

· 基础研究 ·

m6A 识别蛋白 Ythdf3 在精子发生中的作用研究

宋小玲,刘媛媛,王仿竹,沈 彬*

南京医科大学生殖医学国家重点实验室,江苏 南京 211166

[摘要] 目的:通过基因敲除模型研究 N6-甲基腺嘌呤(m6A)识别蛋白 Ythdf3 在小鼠精子发生过程的调控作用。方法:利用 CRISPR/Cas9 技术构建 Ythdf3 基因敲除小鼠,通过免疫荧光和 HE 染色对敲除小鼠进行表型分析,研究 Ythdf3 在调控小鼠精子发生过程中的作用。结果:免疫组化染色显示 Ythdf3 在精原及各级生精细胞核中均有表达;成功构建 Ythdf3 基因敲除小鼠模型;HE 染色显示 Ythdf3 敲除小鼠睾丸各级生精时相及附睾尾精子与对照相比无明显异常。结论:在正常生理条件下,敲除 Ythdf3 不影响雄性小鼠精子发生。

[关键词] CRISPR/Cas9; Ythdf3; 精子发生

[中图分类号] Q78

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)06-846-05

doi:10.7655/NYDXBNS20190611

Effects of m6A reader protein Ythdf3 during spermatogenesis

Song Xiaoling, Liu Yuanyuan, Wang Fangzhu, Shen Bin*

State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the role of N6 - methyladenosine (m6A) reader protein Ythdf3 during spermatogenesis in knockout mouse model. **Methods:** We generated Ythdf3 knockout mice by CRISPR/Cas9 technology, and detected the role of Ythdf3 in spermatogenesis by immunofluorescence, HE staining. **Results:** Immunohistochemistry results showed that Ythdf3 expressed in the nuclear of spermatogonia and spermatocytes; Ythdf3 knockout mice were constructed successfully; HE staining results revealed spermatogenic wave and the morphology of epididymis cauda in Ythdf3 knockout mice were normal compared with control. **Conclusion:** Depletion of Ythdf3 did not affect mouse spermatogenesis in normal physiological condition.

[Key words] CRISPR/Cas9; Ythdf3; spermatogenesis

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(06):846-850]

N6-甲基腺嘌呤(m6A)修饰是真核生物 RNA 最为丰富的化学修饰,广泛存在于真核 mRNA 和长链非编码 RNA 中^[1]。在哺乳动物 mRNA 中,m6A 修饰通常富集在 5'端的非翻译区、终止密码子区和 3'端的非翻译区^[2]。m6A 修饰是由甲基转移酶 3(methyltransferase like 3, Mettl3)、甲基转移酶 14(methyltransferase like 14, Mettl14)和 WT1 相关蛋白形成的复合体催化形成,可被去甲基化酶 alkB 同源蛋白 5(alkB homolog5, RNA demethylase, Alkbh5)和脂肪量

[基金项目] 国家自然科学基金(31622039),江苏省自然科学基金(BK20160045)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:binshen@njmu.edu.cn

及肥胖相关蛋白擦除。m6A 修饰的生物学功能执行者则是 m6A 识别蛋白,包括 Ythdf1、Ythdf3、Ythdc1、Ythdc2 等^[3]。已有研究显示 mRNA 上 m6A 修饰在促进翻译、性别决定、胚胎干细胞自我更新和分化、胚胎发育、肿瘤发生等过程中起重要调控作用^[4]。

精子发生是一个复杂而特化的生物学过程,包括精原干细胞的增殖分化、精母细胞的减数分裂和精子形成 3 个阶段,此过程受神经-内分泌和精子发生相关基因的精密调节。敲除小鼠模型研究表明, Mettl3 可以调控小鼠精原细胞的分化及减数分裂的起始^[5];在早期生殖细胞中条件性敲除 Mettl3 或 Mettl14,均可导致精原干细胞自我更新和分化异常^[6];

