

PRC1.6 复合体表观遗传调控生殖谱系特异性基因的时空表达

孙晓伟¹, 李宏阳¹, 王健¹, 程博^{1,2}

1. 兰州大学生命科学学院, 兰州 730000

2. 兰州大学, 教育部细胞活动及逆境适应重点实验室, 兰州 730000

摘要: 多梳抑制复合体 1 (polycomb repressive complex 1, PRC1) 是一类通过催化和识别染色质表观遗传修饰进而调控基因表达的蛋白复合体, 主要参与干细胞干性维持、细胞分化以及细胞周期调控等生理过程, 该复合体功能异常影响机体发育或导致癌症发生。在哺乳动物细胞内, PRC1 根据组成差异被进一步细分为 6 种不同的亚型 PRC1.1~PRC1.6, 它们在靶基因群识别、表观调控机制及生物学功能上存在明显特化。近年来研究发现, PRC1.6 复合体在胚胎干细胞及体细胞中对于稳定抑制生殖谱系特异性基因的表达至关重要, 同时对于生殖干细胞的干性维持以及精子发生过程中生殖谱系特异性基因的精密调控承担着重要作用。本文在介绍 PRC1.6 复合体的发现、各组分的分子功能及其参与的生化反应途径的基础上, 系统阐述了该复合体在胚胎发育、性腺发育、精子发生等过程中对生殖谱系特异性靶基因群的时空表达发挥的重要调控功能, 并探讨了 PRC1.6 与已知表观遗传调控网络的相互作用, 以期为进一步探索生殖谱系基因表达、精子发生的表观遗传调控机制以及男性不育的致病机制提供参考。

关键词: 多梳抑制复合体 1; PRC1.6; 转录抑制; 生殖谱系特异性基因; 时空表达

收稿日期: 2019-01-27; 修回日期: 2019-03-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31471233, 31771447), 中央高校基本科研业务费(编号: lzujbky-2017-it51, lzujbky-2018-k05)和教育部细胞活动与逆境适应重点实验室开放基金项目(编号: lzujbky-2017-kb05, lzujbky-2018-kb05)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31471233, 31771447), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Nos. lzujbky-2017-it51, lzujbky-2018-k05) and the Foundation of the Ministry of Education Key Laboratory of Cell Activities and Stress Adaptations (Nos. lzujbky-2017-kb05, lzujbky-2018-kb05)]

作者简介: 孙晓伟, 在读博士研究生, 专业方向: 细胞生物学。E-mail: sunxw18@lzu.edu.cn

李宏阳, 在读硕士研究生, 专业方向: 细胞生物学。E-mail: hyl117@lzu.edu.cn

孙晓伟和李宏阳并列第一作者。

通讯作者: 程博, 博士, 教授, 研究方向: 真核基因表达调控。E-mail: bocheng@lzu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.yczs.18-332

网络出版时间: 2019/4/1 9:34:53

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20190401.0934.001.html>

Controlling the spatiotemporal expression of germ line specific genes by PRC1.6 complex

Xiaowei Sun¹, Hongyang Li¹, Jian Wang¹, Bo Cheng^{1,2}

1. School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

2. The Ministry of Education Key Laboratory of Cell Activities and Stress Adaptations, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: Polycomb repressive complex 1 (PRC1) is a class of epigenetic regulatory complexes that normally represses gene expression by catalyzing and/or recognizing chromatin modifications. PRC1 mainly functions in stem cell maintenance, cell differentiation, cell cycle regulation and related processes. PRC1 also have aberrant functions which has been implicated in many types of developmental diseases and cancers. Mammalian PRC1 complexes are divided into six subtypes based on their composition and function; subtypes include PRC1.1 to PRC1.6. Each PRC1 subtype regulates a unique collection of target genes. The PRC1.6 complex subtype plays key roles in specifically repressing transcription of genes controlling germ cell development in embryonic stem cells and other somatic cell types. Recent research demonstrates that the PRC1.6 complex is also crucial for the timely activation of the germ line of specific genes during spermatogenesis, which is essential for proper gonad development. In this review, we summarize the identification of molecular functions of each core component of the PRC1.6 complex including how it recognizes and represses germ line specific genes. We also update the biological roles of this complex in regulating the spatiotemporal expression of germ line specific genes during embryonic development, gonad development, and spermatogenesis. Lastly, the crosstalk between the PRC1.6 complex and the other main epigenetic regulatory mechanisms involved in controlling spermatogenesis is discussed. Our discussion of the PRC1.6 complex in regulating germ line specific genes informs the studies of molecular processes of spermatogenesis and contributes to the understanding of the pathogenic mechanisms of male infertility.

Keywords: polycomb repressive complex 1 (PRC1); PRC1.6; transcriptional repression; germ line specific genes; spatiotemporal expression

表观遗传调控是实现真核生物基因选择性表达的主要途径。多梳蛋白家族(polycomb groups, PcGs)是一类重要的表观遗传调控因子,与多种干细胞的干性维持、细胞分化、细胞周期的调控、细胞衰老、X 染色体失活等一系列细胞生理活动密切相关^[1,2]。它主要通过两类蛋白复合体发挥功能——多梳抑制复合体I和II (polycomb repressive complex 1/2, PRC1/2)。近年来在高等动物细胞中不断鉴定出组分不同的 PRC1 亚型,且它们的生物学功能在靶基因群的选择及调控基因表达的作用机制中有所差异。PRC1.6 复合体属于其中一类 PRC1 亚型,主要包含 RING1B、PCGF6 (polycomb group ring finger protein 6)、MAX

(Myc-associated factor X)、MGA (MAX gene associated)、E2F6 和 L3MBTL2 (lethal (3) malignant brain tumour like 2)等组分。近年来通过对 PRC1.6 复合体不同核心组分在生物化学、分子生物学、细胞生物学及发育生物学等方面的研究,发现该复合体对于哺乳动物发育过程中多种相关细胞谱系的建成及维持是必需的。本文在介绍该复合体的发现、核心组分的分子生物学功能的基础上,对该复合体在高等动物胚胎发育、性腺发育、精子发生、胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)及生殖干细胞(germ line stem cells, GSCs)维持等过程中发挥的生物学功能展开了系统论述。

1 多梳蛋白家族 PcGs

PcGs 是一大类通过催化和识别组蛋白表观遗传修饰来改变染色质构象、对靶基因进行转录调控的蛋白。第一个多梳蛋白编码基因 *Polycomb (Pc)* 是 Pamela Lewis 于 1947 年在黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中发现的, 1978 年 Edward Lewis 发现 *Pc* 突变导致果蝇发生同源异型转化(如雄性果蝇产生多对性梳的异常发育表型), 进一步研究发现多梳蛋白是通过抑制同源异型基因的表达来调控果蝇的体节发育^[1,3,4], 其功能与发挥基因激活作用的三胸蛋白家族 TrxGs(trithorax groups)相拮抗^[5,6]。但是近几年也有关于 PcGs 蛋白激活基因表达的报道^[7-9], 表明 PcGs 蛋白在执行转录调控方面的机制可能是非常复杂且多效的。PcGs 蛋白主要通过 PRC1 和 PRC2 两类蛋白复合体形式发挥作用。其中, EZH2 是 PRC2 中具有催化活性的核心组分, 可以催化组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸的三甲基化(H3K27me3)^[10]。其他的 PRC2 组分参与复合体组装及活性维持^[11]。PRC1 具有 E3 泛素连接酶活性, 该活性由 RING1A/RING1B 及 PCGF 的环指结构域(ring finger domain)的部分亲水性表面构成^[12,13], 催化组蛋白 H2A 第 119 位赖氨酸的单泛素化(H2AK119ub1)^[14]。PRC1 和 PRC2 调控的靶基因群存在部分重叠, 在多数情况下二者存在相互招募的关系, 互助实现对靶基因的转录调控^[15]。

高等动物中 PRC1 的组分较果蝇要复杂的多, 除了对应果蝇 PRC1 的每个组分都衍生出多个同源蛋白之外, 还增添了很多其他组分, 且组分之间的组合方式非常复杂多样^[16]。目前在哺乳动物中发现 PRC1 亚型有 6 类, 称为 PRC1.1~PRC1.6, 其中 PRC1.2 和 PRC1.4 因包含有经典的 Pc 蛋白同系物

CBX 蛋白而被称作经典 PRC1 (canonical PRC1), 其余几种亚型因缺乏 CBX 蛋白而被列为非典型 PRC1 (non-canonical PRC1)。本文着重讨论了 PRC1.6 亚型, 关于其他亚型的组成及功能均有较多报道, 请读者参考相关综述^[17,18]。

