

分类号:

密级:

# 兰州大学

## 研究生学位论文

多梳抑制复合物 PRC1.6 的组分 Mga 的

论文题目 (中文) 分子功能

---

论文题目 (外文) **The Molecular Functions of Mga in Polycomb Repressive Complex 1.6**

---

研究生姓名 马荣岗

---

学科、专业 生物学 细胞生物学

---

研究方向 表观遗传学

---

学位级别 硕 士

---

导师姓名、职称 程博 教授

---

论文工作

起止年月 2013 年 10 月至 2016 年 5 月

---

论文提交日期 2016 年 5 月

---

论文答辩日期 2016 年 5 月

---

学位授予日期

---

校址: 甘肃省兰州市



# 多梳抑制复合物 PRC1.6 的组分 Mga 的分子功能

## 中文摘要

多梳蛋白家族 (PcG) 是一类调控基因沉默的表观修饰蛋白, 它们可以与其它蛋白形成多种复合物。常见的复合物有多梳抑制复合物 I (PRC1), 多梳抑制复合物 II (PRC2)。哺乳动物中多种同源蛋白的存在及组合方式的不同使得哺乳动物中的 PRC1 比果蝇中的 PRC1 更复杂多样, 根据 PRC1 的核心组分 PCGFs (PCGF1-6) 将 PRC1 分为六种 (PRC1.1-1.6)。实验室前期研究 PRC1 核心组分的相互作用时, 通过质谱分析发现了蛋白 Mga (MAX gene associated), 随后有研究证实 Mga 是 PRC1.6 的一个组分, 与我们前期工作的结果相同。Mga 是一种双特异的转录因子, 含有 3042 个氨基酸。Mga 在维持胚胎干细胞的多能性以及胚胎发育早期起着重要作用。Mga 是 PRC1.6 的一个组分, 由于蛋白比较大, 目前有关它的研究还较少。它与 PRC1.6 其他组分之间的互作关系, 自身的表达及调控及其在 PRC1.6 复合体中担任的角色等尚无报道。故本课题以 Mga 为切入点研究其分子功能进而更加深入的探讨多梳蛋白复合体 PRC1.6 的功能机制。

基本方法: (1) 通过 BiFC 及 Ni-pulldown 在体外及体内寻找 RING1B 与 Mga 发生相互作用的主要区段。(2) 采用 Real-time PCR 的方法检测小鼠各个组织中 Mga 的变体的表达, 建立 Mga 各种转录剪切体的组织表达谱图。(3) 前期工作: 实验室已构建 Mga 敲低的干细胞, 微阵列得到 Mga 敲低前后变化的基因。本实验通过 Ingenuity Pathway Analysis (IPA), Gene Ontology, PANTHER Classification System 等生物信息学的手段将 Mga 敲低后上调的基因与 PRC1.6 复合体的组分 *Pcgf6*, *L3mbtl2*, *Ring1b* 敲低或敲除后转录去抑制上调的基因这些已知数据进行比较, 寻找共性。

结果与结论: (1) RING1B 主要通过 C 端与 Mga 的 535-640aa 这个小片段发生相互作用。(2) Mga 的全长转录本 Isoform A 在检测的几种小鼠组织中的表达量最高, 其余转录本仅有较低程度的表达, 以 Isoform A 为代表的几种转录本在睾丸中的表达量最高。(3) 干细胞中 PRC1.6 的组分 Mga, *Pcgf6*, *L3mbtl2*, RING1B 共同抑制一系列与精子发生和减数分裂相关的基因。

**关键词:** PRC 1.6; RING1B; 转录因子 Mga; 蛋白互作; 精子发生

# The Molecular Functions of Mga in Polycomb Repressive Complex 1.6 (PRC1.6)

## Abstract

Polycomb group (PcG) proteins are epigenetic modifiers involved in controlling gene repression. They are organized in multiprotein complexes, such as Polycomb Repressive Complexes I and II (PRC1 and PRC2). The composition of PRC1 in mammals is very complicated and dynamic, and PRC1 can be divided into six classes (PRC1.1-1.6) based on which PCGF(PCGF1-6) it contains. During the preliminary work about protein interaction in PRC1, they find a new protein, Mga (MAX gene associated). It is a dual-specificity transcription factor and an important component of PRC1.6. Due to its large size (3042 aa) and potential technical difficulties, it has been lacking of study and literature report about its expression and regulation, interacting partners and key roles in PRC1.6. In this study, we mainly focused on the characterization of Mga in order to elucidate the molecular functions of PRC1.6 complex.

Methods: (1) We carried out BiFC and Ni-pulldown assay to identify the detailed region(s) within RING1B interacting with Mga 535-640aa in vivo and vitro. (2) We tested the expression of Mga splicing variants in mouse tissues through real-time PCR and established the tissue expression spectrogram of Mga transcription splicing variants. (3) Previous experiments through microarray got upregulated genes specifically involved in spermatogenesis upon Mga KD in mouse embryonic stem cells. We analyzed the upregulated genes in stem cells after Mga KD with other published data of *Pcgf6*, *L3mbtl2*, *Ring1b* in PRC1.6 through bioinformatics approaches, such as Ingenuity Pathway Analysis (IPA), Gene Ontology, PANTHER Classification System to find the common characteristics.

Results and conclusions: (1) The fragment of RING1B which interacts with Mga(535-640) is its C terminal. (2) The Mga splicing variant Isoform A express highest in mouse tissues we tested. Other splicing variants more or less is express in this tissues. Isoform A and several other Isoforms are higher expressed in testis than other tissues saying that Mga may have an important role in testis. (3) Components of PRC1.6, Mga, Pcgf6, L3mbtl2 and RING1B commonly repress a series of genes associated with spermatogenesis and meiosis in stem cells.

**Keywords :** PRC1.6, RING1B, transcription factor Mga, protein interaction, spermatogenesis

# 目 录

中文摘要.....	I
Abstract.....	II
第一章 前言.....	1
1.1 PRC1.6 的结构及功能的介绍.....	1
1.1.1 PRC1.6 的组成成分.....	1
1.1.2 PRC1.6 的靶向机制.....	1
1.1.3 PRC1.6 组分的结合方式.....	2
1.1.4 PRC1.6 各组分的功能.....	3
1.1.5 PRC1.6 组分 Mga 的介绍.....	6
1.2 精子发生.....	10
1.2.1 精子发生的定义.....	10
1.2.2 精子发生中的基因表达.....	11
1.2.3 精子发生过程中的表观遗传调控.....	12
1.2.4 体外诱导精子的模型.....	14
1.2.5 体外构建精子发生模型的意义.....	16
1.3 本课题的研究内容及意义.....	16
第二章 材料与方法.....	18
2.1 主要实验材料.....	18
2.1.1 细胞与菌株.....	18
2.1.2 常用质粒.....	18
2.1.3 主要抗体.....	18
2.1.6 实验相关溶液配制.....	21
2.1.7 构建的载体及其引物.....	22
2.2 实验步骤及方法.....	23

2.2.1 诱导蛋白表达.....	23
2.2.2 Ni-pulldown(PD)方法 .....	24
2.2.3 Western Blotting.....	24
2.2.4 BiFC 实验.....	25
2.2.5 竞争实验.....	25
2.2.6 提取 mRNA，并反转录得到 cDNA.....	26
2.2.7 qPCR.....	27
<b>第三章 结果 .....</b>	<b>28</b>
3.1 RING1B 与 Mga (535-640)相互作用的区段.....	28
3.1.1 BiFC 实验检测体内 RING1B 与 Mga (535-640)相互作用的区段..	28
3.1.2 竞争实验验证体内 RING1B 与 Mga (535-640)相互作用的区段..	30
3.1.3 体外检验 RING1B 与 Mga (535-640)相互作用的区段.....	32
3.2 Mga 转录剪切变体的表达分析 .....	36
3.3 PRC1.6 与精子发生过程相关 .....	36
<b>第四章 结论 .....</b>	<b>39</b>
<b>第五章 讨论与展望 .....</b>	<b>40</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>45</b>
<b>英文缩略词表 .....</b>	<b>57</b>
<b>在读期间研究成果 .....</b>	<b>58</b>
<b>致 谢.....</b>	<b>59</b>

## 第一章 前言

### 1.1 PRC1.6 的结构及功能的介绍

#### 1.1.1 PRC1.6 的组成成分

多梳蛋白家族 (PCG) 是一类调控基因沉默的表观修饰蛋白。PCG 蛋白与胚胎干细胞的命运, X 染色体失活, 细胞分化, 细胞癌变密切相关<sup>[1,2]</sup>。它们一般存在于多蛋白复合物中, 常见的复合物有 PRC1 和 PRC2, 它们催化产生两种抑制标记的转录后修饰: H2AK119ub1, H3K27me<sup>[3]</sup>。果蝇中 PRC1 核心复合物由 Polycomb [Pc], Polyhomeotic [Ph], Posterior sex combs [Psc] 以及 Sex combs extra [Sce] 组成。哺乳动物中, PRC1 的核心组分包括四种 Pc 同源蛋白 (CBX2, 4, 6, 7, 8), 两种 Sce 同源蛋白 (RING1A 和 RING1B), 三种 Ph 同源蛋白 (PHC1-3), 六种 Psc 同源蛋白 (PCGFs) 及 RING1/YY1-binding protein (RYBP) 和它的同源蛋白 YAF2<sup>[3]</sup>。组合方式的不同, 同源蛋白以及各种非核心组分的存在使得哺乳动物中的 PRC1 更复杂。2012 年 Gao 等人根据 PRC1 的核心组分之一 PCGFs (PCGF1-6), 将哺乳动物中的 PRC1 分为 6 种 (PRC1.1-1.6), 每一种复合物中都含有一个不同的 PCGF 同源蛋白, RING1A/ RING1B 以及其它的一些蛋白质<sup>[4]</sup>。293T 中 PRC1.6 组分包括 RING1B, L3MBTL2, HP1r, E2F6, Dp-1, WDR5, MAX, MGA, HDAC1/2, PCGF6, RYBP<sup>[4]</sup>。而 2002 年 Hela 细胞及成纤维细胞中发现的 E2F6 复合物的组分包括 RING1B, L3MBTL2, HP1r, E2F6, Dp-1, MAX, MGA, PCGF6, YAF2, G9a, EuHMTase<sup>[5]</sup>。2011 年 Trojer 等人研究 L3MBTL2 的功能时, 发现了 39 种与其相互作用的蛋白, 其中有一种复合物, 包括 L3MBTL2, RING1B, HP1 $\gamma$ , PCGF6 等, 并将其命名为 PRC1L4<sup>[6]</sup>。这三种复合物根据 Gao 等人分类原则都属于 PRC1.6。它作为非典型的多梳抑制复合物, 目前有关其结构和功能的研究非常少。尽管不同的研究中 PRC1.6 的组成成分有一些差别, 但是其核心组分是不变的, 且本实验主要以 Gao 等人研究结果中 PRC1.6 的组成成分为准。

#### 1.1.2 PRC1.6 的靶向机制

哺乳动物中多梳蛋白复合物抑制成千个基因的表达, 在不同的细胞类型及不同细胞状态下, 这些靶基因不断的变化<sup>[7]</sup>。由于 PRC1 的组分及种类多种多样, 它靶向机制非常复杂<sup>[2]</sup>。经典的靶向机制是依赖 PRC2 的靶向机制, 首先 PRC2

的组分 EZH2 产生 H3K27 的三甲基化修饰<sup>[8]</sup>, 然后 PRC1 通过 CBX 蛋白 (CBX2/4/6/7/8) 识别该标记结合到基因上<sup>[9]</sup>, 随后 PRC1 的组分 RING1/RING2 产生 H2AK119ub 标记, 从而抑制靶基因的转录, 其中 RING1B 产生的泛素化修饰对抑制转录起着重要作用<sup>[3]</sup>。越来越多的不依赖于 H3K27 甲基化的抑制机制被人们发现<sup>[6,10,11]</sup>。目前有关 PRC1.6 具体的靶向机制还不是很明确, 但仅有的数据显示 PRC1.6 是通过一种不依赖于组蛋白甲基化修饰的方式压缩染色体从而抑制转录。2011 年 PRC1.6 的组分 L3MBTL2 全基因组 ChIP-seq 分析结果显示 L3MBTL2 的靶基因上并不存在组蛋白甲基化的抑制信号, 同时 PRC1.6 靶基因上缺乏 H3K9me3 修饰, 这说明 PRC1.6 复合物的靶向机制与甲基化修饰以及 HP1 $\gamma$  依赖的 H3K9me3 无关<sup>[6]</sup>。L3MBTL2 靶向的基因上存在 H2AK119ub, L3MBTL2 敲低后靶基因上 H2AK119ub 修饰减少, 而 L3MBTL2 并没有 RING1B E3 连接酶活性, 故该复合物很可能是通过 L3MBTL2 招募 PRC1 的核心组分 RING1B 到靶基因上, 执行抑制功能<sup>[6]</sup>。PRC1.6 复合物中还含有转录因子 E2F6 和 Mga, 故该复合物可以通过 E2F6 以及 Mga 的两个保守结构域 bHLHZip 和 T-domain 特异靶向 E2F, Myc, Brachyury 的反应元件<sup>[5]</sup>。有别与经典的 PRC1, PRC1.6 的组分 L3MBTL2 与 Tdrd12, Rnf17, Mael, Piwil2, Taf7l, Dazl, Ddx4, Syce2, Tex12 等与精子发生相关的基因结合, Jinzhong 等人认为 L3MBTL2 很可能是通过与其它因子结合形成 PRC1.6 复合物来靶向这些与精子发生相关的基因<sup>[12]</sup>。结合 Kehoe 等人 2008 年在小鼠中的发现: 减数分裂特异基因的起始位点前存在 PRC1.6 的组分 E2F6 的反应元件<sup>[13]</sup>。我们推测 PRC1.6 可能通过转录因子 Mga, E2F6 的帮助靶向精子发生相关基因, 故本课题以转录因子 Mga 为切入点来研究 PRC1.6 在精子发生过程中的作用。

### 1.1.3 PRC1.6 组分的结合方式

不同的研究中 PRC1.6 的组成成分不同, Gao 等人的研究结果中 PRC1.6 的组分包括 RING1B, L3MBTL2, HP1 $\gamma$ , E2F6, Dp-1, WDR5, MAX, MGA, HDAC1/2, PCGF6, RYBP。这些因子在 PRC1.6 中的结合方式还没有报道。但某些组分在其它复合物中的相互作用已经有报道。Trojer 等人通过 GST-pull down 证实 L3MBTL2 与 RING1B, HP1 $\gamma$ , PCGF6 有直接相互作用<sup>[6]</sup>。PRC1.6 的核心组分 PCGFs 与 RING1B 之间有相互作用<sup>[14,15]</sup>。Trimarchi 等人发现 E2F6 与多梳蛋白形成的复合物中, E2F6 通过 179-240aa 与 RYBP 144-228aa 之间有直接相互作用<sup>[16]</sup>, 根据这些研究结果, 我们得到图 1-1<sup>[6,14,15,16,17,18]</sup>

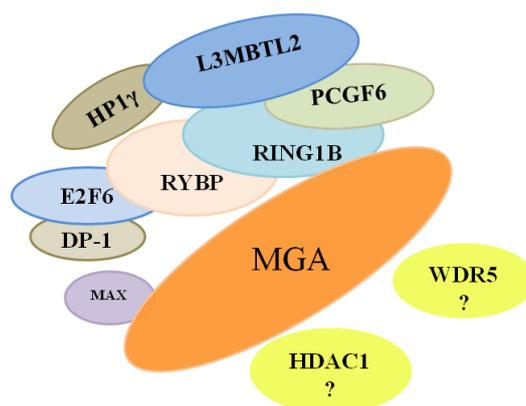


图 1-1 PRC1.6 复合物的组分(? 表示该组分在 PRC1.6 复合物中的结合方式还不清楚)<sup>[6,14,15,16,17,18]</sup>

Fig.1-1 PRC1.6 components( Question mark indicates the interaction proteins of components in PRC1.6 is not clear )<sup>[6,14,15,16,17,18]</sup>

#### 1.1.4 PRC1.6 各组分的功能

Lethal 3 malignant brain tumour like 2 (L3MBTL2) 是多梳蛋白 Sfmbt 的同源蛋白<sup>[18]</sup>, N 端包含一个不规则的 C2/C2 型锌指结构, 随后是四个串联的 MBT 结构, 相比它的同源蛋白 L3MBTL1 及其它 MBT 蛋白缺少 SPM 二聚体结构域<sup>[6]</sup>, MBT 结构域参与 DNA 与组蛋白的组装以及染色质压实<sup>[19]</sup>, MBT 蛋白家族至少有八个串联, 它们在发育中有着重要作用, 且它们的失调会导致疾病的产生<sup>[20]</sup>, 这些蛋白中包括两个, 三个或四个 MBT 结构域串联结构<sup>[21]</sup>, 目前发现所有的 MBT 蛋白均与转录抑制相关。通常含有 MBT 结构域的蛋白倾向于与组蛋白单甲基化以及双甲基化结合<sup>[6,22]</sup>, Guo 证实 L3MBTL2 的四个 MBT 结构与可以与组蛋白 H3, H4 N 端的单甲基化以及双甲基化结合<sup>[6]</sup>, 而 Trojer 等人通过 pull down 证实, L3MBTL2 在 H3, H4 不存在甲基化的情况下, 依旧与 H3 和 H4 结合, L3MBTL2 与组蛋白的结合可以不依赖于组蛋白的甲基化<sup>[6]</sup>。它在基因沉默和染色体凝缩中起着重要的作用<sup>[6,23]</sup>。有研究表明, 它对于胚胎的发育过程非常重要, 敲除 L3MBTL2 的小鼠胚胎致死, 敲除 L3MBTL2 的胚胎干细胞则由于 G0/1 的延长, 导致细胞增殖缓慢, 与分化相关的基因表达, 但是其依然保有持续的自我更新能力<sup>[12]</sup>。

HP1 蛋白是真核生物异染色质的保守组分<sup>[24]</sup>, 在哺乳动物中有三个成员, 分别是 HP1 $\alpha$  (由 *Cbx5* 基因编码), HP1 $\beta$  (由 *Cbx1* 基因编码) 以及 HP1 $\gamma$  (由 *Cbx3* 基因编码)<sup>[25,26]</sup>。它们包含两个保守的结构域, N 端的 chromdomain 以及 C 端的 chromoshadow。它们调节整个基因网络的表达, 在胚胎发育, 细胞周期, 细胞增值, 凋亡, 分化及 DNA 损伤应答等过程中起着关键的作用<sup>[27,28]</sup>。通常

HP1 $\alpha$  和 HP1 $\beta$  位于组成型异染色质上, HP1 $\gamma$  的分布则更均一<sup>[29,30]</sup>。HP1 $\gamma$  的敲低导致性腺机能减退, 精子缺失, 某些曲细精管中仅存在支持细胞<sup>[31]</sup>。HP1 $\gamma$  可以通过 N 端的 chromdomain 识别及特异性的结合某些一甲基及二甲基的组蛋白<sup>[32,33]</sup>。该结构域还可以招募组蛋白甲基转移酶, G9a 和 GLP, 产生 H3K9me2 标记, 它们形成一种正反馈回路, 募集其余相关蛋白, 调节基因表达<sup>[1]</sup>。HP1 $\gamma$  还可以通过其 C 端的 chromoshadow 结构域, 与 HP1 $\alpha$  或 HP1 $\beta$  形成同源二聚体或异源二聚体<sup>[35,36]</sup>, 然后与甲基转移酶 SUV39H1 的特殊结构域 PXVXL 连接, 通过招募其它的染色体调节子, 赋予该蛋白更多的功能<sup>[35,36]</sup>。C57BL/6 背景下产生的 *Cbx3*<sup>-/-</sup> 小鼠新生儿致死<sup>[34]</sup>。C57BL/6 和 129/Ola 杂交背景下可产生可育后代, 但是这些后代生长迟缓<sup>[31]</sup>。*Cbx3* 敲除小鼠, 雄性不育, 大部分雌性也不育, 它们产生的睾丸和卵巢比正常个体的小, 敲除 *Cbx3* 会影响小鼠精母细胞在减数分裂前期的着丝粒成簇以及同源染色体联会<sup>[34]</sup>。另一篇有关 HP1 $\gamma$  的研究发现, 在分化的精原细胞及精母细胞中甲基转移酶 Suv39h1/h2 先催化臂间异染色质 (PCH) 产生 H3K9me3, HP1 $\gamma$  识别该信号并与之结合, 从而招募另一个甲基转移酶 G9a, 瞬时产生 H2K9me2 信号, 从而调节减数分裂时期的中心粒在进化上的保守功能, 使其进行正确的同源染色体配对, 起始联会。在 G9a, HP1 $\gamma$  蛋白缺失的精母细胞中, 着丝粒集会及染色体联会失败<sup>[34]</sup>。以上这些实验均说明 HP1 $\gamma$  在精子发生中起着重要作用。

PcG RING finger (PCGF) 同系物包括 PCGF1, PCGF2, PCGF3, BMI1, PCGF5 和 PCGF6, 它们是区分不同 PRC1 (PRC1.1-PRC1.6) 的关键因子, 每种不同的 PRC1 中仅含有一种 PCGFs 同系物, 它们均可以与 RING finger protein 2 (RNF2) 发生相互作用形成异二聚体发挥 E3 泛素转移酶活性, 并作为骨架组装其余组分<sup>[4,37,38]</sup>。PCGF6 也叫 MBLR 和 RNF134, 在该蛋白的中间位置有一个保守的结构域 RING finger 结构域, 它调节与 RING1B 的相互作用, 该蛋白与 PCGF2 和 PCGF4 很高的同源性, PCGF6 可以直接与 JARID1d/KDM5D (H3K4me3 去甲基化酶) 直接相连, 调节其酶活性<sup>[39]</sup>。另外 PCGF6 还可以直接与 BMI1 发生相互作用<sup>[40]</sup>。PCGF6 在老鼠的多种器官中都有表达如肝脏, 骨骼肌, 卵巢, 睾丸, 胸腺, 胸腺, 胰腺。但它在睾丸中的转录及翻译水平明显比其他组织多<sup>[40]</sup>。PCGF6 蛋白存在于所有类型的雄性生殖细胞中, 在粗线期精母细胞和延伸型精子中表达量最多<sup>[41]</sup>。这说明它可能参与精子减数分裂及减数分裂后的变态发育<sup>[41]</sup>。GC-2 是一个永生的老鼠精母细胞系, 在低温培养下会有少数细胞进行减数分裂, 形成单倍体细胞<sup>[42]</sup>。敲低该细胞中的 PCGF6 敲低后, 产生的单倍体细胞数目减少, 且单倍体细胞中的标记基因的表达量也减少<sup>[42]</sup>, 这些说