Alkbh5 敲除导致小鼠精子发生异常^[7],说明 m6A 修饰在小鼠精子发生中起重要作用。m6A 修饰的生物学功能由其识别蛋白执行,敲除 Ythdc1 和 Ythdc2 可导致小鼠精子发生异常^[8-9],敲除 Ythdf1 和 Ythdf2 不影响小鼠精子发生^[10-11],但 Ythdf3 是否在精子发生中存在作用?之前研究表明,Ythdf3 与 Ythdf1 能够协同作用促进蛋白合成,同时 Ythdf3 能够影响 Ythdf2 介导的甲基化 mRNA 的降解^[12];胞质中 Ythdf3 可促进 mRNA 的翻译^[13],而 Ythdf3 在小鼠精子发生过程中的作用目前没有报道。因此,本研究拟通过敲除小鼠模型,研究 Ythdf3 在小鼠精子发生中的调控作用。

1 材料和方法

1.1 材料

C56BL/6J 小鼠饲养于南京医科大学实验动物中心(批准编号 IACUC-14030127),按照无特定病原体(SPF)条件,12 h 光照 12 h 黑暗周期进行。所有动物实验经南京医科大学动物保护与使用委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 构建敲除小鼠模型

构建 sgRNA 的 oligo 序列如下:sgRNA1_up: 5' - TAGGCTCTCCCAAGAGAACTAGG - 3'; sgRNA1_down: 5' - AAACCCTAGTCTCTTGGGAGAG - 3'; sgRNA2_up: 5' - TAGGATACCTTTGAGTAAGGTGCC - 3'; sgRNA2_down: 5' - AAACGGCACCTTACTCAA - AGTAT-3'。

CRISPR/Cas9 在体外转录和显微注射根据文章所述^[14],Cas9 载体通过 Age1 线性化后,利用 mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit (Abcam 公司,美国)进行体外转录,利用 RNeasy Mini Kit 试剂盒(Qiagen 公司,德国)进行纯化。sgRNA 的 up 和 down oligo 退火之后,连接到 *Bsa* I 酶切的 pUC57-T7-sgRNA 的载体中,测序正确的载体通过 *Dra* I 线性化,并使用 MEGA short script Kit 试剂盒 (Abcam 公司,美国)进行体外转录,MEGAclear 试剂盒 (Abcam 公司,美国)纯化 sgRNA。将 Cas9 mRNA (10 ng/ μ L)和 2 条 sgRNA (每条 5 ng/ μ L)同时注射到合子期受精卵中,然后移植到假孕小鼠子宫,通过 TA 克隆和测序验证首建鼠的基因型,选择移码突变小鼠与 C56BL/6J 小鼠回交。

1.2.2 TA 克隆

将小鼠基因组目的片段扩增、纯化后与 PMD19-

T 载体(TaKaRa 公司,日本)在 16 °C 连接 2 h,再将 2 μ L 连接产物与 20 μ L 大肠杆菌 Top10 (BioVector NTCC 公司,美国)冰上混匀,冰上静置 30 min 后 42 °C 水浴锅热激 60 s,冰上静置 2 min 后每管加 LB 培养基(上海生工公司)200 μ L,放 37 °C 摇床 30 min,220 r/min。将菌涂板,放 37 °C 温箱 12~16 h 后挑单克隆菌进行 PCR 鉴定,将非空载菌落测序鉴定基因型。以上步骤均按照说明书进行。

1.2.3 RT-PCR 检测 Ythdf3 基因表达情况

利用 RNAiso Plus (TaKaRa 公司,日本)提取组织 RNA,PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa 公司,日本)去除基因组 DNA,并将 1 μ g RNA 逆转录成 cDNA。RT-PCR 引物序列如下:mYthdf3-F: 5' - CAT-AGGGCAACAGAGGAAACAG-3'; mYthdf3-R: 5' - ATCTCCAGCCGTGGACCAT - 3'; m18s-F: 5' - CATTCCGAACGTCTGCCCTATC - 3'; m18s-R: 5' - CCTGCTGCCTTCCTTGGGA-3'。

