



雄性减数分裂性染色沉默中缺失的一环: DDR分子的效应器

李孟静^{1,2,3,4,5†}, 李涵臻^{1,2,3,4,5†}, 刘洪彬^{1,2,3,4,5,6*}

1. 山东大学妇儿与生殖健康研究院, 济南 250012;
2. 山东大学, 生殖医学与子代健康全国重点实验室, 济南 250012;
3. 国家辅助生殖与优生工程技术研究中心, 济南 250012;
4. 山东大学, 生殖内分泌教育部重点实验室, 济南 250012;
5. 山东省生殖健康技术创新中心, 济南 250012;
6. 香港中文大学-山东大学生殖遗传联合实验室, 香港 999077

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: hongbin_sduivf@aliyun.com

收稿日期: 2023-08-31; 接受日期: 2023-10-11; 网络版发表日期: 2024-01-10

国家自然科学基金(批准号: 82071699)和国家重点研发计划(批准号: 2021YFC2700200, 2022YFC2702600)资助

摘要 在雄性哺乳动物减数分裂中, X染色体和Y染色体无法完全联会, 广泛的未联会区域会触发减数分裂性染色体沉默(meiotic sex chromosome inactivation, MSCI). MSCI是精子发生所必需的, 随着MSCI的启动, XY染色体结构重塑, 转化为一个与常染色体隔开的区域, 被称为XY body. 本文回顾了MSCI和XY body形成的机制研究. MSCI的启动是由DNA损伤反应(DNA damage response, DDR)通路介导的; DDR下游涉及多条通路, 经过梳理发现, 自粗线期中晚期到双线期早中期的基因沉默机制尚存在证据链缺失. 另外, 越来越多的证据表明, MSCI和随后的XY body形成可能是由相分离驱动, 相分离是一个支配无膜细胞器和其他生物分子凝聚物形成的物理过程. 本文综述了最近关于XY body和相分离机制的研究, 指出了相分离与XY body之间的潜在联系, 并提出了后续研究所面临的挑战.

关键词 性染色体, XY body, 生殖细胞, 表观遗传学, 液-液相分离

减数分裂是有性生殖生物的一种特殊的细胞分裂方式. 在这一过程中, DNA复制一次, 细胞连续分裂两次, 产生四个单倍体配子. 减数第一次分裂前期(减I前期)持续时间较长, 染色体行为复杂, 包括: 同源染色体配对、联会并通过重组交换遗传片段. 根据染色体形态及行为, 可将减I前期进一步划分为细线期、偶线

期、粗线期、双线期、终变期5个亚期^[1]. 在哺乳动物的粗线期精母细胞中, 与在粗线期完全联会的常染色体不同, XY染色体只在拟常染色体区域(pseudoautosomal region, PAR)联会. 性染色体上的基因也因此有其独特的表达方式, 即发生减数分裂性染色体沉默(meiotic sex chromosome inactivation, MSCI). 在MSCI

引用格式: 李孟静, 李涵臻, 刘洪彬. 雄性减数分裂性染色沉默中缺失的一环: DDR分子的效应器. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 73–83
Li M J, Li H Z, Liu H B. A missing link in male meiotic sex chromosome inactivation: the effectors of DDR factors (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 73–83, doi: 10.1360/SSV-2023-0198

过程中, 沉默的XY染色体被浓缩和重构, 形成一个独特的染色质结构区域被称为sex body或XY body^[2-8].

目前, MSCI的作用机制已经被广泛研究, MSCI起始是由DNA损伤反应(DNA damage response, DDR)途径介导的^[9,10]. 未完全联会的XY染色体被丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶ATR和ATR激活因子TOPBP1识别. ATR催化H2AX的139位点丝氨酸发生磷酸化(γ H2AX), γ H2AX招募MDC1. MDC1随后介导 γ H2AX扩散到整个XY染色体^[11-14], 由此形成一个正反馈回路: ATR和TOPBP1被招募到XY染色体, H2AX被磷酸化, MDC1结合 γ H2AX, 促进更多的ATR和TOPBP1结合. MSCI起始后, DDR招募一系列蛋白, 如SETDB1, RNF8及USP7等, 与下游组蛋白修饰联系起来, 多种组蛋白修饰之间协同与拮抗共同完成对XY染色体基因转录的精准调控^[15,16].

