

非整倍体胚胎发育中 MSL 复合体组分的 RNA 表达分析*

祁海珠 田宇 张帅 孙林[†]

(北京师范大学生命科学学院, 北京师范大学北京市抗性基因资源与分子发育重点实验室, 100875, 北京)

摘要 MSL (male specific lethal) 复合体作为调节果蝇剂量补偿的关键元件, 在非整倍体基因表达调控过程中发挥了重要作用. 为深入探究非整倍体胚胎发育过程的分子调控机制, 运用 TSA-FISH (tyramide signal amplification-fluorescence in situ hybridization) 技术比较分析正常二倍体胚胎与常染色体三体胚胎中的 MSL 复合体组分基因表达模式, 探究复合体重要组分在果蝇非整倍体胚胎不同时期的表达水平, 以及亚细胞定位的变化. 研究表明, 在 MSL 复合体尚未组装的非整倍体胚胎发育早期, 即母体表达阶段, 多数复合体组分基因就已存在转录本水平上的差异, 而这种表达差异主要源自于母体的非单倍体配子. 随着发育的进行, 染色体片段的增加导致基因组内剂量平衡发生变化, 由此产生的反式剂量效应将引发 MSL 复合体各组分表达水平的差异变化, 而这种差异将持续作用于后续非整倍体胚胎发育的各个时期.

关键词 非整倍体; MSL 复合体; TSA-FISH; 反式剂量效应

中图分类号 Q38

DOI: 10.12202/j.0476-0301.2020373

非整倍体 (aneuploid) 属于染色体数目变异, 非整倍体内基因剂量的变化以及基因表达水平的差异会导致基因组内部产生不平衡性, 这种不平衡状态往往会对生物体的生存与健康造成严重的损害^[1]. 对于人类个体而言, 唐氏综合征 (Down syndrome) 是最为常见的常染色体非整倍体疾病, 由额外增加的 1 条 21 号染色体所引起, 故而该病又被称为 21 三体综合征^[2-3]. 与正常个体相比, 增加 1 条染色体的患者常伴有先天畸形、智力低下、免疫力低下等特征^[4]. 此外, 有研究表明, 非整倍体变异在人体组织和细胞中的发生率要显著高于个体水平, 其中以肿瘤和癌细胞当中的非整倍体现象最为普遍. 有数据显示, 90% 以上的实体瘤和 75% 以上的造血癌细胞都含有非整倍体^[5-6], 例如, 在急性髓系白血病患者的核型分析结果中, 常见有 8 号染色体的额外增加^[7]. 然而, 非整倍体究竟是癌症和肿瘤发展的诱因还是结果, 关于这一问题, 研究者们尚未得出统一的结论^[8]. 非整倍体变异对生物体的生存发育通常具有极大的毒害作用, 但是关于非整倍体胚胎发育的具体分子调控机制, 还需要更多的科学数据对其进行深入的分析与了解.

很多情况下, 两性间性染色体的组成和数目差异

决定了性别差异, 与此同时, 这一差异也直接导致了两性间性连锁基因在剂量上的不平衡, 迫使其中的一方成为特殊的非整倍体. 在果蝇中, 雄性唯一 1 条 X 染色体的转录水平得到了 2 倍上调, 以补偿两性间及常染色体与性染色体间的基因表达, 从而实现剂量补偿. 这种雄性 X 染色体双倍表达的“超活化”状态受雄性特异性致死复合体 (male specific lethal complex, MSL complex)^[9] 的调控. 果蝇 MSL 复合体是一种仅在雄性体内组装, 并且能够特异性地富集在 X 染色体周围的核糖核蛋白复合体, 由 MSL1、MSL2、MSL3、MOF (males absent on the First)、MLE (maleless) 和 JIL-1 等 6 种蛋白, 外加一种长非编码 RNA, *roX1* (RNA on the X 1) 或 *roX2* 所组成^[10].

MSL1 是雄性果蝇 X 染色体基因完全表达所必需的重要元件, 它作为 MSL 复合体装配的支架, 可实现 MSL 复合体对 X 染色体的特异性靶向^[11]. X 染色体上存在着很多染色质亲和位点 (chromatin entry sites, CESs), 而 CESs 上有很多高亲和部位 (high-affinity sites, HASs), 这些 HASs 可以与 MSL1 的氨基端进行识别、结合^[12]. 另外, MSL1 C 末端的 PEHE 结构域, 介导 MSL1 同 MOF、MSL3 的相互作用^[13], 其 N 末端由

* 国家自然科学基金资助项目 (31871243); 北京师范大学自主科研学科交叉重大资助项目 (310421101)

[†] 通信作者: 孙林 (1978—), 男, 副教授, 博士, 博士生导师. 研究方向: 分子遗传学和基因组学. E-mail: sunlin@bnu.edu.cn