明 PCGF6 在精子发生中起着重要作用，但是其作用机制还不是很了解。

MAX 蛋白包含螺旋-环-螺旋锌指结构域 (bHLHZip)，是 MAX 互作网络的核心组分，该互作网络中的其余蛋白 Mga 以及转录因子 Myc, Mad 和 Mnt 家族组分均需与其形成二聚体才能发挥作用<sup>[43,44,45,46,47,48]</sup>。该互作网络在内细胞团 (ICM) 以及内部多能外胚层 (EPI) 的发育中起着重要作用<sup>[49,50]</sup>。Max 在老鼠胚胎早期发育阶段及未受精的卵子中分布广泛<sup>[51]</sup>，缺乏 Max 的胚胎在胚胎移植后由于来自于母体内的 Max 耗光而立即死亡<sup>[51]</sup>。在细胞水平上，Max 对维持干细胞的多能性非常重要。敲除 Max，干细胞退出多能状态，随后凋亡<sup>[52]</sup>。同时发现在干细胞中 Max 的敲低会导致生殖相关基因的上调，尤其是与精子发生相关的基因<sup>[51]</sup>。

转录因子 E2F6 是 E2F 家族的一个成员，该家族的 E2Fs 成员与 DPs 形成二聚体，以这种形式结合到 DNA 上，实现对基因的表达调控<sup>[17,54]</sup>。该家族基因在细胞增殖，细胞分化，DNA 修复中都发挥着重要作用<sup>[55,56,57]</sup>。E2F6 是不同于该家族其他成员，它缺乏羧基末端序列，失去了转录激活以及与口袋蛋白结合功能，故 E2F6 只能通过 RA 非依赖的方式发挥转录抑制功能<sup>[58]</sup>。Jörg Storre 在研究 E2F6 的生物功能时，发现 E2F6 敲除小鼠生活和生殖并没有明显的变化，但是睾丸出现一定的异常，缺乏成熟的精母细胞，支持细胞出现异常增加，精子生成缺陷<sup>[59]</sup>。E2F6 在体组织中抑制与生殖相关的基因<sup>[60,61,62,63]</sup>。

DP 家族仅有两个成员 DP-1 和 DP-2，DP-1 通常与 E2F 结合形成异二聚体，与 DNA 结合，激活或抑制基因的转录。在细胞周期的进程中起着无与伦比的作用<sup>[77]</sup>。同时它在胚胎发育中也起着重要作用，小鼠中 DP1 特异性失活可导致胚胎外组织发育的严重异常继而导致胚胎死亡<sup>[64]</sup>。

组蛋白去乙酰化酶 (HDAC1) 可以与各种蛋白相互作用，抑制基因的转录，在细胞分裂，细胞分化，神经细胞的存活和死亡中均有一定的作用<sup>[65]</sup>。它参与同源异形基因的沉默，与 PCG 蛋白关系密切<sup>[65]</sup>。同时由于某些因子敲除导致的精子发生缺陷中都发现 HDAC1 的表达异常<sup>[66,67]</sup>。

WDR5 蛋白在表观调控基因表达中发挥着重要的作用<sup>[68]</sup>，众所周知，它存在于 MLL 组蛋白甲基转移酶复合物中，导致 H3K4 甲基化，从而激活转录，但是最近有越来越多的报道表明除了该复合物外，它还与其他因子结合，执行其它的功能，比如在秀丽线虫中它与 TRA-1 (转录抑制子 Ci/Gli 家族的成员) 相互配合，抑制与精子生成相关基因的表达<sup>[69]</sup>。

RYBP (YY1, RING1B 结合蛋白) 是一种锌指结构蛋白，它参与细胞的各种生命活动包括细胞增殖，细胞分裂，细胞凋亡，细胞迁移。在胚胎发育的过程

中起着重要的作用，它可以与 RING1A/RING1B 结合，帮助 PRC1 定位于其靶基因上，RYBP 的失活会阻碍干细胞的形成，干细胞分化异常。RYBP 敲除小鼠胚胎致死<sup>[70]</sup>。RYBP 表达水平的降低，会导致中枢神经系统受损<sup>[70]</sup>。RYBP 有效抑制内源逆转录病毒及一系列与生殖相关基因的表达，但是敲除 RYBP，胚胎干细胞并不受影响<sup>[71]</sup>。

RING1A/RING1B 是多梳蛋白系统中的核心组分，是表观调控因子，对于胚胎发育中细胞多样化，生命活动中各个组织的维持起着重要作用<sup>[72,73]</sup>。RING1A/RING1 和 RING1B/Rnf2 具有 E3 连接酶活性，可以产生 H2A 单泛素化，抑制基因的表达<sup>[4]</sup>，它作为 PRC1 的核心组分，一般存在与复合物中发挥其功能，RING1B 敲除会导致胚胎致死，在原肠胚形成中，胚胎及胚外组织发育缺陷<sup>[74]</sup>。同时 RING1B 在轴旁中胚层前后及神经管的特化中起着重要作用<sup>[75]</sup>。

PRC1.6 的生物功能还没有报道，目前在成纤维细胞中发现该复合物更倾向于结合在 G0 细胞中的靶基因而非 G1 细胞中，该复合物促进了静止细胞中 E2F 和 Myc 反应元件的抑制<sup>[5]</sup>。PRC1.6 中各个组分的研究报告中均显示它们与精子发生有着或多或少的联系。有些组分的敲除模型很明确的显示了它们在精子发生中的重要作用。如 E2F6, CBX3 的敲除使得精子生成缺陷<sup>[34,59]</sup> RYBP, L3MBTL2 的敲除会导致生殖特异性基因表达上调<sup>[71,76]</sup>。除此之外，通过 WDR5 的突变体发现，WDR5 在秀丽线虫中抑制与精子生成相关基因的表达<sup>[69]</sup>。这些说明该复合物很可能在精子发生中起着重要的作用。表一总结了 PRC1.6 某些组分敲除后的小鼠表型。

### 1.1.5 PRC1.6 组分 Mga 的介绍

1999 年 Hurlin 等人用酵母双杂的方法筛选小鼠胚胎发育 9.5 天及 10.5 天的 cDNA 文库，发现了四种与 Max 相互作用的蛋白，其中就包括 Mga，在该实验中筛选出的 Mga cDNA 包含一个含有 9018 个碱基的开放阅读框，编码 3006 个氨基酸<sup>[44]</sup>。目前越来越多的 Mga 变体被人们发现，UCSC 网站上 Mouse Dec. 2011 (GRCm38/mm10) 数据显示：小鼠中共有 7 种 Mga 变体。其中最大的 Mga 蛋白含有 3042 个氨基酸（图 1-2）。Mga (MAX gene associated protein) 是一种双特异性的转录因子，包含两个保守的结构域 bHLHZip 和 T-domain。故它既属于 MAX 互作网络中的一员同时又是 T-BOX 家族的成员。同时拥有这两种结构域可能会导致 Mga 的生物学功能比单一包含 bHLHZip 或 T-domain 家族的其他转录因子更复杂。

表 1-1 PRC1.6 某些组分敲除后的小鼠表型

基因	KO 表型	文献
E2F6	精子生成缺陷； 缺少成熟的精母细胞，出现大量的支持细胞； 中轴骨同源异型转换；	[59]
CBX3	HP1 $\gamma$ $-/-$ 雄性，雌性不育； 卵巢，睾丸个体小； 小鼠的精母细胞在减数分裂前期着丝粒成簇以及同源染色体联会受到了影响；	[34]
RYBP	早期胚胎致死； 影响中枢神经的发育；	[70]
	RYBP 抑制胚胎干细胞中生殖特异性基因的表达	[71]
L3MBTL2	胚胎致死； 胚胎干细胞增殖缓慢； 干细胞中与精子发生相关的基因上调	[12]
Max	纯合子胚胎致死 胚胎及胚外组织发育停滞 杂合子小鼠在体重，活力，寿命，繁殖力均不如野生小鼠。	[51]
Ring1B	胚胎致死 在原肠胚形成中，胚胎及胚外组织发育缺陷	[74]
DP-1	胚胎致死； 胚外组织发育异常；	[64]

Mga 因为 bHLHZip 结构域，成为 MAX 互作网络中的一员。除了 Mga 蛋白外，该网络中还包含 Myc 家族（c-, N-, L-Myc），Mad 蛋白家族（Mad1, Mxi1, Mad3, Mad4），Mnt<sup>[44,45,46,81,82]</sup>。该互作网络中的成员均含有 basic-helix



图 1-2 Mga 蛋白已知的功能结构域（参考基因组：UCSC genome browser:GRCm38/mm10）

Fig.1-2 The known functional domains of Mga protein (Reference genome: UCSC genome browser:GRCm38/mm10)

-loop-helix-leucine-zipper (bHLHZip)，它们通过 bHLHZip 结构域与该家族的一个小的蛋白 MAX 的 bHLHZ 结构域结合形成二聚体，调控靶基因 E-box 元件的转录。这种调控主要通过该二聚体招募共激活子或共抑制子，产生一个高度有序的复合物，抑制或激活转录<sup>[78,79,80]</sup>。MAX 蛋白相互作用网络在细胞增值，分化，凋亡及胚胎发育中发挥着重要的作用<sup>[83]</sup>。该结构域对于内细胞团（ICM）以及内部多能外胚层（EPI）的发育至关重要<sup>[49,50]</sup>。如有报道表明 *Max* 敲除后，小鼠胚

胎会由于母体内的 MAX 耗光,使得胚胎在移植后立即死亡<sup>[51]</sup>。Myc, Mnt, Mad 家族的基因敲除后也会导致胚胎在移植后死亡<sup>[84]</sup>。

除了以上这些相同的功能外, MAX 互作网络的蛋白 Myc/Max/Mad 家族还有着各自不同的生物学功能。Myc/Max/Mad 家族蛋白都可以与 MAX 形成二聚体,但是它们之间却不能形成同源或异源二聚体。Myc 包含两个独立的功能结构域: N-端的反式激活残基和 C-端的 DNA 结合结构域 bHLHZ<sup>[49]</sup>,通过这两个结构域 MYC 与 MAX 结合,激活靶基因 E-box 元件的转录<sup>[85]</sup>,促进细胞增殖。同时 Myc 还可以与 Max 结合,通过其它蛋白的介入靶向一类不同的基因,抑制这些基因的表达<sup>[86]</sup>。在大多数人的恶性肿瘤中都发现了 *myc* 基因的突变<sup>[49]</sup>,越来越多的实验证实它在肿瘤的形成中起着重要作用<sup>[87,88,89,90]</sup>。MAD/MXI 与 MAX 形成的二聚体主要抑制基因的转录,这种转录抑制主要依赖于它们 N 端的一个保守结构域 mSin3-结合结构域 (SID),该结构域可以与共抑制子 mSin3A 和 mSin3B 结合,形成抑制复合物<sup>[82,91,92,93]</sup>,阻止细胞增殖,抑制细胞的转移。与 MYC-MAX 形成一种拮抗反应,它们通过竞争 MAX 伴侣或 E-box 元件调节细胞的增殖<sup>[81,94,95]</sup>。同样的 Mga 与 Myc 也存在竞争关系,Max 与 Myc 结合形成 Myc-Max 二聚体转录水平促进进入细胞周期<sup>[96]</sup>,Mga 通过与 Myc 竞争 Max 或竞争靶基因阻止细胞进入细胞周期<sup>[49]</sup>。Mga 还可以通过形成复合物修饰染色体,长期抑制与细胞周期相关的基因<sup>[97,98]</sup>。Mga 的敲低会导致小鼠胚胎干细胞不成熟的分化,这说明 Mga 存在不依赖于细胞周期的功能,在不同的发育阶段 Mga 有着不同的功能<sup>[5]</sup>。

Mga 含有 T-domain,故它隶属于 T-BOX 家族。其中 T-domain 与 T-BOX 家族的基因有些许差异,它的 T-domain 对应的基因仅由一个外显子组成,缺少 T-box 家族基因含有的保守的内含子,推测 Mga 中的 T-domain 可能是由 T-box 基因转录得到的 mRNA 插入不断演化得来的<sup>[76]</sup>。与 bHLHZip 结构域相同,T-domain 也是高度保守的 DNA 结合结构域<sup>[99,100]</sup>。含有 T-domain 的蛋白,我们将其归为 T-BOX 家族,包括 Brachyury, Tbx3, Tbx5, Tbx6, Tbx20, VegT 等因子,该其中即有转录激活因子又含有转录抑制子,两者在胚胎发育和细胞命运决定中起着重要作用<sup>[101]</sup>。尤其是在胚胎发育中中胚层的特化,诱导及分化中起着重要作用<sup>[102]</sup>。

T-domain 首次在 Brachyury 蛋白中发现,该蛋白是一个转录因子,它在原肠胚的形成过程中起着重要作用,主要在中胚层表达,对于中胚层的建立非常重要,尤其是轴旁中胚层近尾部组分的形成<sup>[103]</sup>,最初巴黎研究者通过 X-RAY 产生了 Brachyury 突变小鼠,发现小鼠具有可遗传的短尾<sup>[104]</sup>,随着研究的深入,发现

大多数杂合子会产生与其相似的表型, 还有一些更严重的表型, 但纯合子在交配后 10 天左右死亡, 这些胚胎体的脊索几乎消失, 体节也只有前肢, 但更严重的是它的尿囊缺陷, 无法建立与胎盘之间的联系, 最终因缺乏营养而死<sup>[105]</sup>。

*Tbx3* 在各种发育过程中都起着重要作用, 包括干细胞的维持, 细胞命运决定, 器官形成。通过上调多能因子 *Nanog* 促进干细胞的自我更新<sup>[106,107]</sup>。与 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 共表达可以诱导多能干细胞形成胚芽组织, 产生可育后代<sup>[108]</sup>。*Tbx3* 还控制发育的肝脏中多能肝祖细胞的增值及细胞命运决定<sup>[109]</sup>。在心脏发育中, *Tbx3* 促进心房心室传导系统的特化<sup>[110]</sup>。*TBX3* 在人类胎儿的肺, 肾脏, 心脏, 肝脏, 以及脾脏中都有表达<sup>[111]</sup>, *Tbx3* 纯合子突变小鼠胚胎在子宫中死亡伴随着四肢, 生殖器, 以及乳腺的缺陷<sup>[112,113]</sup>。*Tbx3* 的突变体中, *TBX3* 不足单倍计量的蛋白时, 会导致尺骨-乳腺综合征, 这种综合征包括很多组织及器官的畸形, 如大汗腺, 生殖器, 头发, 牙齿和四肢, 一般前肢后面的部位严重减少<sup>[111,114]</sup>。另外, 有报道显示, *TBX3* 的过表达会导致肿瘤的形成, 在许多乳腺癌细胞系, 一些小细胞肺癌, 大鼠膀胱癌和肝肿瘤中, *TBX3* 蛋白都过表达<sup>[115,116,117]</sup>。

*Tbx6* 基因在中胚层组织中表达, 主要促进胚胎体后部的发育, 突变小鼠的尾芽变大, 主要由间充质细胞组成, 在后体节产生三个神经管<sup>[117]</sup>, 这些充分证实 *Tbx6* 在轴旁中胚层诱导中不可或缺的地位<sup>[118]</sup>, 而 *Tbx3* 和 *Tbx5* 的突变会影响中胚层诱导以及中胚层与上皮细胞之间的相互作用, 导致人类疾病综合症的形成, 影响四肢及其他器官系统<sup>[119,120,121]</sup>。

T-domain 蛋白 VegT 的 mRNA 在卵子形成过程中产生, 位于卵细胞的植物极以及早期的胚胎, 控制非洲爪蟾中建立原始胚层特化模式<sup>[122]</sup>。包含 T-domain 的蛋白作为胚胎发育中的关键调节子, 通过调控一些与胚胎发育相关的基因来影响胚胎的发育。隶属于转录因子的 T-BOX 家族在心脏生成过程中执行着各种功能<sup>[123]</sup>。如人类中 *TBX5*, *TBX20* 特殊位点的突变会导致人类先天性的心脏发育不全<sup>[121,124]</sup>。

以上介绍了 MAX 互作网络和 T-domain 家族的结构及功能方面的一些研究, 这些可以促进我们对于 Mga 的了解。

1999 年 Hurlin 等人研究与 Max 相互作用的蛋白时, 发现了一种新的 Max 互作蛋白 Mga, 该蛋白可以通过 bHLHZip 和 T-domain 结合在相应靶基因上调控这两类反应元件的转录<sup>[44]</sup>。一方面它通过 bHLHZip 与 MAX 蛋白形成二聚体结合到 Myc-Max 的结合位点 CACGTG; 另一方面由于 T-domain 的存在, 它可以结合到 Brachyury 结合序列调控该类基因的转录<sup>[44]</sup>。用荧光素酶检测 Mga 多这两类基因的转录调控发现: 当 Mga 与 Max 相互作用时, 对 Myc-Max 和 Brachyury

的结合序列均起到正向调控的作用<sup>[44]</sup>。原位杂交的方法对它在胚胎发育的 9.5 天, 10 天, 10.5 天的表达模式进行了研究, 发现在 Mga 在胚胎中广泛表达, 且在肢芽, 鳃弓和尾区的表达量最高<sup>[44,126]</sup>。在胚胎中的这种表达模式, 与 T-BOX 家族的很多成员相同, 故它可能与 T-BOX 家族的成员一样, 参与中胚层的诱导<sup>[44]</sup>。2009 年在胚胎干细胞用 RNA 干扰对全基因组时发现 Mga 对于胚胎干细胞的再生起着重要的作用<sup>[127]</sup>。2013 年科学家发现 Mga 蛋白在慢性淋巴细胞白血病和肺癌中发现了 Mga 的失活性突变, 我们知道 Myc 在肿瘤的形成中起着重要作用故这一发现可能与 Mga 的 bHLHZip 结构域相关, Mga 的这种失活突变可能与 Myc 在肿瘤形成中的重要作用相关<sup>[128,129]</sup>。同年科学家发现 Mga 在斑马鱼的背腹侧的分化中起着重要作用, 胚胎外组织卵黄合胞体层 (YSL) 中 Mga 可以与 MAX 和 SMAD4 形成复合物, 靶向 bmp2b/Swirl(Swr) 的转录起始位点上游, 调控 Bmp2b/Swr 信号, 从而起始胚胎中的 BMP 自动调节环, 从而影响背腹侧的分化<sup>[130]</sup>。最近的一篇有关 Mga 的实验时 Washkowitz 等人在 2015 年发表的, 他们发现 Mga 对于胚胎的正常发育至关重要, Mga 的敲低后, 胚胎发育的 4.5 天时, ICM 发育停滞, 细胞正常增值, 但伴随着大量细胞开始凋亡, 这可能是导致胚胎死亡的原因<sup>[84]</sup>。与包含 bHLHZip 结构域的其他蛋白类似, Mga 在 ICM 和 EPI 的发育中起着重要作用。它在 E3.5 天的 ICM 及随后发育的 EPI 中都表达, Mga 敲低后会导致 ICM 及 EPI 发育缺陷, 多能性细胞凋亡<sup>[84]</sup>。Mga 突变表型与 ICM 或 EPI 中与多能相关的特异基因突变的表型非常相似<sup>[131,132]</sup>。由于 Mga 与 Myc 相似的表达模式以及突变表型<sup>[133]</sup>, 故推测 Myc 的下游基因 ornithine decarboxylase 1 (Odc1) 可能是导致 Mga 突变体胚胎中多能细胞死亡的原因。ODC 是聚胺合成途径中鸟氨酸形成腐胺的限速酶。而聚胺对于胚胎的发育至关重要, Odc1 突变的胚胎在移植后迅速死亡<sup>[133]</sup>。在 Mga 敲低后的胚胎中, 添加外源的腐胺可以部分缓解 ICM 及干细胞的突变状况<sup>[84]</sup>。

## 1.2 精子发生

### 1.2.1 精子发生的定义

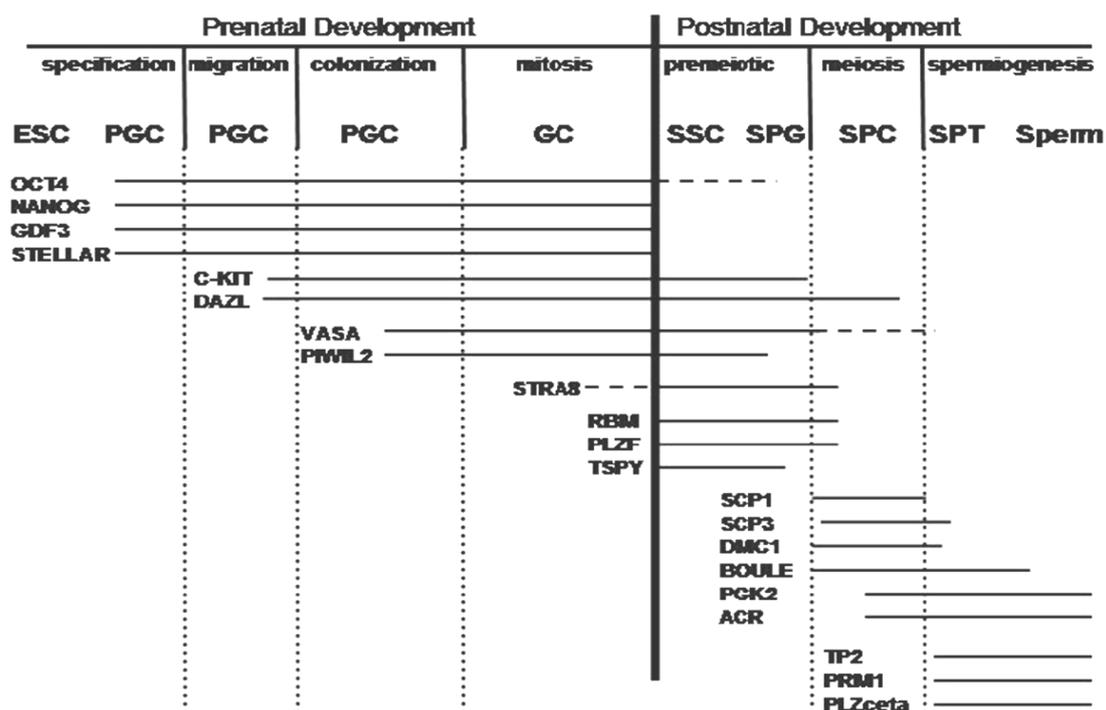
精子发生是复杂的分化过程, 包括三个阶段: (1) 有丝分裂: 精原干细胞 (A 型精原细胞) 有丝分裂不断产生新的细胞, 这些细胞分为两类, A 型精原细胞不分化, 保持有丝分裂能力, B 型精原细胞分化为初级精母细胞。(2) 减数分裂: 初级精母细胞复制一次, 连续分裂两次形成单倍体球形精细胞; (3) 球形精细胞经过变态发育形成成熟的精子<sup>[136]</sup>。