2 PRC1.6 复合体的发现、核心组分及其分子功能

2.1 PRC1.6 复合体的发现

PRC1.6 复合体先后被不同的研究团队发现, 并被赋予了不同的名称(表 1)。2002 年, Ogawa 等^[19]在 HeLa 及成纤维细胞中利用免疫沉降技术、甘油密度梯度离心并结合质谱检测发现了与 E2F6-标签融合蛋白结合的蛋白复合体—E2F6 复合物(E2F6.com)。该复合体中除了包含转录因子 E2F6/DP-1, 还有另一对转录因子异二聚体 MAX/MGA; 同时发现该复合体在甘油密度梯度分离中与组蛋白甲基转移酶 G9a、Eu-HMTase1 (GLP)部分重叠, 具有 H3K9 的甲基转移酶活性^[19]。2011 年, 美国纽约大学医学院 Danny Reinberg 课题组的 Trojer 等^[20]研究 L3MBTL2 的功能时再次发现了该复合体, 将其命名为 PRC1L4 (PRC1-like4)复合体; 2012 年, 同课题组的 Gao 等^[21]通过免疫沉降/质谱实验发现了人源细胞中包含不同 PCGF 因子(PCGF1~PCGF6)的 PRC1 复合体, 并根据包含 PCGF 因子的编号将 PRC1 复合体细分为 PRC1.1~PRC1.6 复合体亚型, 各亚型除了共同组分是 PRC1 复合体的酶学核心组分 RING1B (RING2)外其余组分差异较大。其中 PRC1.6 组分包括 PCGF6、RING1B、RYBP、MAX、MGA、L3MBTL2、E2F6、DP-1/2、HP1 γ 和 HDAC1/2 等。2017 年, Endoh 等^[22]

表 1 PRC1.6 复合体的发现及组分

Table 1 Discovery and identification of the components of PRC1.6 complex

复合体命名	组分	细胞系	文献
E2F6.com	E2F6、PCGF6、RING1B、MAX、MGA、L3MBTL2、HP1 γ 、DP-1/2、YAF2、G9a 和 Eu-HMTase1(GLP)	HeLa	[19]
PRC1-like 4 (PRC1L4)	E2F6、PCGF6、RING1B/RING1A、L3MBTL2、HP1 γ 和 MBLR	HEK293T	[20]
PRC1.6	E2F6、PCGF6、RING1B、MAX、MGA、L3MBTL2、HP1 γ 、DP-1/2、HDAC1/2、RYBP/YAF2 和 WDR5	293TREx	[21]
PCGF6-PRC1	PCGF6、RING1B/RING1A、MGA、L3MBTL2、HP1 γ 、HP1 β 、DP-1 和 RYBP/YAF2	mESCs	[22]

在小鼠 ESCs 中利用带标签的 PCGF6 蛋白也分离到了类似的复合体并将其称为 PCGF6-PRC1。以上 4 种复合体虽然名称各异,但是核心组分都含有 PCGF6、E2F6、RING1B、L3MBTL2 和 HP1 γ 等因子(表 1),本质上属于同一复合体或十分相近的同类复合体。为了叙述简洁,本文在后续介绍中将其统称为 PRC1.6 复合体。

2.2 PRC1.6 复合体各组分的分子功能

如上所述,PRC1.6 复合体是一个多组分蛋白复合体,其组分大致可以分成与催化组蛋白修饰相关的因子和与复合体装配或靶向定位相关的因子。同其他 PRC1 亚型类似,PRC1.6 复合体最主要的酶学活性是由 RING1B 提供的 E3 泛素连接酶活性,催化产生 H2AK119ub1;而 RYBP、PCGF6 等因子对于 RING1B 的活性发挥起到重要的促进作用^[14,21,23]。在该复合体中包含异染色质结合蛋白 HP1 γ ,说明其可能介导 PRC1.6 与甲基化的 H3K9 之间存在功能互作;除此之外,Gao 等^[21]还在 PRC1.6 复合体中检测到了组蛋白去乙酰化酶 HDAC1/2,说明该复合体在某些情况下可能与组蛋白去乙酰化酶协同作用抑制靶基因的转录。

PRC1.6 蛋白复合体各组分的已知分子功能见表 2。在 ESCs 中通过免疫共沉淀实验发现 PCGF6 与 L3MBTL2、MAX、RING1B 和 RYBP 具有相互作用,敲除 *Pcgf6* 时阻断了 L3MBTL2 与复合体中

RING1B、RYBP 和 MAX 等组分的互作,这说明整个复合体的完整性在一定程度上依赖于 PCGF6^[24]。另有研究表明 PCGF6 可通过招募 RING1B 到靶基因上催化 H2AK119 位点的泛素化并抑制其表达^[22]。MGA 对于 PRC1.6 复合体的装配和稳定性发挥着更加关键的作用,在 HEK293T 细胞中敲除 *Mga* 发现不仅该复合体各特异性组分在靶基因上的富集程度均受到明显抑制,且其中几个核心特异组分的蛋白总量明显下降,如 PCGF6、L3MBTL2 和 E2F6^[25]。从 L3MBTL2 的 RNA 干扰实验可知,部分靶基因的上调与其基因上富集的 H2K119ub1 水平的明显下降相伴发生,说明该因子对于 PRC1.6 复合体在靶基因区域组蛋白 H2AK119 位点的泛素化是必需的。同时,体外实验还发现 L3MBTL2 能够诱发染色质凝缩^[20]。

目前,关于 PRC1.6 复合体的靶向定位的研究结果显示该复合体的定位机制较为复杂,由多个组分协同执行,包括 MAX/MGA 和 E2F6/DP-1/2 这两对转录因子形成的异二聚体以及 L3MBTL2^[25](表 2)。MAX 和 MGA 通过各自的 bHLHZip (basic Helix-Loop-Helix-Zipper)结构域结合形成异二聚体,并特异性识别 E-boxes 序列 CACGTG;此外 MGA 的氮端还包含另一个 DNA 结合结构域,可识别 T-box 序列 AGGC_TGC_TGA,该异二聚体在 PRC1.6 复合体的组装、稳定性及靶基因识别上都发挥着重要作用^[25,26]。另一对转录因子是 E2F6 和 DP-1 或 DP-2,二者结合共同识别 E2F 家族识别序列 GCGGGA^[27]。与

表 2 PRC1.6 复合体中各组分的主要生化及分子功能

Table 2 The main biochemical and molecular functions of PRC1.6 components

组分名称	主要生化及分子生物学功能	文献
RING1B/ RYBP	RING1B 具有 E3 泛素连接酶活性,催化 H2AK119 泛素化从而抑制基因转录;RYBP 与 RING1B 直接互作,辅助增强 RING1B 酶活性,其泛素结合结构域可结合 H2A 上的泛素化修饰	[21,23,30]
HDAC1/2	去乙酰化酶,降低组蛋白特定位点的乙酰化水平,抑制靶基因转录	[21,31]
HP1 γ	与 H3K9 甲基化转移酶互作,参与染色质凝缩和异染色质形成与维持,并在转录延伸和 RNA 形成中发挥作用	[21,32]
PCGF6	招募 RING1B 到 PRC1 靶基因形成 H2AK119 单泛素化及维持 H3K27me3 水平来抑制基因表达;在复合体组装中发挥作用	[21,22,24,33,34]
MAX/MGA	是识别特定 DNA 序列结构域的转录因子异二聚体,帮助招募复合体到特定靶基因;主要抑制靶基因表达;MGA 对于该复合体装配及其他组分的蛋白稳定性十分重要	[21,25,35]
E2F6/DP-1	是识别特定 DNA 序列结构域的转录因子异二聚体,帮助招募复合体到特定靶基因。E2F6 在细胞 G ₀ 期结合至 E2F 应答基因启动子并沉默其表达;DP-1 调控 DNA 复制及细胞周期相关基因	[19,36,37]
L3MBTL2	具有组蛋白结合能力,参与染色质凝缩和转录抑制;其 MBT 结构域参与复合体装配及复合体靶向定位	[20,21,25,35]

E2F 家族的其他转录激活因子不同, E2F6 通常对其结合的序列调控的靶基因产生转录抑制效应。L3MBTL2 包含 4 个 MBT 结构域, 结合组蛋白 H3 和 H4, 但该结合是否依赖于组蛋白的甲基化状态目前还有争议^[28,29]。

3 PRC1.6 复合体在胚胎发育中抑制生殖谱系相关基因的表达

近年来不断积累的针对 PRC1.6 组分的 RNA 干扰或基因敲除实验已经充分证实 PRC1.6 复合体在

维持 ESCs 的自我更新及调控其分化能力方面, 尤其在抑制生殖谱系相关基因表达中发挥重要作用。在小鼠中, 该复合体组分的敲除往往造成胚层及/或胚外谱系不同程度的发育异常, 多数情况下产生胚胎致死表型(表 3), 由此可见, PRC 1.6 复合体在 ESCs 以及胚胎发育过程中发挥至关重要的调控功能。

