

DOT1L敲除的鸡胚成纤维细胞系构建及其对ALV-J复制和细胞信号通路的影响

余莫涵¹,王鑫妍¹,蔡清清¹,王佳兴²,高琦¹,常国斌^{1*},陈世豪^{1*}

(1.扬州大学动物科学与技术学院,江苏扬州 225009;

2.扬州大学兽医学院(比较医学研究院),江苏扬州 225009)

摘要:研究旨在通过CRISPR-Cas9技术构建DOT1L基因敲除的鸡胚成纤维细胞系(DF-1),并分析DOT1L基因敲除对J亚群禽白血病病毒(ALV-J)复制及其细胞信号通路的影响,也为后续进一步研究DOT1L的生物学功能提供生物材料。研究首先利用CRISPR/Cas9基因编辑技术构建DOT1L基因敲除的DF-1细胞系,分析野生型和敲除细胞对ALV-J复制的影响,再通过转录组测序技术对敲除细胞与野生型细胞的基因表达谱进行了差异分析。结果显示:设计的sgRNA均具有T7E1酶切割活性且sgRNA-1切割活性最高。DNA测序显示,筛选DOT1L敲除的阳性细胞外显子区域分别缺失2个和4个碱基,导致移码突变产生。Western blot验证DOT1L基因敲除的单克隆细胞的H3K79me2水平显著降低($P<0.05$),并且DOT1L敲除显著抑制ALV-J复制。RNA-Seq结果显示,与野生细胞系相比DOT1L敲除细胞系的差异表达基因(DEGs)共有2821个,其中上调基因1384个,下调基因1437个。DEGs的GO功能注释主要与细胞成长代谢和生物过程的调节相关;KEGG通路富集分析主要集中在细胞黏附、ECM受体和Wnt途径等信号通路。综上,研究首次成功构建了DOT1L基因敲除的鸡胚成纤维细胞系,并通过转录组测序分析和筛选DOT1L基因敲除细胞系的差异基因表达谱,这有助于理解DOT1L基因在鸡胚成纤维细胞中的潜在作用,还为进一步探究鸡DOT1L的抗病毒天然免疫调控功能提供重要的生物材料。

关键词:DOT1L基因;鸡胚成纤维细胞系;CRISPR-Cas9;ALV-J;转录组测序

中图分类号:S831.2

文献标识码:A

文章编号:1004-6364(2025)08-01-10

Construction of a DOT1L-Knockout Chicken Embryo Fibroblast Cell Line and Its Influence on ALV-J Replication and Cellular Signaling Pathways

YU Mohan¹, WANG Xinyan¹, CAI Qingqing¹, WANG Jiaying², GAO Qi¹, CHANG Guobin^{1*}, CHEN Shihao^{1*}

(1.College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009;

2.College of Veterinary Medicine (Institute of Comparative Medicine),

Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009)

Abstract: The objective of this study was to develop a knockdown cell line of chicken DOT1L using CRISPR-Cas9 technology,

收稿日期:2024-11-08;修回日期:2025-03-31

基金项目:农业生物育种国家科技重大专项(2023ZD0405301);江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目(202311117005Z);国家肉鸡产业技术体系(CARS-41)

作者简介:余莫涵(2003-),女,硕士研究生,研究方向为家禽免疫分子调控机理,E-mail:3245856147@qq.com

*通信作者:常国斌(1975-),男,博士,教授,主要从事家禽遗传保护与分子抗病育种研究,E-mail:gbchang1975@yzu.edu.cn;陈世豪(1987-),男,博士,副教授,主要从事家禽免疫与分子抗病育种研究,E-mail:mrrchen@yzu.edu.cn

and analyze the effects of *DOT1L* gene knockout on the replication of Avian leukosis virus subgroup J (ALV-J) and the cellular signaling pathways. It also would provide biological materials for further research on the biological functions of *DOT1L*. In this study, a *DOT1L* knockdown DF-1 cell line utilizing CRISPR/Cas9 gene editing technology was established. The effects of wild-type and knockout cells on ALV-J replication were analyzed. Then, the transcriptome sequencing technology was employed to conduct a differential analysis of the gene expression profiles between the knockout cells and wild-type cells. The results showed that all the designed sgRNAs had T7E1 enzyme cleavage activity, and sgRNA-1 had the highest cleavage activity. DNA sequencing revealed that there were deletions of 2 and 4 bases in the exon regions of the screened positive *DOT1L*-knockout cells, resulting in frameshift mutations. Western blot verified that the H3K79me2 level in the monoclonal cells with *DOT1L* gene knockout was significantly reduced, and *DOT1L* knockout significantly inhibited the replication of ALV-J. The RNA-Seq results indicated that there were a total of 2 821 differentially expressed genes (DEGs) in the *DOT1L*-knockout cell line compared with the wild-type cell line, including 1 384 up-regulated genes and 1 437 down-regulated genes. The GO functional annotation of the DEGs was mainly related to cell growth, metabolism and the regulation of biological processes. The KEGG pathway enrichment analysis mainly focused on signaling pathways such as cell adhesion, ECM-receptor interaction and the Wnt pathway. In conclusion, this study successfully constructed a chicken embryo fibroblast cell line with *DOT1L* gene knockout for the first time. Through transcriptome sequencing analysis and screening of the differential gene expression profiles of the *DOT1L*-knockout cell line, it helped us understand the potential role of the *DOT1L* gene in chicken embryo fibroblasts, and it also provided important biological materials for further exploration of the antiviral innate immune regulatory function of chicken *DOT1L*.