收稿日期: 2020-11-03

α -螺旋相互缠绕形成的超二级结构,可与 MSL2 相结合^[14],因此,MSL1 相当于整个 MSL 复合体的组装平台. MOF 是一种组蛋白乙酰化酶(histone acetyltransferase, HAT),它可以直接与染色质 DNA 结合,能够特异性地乙酰化组蛋白 H4 的 16 号赖氨酸(H4K16Ac),活化染色质结构和功能,从而激活转录^[15-16]. MOF 既直接参与转录调节,又参与 X 染色体剂量补偿^[17]. 当雌、雄果蝇同时过表达 MOF 蛋白,其常染色体相关基因的表达量整体呈现出上升趋势,而 X 染色体相关基因的表达量却出现差异,其中雌性表现为升高,雄性表现为降低. MLE 是一种依赖于 ATP 双联的 RNA/DNA 解旋酶,是人类 RNA 解旋酶 A 的高度同源物^[18]. MLE 结合 *roX* RNAs 重塑其二级结构,并与 MSL2 结合,以起始 MSL 复合体其他组成成分的招募^[19]. 其 ATP 酶活性可促进 MSL 复合体对 HAS 邻近位点的基因进行超转录,解旋酶活性则为 MSL 复合体沿 X 染色体的扩散所必需^[20]. *roX1* 是长非编码 RNA^[21],位于 X 染色体上,具有特定的二级结构,并且自身含有 CESSs. 当 *roX1* 作为转基因插入到常染色体上时,MSL 复合体可被招募到插入位点,并从该位点广泛地扩散到侧翼的常染色体区域^[22],对 MSL 复合体的靶向特异性和组装具有重要作用.

研究表明,由非整倍体引发的基因表达变化会在全基因组范围内产生“反式剂量效应”^[23]. 反式剂量效应是由非整倍体所引起的一种基因剂量效应,是指目标基因的表达量与染色体(或染色体片段)剂量变化呈反比的现象^[24]. 相较于拥有 2 条性染色体的雌性个体,仅有 1 条性染色体的雄性果蝇是一种特殊状态的非整倍体,它是通过反式剂量效应才得以实现 X 染色体上基因表达水平与雌性等同,进而实现剂量补偿^[25]. 而 MSL 复合体在剂量补偿的调控过程中发挥了重要作用,并与非整倍体不平衡基因组内反式剂量效应存在一定关联.

为了深入探究 MSL 复合体在非整倍体胚胎发育过程中基因表达和表型变化的调控作用,本研究利用酪酰胺信号放大荧光原位杂交(tyramide signal amplification-fluorescence *In Situ* hybridization, TSA-FISH)技术,并比较分析了正常二倍体胚胎与常染色体三体胚胎中 MSL 复合体重要组分基因的表达模式,从而进一步掌握与了解 MSL 复合体组分在非整倍体个体发育过程中的重要作用,为进一步解释非整倍体胚胎发育过程中的分子调控机制提供科学依据.

在过去的研究中,使用的检测方法均无法观察到复杂的亚细胞分布模式,而我们使用的高分辨率的

TSA-FISH 技术,可极大地提高传统荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)技术的灵敏度,检测出用传统方法无法测出的低丰度靶标^[26-27]. 基于酪酰胺的信号放大技术只需一个较为简单的孵育步骤,就能够在无须牺牲分辨率的条件下获得样本的多色标记信号,提供极高的敏感度. 与其他全基因组 RNA 检测方法相比, TSA-FISH 技术可在提供基因或 RNA 差异表达信息的同时,保有较高的时间和空间分辨率,进而检测低表达量的 RNA 信息,并可以与其他信号放大系统或传统标记方法联合使用,用于共定位的分析研究^[28].

1 材料与方法

1.1 果蝇杂交与筛选 从杂交所需果蝇品系中挑选出符合性状要求的雄蝇和处女蝇,而后分别按方案 1: ♀ Canton S X ♂ Canton S 和方案 2: ♀ C (2L) dp/F (2R) bw X ♂ Canton S 进行杂交. 其中方案 1 杂交所得的子一代果蝇记为实验对照组野生型 Canton S. 方案 2 由于母本具有复合染色体,即 2 号染色体 2 条左臂连在同一着丝粒上,减数分裂形成配子时 2 条 2L 染色体不分离,从而杂交得到三体果蝇幼虫,标记为 2L 三体.

1.2 酪酰胺信号放大荧光原位杂交 (TSA-FISH)

1) RNA 探针合成. TRIZOL 法提取果蝇总 RNA,反转录制备 cDNA. 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,后对扩增产物进行纯化. 使用 T7 聚合酶体系体外转录 RNA 探针,转录体系中的 UTP 由 Digoxigenin (Dig) 进行标记,将合成的探针与杂交溶液进行充分混合,于 -80 °C 条件下进行保存.

2) 果蝇胚胎的收集与固定. 将各时期收集的胚胎置于 50% 漂白水溶液中旋转摇动以去除卵壳. 将冲洗过的胚胎转移至装有溶液 I (600 μ L 庚烷, 200 μ L 4% PFA) 的 EP 管中,摇动 20 min. 将胚胎转移至装有溶液 II (200 μ L 庚烷, 200 μ L 甲醇) 的 EP 管中,漩涡振荡. 移除溶液 II,加入等体积的庚烷和甲醇重复振荡 1 次. 移除庚烷和甲醇,加入甲醇晃动 15 s,重复 3 次. 保留约 100 μ L 甲醇,于 -20 °C 条件下储存.