为了平衡雌雄细胞中性别连锁基因的剂量, 女性细胞中的一条X染色体发生转录沉默, 被称为X染色体失活(X chromosome inactivation, XCI)^[17]. X-非活性特异性转录本(X inactive specific transcript, XIST)是一种长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA), 在XCI的抑制性表观遗传修饰中具有关键的调控作用^[18]. 令人意外的是, XIST在MSCI中并不发挥功能^[19,20]. 高通量染色体构象捕获(high-throughput chromosome conformation capture, Hi-C)的开发, 使得研究减数分裂过程中全基因组的染色质构象和相互作用成为可能. 在XCI过程中染色质折叠形成超级结构域, 存在A和B的交替状态, 每个状态都优先与相同状态的其他位点相互作用^[21-24], 与XCI不同的是, 减数分裂过程中雄性XY染色体缺乏TADs和A/B间隔, 而呈现一种随机构象, 形成一个不与粗线阶段其他常染色体互作的独立区域^[17,25,26]. 此外, 在雄性减数分裂过程中, 与常染色体相比, X染色体内存在更多的长距离相互作用, XY body在形成过程中逐渐趋于球形^[25,27].

虽然没有正式证明, 领域内多认为液-液相分离(liquid-liquid phase separation, LLPS)可能参与了性染色体与其他常染色体的物理分离. LLPS是一个物理过程, 它将过饱和的液体混合物自发分离成稳定的、独特的、共存的液相. 在细胞核中, 相分离驱动多种基本结构的形成, 如核孔复合物^[28]、核仁^[29]、异染色质^[30]等. 另有研究表明, LLPS驱动转录不活跃和重复序列富集的异染色质区域的形成^[30,31], 如HP1 α 被证明

在体外发生LLPS, 并在果蝇早期胚胎中形成具有液态特性的异染色质小斑点^[30]. XY body汇集了大量可以发生相分离的蛋白, 如HP1家族, 53BP1, MDC1, SCML2等^[32-35], 然而相分离与DDR分子之间的关系以及相分离如何参与MSCI及XY body形成, 目前还尚未可知. 这同时也提出了一个问题: 雌雄X染色体沉默机制差异如此之大, 有何意义呢? 本文认为, MSCI区别于XCI存在的主要意义在于MSCI的可逆性. 在减数分裂中, 沉默的雄性XY染色体未折叠形成明显的“超级结构域”, 其TAD可持续保持到成熟精子及早期胚胎干细胞^[36]. 由此可见, 雄性MSCI并不依赖于染色体结构的改变, 且DDR介导的MSCI仅在减数分裂阶段短暂存在, 完成减数分裂后, XY染色体部分基因需要重启表达, 这提示MSCI存在可逆性. 结合相分离的生化特征, 我们提出XY染色体通过相分离排除RNA聚合酶II等转录相关蛋白质的假设.

1 雄性减数分裂中XY body形成和MSCI机制概述

在精子发生过程中, 生殖细胞经历漫长的发育, 形成成熟的功能性配子. 生殖细胞减I前期, 因其持续时间长和生物事件的复杂性而尤为特殊. 雄性生殖细胞从干细胞分化而来, 经过减数分裂前的DNA复制, 作为初级精母细胞进入减数分裂. 初级精母细胞包含母本和父本两组同源染色体, 同源染色体之间进行同源重组, 确保染色体准确分离的同时, 促进后代的遗传多样性. 随后, 初级精母细胞经历两次快速的细胞分裂, 形成四个单倍体圆形精子细胞^[37,38].