Key words: *DOT1L* gene; chicken embryo fibroblasts; CRISPR-Cas9; ALV-J; transcriptome sequencing

DOT1L(Disruptor of telomeric silencing 1-like)是目前唯一被鉴定出能够特异性催化组蛋白H3第79位赖氨酸甲基化的酶。这种酶的催化活性与大多数依赖于SET结构域的组蛋白甲基转移酶存在显著差异,*DOT1L*的功能依赖于其独特的催化结构域,这一结构域与I型甲基转移酶中的催化结构域具有相似性^[1]。*DOT1L*介导的H3K79甲基化在多种生物学过程中发挥关键作用,包括基因转录调控、细胞周期调节、异染色质形成和DNA修复等^[2-5]。研究表明,*DOT1L*介导的表观遗传调控在不同类型肿瘤发展中发挥重要作用^[6-8]。并且,*DOT1L*在免疫应答和炎症调控中扮演着不可或缺的角色。*DOT1L*介导的组蛋白甲基化修饰不仅控制NK细胞的表型和分化,还影响B细胞的发育和记忆B细胞的形成^[9-10]。此外,*DOT1L*对巨噬细胞、树突状细胞和髓源性抑制细胞的调节作用对体液免疫也同样至关重要^[11-13]。本课题组先前研究表明,鸡巨噬细胞*DOT1L*基因的敲除显著增强MDA5及其下游信号通路的激活从而抑制J亚群禽白血病毒(ALV-J)的复制^[14]。因此,了解*DOT1L*基因在非免疫细胞系——鸡胚成纤维细胞中的调节作用具有重要意义。

成簇的规律性短回文重复序列(CRISPR)作为古细菌内的一种防御机制,通过串联重复的DNA序列来抵御噬菌体或质粒的入侵。CRISPR/Cas9基因编辑技术主要是通过人为设计的sgRNA精确

识别目标DNA序列,并将Cas9核酸切割酶引导至基因组的特定位置进行准确的基因敲除或敲入操作^[15]。目前,CRISPR/Cas9技术已被广泛应用于基因组功能的研究和细胞系的构建^[14,16]。转录组测序技术能够在细胞的特定发育阶段或功能状态下快速、直接地获取mRNA的集合^[17]。因其具有高通量、高精度、高灵敏性等特点,也被广泛应用于基因组功能的研究^[18],为基因结构、基因表达和基因调控的研究提供可大量的有效信息^[19]。转录组测序技术帮助研究人员在基因表达水平上深入剖析不同基因间的相互作用及差异表达情况。本研究旨在利用CRISPR/Cas9技术构建*DOT1L*基因敲除的鸡胚成纤维细胞系,并利用转录组测序技术探究*DOT1L*基因敲除的基因表达谱的变化,进一步揭示鸡*DOT1L*基因的生物功能及潜在的抗病毒功能,为研究*DOT1L*潜在的天然免疫调控机制提供生物材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 细胞和质粒

鸡胚成纤维细胞系DF-1,由本课题组传代保存。非病毒载体Cas9-T2A-GFP由本课题组通过MLM3613 Cas9质粒(Addgene公司)改造而来,携带绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)标签。pEX-A-U6-sgRNA(Addgene公司)。

1.1.2 主要试剂

标准品 2 000 bp DNA Marker、高保真酶、RNA 提取与反转录试剂、微量 DNA 提取试剂盒和 PCR 产物回收试剂盒均由诺唯赞生物科技股份有限公司(南京)提供;DMEM 高糖培养基、胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;DH5 α 感受态细胞, ExpressCast PAGE 彩色凝胶快速试剂盒和 ECL 超灵敏化学发光试剂盒均购自苏州 NCM 生物技术有限公司;Triton X-100 和 Proteinase K (20 mg/mL) 购自碧云天生物技术有限公司(上海);质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司;Bbs I 限制性内切酶、T7 核酸内切酶 I (T7E I) 购自 NEB 公司;T4 连接酶购自 Thermo Scientific 公司;H3K79me2 与 H3 抗体由 CST 公司提供;ALV-J GY03 株与 Env 抗体由扬州大学秦爱建教授惠赠;HighGene 转染试剂购自 ABclonal 公司;0.45 μ m PVDF 膜购自 Cytiva 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 设计靶向 DOTIL 的 sgRNA

首先,从 NCBI 数据库中获取鸡 DOTIL 基因全基因组序列(GeneID:84444),比对 DOTIL 的不同转录本,选择第 5 个共有外显子核苷酸序列为 sgRNA 设计位点,依据 CRISPR/Cas9 设计原则,使用 sgRNA 在线设计工具(<https://chopchop.cbu.uib.no/>)设计 DOTIL 基因的 3 对 sgRNA,并在 sgRNA 的上、下游 300 bp 左右设计 Check 引物,sgRNA 序列与引物序列见表 1。引物由金唯智生物技术有限公司(苏州)合成。

表 1 sgRNA 寡核苷酸及 qRT-PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
chDOTIL-gRNA1	caccGTTGTTGACTTTCGCGGGT
chDOTIL-gRNA2	caecgCTCTTTGTCGACTTGGGCAG
chDOTIL-gRNA3	caccGAGGTTTCTCCATACACCTC
DOTIL-Check-F	ACCGATGAAGCTGAACAC
DOTIL-Check-R	ACACAAGACTGATGAACACT
q-Env-F	TTGGTTCGGTGTGCTATG
q-Env-R	GTCTCGTTGCTGGTGAAT
q- β -actin-F	GAGAAATTGTCCGTGACATCA
q- β -actin-R	CCTGAACCTCTCATTGCCA

1.2.2 构建靶向 DOTIL 的 sgRNA 重组质粒

将三对 sgRNA 单链进行退火处理,形成带有黏性末端的短双链 DNA。同时使用 Bbs I 内切酶对 pEX-A-U6-sgRNA 质粒载体进行切割,通过凝胶电泳回收酶切片段。利用 T4 DNA 连接酶将回收的 sgRNA 酶切质粒产物与短双链 DNA 连接,并

将连接产物与 DH5 α 感受态细胞混合后转化,使用塑料滚珠将转化产物涂至含有 1:1 000 氨苄霉素的 LB 固体培养基中,于 37 $^{\circ}$ C 培养箱过夜。挑选单克隆菌落,并送至苏州金唯智生物技术有限公司进行测序鉴定。测序结果显示 sgRNA 均正确插入重组载体,表明载体构建成功。对阳性菌落进行扩大培养并提取质粒,并检测浓度后保存于 -20 $^{\circ}$ C。

1.2.3 细胞的传代和培养

将冻存于 -196 $^{\circ}$ C 液氮中的 DF-1 细胞置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中进行细胞复苏,并使用含有 10% FBS 的 DMEM 培养细胞。待细胞性状表达稳定并贴壁生长后,确定适宜的细胞稀释倍数,进行传代培养,确保细胞状态良好。细胞生长至 90% 后重新接种至新 6 孔板中,并置于 38.5 $^{\circ}$ C、含 5% CO $_2$ 、相对湿度 60%~70% 的细胞培养箱中继续培养,用于后续处理。