精子发生过程的第二步非常关键, 减数分裂在维持物种染色体数目稳定, 物

种适应环境变化不断进化的机制中起着重要的作用。减数分裂染色体复制一次，细胞连续分裂两次，最终细胞中染色体数目减半<sup>[136]</sup>。减数分裂分为间期和分裂期。间期分为 G1 期、S 期和 G2 期。分裂期分为减数第一次分裂期，减数第二次分裂期。减数第一次分裂期分为前期，中期，后期，末期。根据染色体的形态，前期可分为 5 个阶段：细线期：核内出现细长、线状染色体，细胞核和核仁体积增大，每条染色体含有两条姐妹染色单体；偶线期：染色体联会（配对的一对同源染色体中有 4 条染色单体，又称四分体）；粗线期：染色体缩短变粗，四分体中的非姐妹染色单体之间发生 DNA 片断交换，基因重组；双线期：染色单体分开；终变期：染色体紧密凝集向核周围靠近。核膜、核仁消失，最后形成纺锤体。性染色体在该过程中不同与其它常染色体，在精母细胞中可以形成 XY 小体<sup>[137]</sup>。XY 小体是初级精母细胞细胞核中明显的无被膜的深染色区域。它是区别于同一细胞中常染色体的关键结构。该结构导致精子发生过程中性连锁基因的抑制，叫作性染色体的钝化（MSCI）<sup>[137]</sup>。该过程伴随着组蛋白转录后修饰，染色体结合蛋白的招募或去除<sup>[138]</sup>。

### 1.2.2 精子发生中的基因表达

哺乳动物中的精子发生是一个复杂且独特的分化过程，在该过程中产生了多种类型的细胞，这些细胞中体细胞中存在的结构基因处于静止状态，生精细胞特异的基因被激活<sup>[139]</sup>。伴随着精子发生的 3 个主要阶段，许多睾丸特异性基因呈现阶段特异性表达，这些基因包括原癌基因，细胞骨架蛋白基因，鱼精蛋白基因，热休克蛋白基因，周期蛋白基因，无精子因子基因，乳酸脱氢酶基因，依赖 cAMP 蛋白激酶基因等<sup>[140]</sup>。它们的表达受到严格的时空调节，这种调节对精子发生起着决定性的作用，同时也为体外诱导精子发生提供了检测的标准。如 *Dazl*, *Ddx4*, *Prdm1*, *Dppa3* (*Stella*) 等是早期生殖细胞标志基因<sup>[141]</sup>。其中 *Dazl* 属于无精子因子基因，它的表达仅仅预示着生殖细胞的出现<sup>[142]</sup>，*Dazl* 敲除小鼠的胚胎中，生殖特异性基因 *Oct4*, *Dppa3/Stella*, *GCNA* (germ cell nuclear antigen) 和 *MVH* 会降低<sup>[143]</sup>，出生后的雄性小鼠，减数分裂停滞<sup>[144]</sup>。*c-kit* 是原癌基因蛋白激酶家族的成员，对进入或完成减数分裂是必需的<sup>[145]</sup>，*c-kit* 突变后，睾丸中分化的精原细胞显著减少<sup>[146]</sup>，它是早期精母细胞的标志<sup>[147]</sup>。*Stra8* 是哺乳动物生殖细胞由有丝分裂转变为减数分裂前特异表达的基因<sup>[148]</sup>。*SSC* 也表达一些基因维持其自我复制，保证干细胞数量稳定。如 *NANOS2* 是一种锌指蛋白<sup>[149]</sup>，维持 As，

图 1-3 胚胎干细胞诱导成精子过程中重要调控因子的表达时相<sup>[158]</sup>Fig.1-3 The expression stages of key regulatory genes during differentiation of ESC into sperm<sup>[158]</sup>

Apr 细胞的自我复制, 抑制 Ngn3、Nanos3 的表达, 当细胞分化到 Aal 阶段时, Nanos2 表达逐渐降低, Ngn3、Nanos3 开始表达<sup>[150]</sup>。TSPY1 (testis-specific protein Y-encoded) 基因主要表达于精原细胞阶段以及早期精母细胞<sup>[151]</sup>。由于剪切方式的不同产生了很多变体<sup>[152]</sup>, 发现小的剪切体主要存在于圆形精细胞中<sup>[153]</sup>。TP1, TP2 以及 PRM1 蛋白在精子变态期表达, 在精子变态早期, 过渡蛋白 (TP) 代替了组蛋白变体。过渡蛋白 2 (TP2) 对于鱼精蛋白的形成非常关键。它在精子形成中起着重要作用, 它的过早翻译使得精子头部畸形, 活动力降低, 雄性不育, 故 TP2 翻译的时空特异性是精子形成所必需的<sup>[154,155]</sup>。如图 1-3 为胚胎干细胞诱导成精子的过程中一些特异基因的时空表达。

### 1.2.3 精子发生过程中的表观遗传调控

表观遗传调控是在不改变基因序列的情况下, 对染色体进行修饰, 调控基因表达。常见的调控方式有 DNA 甲基化 (DNA methylation), 组蛋白修饰 (histone modifications) 非编码 RNA (non-coding RNAs ncRNAs)<sup>[156]</sup>。精子发生过程包括三个阶段, 这三个阶段涉及生殖细胞分化, 染色体重塑, 基因表达的变化, 这些都与表观遗传修饰密切相关<sup>[157]</sup>。

DNA 甲基化是表观修饰的主要调控方式, 与基因的转录相关, 低甲基化激

活转录，高甲基化抑制转录<sup>[159]</sup>。哺乳动物的精子发生过程中含有甲基化的重塑<sup>[160,161]</sup>。早期原生殖细胞经历类体细胞的全基因组 DNA 高度甲基化，然后进入生殖嵴，发生全基因组 DNA 去甲基化，随后建立性别特异性表观遗传修饰，在不同的性别中甲基化建立的时间不同<sup>[162]</sup>。精子发生过程中，基因组的从头甲基化发生在前精原细胞，起始于印记位点和重复序列，在减数分裂的粗线期末完成<sup>[163,164]</sup>。某些在精子发生早期表达的基因则在减数分裂后期精母细胞中逐步甲基化，使得这些基因在逐渐成熟的精子细胞中保持沉默<sup>[165]</sup>。DNA 甲基化的正确修饰对于精子发生的正常进行非常关键，在很多不育病人的配子中均发现 DNA 甲基化的改变<sup>[166,167,168]</sup>。

组蛋白甲基化修饰是一种最常见的组蛋白翻译后修饰，通常与基因沉默相关。在精子发生过程中，只有保证 H3K4, H3K9 及 H3K27 甲基化的正确修饰才能确保精子发生过程<sup>[169,170]</sup>。去甲基化酶（demethylase）对于精子发生（spermatogenesis）和正常的生育能力密切相关，其中 H3K9 甲基化在精子发生过程的许多阶段中都起着重要的作用<sup>[171-174]</sup>。H3K9 的去甲基化会使得精子特异基因 Prm1, Tnp1 表达量上升，对维持 H3/H4 的高度乙酰化及精子活力（sperm motility）、活率也起着重要作用<sup>[171,175,177]</sup>。

组蛋白的乙酰化可逆。在精子发生过程中，染色质中的组蛋白接连被过渡蛋白，鱼精蛋白替代，核逐渐变小，使得精子可以正常受精<sup>[175]</sup>。而组蛋白的乙酰化使核小体结构松散，利于过渡蛋白及鱼精蛋白的替代<sup>[178]</sup>。在减数分裂粗线期时，性染色体(X,Y)染色体会形成 XY 小体，抑制基因的转录<sup>[178]</sup>。该过程伴随着许多表观遗传修饰<sup>[179]</sup>，如 H2A 泛素化，H3K9, H3K27, H4K20, H3K79 甲基化，H3K9, H4K12, H4K16 去乙酰化，以及导致基因活化的 H4K5, H4K8 的高度乙酰化现象都会出现<sup>[180,181]</sup>。

组蛋白磷酸化与转录激活有着联系<sup>[182]</sup>。精子发生过程中，染色质的折叠和浓缩中，涉及组蛋白磷酸化。组蛋白被其它蛋白替代的过程，伴随磷酸化、去磷酸化。减数分裂的过程中，组蛋白变体 H2AX 的磷酸化影响染色质浓缩及基因沉默<sup>[183]</sup>。在精子发生的过程中，组蛋白磷酸化影响精子核染色质特性，继而对受精以及后代发育产生影响<sup>[184,185]</sup>。

除了以上的修饰外，非编码 RNA 与精子发生也有这密切的关系。如 miRNA 在正常精子和低活力精子中的表达不同<sup>[186]</sup>，在精子发生的不同阶段睾丸中表达的 miRNA 表达量也会有差异<sup>[187]</sup>。除此之外，与 Piwi 蛋白家族的成员相互作用而得名的 piRNA<sup>[188]</sup>，在精子发生过程中也起着重要作用。如 Piwi 蛋白对雄性的生育力是不可或缺的<sup>[189-191]</sup>。而 Miwi 敲除的小鼠在圆形精子早期阶段会表现出

精子发生阻滞的现象<sup>[190]</sup>。

在精子发生过程中, 这些表观遗传修饰相互协调配合, 从而精子发生的正常进行, 最终形成具有活力的精子。

#### 1.2.4 体外诱导精子的模型

体内研究精子生成受诸多变量的影响, 为了满足理论研究及临床应用的需求, 体外诱导精子势不可挡。1937 年就有科学家开始了这方面的尝试, 经过 70 多年的努力, 科学家们通过激活原始生殖细胞特异基因或药物诱导 SSC、ESC、iPS、MSC、TC 等细胞诱导为生殖细胞系, 继而产生精子。

精原干细胞 (SSC) 在睾丸的曲细精管中, 经过有丝分裂及减数分裂最终形成成熟的精子。日本的 Takuya Sato 小组通过体外模拟睾丸曲细精管的内环境成功将精原干细胞诱导成精子<sup>[192]</sup>。2010 年 Sato 等人从携带 Acr-GFP(acrosin-green fluorescent protein, 精子酵素-绿色荧光蛋白), Gsg2-GFP(germ cell associated 2-green fluorescent protein)报告基因的转基因小鼠的睾丸组织, Acr 和 Gsg2 分别指示精母细胞减数分裂中期、减数分裂后期的开始。将这两种睾丸分别切成小块并放置在半浸泡在培养基中琼脂糖凝胶上进行体外培养, 发现 Gsg2-GFP 在第 8~10d 开始产生荧光, 持续表达 15~20d, 这与正常发育的小鼠睾丸内 Gsg2 的表达规律吻合。关于 Acr-GFP 的实验也符合类似规律。Hoechst 染色发现了单倍体细胞的存在, 但是并没有观察到精子产生<sup>[192]</sup>。当 Sato 用 KSR (knockout serum replacement) 代替培养基中的胎牛血清后, 在组织水平上观察到了精子的产生<sup>[193]</sup>。用该培养体系, Sato 等人随后又将异体精原干细胞 (SSC) 在体外培养成精子<sup>[193]</sup>。

胚胎干细胞 (ESC) 具有全能性, 可以分化成成体的所有细胞类型, 包括生殖细胞。2006 年 Nayernia 等构建了质粒 Stra8-EGFP 和 Prm1-DsRed, 通过绿色和红色荧光蛋白分别报告细胞内 Stra8, Prm1 的表达, 检测生殖细胞发育进程<sup>[194]</sup>。首先通过 G418 筛选得到稳转 Stra8-EGFP 的 ESC, 然后通过 RA 诱导, 流式细胞仪的分选, G418 筛选得到表达 Stra8-EGFP 的精原干细胞 (SSC), 接着用 RA 再次诱导转染了 Prm1-DsRed 质粒的精原干细胞 (SSC), 发现经过两次转染, 两次 RA 诱导后可以在显微镜下观察到具有尾部的精子及联会复合体<sup>[195]</sup>。2009 年冯立新研究小组通过转基因技术将 ESC 不经过类胚体直接诱导成精子<sup>[196]</sup>。他们在雄性 ESC 中异位表达 Dazl (deleted in azoospermia-like), 最终在体外将小鼠 ESC 诱导成游动的精子<sup>[196]</sup> (如图 1-4)。该实验首先将 Dazl 的 cDNA 克隆至 pMSCVneo 质粒中, 然后用该质粒转染 mES 细胞, 在标准培养条件下培养 2 天, 然后用胰酶消化, 铺到用 gelatin 处理后的六孔板中, 标准条件下培养 24h, 然后

用 G418 开始筛选。筛选两周后就可以得到稳转 Dazl 的 mES 细胞，用 Western Blotting 检测 Dazl 的表达，成功后。用不含 LIF 的标准干细胞培养基培养稳转 Dazl 的干细胞，首先可以看到这些细胞贴壁生长，有单层细胞形成一个个克隆，培养 3-5 天后，可以观察到在这些克隆的中央聚集了很多小细胞，这些小细胞中有的形态会发生变化，形成具有尾巴蝌蚪状的细胞，并游离在培养基中。该文章中通过流式细胞仪检测染色体数目，发现在早期诱导中，大约有 9% 的细胞可以变为单倍体细胞。

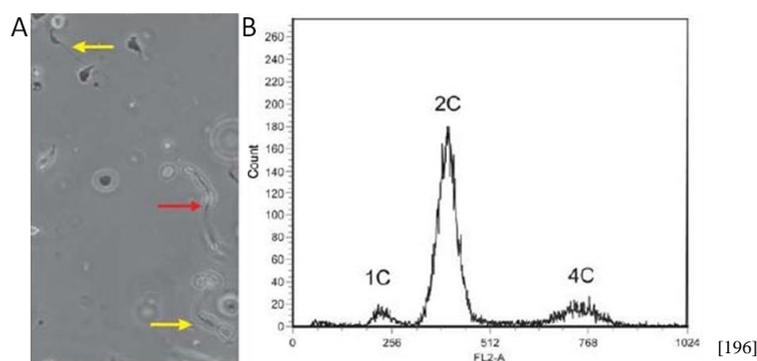


图 1-4 稳转 Dazl 的胚胎干细胞诱导分化成精子<sup>[196]</sup>

A. 相差显微镜下稳转 Dazl 的干细胞产生的精子（黄色箭头指示的精子含有一个长的尾巴和一个头部，红色箭头指示的精子含有一个头部，两条尾巴）；B. 流式细胞术分析 DNA 的含量结果显示诱导过表达 Dazl 的干细胞中出现单倍体，二倍体，四倍体的亚细胞群。

Fig.1-4 Sperms produced from mES cells stably expressing Dazl<sup>[196]</sup>

A. Phase contrast microscopy results show that sperms were produced from Dazl transfected mES cells (sperms with a long tail and a head are indicated by yellow arrows and two sperm heads connected by one tail were indicated by a red arrow). B. Flow cytometry analysis of DNA content shows Dazl transfected mES cells can produce haploid cells(1C), diploid cells (2C) and tetraploid cells (4C).

iPS 是一种人工诱导的干细胞，同 ESC 一样，具有分化成成体所有细胞类型的能力。故将诱导 ESC 的方法用于诱导 iPS 也一样可行<sup>[197-199]</sup>。

间充质干细胞（mesenchymal stem cells, MSC），是一种具有自我复制能力和多向分化潜能的成体干细胞，能够发育成硬骨、软骨、脂肪和其他类型的细胞。2009 年，华进联等利用维甲酸和山羊睾丸提取物诱导胎儿骨髓 MSC，发现了精子形成过程中减数分裂标志性基因的表达<sup>[200]</sup>。

F9 畸胎瘤干细胞（F9 teratocarcinoma stem cells）同早期胚胎干细胞类似<sup>[201]</sup>。2004 年，Nayernia 通过药物诱导的方法将 F9 诱导成生殖细胞，首先构建稳转

Stra8-EGFP 质粒的 F9 畸胎瘤干细胞，然后通过两次 RA 诱导和两次荧光激活细胞筛选（FACS），得到了精原干细胞（SSC），将此细胞移植到睾丸后，产生了成熟的输精管结构以及可育的精子<sup>[202]</sup>。

### 1.2.5 体外构建精子发生模型的意义

世界范围内有 13-18% 的夫妻受到不育症的影响，其中 50% 是由于男性不育导致的<sup>[201]</sup>。而雄性不育中有 70% 的患者伴随着不同程度的精子发生障碍<sup>[202]</sup>。故对于精子形成过程的研究就显得异常重要。精子形成是一个非常复杂的过程，受多种因素的调控，任何因素的改变都有可能导致雄性不育的发生，就这点而言，体外实验比体内实验占有更多的优势，它可以控制精子形成过程中变量的数目及变量的内容，同时根据研究的内容及目的运用适合的诱导方案，得到更好的结果。其次体外实验更有利于持续观察生殖细胞的迁移，增殖，分化，发育等过程，可以促进对于基础生殖生物学的研究，从而为解决不孕不育症提供更多的前景。

## 1.3 本课题的研究内容及意义

目前有关 Mga 功能研究均与它的两个保守结构域的结构及功能相关，但是 Mga 作为全长 3042 个氨基酸的大蛋白，这两个结构域仅仅只占了它的 8.9%，目前有关 Mga 蛋白中其它区段氨基酸的结构及作用，它与 PRC1.6 其他组分之间的互作关系，自身的表达及调控及其在 PRC1.6 复合体中担任的角色等尚无报道。

本课题以 Mga 为切入点研究其分子功能进而更加深入的探讨多梳蛋白复合体 PRC1.6 的功能机制。

为了研究 Mga 在 PRC1.6 中的作用，我们需要寻找 Mga 与 PRC1.6 其它组分的互作位点，突变这些位点，破坏它们之间的相互作用，从而观察 Mga 对该复合物的形成，稳定，靶向机制及功能的影响。前期结果显示 Mga 通过 535-640 aa 与 RING1B 发生互作。本论文通过 BiFC，竞争实验，Ni-pulldown 实验在体内和体外寻找 RING1B 与 Mga(535-640)发生相互作用的片段，为下一步得到它们的三维结构提供基础。

目前，在 UCSC Genome Browser: GRCm38/mm10 数据库中有很多关于 Mga 转录剪切体的信息，但是其在组织及细胞中的表达情况还不是很了解，故我们收集了 UCSC Genome Browser: GRCm38/mm10 数据库中 Mga mRNA 剪切体及其对应的截短体蛋白的信息对它们进行整理分析，并检测它们在小鼠组织及细胞中的表达情况。

背景介绍中我们了解到 PRC1.6 的很多组分与精子发生有着或多或少的联系

[34,59,69,71,76]。我们的前期工作通过微阵列分析比较 Mga 敲低前后基因的表达量，发现有 158 种基因的表达发生变化 ( $\log_2 > 1$ )，其中上调的有 130 种基因。运用信息学手段，检测这些上升基因，发现有很多与精子发生相关。

为此我们将 PRC1.6 的组分 PCGF6, L3MBTL2, RING1B 敲低/敲除后，干细胞中上调的及基因<sup>[12,134,203]</sup>，与 Mga 敲低后上调的基因进行比较。检测是否有与精子发生相关的基因同时受到它们的调控。

目前有关 Mga 的研究比较少，我们对 PRC1.6 中 RING1B 与 Mga(535-640) 的作用区段的确定及 Mga 转录剪切体表达谱的研究丰富了 Mga 的理论基础。其次，我们有关 PRC1.6 与精子发生有关的推测，可能为其它的研究者提供一种研究方向，开拓治疗不孕不育症的研究。

## 第二章 材料与方法

### 2.1 主要实验材料

#### 2.1.1 细胞与菌株

细胞系：人胚肾上皮细胞系 293T 为本实验保存，小鼠胚胎干细胞 R1、小鼠畸胎瘤细胞 F9 均为四川大学李沁桐实验室提供。

菌株：大肠杆菌菌株 E.coli DH5 $\alpha$ 、E.coli BL21 感受态细胞购自全式金，E.coli Rosetta 感受态细胞为本实验所制备；

#### 2.1.2 常用质粒

Ni-pulldown (PD) 用到的质粒被构建在 PET28a(+)载体上，该载体为本实验室保存。

BiFC 实验用到的质粒被构建在 pBiFC 载体上（该质粒由 pBiFC-YC-173SMAD3, pBiFCYN-173SMAD4 改造得到）。该质粒由本实验保存。

#### 2.1.3 主要抗体

Mouse anti GST (TA-03) 购自中杉金桥，Mouse anti His (No.B1169) 购自北京博奥龙免疫技术有限公司，Goat anti Mouse IgG (NXA931) 购自 GE 公司。

#### 2.1.4 主要实验试剂

►细胞培养及相关试剂：

试剂名称	制造商	货号
细胞培养皿	Corning	L30196
6 孔、12 孔、24 孔培养板	JETBIOFIL	TCP001-006/012/0 24
新生牛血清	Biological Industries	04-102-1A
胎牛血清	GEMINI	A9TE009
胰酶消化液	Gibco	1427015
非必需氨基酸	Gibco	1628158
高糖 DMEM	Gibco	1719978
$\beta$ -巯基乙醇	Sigma	20130110
X-tremeGENE HP DNA 转染	Roche	06366236001

## 试剂

## ➤分子实验相关试剂:

Plasmid Miniprep Purification Kit II	GeneMark	DP012-300
质粒 DNA 小量抽提试剂盒	生工	B518191-0100
高纯度质粒小提中量试剂盒	天根	DP107-02
PCR 纯化试剂盒	生工	B518141-0100
DNA 胶回收试剂盒	生工	B518131-0100
基因组 DNA 提取试剂盒	天根	DP304-02
Total RNA Kit I	OMEGA	R6834-01
动物全蛋白提取试剂盒	生工	C510003-01
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis	Roche	04896866001
2×SYBR GREEN Fast qPCR MASTER MIX	BIOTOOL	B21802
2×Taq master mix	诺唯赞生物	LN90151
PrimeSTAR® HS (Premix)	Takara	R040
蛋白酶 K	生工	04-N-1-5
DnaseI	TRANSGENE	J10326
限制性内切酶、T <sub>4</sub> DNA 连接酶	NEB	略
100 bp DNA marker	东盛	
1 Kb DNA marker	Takara	3426A
Protein marker	生工	C610013-0250
八联管	美国 AXYGEN	PCR-0208-C
显影液	柯达	661-0190
定影液	柯达	661-0208
X 光片	锐珂医疗器材公司	XBT
Super signal 发光液	Thermo	34079
PVDF 膜	Thermo	
Ni-NTA Sefinose™ Resin Kit	生工	C60031-005