1.1 减数分裂XY body形成

在精母细胞减I前期, XY染色体经历结构重塑, 浓缩为致密的异染色质, 并形成XY body. XY body在19世纪90年代首次在哺乳动物精母细胞中被观察到(XY body报道时间在文献^[3]中有详细回顾). 起初, 研究人员认为, XY body通过膜结构与核内其他结构隔开, 将其命名为“性囊泡”^[39]. 随着研究的深入, 研究人员发现, XY body是一个无膜的结构体, 并将其重新命名为XY body^[3]. 截至目前, 一系列研究对XY body在不同阶段的特征进行了描述, 但XY body形成的分子机制和生物物理过程仍不清楚. 雄性MSCI与XY

body的形成相伴而行. 与常染色体不同, X和Y染色体只在其末端PAR区联会. 在小鼠早粗线期精母细胞中, 联会复合体(synapsis complex, SC)覆盖Y轴长度的72%和X轴长度的22%^[40]. 在减 I 前期, 精母细胞经历程序化的DSBs, DSB修复与染色体联会紧密相连. 在偶线期到粗线期转变过程中, 任何未联会染色质区域都会被沉默, 并在染色体完成联会后解除, 这一过程被称为减数分裂未联会染色体的沉默(meiotic silencing of unsynapsed chromatin, MSUC)^[41,42]. 由于XY染色体无法完全联会, 因此进入粗线期后的XY染色体依然保持转录沉默, MSCI是一种特殊形式的MSUC^[10].

XY body形成和MSCI的确切时间已经被广泛讨论, 目前多认为起始于早粗线期精母细胞. 然而随着技术的进步, 单细胞转录组测序结果显示, 减数分裂XY染色体上基因的沉默时期呈现多样性: (i) 一旦进入粗线期, 立即终止转录; (ii) 随着粗线期时期进展, 转录水平逐渐下降, 并于双线期达到最低水平. 第二类基因又可根据生殖细胞减数分裂完成后是否重启转录分为两类^[43-46]. 时期的差异不排除受实验技术的影响, 但也提示人们, MSCI调控机制存在多样性. 基于此, 也可以提出一个假设, XY body也是一个逐渐成熟的结构.

1.2 MSCI与DDR

MSUC, 特别是MSCI发生的机制, 已经被广泛研究. 涉及的蛋白可大致划分为两类, 感受器和效应器, 依序在MSCI中发挥功能. 首先, 感受器接收染色体未联会的信号, 如HORMAD1^[47], HORMAD2^[48]和BRCA1^[48,49]. 随后一系列效应器被招募至未联会的染色体轴, 并进一步扩散至染色质环, 正式启动MSCI. ATR-TOPBP1复合物被招募到未联会的XY染色体轴上, 并将H2AX的Ser139位点磷酸化. 随后, 在MDC1的介导下ATR-TOPBP1复合物进一步扩散到染色质环^[9,11-13]. MDC1缺失的情况下, ATR-TOPBP1和 γ H2AX仅沿着染色体轴分布, 而不扩散至染色体环上, 这表明这些DDR分子的第一步轴定位是独立于MDC1的^[14]. 随着ATR-TOPBP1复合物的扩散, 染色质环上的H2AX蛋白也被ATR磷酸化, 同时促进更多的ATR和TOPBP1结合^[12,13], 形成一个正反馈闭环, 每一环节对于XY body的形成和MSCI的启动都至关重要. MSCI相关蛋白依次招募过程总结如图1.

在粗线期, DDR分子从常染色体消失, 最终聚集于XY body处. 如何解释此过程的机制? 一些证据表明, 减数分裂SC的形成与此有关. 在雄性减数分裂中, SC中轴组分SYCP1, SYCE2, SIX6OS1等分子缺失后, 同源常染色体发生配对但联会异常, DDR分子可被常染色体DSB招募, 但无法聚集至XY body处^[50-52]. 在雌性减数分裂中, SC侧轴组分SYCP3是BRCA1招募至未联会染色体轴所必需的^[53]. 除了SC, 在含有HORMA结构域的蛋白HORMAD1和HORMAD2缺失后, DDR分子招募障碍, 表明HORMAD蛋白似乎是在DDR的上游发挥作用. 在粗线期, HORMAD1和HORMAD2在未联会的染色体轴上主动聚集, 进一步募集DDR分子聚集于XY body^[47,54-56]. 这些结果提示, XY body对于DDR分子的募集以及DDR分子在常染色体上的去除可能是一个主动的过程, 而不是DDR分子被动驱逐到XY body的过程.