1.2.4 sgRNA 重组质粒的转染与敲除细胞系的鉴定

当 DF-1 细胞生长密度达到 70%~80% 时,将构建成功的 sgRNA 重组质粒转染至 DF-1 细胞中。转染 48 h 后,使用胰酶消化 DF-1 细胞,并使用含有 1% FBS 的 DMEM 制备细胞悬液,通过流式细胞分选,将表达 GFP 荧光蛋白的阳性细胞分选至 96 孔板中,取一部分细胞收集 DNA 进行 T7E I 酶切鉴定,一部分细胞使用有限稀释法进行单克隆细胞筛选。有限稀释法主要概括为:以 0.1 mL/孔的细胞悬液接种于 96 孔板中,分别将每个孔的细胞悬液进行梯度稀释新的 96 孔板中,直至每孔细胞保留至个位数,培养 24 h;待细胞贴壁后挑选单克隆细胞,进行扩大培养。当亚克隆细胞密度达到 80% 时,将其中一半细胞用于提取 DNA 用于基因组测序鉴定切割位点,另一半细胞继续扩大培养。

1.2.5 细胞 DNA 的提取

将 DOTIL 基因敲除的 DF-1 细胞与野生型细胞收集至离心管中,使用微量 DNA 提取法进行 DNA 提取。利用 DOTIL 的 Check 引物对含有 sgRNA 目标位点的片段进行扩增,随后使用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定片段大小,回收扩增产物,并将样本送至苏州金唯智生物有限公司进行 DNA 测序鉴定。

1.2.6 Western blot 检测蛋白表达水平

将 DOTIL 基因敲除的 DF-1 细胞系与野生型

DF-1 细胞系分别接种于6孔培养板中,待细胞生长至密度约90%时,收集细胞样本,并用PBS溶液洗涤细胞沉淀。随后,每孔加入150 μ L 预混裂解液(包括100:1:1比例混合的RIPA、PMSF酶抑制剂和NCM稳定剂);在冰上裂解15 min。低温环境下超声波裂解共30 s,并4 $^{\circ}$ C 12 000 g离心10 min。弃去沉淀转移上清液,并通过比色法测定蛋白浓度。按比例加入5 \times 蛋白上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C高温变性10 min,充分振荡混匀后进行电泳。在90 V恒压条件下电泳90 min。采用湿转法将蛋白转移到0.45 μ m孔径的PVDF膜上,转膜条件为恒流230 mA,转印90 min。使用快速封闭液室温孵育1 h。H3K79me2抗体(比例1:1 000)、Env抗体(比例1:1 000)、H3抗体(比例1:1 000)和GAPDH抗体(比例1:2 000)与抗体稀释液按照比例配制;将条带浸入抗体中,4 $^{\circ}$ C摇床中孵育过夜。用配制好的TBST溶液洗涤膜5 min,重复三次。接着,使用HRP标记的亲纯化羊抗兔IgG二抗(稀释比例1:10 000),室温孵育1 h。用TBST溶液洗涤膜7 min,重复三次。最后,使用ECL发光显影液对蛋白条带进行显影。

1.2.7 qRT-PCR 检测 mRNA 表达水平

细胞处理如前所述,更换培养基为DMEM,使用10 MOI为1的病毒处理WT与DOTIL基因敲除的DF-1细胞2 h,弃去培养基更换为含有2%胎牛血清的DMEM后继续培养24 h与48 h后。使用RNA提取试剂盒收获RNA,反转录为cDNA进行qRT-PCR检测mRNA水平; β -actin作为内参基因,所有数据均进行3次生物学重复并进行归一化处理。

1.2.8 转录组测序筛选差异基因和富集分析

广州基迪奥生物有限公司负责(<https://www.omicmart.com/>)本研究的转录组测序服务。对转录组测序结果中 $P < 0.05$ 且 $|\log_2(fc)| > 2$ 的差异表达基因进行筛选和分析,GO(Gene ontology)与KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes)富集分析使用基迪奥 OmicsShare 在线分析平台(<https://www.omicshare.com/>)完成;其中GO功能分析根据FDR值选择前10个富集的功能区,KEGG富集分析根据FDR值选择前15个富集的信号通路。

1.3 统计与分析

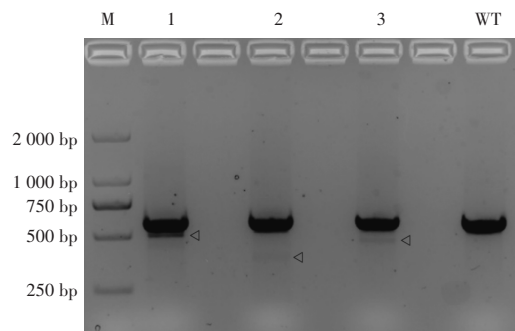
采用GraphPad Prism 9.5.0软件对试验数据进

行处理,两组间比较使用双尾Student *t* 检验分析。统计学显著性定义为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 靶向DOTIL基因的sgRNA切割效率测定

结果见图1,转染sgRNA-1、sgRNA-2、sgRNA-3的扩增片段呈现双条带,表明3个sgRNA重组质粒转染组均产生靶向切割作用。其中,sgRNA-1引导Cas9蛋白对靶标序列表现出较高切割活性,经酶切后的全长扩增产生520 bp和500 bp左右的片段。后续选取转染sgRNA-1重组质粒的细胞进行单克隆细胞筛选。



注: M. DL2000 DNA Marker; 1. sgRNA-1; 2. sgRNA-2; 3. sgRNA-3; 4. 转染空载质粒的野生型对照组。

图1 T7E1酶切产物鉴定结果

2.2 鸡DOTIL敲除的单克隆细胞的筛选与测序鉴定

结果见图2, DOTIL敲除细胞与WT型DF-1细胞相比,在sgRNA-1切割位点后,DNA双链分别发生了4 bp和2 bp的缺失,导致鸡DOTIL基因移码突变,转录提前终止。