3.1 PRC1.6 复合体参与 ESCs 干性维持及调控 ESCs 正常分化

PRC1.6 复合体的组分 RING1B、MAX、MGA、HP1 γ 、PCGF6 和 L3MBTL2 等都被报道对于 ESCs

表 3 PRC1.6 组分下调对 ESCs 及小鼠胚胎发育或性腺发育的影响

Table 3 Effects of down-regulation of PRC1.6 components on ESCs and mouse embryonic/gonad development

组分	敲低/敲除表型(ESCs)	敲低/敲除表型(小鼠胚胎发育)
RING1B	敲除后干细胞分化相关基因(含印记基因)转录去抑制, ESCs 异常分化 ^[47-49] ; 与 <i>Ring1a</i> 双敲除导致 H2A K119 泛素化标记消失, 同时释放对 pol 的转录延伸抑制 ^[50]	敲除后胚胎及胚外组织发育迟缓, 不能正常进入原肠胚阶段, E8.5 左右出现胚胎致死 ^[51] ; 半合子体轴和胸骨发育异常 ^[52] ; 在生殖细胞特异性敲除的雄鼠可存活但睾丸明显变小且不育 ^[53] ; 对原始生殖细胞的性别分化至关重要 ^[54]
RYBP	缺失后 ESCs 不能形成收缩的心肌细胞 ^[55] ; 对 ESCs 自我更新维持非必需, 但敲除导致 ESCs 不能形成囊胚, 生殖谱系相关基因及内源性反转录病毒表达去抑制 ^[38]	敲除后在受精卵着床后早期胚胎致死(E5.5~6.0), 对于胚胎存活及胚外组织的结构建成是必需的; 敲除 <i>Rybp</i> 的杂合子 CNS 系统发育异常 ^[56]
HDAC1/2	同时条件性敲除 <i>Hdac1</i> 和 2 导致细胞活力丧失, 基因失活从而导致有丝分裂纺锤丝异常增加和染色体分离缺陷, 多能性核心因子 <i>Oct4</i> , <i>Nanog</i> 等表达下调 ^[57]	敲除 <i>Hdac1</i> 会导致胚胎 E10.5 致死 ^[58] ; 在 E8.5 时诱导敲除 <i>Hdac1</i> 和 2 导致从 E12.5 开始产生突变的肺上皮细胞, 并且出生后全部死于呼吸窘迫 ^[59]
HP1 γ	敲除导致 ESCs 趋于分化且内胚层和神经发育缺陷, 细胞增殖能力下降 ^[60]	纯合敲除的小鼠只有约 1% 活到成年, 且雄性表现出性腺功能低下, 精子发生缺陷, 转座子活性升高 ^[61] ; 对于减数分裂中组蛋白 H3K9 甲基化修饰的识别至关重要 ^[62]
PCGF6	对于维持 ESCs 干性是必需的 ^[24] , 抑制小鼠 ESCs 过早分化 ^[22] ; 敲除导致干性相关基因表达下调, 中胚层及精子发生特异性基因上调, 在 iPS 形成实验中可有效取代 <i>Sox2</i> ^[33,34]	敲除小鼠可以存活并且可育, 但是存在部分胚胎致死现象, 出现骨骼同源异型转化及胎盘发育异常, 约有 1/3 的 <i>Pcgf6</i> ^{-/-} 胚胎在 E10.5 体现出明显的发育迟缓 ^[22]
E2F6	结合在生殖相关基因的启动子区抑制其表达 ^[63] ; 可以与 G ₀ 期相关基因的靶启动子区结合, 沉默 E2F-和 Myc-应答基因 ^[19]	<i>E2f6</i> 敲除小鼠可存活, 但是轴向骨骼出现同源异型转化; 2~3 个月龄的雄鼠睾丸发育异常, 支持细胞数目异常增加, 精母细胞及成熟的精子数目减少, 但未达到不孕程度 ^[64] ; <i>E2f6</i> 与 <i>Bmi1</i> 双敲小鼠生长迟缓, 且严重贫血 ^[65] ; 体细胞广谱表达生殖细胞特异性基因 ^[42]
DP-1	DP-1 的敲除不影响 ESCs 中细胞周期相关基因的表达 ^[66]	敲除小鼠胚胎外谱系发育及 DNA 复制异常, 于 E12.5 胚胎致死; 但对胚胎本身发育不是必需的 ^[66,67]
MAX	敲除后诱发 ESCs 进入减数分裂 ^[39,40]	影响胚胎及胚外组织发育, 在受精卵着床后早期发育停滞并于 E5.5~E6.5 胚胎致死 ^[44]
MGA	敲低导致 ESCs 明显分化甚至死亡, 生殖谱系发育及减数分裂相关基因去抑制 ^[45,68]	敲除导致小鼠胚胎中多能性的内细胞团细胞死亡(可能与调控腐胺合成酶 <i>Odc1</i> 有关), 于 E4.5~E5.5 胚胎致死 ^[45]
L3MBTL2	敲除后 ESCs 的增殖能力下降, 细胞周期改变, 干细胞分化异常; 生殖谱系发育及减数分裂及其他发育相关基因去抑制 ^[41]	缺失导致内细胞团不能形成正常的上胚层, 胚胎于 E7.5~9.5 致死 ^[41] ; 在生殖细胞中特异性敲除后, 雄鼠可育但精子数目减少, 睾丸小且呈现生育能力下降 ^[69]

的干性维持是必需的,这些组分在被敲除后均会引起 ESCs 分化异常(表 3)。另有一些因子如 RYBP 虽然对于 ESCs 的自我更新是非必需的,但对于 ESCs 的正常分化却是不可缺少的^[38]。2013 年, Maeda 等^[39]在小鼠 ESCs 中通过 siRNA 文库从 864 个候选基因中筛选能够抑制生殖细胞分化路径的重要基因,筛选到多个 PRC1.6 复合体组分,包括 *Max*、*Mga* 和 *L3mbtl2*,其中 *Max* 敲低效应最为显著,可诱发 ESCs 进入类似减数分裂的状态。Suzuki 等^[40]在 ESCs 中诱导性敲除 *Max* 后也发现表达上调的基因主要包括减数分裂和精子发生过程中的相关基因,如 *Hormad1*、*Dazl* 和 *Slc25a31* 等。通过细胞免疫荧光实验发现在 Dox 诱导 *Max* 敲除 10 天后, ESCs 发生类似减数分裂细胞的形态学变化,出现减数分裂前期(细线期和偶线期)相关蛋白 SYCP3 的表达,因此 PRC1.6 复合体功能异常导致减数分裂相关基因的异常高表达,使 ESCs 越过原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)直接形成类似减数分裂前期的细胞,说明 MAX 对于调控减数分裂的起始至关重要^[40]。

在小鼠 ESCs 中 PRC1.6 复合体不同组分的 ChIP-Seq 数据显示,该复合体在全基因组中靶向上万位点(由 PCGF6、L3MBTL2 和 MGA 共同靶向);当逐个敲除不同组分时,这些 PRC1.6 复合体靶基因中转录本水平发生上调的基因数目一般为数百个,如敲除 *Pcgf6* 导致 882 个基因上调^[25,26];敲除 *L3mbtl2* 导致 421 个^[25]或 167 个^[41]基因上调。这类对 PRC1.6 复合体调控最敏感的基因中包含不同类型的发育相关基因(如神经发育基因),但最显著的是特异性地包含生殖谱系及减数分裂关键基因^[24,25,40,41],这是其区别于其他 PRC1 复合体亚型所独具的功能。在敲除 *Pcgf6* 的 ESCs 中表达显著上调(>10 倍)的基因中有 49 个都是在精子发生过程中必不可少的基因^[22]。在 ESCs 中敲除 *Mga* 后发现与减数分裂相关的基因 *Taf7l*、*Slc25a31*、*Stra8* 和 *Sycp3* 表达量上调^[25]。同样,敲除 *Rybp* 的 ESCs 也呈现出生殖谱系相关基因特异性上调的现象^[38]。另有研究表明,PRC1.6 复合体同时抑制体细胞中生殖谱系相关基因的表达,如敲除 *E2f6* 基因的小鼠呈现出生殖谱系相关基因(*SMC1β* 和 *STAG3* 等)在体细胞中的异常表达^[42,43]。这些实验证据都支持 PRC1.6 复合体在 ESCs