1.2.4 基因型鉴定

剪取小鼠脚趾 1~2 mm 进行基因型鉴定,Ythdf3 基因型鉴定引物:msYthdf3-E4C9 F: 5' - GC-TATCCACCAATGTCAGA-3'; msYthdf3-E4C9 R: 5' - CATACCACTGCTGCTCAA-3'。

1.2.5 免疫荧光染色

小鼠睾丸用 MDF(30% 甲醛、15% 乙醇、5% 乙酸和 50% 蒸馏水)固定。组织切片脱蜡水化后用柠檬酸(福州迈新公司)进行抗原修复,0.3% PBST 透膜 45 min,5% BSA 室温封闭 2 h,YTHDF3 抗体(武汉 Proteintech 公司)以 1:200 稀释,4 °C 孵育过夜;次日,二抗室温孵育 2 h,清洗后用 50% 甘油封片。

1.2.6 HE 染色

组织切片脱蜡水化后用双蒸水清洗 3 次,每次 5 min,然后在苏木素中浸染 20 s,伊红染色 4 min,梯度酒精脱水后树脂封片。

1.2.7 免疫组化染色

组织切片脱蜡水化后,用过氧化氢(上海凌峰公司)去除内源性过氧化氢酶,PBS(上海生工公司)清洗后柠檬酸修复,0.3% PBST 透膜 45 min,5% BSA 室温封闭 2 h,Ythdf3 抗体(武汉 Proteintech 公司)以 1:200 稀释,4 °C 孵育过夜;次日,二抗室温孵育 2 h,清洗后 DAB(北京中杉金桥公司)显色适当时间,苏木素染色 15 s,梯度酒精脱水后 50% 甘油封片。

1.2.8 Western blot

小鼠组织用 8 mol/L 尿素裂解液(75 μ mol/L NaCl, 50 μ mol/L Tris-Cl pH 8.2)包含 1 mmol/L

PMSF 提取蛋白, Bradford Protein Assay Kit(上海碧云天)测其浓度。蛋白用10% SDS-PAGE 胶分离后转移至PVDF膜(Millipore), 然后用5%脱脂奶粉溶液室温封闭2 h, Ythdf3 抗体(Abcam 公司, 美国)以1:500 稀释后4 °C 孵育过夜。次日, 二抗室温孵育2 h, 用 SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate(Thermo 公司, 美国)检测结果。