近年来, MSCI的机制研究如火如荼, 同时也提出了一个问题, 在MSCI过程中, DDR分子聚集于XY body的作用是什么? 近期的一项研究提出了见解, 该研究构建了一个点突变小鼠模型, 将H2AX在DDR通路发挥重要功能的氨基酸残基酪氨酸142(Y142)转化为丙氨酸(H2ax^{Y142A}). 在H2ax^{Y142A}小鼠中, DDR分子在XY染色体上招募异常, ATR介导的DDR分子滞留在常染色体上. 精母细胞阻滞在中粗线期, 表明减数分裂正常进程需要将ATR介导的DDR信号通路从常染色体上去除, 并提出假设: 在粗线期阶段, MSCI的启动将DDR分子从常染色体隔离到XY body, 形成一个独立隔间, 隔离的DDR分子允许减数分裂从中粗线期开始继续进展. MSCI作为减 I 前期的检验点调控精母细胞的发育^[57,58]. 然而真相究竟如何, 仍需要大量深入的研究.

1.3 MSCI启动后的下游效应通路

近期的一项研究中, 研究者通过向体外培养的粗线期精母细胞中添加ATR抑制剂, 探索ATR介导的DDR通路在精母细胞MSCI中发挥的功能. 研究者认为, 仅DDR足以启动和维持MSCI, 包括基因沉默; DDR通路是MSCI启动和维持的主要机制^[59]. 然而, 考虑到ATR功能的广泛性以及体外实验的局限性, 无法排除研究结果是精母细胞状态受损而带来的次生影响的可能性. 另外, 有三点证据不支持仅依靠DDR就足以启动和维持MSCI这一结论: (i) 存在一类基因, 进