等其他非生殖细胞类型中发挥稳定抑制生殖谱系特异性基因表达的作用,维持这些细胞类型的身份,限制其向生殖细胞谱系异常分化。

3.2 PRC1.6 复合体对于正常胚胎发育必不可少

PRC1.6 复合体对于哺乳动物胚胎发育的正常进行是必需的,但每个组分被敲除后小鼠所呈现的胚胎发育异常状况却有所区别,这一定程度上反映出每个组分在该复合体功能发挥中的权重不同以及部分组分可能因为参与多种复合体而具备更为多样的发育调控功能(表 3)。有研究表明,*Max* 敲除小鼠在 E5.5~6.5 时表现出胚胎及胚外组织发育阻滞,且不具备明显的胚胎特征或胚胎与胚外组织分界不清晰^[44]。*Mga* 的表达在小鼠 E3.5 时的内细胞团中以及 E4.5~E6.5 时具全能性的上胚层(epiblast)中均可检测到,当使用 *Mga^{Gt}/Mga^{Gt}* 纯合敲除 *Mga*,内细胞团在 E4.5 后随即发育停滞,细胞增殖无明显变化但细胞凋亡增加,上胚层不能正常形成^[45]。由 *Mga^{Gt}* 衍生出来的 *Mga^{Inv}* 等位基因呈现出 *Mga* 低表达表型,约一半 *Mga^{Inv}/Mga^{Inv}* 纯合小鼠在出生及哺乳期死亡,其余能存活并可育^[45]。早期通过原位杂交实验发现 *Mga* 在胚胎发育 E9.5~10.5 间广谱表达,在肢芽、腮弓及尾部区域高表达^[26]。为进一步澄清其在 E4.5 之后的发育调控功能,近期研究发现表达低剂量 *Mga* 的 *Mga^{Gt}/Mga^{Inv}* 杂合转基因小鼠在 E7.5~E12.5 之间死亡,主要由于 E7.5 之前上胚层全能性细胞发育停滞导致^[46],所以 *Mga* 对于上胚层的正常分化是必不可少的。*L3mbtl2* 缺失会导致多能性 ESCs 增殖及分化异常,在 E7.5 左右胚胎因不能正常形成原肠胚而致死,致死原因尚不明确^[41]。

4 PRC1.6 复合体调控雄性性腺发育及精子生成过程中生殖谱系基因的顺次激活

PRC1.6 复合体不仅可以影响胚胎发育中生殖谱系相关基因的表达,还可以影响精子生成和雄性性腺发育。从表 3 中可知,当分别敲除 *E2f6*、*Hp1γ*、*L3mbtl2* 和 *Ring1b* 时,小鼠都可存活,但会表现出

不同程度的睾丸发育不良及精子生成障碍。特异性敲除生殖细胞中 *Ring1b* 的小鼠呈现出睾丸发育异常和不育表型, GSCs 数目明显下降并且异常分化^[53]。最新研究表明, L3MBTL2 在小鼠精原细胞减数分裂前期高表达, 特异性敲除生殖细胞中 *L3mbtl2* 的雄鼠虽然可育但表现出睾丸重量减轻, 附睾中的精子数目减少及异常精子增多, 并出现睾丸早衰现象^[69]。进一步研究发现这些雄鼠的精原细胞在减数分裂前期出现染色体异常联会, 且影响延长型精子中组蛋白乙酰化水平和精子成熟过程中组蛋白向鱼精蛋白的转变, 说明 *L3mbtl2* 参与精子生成过程进而影响性腺发育。这些研究结果证明了 PRC1.6 复合体确实在精子发生及性腺发育过程中具有重要的作用。

近期关于 PRC1.6 复合体对生殖细胞分化过程中生殖谱系基因的表达调控也有相应的报道。Maezawa 等^[53]构建了生殖细胞特异性敲除 *Ring1b* 的小鼠, 并从出生 7 天的雄鼠中分离出未分化的精原细胞(Thy1⁺标记)和已初步分化的精原细胞(c-Kit⁺标记)。RNA-Seq 检测结果揭示, 与野生型相比 *Ring1b*^{-/-}小鼠的 Thy1⁺细胞中分别有 116 个基因表达下调和 69 个基因表达上调, c-Kit⁺细胞中有 1381 基因表达下调和 269 个基因表达上调。GO 分析发现大多数上调基因的功能与精子发生没有直接的关联, 而下调基因中富含调控精子分化的重要功能基因。Thy1⁺

和 c-Kit⁺的细胞中因 *Ring1b* 敲除表达下调的基因中有 78 个重叠, 包含许多精子发生过程中必要的调控基因(如 *Sall4*、*Plzf*、*Lin28a*、*Tdrd9* 和 *Piwi2*), 其中下调最显著的是 *Sall4*, 后续 ChIP 实验证实 *Sall4* 是 RING1B 的直接靶基因。c-Kit⁺细胞中因 *Ring1b* 敲除特异性下调的基因主要用于调节精原细胞分化(如 *Dmrt*、*Nxf2* 和 *Sohlh1d*)、减数分裂的开启(如 *Dazl* 和 *Stra8*)和 piRNA 的调控(如 *Tdrkh*、*Mael* 和 *Tdrd1*); 在正常精子发生中这些基因会在 Thy1⁺精原细胞向 c-Kit⁺精原细胞分化的过程中被高度激活, 且进一步研究证实 RING1B 与 SALL4 可以共同靶向并上调这群基因的表达。该研究表明 RING1B 可与 SALL4 协同调控生殖谱系基因的顺次激活, 这对生殖谱系细胞的正常分化及进入减数分裂等过程至关重要。

5 PRC1.6 复合体是精子发生表观遗传调控网络的重要组成部分

精子发生是一个受到多因素调控的复杂发育过程。表 4 简要概括了精子发生过程中已知的表观遗传调控机制的大致类型。参与甲基化的各类 DNA 甲基转移酶(DNMTs)的表达及活性在生殖细胞发育过程中呈现明显的动态变化, 这些 DNMTs 的异常往往

表 4 精子发育过程中的表观遗传调控方式

Table 4 The epigenetic regulatory mechanisms underlying spermatogenesis

调控类型	分类	作用靶点及分子功能举例	文献
DNA 甲基化		与原始生殖细胞的增殖状态以及染色体联会等有关	[84,85]
组蛋白修饰	甲基化	H3K4 甲基化水平在精原干细胞(SSCs)阶段最高; H3K9 和 H3K27 甲基化水平在 SSCs 阶段中较低, 在减数分裂过程中增加	[86]
	乙酰化	精子形成过程中, 组蛋白 H4 高度乙酰化, 有助于置换组蛋白变体	[87]
	磷酸化	小鼠精子组蛋白磷酸化影响染色质解凝集、减数分裂后染色质折叠和压缩、双线期精原细胞减数分裂等过程, 是组蛋白变体和/或鱼精蛋白替换的前提	[88]
	泛素化	E3 泛素连接酶 RNF8 异常导致精子细胞发育后期缺陷	[89,90]
	巴豆酰化	<i>Cdy1</i> 敲除小鼠组蛋白巴豆酰化失调和雄性生育能力降低, 附睾精子数和精子运动能力降低	[74]
组蛋白变体		睾丸 H1 变体 H1t2 影响精子形态和生育力	[91]
非编码 RNA	piRNA	在生殖细胞中抑制可转座元件的表达并指导该位置的新生甲基化; MILI 和 MIWI2 在影响 piRNA 生物合成及指导在不同类型转座元件上 DNA 新生甲基化方面功能有所区别	[92, 93]
	miRNA	调控 SSCs 自我更新相关转录因子的表达; 维持 SSCs 总数并调控 SSCs 动态平衡	[94, 95]
	lncRNA	小鼠精原细胞特异性表达的 lncRNA033862 调控 <i>Gfra1</i> 基因表达, 对于 SSCs 生存所必需	[96]
RNA 甲基化		mRNA 的 N ⁶ -腺苷甲基化修饰(m ⁶ A)确保在小鼠精子发生的不同阶段协调翻译	[97]

直接导致生殖细胞发育异常以及个体雄性不育^[70]。胚胎发育及生殖细胞发育过程中呈现动态变化的组蛋白甲基化、乙酰化等修饰对于建立细胞谱系的特异性身份至关重要^[71,72]。其他组蛋白修饰,如泛素化、磷酸化以及近几年新发现的组蛋白巴豆酰化等对精子发育也十分重要^[73,74]。在精子发育过程中,组装核小体的经典组蛋白在特定发育阶段被不同睾丸特异性组蛋白变体所替换,逐渐减弱 DNA 和组蛋白之间的作用,为大多数组蛋白在单倍体精子成熟的过程中被鱼精蛋白所替代做准备^[75,76]。非编码 RNA 如 piRNA 介导的 *Piwi* 基因沉默机制是精子发育及其他情况下抑制可转座元件活性的重要途径,对于精子的正常发育必不可少^[77];同时生殖细胞特异性表达的 lncRNAs 或 miRNAs 等在精子发育过程中也都起到重要的调控作用^[78-81]。另外,近几年发现 RNA 的修饰尤其是甲基化修饰可参与 RNA 的转录后加工、核输出、翻译及 RNA 稳定性调节等,在造血干细胞分化、精子发生、神经发育等发育过程中发挥重要作用^[82,83]。