2 结果

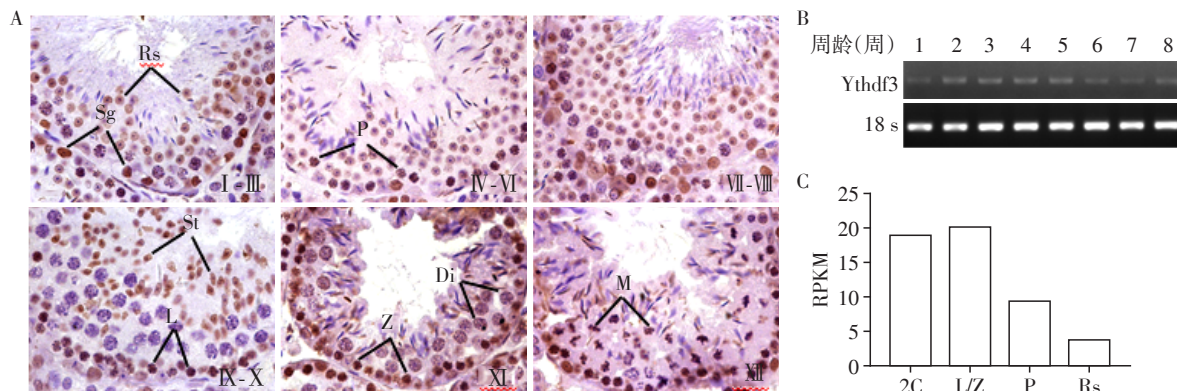
2.1 Ythdf3 在小鼠睾丸中的表达情况

免疫组化结果显示, 精原细胞、各级精母细胞、圆形精子细胞, 以及变形期精子细胞的细胞核中均有 Ythdf3 表达, 在精原细胞、细线期和偶线期的精母细胞中 Ythdf3 信号较强, 在粗线期精母细胞和圆形精子中信号较弱(图 1A)。RT-PCR 结果发现, Ythdf3 基因在1周龄小鼠睾丸中已开始并持续表达(图 1B)。进一步分析了已发表的分选的生精细胞 RNA 的测序数据, 结果显示 Ythdf3 mRNA 在精原

细胞和体细胞、细线期和偶线期精母细胞中表达量较高, 而在粗线期精母细胞、圆形精子中表达量较低(图 1C)^[15], 与本研究免疫组化染色结果一致, 提示 Ythdf3 基因可能对精子发生具有重要作用。

2.2 构建 Ythdf3 基因敲除小鼠

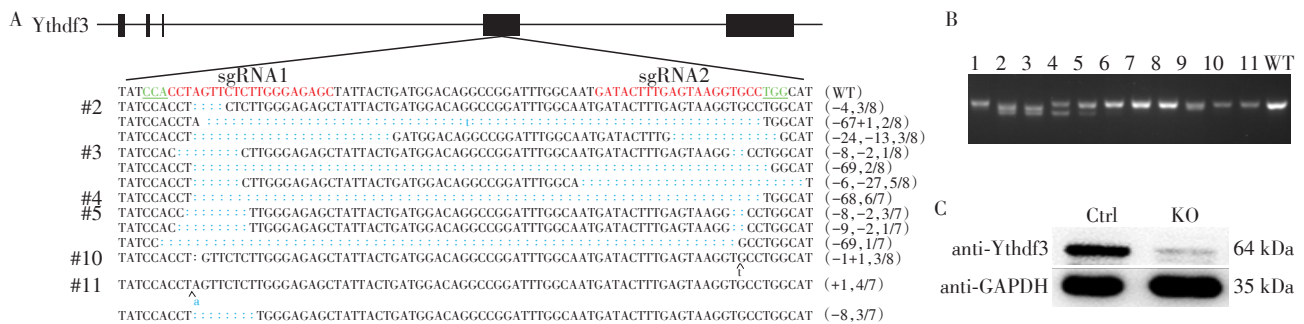
Ythdf3 在小鼠中具有6个转录本, 为了完全敲除 Ythdf3, 选择了6个转录本共有的外显子。为了增加基因敲除效率, 在4号公共外显子上设计了2条 sgRNA, 将体外转录好的 sgRNA 与 Cas9 mRNA 共同注射到合子期受精卵, 然后移植到假孕小鼠子宫, 共出生11只首建鼠。通过对11只首建鼠中的6只小鼠进行TA克隆和Sanger测序, 发现这6只小鼠都携带移码突变(图 2A)。通过对11只首建鼠尾巴基因组 DNA 进行PCR扩增, 可以看到有4只小鼠含有明显的突变条带(图 2B)。将携带移码突变的首建鼠和野生型 C56BL/6J 进行回交, 得到 F1 之后进行自交, 然后得到 Ythdf3 纯合子敲除小鼠。通过 Western blot 检测到在敲除小鼠中, Ythdf3 蛋白被成功删除(图 2C)。



