

甲基转移酶 $set9$ 缺失的斑马鱼低氧耐受能力增强

查荒源 于光晴 陈小云 肖武汉 刘兴

DELETION OF METHYLTRANSFERASE *SET9* ENHANCES HYPOXIA TOLERANCE IN ZEBRAFISH

ZHA Huang-Yuan, YU Guang-Qing, CHEN Xiao-Yun, XIAO Wu-Han, LIU Xing

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2021.2020.106>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

血红素加氧酶1在斑马鱼低氧应激中的保护作用研究

STUDIES ON THE PROTECTIVE ROLE OF ZEBRAFISH HO1 IN RESPONSE TO HYPOXIA

水生生物学报. 2017, 41(1): 43–49 <https://doi.org/10.7541/2017.6>

斑马鱼 $ints12$ 的CRISPR/Cas9敲除及其对UsnRNA剪接的调控

CRISPR/CAS9-MEDIATED KNOCKOUT OF *INTS12* IN ZEBRAFISH AND THE REGULATION OF *INTS12* ON USNRNA PROCESSING

水生生物学报. 2019, 43(1): 1–8 <https://doi.org/10.7541/2019.001>

雨生红球藻虾青素酰基转移酶的鉴定与功能研究

IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL STUDY OF ASTAXANTHIN ACYLTRANSFERASE IN *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

水生生物学报. 2020, 44(5): 1143–1151 <https://doi.org/10.7541/2020.132>

斑马鱼 $IRF11$ 基因的鉴定、亚细胞定位及表达特征

IDENTIFICATION, SUBCELLULAR LOCALIZATION AND EXPRESSION CHARACTERIZATION OF ZEBRAFISH *IRF11*

水生生物学报. 2017, 41(1): 1–8 <https://doi.org/10.7541/2017.1>

秦岭细鳞鲑代谢及低氧耐受能力对温度驯化的响应

THE METABOLISM AND HYPOXIA TOLERANCE OF *BRACHYMYSTAX LENOK TSINLINGENSIS* IN RELATION TO TEMPERATURE ACCLIMATION

水生生物学报. 2017, 41(1): 201–205 <https://doi.org/10.7541/2017.25>

肌间刺缺失对斑马鱼骨骼发育的影响

COMPARATIVE ANALYSIS OF SKELETAL DEVELOPMENT BETWEEN WILDTYPE ZEBRAFISH AND INTERMUSCULAR BONE-DEFICIENT MUTANTS

水生生物学报. 2020, 44(3): 546–553 <https://doi.org/10.7541/2020.067>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2021.2020.106

甲基转移酶 $set9$ 缺失的斑马鱼低氧耐受能力增强

查荒源^{1,2} 于光晴² 陈小云² 肖武汉^{2*} 刘兴^{2*}

(1. 大连海洋大学水产与生命学院, 大连 116023; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 为了研究鱼类的甲基转移酶 $set9$ [SET domain containing (lysine methyltransferase) 9, 也称作 $set7/setd7$]在低氧耐受中的功能, 以斑马鱼(*Danio rerio*)作为模式生物, 利用CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9)基因编辑技术, 在斑马鱼 $set9$ 基因的第二个外显子上设计了Cas9的靶位点, 对其进行基因敲除, 获得了缺失8个碱基的 $set9$ 基因敲除的斑马鱼品系。对受精后3d的斑马鱼幼鱼和3月龄的斑马鱼成鱼进行低氧胁迫处理, 比较了野生型及 $set9$ 基因敲除的斑马鱼的低氧耐受能力; 并对低氧胁迫处理后的3月龄的野生型及 $set9$ 基因敲除的斑马鱼成鱼的脑组织取材、固定并进行TUNEL染色。结果显示: $set9$ 基因敲除的斑马鱼与野生型相比, 其低氧耐受能力显著增强, 脑组织中的细胞凋亡水平显著减少。研究为进一步揭示鱼类甲基转移酶 $set9$ 在低氧耐受中的功能和分子机制提供了线索, 并为培育耐低氧鱼类新品种提供了候选靶标。

关键词: 甲基转移酶; $set9$; 基因敲除; 低氧; 斑马鱼

中图分类号: Q344⁺.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2021)05-0951-07



低氧诱导因子(Hypoxia inducible factor, HIF)介导的转录激活调控是细胞感受氧气变化和应答低氧胁迫的最为关键的信号传导途径^[1,2]。低氧信号传导途径非常保守, 从线虫到人类, 低氧信号都启动相同或相似的同源基因的转录和调控, 从而调控类似的生理和生化反应^[3]。HIF由HIF- α (包括HIF-1 α 和HIF-2 α)和HIF-1 β 两个亚单位组成, 每个亚单位都包含基本的bHLH-PAS (helix-loop-helix-PAS)结构域, 该结构域介导异源二聚体的形成及与DNA的结合。HIF-1 β 的蛋白水平稳定, 因而HIF的活性主要由HIF- α 来决定^[4,5]。在常氧条件下, HIF- α 能够被一类依赖于氧气的脯氨酸羟化酶(Prolyl hydroxylase domain enzymes, PHDs, 包括PHD1, PHD2 和 PHD3)所识别, 进而对HIF- α (包括HIF-1 α 和HIF-2 α)上特定的脯氨酸残基进行羟基化修饰, 其中, PHD2是起主要作用的脯氨酸羟化酶^[6]。被羟基化