如表 4 所示,生殖谱系基因的表达受到非常复杂精密的表观遗传调控网络的调控,PRC1.6 复合体作为该表观遗传调控网络的一部分,与该调控网络的其他“版块”之间存在着紧密的交互作用。目前已知 PRC1.6 复合体与 DNA 甲基化、组蛋白 H3K9me3 和 H3K27me3 等重要的表观遗传修饰存在协同作用,且这些协同互作呈现出明显的动态变化(图 1)。例如,在胚胎发育早期 E2F6 对于减数分裂相关基因的转录抑制主要通过与 PRC2 协同完成,但不依赖于 DNA 甲基转移酶 DNMT3B^[98];然而,在小鼠体细胞中 E2F6 则更多地通过招募 DNMT3B 对靶基因启动子进行甲基化来实现对这些生殖谱系特异性基因表达的有效抑制^[99]。有趣的是,虽然小鼠 ESCs 中 E2F6 与 DNMT3B 之间没有协同关系,但 MAX 与 DNA 甲基转移酶 DNMT1, DNMT3A, DNMT3B 之间存在明显的协同作用并抑制生殖谱系相关基因的转录^[100]。除了 PRC1.6 复合体自身包含 HP1 γ ,可实现对转录抑制标记 H3K9me3 的结合之外,最近有研究揭示 MAX 与 H3K9 甲基转移酶

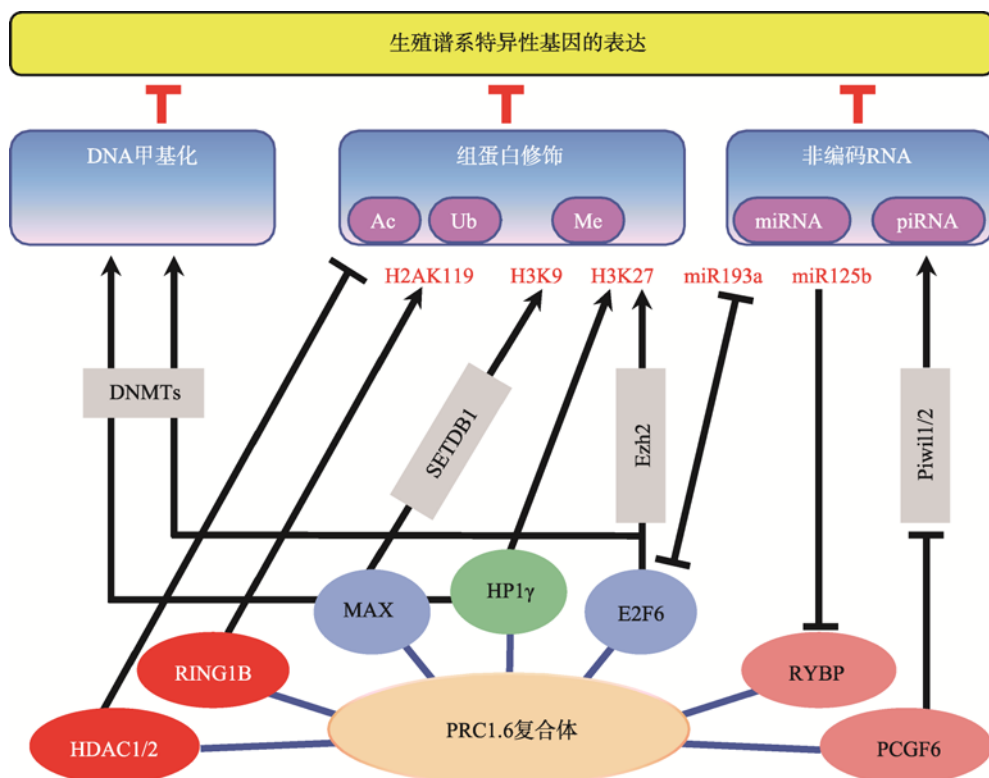


图 1 PRC1.6 复合体与其他表观遗传调控机制的相互作用

Fig. 1 The crosstalk between PRC1.6 and other epigenetic regulators

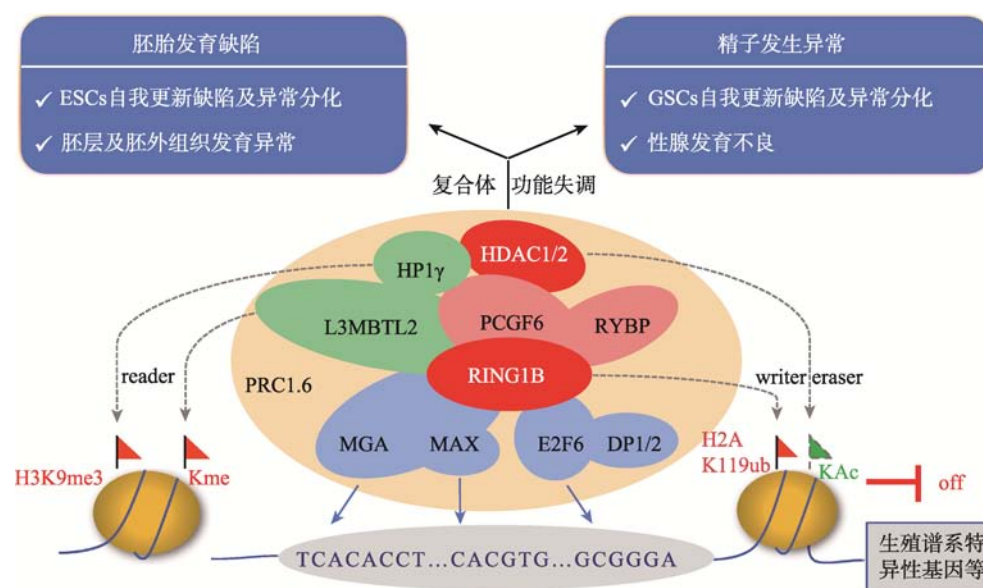


图2 PRC1.6复合体的组成、分子功能及活性异常产生的发育缺陷

Fig. 2 The composition, molecular functions of PRC1.6 complex and the developmental defects originated from its dysregulation

标注红色的组分为具有酶活性或辅助酶活性的因子；标注蓝色的组分为具有DNA结合能力的转录因子；标注绿色的组分为具有染色质结合能力的因子。

SETDB1可协同介导生殖谱系相关基因的转录抑制，但该机制并不依赖于PRC1.6复合体^[100]。另外，在PCGF6敲除的小鼠ESCs中，piRNA互作蛋白PIWIL1和PIWIL2的表达量均明显上升，意味着PRC1.6复合体通过抑制piRNA调控途径中重要RNA结合蛋白的表达水平来控制其活性^[24]。除此之外，PRC1.6复合体组分自身的表达水平受到严密调控，目前这方面的报道相对较少，已知RYBP^[101]和E2F6^[102]等均可以受到miRNA的调控。

6 结语与展望

本文总结了多梳蛋白PRC1.6复合体主要组分的分子功能及其在胚胎发育和精子发生中所扮演的重要角色(图2)。胚胎发育过程中PRC1.6复合体通过抑制生殖谱系相关基因及其他发育调控基因的表达确保了胚胎的正常分化。PRC1.6复合体也参与精子发生的表观遗传调控，顺次激活其不同阶段生殖谱系相关基因的表达，是正常精子发生及性腺发育的必要条件。尽管在过去的几年中有关PRC1.6复合体的组成及作用机制等方面取得了可喜的进展，但

对于该复合体具体的工作机制包括组分之间及整个复合体与其他表观调控途径之间的协调关系等的研究还有待深入。如PRC1.6各组分在调节减数分裂及精子形成过程中的具体分工还不够明确，以及该复合体如何实现对体细胞及不同分化阶段的生殖细胞中相关特异性基因的差异调控等。随着基因编辑技术以及现代分子生物学的进一步深入发展，PRC1.6各组分的具体功能以及它们之间的相互作用机制一定会研究得更加清晰，并将为与PRC1.6复合体组分突变或功能缺陷相关的男性不育的诊断与治疗带来新的思路。

参考文献(References):

- [1] Schuettengruber B, Bourbon HM, Di Croce L, Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax: 70 years and counting. *Cell*, 2017, 171(1): 34–57. [DOI]
- [2] Pasini D, Bracken AP, Helin K. Polycomb group proteins in cell cycle progression and cancer. *Cell Cycle*, 2004, 3(4): 396–400. [DOI]
- [3] Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, 1978, 276(5688): 565–570. [DOI]