A: 免疫组化检测睾丸中 Ythdf3 蛋白表达情况($\times 40$); B: RT-PCR 检测 1~8 周龄小鼠睾丸中 Ythdf3 表达量; C: Ythdf3 在分选的生精细胞中的表达情况。Rs: 圆形精子; Sg: 精原细胞; St: 精子细胞; L: 细线期精母细胞; P: 粗线期精母细胞; Z: 偶线期精母细胞; Di: 双线期精母细胞; M: 终变期减数分裂细胞; RPKM: 每百万 Reads 中来自某基因每千碱基长度的 Reads 数; 2C: 精原细胞和体细胞。

图1 Ythdf3 基因表达情况

Figure 1 Expression of Ythdf3



A: Ythdf3 基因敲除策略, 红色代表 sgRNA 的识别位点, 绿色下划线代表 PAM 序列, 括号内正数代表碱基插入数目, 负数代表碱基敲除数目, 分数代表 TA 克隆中突变克隆的比例; B: PCR 鉴定 11 只首建鼠(1~11)的基因型; C: Western blot 检测 Ythdf3 蛋白在小鼠组织表达情况, 敲除小鼠中存在一条非特异性条带。

图2 构建 Ythdf3 基因敲除小鼠

Figure 2 Generation of Ythdf3 KO mice

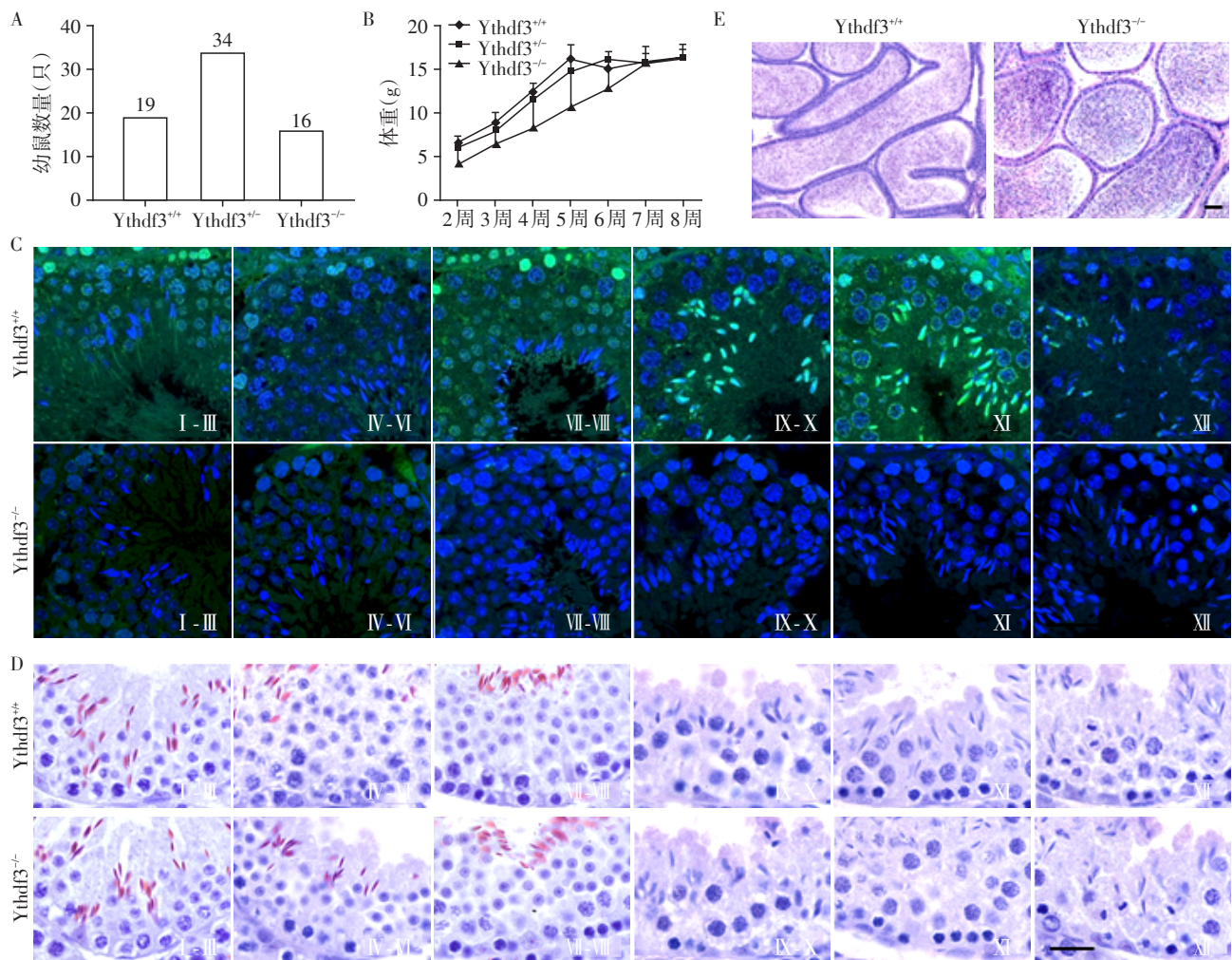
2.3 Ythdf3 敲除小鼠表型分析

首先,对 Ythdf3 缺失的小鼠出生比例进行统计,发现敲除小鼠出生比例符合孟德尔遗传定律(图 3A),说明敲除 Ythdf3 并不影响小鼠的存活;通过对 3 种基因型小鼠体重的连续称量,发现与对照组相比,敲除小鼠体重无显著性差异(图 3B),说明 Ythdf3 敲除不影响小鼠的体重。