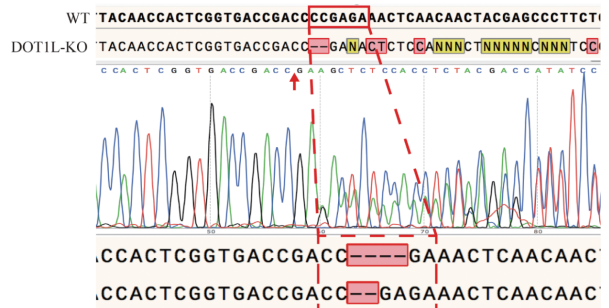


图2 DOTIL基因敲除的单克隆细胞DNA测序结果

2.3 鸡DOTIL敲除细胞蛋白水平分析

结果见图3,与野生型细胞相比,DOTIL敲除细胞的H3K79me2蛋白水平降低。综合T7E1酶切与基因组切割位点的测序结果,表明敲除DOTIL的鸡胚胎成纤维细胞系构建成功。

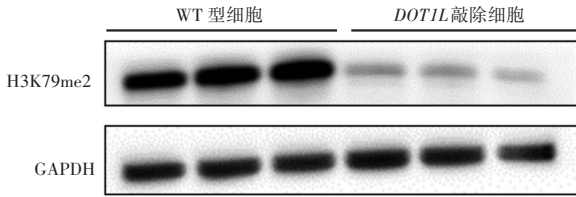


图3 Western blot检测野生型和DOTIL敲除细胞的H3K79me2蛋白表达

2.4 鸡DOTIL敲除细胞形态学变化分析

形态学观察结果见图4,与野生型DF-1细胞相比,DOTIL基因敲除的DF-1细胞的形态发生较大变化,细胞胞体出现无规则的触角型结构,表面大多不光滑平整,且细胞呈现头尾细长,中间偏圆的状态。

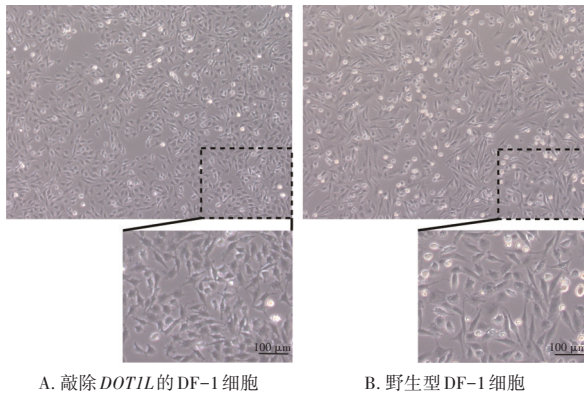


图4 野生型细胞和DOTIL敲除细胞形态学

2.5 鸡DOTIL敲除抑制ALV-J病毒复制

DOTIL敲除对ALV-J复制的影响见图5,在DOTIL敲除细胞感染ALV-J后24 h和48 h后,病毒蛋白Env水平相较于WT组均显著下调。DOTIL敲除对病毒Env的mRNA水平的影响见图6,病毒Env的RNA水平随着感染时间的增加呈显著上升趋势,在DOTIL敲除后病毒mRNA水平显著下调。

2.6 转录组数据筛选与差异基因基本分析

DOTIL基因敲除细胞系转录组测序原始数据

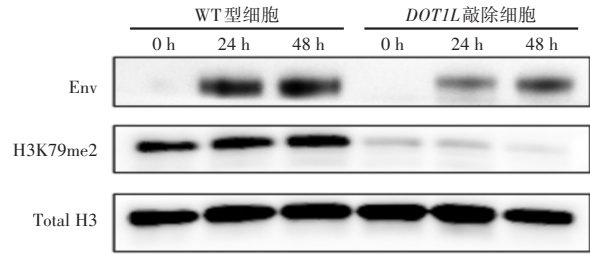
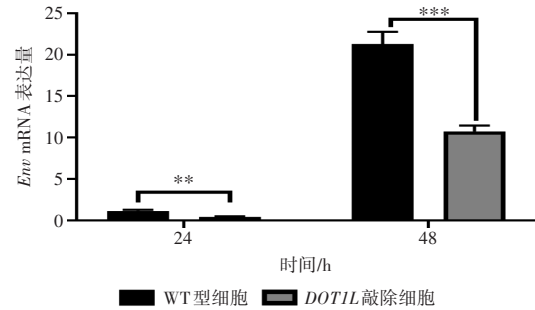
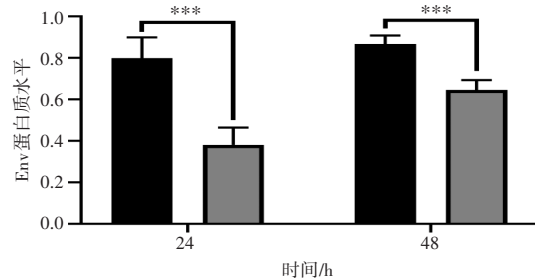


图5 Western blot检测野生型和DOTIL敲除细胞感染ALV-J后Env蛋白表达



A. Env mRNA 表达量



B. Env 蛋白质水平

注:***表示差异显著($P < 0.05$)。

图6 qRT-PCR检测野生型和DOTIL敲除细胞感染ALV-J后Env mRNA表达量和Env蛋白质水平

见表2,在去除原始数据中的接头序列(Adapter)、未知核苷酸(含N)比例大于10%的reads、全部都是A碱基的reads(polyA)、低质量reads(质量值 $Q \leq 20$ 的碱基数占整条read的50%以上),最终获得干净的reads比例超过99%,表明测序质量较高。

表2 RNA-Seq的原始reads数据

样本名称	RawDats	CleanData/%	Adapter/%	LowQuality/%	polyA/%	N/%
CTRL-1	40 885 148	40 755 714(99.68%)	8 314(0.02%)	114 940(0.28%)	0(0.00%)	6 180(0.02%)
CTRL-2	38 248 932	38 122 574(99.67%)	11 020(0.03%)	108 984(0.28%)	0(0.00%)	6 354(0.02%)
CTRL-3	40 374 248	40 169 264(99.49%)	73 366(0.18%)	126 164(0.31%)	0(0.00%)	5 454(0.01%)
DOTIL-KO1	46 015 400	45 763 724(99.45%)	98 450(0.21%)	146 560(0.32%)	0(0.00%)	6 666(0.01%)
DOTIL-KO2	41 969 722	41 749 894(99.48%)	87 066(0.21%)	127 482(0.30%)	0(0.00%)	5 280(0.01%)
DOTIL-KO3	39 481 486	39 287 370(99.51%)	80 666(0.20%)	108 940(0.28%)	0(0.00%)	4 510(0.01%)