- [4] Struhl G. A homoeotic mutation transforming leg to antenna in *Drosophila*. *Nature*, 1981, 292(5824): 635–638. [DOI]
- [5] Geisler SJ, Paro R. Trithorax and polycomb group-dependent regulation: a tale of opposing activities. *Development*, 2015, 142(17): 2876–2887. [DOI]
- [6] Ingham PW. Differential expression of bithorax complex genes in the absence of the extra sex combs and trithorax genes. *Nature*, 1983, 306(5943): 591–593. [DOI]
- [7] Creppe C, Palau A, Malinverni R, Valero V, Buschbeck M. A Cbx8-containing polycomb complex facilitates the transition to gene activation during ES cell differentiation. *PLoS Genet*, 2014, 10(12): e1004851. [DOI]
- [8] Gao Z, Lee P, Stafford JM, von Schimmelmann M, Schaefer A, Reinberg D. An AUTS2-polycomb complex activates gene expression in the CNS. *Nature*, 2014, 516(7531): 349–354. [DOI]
- [9] Morey L, Santanach A, Blanco E, Aloia L, Nora EP, Bruneau BG, Di Croce L. Polycomb regulates mesoderm cell fate-specification in embryonic stem cells through activation and repression mechanisms. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(3): 300–315. [DOI]
- [10] Margueron R, Li GH, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL, Dynlacht BD, Reinberg D. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell*, 2008, 32(4): 503–518. [DOI]
- [11] Margueron R, Justin N, Ohno K, Sharpe ML, Son J, Drury WJ, Voigt P, Martin SR, Taylor WR, De Marco V, Pirrotta V, Reinberg D, Gambelin SJ. Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature*, 2009, 461(7265): 762–767. [DOI]
- [12] Buchwald G, van der Stoep P, Weichenrieder O, Perrakis A, van Lohuizen M, Sixma TK. Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1B. *Embo J*, 2006, 25(11): 2465–2474. [DOI]
- [13] Li ZZ, Cao R, Wang M, Myers MP, Zhang Y, Xu RM. Structure of a Bmi1-Ring1b polycomb group ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem*, 2006, 281(29): 20643–20649. [DOI]
- [14] de Napoles M, Mermoud JE, Wakao R, Tang YA, Endoh M, Appanah R, Nesterova TB, Silva J, Otte AP, Vidal M, Koseki H, Brockdorff N. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell*, 2004, 7(5): 663–676. [DOI]
- [15] Cooper S, Dienstbier M, Hassan R, Schermelleh L, Sharif J, Blackledge NP, De Marco V, Elderkin S, Koseki H, Klose R, Heger A, Brockdorff N. Targeting polycomb to pericentric heterochromatin in embryonic stem cells reveals a role for H2AK119u1 in PRC2 recruitment. *Cell Rep*, 2014, 7(5): 1456–1470. [DOI]
- [16] Ma RG, Zhang Y, Sun TT, Cheng B. Epigenetic regulation by polycomb group complexes: focus on roles of CBX proteins. *J Zhejiang Univ-Sc B*, 2014, 15(5): 412–428. [DOI]
- [17] Gil J, O’Loghlen A. PRC1 complex diversity: Where is it taking us? *Trends Cell Biol*, 2014, 24(11): 632–641. [DOI]
- [18] Connelly KE, Dykhuizen EC. Compositional and functional diversity of canonical PRC1 complexes in mammals. *BBA-Gene Regul Mech*, 2016, 1860(2): 233–245. [DOI]
- [19] Ogawa H, Ishiguro K, Gaubatz S, Livingston DM, Nakatani Y. A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science*, 2002, 296(5570): 1132–1136. [DOI]
- [20] Trojer P, Cao AR, Gao ZH, Li Y, Zhang J, Xu X, Li G, Losson R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Farnham PJ, Reinberg D. L3mbtl2 protein acts in concert with PcG protein-mediated monoubiquitination of H2A to establish a repressive chromatin structure. *Mol Cell*, 2011, 42(4): 438–450. [DOI]
- [21] Gao Z, Zhang J, Bonasio R, Strino F, Sawai A, Parisi F, Kluger Y, Reinberg D. PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. *Mol Cell*, 2012, 45(3): 344–356. [DOI]
- [22] Endoh M, Endo TA, Shinga J, Hayashi K, Farcas A, Ma KW, Ito S, Sharif J, Endoh T, Onaga N, Nakayama M, Ishikura T, Masui O, Kessler BM, Suda T, Ohara O, Okuda A, Klose R, Koseki H. PCGF6-PRC1 suppresses premature differentiation of mouse embryonic stem cells by regulating germ cell-related genes. *eLife*, 2017, 6: e21064. [DOI]
- [23] Arrigoni R, Alam SL, Wamstad JA, Bardwell VJ, Sundquist WI, Schreiber-Agus N. The polycomb-associated protein RYBP is a ubiquitin binding protein. *FEBS Lett*, 2006, 580(26): 6233–6241. [DOI]
- [24] Zhao W, Tong H, Huang Y, Yan Y, Teng H, Xia Y, Jiang Q, Qin J. Essential role for polycomb group protein PCGF6 in embryonic stem cell maintenance and a noncanonical polycomb repressive complex 1 (PRC1)

- integrity. *J Biol Chem*, 2017, 292(7): 2773–2784. [DOI]
- [25] Stielow B, Finkernagel F, Stiewe T, Nist A, Suske G. MGA, L3MBTL2 and E2F6 determine genomic binding of the non-canonical Polycomb repressive complex PRC1.6. *PLoS Genet*, 2018, 14(1): e1007193. [DOI]
- [26] Hurlin PJ, Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA, Eisenman RN. Mga, a dual-specificity transcription factor that interacts with Max and contains a T-domain DNA-binding motif. *Embo J*, 1999, 18(24): 7019–7028. [DOI]
- [27] Cartwright P, Müller H, Wagener C, Holm K, Helin K. E2f-6: a novel member of the E2F family is an inhibitor of E2F-dependent transcription. *Oncogene*, 1998, 17(5): 611–623. [DOI]
- [28] Stielow C, Stielow B, Finkernagel F, Scharfe M, Jarek M, Suske G. SUMOylation of the polycomb group protein L3MBTL2 facilitates repression of its target genes. *Nucleic Acids Res*, 2013, 42(5): 3044–3058. [DOI]
- [29] Guo Y, Nady N, Qi C, Allali-Hassani A, Zhu H, Pan P, Adams-Cioaba MA, Amaya MF, Dong A, Vedadi M, Schapira M, Read RJ, Arrowsmith CH, Min J. Methylation-state-specific recognition of histones by the MBT repeat protein L3MBTL2. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(7): 2204–2210. [DOI]
- [30] Rose NR, King HW, Blackledge NP, Fursova NA, Ember KJI, Fischer R, Kessler BM, Klose RJ. RYBP stimulates PRC1 to shape chromatin-based communication between Polycomb repressive complexes. *eLife*, 2016, 5: e18591. [DOI]
- [31] Zimmerlin CD, Lancini C, Sno R, Rosekrans SL, McLean CM, Vlaming H, van den Brink GR, Bots M, Medema JP, Dannenberg JH. HDAC1 and HDAC2 collectively regulate intestinal stem cell homeostasis. *Faseb J*, 2015, 29(5): 2070–2080. [DOI]
- [32] Vakoc CR, Mandat SA, Olenchok BA, Blobel GA. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell*, 2005, 19(3): 381–391. [DOI]
- [33] Yang CS, Chang KY, Dang J, Rana TM. Polycomb group protein PCGF6 acts as a master regulator to maintain embryonic stem cell identity. *Sci Rep*, 2016, 6: 26899. [DOI]
- [34] Zdzienblo D, Li X, Lin Q, Zenke M, Illich DJ, Becker M, Müller AM. Pcgf6, a polycomb group protein, regulates mesodermal lineage differentiation in murine ESCs and functions in iPS reprogramming. *Stem Cells*, 2014, 32(12): 3112–3125. [DOI]
- [35] Huang Y, Zhao W, Wang C, Zhu Y, Liu M, Tong H, Xia Y, Jiang Q, Qin J. Combinatorial control of recruitment of a variant PRC1.6 complex in embryonic stem cells. *Cell Rep*, 2018, 22(11): 3032–3043. [DOI]
- [36] Bandara LR, Buck VM, Zamanian M, Johnston LH, La Thangue NB. Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. *Embo J*, 1993, 12(11): 4317–4324. [DOI]
- [37] Rowland BD, Bernards R. Re-evaluating cell-cycle regulation by E2Fs. *Cell*, 2006, 127(5): 871–874. [DOI]
- [38] Hisada K, Sánchez C, Endo TA, Endoh M, Román-Trufero M, Sharif J, Koseki H, Vidal M. Rybp represses endogenous retroviruses and preimplantation- and germ line-specific genes in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(6): 1139–1149. [DOI]
- [39] Maeda I, Okamura D, Tokitake Y, Ikeda M, Kawaguchi H, Mise N, Abe K, Noce T, Okuda A, Matsui Y. Max is a repressor of germ cell-related gene expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Commun*, 2013, 4: 1754. [DOI]
- [40] Suzuki A, Hirasaki M, Hishida T, Wu J, Okamura D, Ueda A, Nishimoto M, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Matsui Y, Izpisua Belmonte JC, Okuda A. Loss of Max results in meiotic entry in mouse embryonic and germline stem cells. *Nat Commun*, 2016, 7: 11056. [DOI]
- [41] Qin JZ, Whyte WA, Anderssen E, Apostolou E, Chen HH, Akbarian S, Bronson RT, Hochedlinger K, Ramaswamy S, Young RA, Hock H. 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): 319–332. [DOI]
- [42] Pohlers M, Truss M, Frede U, Scholz A, Strehle M, Kuban RJ, Hoffmann B, Morkel M, Birchmeier C, Hagemeyer C. A role for E2F6 in the restriction of male-germ-cell-specific gene expression. *Curr Biol: CB*, 2005, 15(11): 1051–1057. [DOI]
- [43] Storre J, Schäfer A, Reichert N, Barbero JL, Hauser S, Eilers M, Gaubatz S. Silencing of the meiotic genes Smc1beta and Stag3 in somatic cells by E2F6. *J Biol Chem*, 2005, 280(50): 41380–41386. [DOI]
- [44] Shen-Li H, O'Hagan RC, Hou H Jr, Horner JW, Lee HW, DePinho RA. Essential role for Max in early embryonic growth and development. *Gene Dev*, 2000, 14(1): 17–22. [DOI]
- [45] Washkowitz AJ, Schall C, Zhang K, Wurst W, Floss T,