Ythdf3 对精子发生作用如何? 对 Ythdf3 敲除小鼠的生殖器官进行了检测,首先从形态学角度分析睾丸和附睾的发育有无异常。免疫荧光显示 Ythdf3 在小鼠睾丸的精原细胞、各级精母细胞、圆形精子细胞及变形期精子细胞的细胞核中表达,与前面免疫组化染色结果一致,而在敲除小鼠中,检测不到荧光信号,说明 Ythdf3 确实被成功敲除,这和之前的 Western blot 结果一致(图 3C)。通过 HE 染色,发现敲除小鼠辜

丸各级生精时相和对照组相比无明显差异(图 3D),敲除小鼠附睾尾中精子无明显异常(图 3E)。以上数据说明敲除 Ythdf3 不影响小鼠的精子发生过程。

3 讨论

通过免疫组化染色,发现 Ythdf3 在小鼠精原细胞和细线期、偶线期精母细胞中高表达。利用 CRISPR/Cas9 技术,成功构建 Ythdf3 基因敲除小鼠模型,发现敲除 Ythdf3 不影响纯合小鼠的出生比例和体重,进一步分析发现 Ythdf3 敲除小鼠的精子发生正常,因此发现在正常生理条件下, Ythdf3 敲除对小鼠精子发生无明显影响。之前研究表明,敲除 m6A 的甲基转移酶和去甲基化酶,会导致小鼠精子发生异常,说明 m6A 修饰对精子发生非常重要。m6A 的生物学功能需要其识别蛋白去执行,本实验



A: Ythdf3 杂合敲除小鼠子代基因型比例; B: 2~8 周龄小鼠体重 ($P>0.05, n=3$); C: 免疫荧光染色检测 8 周龄小鼠辜丸 Ythdf3 表达情况 ($\times 63$); D: HE 染色分析 8 周龄小鼠辜丸各级生精时相 ($\times 100$); E: 8 周龄小鼠附辜尾 HE 染色 ($\times 20$)。