修饰的HIF- α 能被pVHL(Von Hippel-Lindau)识别, pVHL能够与ElonginB、ElonginC结合形成E3泛素连接酶复合体, 介导HIF- α 通过蛋白酶体降解^[7]。在低氧条件下, 由于氧气的缺乏, 使得脯氨酸羟化酶的活性受到抑制, HIF- α 的羟基化修饰受到抑制, 进而导致HIF- α 的蛋白酶体降解途径受到抑制, 从而导致HIF- α 的蛋白水平得以积累, 积累的HIF- α 进入细胞核, 与HIF-1 β 形成异源二聚体, 该二聚体与下游基因启动子上的低氧应答元件(Hypoxia response element, HRE)结合, 从而激活下游基因的表达, 发挥相应的生物学功能^[1,4]。

蛋白质赖氨酸残基上的甲基化修饰主要是由一类含有SET保守结构域的蛋白质完成的, 目前在哺乳动物中已鉴定到50多种蛋白质可以归入这一家族, 组蛋白甲基转移酶SET9就是该家族的成员^[8,9]。SET9可以甲基化修饰组蛋白H3上第4位的赖氨酸

收稿日期: 2020-05-11; 修订日期: 2021-04-16

基金项目: 国家重点研发项目(2018YFD0900602); 国家自然科学基金(31830101、31721005、31671315和31772872); 中国科学院战略性先导科技专项(A)(XDA24010308); 青年创新促进会(CAS)资助 [Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900602); the National Natural Science Foundation of China (31830101, 31721005, 31671315 and 31772872); the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (A)(XDA24010308); Youth Innovation Promotion Association (CAS)]

作者简介: 查荒源, 男, 硕士研究生; 主要从事鱼类抗逆抗病机理研究。E-mail: zhahy@ihb.ac.cn

通信作者: 肖武汉, 男, 博士, 研究员; 主要从事鱼类抗逆抗病机理及遗传育种研究。E-mail: w-xiao@ihb.ac.cn 刘兴, 男, 博士, 副研究员; 主要从事鱼类抗逆抗病机理及遗传育种研究。E-mail: liuxing@ihb.ac.cn *共同通信作者

残基,也可以对多种非组蛋白进行甲基化修饰^[10-12]。SET9可以甲基化修饰p53上第372位的赖氨酸残基,从而激活p53的转录活性^[13]。SET9可以甲基化RelA第37位的赖氨酸残基,在肿瘤坏死因子TNF α 的刺激下增强RelA与下游基因启动子的结合^[14];SET9也可以甲基化RelA第314和315位的赖氨酸残基,从而促进与下游基因启动子结合的RelA的降解,抑制NF- κ B信号通路的激活^[15]。

前期的研究工作发现SET9可以甲基化HIF-1 α 上第32位的赖氨酸残基,抑制HIF-1 α 与下游基因启动子的结合,从而抑制低氧信号通路下游基因的表达^[16]。但是,SET9在体内调控低氧信号通路和在低氧胁迫中的生物学功能及其机制还并不清楚。

研究基因在体生物学功能最好的手段是建立该基因敲除的动物模型。斑马鱼(*Danio rerio*)是重要的模式生物,建立目的基因敲除的斑马鱼品系有助于研究该基因的在体生物学功能。前期的研究工作以斑马鱼为模式生物,建立了foxo3b、tet1及fih敲除的斑马鱼品系,用以研究这些基因在低氧耐受中的生物学功能。foxo3b可以诱导vhl的表达,从而促进hif- α 的降解,foxo3b的敲除会导致斑马鱼低氧耐受能力的下降^[17];tet1可以稳定hif- α 的蛋白水平,tet1的敲除会降低斑马鱼的低氧耐受能力^[18];fih可以抑制hif- α 的转录激活活性,fih的敲除可以增强斑马鱼的低氧耐受能力^[19]。

本研究利用CRISPR/Cas9基因编辑技术,获得了甲基转移酶set9敲除的斑马鱼品系,初步分析了set9基因的敲除对斑马鱼低氧耐受能力的影响,为研究鱼类甲基转移酶set9在低氧耐受中的生物学功能及耐低氧鱼类新品种的培育提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

主要试剂 DNA胶回收试剂盒购自Bio-flux公司,质粒小提试剂盒购自天根公司,限制性内切酶、RNAiso plus购自TaKaRa, All-in-One cDNA Synthesis SuperMix kit试剂盒、SYBR Green Fast quantitative PCR master mix试剂盒购自Biotool公司,T4 DNA连接酶、DNase I 购自Fermentas公司,T7体外转录试剂盒购自Ambion公司,Agarose、2 $\times$ Sosoo Mix重组酶购自Tsingke公司,DNA Marker、Trans10感受态细胞购自TransGen公司,多聚甲醛、DEPC购自Amresco公司。

主要仪器 显微注射仪PLI-100(Harvard Aparatus),斑马鱼生化培养箱SHP-150(上海精宏),低氧工作站Invivo2(Ruskin),凝胶成像系统(上海

培清科技有限公司),离心机5702、5430、5425D、5415R(Eppendorf),荧光定量PCR仪Step One Real-Time PCR System(ABI),恒温水浴锅(上海精宏),Nanodrop 2000浓度定量仪(Thermo),-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱(Thermo)。

