identity [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 205.
- [21] RAO S S P, HUANG S C, GLENN S T, HILAIRE B, et al. Cohesin loss eliminates all loop domains [J]. Cell, 2017, 171(2): 305-20.
- [22] GABRIELE M, BRANDÃO H, GROSSE-HOLZ S, et al. Dynamics of CTCF- and cohesin-mediated chromatin looping revealed by live-cell imaging [J]. Science, 2022, 376(6592): 496-501.