所有差异表达基因进行 $\log_2FC \geq 2$ 、 $P < 0.01$ 的筛选和分析结果见图7。与野生型DF-1细胞

系相比,DOTIL敲除的DF-1细胞系差异表达基因共富集到2 821个,其中上调基因1 384个,下

调基因 1 437 个。将差异表达基因按照 X 轴为 \log_2 (FC)、Y 轴为 \log_{10} (FDR) 绘制火山图, 结果见图 8, 下调基因的离散程度大于上调基因, 并且高丰度表达基因多集中于上调基因中。

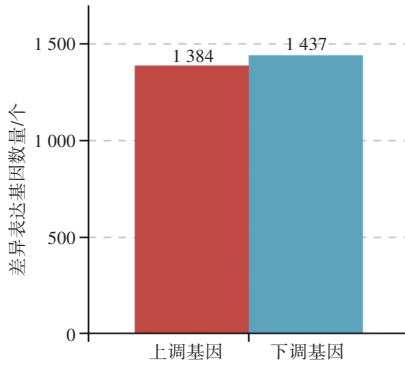


图7 DOTIL 敲除细胞差异表达基因

2.7 差异表达基因 GO 富集分析

对差异表达基因的 GO 功能富集结果见图 9, 富集到的 GO 分类项主要包括三个部分: 生物学过程 (Biological process, BP)、细胞组成 (Cellular component, CC) 以及分子功能 (Molecular function, MF)。

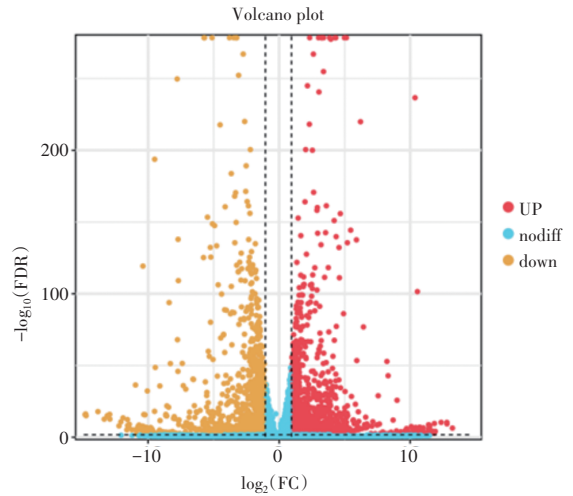


图8 差异表达基因分布情况

其中生物学过程中, 显著富集的有细胞过程、生物规律和代谢过程等。细胞组成显著富集于催化活性与分子功能调节剂等。分子功能基因则主要富集于细胞有机体和含蛋白质复合物中。并且, 所有下调基因功能富集的数量均高于上调基因。

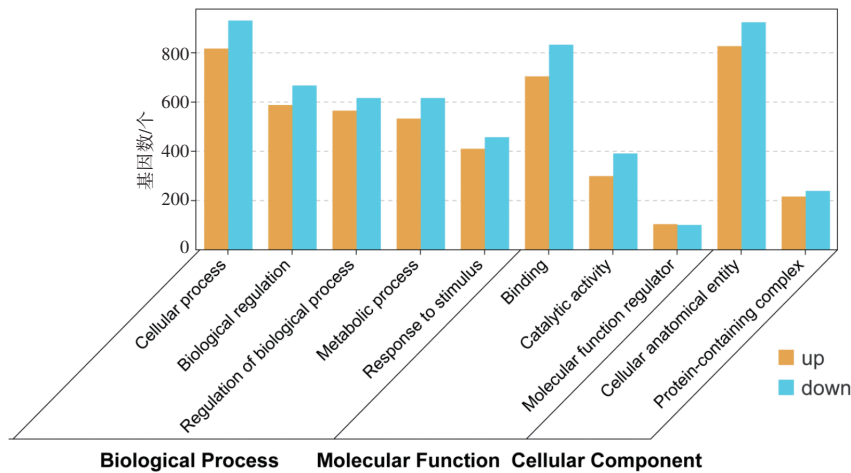


图9 差异基因的 GO 功能富集分析结果

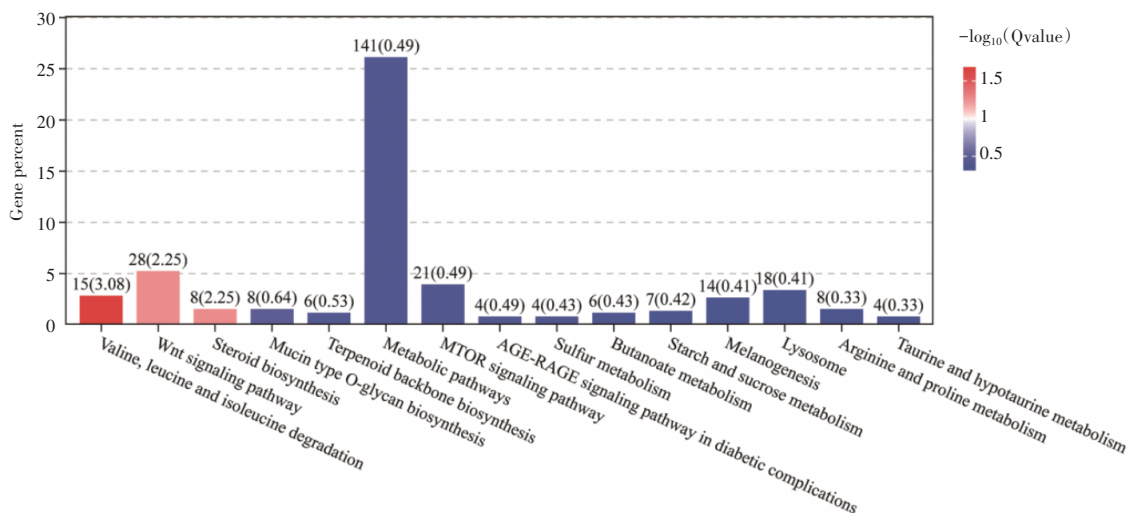
2.8 差异表达基因 KEGG 富集分析

对上调和下调差异基因所富集的信号通路进行分析, 结果见图 10, 富集到的差异最显著的前 15 个通路中, 下调基因主要富集在缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解途径, Wnt 信号通路以及类固醇的生物合成。值得注意的是, 其他代谢相关的信号通路也被显著富集。上调基因则主要富集在细胞黏附和 ECM 受体相互作用等信号通路。将下调基因富集的 Wnt 信号通路与上调基因富集的 ECM 信号通路绘制了热图 (见图 11), 其中包括关