1.2 斑马鱼品系

AB品系的斑马鱼购自国家斑马鱼资源中心。

1.3 序列分析

使用ClustalX2软件对人SET9、小鼠Set9和斑马鱼set9的氨基酸序列进行比对,并根据已知的人SET9的结构域标注3个物种的SET结构域及其甲基转移酶的酶活性位点。

1.4 斑马鱼set9基因的敲除与鉴定

利用在线设计工具 (<http://crispr.mit.edu>) 设计Cas9作用的靶位点;将体外合成的Cas9 mRNA和gRNA(guide RNA)按照400 ng/ μ L:60 ng/ μ L混合后,注射到一细胞期胚胎动物极;24h后,利用异双链迁移率测定法(Heteroduplex mobility assay, HMA)筛选有敲除效果的F0代嵌合体;F0代性成熟后与AB品系斑马鱼交配,筛选到能稳定遗传的F1代杂合子;F1代性成熟后自交可获得对应的野生型和纯合子突变体,利用PCR扩增基因组中包含Cas9作用靶位点的DNA片段,经测序确定突变的碱基信息。

1.5 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

取受精后3d的野生型及set9基因敲除的斑马鱼幼鱼,使用TaKaRa公司的RNAiso plus进行RNA的提取,使用Biotool公司的All-in-One cDNA Synthesis SuperMix kit试剂盒进行cDNA的合成,使用Biotool公司的SYBR Green Fast quantitative PCR master mix试剂盒进行qRT-PCR检测,使用5'-GCATGTGCTGGGTCTACTATC-3'和5'-GGCCATCAGGGTACACATAAG-3'扩增set9的mRNA, β -actin作为内参,其扩展引物为5'-TACAATGAGCTCCGTGTTGC-3'和5'-ACATACAATGGCAGGGGTGTT-3'。

1.6 斑马鱼低氧处理

使用Ruskin Invivo2 I-400低氧工作站进行斑马鱼的低氧胁迫处理。对于受精后3d的斑马鱼幼鱼,低氧胁迫时氧气浓度调整到2%,将出膜且发育程度一致的野生型及基因敲除的斑马鱼置于6 cm培养皿中,每皿50条,加入5 mL的胚胎培养液(Egg water),放置于低氧工作站中,每12h统计1次鱼的存活情况,利用GraphPad 7.0绘制存活曲线;对于3月龄的斑马鱼成鱼,低氧胁迫时氧气浓度调整到5%,将个体大小相近(个体重量 $\pm$ 0.02 g)的野生型及基因敲除的斑马鱼放置于250 mL锥形瓶中,加入200 mL的曝气水,放置于低氧工作站中,并进行跟

踪拍照, 记录鱼的运动及存活情况。

1.7 TUNEL染色

将个体大小相近(个体重量 ± 0.02 g)的3月龄野生型及基因敲除的斑马鱼放置于低氧工作站, 并在低氧胁迫6h后将对应的野生型及敲除品系的斑马鱼进行脑部的取材和固定, 利用TUNEL染色试剂盒进行染色并进行拍照, 比较斑马鱼脑部细胞凋亡的情况。

1.8 统计学处理

所有相关实验至少重复3次。使用GraphPad 7.0软件展示统计的数据, 结果表示为平均值 $\pm$ SEM。对于所有比对, $P < 0.05$ 被视为具有统计学意义。

2 结果

2.1 斑马鱼甲基转移酶 $set9$ 的序列特征

斑马鱼 $set9$ 基因的全长CDS长度为1977 bp, 编码373个氨基酸组成的蛋白质。利用ClustalX2软件对人SET9、小鼠Set9和斑马鱼 $set9$ 的氨基酸序列进行比对, 发现序列的保守性很高。作为一个含SET结构域的赖氨酸甲基转移酶, 斑马鱼 $set9$ 也含有一个保守的SET结构域(图1中虚线框标注)并且其发挥甲基转移酶活性的酶活性位点在三个物种间都是保守的(图1中实线框标注)。

2.2 建立 $set9$ 基因敲除的斑马鱼品系

根据CRISPR/Cas9基因编辑技术的原理, 在斑马鱼 $set9$ 基因的第二个外显子上, 设计了基因编辑

的靶位点, 其序列为5'-GGACAGCGATGATGAC AACA-3'(图2A)。提取基因编辑品系鱼尾基因组, 使用引物5'-AGTGCAGGGCTGATGATG-3'和引物5'-CTAATCCTCGACGGAATGAGAC-3'扩增包含靶位点的DNA片段, 经异双链迁移率测定法筛选获得有效率的F0代(图2B)。

F0发育至性成熟后与AB品系交配, 筛选到能稳定遗传的F1代, 获得一个缺失8个碱基的品系。由于在翻译起始密码子之后, 缺失8个碱基, 造成移码突变, 终止密码子提前出现, 使得突变的品系只表达不包含SET结构域的14个氨基酸的多肽(图2A)。由于翻译的提前终止, 会导致mRNA的不稳定性, 进而导致mRNA的快速降解, 因此, 进一步利用qRT-PCR技术分析野生型和突变品系中 $set9$ 的mRNA水平, 结果显示突变品系中 $set9$ 的mRNA水平显著下降(图2C)。