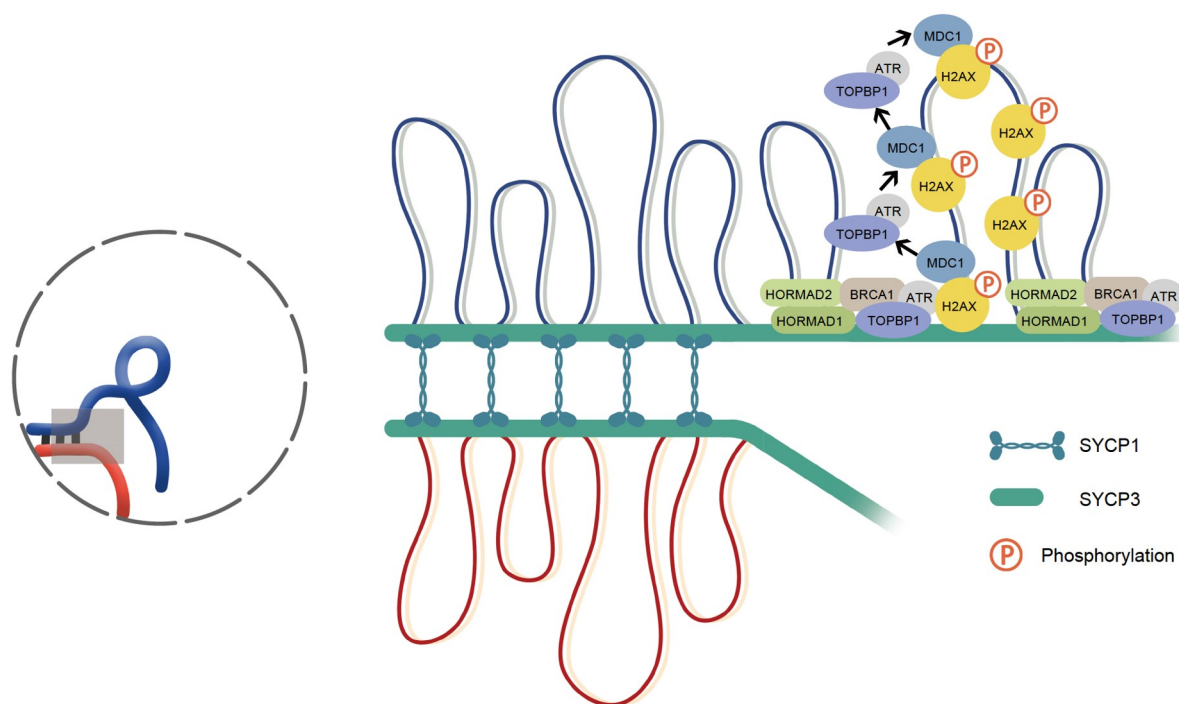


图 1 MSCI相关蛋白依次招募过程总结

Figure 1 MSCI mechanisms in mouse spermatocytes

入粗线期即终止表达。然而此时DDR分子并未在XY body处建立起“巨型结构域”，如不依赖于下游“效应器”，无法实现转录沉默。DDR分子缺失后，精母细胞多阻滞在IV期粗线期的表型佐证“效应器”在早粗线期的重要功能。(ii) 在精母细胞由偶线期向粗线期转变过程中，DDR分子广泛存在于常染色体及性染色体，然而DDR分子的缺失，并不会影响偶线期末期精母细胞全基因组范围的转录抑制，这提示DDR分子无法直接参与转录沉默。(iii) MSCI基因在粗线期及双线期各阶段呈现动态变化，然而“DDR巨型结构域”形成后，在这一阶段再无改变，无法实现对MSCI的精准调控，这也进一步佐证“效应器”在转录沉默过程的作用。

H3K9me3作为公认的转录抑制性组蛋白修饰，其甲基转移酶SETDB1可通过Tripartite motif-containing 28(TRIM28)被 γ H2AX招募，并负责早粗线期基因沉默^[16]。然而，进入中粗线期后，XY染色体上经典的组蛋白H3.1和H3.2，被H3.3所取代^[60]。这种替换伴随着大多数组蛋白翻译后修饰(posttranslational modifications, PTMs)的丢失，包括中粗线期H3K9me3的丢失，同时也发生在H3K9me1/2，这些修饰直至双线期晚期才在整

个XY body重新分布(图2)^[60,61]。HP1家族中的蛋白质，作为H3K9me3的reader，虽于粗线期定位于XY body^[32,62]，但仅在极晚期的双线期精母细胞中才覆盖整个XY染色体(图3)。在MSCI过程中，组蛋白的替换导致表观遗传修饰和染色质重塑都发生了显著的变化，这就提出了，中粗线期至双线期晚期精母细胞中，存在其他效应器的可能性。伴随着H3.1和H3.2的替换，有一点事实不能忽视，除了抑制性组蛋白修饰丢失，激活性组蛋白修饰，如H3K4甲基化修饰也会同时丢失^[60]。这些修饰于减数第一次分裂中期在RNF8的指导下重新获得，用于支持减数分裂后精子细胞中部分基因的激活^[15,63]。

在XY body内发生的蛋白质积累和表观遗传编程有一个动态的时间顺序。本文对招募至XY body的蛋白进行梳理，为效应器的预测奠定基础。DDR支架蛋白53BP1于中粗线期定位至XY body，且与MDC1相互作用。但在53bp1敲除小鼠没有任何异常，包括生育能力^[15]。一组与Fanconi anemia(FA)相关的DDR/DNA损伤修复蛋白，如SLX4(FANCP/BTBD12)^[64]，FANCI^[65]，FANCB^[66]于中粗线期定位至性染色体上，可正向调节

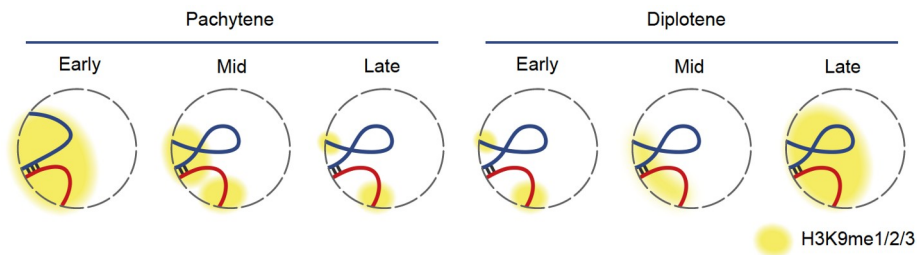


图 2 H3K9me1/2/3在XY body分布变化模式图

Figure 2 The localization of H3K9me1/2/3 in the XY body of pachytene and diplotene spermatocytes