- Mager J, Papaioannou VE. Mga is essential for the survival of pluripotent cells during peri-implantation development. *Development*, 2015, 142(1): 31–40. [DOI]
- [46] Burn SF, Washkowitz AJ, Gavrillov S, Papaioannou VE. Postimplantation Mga expression and embryonic lethality of two gene-trap alleles. *Gene Expr Patterns: GEP*, 2018, 27: 31–35. [DOI]
- [47] Jørgensen HF, Giadrossi S, Casanova M, Endoh M, Koseki H, Brockdorff N, Fisher AG. Stem cells primed for action: polycomb repressive complexes restrain the expression of lineage-specific regulators in embryonic stem cells. *Cell Cycle*, 2006, 5(13): 1411–1414. [DOI]
- [48] Terranova R, Yokobayashi S, Stadler MB, Otte AP, van Lohuizen M, Orkin SH, Peters AH. Polycomb group proteins EZH2 and RNF2 direct genomic contraction and imprinted repression in early mouse embryos. *Dev Cell*, 2008, 15(5): 668–679. [DOI]
- [49] Endoh M, Endo TA, Endoh T, Fujimura Y, Ohara O, Toyoda T, Otte AP, Okano M, Brockdorff N, Vidal M, Koseki H. 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. [DOI]
- [50] Stock JK, Giadrossi S, Casanova M, Brookes E, Vidal M, Koseki H, Brockdorff N, Fisher AG, Pombo A. Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase ii at bivalent genes in mouse ES cells. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(12): 1428–1435. [DOI]
- [51] Voncken JW, Roelen BA, Roefs M, de Vries S, Verhoeven E, Marino S, Deschamps J, van Lohuizen M. Rnf2 (Ring1B) deficiency causes gastrulation arrest and cell cycle inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(5): 2468–2473. [DOI]
- [52] Suzuki M, Mizutani-Koseki Y, Fujimura Y, Miyagishima H, Kaneko T, Takada Y, Akasaka T, Tanzawa H, Takihara Y, Nakano M, Masumoto H, Vidal M, Isono K, Koseki H. Involvement of the polycomb-group gene Ring1B in the specification of the anterior-posterior axis in mice. *Development*, 2002, 129(18): 4171–4183. [DOI]
- [53] Maezawa S, Hasegawa K, Yukawa M, Sakashita A, Alavattam KG, Andreassen PR, Vidal M, Koseki H, Barski A, Namekawa SH. Polycomb directs timely activation of germline genes in spermatogenesis. *Gene Dev*, 2017, 31(16): 1693–1703. [DOI]
- [54] Yokobayashi S, Liang CY, Kohler H, Nestorov P, Liu Z, Vidal M, van Lohuizen M, Roloff TC, Peters AH. PRC1 coordinates timing of sexual differentiation of female primordial germ cells. *Nature*, 2013, 495(7440): 236–240. [DOI]
- [55] Ujhelly O, Szabo V, Kovacs G, Vajda F, Mallok S, Prorok J, Acsai K, Hegedus Z, Krebs S, Dinnyes A, Pirity MK. Lack of RYBP in mouse embryonic stem cells impairs cardiac differentiation. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(18): 2193–2205. [DOI]
- [56] Pirity MK, Locker J, Schreiber-Agus N. RYBP/DEDAF is required for early postimplantation and for central nervous system development. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(16): 7193–7202. [DOI]
- [57] Jamaladdin S, Kelly RD, O'Regan L, Dovey OM, Hodson GE, Millard CJ, Portolano N, Fry AM, Schwabe JW, Cowley SM. Histone deacetylase (HDAC) 1 and 2 are essential for accurate cell division and the pluripotency of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(27): 9840–9845. [DOI]
- [58] Lager G, O'Carroll D, Rembold M, Khier H, Tischler J, Weitzer G, Schuettengruber B, Hauser C, Brunmeir R, Jenuwein T, Seiser C. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *Embo J*, 2002, 21(11): 2672–2681. [DOI]
- [59] Wang Y, Tian Y, Morley MP, Lu MM, Demayo FJ, Olson EN, Morrissey EE. Development and regeneration of Sox2+ endoderm progenitors are regulated by a Hdac1/2-Bmp4/Rb1 regulatory pathway. *Dev Cell*, 2013, 24(4): 345–358. [DOI]
- [60] Caillier M, Thénot S, Tribollet V, Birot AM, Samarut J, Mey A. Role of the epigenetic regulator HP1 γ in the control of embryonic stem cell properties. *PLoS One*, 2010, 5(11): e15507. [DOI]
- [61] Brown JP, Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Billur M, Schneider P, Winking H, Singh PB. Hplgamma function is required for male germ cell survival and spermatogenesis. *Epigenet Chromat*, 2012, 5(1): 18. [DOI]
- [62] Takada Y, Naruse C, Costa Y, Shirakawa T, Tachibana M, Sharif J, Kezuka-Shiotani F, Kakiuchi D, Masumoto H, Shinkai Y, Ohbo K, Peters AHFM, Turner JMA, Asano M, Koseki H. Hpl1 links histone methylation marks to meiotic synapsis in mice. *Development*, 2011, 138(19): 4207–4217. [DOI]
- [63] Leseva M, Santostefano KE, Rosenbluth AL, Hamazaki T, Terada N. E2f6-mediated repression of the meiotic Stag3 and Smc1 β genes during early embryonic development requires Ezh2 and not the de novo methyltransferase Dnmt3b. *Epigenetics*, 2013, 8(8):