图 3 Ythdf3 敲除小鼠表型分析

Figure 3 Phenotypic analysis of Ythdf3 KO mice

室已经报道敲除 Ythdf1 不影响小鼠精子发生,其他研究组报道敲除 Ythdf2,雄鼠精子发生正常,并可以生育后代,说明单独敲除 Ythdf1、Ythdf2 和 Ythdf3 不影响小鼠的精子发生。之前文章报道 Ythdf3 与 Ythdf1 协同作用促进蛋白合成,同时 Ythdf3 可影响 Ythdf2 介导的甲基化 mRNA 的降解,那么, Ythdf3 与 Ythdf1、Ythdf2 在小鼠精子发生过程中有无协同作用,有待深入研究。另外,在热应激条件下, Ythdf2 被报道可以入核保护热应激蛋白 mRNA 免受 FTO 的去甲基化,并通过非帽依赖的方式促进热应激蛋白的翻译,从而维持细胞稳态^[16],在极端情况下, Ythdf3 是否对精子发生存在作用,亦值得我们进一步探究。

[参考文献]

- [1] Pan T. N6-methyl-adenosine modification in messenger and long non-coding RNA[J]. Trends Biochem Sci, 2013, 38(4):204-209
- [2] Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, et al. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons [J]. Cell, 2012, 149 (7) : 1635-1646
- [3] Wu RF, Jiang DH, Wang YZ, et al. N6-methyladenosine (m6A) methylation in mRNA with a dynamic and reversible epigenetic modification[J]. Mol Biotechnol, 2016, 58 (7):450-459
- [4] Yang Y, Hsu PJ, Chen YS, et al. Dynamic transcriptomic m(6)A decoration: writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism[J]. Cell Res, 2018, 28(6):616-624
- [5] Xu K, Yang Y, Feng GH, et al. Mettl3 mediated m(6)A regulates spermatogonial differentiation and meiosis initiation[J]. Cell Res, 2017, 27(9):1100-1114
- [6] Lin Z, Hsu PJ, Xing X, et al. Mettl3/Mettl14-mediated mRNA N6-methyladenosine modulates murine spermatogenesis[J]. Cell Res, 2017, 27(10):1216-1230
- [7] Tang C, Klukovich R, Peng H, et al. ALKBH5-dependent m6A demethylation controls splicing and stability of long 3' -UTR mRNAs in male germ cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(2):E325-E333
- [8] Kasowitz SD, Ma J, Anderson SJ, et al. Nuclear m6A reader YTHDC1 regulates alternative polyadenylation and splicing during mouse oocyte development [J]. PLoS Genet, 2018, 14(5):e1007412
- [9] Hsu PJ, Zhu Y, Ma H, et al. Ythdc2 is an N(6)-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis [J]. Cell Res, 2017, 27(9):1115-1127
- [10] 刘媛媛,宋小玲,王仿竹. m6A 识别蛋白 Ythdf1 在精子发生中的作用研究 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2019, 39(2):171-175
- [11] Ivanova I, Much C, Di Giacomo M, et al. The RNA m6A reader YTHDF2 is essential for the post-transcriptional regulation of the maternal transcriptome and oocyte competence [J]. Mol Cell, 2017, 67(6):1059-1067
- [12] Shi H, Wang X, Lu Z, et al. YTHDF3 facilitates translation and decay of N6-methyladenosine-modified RNA [J]. Cell Res, 2017, 27(3):315-328
- [13] Li A, Chen YS, Ping XL, et al. Cytoplasmic m6A reader YTHDF3 promotes mRNA translation [J]. Cell Res, 2017, 27(3):444-447
- [14] Shen B, Zhang W, Zhang J, et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects [J]. Nat Methods, 2014, 11(4):399-402
- [15] da Cruz I, Rodríguez-Casuriaga R, Santiañaque FF, et al. Transcriptome analysis of highly purified mouse spermatogenic cell populations: gene expression signatures switch from meiotic- to postmeiotic-related processes at pachytene stage [J]. BMC Genomics, 2016, 17:294
- [16] Zhou J, Wan J, Gao X, et al. Dynamic m(6)A mRNA methylation directs translational control of heat shock response [J]. Nature, 2015, 526(7574):591-594

[收稿日期] 2019-01-16