以上结果表明, 利用CRISPR/Cas9基因编辑技术, 获得了 $set9$ 基因敲除的斑马鱼品系。在实验室正常饲养条件下, $set9$ 基因敲除的斑马鱼与其同胞野生型相比, 发育、生长和繁殖等并无肉眼可见的差异。

2.3 $set9$ 的敲除能增强斑马鱼低氧耐受能力

利用获得的 $set9$ 基因敲除的斑马鱼品系, 分析 $set9$ 基因在斑马鱼低氧耐受中的功能。首先, 选取出生后3d的斑马鱼幼鱼进行低氧处理。该时期的斑马鱼幼鱼刚孵化出膜, 可以方便地获取足够数量

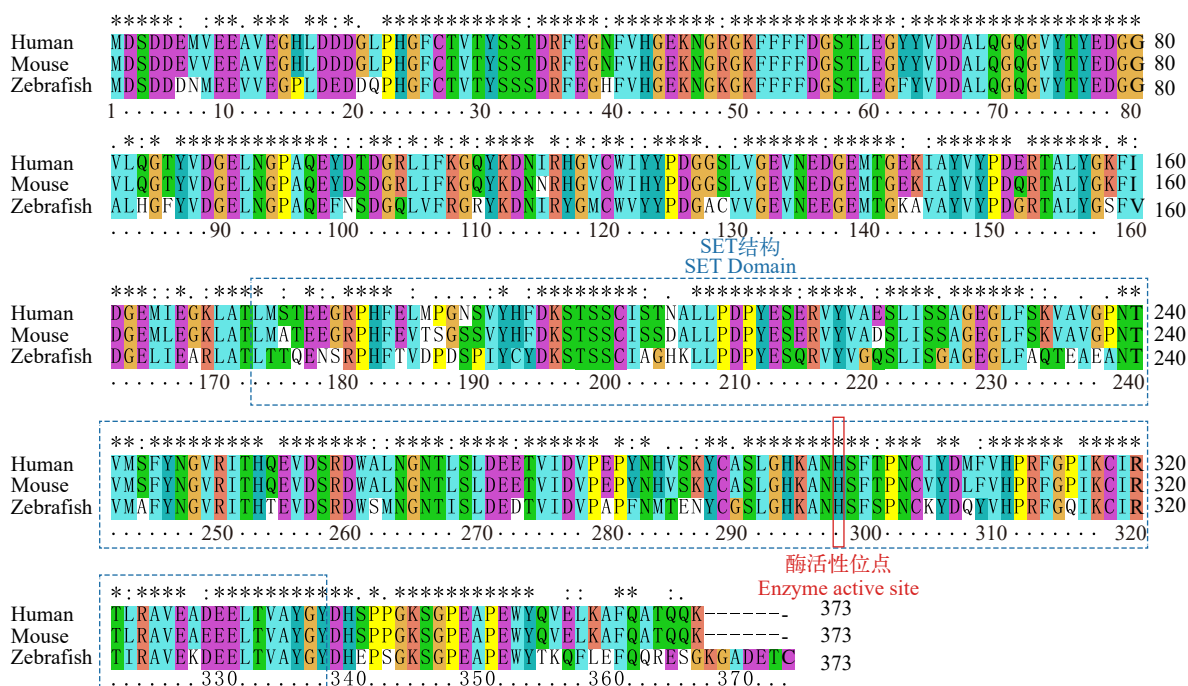


图1 人SET9、小鼠Set9、斑马鱼 $set9$ 的氨基酸序列对比

Fig. 1 Alignment of amino acid sequences of human SET9, mouse Set9 and zebrafish $set9$