## 2.1.5 主要实验仪器

仪器名称	型号	生产厂家
-80°C 超低温冰箱	海尔公司	BCD-649WE
超声波清洗器	洁盟公司	JP-040S
二氧化碳培养箱	MEMMERT 公司	INC153H9
倒置显微镜	Motic 公司	AE2000
烘箱	上海精宏有限公司	DHG-9076A
恒温振荡器	常州国华电器有限公司	SHZ-82
恒温培养箱	上海精宏实验设备有限公司	DNP-9052
分光光度计	龙尼柯（上海）有限公司	UV-2350
二级生物洁净安全柜	苏净安泰公司	BHL-1300IIIH2
雪花制冰机	XUEKE 公司	TIVIS-30
微波炉	格兰仕公司	P70D20P-G5
PCR 仪	Life invitrogen 公司	2720
离心机	上海卢湘仪制造有限公司	TGL-16M
液氮罐	GREENLAND 公司	30 L
干式恒温器	常州朗越仪器制造有限公司	DTH-100
数显恒温磁力搅拌器	常州朗越仪器制造有限公司	85-2
恒温水浴锅	科伟公司	HH-2
漩涡混合器	常州朗越仪器制造有限公司	XH-C
酸缸	新乡市康林医疗器械有限公司	50*40
四维旋转混匀器	海门市其林贝尔仪器有限公司	BE-1100
垂直电泳槽	上海天能仪器有限公司	VE-180
转移电泳槽	上海天能仪器有限公司	VE-186
水平电泳槽	上海天能仪器有限公司	VE-90
电泳仪	上海天能仪器有限公司	EPS-300
立式压力蒸汽灭菌锅	申安医疗器械公司	LDXZ-501KBS
震荡培养箱	海门市其林贝尔仪器有限公司	TS-1
杯式过滤器	海宁市亚泰制药机械有限公司	YT-φ50
正压过滤器	海宁市亚泰制药机械有限公司	1L
暗箱式紫外分析仪	上海予申仪器有限公司	ZF-20D
研究级倒置荧光显微镜	OLYMPUS 公司	IX71
实时定量 PCR 仪	Agilent 公司	MX3005P
微型台式真空泵	海门市其林贝尔仪器有限公司	GL-802B

洁净工作台

苏净安泰公司

SW-CJ-1FD

### 2.1.6 实验相关溶液配制

(1) 抗生素氨苄青霉素溶液 (Amp, 100 mg/mL): 称取 1 g 氨苄青霉素钠溶于 10 mL 无菌水, 过滤后即得 100 mg/mL 氨苄青霉素溶液, 分装后冻存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 。工作浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ 。

(2) 卡那霉素溶液 (Kan, 50 mg/mL): 称取 0.1 g 卡那霉素溶于 2 mL 无菌水, 混匀后过滤分装, 冻存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 。Kan 的工作浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$ 。

(3) LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g 溶于约 950 mL 纯水, 全部溶解后加纯水至 1000 mL。120  $^{\circ}\text{C}$  高压蒸汽灭菌 20 min, 室温储存。

(4) LB 固体培养基 LB 液体培养基: 向液体培养基中加入 1.2% 琼脂粉 (Agar) 高压蒸汽灭菌, 降至温度约 55  $^{\circ}\text{C}$ , 加入相应抗生素, 倒板, 凝固后, 倒置平皿, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  储存。

(5) 核酸电泳缓冲液 TAE (50 $\times$ 储备液): Tris 碱 242 g, 冰乙酸 57.1 mL, 乙二胺四乙酸二钠二水 37.2 g, 纯水 1 L, 临用时, 用纯水稀释至 1 $\times$ 即可。

(6) 1% 琼脂糖凝胶: 称取 0.25 g 琼脂糖凝胶溶于 25 mL 1 $\times$ TAE 中, 微波炉加热至琼脂糖溶解, 放凉后加入 1.25  $\mu\text{L}$  溴化乙锭, 混匀后倒入模具。

(7) 1 $\times$ PBS 缓冲液: NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g, 用 HCl 调节 pH 至 7.4, 高压下蒸气灭菌 20 min, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

(8) 1M IPTG: 称取 2.38 g IPTG 粉末溶于 10 mL 纯水中, 过滤除菌, 于 $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

(9) 蛋白酶抑制剂: 用异丙醇配制 100 mM PMSF, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

(10) 5 $\times$ SDS-PAGE 加样缓冲液: SDS 5 g, 50 mM Tris-HCl (pH6.8) 12.5 mL, 溴酚蓝 0.05 g, 0.1 M DTT 3.87g, 甘油 25 mL。

(11) Western Blot 10 $\times$ 电泳缓冲液: Tris 30.3 g, 甘氨酸 188 g, SDS 10 g, 用水定容至 1 L。

(12) Western Blot 10 $\times$ 转膜缓冲液: Tris 116.3 g, 甘氨酸 58.5 g, SDS 7.5 g, 用水定容至 1 L。

(13) 1 $\times$ 转膜缓冲液: 10 $\times$ 转膜缓冲液 100 mL, 甲醇 200mL, H<sub>2</sub>O 700 mL。

(14) Western Blot 10 $\times$ TBS 缓冲液: Tris 24.23 g, NaCl 88 g, 定容至 1 L。

(15) 1 $\times$ TBST 缓冲液: 10 $\times$ TBS 100 mL, Tween-20 500  $\mu\text{L}$ , 定容至 1 L。

(16) Western Blot 封闭孵育缓冲液: 1 $\times$ TBST 配制 5% (w/v) 脱脂奶粉, 充分溶解, 现用现配。

(17)考马斯亮蓝染色液:考马斯亮蓝 R-250 2.5 g, 甲醇 500 mL, 冰醋酸 100 mL, 定容至 1 L。

(18)考马斯亮蓝脱色液: 甲醇 450 mL, 冰醋酸 100 mL, 超纯水 450 mL。

(19)显影液: 温水 750 mL, 米吐尔 2 g, 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 90 g, 对苯二酚 8 g, 无水 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 44.8 g, 溴化钾 5 g, 加冷水至 1 L。

(20)定影液: 先配 I 液: 蒸馏水 500 mL, 硫代硫酸钠 240 g, 配 II 液: 蒸馏水 200 mL, 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 315 g, 冰醋酸 13.4 g, 硼酸 7.5 g, 钾矾 15 g。I 液和 II 液混到一块补充至 1 L。

(21)洗脱液 I: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM 咪唑。

(22)洗脱液 II: 274 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM 咪唑。

### 2.1.7 构建的载体及其引物

Ni-pulldown (PD)中涉及的载体模板均为: pBiFC-VN-RING1B 和 pET-28a (+);

#### pET-28a-his-RING1B

F: GGAATTCCATATGATGTCTCAGGCTGTGCAGACAAACG

R: TGGCCCTCGAGTTCATTTGTGCTCCTTTGTAGGTGCG

#### pET-28a-his-RING1B (1-220)

F: GGAATTCCATATGATGTCTCAGGCTGTGCAGACAAACG

R: TGGCCCTCGAGTCATTACTGGATCAATTGCCATTGCT

#### pET-28a-his-RING1B (221-336)

F: GGAATTCCATATGAGCAATGGCAATTGATCCAGTAATG

R: TGGCCCTCGAGTTCATTTGTGCTCCTTTGTAGGTGCG

#### pET-28a-his-RING1B (1-116)

F: GGAATTCCATATGATGTCTCAGGCTGTGCAGACAAACG

R: TGGCCCTCGAGTCAACTTGGATAAATTTGCTGATG

#### pET-28a-his-RING1B (117-220)

F: GGAATTCCATATGATGCGTGATGAGTATGAAGCTC

R: TGGCCCTCGAGTCACATTACTGGATCAATTGCCATTGCT

Ni-pulldown (PD)中用到的其它质粒: pET-28a-his, pGEX-6P-1-GST-Mga(535-640) 为本实验保存。

BiFC 实验中构建的载体的模板均为 pBiFC-VN-RING1B 和 pBiFC-YC-CBX7

#### pBiFC-VN-RING1B(1-220)

F: GCTCTAGAGCAGTCTCTATGTCTCAGGCTGTGCAGAC

R: CGGGATCCTCATCACATTACTGGATCAATTGC

pBiFC-VN-RING1B(221-336)

F: GCTCTAGAGCAGTCTCTGATGGTGCTAGTGAAATTG

R: CGGGATCCTCATCATCATTTGTGCTCCTTTGTAGGTG

pBiFC-VN-RING1B(1-116)

F: GCTCTAGAGCAGTCTCTATGTCTCAGGCTGTGCAGAC

R: CGGGATCCTCAACTTGGATAAATTTTGCTGATG

pBiFC-VN-RING1B(117-220)

F: GCTCTAGACGTGATGAGTATGAAGCTC

R: CGGGATCCTCATCACATTACTGGATCAATTGC

pBiFC-VN-RING1B(117-336)

F: GCTCAGACGTGATGAGTATGAAGCTC

R: CGGGATCCTCATCATCATTTGTGCTCCTTTGTAGGTG

pBiFC-YC-Mga(535-640)

F: GCTCAGAGCAGTCTCTATGATTGTACAAAAATATAC

R: CGGGATCCTCATAACAGGAATATTCTTGGCAGCAG

BiFC 实验中用到的其它质粒，如 pBiFC-YC-BMI1，pBiFC-YC-CBX7，pBiFC-YC-CBX7(delta box)为本实验室保存。

## 2.2 实验步骤及方法

### 2.2.1 诱导蛋白表达

(1)将 pET28a-his、pET28a-his-RING1B、pET28a-his-RING1B(1-220)、pET28a-his-RING1B (221-336)、pET28a-his-RING1B (1-116)、pET28a-his-RING1B (117-220)质粒分别转化到 Rosseta 感受态中，pGEX6p1-GST-Mga(535-640)转化到 BL21 感受态细胞中。

(2)挑取单菌落，将 Rosetta 单菌落置于 1 mL 含 Kan 的 LB 培养基中，BL21 单克隆置于 1 mL 含 Amp 的 LB 培养基中，37 摄氏度 200 转震荡 7 h。

(3)将 1 mL 的菌液平均分成三份，置于 1.5 mL 的 Eppendorf 管中，用含相应抗生素的 LB 培养基补齐至 1 mL，37 摄氏度 200 转震荡 2 h，向其中一管中加入 IPTG (终浓度为 0.2 mM)，一管作为对照，一管留作备用。37 摄氏度 200 转震荡 4 h。

(4)将加入 IPTG 的菌液和用于对照的菌液离心 (5000 g, 4 °C, 5 min)，去上

清, 40  $\mu\text{L}$  的水彻底悬浮沉淀, 加入 40  $\mu\text{L}$  5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5 $\times$ SDS 蛋白上样缓冲液在 100 摄氏度下煮沸 3 min, 待温度降到室温后, 向其中加入 5% 体积的 DTT 后使用), 100 摄氏度下煮沸 10 min, 4 摄氏度, 最大转速离心离心 4 min, 得到最终样品。

(5) SDS-PAGE 后, 用考马斯亮蓝染色检测蛋白的诱导情况。

(6) 将备用的 1 mL 菌液加入 50 mL 含相应培养基的 LB 培养液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$  培养至  $\text{OD}_{600}=0.6$ 。

(7) 随后各加入 IPTG 使成 0.2 mM, 在 37 $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 4 h, 进行蛋白表达。离心 (5000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ , 5 min) 收集细菌, 得到含目的蛋白的菌体。向沉淀中加入 1 mL 含有 PMSF 的 PBS (PMSF 终浓度 1 mM), 超声破碎 (工作 3 s, 间歇 7 s, 总工作时间 3 min, 输出功率 45%)。

### 2.2.2 Ni-pulldown(PD)方法

(1) 吸取 100  $\mu\text{L}$  His beads, 加入 1.5 mL 离心管中, 常温, 700 g, 离心 1 min, 去上清。

(2) 向其中加入 1 mL 的 PBS, 常温下, 四维旋转仪混匀 5 min, 700 g, 离心 1 min, 去上清, 重复洗 2 次。

(3) 将 1 mL 携带 His 标签的蛋白裂解液分别加入含有 beads 的 1.5 mL 离心管中, 4 摄氏度, 混匀 1 h, 700 g, 离心 1 min, 去上清。

(4) 用 1 mL 的洗脱液 I 洗脱 beads, 4 摄氏度, 四维旋转仪混匀 5 min, 700 g, 4 摄氏度, 离心 1 min, 去上清, 重复 5 次。

(5) 吸取 20  $\mu\text{L}$  beads, 加入 20  $\mu\text{L}$  2 $\times$ 蛋白上样缓冲液, 100 摄氏度煮沸 5 min, 制备样品, SDS-PAGE 检测带有 his-tag 的蛋白。

(6) 将 1 mL Mga(535-640)裂解液加入剩余的 beads 中, 4 摄氏度, 混匀 1.5 h, 800 g, 4 摄氏度, 离心 1 min, 去上清。

(7) 加入 1.5 mL 洗脱液 II, 4 摄氏度混匀 5 min, 4 摄氏度, 700 g, 离心 1 min, 去上清, 重复 5 次; 加入 80  $\mu\text{L}$  2 $\times$ 蛋白上样缓冲液, 100 摄氏度煮沸 5 min, Western 检测 GST-protein 和 His-proteins。

### 2.2.3 Western Blotting

(1) 30% 丙烯酰胺, 1.5 M Tris (PH=8.8), 0.5 M Tris (PH=6.8) 于 37 摄氏度水浴锅中预热 30 min。

(2) 配胶: 向 50 mL 离心管中依次加入 30% 丙烯酰胺, 1.5 M Tris (PH=8.8), 水, 将三者剧烈混匀, 混匀后向其中加入 10% SDS, 将枪尖没入液面以下, 吹

吸 50 次，然后向其中加入 10% APS（现用现配），将枪尖没入液面以下，吹吸 50 次，最后向其中均匀加入 TEMED，将枪尖没入液面以下，吹吸 50 次，分离胶溶液即配好了，吸取 4 mL 的以上混合液注入夹板后，然后向夹板中缓慢加入 2 mL 的乙醇，室温静置 20 min。倒掉乙醇，向其中加入蒸馏水冲干残余乙醇，将夹板倒置，用枪尖洗干净水分，以同样的方法配好浓缩胶溶液后，将 2 mL 的分离胶溶液注入夹板中，立刻插入梳子，室温放 20 min。（3）跑胶：分离胶 60 V 30 min，浓缩胶 120 V 50 min（保持电流在 20 mA-30 mA 左右）。

（4）转膜：1×转膜液于-80 摄氏度放置 30 min 预冷；将转膜夹子正极的一面朝下，然后依次铺上以下的东西：海绵，三层滤纸，NC 膜，胶，3 层滤纸，海绵；在滤纸上用铅笔标明方向及一抗名称。按照正负极装配好转膜仪，加入转膜液，将转膜仪置于冰中，90 V 90 min。

（5）封闭：膜的正面朝上，在 5%的脱脂奶粉中室温封闭 1 h。

（6）孵育一抗：将封闭后的膜用 TBST 在摇床上轻轻震荡 5 min ×3 次；用 3 mL 1:1000 稀释 mouse anti-GST 于封闭袋中孵育膜，4 摄氏度孵育 12 h。

（7）将膜正面朝上，用 TBST 洗 5 min ×3 次；用 1:10000 稀释的二抗室温孵育膜 1 h。洗膜 5 min ×3 次；然后于暗室中曝光。

#### 2.2.4 BiFC 实验

（1）转染前 24 h 将 293T 细胞传到十二孔板中，至细胞覆盖率达到 60%-70% 时进行转染，转染前 4 h 对细胞进行换液。

（2）X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent 和 DNA 提前放于室温下，DMEM 放置于 37 摄氏度水浴锅中。

（3）上下颠倒混匀 X-treme GENE HP DNA Transfection Reagen，用 DMEM 稀释 DNA（终浓度为 1 μg 质粒/100 μL 培养基；质粒=0.5 μg BiFC 质粒 A+ 0.5 μg BiFC 质粒 B，稀释体积不得小于 100 μL）。

（4）将 1 μL X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent 直接添加至含稀释 DNA 的培养基中，切勿接触到塑料管壁，轻柔混合，室温孵育混合物 10 min。

（5）将转染复合物逐滴加至细胞中，转染 32 小时后，在倒置荧光显微镜下观察荧光。

#### 2.2.5 竞争实验

竞争实验的步骤与以上所描述的 BiFC 的方法相同，加入的质粒不同。

VN-RING1B    YC-Mga    YC-CBX2    CBX7-CFP    H2B-CFP

(117-336)    (535-640)

0.4 $\mu\text{g}$	0.4 $\mu\text{g}$	--	--	--
0.4 $\mu\text{g}$	0.4 $\mu\text{g}$	--	0.2 $\mu\text{g}$	--
0.4 $\mu\text{g}$	0.4 $\mu\text{g}$	--	1 $\mu\text{g}$	--
0.4 $\mu\text{g}$	--	0.4 $\mu\text{g}$	--	--
0.4 $\mu\text{g}$	--	0.4 $\mu\text{g}$	0.2 $\mu\text{g}$	--
0.4 $\mu\text{g}$	--	0.4 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{g}$	--
0.4 $\mu\text{g}$	--	0.4 $\mu\text{g}$	--	--
0.4 $\mu\text{g}$	--	0.4 $\mu\text{g}$	--	0.2 $\mu\text{g}$
0.4 $\mu\text{g}$	--	0.4 $\mu\text{g}$	--	1 $\mu\text{g}$

### 2.2.6 提取 mRNA，并反转录得到 cDNA

(1) 首先准备实验材料：C57BL/6 小鼠，研钵，镊子，药勺（在 0.4 M NaOH 中浸泡过夜，然后在 DEPC 水中浸泡过夜，高温高压灭菌 1 h），液氮，新鲜的干细胞 R1 以及畸胎瘤细胞 F9（细胞数量：铺满六孔板的一个孔）。

(2) 用液氮研磨组织：用断颈法处死 C57BL/6 小鼠，剥离肝脏，心脏，脑，肾，精囊，立即置于液氮中，将冻硬的组织用研钵研磨，整个过程不能化冻，建议研磨 10 min（组织中自带的 RNA 酶是降解 RNA 的主要酶）；对于 R1 及 F9 细胞直接进行第三步即可。

(3) 向研磨后的组织加入一定量的 Lysis buffer 中（1 mL TRK Lysis Buffer 加 20  $\mu\text{L}$  2-mercaptoethanol），颠倒混匀，最大转速，室温离心 5 min，将上清转移至新的 1.5 mL EP 管中；

(4) 加入与 TRK 等量的 70% 乙醇，充分混匀（加入乙醇后，溶液中会有沉淀）；

(5) 将所有溶液加入 HiBind RNA Mini column，10000 g，室温离心 1 min，弃过滤液；

(6) 将柱子放到新的 2 mL 收集管中，加入 300  $\mu\text{L}$  RNA Wash Buffer I，10000 g 室温离心 1 min，弃过滤液；

(7) 向柱子中加入 500  $\mu\text{L}$  RNA Wash Buffer I，10000 g 离心 1 min，弃过滤液；

(8) 将柱子放到新的 2 mL 收集管中，加入 500  $\mu\text{L}$  RNA Washing Buffer II（用乙醇稀释），10000 g 离心 1 min，弃过滤液；

(9) 重复第 7 步，倒掉收集管中的液体，将柱子放到收集管中 10000 g，室温离心 2 min；

(10) 溶解 RNA：将吸附柱转移至干净的 1.5 mL EP 管中，向吸附柱膜中央加入 30-50  $\mu\text{L}$  DEPC-处理的双蒸水，10000 g，室温离心 1 min（若 RNA > 30  $\mu\text{g}$ ，可溶解第二次）。

(11) 参考罗氏 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Kit 04896866 001)的说明书, 将 C57BL/6 小鼠组织: 肝脏, 脑, 肾, 精囊, 心脏中的 RNA 以及干细胞 R1, 小鼠畸胎瘤细胞 F9 中的 RNA, 反转录成 cDNA, 用于后续实验。

### 2.2.7 qPCR

#### (1) qPCR 体系

Components	Volume ( $\mu\text{L}$ )
cDNA	2
Primers (F+R) (2.5 $\mu\text{M}$ )	2
SYBR GreenI (2 $\times$ Mix)	5
ddH <sub>2</sub> O	1

#### (2) qPCR 反应条件

95 °C	10 min	
95 °C	15 s	} 40 cycles
60 °C	30 s	

#### 熔解曲线程序

95 °C	15 s	
60 °C	1 min	} 1 cycles
95 °C	15 s	

#### (3) qPCR 检测 Mga 转录剪切体引物 (引物的名称与图 3-1A 相同)。

Name	Sequence
F1	TTGTTCCAGCAAAAAGGCCAAT
R1	CTGTAAGGGGTTGAGGTGTG
F2	TTTGTTCAGCAAAAAGGCCAA
R2	CGTAGGAGAACCCTGCTGC
F3	TGCAGAACAAGAATTTCCCAGT
R3	ACGGTTTTTCAGTGAAGCCT
F5	ACTCGGTGTGGCTCGAC
R5	ACTCGGTGTGGCTCGAC
F7	CACTCCGCACTCTTCTGCCA
R7	CACTCCGCACTCTTCTGCCA

## 第三章 结果

### 3.1 RING1B 与 Mga(535-640)相互作用的区段

#### 3.1.1 BiFC 实验检测体内 RING1B 与 Mga(535-640)相互作用的区段

为了研究 Mga 在 PRC1.6 中的作用, 我们需要寻找 Mga 与 PRC1.6 其它组分的互作位点, 突变这些位点, 破坏它们之间的相互作用, 从而观察 Mga 对该复合物的形成, 稳定, 靶向机制及功能的影响。前期结果显示 Mga 通过 535-640 aa 与 RING1B 发生互作。本论文通过 BiFC 寻找 RING1B 与 Mga(535-640)发生相互作用的片段, 为下一步得到它们的三维结构提供基础。