3) 探针杂交. 依次使用甲醇、混合溶液 (V(甲醇) : V(PBTT) 为 1 : 1) 和 PBTT (1 \times PBS, 0.1% Tween-20, 0.3% Triton-X 100) 洗涤胚胎. 加入蛋白酶 K 溶液,室温下孵育胚胎 13 min,而后在冰上静置 1 h. 移除蛋白酶 K 溶液,用 1 mL 甘氨酸溶液 (2 mg \cdot mL⁻¹) 洗涤胚胎 2 次,再用 1 mL PBTT 洗涤胚胎. 加入 4% PFA 溶液对胚胎进行后固定,孵育 20 min. 依次使用 PBTT 溶液、混合溶液 (V(PBTT) : V(杂交溶液) 为 1 : 1) 和

杂交溶液(20 × SSC, Formamide, 50 mg · mL⁻¹ Heparin, Salmon sperm single strand DNA, Tween-20, DEPC treated water)洗涤胚胎。

向每管样品加入预冷的变性杂交溶液, 56 °C 孵育胚胎 2.5~3.0 h. 孵育结束前, 在 PCR管中加入 RNA 探针, 80 °C 温育 5 min, 冰浴 5 min 对其进行变性处理. 移除预杂交溶液, 每管加入 100 μL 变性探针, 56 °C 金属浴 16~18 h. 移除管内液体, 加入 PBTTB(含 1% 脱脂奶粉的 1 × PBTT), 室温封闭 20 min. 移除 PBTTB, 加入 Biotin-conjugated anti-DIG antibody 溶液(2.5 μg · mL⁻¹), 室温孵育 2 h. 用 PBTTB 洗涤胚胎. 移除 PBTTB, 加入 Streptavidin-HRP 溶液(2.5 μg · mL⁻¹), 室温孵育 1.5 h. 移除 Streptavidin-HRP 溶液, 用 PBTTB 洗涤胚胎. 用 DAPI 溶液对胚胎 DNA 进行染色, 孵育 15 min. 移除 DAPI 溶液, 用 PBTT 溶液洗涤胚胎。

4) 酪酰胺信号放大检测. 用酪酰胺活化缓冲液(0.006% H₂O₂ 溶液)冲洗胚胎. 加入 Cyanine 3-tyramide 溶液, 孵育胚胎 2 h. 依次使用 PBTT 和 PBS 洗涤胚胎. 后加入抗荧光淬灭封片剂, 并将样品于 4 °C 条件下过夜. 将胚胎转移至载玻片上, 加盖盖玻片后用透明指甲油封住边缘。

使用超高分辨率激光共聚焦显微镜(LSM880)进行观测和拍摄. 20×物镜下, 扫描 z 轴 16 层, 获得 30 μm 厚度的胚胎切片图像, 调整 gain 值以避免图像出现过曝光, 拍摄用于荧光强度对比的图像时, 确保显微镜参数设置一致, 并将图像存储为 CZI 文件. 运用 ImageJ 软件对拍摄的图像进行 z 轴叠加、多通道图像拆分、添加标尺、图像导出等处理. 使用 ZEN Blue Lite 2019 测量 DNA 和 RNA 探针荧光信号强度, 并以各层图像的 RNA 探针荧光强度与 DNA 荧光强度比值均值作为单个胚胎的转录本水平测量值, 每个样本数据至少设置 3 个及以上的生物学重复, 并使用 SPSS 24.0 进行显著性差异分析。

2 结果

为了探究 MSL 复合体对非整倍体的调控作用和内在机制, 从 MSL 复合体自身出发, 运用 TSA-FISH 技术检测 MSL 复合体重要组分在果蝇胚胎各发育时期的转录本水平和细胞水平的转录本分布情况, 通过对比野生型和 2L 三体胚胎中 *roX1*、*mSl-1*、*mle*、*mof* 的表达模式, 探究 MSL 复合体的重要组成元件对非整倍体染色体剂量变化的应答情况. 本实验旨在进一步理解 MSL 复合体在非整倍体胚胎发育过程中的作用, 为 MSL 复合体内部元件的关联提供实验依据, 以及为深入认识非整倍体疾病的发生发展和寻求切