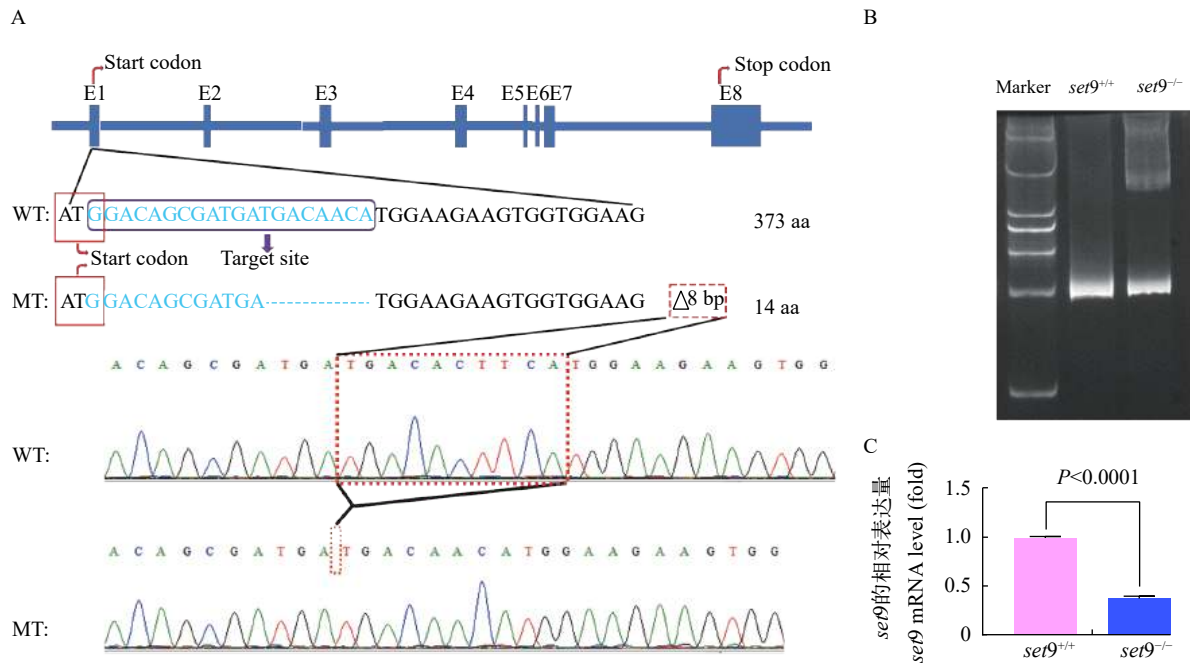


图2 利用CRISPR/Cas9技术敲除斑马鱼set9基因

Fig. 2 Targeting strategy for generating zebrafish *set9* mutant by CRISPR/Cas9

A. 斑马鱼*set9*基因结构及敲除靶位点示意图; B. 异源双链迁移实验检测突变体敲除效果; C. RT-PCR检测野生型及敲除品系的斑马鱼中*set9*的mRNA水平

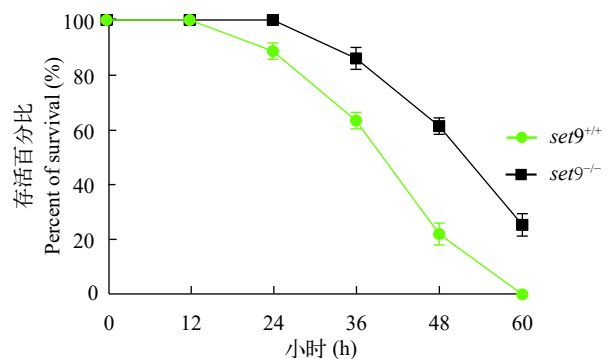
A. Schematic of targeting site in *set9* and the resulted nucleotide sequence in the mutant; B. Verification of the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated zebrafish *set9* disruption by HMA (heteroduplex mobility assay). Genomic DNA was prepared from the pools of injected embryos. The injected (Cas9 mRNA & gRNA) pools contain heteroduplex band, indicating that the site has been disrupted; C. The relative mRNA levels of *set9* in the wild-type (WT) (*set9*^{+/+}) or homozygous mutant (*set9*^{-/-}) (3 dpf) detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

的样本,且个体差异较小,因而可以很好地评估斑马鱼低氧耐受能力的差异。将野生型及*set9*基因敲除的斑马鱼幼鱼放置于氧气含量为2%的低氧工作站中,随着时间的推移,记录斑马鱼幼鱼的存活时间,制作存活曲线。结果显示,在低氧胁迫处理24h后,野生型的斑马鱼已经开始死亡,而*set9*基因敲除的斑马鱼在处理36h后才出现明显的死亡;在低氧胁迫处理60h后,野生型的斑马鱼均已死亡,而*set9*敲除的斑马鱼还有部分存活(图3)。由此可见,*set9*基因的敲除可以增强斑马鱼幼鱼的低氧耐受能力。

进一步,选取3月龄的斑马鱼成鱼进行低氧耐受能力的比较。将野生型及*set9*基因敲除的斑马鱼成鱼放置于氧气含量为5%的低氧工作站中,录制视频记录斑马鱼的存活及运动的情况。结果显示,在低氧胁迫处理4h后,野生型的斑马鱼即开始出现死亡;在低氧胁迫处理8h后,野生型的斑马鱼均已死亡,而*set9*敲除的斑马鱼则刚开始有鱼出现濒死的迹象(图4)。以上结果显示,*set9*基因的敲除可以增强斑马鱼成鱼的低氧耐受能力。

2.4 *set9*的敲除减轻低氧导致的脑细胞凋亡

为阐明*set9*敲除的斑马鱼高低氧耐受力的机

图3 *set9*基因的敲除能增强斑马鱼幼鱼的低氧耐受能力Fig. 3 Deletion of *set9* enhances hypoxia tolerance in zebrafish larvae

野生型及*set9*基因敲除的斑马鱼幼鱼(受精后3d)放置于氧气含量为2%的低氧工作站中,记录斑马鱼幼鱼的存活时间,制作存活曲线

The survival curve of WT (*set9*^{+/+}) and *set9*-null (*set9*^{-/-}) zebrafish larvae (3 dpf) under hypoxia (2% O₂). Error bars, SEM

制,利用TUNEL染色检测低氧胁迫处理后野生型及*set9*敲除的斑马鱼脑中细胞凋亡的情况。5% O₂处理6h后,选择存活的野生型及*set9*敲除的斑马鱼,对其脑组织取材、固定、切片并进行TUNEL