在 RCSB Protein Data Bank 中我们通过查找已经发布的具有功能的 RING1B

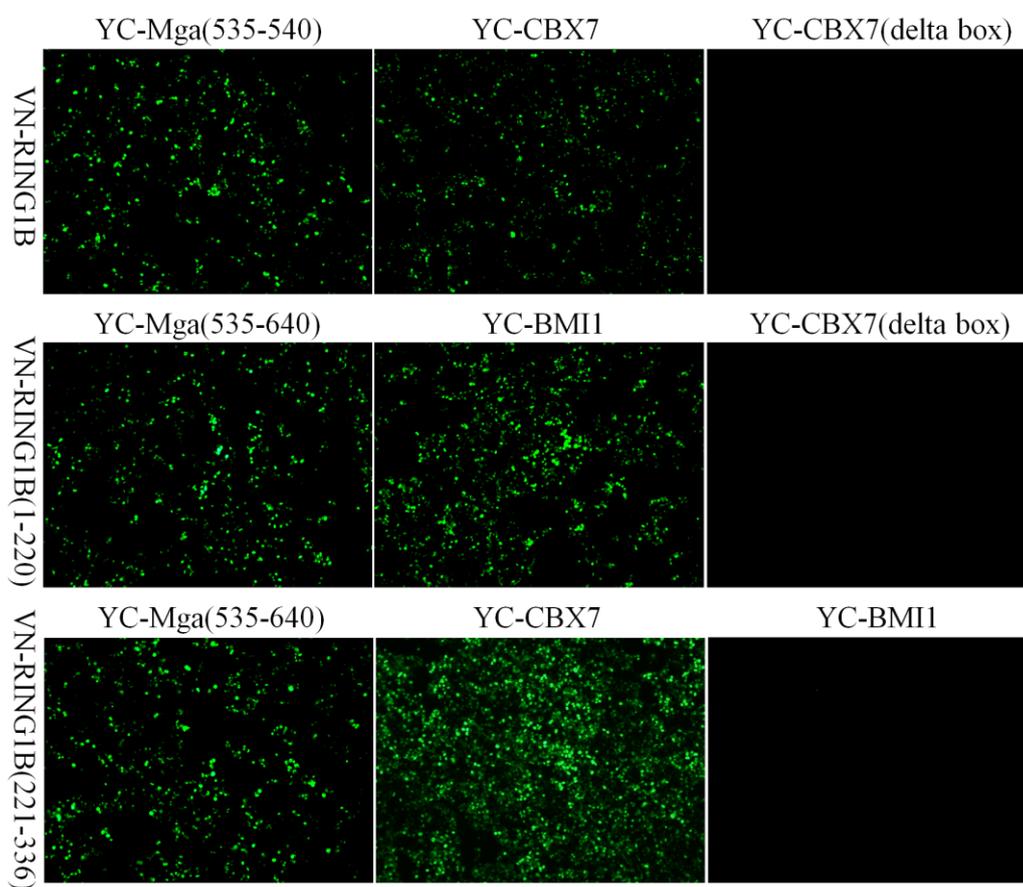


图 3-1 RING1B 的 N 端及 C 端截短体与 Mga(535-640)的相互作用的 BiFC 检测 (中间一列为阳性对照, 右边一列为阴性对照)

Fig 3-1 BiFC analysis of the interaction between the N or C terminus of RING1B and Mga(535-640) (Images in the middle column are positive controls; Images in the right column are negative controls)

截短体,将 RING1B 分成两段,构建 BiFC 质粒:VN-RING1B(1-220),VN-RING1B(221-336),YC-Mga(536-640),然后将每一个 VN-RING1B 截短体质粒和 YC-Mga(536-640)质粒分别组成一对,转染到 293T 中,通过观察荧光信号的强弱判断与 Mga(536-640)相互作用的 RING1B 区段。为了增加实验的可信性,我们设计了阳性对照和阴性对照:CBX7 主要通过 C 端的 Chrombox 结构域(220-251 aa)与 RING1B 发生相互作用<sup>[125]</sup>,故以 CBX7(delta box, d220-251aa)和 RING1B

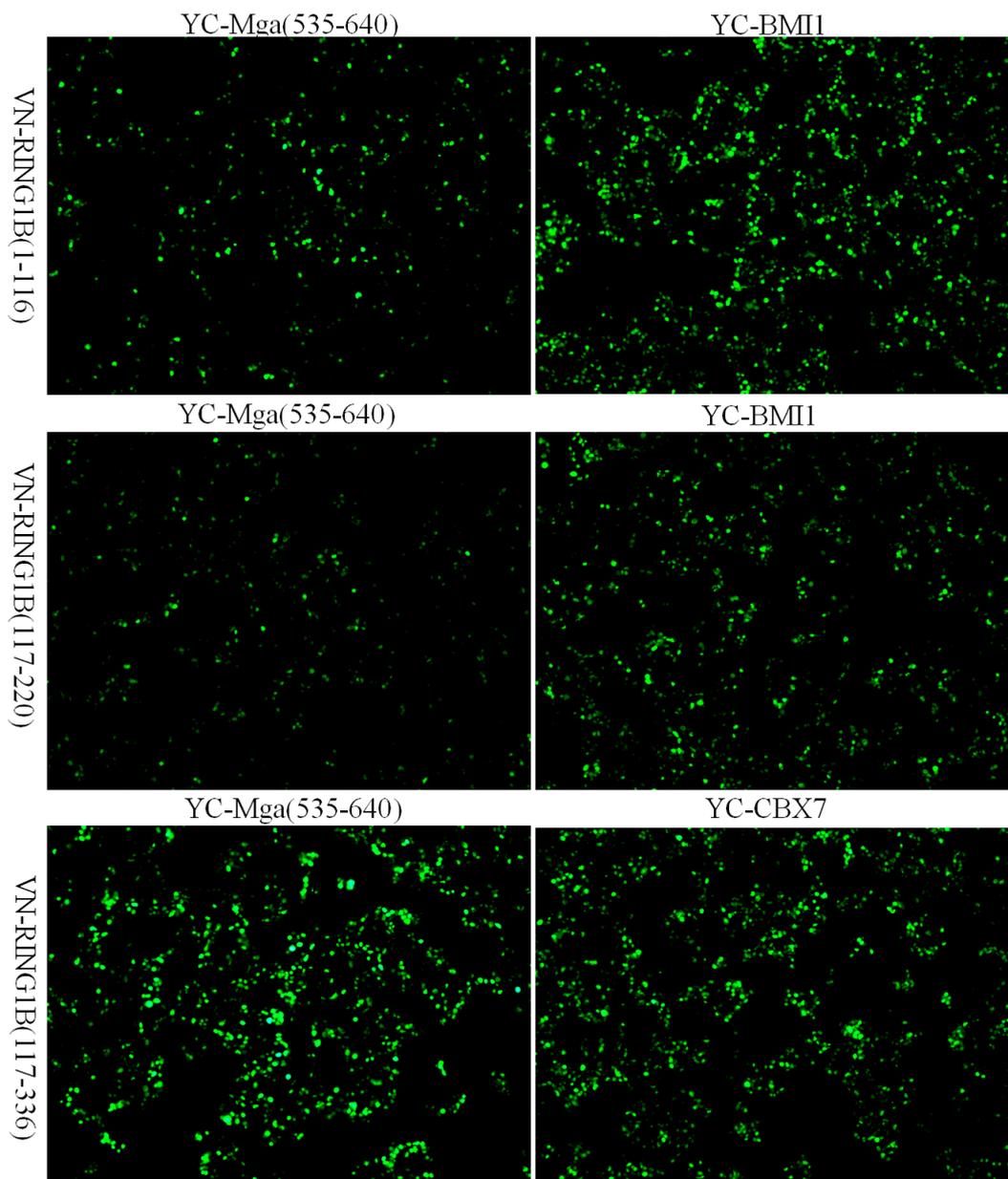


图 3-2 RING1B 截短体(1-220)及 (117-336)与 Mga(535-640)的相互作用的 BiFC 检测(右边一列为阳性对照)

Fig 3-2 BiFC analysis of the interaction between RING1B fragments(1-220) and (117-336) and Mga(535-640) (Images in the right column are positive controls)

的互作作为阴性对照；RING1B 与 CBX7 之间存在相互作用，RING1B 主要通过 N 端与 BMI1 发生相互作用，故以它们的组合作为阳性对照。结果显示 RING1B 的两个截短体，RING1B(1-220)，RING1B(221-336)与 Mga(535-640)都有很强的荧光信号，即它们都可以与 Mga(535-640)发生相互作用（如图 3-1）。

我们将 RING1B(1-220)再次切分，构建载体 VN-RING1B(1-116)，VN-RING1B(117-220)，VN-RING1B(117-336)。阳性对照的结果显示：这三个截短体均具有功能活性，证实我们的结果可信。实验组中 RING1B(117-336)与 Mga(535-640)的信号明显强于 RING1B(1-116)，RING1B(117-220)（如图 3-2）。

图 3-1 和图 3-2 的结果证实 RING1B 主要通过 C 端与 Mga(535-640)发生相互作用。

### 3.1.2 竞争实验验证体内 RING1B 与 Mga (535-640)相互作用的区段

Wang 等人的蛋白互作三维图表明 RING1B 通过 C 端与 CBX7 发生相互作用<sup>[125]</sup>。我们的 BiFC 结果得到与之相同的结论。图 3-3 显示 CBX7 与 RING1B(117-336) 有很强的荧光信号，同 Mga(535-640)与 RING1B 的作用区段相同。如此它们之间应该存在竞争关系。

为了进一步证实 BiFC 实验得到的 RING1B 主要通过 C 端与 Mga(535-640)发生相互作用的结论，我们设计了竞争实验。将两个通过互作能够产生 BiFC 信号（在本实验中为 Venus 信号）的质粒共转染到细胞中，随着梯度增加第三个竞争质粒（在本实验中为带 CFP 标签的质粒）的量，观察是否有竞争质粒取代其中一个 BiFC 质粒而与另一个 BiFC 质粒作用而导致 Venus 信号衰减的现象产生。为了检测该竞争实验系统的可行性和特异性，我们分别设计了两个对照组：其中 CBX2 和 CBX7 在与 RING1B 的结合上存在竞争关系因而作为系统正对照，而

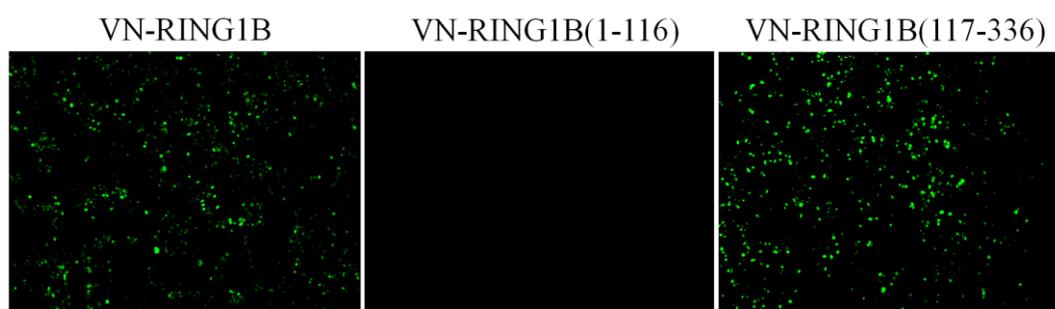


图 3-3 RING1B 截短体(1-116)及(117-336)与 CBX7(YC-CBX7)的相互作用的 BiFC 检测

Fig 3-3 BiFC analysis of the interaction between RING1B fragments(1-116),(117-336) and CBX7

CBX2 和 H2B 之间在与 RING1B 的结合上没有已知的竞争关系作为负对照。如

图 3-4 所示，两个正负对照的实验结果符合预期，即随着 CBX7-CFP 竞争质粒的增加，CBX2 与 RING1B(117-336)之间产生的 BiFC/Venus 的信号逐渐减少；而 H2B-CFP 竞争质粒的增加则对该信号不产生负效应（图中信号的增强实际为 CFP 信号过 YFP/Venus 通道产生的荧光干扰，CFP 通道的结果未在此处展示）。在此基础上，我们的实验组 VN-RING1B(117-336)与 YC-Mga(535-640)之间的

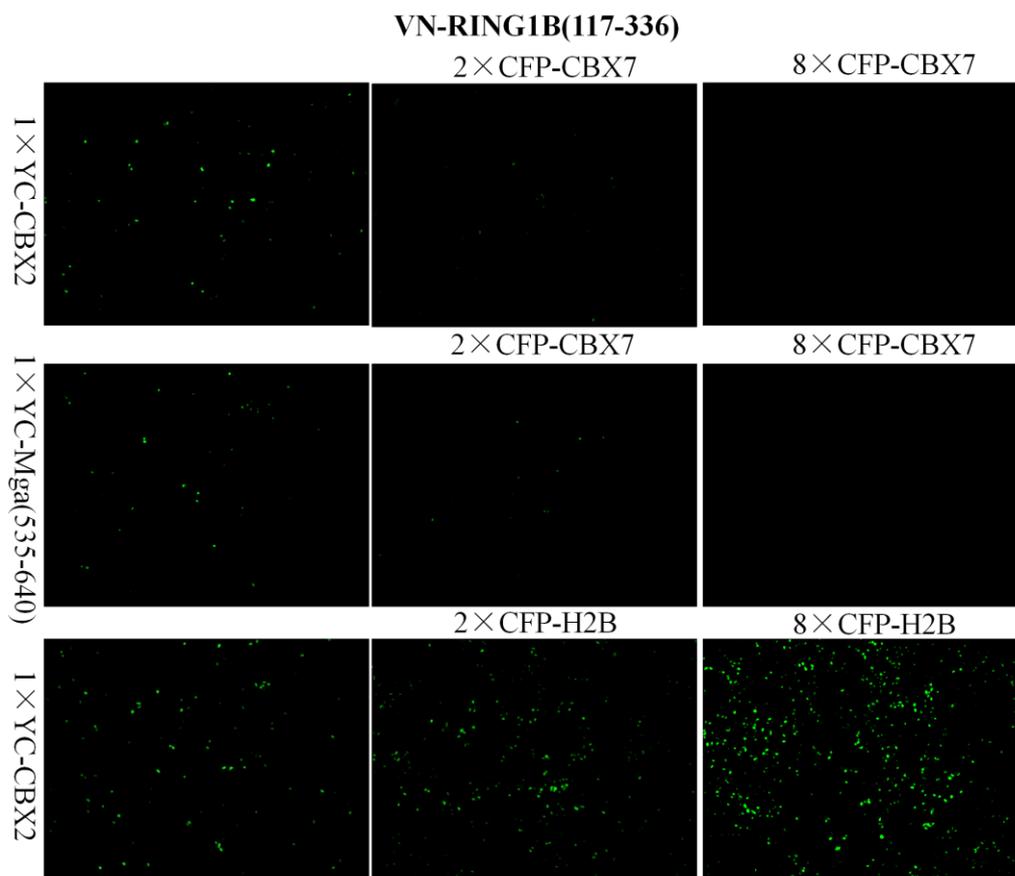


图 3-4 CBX7 和 Mga(535-640)竞争结合 RING1B(117-336)(左边一列:VN-RING1B(117-336)分别与如图左侧所标注的 YC-融合蛋白表达质粒共转染到 293T 细胞中，质粒浓度是图 3-3 的 1/2; 中间及右边一列:在此基础上共转染相对于 VN/YC-蛋白表达质粒的 2 倍及 8 倍剂量的表达 CFP-融合蛋白的竞争质粒)

Fig.3-4 CBX7 and Mga(535-640) compete for RING1B(117-336)(The left column: plasmids expressing VN-RING1B(117-336) and indicated YC-proteins were co-transfected into 293T cells.

The amount of plasmids used in this experiment was half comparing to the dose used in the experiments shown in Fig 3-3.The middle and right columns: a competitor plasmid expressing indicated CFP-protein was cotransfected together on top of the pair used in the left column. The amount of competitor plasmid used was twice or 8 times more comparing to the corresponding VN/YC-protein expressing plasmids cotransfected. )

BiFC 信号随着竞争质粒 CBX7-CFP 的增加而逐渐减弱,说明 CBX7 和 Mga(535-640)与 RING1B 的 C 端存在竞争结合的关系,意味着在细胞中二者分别与 RING1B 发生互作形成不同的 PRC1 的复合体亚型。再次验证了 BiFC 得到的结果。

### 3.1.3 体外检验 RING1B 与 Mga(535-640)相互作用的区段

前面 BiFC 和竞争实验验证在体内 RING1B 通过 C 端与 Mga(535-640)发生相互作用。随后用 Ni-pulldown (PD)的方法在体外检验 RING1B 截短体与 Mga(535-640)之间是否存在相互作用。

首先构建了一系列实验所需的质粒 pET28a-his-RING1B, pET28a-his-RING1B(1-220), pET28a-his-RING1B (221-336), pET28a-his-RING1B (1-116), pET28a-his-RING1B(117-220)。实验中用到另外两种质粒 pET-28a-his, pGEX-6P-1-GST-Mga(535-640)为本实验保存。将这些质粒转化到相应表达菌株中诱导蛋白表达, SDS-PAGE 检测蛋白的表达情况,图 3-5A 显示所有的蛋白均可诱导出来了(His 标签蛋白本身过小,且不稳定,故没有诱导条带)。

在相同的诱导条件下,扩大诱导的菌体量,超声后最大转速离心,收集上清, SDS-PAGE 检测蛋白的可溶性(结果未呈现)。发现除 RING1B(1-116),其余蛋白均可溶。为了增加 RING1B(1-116)的可溶性,我们尝试改变它的表达菌株,表达条件,发现其余条件均不适合该蛋白的表达(如图 3-5B)。后期我们准备尝试更换 RING1B(1-116)的载体,提高其蛋白可溶性。

用这几种可溶蛋白进行 Ni-pulldown(PD)实验,首先将 His, RING1B, RING1B(1-220), RING1B(221-336), RING1B(117-220)蛋白与 His beads 孵育,洗去未结合的蛋白,然后与 GST-Mga(535-640)蛋白裂解液混合反应,洗去未结合的蛋白,蛋白上样缓冲液处理 beads,得到最终样品。图 3-5C 上半部分利用 His 抗体检测 His 标签蛋白,发现每种含 His 标签的蛋白都可以很好的吸附在 beads 上。下半部分则利用 GST 抗体检测各个 His-proteins 捕获 GST-Mga(535-640)的能力。图 3-5C 的第 2 道为阳性对照,结果显示 RING1B 可以有效的捕获 Mga(535-640)。第三道为阴性对照,His 标签蛋白与 Mga(535-640)之间无相互作用, WB 信号显示 GST-Mga(535-640)的信号非常弱(可能是因为洗脱过程中,没有洗脱干净)。第二道和第三道的 anti-GST WB 结果证实 Pull down 系统是可行的。第四道中 RING1B(1-220)比 RING1B 多,但是其捕获到的 GST-Mga(535-640)不如 RING1B 多。第五道中 RING1B(221-336)比 RING1B(1-220)少,但是它们捕获到的 GST-Mga(535-640)相差不大。第六道中 RING1B(117-220)比其它蛋白都多,但是它捕获到的 GST-Mga(535-640)和阴性对照相同,故认为这是背景。综上所述, RING1B(117-220)与 Mga(535-640)无相互作用, RING1B(221-336)与 RING1B

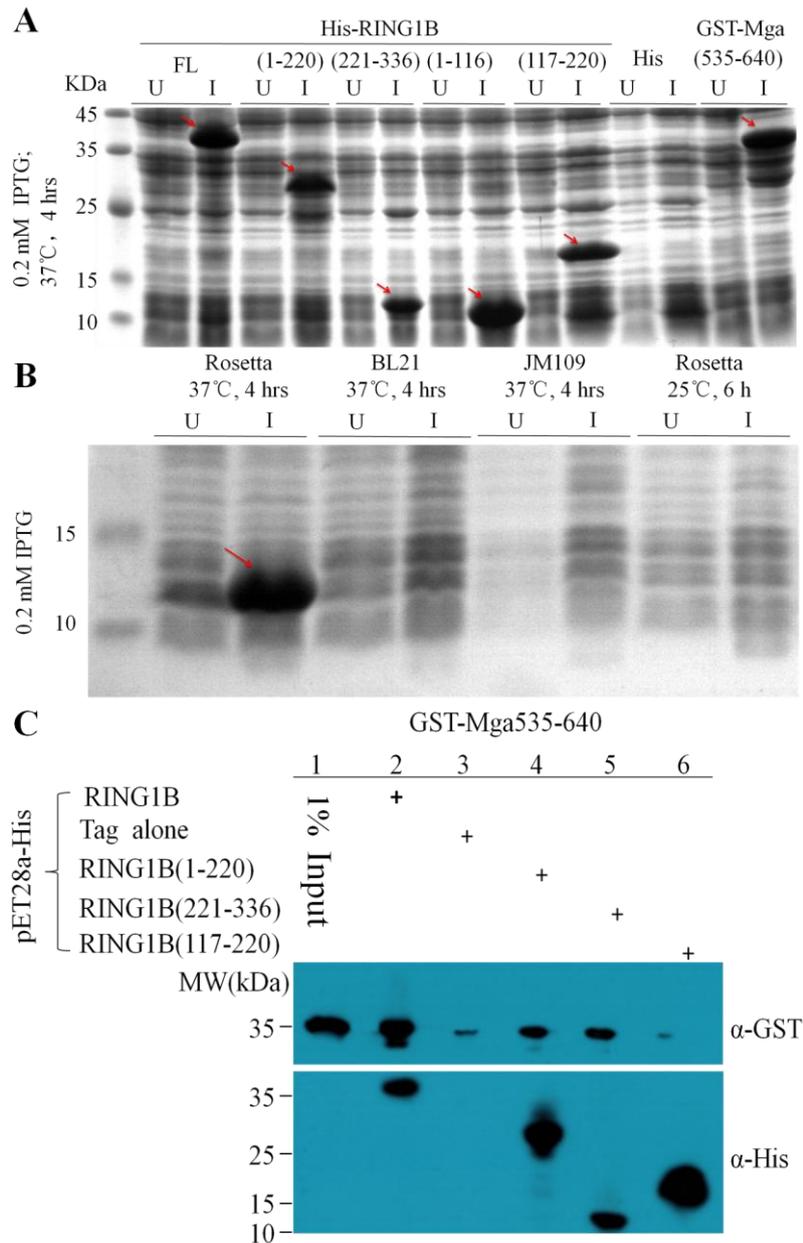


图 3-5 RING1B 与 Mga(535-640)的作用区段

A.His-proteins 和 GST-Mga(535-640)的表达情况； B.His-RING1B(1-116)的诱导条件； C. Ni-pulldown 检测 His-proteins 与 GST-Mga(535-640)的相互作用。(U: 未诱导； I: 诱导； FL: 全长)