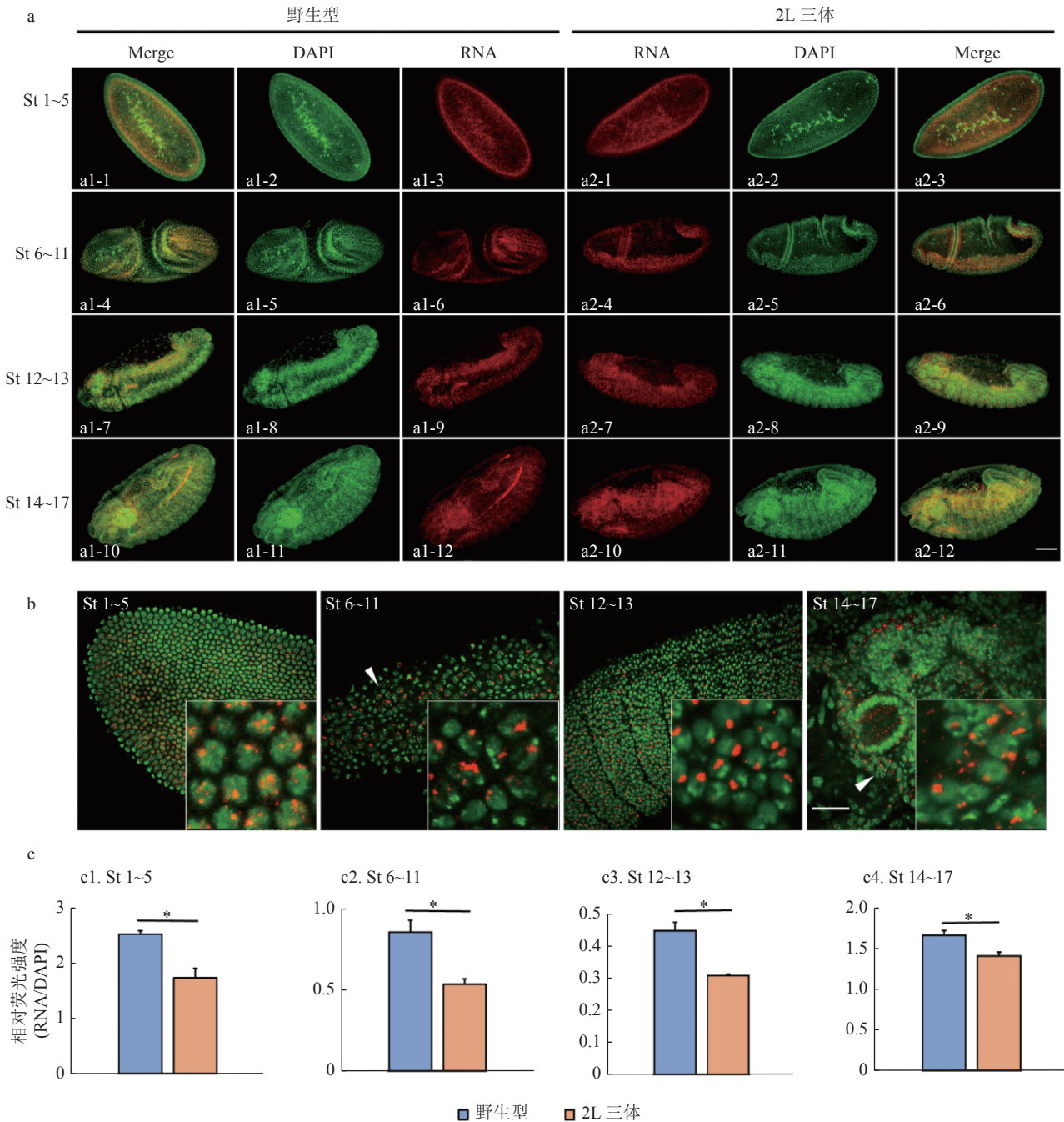
实有效的治疗方法提供新的科学依据与可行性思路。

2.1 *roX1* 表达模式变化 *roX1* 位于 X 染色体上, 是果蝇 MSL 复合体中的长非编码 RNA 组分. 通过对比 *roX1* 转录本在野生型和 2L 三体胚胎中的定位情况, 发现 *roX1* 在任一时期的胚胎中都有着强烈且广泛的表达(图 1-a), 其转录本几乎遍布于胚胎所有的组织或胚层细胞, 亚细胞定位以核内积聚为主(图 1-b). 图 1-b 中 St 6~11 箭头所指部位为中枢神经系统的腹神经索, St 14~17 箭头所指部位为消化系统的中肠. 在 St 1~5 时期, *roX1* 转录本主要定位于细胞胚层, 在胚层细胞核内积聚; St 6~11 时期, *roX1* 转录本主要定位于腹神经索, 在神经母细胞核内积聚; St 12~13 时期, *roX1* 转录本主要定位于外胚层, 在细胞核内积聚; St 14~17 时期, *roX1* 转录本主要定位于中肠, 在细胞核内积聚. 而在野生型胚胎与非整倍体 2L 三体胚胎间不存在转录本定位差异, 说明在胚胎发育过程中, *roX1* 转录本的定位模式并不会因为 2L 三体产生的基因组内部不平衡变异而改变。

但在 2L 三体中, 当基因组内发生染色体片段剂量变化, 随之产生的反式剂量效应将影响 *roX1* 的表达水平, 并产生显著变化(图 1-c). 在早期胚胎中(St 1~5 时期), 2L 三体果蝇 *roX1* 的表达量显著低于正常水平(图 1, c1); 而在胚胎发育的中后期(St 6~13 时期)和晚期(St 14~17 时期), 非整倍体胚胎中 *roX1* 的表达量也始终低于正常水平(图 1, c2~c4), 但是随着胚胎发育的不断进行, 我们发现 *roX1* 在 2L 三体胚胎中的表达水平与其在野生型胚胎中的表达水平间的差异越来越小. 综合不同发育时期 TSA-FISH 实验结果表明, 在果蝇基因组内增加 1 条 2L 染色体并不能提升 *roX1* 的表达水平, 反之此种变异可显著抑制胚胎发育各个阶段中 *roX1* 的表达水平。

2.2 *mSl-1* 表达模式变化 实验结果表明, *mSl-1* 转录本主要定位于胚胎的神经系统(脑和腹神经索, 图 2-b)和消化系统(后肠、中肠、马氏管、唾液腺, 图 2-a 和 b). 与之前 *roX1* 转录本的亚细胞定位模式不同, *mSl-1* 转录本的亚细胞定位模式为核周分布(图 2-b). 图 2-a 中, a1-4 箭头所指部位为脑(实心箭头)和腹神经索(空心箭头), a1-7 箭头所指部位为后肠, a1-10 箭头所指部位为唾液腺, a2-12 箭头所指部位为中肠(实心箭头)和马氏管(空心箭头); 图 2-b 中, St 1~5 箭头所指部位为细胞胚层, St 6~11 箭头所指部位为中枢神经系统的腹神经索, St 12~13 箭头所指部位为中枢神经系统的脑, St 14~17 箭头所指部位为消化系统的唾液腺。