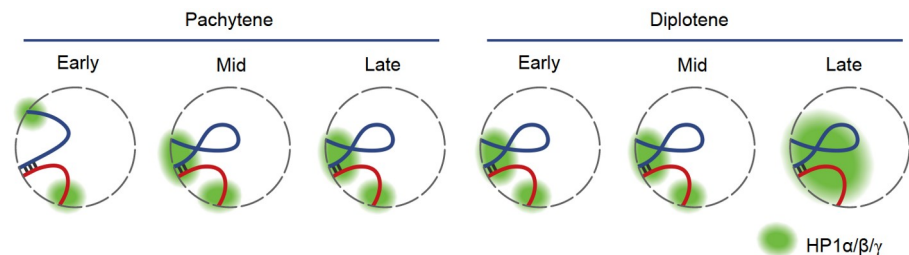


图 3 HP1α/β/γ在粗线期及双线期精母细胞中的定位

Figure 3 The localization of HP1α/β/γ in the XY body of pachytene and diplotene spermatocytes

H3K4me2和H3K9me2, 同时拮抗H3K9me3, 但并不参与MSCI. 除这些DDR介导的过程外, SCML2与USP7共同作用, 抑制Polycomb抑制复合物1(PRC1)介导的组蛋白H2A 119位赖氨酸的泛素化(H2AK119ub), 并影响RNF8介导的性染色体泛素化^[67-69]. SCML2虽参与调控与XY body相关的表观遗传和翻译后修饰, 但其在MSCI中的功能微弱. 综上, 目前研究中并没有一个合适的分子可以填补中粗线期至双线期这一MSCI效应器的空缺.

2 LLPS与MSCI

最新开发的Hi-C已成为研究减数分裂过程中全基因组染色质构象和相互作用的有力工具. 由于观察到X染色体受到独立且明确的调控, 研究者们首次指出, 雄性减 I 前期XY染色体可能形成物理上与常染色体分离的液滴, 进一步证实XY body是一个不与粗线期其他常染色体互作的独立区域^[36]. XY body于中粗线期形成, 但其形成的机制一直是该领域的一个有待解决的问题. 研究发现, 与常染色体相比, X染色体内存在更多的长距离相互作用, 这表明X染色体比常染色体更加柔软. 与杆状常染色体不同, XY染色体在XY

body形成过程中逐渐变成球形^[25], 这种独特的球形结构如同水中的油滴. 因此, 研究者推测LLPS可能参与了性染色体与其他常染色体的物理分离. LLPS是均匀流体分解成两个不同的液相的物理现象, 驱动各种细胞室的形成^[70]. 类似于水在油-水混合物中与油的分离方式, 许多无膜的细胞器, 如核仁^[71]、核孔复合体^[28]等, 都是通过LLPS与周围物质分离. 此外, 有研究表明, LLPS驱动转录不活跃和重复序列富集的异染色质区域的形成^[30]. 或许XY body通过LLPS将转录机器RNA聚合酶 II (RNA polymerase II, Pol II)等从XY body中驱逐出去的假设, 可填补中粗线期至双线期效应器的空缺.

2.1 定位于XY body的相分离蛋白与MSCI

随着研究者对转录机制的深入探索, XY body的研究也获得了一定启发. 高等生物中, 由Pol II介导的转录是一个高度动态的过程, 包括转录起始、启动子近端暂停、延伸和终止等步骤^[72-74]. 转录所需因子数量众多, 人们开始疑惑如此大规模的因子如何在细胞核进行有序组织, 即如何快速传递所需因子, 并保持起始和延伸因子的分离. Pol II介导的转录过程发生在一个无膜的核结构中, 通过超分辨显微镜可在细胞内

观察到Pol II的动态凝聚体, 这些凝聚体是由具有无序区域的蛋白质进行LLPS形成的. Pol II可以依赖于磷酸化状态的改变在这些凝聚体之间穿梭, 完成转录工作^[74-77].