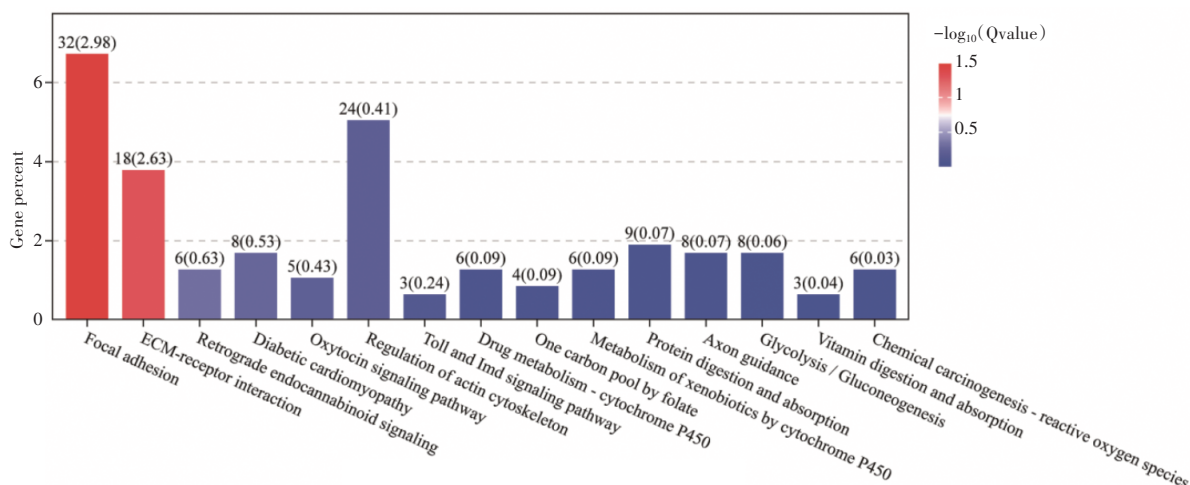
键的 Wnt 信号通路基因如: *WNT6*、*SMAD4*、*DAAMI*、*DAAM2* 等。ECM 受体相互作用基因主要包括: *FNI*、*THBS1*、*LAMA2*、*LAMB1* 等。结果显示, *DOTIL* 敲除直接影响 DF-1 细胞的生长形态发育。

3 讨论

目前, 基因敲除 (敲低) 已成为探究基因功能不可或缺的技术手段。自 2013 年 CRISPR-Cas9 系统被作为基因编辑技术应用于哺乳动物, 展现出了相较于其他基因敲除或敲低技术的独特优势^[20]。CRISPR-Cas9 技术操作简单、编辑效率高、



A. 下调基因的KEGG途径分析结果



B. 上调基因的KEGG途径分析结果

图10 差异基因的KEGG信号通路富集分析结果

周期短、精准度高等优点,被广泛应用于生命科学各个领域^[21]。例如,研究人员利用CRISPR/Cas9技术可以构建小鼠疾病模型^[22]。本课题组前期研究利用CRISPR/Cas9技术分别构建了TET2敲除的DF-1细胞系和DOT1L基因敲除的HD11细胞系^[14,16]。本试验在前期研究基础上,利用先前设计的靶向鸡DOT1L基因的sgRNA,应用于DF-1细胞并成功构建了DOT1L基因敲除的鸡胚成纤维细胞系。研究表明,CRISPR/Cas9技术的编辑效率与sgRNA靶位点相关^[23]。本研究的T7E1酶切割indel试验表明sgRNA-1切割活性最高。Sanger测序是判断基因编辑的金标准,本研究获得的DOT1L基因敲除的单克隆细胞,一个等位基因缺

失2个碱基,另一个等位基因缺失了4个碱基,因此两个等位基因都会出现移码突变,进而提前终止转录或者改变蛋白序列,从而达到功能缺失的目的。

本研究利用CRISPR-Cas9技术敲除DOT1L基因后,观察到H3K79me2蛋白的表达量显著降低。通常认为,DOT1L介导的H3K79甲基化与活跃基因的转录活动紧密相关。研究表明,在巨噬细胞中,H3K79me2能够优先启动IL-6和IFN-β的启动子活性水平^[11],显示DOT1L在转录调控和免疫调控等方面的重要作用。同时,DOT1L作为许多免疫生长发育的调控因子,参与调控CD4⁺和CD8⁺T细胞的受体表达和细胞凋亡过程:参与调