在早期胚胎(St 1~5 时期)中, *mSl-1* 转录本主要定位于细胞胚层, 于胚层细胞核周分布; 在胚胎发育的

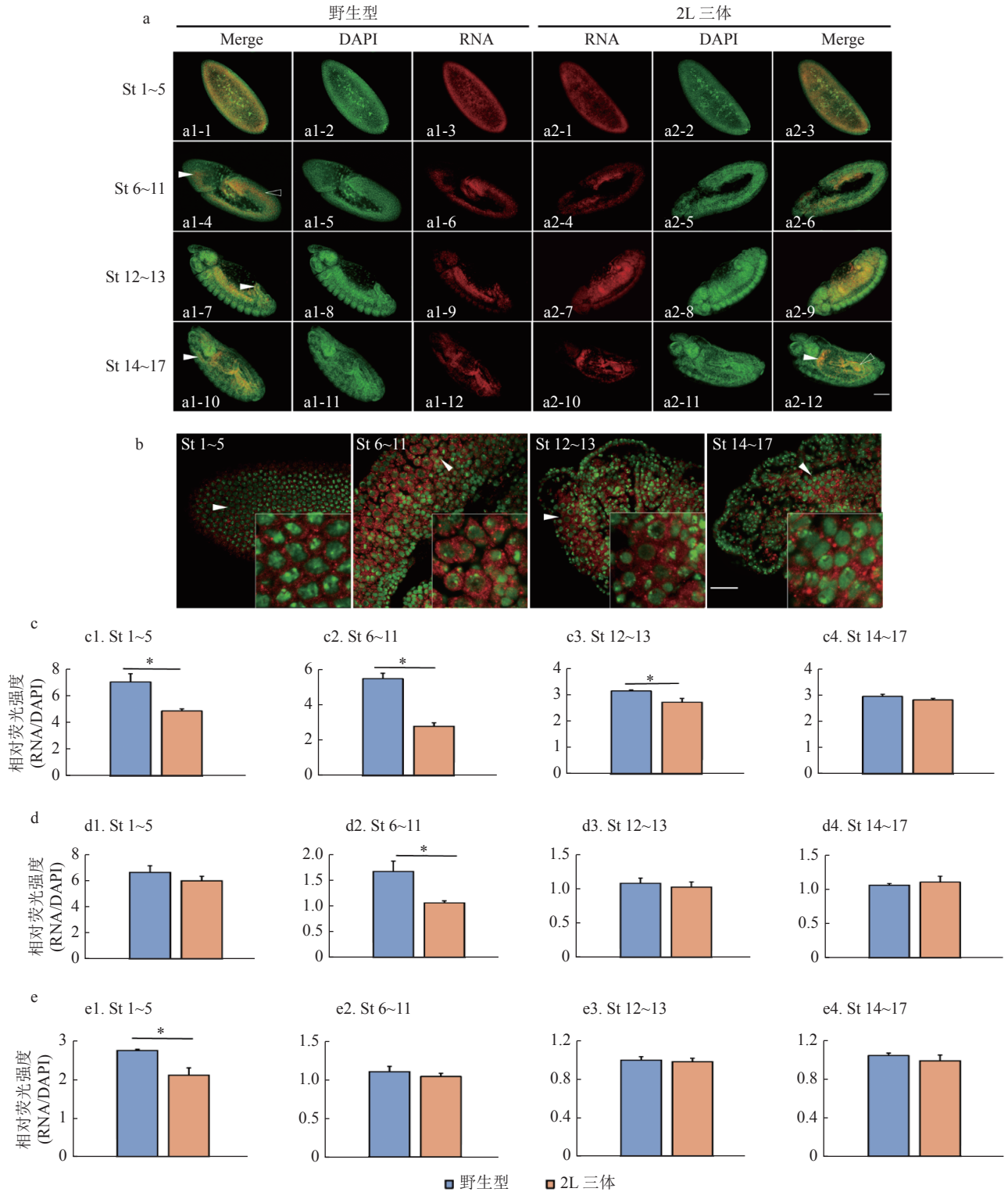


a. RNA 探针的全胚胎定位模式, 样本基因型如顶端所示, 样本所处的胚胎发育时期如左侧纵轴所示. *roX1* 转录本几乎遍布于胚胎所有的组织或胚层细胞. 标尺: 80 μm . **b.** 组织定位模式, 右下方显示的图像是局部放大后的亚细胞定位模式: b1. St 1~5; b2. St 6~11; b3. St 12~13; b4. St 14~17. St 6~11 箭头所指部位为腹神经索, St 14~17 箭头所指部位为中肠. 标尺: 30 μm . **c.** *roX1* 在各基因型胚胎不同发育时期的表达水平分析: c1. St 1~5; c2. St 6~11; c3. St 12~13; c4. St 14~17. * $P < 0.05$.

图 1 a、b. *roX1* 转录探针在胚胎中的定位结果, 绿色为 DAPI 染料所标记的 DNA 信号, 红色为 RNA 探针信号; 图 1-a-Merge 和图 2-b 显示的结果为红色荧光与绿色荧光合并后的图像

中期 (St 6~11 时期), *misl-1* 转录本主要定位于腹神经索, 于神经母细胞核周分布; 在胚胎发育的后期 (St 12~13 时期), *misl-1* 转录本主要定位于脑, 于神经母细胞核周分布; 在胚胎发育的晚期 (St 14~17 时期), *misl-1* 转录本主要定位于唾液腺, 于细胞核周分布. 与 *roX1* 转录本相同, *misl-1* 转录本在野生型胚胎与 2L 三体型胚胎间不存在转录本定位差异.