相分离存在不同的相, 不同相之间的“相分离”有自己的临界点, 越过临界点的相会发生“相变”, 即从一个相到另一个相的转变, 造成相应的功能转变^[78,79]. 不同相之间, 蛋白极性转变以及蛋白翻译后修饰均可影响相分离^[80,81]. 那么目前已报道的定位至XY body的蛋白, 是否具有相分离的特性呢? 在MSCI启动发挥重要功能的MDC1分子, 在体外被证实与Pre-RNA结合后可发生LLPS^[33]; 53BP1及SCML2被证实可在体细胞中发生相分离^[34,35]. 其中SCML2进行光漂白后, 需要8.6 s才能恢复50%的稳定强度($t_{1/2}$), 被认为是一种更倾向于固态的相分离状态^[35]. 另外, HP1也在体外和体内显示LLPS的特性^[82]. 但遗憾的是, 目前没有研究探索定位于XY body的MSCI相关分子与Pol II之间的直接关系. 在XY body内出现的蛋白有一个动态的时间顺序, 但出现后大多可在粗线期及双线期内一直存在于XY body中, 这种蛋白积累的意义是什么呢? 有学者建立了一个可验证的假设, 即XY body以类液体状态开始, 蛋白质之间主要存在均匀的、较短范围的非共价相互作用; 然后, 随着时间的推移和各种蛋白质的加入, XY body开始获得一种凝胶状态, 由不均匀的、更长范围的非共价相互作用连接. 各种生物分子随着时间的推移继续改变成分的状态, 如从液体到凝胶到固态, 随着组分的迁移率逐渐降低, 形成越来越不可逆的相互作用状态^[7,8]. 这个模型对于MSCI的研究具有一定的指导意义, 但有一点不可忽视, 现已报道可发生相分离的蛋白, 如53BP1和SCML2等缺失后并不影响MSCI. 所以本文认为, 相分离模型中的关键蛋白尚未被发现.

2.2 核仁在MSCI中的功能预测

雄性XY染色体与核仁之间的联系在几十年前就已经被观察^[83]. 核仁从其常染色体核仁组织区分离, 并向XY body迁移^[84]. 在粗线期后期及双线期, 一个半月形的核仁包裹并覆盖在XY body表面. 核仁的颗粒组分深入到XY body的染色质部分^[39]. 原位杂交研究表明, 性染色体分布于细胞核和靠近核仁的位置并不是随机的^[85,86]. 目前尚不清楚XY body和核仁之间的

联系是如何形成的^[87], 迁移后核仁的功能也是未知的. Barr和Bertram^[88]将失活的X染色体描述为“核仁卫星”, 表明失活的X染色体和核仁之间存在密切的联系. 80%~90%失活的X染色体在S期中晚期定位于核仁^[89]. 这种关联通过核仁相关染色体结构域(nucleolus-associated domains, NADs)的全基因组定位得到证实^[90]. 失活X染色体定位于浓缩的核周室, 对建立其表观遗传状态和抑制其基因表达发挥了重要作用^[89,91]. 最新刊登在bioRxiv上的研究^[92]显示, 在果蝇中删除核糖体DNA(ribosomal DNA, rDNA)来消除核仁组装后, 着丝粒周围异染色质变得更加紧实, 重新组成一个“甜甜圈”的结构. 但研究中未涉及异染色质结构的变化是否伴随转录的影响. 这些证据都提示了核仁与转录抑制之间的关系, 如果XY body和失活X染色体与核仁具有相似的相分离特性, 那么转移后的核仁或许可以填补中粗线期至双线期效应器的空缺.

3 展望

在雄性减数分裂中, 性染色体重塑并通过MSCI转录沉默, 在粗线期形成明显的无膜结构. 虽然MSCI的分子基础已经被广泛研究, 相关分子总结见表1, 但目前尚不清楚是什么因素驱动了XY body的形成并介导了基因的沉默. 本文先对已报道的MSCI及XY body形成的机制进行了梳理. MSCI的启动是由DDR通路介导的; 在DDR的下游, 各通路错综复杂, 机制不甚明确. 可能是特殊表观遗传状态的构建, 导致MSCI及XY body的形成. 但由于组蛋白替换的存在, 在粗线期中晚期及双线期早中期存在抑制性表观遗传修饰缺失的情况. 因此, 这一阶段的MSCI及XY body的加工, 不排除是由其他分子负责, 后续仍需大量研究继续挖掘, 以解析这一领域内的“黑匣子”.