Fig.3-5 The fragments of RING1B interact with Mga(535-640)

A.The expression of His-proteins and GST-Mga(535-640).B.The condition of inducing His-RING1B(1-116) protein. C. Ni-pulldown (PD) tests the fragments of RING1B interacting with Mga(535-640). (U:uninduced; I:induced; FL:full length)



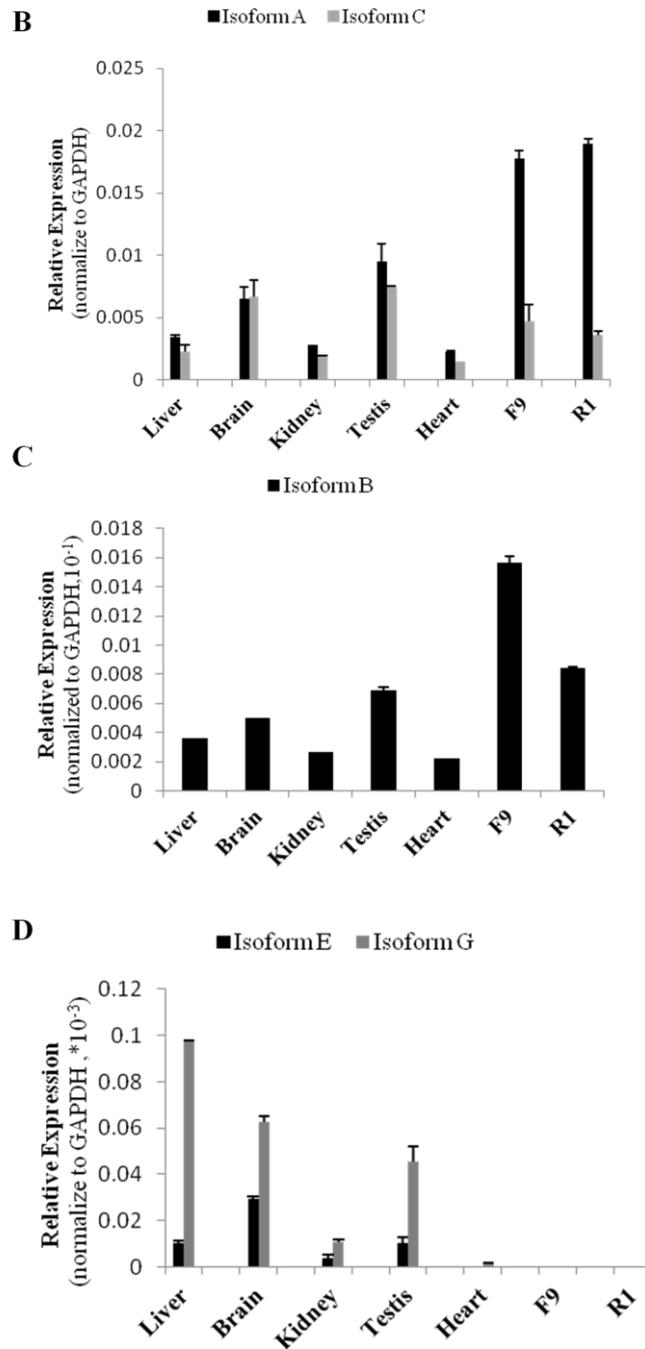


图 3-6 Mga 转录剪切变体在小鼠组织及细胞中的表达情况

A.Mga 的几种变体 RNA (UCSC Genome Browser: GRCm38/mm10) 图中显示了各个剪切体特异引物的位置 (红色箭头); B-D. Mga 转录剪切体 Isoform A 和 C , Isoform B, Isoform E 和 G 在小鼠各个组织及细胞系中的表达;

Fig.3-6 The expression of Mga splicing variants in mouse tissues and cells

A. The isoform of Mga RNA(UCSC Genome Browser: GRCm38/mm10). it shows the specific primer for each Mga isoform (Red arrow). B-D. The expression of Isoform A and C , Isoform B , Isoform E and G in mouse tissues and cells.

(1-220)和 Mga(535-640)都有相互作用,但是 RING1B(221-336)与 Mga(535-640)的作用强于 RING1B(1-220)。所以在 RING1B 主要通过 C 端与 Mga(535-640)发生直接相互作用。

### 3.2 Mga 转录剪切变体的表达分析

目前,有关 Mga 转录剪切体在组织及细胞中的表达情况还不是很了解,故收集了 UCSC Genome Browser: GRCm38/mm10 数据库中 Mga mRNA 剪切体及其对应的截短体蛋白的信息,整理比较它们的异同作成图 3-6A。结果显示目前在 C57BL/6J 小鼠中共发现 7 种 Mga mRNA 剪切体,本文将它们定义为 Isoform(A-G),它们均表达蛋白,其中 Isoform D 和 Isoform E 表达同一种蛋白。Isoform A 是小鼠中最大的一个 Mga mRNA 剪切体,含有 24 个外显子,共表达 3042 个氨基酸。Mga 的保守结构域 T-domain 位于第 2 个外显子, bHLHZip 结构域位于第 20 和 21 个外显子,研究中涉及的 Mga 535-640aa 位于第 3 个外显子。其余剪切体表达的蛋白均为该蛋白的一部分。其中 Isoform C, Isoform D, Isoform E 不包含 bHLHZip 结构域, Isoform F 这三段序列均没有, Isoform G 不包含 T-domain 以及 Mga 535-640aa。随后为这几种转录剪切体设计特意引物(Isoform D, Isoform F 不存在特异引物,故没有结果),检测小鼠组织及两种细胞系中它们的相对表达量(如图 3-6 B, C, D; 由于各种变体相对表达量差异较大,结果采取了分别做图的展示形式,注意各个图的纵坐标标注)。结果显示这几种组织中 Isoform A, B, C 在睾丸中的表达量最高,说明 Isoform A, B, C 可能在睾丸中起着重要的作用。几种剪切体之间进行比较,发现在小鼠胚胎干细胞 R1 及小鼠畸胎瘤细胞 F9 中 Isoform A 的表达量明显高于其余的变体。在这几种组织中 Isoform A 和 C 的表达量高于 Isoform B, 更远远高于 Isoform E 和 G。

### 3.3 PRC1.6 与精子发生过程相关

根据前言背景介绍我们了解到 PRC1.6 的很多组分与精子发生有着或多或少的联系<sup>[34,59,69,71,76]</sup>。前期工作中,构建了 Mga KD 的干细胞,微阵列分析比较 Mga 敲低前后基因的表达量,发现有 158 种基因的表达发生变化( $\log_2 > 1$ ),其中上调的有 130 种基因。我们运用 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 对这 130 种基因的功能进行分析得到图 3-7。发现它们大多与细胞周期,生殖系统的发育,胚胎发育,器官发育等过程相关,其中参与生殖系统的发育的基因位列第二。随后我们用 Gene Ontology (GO) 对上调幅度最大的 10 个基因的功能进行分析,发现它们与配子生成,减数分裂,精子发生等过程相关(如图 3-7)。

以上的这些分析结果说明 Mga 很可能与 PRC1.6 的很多组分一样, 参与精子发生及减数分裂过程。且它们可能以 PRC1.6 的形式调控精子发生过程。

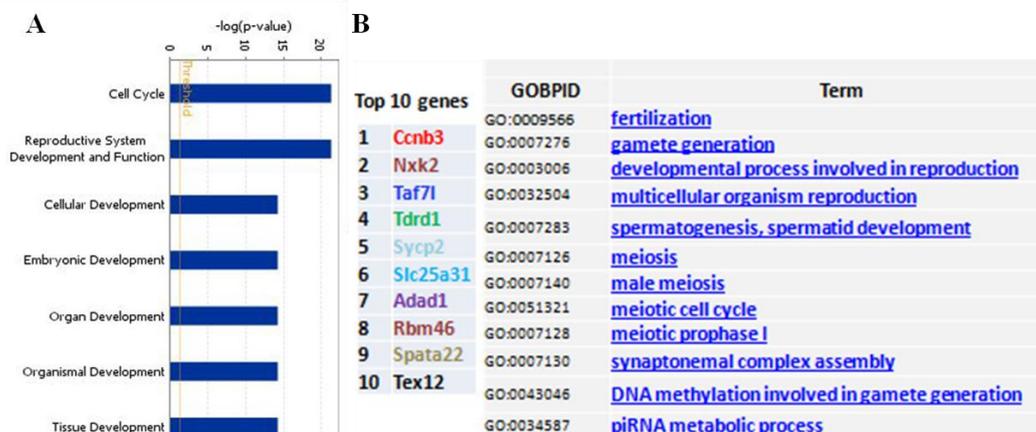


图 3-7 Mga 敲低后上调基因的功能

A. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 按照功能将 Mga 敲低后上调的基因进行分类; B. GO biological process 分析 Mga 敲低后上调幅度最大的十个基因参与的生理过程。

Fig.3-7 The function of genes upregulated upon Mga Knockdown

A. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) classified the genes upregulated upon Mga Knockdown according to the function. B. GO biological process analysis of the top ten genes upregulated upon Mga.

为此我们将 PRC1.6 的组分 PCGF6, L3MBTL2, RING1B 敲低/敲除后, 干细胞中上调的及基因<sup>[12,134,203]</sup>, 与 Mga 敲低后上调的基因进行比较得到表 3-1。结果显示它们共同抑制某些与精子发生相关的基因。这说明 Mga 可能以 PRC1.6 的形式在精子发生过程中起着一定的作用。

表 3-1 干细胞中 PRC1.6 的组分敲低/敲除后上升的基因 (+ 代表 PRC1.6 的组分敲低/敲除后上升的基因中包含该基因; \*代表由于实验方法及实验材料的影响导致的数据缺失。)

Table.3-1 The genes upregulated after components of PRC1.6 KD/KO in stem cells.(+ represents the gene involved in genes upregulated after components of PRC1.6 KD/KO. \* represent the missing dates result form the different methods and materials)

Genes	Term	Mga KD	Pcgf6 KD <sup>[134]</sup>	L3mbtl2 KO <sup>[12]</sup>	Ring1b KO <sup>[203]</sup>
Mael	GO:0007127:meiosis I	+	+	+	*
Tdrkh	GO:0007127:meiosis I	+	+	+	+
Piwil2	GO:0051445:regulation of meiotic cell cycle	+	+	+	*
Asz1	GO:0007283:spermatogenesis	+	*	*	+
Taf7l	GO:0007281:germ cell development	+	+	+	*
Meil	GO:0007141: male meiosis I	+	*	+	*
Boll	GO:0007126:meiotic nuclear division	+	+	+	+

续表 3-1 干细胞中 PRC1.6 的组分敲低/敲除后上升的基因

<b>Tex13</b>	GO:0007283:spermatogenesis	+	+	+	*
<b>Ddx4</b>	GO:0007141: male meiosis I	+	+	+	*
<b>Hormad1</b>	GO:0007283:spermatogenesis	+	*	*	+
<b>Stra8</b>	GO:0051445:regulation of meiotic cell cycle	+	*	+	*
<b>Dmrtc2</b>	GO:0007281:germ cell development	+	*	+	*
<b>Dazl</b>	GO:0051445:regulation of meiotic cell cycle	+	*	+	*
<b>Brdt</b>	GO:0007127:meiosis I	+	*	+	*
<b>Dmrt1</b>	GO:0051445:regulation of meiotic cell cycle	+	*	+	+
<b>Asz1</b>	GO:0007283:spermatogenesis	+	*	*	+

## 第四章 结论

本论文主要研究了 Mga 在多梳抑制复合物 PRC1.6 与核心组分 RING1B 的互作关系，其自身的表达及调控，及其在 PRC1.6 复合体中担任的角色。

➤BiFC 实验证实在体内 RING1B 主要通过 C 端 117-336aa 与 Mga(535-640)发生相互作用。

➤竞争实验证实 CBX7 与 Mga(535-640)竞争结合 RING1B(117-336)，侧面验证了 BiFC 的结果。

➤Ni-pulldown (PD) 实验证实在体外 RING1B 的 C 端 221-336aa 与 Mga(535-640)具有强的直接相互作用。

➤R1 及 F9 两种细胞系中全长 Mga 的表达量明显高于其余的变体。在肝脏，大脑，肾脏，睾丸，心脏这五种组织中 Isoform A 和 C 的表达量高于 Isoform B，更远远高于 Isoform E 和 G。且 Isoform A, B, C 在睾丸中的表达量最高。

➤Mga 可能以 PRC1.6 的形式在精子发生过程中起着一定的作用。

## 第五章 讨论与展望

Mga 是一种双特异的转录因子, 全长 Mga 含有 3042 个氨基酸, 包含两个保守的结构域 bHLHZip 和 T-domain。它在维持胚胎干细胞的多能性及胚胎发育早期起着重要作用。但是由于 Mga 全长蛋白过大, 目前有关它的了解非常少, 其与 PRC1.6 其他组分之间的互作关系, 自身的表达及调控及其在 PRC1.6 复合体中担任的角色等尚无报道。

我们实验室前期研究 PRC1 组分相互作用的过程中, 质谱分析结果发现了一种大的蛋白 Mga, 推测 Mga 可能是 PRC1 的一个组分。2002 年 Hidesato 等在研究 E2F6 时发现一种复合物, 包括 RING1B, L3MBTL2, HP1r, E2F6, Dp-1, MAX, MGA, PCGF6, YAF2, G9a, EuHMTase<sup>[5]</sup>。2012 年 Gao 等人在 293T 中发现并命名了 PRC1.6, 组分包括 RING1B, L3MBTL2, HP1r, E2F6, Dp-1, WDR5, MAX, MGA, HDAC1/2, PCGF6, RYBP<sup>[4]</sup>。这两种复合物均为含有 Mga 的 PRC1 与我们的前期结果相同。尽管不同的研究中含有 Mga 的多梳抑制复合物的组成成分有一些差别, 但是其核心组分是不变的, 本实验主要以 Gao 等人研究结果中 PRC1.6 的组成成分为准。PRC1.6 作为非典型的多梳抑制复合物, 目前有关其结构和功能的研究非常少。

我们的前期结果证实 Mga 主要通过 535-640aa 与 RING1B 发生相互作用, 我们通过 BiFC 实验证实 RING1B(1-220)和 RING1B(221-336)与 Mga(535-640)都有相互作用。但是当 RING1B(1-220)分成两段 RING1B(1-116)和 RING1B(117-220), 它们与 Mga(535-640)互作信号减弱(阳性对照显示这两个截短体可正常表达的)。而 RING1B(117-336)与 Mga(535-640)的作用则很强。说明 RING1B 主要通过 117-336aa 与 Mga(535-640)发生相互作用, RING1B(117-220)与 Mga(535-640)的互作较弱, 可能因为 117-220aa 破坏了 117-336aa 与 Mga(535-640)发生互作的结构域导致的。实验中的阳性及阴性对照结果与 PDB 网站上蛋白互作三维结构蛋白互作区段相同。如 Buchwald 等人通过 X 射线衍射得到的结构图, RING1B 主要通过 N 端与 BMI1 的 N 端发生过相互作用<sup>[212]</sup>, 我们的 BiFC 结果显示 RING1B 的 N 端与 BMI1 的荧光强度明显强于 RING1B 的 C 端与 BMI1 的信号(结果未呈现)。同样的 X 射线衍射得到的三维结构中显示 RING1B 主要通过其 C 端与 CBX7 的 C 端相互作用<sup>[125]</sup>, BiFC 实验中 RING1B 与 CBX7 的 C 端的信号明显强于 N 端。

多梳蛋白 CBX 与 RING1B 的主要作用区段同 Mga(535-540)与 RING1B 的作用区段相同。由于空间位阻, 它们之间一定会产生竞争作用, 竞争实验结果也证

实了这一点。意味着在细胞中二者分别与 RING1B 发生互作形成不同的 PRC1 的复合体亚型。

我们的 Ni-pulldown (PD) 结果显示 RING1B(221-336)与 RING1B(1-220)和 Mga(535-640)都有相互作用,但是 RING1B(221-336)与 Mga(535-640)的作用强于 RING1B(1-220)。RING1B(117-220)与 Mga(535-640)无相互作用。所以 RING1B 主要通过 C 端与 Mga(535-640)相互作用。以上已有的这些数据与我们上面 BiFC 的结果相符。目前该实验中还缺乏 RING1B(1-116)及 RING1B(117-336)与 Mga(535-640)的 Ni-pulldown (PD)数据。由于 RING1B(1-116)形成包涵体,蛋白存在与沉淀中,我们改变了诱导条件后,没有任何改进,故下一步准备更换 RING1B(1-116)的载体。

在 C57BL/6J 小鼠中发现 7 种 mRNA 剪切体,表达 6 种不同的蛋白(Isoform D 和 Isoform E 表达的蛋白相同)。Isoform A 是全长 Mga 的转录剪切体,含有 24 个外显子,共表达 3042 个氨基酸。其余剪切体表达的蛋白只含该蛋白的一部分,可能只行使该蛋白的某一功能。我们检测了小鼠各个组织及两种细胞系中 Mga mRNA 剪切体的表达情况,发现在小鼠胚胎干细胞 R1 及小鼠畸胎瘤细胞 F9 中全长 Mga 的表达量明显高于其余的变体。在肝脏,大脑,肾脏,睾丸,心脏这五种组织中 Isoform A 和 C 的表达量高于 Isoform B,更远远高于 Isoform E 和 G。且 Isoform A, B, C 在睾丸中的表达量最高, Isoform E 和 G 在睾丸中的表达量并不高。说明 Isoform A, B, C 可能在睾丸中起着重要的作用。

本文对前期结果中微阵列分析得到的 Mga 敲低前后变化的基因进行了分析。158 个变化的基因中 130 个基因表达上调。这 130 个基因与细胞周期,生殖系统的发育,胚胎发育,器官发育等过程相关,其中与生殖系统的发育相关的基因为第二大类基因。上调的基因中有 33% 的基因与精子发生相关。上调幅度最大的 10 个基因与配子生成,减数分裂,精子发生等过程相关,说明在干细胞中 Mga 直接或间接抑制与精子发生及减数分裂相关的基因。

Mga 是 PRC1.6 复合物的一个组分。目前有关 PRC1.6 功能的报道非常少,但是它的很多组分与精子发生有着或多或少的联系。E2F6, CBX3 的敲除使得精子生成缺陷<sup>[34,59]</sup> RYBP, L3MBTL2 的敲除会导致生殖特异性基因表达上调<sup>[71,76]</sup>。WDR5 在秀丽线虫中抑制与精子生成相关基因的表达<sup>[69]</sup>。这些说明该复合物很可能在精子发生中起着重要的作用。

本文通过对干细胞中 Mga 以及 PRC1.6 的组分 Pcgf6, L3mbtl2, Ring1b 敲低或敲除后上调的基因这些已经公布的数据进行分析<sup>[12,134,203]</sup>,发现它们有很多重叠基因,很多与精子发生相关。其中 L3mbtl2 和 Mga 敲低/敲除后上调的基因

中, 重复基因占据了 Mga 总上调基因数目的 30%, 而这 30% 的基因中有 20% 的基因是与精子发生相关的基因。且 L3MBTL2 敲除后表达量上升幅度最大的 12 个基因中有 7 个在生殖细胞中起着重要作用<sup>[12]</sup>。Jinzhong 等人通过 ChIP-Seq 及基因芯片技术结果表明 L3MBTL2 蛋白抑制并且靶向这些与精子发生相关的基因。David classification tool 对 L3MBTL2 的靶基因进行分类, 其中第三大类基因就是与精子发生相关的基因, 且在精子发生相关的靶基因上发现了 H3ac 和 H4ac, 而 L3MBTL2 敲除后这些修饰增加, 这可能是 PRC1.6 复合物中乙酰转移酶 HDAC1 的缺失导致的<sup>[12]</sup>。而 H3K9me2 也存在于所有 L3MBTL2 的靶基因上, 并且随着 L3MBTL2 的敲除而缺失, 这可能与 PRC1.6 的另一种因子 G9a 的功能相关。故我们推测 Mga, Pcgf6, L3mbtl2, Ring1b 等因子在干细胞中形成复合物 PRC1.6, 直接靶向并抑制精子发生相关的基因。而 Jinzhong 等人通过对已经发现的 PRC1 和 PRC2 的靶基因进行总结, 发现在干细胞中经典的 PRC1/2 并不靶向精子发生相关的基因, 由 PRC1.6 抑制精子发生相关基因的表达<sup>[12]</sup>。但有研究证实在精母细胞粗线期后期 PRC1 在 XY 小体上的量减少, 伴随着 XY 小体上 H3K9me2 的修饰增加, 这两种变化对于维持粗线期精母细胞的存活非常重要<sup>[138]</sup>。另一项研究发现在精子中存在的 H3K27me3 标记, 它的形成与 PRC2 中甲基转移酶有关<sup>[176]</sup>。这可能是因为经典的 PRC1, PRC2 以及 PRC1.6 以不同的方式在精子发生过程中起作用。

为了研究包含 Mga 的 PRC1.6 在精子发生过程中的作用, 我们需要构建一个包含精子发生过程的实验模型。比较体外诱导精子发生的模型<sup>[193-196,202]</sup>, 我们发现王教授实验组的方法比较简单且耗时短, 故我们准备参考王立新教授的方法在体外将干细胞诱导成精子, 实验流程如图 5-1, 然后以此为实验材料探索包含 Mga 的 PRC1.6 在其中的功能。该实验主要通过 mESC 中表达外源的 *Dazl* 来实现将干细胞定向分化到精子的目的<sup>[196]</sup>, 首先我们通过 qPCR 检测了 *Dazl* 在小鼠一些组织中的表达量, 发现它在睾丸中的表达量最高, 故我们从小鼠睾丸中提取组织 RNA, 然后通过特异的引物反转录得到了 *Dazl* 的 cDNA, 将该 cDNA 克隆到可在真核细胞中诱导表达外源基因的 pTRIPZ 质粒中, 形成 pTRIPZ-*Dazl*-Venus-flag 及 pTRIPZ-*Dazl*-flag 质粒。由于我们需要构建稳转 *Dazl* 的干细胞, 所以我们用 qPCR 检测了干细胞 R1 中的 *Dazl* 表达量, 发现 *Dazl* 在干细胞中就有一定的表达, 但是表达量比较少, 说明干细胞向精子发生的方向分化, 需要 *Dazl* 的表达量达到更高的丰度。接着我们用 pTRIPZ-*Dazl*-venus-flag 和 pTRIPZ-*Dazl*-flag 的病毒感染 mESC 细胞, 用 Puro 筛选细胞, 构建稳转 *Dazl* 的干细胞系, 目前正在筛选细胞中。