与野生型相比, 在胚胎发育早期, 2L 三体的 *misl-1* 表达量显著偏低 (图 2, c1). 但在 2L 三体中, *misl-1* 的表达量可随着胚胎发育的进程逐渐恢复至正常水平 (图 2, c2~c4): 在 St 1~5 时期, *misl-1* 在 2L 三体中的表达量与其在野生型中的表达量开始出现显著性差异; 到 St 12~13 时期, 二者间的显著性差异大幅度地减小; 再到胚胎发育的 St 14~17 时期, 二者之间的明显



a. RNA 探针的全胚胎定位模式, 样本基因型如顶端所示, 样本所处的胚胎发育时期如左侧纵轴所示. a1-4 箭头所指部位为脑 (实心箭头) 和腹神经索 (空心箭头), a1-7 箭头所指部位为后肠, a1-10 箭头所指部位为唾液腺, a2-12 箭头所指部位为中肠 (实心箭头) 和马氏管 (空心箭头). 标尺: 80 μm . **b.** 组织定位模式, 右下方显示的图像是局部放大后的亚细胞定位模式: b1. St 1~5; b2. St 6~11; b3. St 12~13; b4. St 14~17. St 1~5 箭头所指部位为细胞胚层, St 6~11 箭头所指部位为腹神经索, St 12~13 箭头所指部位为脑, St 14~17 箭头所指部位为唾液腺. 标尺: 30 μm . **c.** *msl-1* 在各基因型胚胎不同发育时期的表达水平分析: c1. St 1~5; c2. St 6~11; c3. St 12~13; c4. St 14~17. * $P < 0.05$. **d.** *mle* 在各基因型胚胎不同发育时期的表达水平分析: d1. St 1~5; d2. St 6~11; d3. St 12~13; d4. St 14~17. * $P < 0.05$. **e.** *mof* 在各基因型胚胎不同发育时期的表达水平分析: e1. St 1~5; e2. St 6~11; e3. St 12~13; e4. St 14~17. * $P < 0.05$.

图 2 a、b. *msl-1* 转录本探针在胚胎中的定位结果, 绿色为 DAPI 染料所标记的 DNA 信号, 红色为 RNA 探针信号; 图 1-a-Merge 和图 2-b 显示的结果为红色荧光与绿色荧光合并后的图像

差异已经消失,基本处于同一表达水平.以上结果表明,*msl-1* 转录本的表达水平对 2L 三体非整倍体中染色体剂量的变化具有十分强烈的敏感性,其转录水平在胚胎发育初期,因受到母体效应基因影响导致转录水平显著下降.随着胚胎的进一步发育,我们发现 *msl-1* 的表达水平逐步摆脱了受母体影响的下降趋势,反而呈现出一种回补到野生型的表达水平.

2.3 *mle* 表达模式变化 *mle* 转录本的分布位点主要集中在神经系统的脑部和消化系统的唾液腺、中肠,其亚细胞定位为胞质分布.在 St 1~5 时期,*mle* 转录本主要定位于细胞胚层,在胚层细胞胞质分布;St 6~13 时期,*mle* 转录本主要定位于脑,在神经母细胞胞质分布;St 14~17 时期,*mle* 转录本主要定位于唾液腺,在细胞胞质分布.且各基因型胚胎间不存在转录本定位差异,说明 2L 三体变异不会改变胚胎中 *mle* 转录本的定位模式.

在 2L 三体胚胎发育的前期,*mle* 的表达水平与野生型无显著性差异(图 2, d1);中期,*mle* 的转录水平显著低于野生型(图 2, d2);但在胚胎发育的后半程,*mle* 的表达水平可上调至正常水平(图 2, d3~d4).这些结果说明在胚胎发育的多数时期,*mle* 在 2L 三体中的表达水平与野生型相当,果蝇 2 号染色体左臂数目的增加基本不会造成 *mle* 表达模式的改变.

2.4 *mof* 表达模式变化 *mof* 转录本定位于胚胎的神经系统(脑、腹神经索)和消化系统(唾液腺、中肠、马氏管),其亚细胞定位模式为核周分布,各基因型胚胎间的 *mof* 转录本定位模式相同.在早期胚胎中,*mof* 转录本主要定位于细胞胚层,于胚层细胞核周分布;在胚胎发育的中期,*mof* 转录本主要定位于脑,于神经母细胞核周分布;在胚胎发育的后期,*mof* 转录本主要定位于腹神经索,于神经母细胞核周分布;在胚胎发育的晚期,*mof* 转录本主要定位于唾液腺,于细胞核周分布.

虽然由于受到母体效应的影响,*mof* 在 2L 三体中的表达水平在早期胚胎(St 1~5 时期)中显著低于野生型(图 2, e1),但在后续的胚胎发育阶段,2L 三体中 *mof* 的表达水平可与野生型持平(图 2, e2~e4).以上结果表明,除早期以外,2L 三体不会改变其他阶段的 *mof* 表达模式.

从表达水平上看,*mof* 和 *msl-1* 的表达模式具有相似性,果蝇 2 号染色体左臂数目的增加对三体胚胎中 *mof* 和 *msl-1* 的表达均显示出了抑制作用,在 2L 三体胚胎发育早期都表现为显著降低,而到胚胎发育的晚期则可与正常水平相近.