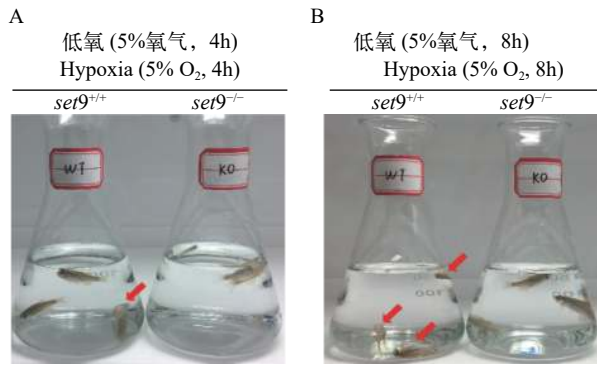


图4 $set9$ 基因的敲除能增强斑马鱼成鱼的低氧耐受能力

Fig. 4 Deletion of $set9$ enhances hypoxia tolerance in zebrafish larvae

野生型以及 $set9$ 敲除的斑马鱼成鱼(3月龄)放置于氧气含量为5%的低氧工作站中(每组3条, 重复3次), 记录斑马鱼幼鱼的低氧耐受情况。A. 低氧处理4h后的情况, B. 低氧处理8h后的情况。箭头标注的是濒死的斑马鱼

The survival of WT ($set9^{+/+}$; left flask) and $set9$ -null ($set9^{-/-}$; right flask) adult zebrafish (3 mpf) after 4h (A) and 8h (B) in hypoxia conditions (5% O_2). Arrows, dying zebrafish

染色。结果表明, 野生型斑马鱼脑中凋亡细胞数量明显高于突变体(图5)。

3 讨论

SET9是一种重要的赖氨酸甲基转移酶, SET9最开始报道为通过甲基化组蛋白H3的第4位赖氨酸残基来实现对基因表达的调控^[11]。此外, 多种非组蛋白也被发现是SET9的底物, 包括p53、TAF10、E2F1、AR、RelA和FOXO3a等^[12]。SET9通过调控这些非组蛋白的甲基化修饰参与了细胞对多种环境胁迫的响应: SET9对FOXO3a的甲基化修饰可以调控氧化损伤诱导的神经细胞死亡^[20, 21]; SET9通过甲基化修饰p53和E2F1等转录因子的活性来响应DNA损伤等^[13, 22, 23]。最近, 首次在细胞水平报道了SET9通过直接甲基化低氧信号通路中的关键转录因子HIF-1 α 第32位的赖氨酸残基, 进而调控HIF-1 α 的转录活性, 从而在低氧信号转导及细胞低氧胁迫应答中发挥重要的生物学功能^[16]。然而, 对于SET9在体内的生物学功能还并不清楚。

水体溶氧量随季节、地理位置、水流状态和水体环境等变化而发生很大的变化, 鱼类在长期演化历程中发展出适应不同溶氧水环境的策略^[3]。而另一方面, 随着“工厂化”养殖等集约化养殖模式的发展, 单位水体养殖密度和产量的提高, 也迫切地

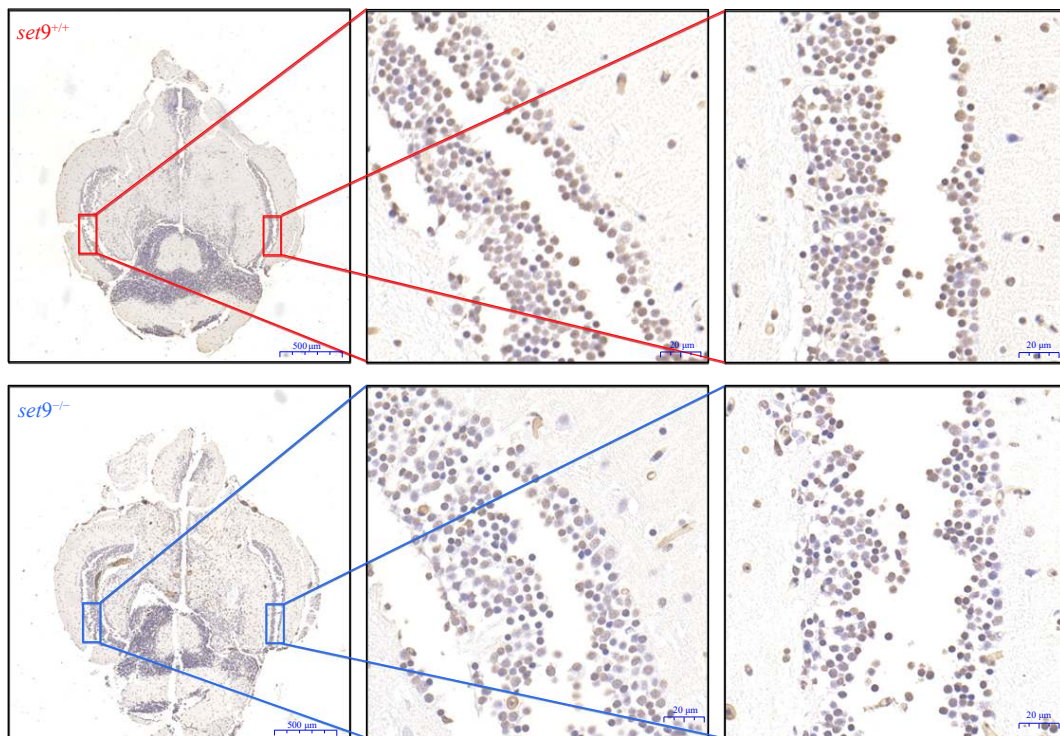


图5 $set9$ 基因的敲除能减少低氧胁迫下的斑马鱼脑部的细胞凋亡

Fig. 5 Deletion of $set9$ diminishes hypoxia-induced apoptosis in adult zebrafish brains