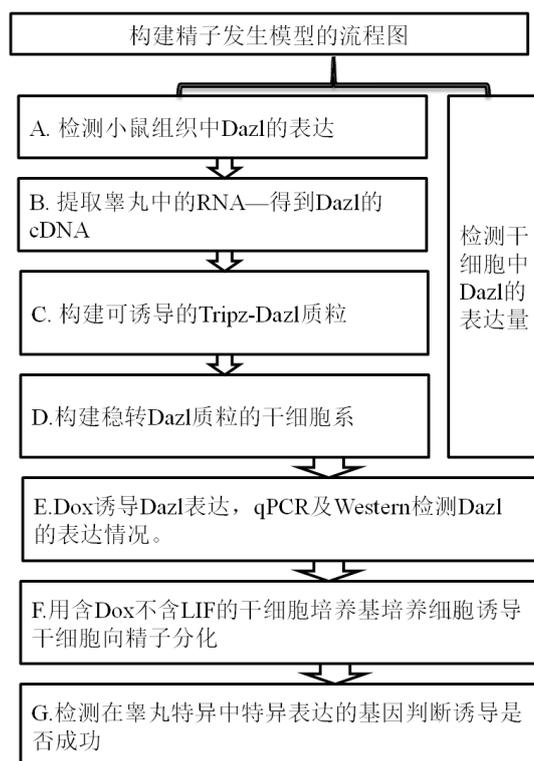


图 5-1 将过表达 Dazl 的干细胞诱导成精子的流程图

Fig.5-1 The flow chart of inducing stem cell to sperm

上面的系统构建成功后,则需要结合我们前面有关 RING1B 与 Mga(535-640) 相互作用区段的研究。下一步我们需要将 RING1B 的 C 端进一步切分, 将它与 Mga(535-640)相互作用的区段缩小至 50aa-100aa, 然后得到这两种蛋白的互作三维模型, 突变 RING1B 上与 Mga 作用的位点, 从而特异的破坏 PRC1.6, 观察它对干细胞诱导成精子这个过程所产生的影响。而我们之所以要特异的破坏 PRC1.6 是因为: 一方面 Mga 的敲低会导致干细胞的分化甚至死亡; 另一方面该复合物中的很多组分与精子发生有关, 而它们除了可以形成 PRC1.6 发挥功能外, 还可以形成其它的复合物, 我们无法确定最后产生的影响是由于 PRC1.6 引起的。

除了特异的破坏 PRC1.6 外, 我们还可以在该系统中过表达 Mga, 观察它对精子发生过程的影响。但是我们的前期结果显示: 由于 Mga 蛋白过大, 构建过表达 Mga 的稳转细胞系失败, 我们知道在小鼠中 Mga 共存在 7 种变体, 除了 Isoform A, 其它的变体均缺少一部分结构, 导致其功能也缺少, 而 Isoform C 在睾丸中的表达量很高, 它可能在精子发生过程中起着重要作用。我们可以利用这一点, 在该精子发生系统中表达 Isoform C, 观察它对精子发生的影响。

随着 CRISPR-Cas9 方法的广泛应用, 我们可以利用该技术观察 Mga 在精子发生过程中的表达情况。首先利用 CRISPR-Cas9 的 konckin 技术将 YFP 插入到

稳转了 Dazl 的干细胞中 Mga 基因的前部, 在基因组上修饰 Mga 基因, 表达 YFP-Mga, 然后加入 Dox 诱导 Dazl 表达 (在不含 LIF 的条件下培养), 细胞开始向精子分化, 在高倍显微镜下通过观察荧光信号来确定各个类型细胞中 Mga 的表达情况。

目前我的实验结果均只是为研究 PRC1.6 在精子发生过程中的作用提供了一些基本的实验材料, 并没有得到具体的实验成果, 但是在此基础上, 可以大肆展开研究, 除了研究 PRC1.6 在精子发生过程中的功能及分子机制, 还可以进行其它方面的研究, 它们之间并不冲突, 反而是相辅相成的。

Mga 蛋白作为一种新发现的大蛋白, 目前有关它的了解比较少, 我们可以在我们实验室已有的研究基础, 对它进行进一步的研究, 增加对它的了解。由于 Mga 含有 bHLHZip 故它可能如 MAX 互作网络中的其它蛋白一样, 在细胞周期中起着作用。敲低干细胞中的 Mga 后导致细胞分化及死亡, 这说明 Mga 对于维持细胞的干性起着重要作用<sup>[84]</sup>。很多实验均证实在高度分化的细胞存在 Mga<sup>[4,5,6]</sup>。敲低高度分化的细胞中的 Mga 会产生什么结果, 目前还没有了解。故我们可以敲低 293T 中的 Mga 后, 观察细胞的生长状况, 确定它是否会死亡。首先将可诱导的 Mga shRNA (实验室已有) 转染到 293T 中, 收集病毒, 感染 293T, 通过药物筛选得到稳转细胞, 然后 Dox 诱导 shRNA 表达, 观察细胞的生长状态是否有变化。然后向诱导后的细胞中瞬时转染全长 Mga, 观察细胞状态看看是否可以回复这种变化。若可以回复, 则需要检测是 Mga 的那个区段起作用, 故将 Mga 截短体 (实验室已有, 将 Mga 分成了 4 段) 分别瞬时转染到敲低 Mga 的 293T 细胞中, 通过 RT-PCR 以及 Western 检测截短体的表达情况, 并观察细胞状态, 确定是哪个片段回复了这种变化, 从而确定 Mga 在高度分化细胞中起作用的片段。

我们知道 PRC1.6 的很多组分在胚胎干细胞中起着重要作用, 如 Mga, Max, Ring1B, RYBP, DP-1, L3MBTL2 等基因的敲除会导致胚胎死亡, 它们在胚胎发育过程中起着重要作用<sup>[12,51,64,70,71,74,84]</sup>, 很可能 PRC1.6 在胚胎发育过程中也起着重要作用。由于这些组分缺失胚胎致死, 故要研究该复合物在胚胎发育过程中的作用比较困难。我们可以突变 RING1B 与 Mga 相互作用的位点, 特异破坏 Mga 与 RING1B 之间的相互作用, 使得 PRC1.6 无法形成, 构建缺乏 PRC1.6 的小鼠模型, 观察它在胚胎发育过程中的作用。同时我们可以利用 CRISPR-Cas9 的 konckin 技术将 YFP 插入 F9 细胞中 Mga 基因的前部, 表达 YFP-Mga, 通过 RT-PCR 及 western 检测 YFP-Mga 的表达。然后将该细胞向着类胚胎诱导, 观察在类胚体形成过程 Mga 的分布。

## 参考文献

- [1] Rong Gang MA, Zhang Y, Sun T T, et al. Epigenetic regulation by polycomb group complexes: focus on roles of CBX proteins. *Journal of Zhejiang University B*, 2014, 15:412-428.
- [2] Müller J, Verrijzer P. Biochemical mechanisms of gene regulation by polycomb group protein complexes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2009, 19(2):150-158.
- [3] Simon J A, Kingston R E. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(10):697-708.
- [4] Gao Z, Jin Z, Bonasio R, et al. PCGF Homologs, CBX Proteins, and RYBP Define Functionally Distinct PRC1 Family Complexes. *Molecular Cell*, 2012, 45(3):344-56.
- [5] Hidesato O, Kei-Ichiro I, Stefan G, et al. A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science*, 2002, 296(5570):1132-6.
- [6] Trojer P, Cao A, Gao Z, et al. L3MBTL2 Protein Acts in Concert with PcG Protein-Mediated Monoubiquitination of H2A to Establish a Repressive Chromatin Structure. *Molecular Cell*, 2011, 42(4):438-50.
- [7] Simon J A, Kingston R E. Occupying chromatin: Polycomb mechanisms for getting to genomic targets, stopping transcriptional traffic, and staying put. *Molecular Cell*, 2013, 49(5):808-24.
- [8] Croce L D, Helin K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2013, 20(10):1147-1155.
- [9] Lilia K, Hui O, Maria A, et al. Recognition and specificity determinants of the human cbx chromodomains. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(1):521-9.
- [10] Pasini D, Bracken A, Hansen J, et al. The polycomb group protein Suz12 is required for embryonic stem cell differentiation. *Molecular & Cellular Biology*, 2007, 27(10):3769-3779.
- [11] L'gía T, Emilia D, David O, et al. RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3. *Cell*, 2012, 148(4):664-78.
- [12] Jinzhong Q, Whyte W A, Endre A, et al. The polycomb group protein L3mbtl2 assembles an atypical PRC1-family complex that is essential in pluripotent stem cells and early development. *Cell Stem Cell*, 2012, 11(3):319-32.
- [13] Kehoe S M, Masahiro O, Hankowski K E, et al. A conserved E2F6-binding element in murine meiosis-specific gene promoters. *Biology of Reproduction*, 2012, 79(5):921-30.
- [14] Ru C, Tsukada Y I, Yi Z. Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A Ubiquitylation and Hox Gene Silencing. *Molecular Cell*, 2005, 20(6):845-854.
- [15] Schwartz Y B, Vincenzo P. A new world of Polycombs: unexpected partnerships and emerging functions. *Nature Reviews Genetics*, 2013, 14(12):853-864.
- [16] Trimarchi J M, Fairchild B, Wen J, et al. The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(4):1519-1524.
- [17] Helin K, Wu C L, Fattaey A R, et al. Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes & Development*, 1993, 7(10):1850-61.
- [18] Christina S, Bastian S, Florian F, et al. SUMOylation of the polycomb group protein

- L3MBTL2 facilitates repression of its target genes. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(5):3044-3058.
- [19]Trojer P, Li G, Sims RJ 3rd, Vaquero A, Kalakonda N, Boccuni P, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Nimer SD, Wang YH, Reinberg D. L3MBTL1, a histone-methylation-dependent chromatin lock. *Cell*, 2007, 129(5):915–928.
- [20]Addou-Klouche L, Ad da ĩle J, Finetti P, et al. Loss, mutation and deregulation of L3MBTL4, in breast cancers. *Molecular Cancer*, 2010, 9(1):1-13.
- [21]Jitka E, Patricia P, Amaya M F, et al. Structural studies of a four-MBT repeat protein MBTD1. *Plos One*, 2009, 4(10):e7274-e7274.
- [22]Taverna S D, Li H, Ruthenburg A J, et al. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2007, 14(11):1025-1040.
- [23]Yoo J Y, Choi K C, Kang H B, et al. Histone deacetylase 3 is selectively involved in L3MBTL2-mediated transcriptional repression. *Febs Letters*, 2010, 584(11):2225–2230.
- [24]Elgin S C R, Grewal S I S. Heterochromatin: silence is golden. *Current Biology Cb*, 2003, 13(23):895-8.
- [25]Jones D, Cowell I P. Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *Bioessays News & Reviews in Molecular Cellular & Developmental Biology*, 2000, 22(2):124-137.
- [26]Billur M, Bartunik H D, Singh P B. The essential function of HP1 $\beta$ : a case of the tail wagging the dog?. *Trends in Biochemical Sciences*, 2010, 35(2):115.
- [27]Lomberk G, Wallrath L, Urrutia R. The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biology*, 2006, 7(7):1-8.
- [28]Dialynas G K, Vitalini M W, Wallrath L L. Linking Heterochromatin Protein 1 (HP1) to cancer progression. *Mutation Research/fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2008, 647(s1–2):13-20.
- [29]Wreggett K A, Hill F , James P S, et al. A mammalian homologue of *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1) is a component of constitutive heterochromatin. *Cytogenetics & Cell Genetics*, 1994, 66(2):99-103.
- [30]Minc E, Allory Y, Worman H J, et al. Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma*, 1999, 108(4):220-234.
- [31]Brown J P, Bullwinkel J, Baronlühr B, et al. HP1 $\gamma$  function is required for male germ cell survival and spermatogenesis. *Epigenetics & Chromatin*, 2010, 3(1):52-59.
- [32]Bannister A J, Zegerman P , Partridge J F, et al. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, 2001, 410(6824):120-4.
- [33]Aasland R, Stewart A F. The chromo shadow domain, a second chromo domain in heterochromatin-binding protein 1, HP1. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(16):3168-73.
- [34]Yuki T, Chie N, Yael C, et al. HP1 $\gamma$  links histone methylation marks to meiotic synapsis in mice. *Development*, 2011, 138(19):4207-17.
- [35]Velez G, Urrutia R, Lomberk G. Critical Role of the HP1-Histone Methyltransferase Pathways in Cancer Epigenetics. *Medical Epigenetics*, 2013, 1(1):100-105.
- [36]Gwen L, Mathison A J, Adrienne G, et al. Sequence-specific recruitment of heterochromatin

- protein 1 via interaction with Krüppel-like factor 11, a human transcription factor involved in tumor suppression and metabolic diseases. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(16):13026-13039.
- [37]Schwartz Y B, Vincenzo P. A new world of Polycombs: unexpected partnerships and emerging functions. *Nature Reviews Genetics*, 2013, 14(12):853-864.
- [38]Taiping C, Dent S Y R. Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15(2):93-106.
- [39]Gyu L M, Jessica N, Ali S, et al. Physical and Functional Association of a Trimethyl H3K4 Demethylase and Ring6a/MBLR, a Polycomb-like Protein. *Cell*, 2007, 128(5):877-87.
- [40]Akasaka T, Takahashi N, Suzuki M, et al. MBLR, a new RING finger protein resembling mammalian Polycomb gene products, is regulated by cell cycle-dependent phosphorylation. *Genes to Cells*, 2002, 7(7):835-50.
- [41]Hofmann M C, Hess R A, Goldberg E , et al. Immortalized germ cells undergo meiosis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(12):5533-7.
- [42]Hofmann M C, Abramian D, Millán J L. A haploid and a diploid cell cycle coexist in an in vitro immortalized spermatogenic cell line. *Developmental Genetics*, 1995, 16(2):119-27.
- [43]Henriksson M, Lüscher B. Proteins of the Myc Network: Essential Regulators of Cell Growth and Differentiation. *Advances in Cancer Research*, 1996, 68(8):109-82.
- [44]Hurlin P J, Steingrímsson E , Copeland N G, et al. Mga, a dual-specificity transcription factor that interacts with Max and contains a T-domain DNA-binding motif. *Embo Journal*, 2000, 18(24):7019-28.
- [45]Germana M, Alexre R, Myriam A, et al. Rox, a novel bHLHZip protein expressed in quiescent cells that heterodimerizes with Max, binds a non-canonical E box and acts as a transcriptional repressor. *Embo Journal*, 1997, 16(10):2892-2906.
- [46]Zervos A S, Gyuris J , Brent R. Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell*, 1993, 72(72):223-32.
- [47]Kleene K C, Flynn J F. Characterization of a cDNA clone encoding a basic protein, TP2, involved in chromatin condensation during spermiogenesis in the mouse. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, 262(36):17272-7.
- [48]Kleene K C, Gerstel J , Shih D. Nucleotide sequence of the gene encoding mouse transition protein 2. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1990, 95(2):301-2.
- [49]Grandori C, Cowley SMJames L P, Eisenman R N. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annual Review of Cell & Developmental Biology*, 2000, 16(4):653-699.
- [50]Hurlin P J, Jie H. The MAX-interacting transcription factor network. *Seminars in Cancer Biology*, 2006, 16(16):265-74.
- [51]Shen-Li H , O'Hagan R C, Hou H , et al. Essential role for Max in early embryonic growth and development. *Genes & Development*, 2000, 14(1):17-22.
- [52]Hishida T, Nozaki Y, Nakachi Y, et al. Indefinite Self-Renewal of ESCs through Myc/Max Transcriptional Complex-Independent Mechanisms. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(1):37-49.
- [53]Maeda I, Okamura D, Tokitake Y, et al. Max is a repressor of germ cell-related gene

- expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Communications*, 2013, 4(2):1754-1754.
- [54]Krek W , Livingston D M, Shirodkar S. Binding to DNA and the retinoblastoma gene product promoted by complex formation of different E2F family members. *Science*, 1993, 262(5139):1557-60.
- [55]Helin K. Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Current Opinion in Genetics & Development*, 1998, 8(1):28-35.
- [56]Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes & Development*, 1998, 12(15):2245-2262.
- [57]Ching-Chun L, Tsai C Y, Wen-Chang C, et al. RB E2F1 complex mediates DNA damage responses through transcriptional regulation of ZBRK1. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(43):33134-43.
- [58]Wong C F, Barnes L L, Popa C, et al. E2F6: a member of the E2F family that does not modulate squamous differentiation. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2004, 324(2):497-503.
- [59]Storre J, Elsässer H P, Fuchs M, et al. Homeotic transformations of the axial skeleton that accompany a targeted deletion of E2f6. *Embo Reports*, 2002, 3(7):695-700.
- [60]Hub é F, Francastel C. Dnmt3b recruitment through E2F6 transcriptional repressor mediates germ-line gene silencing in murine somatic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(20):9281-6.
- [61]Kehoe S M, Masahiro O, Hankowski K E, et al. A conserved E2F6-binding element in murine meiosis-specific gene promoters. *Biology of Reproduction*, 2012, 79(5):921-30.
- [62]Storre J, Schäfer A, Reichert N, et al. Silencing of the meiotic genes SMC1beta and STAG3 in somatic cells by E2F6. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(50):41380-41386.
- [63]Michael P, Matthias T, Ute F, et al. A role for E2F6 in the restriction of male-germ-cell-specific gene expression. *Current Biology*, 2005, 15(11):1051-7.
- [64]Kohn M J, Bronson R T, Ed H, et al. Dp1 is required for extra-embryonic development. *Development*, 2003, 130(7):1295-1305.
- [65]Chang Y L, Peng Y H, Pan I C, et al. Essential role of Drosophila Hdac1 in homeotic gene silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(17):9730-5.
- [66]Eunyoung C, Cecil H, Inju P, et al. A novel germ cell-specific protein, SHIP1, forms a complex with chromatin remodeling activity during spermatogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(50):35283-94.
- [67]Motonobu S, Kensuke K, Robles A I, et al. Targeted disruption of Ing2 results in defective spermatogenesis and development of soft-tissue sarcomas. *Plos One*, 2010, 5(11):e15541.
- [68]Bailey J K, Fields A T, Kaijian C, et al. WD repeat-containing protein 5 (WDR5) localizes to the midbody and regulates abscission. *Atmospheric Environment*, 2015, 290(14):2339-2340.
- [69]Tengguo L, Kelly W G. A role for WDR5 in TRA-1/Gli mediated transcriptional control of the sperm/oocyte switch in *C. elegans*. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(9):5567-5581.
- [70]Pirity M K, Joseph L, Nicole S A. Rybp/DEDAF is required for early postimplantation and for central nervous system development. *Molecular & Cellular Biology*, 2005, 25(16):7193-202.
- [71]Kaori H, Carmen S, Endo T A, et al. RYBP represses endogenous retroviruses and

- preimplantation- and germ line-specific genes in mouse embryonic stem cells. *Molecular & Cellular Biology*, 2012, 32(6):1139-49.
- [72] Vinagolu K, Rajasekhar M.Sc. M.Phil. Ph.D, Begemann M. Roles of Polycomb Group Proteins in Development and Disease: A Stem Cell Perspective. *Stem Cells*, 2007, 25(10):2498-510.
- [73] Sparmann A, Van L M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2006, 6(11):846-56.
- [74] Voncken J W, Roelen B A, Roefs M, et al. Rnf2 (Ring1b) deficiency causes gastrulation arrest and cell cycle inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(5):2468-2473.
- [75] Maki S, Yoko M K, Yu-Ichi F, et al. Involvement of the Polycomb-group gene Ring1B in the specification of the anterior-posterior axis in mice. *Development*, 2002, 129(18):4171-83.
- [76] Lardelli M. The evolutionary relationships of zebrafish genes *tbx6*, *tbx16* / *spadetail* and *mga*. *Development Genes & Evolution*, 2003, 213(10):519-522.
- [77] Bandara L R, Lam E W, Sorensen T S, et al. DP-1: a cell cycle-regulated and phosphorylated component of transcription factor DRTF1/E2F which is functionally important for recognition by pRb and the adenovirus E4 orf 6/7 protein. *Embo Journal*, 1994, 13(13):3104-14.
- [78] Davis L J, Halazonetis T D. Both the helix-loop-helix and the leucine zipper motifs of c-Myc contribute to its dimerization specificity with Max. *Oncogene*, 1993, 8(1):125-32.
- [79] Ferré-D'Amaré A R, Prendergast G C, Ziff E B, et al. Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature*, 1993, 363(6424):38-45.
- [80] Luscher B, Larsson L. The basic region/helix-loop-helix/leucine zipper domain of Myc proto-oncoproteins: function and regulation. *Oncogene*, 1999, 18(19):2955-2966.
- [81] Ayer D E, Kretzner L, Eisenman R N. Mad: A heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell*, 1993, 72(2):211-22.
- [82] Hurlin P J, Quéva C, Koskinen P J, et al. Mad3 and Mad4: novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation. *Embo Journal*, 1996, 15(8):5646-5659.
- [83] Henriksson M, Lüscher B. Proteins of the Myc Network: Essential Regulators of Cell Growth and Differentiation. *Advances in Cancer Research*, 1996, 68(8):109-82.
- [84] Washkowitz A J, Caroline S, Kun Z, et al. Mga is essential for the survival of pluripotent cells during peri-implantation development. *Development*, 2015, 142(1):31-40.
- [85] Blackwood E M, Eisenman R N. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science*, 1991, 251(4998):1211-7.
- [86] Li L H, Nerlov C, Prendergast G, et al. c-Myc represses transcription in vivo by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. *Embo Journal*, 1994, 13(17):4070-9.
- [87] Nesbit C, Tersak J E. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene*, 1999, 18(19):3004-3016.
- [88] Cole M, McMahon S. The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene*, 1999, 18(19):2916-2924.