3 讨论

综上所述,根据 MSL 复合体组分的 TSA-FISH 结果,可以看出 *roX1* 的表达范围最广,转录本定位几乎遍布整个胚胎,其亚细胞定位模式也最为特别,主要在核内积聚.而 *msl-1*、*mle* 和 *mof* 转录本则主要分布在中枢神经系统和消化系统,定位于细胞质或核周.尽管在非整倍体影响下,各基因型胚胎间 MSL 复合体组分的定位模式均未发生变化,但在表达水平上确有不同程度的改变.

与野生型胚胎相比,三体胚胎中 *mle* 的表达水平最为稳定,基本不受染色体数目变异的影响,而其余组分的表达水平均在早期三体胚胎中显著降低,其中 MOF 具有组蛋白乙酰化酶活性,*mof* 转录本水平在早期胚胎中的降低,可能会对同一发育时期其他基因的表达造成影响.*roX1* 和 *msl-1* 的表达水平在三体胚胎的多数发育阶段均受到了非整倍体的抑制,作为 MSL 复合体靶向和装配的重要平台,这 2 种组分的表达水平降低可能会使得胚胎中 MSL 复合体的整体剂量下降.

之前有研究通过 RNA 测序对 2L 三体进行基因表达的整体分析,并与正常基因型进行比较.其结果显示,与二倍体对照相比,对于果蝇 2 号染色体左臂(2L)数目的增加,2L 基因表达的主要反应是剂量补偿;而对于其他常染色体区域的基因,2L 数目的增加则引发了反式剂量效应,基因的表达量与染色体剂量变化成反比(2/3)^[29].虽然 RNA 测序可以帮助我们了解到 RNA 差异表达的信息,但它提供的时间和空间分辨率相对较低,因而无法观察到转录本的空间分布.

与上述研究不同,本研究应用了高分辨率的 TSA-FISH 技术,探究非整倍体胚胎发育中 MSL 复合体组分的 RNA 表达分析.RNA 原位杂交可以在固定的组织中直观地观察转录本的空间分布,从而揭示细胞和亚细胞定位的细节,同时 FISH 技术可以提供更高的空间分辨率,另外 TSA 用于探针检测则能够产生具有优越分辨率的稳定信号.

值得一提的是,TSA-FISH 技术能够明确区分母体和合子 mRNA.母本来源的 mRNA 通常定位于细胞质中,在第 1 时期胚胎中表现出高于背景的 FISH 信号强度,到后期,信号强度则显著降低;而直到第 4 时期,合子 mRNA 才能被观察到.TSA-FISH 技术现已被极大地优化,以实现包括果蝇胚胎、唾液腺、卵巢、睾丸等多种组织在内的检测需求^[30],进而帮助获

取样品中目标 RNA 在细胞和亚细胞水平上的定位图像, 最终通过荧光强度的测量对样品基因的转录水平进行半定量分析。

因此, 通过运用该技术, 可以从复合体内部出发, 综合各个关键组分基因 RNA 表达水平变化的结果, 探究在果蝇非整倍体胚胎不同时期中复合体重要组分的表达水平, 其亚细胞分布模式, 以及各组分间的相互作用关系。接下来, 我们将从全转录组水平深入探究 MSL 复合体重要元件对非整倍体基因表达调控的作用, 并以 MSL 复合体为核心, 探究复合体自身组分之间及其与靶因子之间的互作关系。将本研究的结果与目前正在开展的部分研究结合起来, 能够进一步阐明非整倍体中反式剂量效应与 MSL 复合体之间的调控机制, 从而有助于厘清非整倍体基因表达失衡与其异常表现之间的联系, 为治疗非整倍体疾病或癌症提供新的思路和靶点。