- 873–884. [DOI]
- [64] Storre J, Elsässer HP, Fuchs M, Ullmann D, Livingston DM, Gaubatz S. Homeotic transformations of the axial skeleton that accompany a targeted deletion of E2f6. *Embo Rep*, 2002, 3(7): 695–700. [DOI]
- [65] Courel M, Friesenhahn L, Lees JA. E2f6 and Bmi1 cooperate in axial skeletal development. *Dev Dynam*, 2008, 237(5): 1232–1242. [DOI]
- [66] Kohn MJ, Leung SW, Criniti V, Agromayor M, Yamasaki L. Dp1 is largely dispensable for embryonic development. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(16): 7197–7205. [DOI]
- [67] Kohn MJ, Bronson RT, Harlow E, Dyson NJ, Yamasaki L. Dp1 is required for extra-embryonic development. *Development*, 2003, 130(7): 1295–1305. [DOI]
- [68] Hu G, Kim J, Xu QK, Leng YM, Orkin SH, Elledge SJ. A genome-wide RNAi screen identifies a new transcriptional module required for self-renewal. *Gene Dev*, 2009, 23(7): 837–848. [DOI]
- [69] Meng C, Liao J, Zhao D, Huang H, Qin J, Lee TL, Chen D, Chan WY, Xia Y. L3mbtl2 regulates chromatin remodeling during spermatogenesis. *Cell Death Differ*, 2019. doi: 10.1038/s41418-019-0283-z. [Epub ahead of print] [DOI]
- [70] Uysal F, Akkoyunlu G, Ozturk S. DNA methyltransferases exhibit dynamic expression during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online*, 2016, 33(6): 690–702. [DOI]
- [71] Ge SQ, Lin SL, Zhao ZH, Sun QY. Epigenetic dynamics and interplay during spermatogenesis and embryogenesis: Implications for male fertility and offspring health. *Oncotarget*, 2017, 8(32): 53804–53818. [DOI]
- [72] Xiong J, Wang H, Guo G, Wang S, He L, Chen H, Wu J. Male germ cell apoptosis and epigenetic histone modification induced by *Tripterygium wilfordii* Hook F. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20751. [DOI]
- [73] Sheng K, Liang X, Huang S, Xu W. The role of histone ubiquitination during spermatogenesis. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 870695. [DOI]
- [74] Liu S, Yu H, Liu Y, Liu X, Zhang Y, Bu C, Yuan S, Chen Z, Xie G, Li W, Xu B, Yang J, He L, Jin T, Xiong Y, Sun L, Liu X, Han C, Cheng Z, Liang J, Shang Y. Chromodomain protein CDYL acts as a crotonyl-CoA hydratase to regulate histone crotonylation and spermatogenesis. *Mol Cell*, 2017, 67(5): 853–866.e5. [DOI]
- [75] Maze I, Noh KM, Soshnev AA, Allis CD. Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(4): 259–271. [DOI]
- [76] Bao J, Bedford MT. Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. *Reproduction*, 2016, 151(5): R55–70. [DOI]
- [77] Russell SJ, Stalker L, LaMarre J. Piwis, piRNAs and retrotransposons: complex battles during reprogramming in gametes and early embryos. *Reprod Domest Anim*, 2017, 52(Suppl. 4): 28–38. [DOI]
- [78] Hong SH, Kwon JT, Kim J, Jeong J, Kim J, Lee S, Cho C. Profiling of testis-specific long noncoding RNAs in mice. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 539. [DOI]
- [79] Bie B, Wang Y, Li L, Fang H, Liu L, Sun J. Noncoding RNAs: potential players in the self-renewal of mammalian spermatogonial stem cells. *Mol Reprod Dev*, 2018, 85(8–9): 720–728. [DOI]
- [80] Chen X, Li X, Guo J, Zhang P, Zeng W. The roles of microRNAs in regulation of mammalian spermatogenesis. *J Anim Sci Biotechnol*, 2017, 8: 35. [DOI]
- [81] Wichman L, Somasundaram S, Breindel C, Valerio DM, McCarrey JR, Hodges CA, Khalil AM. Dynamic expression of long noncoding RNAs reveals their potential roles in spermatogenesis and fertility. *Biol Reprod*, 2017, 97(2): 313–323. [DOI]
- [82] Yang Y, Chen YS, Sun BF, Yang YG. RNA methylation: regulations and mechanisms. *Hereditas(Beijing)*, 2018, 40(11): 964–976. 杨莹, 陈宇晟, 孙宝发, 杨运桂. RNA 甲基化修饰调控和规律. *遗传*, 2018, 40(11): 964–976. [DOI]
- [83] Peer E, Rechavi G, Dominissini D. Epitranscriptomics: regulation of mRNA metabolism through modifications. *Curr Opin Chem Biol*, 2017, 41: 93–98. [DOI]
- [84] Oakes CC, La Salle S, Smiraglia DJ, Robaire B, Trasler JM. A unique configuration of genome-wide DNA methylation patterns in the testis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 104(1): 228–233. [DOI]
- [85] Hata K, Kusumi M, Yokomine T, Li E, Sasaki H. Meiotic and epigenetic aberrations in Dnmt3l-deficient male germ cells. *Mol Reprod Dev*, 2006, 73(1): 116–122. [DOI]
- [86] de Vries M, Ramos L, Housein Z, de Boer P. Chromatin remodelling initiation during human spermiogenesis. *Biol Open*, 2012, 1(5): 446–457. [DOI]
- [87] Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK, Usson Y, Pelletier R, Sèle B, Khochbin S, Rousseaux S. Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases.

- Eur J Cell Biol*, 2000, 79(12): 950–960. [DOI]
- [88] Hirota T, Lipp JJ, Toh BH, Peters JM. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature*, 2005, 438(7071): 1176–1180. [DOI]
- [89] Lu LY, Wu JX, Ye L, Gavrilina GB, Saunders TL, Yu XC. RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Dev Cell*, 2010, 18(3): 371–384. [DOI]
- [90] Sin HS, Barski A, Zhang F, Kartashov AV, Nussenzweig A, Chen JJ, Andreassen PR, Namekawa SH. RNF8 regulates active epigenetic modifications and escape gene activation from inactive sex chromosomes in post-meiotic spermatids. *Gene Dev*, 2012, 26(24): 2737–2748. [DOI]
- [91] Tanaka H, Iguchi N, Isotani A, Kitamura K, Toyama Y, Matsuoka Y, Onishi M, Masai K, Maekawa M, Toshimori K, Okabe M, Nishimune Y. HANP1/HIT2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(16): 7107–7119. [DOI]
- [92] Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, Morris P, Brownstein MJ, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Chien M, Russo JJ, Ju J, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*, 2006, 442(7099): 203–207. [DOI]
- [93] Manakov SA, Pezic D, Marinov GK, Pastor WA, Sachidanandam R, Aravin AA. MIWI2 and MILI have differential effects on piRNA biogenesis and DNA methylation. *Cell Rep*, 2015, 12(8): 1234–1243. [DOI]
- [94] Moritoki Y, Hayashi Y, Mizuno K, Kamisawa H, Nishio H, Kurokawa S, Ugawa S, Kojima Y, Kohri K. Expression profiling of microRNA in cryptorchid testes: MiR-135a contributes to the maintenance of spermatogonial stem cells by regulating FoxO1. *J Urology*, 2013, 191(4): 1174–1180. [DOI]
- [95] Niu Z, Goodyear SM, Rao S, Wu X, Tobias JW, Avarbock MR, Brinster RL. MicroRNA-21 regulates the self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(31): 12740–12745. [DOI]
- [96] Li L, Wang M, Wang M, Wu X, Geng L, Xue Y, Wei X, Jia Y, Wu X. A long non-coding rna interacts with gfra1 and maintains survival of mouse spermatogonial stem cells. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2140. [DOI]
- [97] Lin Z, Hsu PJ, Xing X, Fang J, Lu Z, Zou Q, Zhang KJ, Zhang X, Zhou Y, Zhang T, Zhang Y, Song W, Jia G, Yang X, He C, Tong MH. Mettl3-/Mettl14-mediated mRNA N(6)-methyladenosine modulates murine spermatogenesis. *Cell Res*, 2017, 27(10): 1216–1230. [DOI]
- [98] Leseva M, Santostefano KE, Rosenbluth AL, Hamazaki T, Terada N. E2f6-mediated repression of the meiotic stag3 and Smc1 β genes during early embryonic development requires Ezh2 and not the de novo methyltransferase Dnmt3b. *Epigenetics*, 2013, 8(8): 873–884. [DOI]
- [99] Velasco G, Hubé F, Rollin J, Neuillet D, Philippe C, Bouzinba-Segard H, Galvani A, Viegas-Péquignot E, Francastel C. Dnmt3b recruitment through E2F6 transcriptional repressor mediates germ-line gene silencing in murine somatic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(20): 9281–9286. [DOI]
- [100] Tatsumi D, Hayashi Y, Endo M, Kobayashi H, Yoshioka T, Kiso K, Kanno S, Nakai Y, Maeda I, Mochizuki K, Tachibana M, Koseki H, Okuda A, Yasui A, Kono T, Matsui Y. DNMTs and SETDB1 function as co-repressors in Max-mediated repression of germ cell-related genes in mouse embryonic stem cells. *PLoS One*, 2018, 13(11): e0205969. [DOI]
- [101] Li HH, Lai P, Jia JP, Song YW, Xia Q, Huang KM, He N, Ping WF, Chen JY, Yang ZZ, Li J, Yao MZ, Dong XT, Zhao JC, Hou CH, Esteban MA, Gao SR, Pei DQ, Hutchins AP, Yao HJ. RNA helicase DDX5 inhibits reprogramming to pluripotency by miRNA-based repression of RYBP and its PRC1-dependent and -independent functions. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(4): 462–477. [DOI]
- [102] Cheng FHC, Lin HY, Hwang TW, Chen YC, Huang RL, Chang CB, Yang W, Lin RI, Lin CW, Chen GCW, Mai SY, Lin JMJ, Chuang YM, Chou JL, Kuo LW, Li C, Cheng ASL, Lai HC, Wu SF, Tsai JC, Chan MWY. E2f6 functions as a competing endogenous RNA, and transcriptional repressor, to promote ovarian cancer stemness. *Cancer Sci*, 2019, 110(3): 1085–1095. [DOI]