野生型及 $set9$ 敲除的斑马鱼成鱼(3月龄)放置于氧气含量为5%的低氧工作站中, 在低氧处理6h后, 对斑马鱼的脑组织进行取材和固定, 随后进行TUNEL染色。图中褐色的是凋亡的细胞, 而淡蓝色的是正常的细胞

TUNEL stain of the brains of WT ($set9^{+/+}$) and $set9$ -null ($set9^{-/-}$) adult zebrafish (3 mpf) after exposure to hypoxia (5% O_2) for 6h. Apoptotic cells are colored brown; healthy cells are colored baby blue

要求养殖品种的耐低氧能力有相应的提高。对于鱼类低氧适应机制的研究, 不仅对于认识鱼类物种的分化及低氧信号传导途径的系统演化等方面具有十分重要的理论意义, 而且对于培育耐低氧鱼类新品种具有十分重要的实践意义。低氧信号传导途径非常保守, 近年来的研究表明其在鱼类低氧适应及低氧耐受中具有重要功能^[24-26]。鉴于低氧诱导因子及其调控的分子网络在低氧信号传导中的关键作用, 挖掘低氧诱导因子的调控因子并解析其调控模式的分子机制是阐明鱼类低氧耐受分子机制的主要手段, 可以为培育耐低氧鱼类新品种提供候选靶标。

在哺乳动物中, SET9通过甲基化HIF-1 α 第32位的赖氨酸残基, 从而实现对低氧信号通路的调控。SET9在不同物种间具有极高的保守性, 其发挥甲基转移酶活性的SET结构域和酶活性位点, 在不同物种间都是非常保守的。然而, 斑马鱼中HIF-1 α 第32位的赖氨酸残基并不保守, 并不具备SET9作用的经典底物所具备的“R/K S K”3个氨基酸组成的基序^[13, 16]。因此, 斑马鱼set9调控低氧信号传导途径及影响鱼类低氧耐受的分子机制还有待进一步的探讨, 很可能与哺乳类SET9调控低氧信号传导的机制有所不同。

本研究利用CRISPR/Cas9基因编辑技术, 获得了甲基转移酶set9敲除的斑马鱼品系。斑马鱼set9基因的敲除可以增强斑马鱼的低氧耐受能力, 减少低氧胁迫导致脑组织中的细胞凋亡水平, 且在正常饲养条件下, 其发育、生长和繁殖与野生型斑马鱼相比, 并无差异。本研究为深入了解甲基转移酶set9的在体生物学功能及其机制提供了线索, 也为鱼类耐低氧新品种的培育提供了候选的靶标。

参考文献:

- [1] Dunwoodie S L. The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo [J]. *Developmental Cell*, 2009, **17**(6): 755-773.
- [2] Schofield C J, Ratcliffe P J. Oxygen sensing by HIF hydroxylases [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, **5**(5): 343-354.
- [3] Bickler P E, Buck L T. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability [J]. *Annual Review of Physiology*, 2007(69): 145-170.
- [4] Semenza G L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine [J]. *Cell*, 2012, **148**(3): 399-408.
- [5] Greer S N, Metcalf J L, Wang Y, et al. The updated biology of hypoxia-inducible factor [J]. *The EMBO Journal*, 2012, **31**(11): 2448-2460.
- [6] Aragonés J, Fraisl P, Baes M, et al. Oxygen sensors at the crossroad of metabolism [J]. *Cell Metabolism*, 2009, **9**(1): 11-22.
- [7] Chittiboina P, Lonser R. Von Hippel-Lindau disease [J]. *Handbook of Clinical Neurology*, 2015(132): 139-156.
- [8] Kouzarides T. Chromatin modifications and their function [J]. *Cell*, 2007, **128**(4): 693-705.
- [9] Greer E L, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance [J]. *Nature Reviews. Genetics*, 2012, **13**(5): 343-357.
- [10] Wang H, Cao R, Xia L, et al. Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase [J]. *Molecular Cell*, 2001, **8**(6): 1207-1217.
- [11] Nishioka K, Chuikov S, Sarma K, et al. Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation [J]. *Genes & Development*, 2002, **16**(4): 479-489.
- [12] Biggar K K, Li S S. Non-histone protein methylation as a regulator of cellular signalling and function [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2015, **16**(1): 5-17.
- [13] Chuikov S, Kurash J K, Wilson J R, et al. Regulation of p53 activity through lysine methylation [J]. *Nature*, 2004, **432**(7015): 353-360.
- [14] Ea C K, Baltimore D. Regulation of NF-kappaB activity through lysine monomethylation of p65 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, **106**(45): 18972-18977.
- [15] Yang X D, Huang B, Li M, et al. Negative regulation of NF-kappaB action by Set9-mediated lysine methylation of the RelA subunit [J]. *The EMBO Journal*, 2009, **28**(8): 1055-1066.
- [16] Liu X, Chen Z, Xu C, et al. Repression of hypoxia-inducible factor α signaling by Set7-mediated methylation [J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, **43**(10): 5081-5098.
- [17] Liu X, Cai X, Hu B, et al. Forkhead transcription factor 3a (FOXO3a) modulates hypoxia signaling via up-regulation of the von hippel-lindau gene (VHL) [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2016, **291**(49): 25692-25705.
- [18] Wang J, Zhang D, Du J, et al. Tet1 facilitates hypoxia tolerance by stabilizing the HIF- α proteins independent of its methylcytosine dioxygenase activity [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, **45**(22): 12700-12714.
- [19] Cai X, Zhang D, Wang J, et al. Deletion of the fih gene encoding an inhibitor of hypoxia-inducible factors increases hypoxia tolerance in zebrafish [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, **293**(40): 15370-15380.
- [20] Xie Q, Hao Y, Tao L, et al. Lysine methylation of FOXO3 regulates oxidative stress-induced neuronal cell death [J]. *EMBO Reports*, 2012, **13**(4): 371-377.
- [21] Calnan D R, Webb A E, White J L, et al. Methylation by Set9 modulates FoxO3 stability and transcriptional activity [J]. *Aging*, 2012, **4**(7): 462-479.
- [22] Kontaki H, Talianidis I. Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death [J]. *Molecular Cell*, 2010, **39**(1): 152-160.