4 参考文献

- [1] GOGENDEAU D, SIUDEJA K, GAMBAROTTO D, et al. Aneuploidy causes premature differentiation of neural and intestinal stem cells[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8894
- [2] DE GRAAF G, BUCKLEY F, SKOTKO B G. Estimates of the live births, natural losses, and elective terminations with Down syndrome in the United States[J]. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 2015, 167A(4): 756
- [3] KAJII T. Predicted prevalence of Down syndrome live births in Japan, 1970-2006[J]. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 2008, 146A(11): 1387
- [4] WILSON L R, VATANSEVER D, ANNUS T, et al. Differential effects of Down's syndrome and Alzheimer's neuropathology on default mode connectivity[J]. *Human Brain Mapping*, 2019, 40(15): 4551
- [5] WEAVER B A, CLEVELAND D W. Does aneuploidy cause cancer?[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2006, 18(6): 658
- [6] HERBERT M, KALLEAS D, COONEY D, et al. Meiosis and maternal aging: insights from aneuploid oocytes and trisomy births[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2015, 7(4): a017970
- [7] PAULSSON K, JOHANSSON B. Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes[J]. *Pathologie Biologie*, 2007, 55(1): 37
- [8] WENZEL E S, SINGH A T K. Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer[J]. *In Vivo (Athens, Greece)*, 2018, 32(1): 1
- [9] GEORGIEV P, CHLAMYDAS S, AKHTAR A. *Drosophila* dosage compensation: males are from Mars, females are from Venus[J]. *Fly*, 2011, 5(2): 147
- [10] BAI X Y, ALEKSEYENKO A A, KURODA M I. Sequence-specific targeting of MSL complex regulates transcription of the *roX* RNA genes[J]. *The EMBO Journal*, 2004, 23(14): 2853
- [11] KOYA S K, MELLER V H. Modulation of heterochromatin by male specific lethal proteins and *roX* RNA in *Drosophila melanogaster* males[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0140259
- [12] LI F, PARRY D A D, SCOTT M J. The amino-terminal region of *Drosophila* MSL1 contains basic, glycine-rich, and leucine zipper-like motifs that promote X chromosome binding, self-association, and MSL2 binding, respectively [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(20): 8913
- [13] KADLEC J, HALLACLI E, LIPP M, et al. Structural basis for MOF and MSL3 recruitment into the dosage compensation complex by MSL1[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2011, 18(2): 142
- [14] VILLA R, FORNÉ I, MÜLLER M, et al. MSL2 combines sensor and effector functions in homeostatic control of the *Drosophila* dosage compensation machinery[J]. *Molecular Cell*, 2012, 48(4): 647
- [15] GU W, SZAUTER P, LUCCHESI J C. Targeting of MOF, a putative histone acetyl transferase, to the X chromosome of *Drosophila melanogaster*[J]. *Developmental Genetics*, 1998, 22(1): 56
- [16] SU J M, WANG F, CAI Y, et al. The functional analysis of histone acetyltransferase MOF in tumorigenesis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(1): 99
- [17] COPUR Ö, GORCHAKOV A, FINKL K, et al. Sex-specific phenotypes of histone H4 point mutants establish dosage compensation as the critical function of H4K16 acetylation in *Drosophila*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(52): 13336
- [18] IZZO A, REGNARD C, MORALES V, et al. Structure-function analysis of the RNA helicase maleless[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(3): 950
- [19] CUGUSI S, KALLAPPAGAUDAR S, LING H P, et al. The *Drosophila* helicase maleless (MLE) is implicated in functions distinct from its role in dosage compensation[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2015, 14(6): 1478
- [20] MORRA R, SMITH E R, YOKOYAMA R, et al. The MLE subunit of the *Drosophila* MSL complex uses its ATPase activity for dosage compensation and its helicase activity for targeting[J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2008, 28(3): 958

- [21] MELLER V H, RATTNER B P. The *roX* genes encode redundant male-specific lethal transcripts required for targeting of the MSL complex[J]. The EMBO Journal, 2002, 21(5): 1084
- [22] KELLEY R L, MELLER V H, GORDADZE P R, et al. Epigenetic spreading of the *Drosophila* dosage compensation complex from *roX* RNA genes into flanking chromatin[J]. Cell, 1999, 98(4): 513
- [23] JOHNSON A F, HOU J, YANG H, et al. Magnitude of modulation of gene expression in aneuploid maize depends on the extent of genomic imbalance[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2020, 47(2): 93
- [24] GUO M, DAVIS D, BIRCHLER J A. Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series[J]. Genetics, 1996, 142(4): 1349
- [25] BHADRA U, GANDHI S G, PALAPARTHI R, et al. *Drosophila* maleless gene counteracts X global aneuploid effects in males[J]. The FEBS Journal, 2016, 283(18): 3457
- [26] SCHÖNHUBER W, FUCHS B, JURETSCHKO S, et al. Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(8): 3268
- [27] EICKHORST T, TIPPKÖTTER R. Improved detection of soil microorganisms using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition (CARD-FISH) [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(7): 1883
- [28] LAUTER G, SÖLL I, HAUPTMANN G. Sensitive multiplexed fluorescent *in situ* hybridization using enhanced tyramide signal amplification and its combination with immunofluorescent protein visualization in zebrafish[J]. Methods in Molecular Biology, 2020, 2047: 397
- [29] SUN L, JOHNSON A F, LI J, et al. Differential effect of aneuploidy on the X chromosome and genes with sex-biased expression in *Drosophila*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(41): 16514
- [30] ZIMMERMAN S G, PETERS N C, ALTARAS A E, et al. Optimized RNA ISH, RNA FISH and protein-RNA double labeling (IF/FISH) in *Drosophila* ovaries[J]. Nature Protocols, 2013, 8(11): 2158

RNA expression analysis of MSL complex components in *Drosophila* aneuploid embryogenesis

QI Haizhu TIAN Yu ZHANG Shuai SUN Lin[†]

(College of Life Sciences, Beijing Key Laboratory of Gene Resource and Molecular Development, Beijing Normal University, 100875, Beijing, China)

Abstract Unbalanced gene dosage of aneuploidy usually results in some detrimental consequences in development, or even in death. The male specific lethal (MSL) complex, which is thought to play a fundamental role in regulating dosage compensation in *Drosophila*, also has great impact on gene expression in aneuploidy. To explore the molecular mechanism in embryogenesis, gene expression of MSL complex components was compared between normal diploid and autosomal trisomy embryos. TSA-FISH (tyramide signal amplification-fluorescence in situ hybridization) technology was used to detect changes in subcellular localization of transcripts. In early stage of aneuploid embryo development or maternal expression stage when no MSL complex is assembled, most complex component genes already showed differences at the transcript level. Such differences mainly derived from maternal non-haploid gametes. As embryo development proceeds, gene dosage imbalance due to increased chromosome fragmentation produced inverse dosage effect leading to differential expression of the MSL complex components. Consequently, it will continue to affect subsequent development of aneuploid embryos at later stages.

Keywords aneuploidy; MSL complex; TSA-FISH; inverse dosage effect

【责任编辑:武佳】