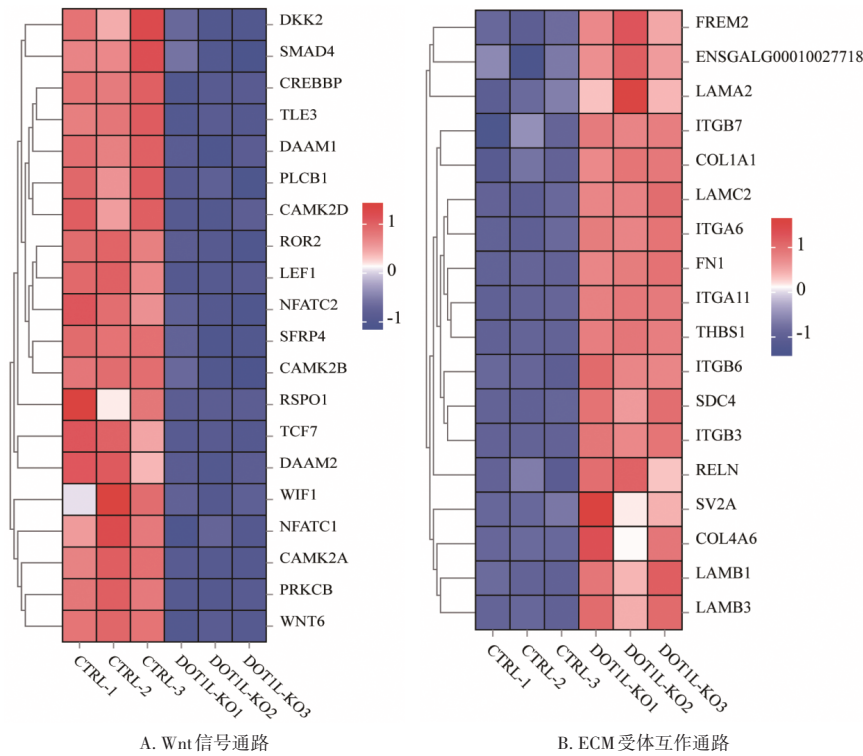


图11 Wnt信号通路基因与ECM受体相互作用通路聚类结果

控B淋巴细胞成熟和分化, DOT1L因此被确定为体液调节的中心因子^[24]。本课题前期研究表明, 鸡巨噬细胞 *DOT1L* 敲除促进 IFN- β 及其下游 ISG 的表达抑制 ALV-J 的复制^[14]。另一项研究显示, 人肺上皮细胞中 *DOT1L* 敲低会增加流感病毒的复制, 这可能是 *DOT1L* 介导的 H3K79 甲基化存在不同的机制^[25-27]。因此, *DOT1L* 基因在免疫细胞和非免疫细胞中都可以调节抗病毒反应。本研究发现 *DOT1L* 基因敲除的 DF-1 细胞下调的基因数目要高于上调基因, 这显示了 *DOT1L* 的甲基化调控转录激活的作用。并且, 本研究发现 ALV-J 在 *DOT1L* 敲除之后复制受到明显抑制, 这与本课题组先前在鸡巨噬细胞中的研究是一致的^[14]。GO 功能富集主要集中在生物过程中的细胞过程和生物过程的调节等。KEGG 信号通路富集分析表明, 在基因表达分析中, 下调基因在 Wnt 信号通路中显著富集, 而上调基因则在细胞外基质 (ECM) 受体相互作用通路中表现出显著的富集现象。对于下调基因, KEGG 富集分析并未显示出免疫相关信号通路的显著富集。然而, 在上调基因中, Toll 样受体以及免疫缺陷 (IMD) 信号通路呈现出显著的富集趋势。

Wnt 信号通路主要参与调控机体内多种细胞增殖、分化、细胞极化、细胞迁移和凋亡等过程, 主要包括经典 (WNT/ β -catenin 信号通路) 和非经典 (WNT/PCP 和 WNT-Ca²⁺) 通路^[28-29]。已有研究表明, *DOT1L* 能够维持和激活 WNT 途径靶基因的表达^[30]。并且 WNT 非经典信号会影响细胞极性的信号传导, 导致细胞发育和细胞形态改变^[31]。本试验结果中也显示了细胞黏附相关基因被显著下调, 这可能是 *DOT1L* 敲除后细胞形态发生变化的主要原因。

细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 与其受体的相互作用调节重要的细胞行为和功能。影响细胞形态、突触形成和细胞功能^[32]。*DOT1L* 敲除后的细胞形态学改变也可能与激活的 ECM 相互作用受体基因有关。研究表明, *DOT1L* 可以调节转录因子 FoxO3a, 敲低 *DOT1L* 可以抑制 Ang II 诱导的 ECM 沉积, 导致心脏纤维细胞促纤维化基因抑制, 改变细胞纤维化结构形成^[33]。有趣的是, ECM 受体-配体相互作用在调控先天免疫的作用更为重要, 免疫学角度认为细胞因子、趋化因子和生长因子都属于 ECM 分泌的蛋白, 能够调节免疫细胞的炎症反应, 并且免疫细胞可以对 ECM 进行

调节和重塑^[34]。ITG被认为是多种病毒感染中是必需的,其中包括ITGB3、ITGB7和ITGA6^[35-37]。

由于本研究未将*DOT1L*基因敲除细胞进行免疫激活处理,这可能是转录组分析中免疫调节相关通路差异不显著的根本原因。但RIG-I样受体信号通路中*IFIH1*等免疫基因在*DOT1L*基因敲除后显著上调,这与在鸡巨噬细胞*DOT1L*基因敲除后的结果相一致^[14]。因此,后续将对*DOT1L*基因敲除介导*IFIH1*基因高表达以及相关的天然免疫抗病毒调控机制进行深入研究。

4 结论

本研究构建了*DOT1L*基因敲除的鸡成纤维细胞系,发现*DOT1L*敲除抑制ALV-J复制,*DOT1L*及其介导的H3K79甲基化的缺失主要影响了Wnt信号通路和ECM信号通路;鸡*DOT1L*基因敲除的成纤维细胞系的成功构建也为研究*DOT1L*基因在细胞发育和分化及其抗病毒免疫调节中的作用提供了重要生物学材料。

参考文献:

[1] ANH TRAM N, ZHANG Y. The diverse functions of DOT1 and H3K79 methylation[J]. *Genes & development*, 2011, 25(13): 1345-1358.

[2] CATTANEO P, KUNDERFRANCO P, GRECO C, et al. DOT1L-mediated H3K79me2 modification critically regulates gene expression during cardiomyocyte differentiation[J]. *Cell death differentiation*, 2016, 23(4): 555-564.

[3] KARI V, RAUL S K, HENCK J M, et al. The histone methyltransferase DOT1L is required for proper DNA damage response, DNA repair, and modulates chemotherapy responsiveness[J]. *Clinical epigenetics*, 2019, 11(1): 4.

[4] KIM W, CHOI M, KIM J E. The histone methyltransferase DOT1/DOT1L as a critical regulator of the cell cycle[J]. *Cell cycle*, 2014, 13(5): 726-738.

[5] MALLA A B, YU H, FARRIS D, et al. DOT1L bridges transcription and heterochromatin formation at mammalian pericentromeres[J]. *EMBO reports*, 2023, 24(8): e56492.

[6] KURANI H, RAZAVIPOUR S F, HARIKUMAR K B, et al. DOT1L is a novel cancer stem cell target for triple-negative breast cancer[J]. *Clinical cancer research*, 2022, 28(9): 1948-1965.

[7] SUN D, WANG W, GUO F, et al. DOT1L affects colorectal carcinogenesis via altering T cell subsets and oncogenic pathway[J]. *Oncoimmunology*, 2022, 11(1): 2052640.

[8] ZHANG X, LIU D, LI M, et al. Prognostic and therapeutic value of disruptor of telomeric silencing-1-like (DOT1L) expression in patients with ovarian cancer[J]. *Journal of hematology*

& oncology, 2017, 10(1): 29.