- [23] Xie Q, Bai Y, Wu J, *et al.* Methylation-mediated regulation of E2F1 in DNA damage-induced cell death [J]. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 2011, **31**(2): 139-146.
- [24] Turko A J, Cooper C A, Wright P A. Gill remodelling during terrestrial acclimation reduces aquatic respiratory function of the amphibious fish *Kryptolebias marmoratus* [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2012, **215**(Pt 22): 3973-3980.
- [25] Law S H, Wu R S, Ng P K, *et al.* Cloning and expression analysis of two distinct HIF- α isoforms-gcHIF-1 α and gcHIF-4 α --from the hypoxia-tolerant grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *BMC Molecular Biology*, 2006(7): 15.
- [26] Rimoldi S, Terova G, Ceccuzzi P, *et al.* HIF-1 α mRNA levels in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) exposed to acute and chronic hypoxia [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, **39**(4): 4009-4015.

DELETION OF METHYLTRANSFERASE *SET9* ENHANCES HYPOXIA TOLERANCE IN ZEBRAFISH

ZHA Huang-Yuan^{1,2}, YU Guang-Qing², CHEN Xiao-Yun², XIAO Wu-Han² and LIU Xing²

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: As a group of the lower vertebrates, fishes live in water for almost their whole life and have evolved gill as a specific organ to absorb oxygen dissolved in water but not in air. Compared to land environment, oxygen in water is much lower. In addition to altitude, oxygen in water is also influenced by temperature, sun light, season, water mobility, aquatic life, etc. Thus, fish has evolved a variety of species with a high range of hypoxia adaptation. For aquaculture, due to the influence of oxygen dissolved in water on survive, growth, reproduction and disease-resistant, oxygen is one of the major limiting factors. With the development of aquaculture, in order to obtain high yields in a limited body of water, high density cultivation has become a pursuing tendency. So, oxygen is becoming more and more critical for improving aquaculture constantly and healthily. Similar to mammals, during speciation, fishes have evolved sophisticated cellular sensors and systematic physiological systems responding to O₂ gradients. It is well-known that the hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α (HIF-1 α and HIF-2 α) are master regulators of the cellular response to O₂. HIF-1 α and HIF-2 α orchestrate this cellular response to hypoxia by regulating the expression of a wide set of genes involved in multiple biological processes.

In order to study the function of fish methyltransferase *set9* (SET domain containing (lysine methyltransferase) 9, also called *set7* or *setd7*) in hypoxic tolerance, we used zebrafish as the model organism. We targeted the first exon of *set9* gene, and obtained a mutant line with 8 base pairs deletion of *set9* gene using CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9) technology. The putative transcript from this mutant line was predicted truncated peptide due to premature termination. The predicted protein encoded by *set9*^{-/-} was 14aa residues starting from the amino terminus and semi-quantitative RT-PCR assays showed that *set9* mRNA was reduced in the mutant line as compared with the WT, indicating that *set9* had been successfully knocked out in the mutant line. Then, a Ruskinn Invivo2 I-400 work station was used for hypoxia treatment. For hypoxia treatment of zebrafish embryo and larvae at 3 days postfertilization (dpf), the oxygen concentration in the Ruskinn Invivo2 I-400 work station was set to 2%. During preliminary experiments, we noticed that zebrafish adults were less tolerant of hypoxic conditions than larvae (3 dpf) and the zebrafish body weight significantly affected hypoxia tolerance. Then, we selected adult zebrafish (3 mpf) with similar body weights to test their hypoxia tolerance and the oxygen concentration in the Ruskinn Invivo2 I-400 work station was set to 5% instead of 2%. The apoptotic cells in the brains of *set9*-null zebrafish and their WT siblings subjected to hypoxia (5% O₂) were detected by TUNEL assay using the Apoptag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore) following the manufacturer's instructions. After 6h of hypoxia, there were significantly more apoptotic cells in the WT zebrafish brains than in the *set9*-null zebrafish brains. The results indicated that *set9*-deficient zebrafish showed significantly enhanced hypoxic tolerance and significantly reduced apoptosis in brain tissue. This study provides clues for further reveal the function and molecular mechanism of fish methyltransferase *set9* in hypoxic tolerance, and provides a candidate target for breeding new fish species with enhanced hypoxia tolerance.

Key words: Methyltransferase; *set9*; Gene knock-out; Hypoxia; Zebrafish