- [89]Dang C V, Resar L M, Emison E , et al. Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Experimental Cell Research*, 1999, 253(1):63-77.
- [90]Bouchard C, Staller P, Eilers M. Control of cell proliferation by Myc. *Trends in Cell Biology*, 1998, 8(5):202-6.
- [91]Ayer D E, Lawrence Q A, Eisenman R N. Ayer, D.E. Lawrence, Q.A. Eisenman, R.N. Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. *Cell* 80, 767-776. *Cell*, 1995, 80(5):767-76.
- [92]Schreiber-Agus N , Chin L , Chen K , et al. An amino-terminal domain of Mxi1 mediates anti-Myc oncogenic activity and interacts with a homolog of the yeast transcriptional repressor SIN3. *Cell*, 1995, 80(5):777-86.
- [93]Germana M, Alexre R, Myriam A, et al. Rox, a novel bHLHZip protein expressed in quiescent cells that heterodimerizes with Max, binds a non-canonical E box and acts as a transcriptional repressor. *Embo Journal*, 1997, 16(10):2892-2906.
- [94]Ayer D E, Eisenman R N. A switch from Myc:Max to Mad:Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation. *Genes & Development*, 1993, 7(11):2110-2119.
- [95]Bouchard C, Dittrich O, Kiermaier A, et al. Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes & Development*, 2001, 15(16):2042-2047.
- [96]Martin E, Eisenman R N. Myc's broad reach. *Genes & Development*, 2008, 22(20):2755-66.
- [97]Dou Y, Milne T A, Tackett A J, et al. Physical Association and Coordinate Function of the H3 K4 Methyltransferase MLL1 and the H4 K16 Acetyltransferase MOF. *Cell*, 2005, 121(6):873-885.
- [98]Hidesato O, Kei-Ichiro I, Stefan G, et al. A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science*, 2002, 296(5570):1132-6.
- [99]Kispert A , Herrmann B G. The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *Embo Journal*, 1993, 12(8):3211-20.
- [100]Müller C W, Herrmann B G. Crystallographic structure of the T domain-DNA complex of the Brachyury transcription factor. *BMJ*, 1921, 1(3138):284-284.
- [101]Technau U. Brachyury , the blastopore and the evolution of the mesoderm. *Bioessays News & Reviews in Molecular Cellular & Developmental Biology*, 2001, 23(9):788-794.
- [102]Papaioannou V E, Silver L M. The T-box gene family. *Bioessays News & Reviews in Molecular Cellular & Developmental Biology*, 1998, 20(1):9-19.
- [103]Herrmann B G, Kispert A. The T genes in embryogenesis. *Trends in Genetics*, 1994, 10(8):280-6.
- [104]Cloudman A M, Little C C. The genetics of tumour formation in mice, in relation to the gene T for brachyury. *Journal of Genetics*, 1936, 32(32):487-504.
- [105]Gluecksohn-schoenheimer S. The Development of Normal and Homozygous Brachy (T/T) Mouse Embryos in the Extraembryonic Coelom of the Chick. *Science*, 1941, 93(2421):502-3.
- [106]Natalia I, Radu D, Rong L, et al. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature*, 2006, 442(7102):533-538.

- [107]Hitoshi N, Kazuya O, Daisuke S, et al. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*, 2009, 460(7251):118-22.
- [108]Jianyong H, Ping Y, Henry Y, et al. Tbx3 improves the germ-line competency of induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2010, 463(7284):1096-100.
- [109]Atsushi S, Sayaka S, Dirk B, et al. Tbx3 controls the fate of hepatic progenitor cells in liver development by suppressing p19ARF expression. *Development*, 2008, 135(9):1589-95.
- [110]Bakker M L, Boukens B J, Mommersteeg M T M, et al. Transcription factor Tbx3 is required for the specification of the atrioventricular conduction system. *Circulation Research*, 2008, 102(11):1340-9.
- [111]Bamshad M, Le T, Watkins W S, et al. The Spectrum of Mutations in TBX3: Genotype/Phenotype Relationship in Ulnar-Mammary Syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 1999, 64(6):997-1010.
- [112]Davenport T G, Jerome-Majewska L A, Papaioannou V E. Mammary gland, limb and yolk sac defects in mice lacking Tbx3, the gene mutated in human ulnar mammary syndrome. *Development*, 2003, 130(10):2263-73.
- [113]Jerome-Majewska, Loydie A, Jenkins, Gerard P, Ernstoff, Elana, et al. Tbx3, the ulnar-mammary syndrome gene, and Tbx2 interact in mammary gland development through a p19Arf/p53-independent pathway. *Developmental Dynamics An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 2005, 234(4):922-933.
- [114]Bamshad M, Lin R C, Law D J, et al. Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome. *Nature Genetics*, 1997, 16(3):311-315.
- [115]Ito A, Asamoto M, Hokaiwado N, et al. Tbx3 expression is related to apoptosis and cell proliferation in rat bladder both hyperplastic epithelial cells and carcinoma cells. *Cancer Letters*, 2005, 219(1):105-12.
- [116]Marta L, Anna D, Ulf H, et al. Increased expression of cSHMT, Tbx3 and utrophin in plasma of ovarian and breast cancer patients. *International Journal of Cancer Journal International Du Cancer*, 2006, 118(2):412-21.
- [117]Claire-Angélique R, Charlotte L, Carolina A, et al. Tbx3 is a downstream target of the Wnt/beta-catenin pathway and a critical mediator of beta-catenin survival functions in liver cancer. *Cancer Research*, 2007, 67(3):901-10.
- [118]Chapman D L, Papaioannou V E. Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene Tbx6. *Nature*, 1998, 391(6668):695-7.
- [119]Bamshad M, Lin R C, Law D J, et al. Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome. *Nature Genetics*, 1997, 16(3):311-315.
- [120]Basson C T, Bachinsky D R, Lin R C, et al. Mutations in human TBX5 cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nature Genetics*, 1997, 15(1):30-5.
- [121]Li Q Y, Newbury-Ecob R A, Terrett J A, et al. Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nature Genetics*, 1997, 15(1):21-29.
- [122]Zhang J, Houston D W, King M L, et al. The role of maternal VegT in establishing the primary germ layers in *Xenopus* embryos. *Cell*, 1998, 94(4):515-24.
- [123]Olson E N. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science*, 2006, 313(5795):1922-7.

- [124]KIRK Edwin P, SUNDE Margaret, COSTA Mauro W, et al. Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy. *American Journal of Human Genetics*, 2007, 81(2):280-291.
- [125]Wang R, Taylor A B, Leal B Z, et al. Polycomb group targeting through different binding partners of RING1B C-terminal domain. *Structure*, 2010, 18(8):966-75.
- [126]Kispert A, Koschorz B, Herrmann B G. The T protein encoded by Brachyury is a tissue-specific transcription factor. *Embo Journal*, 1995, 14(19):4763-72.
- [127]Guang H, Jonghwan K, Qikai X, et al. A genome-wide RNAi screen identifies a new transcriptional module required for self-renewal. *Genes & Development*, 2009, 23(7):837-848.
- [128]Lander E S. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*, 2014, 511(7517):543-550.
- [129]Lorenzo D P, Michaela C, Sara M, et al. MGA, a suppressor of MYC, is recurrently inactivated in high risk chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 2013, 54(5):1087-1090.
- [130]Sun Y, Tseng W C, Xiang F, et al. Extraembryonic Signals under the Control of MGA, Max, and Smad4 Are Required for Dorsal-ventral Patterning. *Developmental Cell*, 2014, 28(3):322-334.
- [131]Avilion A A, Nicolis S K, Pevny L H, et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Development*, 2003, 17(1):126-40.
- [132]Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 1998, 95(3):379-391.
- [133]Pendeville H, Carpino N, Marine J C, et al. The ornithine decarboxylase gene is essential for cell survival during early murine development. *Molecular & Cellular Biology*, 2001, 21(19):6549-6558.
- [134]Zdziebło D, Li X, Lin Q, et al. Pcgf6, a Polycomb Group Protein, Regulates Mesodermal Lineage Differentiation in Murine ESCs and Functions in iPS Reprogramming. *Stem Cells*, 2014, 32(12):3112-3125.
- [135]Reijo R, Lee T Y, Salo P, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genetics*, 1995, 10(4):383-393.
- [136]Rolland A D, Jégou B, Pineau C. Testicular Development and Spermatogenesis: Harvesting the Postgenomics Bounty. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 2008, 636(1):16-41.
- [137]Handel M A, Park C, Kot M. Genetic control of sex-chromosome inactivation during male meiosis. *Cytogenetics & Cell Genetics*, 1994, 66(2):83-88.
- [138]Takada Y, Isono K J, Turner J, et al. Mammalian Polycomb Scmh1 mediates exclusion of Polycomb complexes from the XY body in the pachytene spermatocytes. *Development* 134, 579-590. *Development*, 2007, 134(3):579-90.
- [139]Mori C, Welch J E, Sakai Y, et al. In situ localization of spermatogenic cell-specific

- glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapd-s) messenger ribonucleic acid in mice. *Biology of Reproduction*, 1992, 46(5):859-68.
- [140]Iannello R C, Dahl H H M. Transcriptional expression of a testis-specific variant of the mouse dehydrogenase E1 $\alpha$  subunit. *Biology of Reproduction*, 1992, 47(1):48-58.
- [141]Kehkooi K, Angeles V T, Martha F, et al. Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature*, 2009, 462(7270):222-5.
- [142]Kleiman S E, Lagziel A, Yogev L, et al. Expression of CDY1 may identify complete spermatogenesis. *Fertility & Sterility*, 2001, 75(1):166-73.
- [143]Lin Y, Page D C. Dazl deficiency leads to embryonic arrest of germ cell development in XY C57BL/6 mice. *Developmental Biology*, 2006, 288(2):309-16.
- [144]Ruggiu M, Speed R, Taggart M, et al. The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature*, 1997, 389(6646):p ágs. 73-77.
- [145]Vincent S, Segretain D, Nishikawa S, Nishikawa SI, Sage J, Cuzin F, Rassoulzadegan M. Stage-specific expression of the Kit receptor and its ligand (KL) during male gametogenesis in the mouse: a Kit-KL interaction critical for meiosis. *Development*, 1998, 125(22):4585-93.
- [146]Rossi P, Sette C, Dolci S, et al. Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2000, 23(9):609-15.
- [147]Schrans-Stassen B H, Kant H J V D, Rooij D G D, et al. Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. *Endocrinology*, 1999, 140(12):5894-900.
- [148]Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*. *Nature*, 2011, 469(7330):343-9.
- [149]Aiko S, Atsushi S, Hitomi S, et al. The RNA-binding protein NANOS2 is required to maintain murine spermatogonial stem cells. *Science*, 2009, 325(5946):1394-.
- [150]Julaton V T A, Pera R A R. NANOS3 function in human germ cell development. *Human Molecular Genetics*, 2011, 20(11):2238-50.
- [151]Kido T, Lau Y F C. A Cre gene directed by a human TSPY promoter is specific for germ cells and neurons. *Genesis the Journal of Genetics & Development*, 2005, 42(4):263-275.
- [152]Lau Y F C, Lau H W, Köm üves L G. Expression pattern of a gonadoblastoma candidate gene suggests a role of the Y chromosome in prostate cancer. *Cytogenetic & Genome Research*, 2003, 101(3-4):250-260.
- [153]Schnieders F, Dörk T, Arnemann J, et al. Testis-specific protein, Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues. *Human Molecular Genetics*, 1996, 5(11):1801-7.
- [154]Kleene K C, Flynn J F. Characterization of a cDNA clone encoding a basic protein, TP2, involved in chromatin condensation during spermiogenesis in the mouse. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, 262(36):17272-7.
- [155]Kleene K C, Gerstel J, Shih D. Nucleotide sequence of the gene encoding mouse transition protein 2. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1990, 95(2):301-2.
- [156]Aravin A A, Sachidanandam R, Girard A, et al. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science*, 2007, 316(5825):744-7.
- [157]Quina A S, Buschbeck M, Croce L D. Chromatin structure and epigenetics. *Biochemical*

- Pharmacology, 2006, 72(11):1563-9.
- [158]Nayernia K, Nolte J, Michelmann H W, et al. In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Developmental Cell*, 2006, 11(11):125-32.
- [159]Brenner C, Fuks F. DNA Methyltransferases: Facts, Clues, Mysteries. *Current Topics in Microbiology & Immunology*, 2006, 301(12):45-66.
- [160]Hajkova P, Erhardt S, Lane N, et al. Hajkova, P. et al. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech. Dev.* 117, 15-23. *Mechanisms of Development*, 2002, 117(1-2):15-23.
- [161]Zamudio N M, Chong S, O'Bryan M K. Epigenetic regulation in male germ cells. *Reproduction*, 2008, 136(2):321-323.
- [162]Marques C J, Pinho M J, Carvalho F, et al. DNA methylation imprinting marks and DNA methyltransferase expression in human spermatogenic cell stages. *Epigenetics Official Journal of the Dna Methylation Society*, 2011, 6(11):1354-61.
- [163]Oakes C C, La S S, Smiraglia D J, et al. A unique configuration of genome-wide DNA methylation patterns in the testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(1):228-33.
- [164]Oakes C C, Salle S L, Smiraglia D J, et al. Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Developmental Biology*, 2007, 307(2):368-379.
- [165]Ariel M, Cedar H, Mccarrey J. Developmental changes in methylation of spermatogenesis specific genes include reprogramming in the epididymis. *Nature Genetics*, 1994, 7(1):59-63.
- [166]Kobayashi H, Hiura H, John R M, et al. DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. *Eur J Hum Genet. European Journal of Human Genetics Ejhg*, 2009, 17(12):1582-91.
- [167]Marques C J, Costa P, Vaz B, et al. Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Molecular Human Reproduction*, 2008, 14(2):67-74.
- [168]Kobayashi H, Sato A E, Hiura H, et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Human Molecular Genetics*, 2007, 16(21):2542-2551.
- [169]Godmann M, Auger V, Ferraroniaguilar V, et al. Dynamic regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in mammalian spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, 2007, 77(5):754-764.
- [170]Khalil A M, Boyar F Z, Driscoll D J. Dynamic histone modifications mark sex chromosome inactivation and reactivation during mammalian spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(47):16583-7.
- [171]Lahn B T, Tang Z L, Zhou J, et al. Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(13):8707-8712.
- [172]Yuki Okada, Keisuke Tateishi, Yi Z. Histone Demethylase JHDM2A Is Involved in Male Infertility and Obesity. *Journal of Andrology*, 2010, 31(31):75-8.

- [173]Peters A H. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell*, 2001, 107(3):323-337.
- [174]Seki Y, Yamaji M, Yabuta Y, et al. Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development*, 2007, 134(14):2627-38.
- [175]Eun S H, Qiang G, Xin C. Epigenetic regulation of germ cell differentiation. *Current Opinion in Cell Biology*, 2010, 22(6):737-43.
- [176]Okada Y, Scott G, Ray M K, et al. Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis. *Nature*, 2007, 450(7166):119-23.
- [177]Buchwald G, Stoop P V D, Weichenrieder O, et al. Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of Polycomb proteins Bmi1 and Ring1b. *Embo Journal*, 2006, 25(11):2465-74.
- [178]Marushige Y, Marushige K. Transformation of sperm histone during formation and maturation of rat spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry*, 1975, 250(1):39-45.
- [179]Khalil A M, Boyar F Z, Driscoll D J. Dynamic histone modifications mark sex chromosome inactivation and reactivation during mammalian spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(47):16583-7.
- [180]Turner J M A. Meiotic sex chromosome inactivation. *Development* 134, 1823-1831. *Development*, 2007, 134(10):1823-31.
- [181]Zamudio N M, Chong S, O'Bryan M K. Epigenetic regulation in male germ cells. *Reproduction*, 2008, 136(2):321-323.
- [182]Berger SL. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 2002, 12(2):142-148.
- [183]Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah S K, Celeste A, et al. H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Developmental Cell*, 2003, 4(4):497-508(12).
- [184]Kota S K, Feil R. Epigenetic transitions in germ cell development and meiosis. *Developmental Cell*, 2010, 19(5):675-86.
- [185]Kimmins S, Sassonecorsi P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature*, 2005, 434(7033):583-589.
- [186]Curry E, Safranski TJ, Pratt SL. Differential expression of porcine sperm microRNAs and their association with sperm morphology and motility. *Theriogenology*, 2011, 5(4):308-312.
- [187]Hayashi K, Sm C D S L, Kaneda M, et al. MicroRNA Biogenesis Is Required for Mouse Primordial Germ Cell Development and Spermatogenesis. *Plos One*, 2008, 3(3):e1738.
- [188]Kuramochimiyagawa S, Kimura T, Ijiri T W, et al. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development*, 2004, 131(4):839-849.
- [189]Carmell M A, Girard A, Kant H J G V D, et al. MIWI2 Is Essential for Spermatogenesis and Repression of Transposons in the Mouse Male Germline. *Developmental Cell*, 2007, 12(4):503-14.
- [190]Deng W, Lin H. miwi, a Murine Homolog of piwi, Encodes a Cytoplasmic Protein Essential for Spermatogenesis. *Developmental Cell*, 2002, 2(6):819-30.

- [191]Reijo R, Lee T Y, Salo P, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genetics*, 1995, 10(4):383-393.
- [192]Ayako G, Kumiko K, Takuya S, et al. In vitro murine spermatogenesis in an organ culture system. *Biology of Reproduction*, 2010, 83(2):261-267.
- [193]Takuya S, Kumiko K, Ayako G, et al. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*, 2011, 471(7339):504-7.
- [194]Sato T, Katagiri K, Yokonishi T, et al. In vitro production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nature Communications*, 2011, 2(1):472-472.
- [195]Nayernia K, Nolte J, Michelmann H W, et al. In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Developmental Cell*, 2006, 11(11):125-32.
- [196]Zhuo Y, Ping J, Jinping C, et al. Dazl promotes germ cell differentiation from embryonic stem cells. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2009, 1(2):93-103.
- [197]Sarita P, Medrano J V, Kehkooi K, et al. Human germ cell differentiation from fetal- and adult-derived induced pluripotent stem cells. *Human Molecular Genetics*, 2011, 20(4):752-762.
- [198]Katsuhiko H, Hiroshi O, Kazuki K, et al. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, 2011, 146(4):519-32.
- [199]Park T S, Galic Z, Conway A E, et al. Derivation of Primordial Germ Cells from Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells Is Significantly Improved by Coculture with Human Fetal Gonadal Cells. *Stem Cells*, 2009, 27(4):783-795.
- [200]Jinlian H, Shaohui P, Chunrong Y, et al. Derivation of male germ cell-like lineage from human fetal bone marrow stem cells. *Reproductive Biomedicine Online*, 2009, 19(1):99-105.
- [201]Lehtonen E, Laasonen A, Tienari J. Teratocarcinoma stem cells as a model for differentiation in the mouse embryo. *International Journal of Developmental Biology*, 1989, 33(1):105-15.
- [202]Karim N, Manyu L, Lukasz J, et al. Stem cell based therapeutical approach of male infertility by teratocarcinoma derived germ cells. *Human Molecular Genetics*, 2004, 13(14):1451-1460.
- [203]Endoh M, Endo T, Endo T, et al. Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the core transcriptional regulatory circuitry to maintain ES cell identity. *Development*, 2008, 135(8):1513-1524.

## 英文缩略词表

## List of abbreviation

缩略词	英文名称	中文名称
Acr-GFP	Acrosin-green fluorescent protein	精子酵素-绿色荧光蛋白
bHLHZip	Basic-helix-loop-helix-leucine-zipper	螺旋-环-螺旋锌指结构域
EPI	Inner Pluripotent Epiblast	内部多能外胚层
ESC	Embryonic Stem Cell	胚胎干细胞
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting	荧光激活细胞分离法
Gsg2-GFP	Germ Cell Associated 2-Green Fluorescent protein	精子相关蛋白 2-绿色荧光 蛋白
ICM	Inner Cell Mass	内细胞团
iPS	Induced Pluripotent Stem Cell	诱导多能干细胞
IPTG	Isopropyl B-D-1- Thiogalactopyranoside	异丙基硫代半乳糖苷
MSC	Mesenchymal Stem Cell	间充质干细胞
PcG	Polycomb Group	多梳家族蛋白
PCH	Pericentric Heterochromatin	臂间异染色质
PMSF	Phenylmethanesulfonyl Fluoride	苯甲基磺酰氟
PRC1	Polycomb Repressive Complex I	多梳抑制复合物 I
PRC2	Polycomb Repressive Complex II	多梳抑制复合物 II
SSC	Spermatogonial Stem Cell	精原干细胞
TP	Transition protein	过渡蛋白
YSL	Yolk Syncytial Layer	卵黄合胞体层

## 在读期间研究成果

### 一、发表的学术论文

1. Ronggang Ma, Yang Zhang, Tingting Sun, Bo Cheng. Epigenetic regulation by polycomb group complexes: focus on roles of cbx proteins. (*Journal of Zhejiang University B*, 15, 412-428.)

### 二、参与科研项目

1. PRC1 在胚胎干细胞生长和分化中识别和抑制靶基因的分子机制。  
国家自然科学基金项目（31471233）

## 致 谢

本论文是在程博老师的指导下完成的,谨此向导师致以衷心的感谢和崇高的敬意!论文从选题、设计到撰稿,以及实验中遇到的问题,无不倾注着程老师心血。正是因为老师的关心和帮助,才使得我的实验能够顺利的开展和进行。

比起实验室的其他同学,我基础比较差,尤其是实验之初,很多东西都不了解,老师耐心的给我讲解,让我的知识储备一点点增加。而在实验中,实验失败后,老师会给我分析各种可能导致失败的原因,在这个过程中让我学会了一种科学的处理问题的方法。

回想这三年的经历,导师用她的一言一行给我树立了一个真正的科研人员应该具备的素质及态度,使我在学识和科研能力上更进一步,老师对于问题的处理方法及思考方式,给了我很大的震撼,这些对我今后的人生道路都有很大的帮助。

除了我的导师外,我们最应该感谢杨金波老师以及王勤老师。他们在我们实验室建设之初对我们实验室提供了很大的帮助,现在很多的实验依然用到杨老师实验室的仪器。杨老师实验的杜宇平老师老师对我们的生活提供很大的帮助,朱宁师兄则在我们实验遇到困难时,给了我们很大的帮助。感谢王新宇教授课题组的杨涛师兄,在我的实验上,给了我很大的帮助。

感谢中心实验室的彭亮、管丽萍、赵扬老师的帮助,感谢课题组的其他成员在实验和生活上的关心与帮助,包括孙婷婷、张洋、卢汉文、关珊丽、白米雪、王健、王玢、项鹏宇,感谢所有帮助过我的老师和同学。

另外,衷心的感谢我的父母和其他亲朋好友对我的关心、支持和理解。感谢曾经教育和帮助过我的所有老师。衷心地感谢为评阅本论文而付出宝贵时间和辛勤劳动的专家和教授们!

马荣岗

2016.5 书于兰州大学