[9] KEALY L, DI PIETRO A, HAILES L, et al. The histone methyltransferase DOT1L is essential for humoral immune responses[J]. *Cell reports*, 2020, 33(11): 108504.

[10] SUDHOLZ H, SCHUSTER I S, FOROUTAN M, et al. DOT1L maintains NK cell phenotype and function for optimal tumor control[J]. *Cell reports*, 2024, 43(6): 114333.

[11] CHEN X, LIU X, ZHANG Y, et al. Methyltransferase DOT1L preferentially promotes innate IL-6 and IFN-β production by mediating H3K79me2/3 methylation in macrophages[J]. *Cellular & molecular immunology*, 2020, 17(1): 76-84.

[12] ZHOU Z, CHEN H, XIE R, et al. Epigenetically modulated FOXM1 suppresses dendritic cell maturation in pancreatic cancer and colon cancer[J]. *Molecular oncology*, 2019, 13(4): 873-893.

[13] YANG W, YU H, HUANG J, et al. Inhibition of DOT1L alleviates fulminant hepatitis through myeloid-derived suppressor cells[J]. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 2021, 12(1): 81-98.

[14] CHEN S, WANG D, LIU Y, et al. Targeting the histone methyltransferase disruptor of telomeric silencing 1-like restricts avian leukosis virus subgroup J replication by restoring the innate immune response in chicken macrophages[J]. *Frontiers in microbiology*, 2020, 11: 603131.

[15] TRAN N T, SOMMERMANN T, GRAF R, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockin in mouse hematopoietic stem and progenitor cells[J]. *Cell reports*, 2019, 28(13): 3510-3522.

[16] 王强州, 潘诗雨, 方梦雅, 等. 基于CRISPR-Cas9技术构建*TET2*基因敲除的鸡胚成纤维细胞系[J]. *中国农业科技导报*, 2023, 25(11): 227-233.

[17] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. *Nature reviews genetics*, 2009, 10(1): 57-63.

[18] 王沁园, 袁一铭, 郑钢, 等. 利用三代全长转录组测序对禽内源性白血病毒ALVE3不同插入类型鸡进行血液转录组分析[J]. *中国家禽*, 2024, 46(10): 21-31.

[19] CASAMASSIMI A, FEDERICO A, RIENZO M, et al. Transcriptome profiling in human diseases: new advances and perspectives[J]. *International journal of molecular sciences*, 2017, 18(8): 1652.

[20] FRIEDLAND A E, TZUR Y B, ESVELT K M, et al. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system[J]. *Nature methods*, 2013, 10(8): 741-743.

[21] XIE C, CHEN Y L, WANG D F, et al. SgRNA expression of CRISPR-Cas9 system based on mirna polycistrons as a versatile tool to manipulate multiple and tissue-specific genome editing[J]. *Scientific reports*, 2017, 7(1): 5795.

[22] 陈楚雯, 李洁, 赵瑞鹏, 等. CRISPR/Cas9技术在鸡遗传育种



- 中的研究进展[J]. 中国家禽, 2023, 45(6): 96-103.
- [23] ZOU K, WANG F, ZHANG Z, et al. Optimized CRISPR/Cas9 system for gene knockout in chicken DF1 cells[J]. Poultry science, 2023, 102(10): 102970.
- [24] CILDIR G, TUMES D J. DOT1L leaves its mark on adaptive immunity[J]. Immunology and cell biology, 2021, 99(4): 348-350.
- [25] MARCOS-VILLAR L, DÍAZ-COLUNGA J, SANDOVAL J, et al. Epigenetic control of influenza virus: role of H3K79 methylation in interferon-induced antiviral response[J]. Scientific reports, 2018, 8(1): 1230.
- [26] MARCOS-VILLAR L, NIETO A. The DOT1L inhibitor pinometostat decreases the host-response against infections: considerations about its use in human therapy [J]. Scientific reports, 2019, 9(1): 16862.
- [27] MARCOS-VILLAR L, NISTAL-VILLAN E, ZAMARREÑO N, et al. Interferon- β stimulation elicited by the influenza virus is regulated by the histone methylase DOT1L through the RIG-I-TRIM25 signaling axis[J]. Cells, 2020, 9(3): 732.
- [28] AXELROD J D, MILLER J R, SHULMAN J M, et al. Differential recruitment of dishevelled provides signalling specificity in the planar cell polarity and wingless signaling pathways [J]. Genes and development, 1998, 12(16): 2610-2622.
- [29] BOUTROS M, PARICIO N, STRUTT D I, et al. Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling [J]. Cell, 1998, 94(1): 109-118.
- [30] GIBBONS G S, OWENS S R, FEARON E R, et al. Regulation of Wnt signaling target gene expression by the histone methyltransferase DOT1L [J]. ACS chemical biology, 2015, 10(1): 109-114.
- [31] HU K, IANOV L, CROSSMAN D. Profiling and quantification of pluripotency reprogramming reveal that Wnt pathways and cell morphology have to be reprogrammed extensively [J]. Helixyon, 2020, 6(5): e04035.
- [32] HAY E D. Extracellular matrix, cell skeletons, and embryonic development [J]. American journal of medical genetics, 1989, 34(1): 14-29.
- [33] XU J, WANG J, LONG F, et al. Inhibition of the cardiac fibroblast-enriched histone methyltransferase DOT1L prevents cardiac fibrosis and cardiac dysfunction [J]. Cell & bioscience, 2022, 12(1): 134.
- [34] SUTHERLAND T E, DYER D P, ALLEN J E. The extracellular matrix and the immune system: a mutually dependent relationship [J]. Science, 2023, 379(6633): 659.
- [35] BOWLES J B, STEAIN M, SLOBEDMAN B, et al. Inhibition of integrin $\alpha 6$ expression by cell-free varicella-zoster virus [J]. The journal of general virology, 2012, 93(8): 1725-1730.
- [36] CUI X, ZHANG X, XUE J, et al. TMT-based proteomic analysis reveals integrins involved in the synergistic infection of reticuloendotheliosis virus and avian leukosis virus subgroup J [J]. BMC veterinary research, 2022, 18(1): 131.
- [37] DELECLUSE S, TSAI M H, SHUMILOV A, et al. Epstein-barr virus induces expression of the LPAM-1 integrin in B cells in vitro and *in vivo* [J]. Journal of virology, 2019, 93(5): e01618.

(编辑:朱云芬)