LLPS是细胞内无膜生物分子凝聚物组装的驱动因素. XY body和已知相分离无膜细胞器之间存在相似之处. 首先, XY body的外观与由相分离形成的其他无膜液滴相似, 是与常染色体相互作用频率较低的独立区域. 其次, XY body与已知的异染色质结构重塑和转录沉默之间也存在相似之处: (i) XY body与异染色质区域具有相同的沉默状态和组蛋白修饰, 如H3K9me3; (ii) 相分离蛋白HP1驱动异染色质的形成. HP1也定位于精母细胞的XY body. 不断发展的实验方

表 1 减 I 前期与MSCI 相关的蛋白

Table 1 MSCI related proteins in meiotic prophase I

蛋白名称	蛋白分子功能	减数分裂中的功能	敲除小鼠生殖表型	参考文献
ATR	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	DNA损伤感受器, H2AX二次磷酸化	纯合缺失导致胚胎死亡. 生殖系统条件性敲除会导致雌雄不育	[12,93]
BRCA1	DNA损伤修复	将ATRIP和ATR募集到未联会的染色体轴上, 参与同源染色体联会的监测和MSCI的建立	雄性不育, 精母细胞阻滞在中粗线期. 雌性可育	[48,49]
HORMAD1	染色体轴的组分	定位于未联会的染色体, 参与同源染色体的联会、重组和MSCI	雌雄均不育. 雄性出现精母细胞阻滞在早粗线期. 雌性发生早期胚胎死亡.	[54]
HORMAD2	染色体轴的组分	与HORMAD1相互作用, 参与ATR在未联会染色体的积累, 抑制姐妹单体间重组修复	雄性不育, 精母细胞阻滞在中粗线期; 雌性可育	[56]
MDC1	DNA损伤检验点	介导 γ H2AX由XY染色体轴扩散至整个染色体	雄性不育, 精母细胞阻滞在中粗线期; 雌性可育	[14]
SCML2	PRC1复合体亚基	参与建立独特的减数分裂性染色体表观基因组	雄性不育; 雌性未知	[68]
SETDB1	组蛋白甲基转移酶	促进性染色体结构重塑, 建立MSCI所必需的	雄性不育	[16]
H2AX	DNA损伤修复	促进性染色体结构重塑, 建立MSCI所必需的	雄性不育, 精母细胞阻滞在中粗线期; 雌性可育	[94]
TOPBP1	ATR激活因子	参与ATR激活及MSCI建立	雄性不育	[13]
MAPS	雄性粗线期特异蛋白	参与DSB修复及MSCI 建立	雄性不育, 精母细胞阻滞在早粗线期; 雌性可育	[95]
BRDT	睾丸特异性蛋白	促进XY染色体联会以及MSCI的建立	雄性不育	[96]

法已经被应用到研究LLPS的特性和机制, 包括体内和体外的方法. 尽管越来越多的线索表明, LLPS驱动着XY body的形成, 但到目前为止, 仍然没有直接的证据. 主要受限于两点: (i) 精母细胞无可替代的细胞系, 仅能依靠体内细胞分选进行研究, 且在体外无法长期存活; (ii) 精母细胞转染对技术的要求极为复杂, 不能通过简单的脂质体转染试剂进行转染, 无法通过快捷

的方式使XY body的蛋白可视, 以观察其相分离特性. 在未来, 研究其他细胞中LLPS的方法需要进行改进, 目前解释参与XY body形成的驱动力和因素仍然具有挑战性. 但随着探索LLPS特征的新方法逐渐出现, 人们对MSCI及XY body特性的认识将更加深入, 对精子发生过程机制的解析将更加完善, 有利于为临床治疗提供更多的理论基础.

参考文献

1 Handel M A, Schimenti J C. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 124–136

2 Turner J M A. Meiotic sex chromosome inactivation. *Development*, 2007, 134: 1823–1831

3 Solari A J. The behavior of the XY pair in mammals. *Int Rev Cytol*, 1974, 38: 273–317

4 McKee B D, Handel M A. Sex chromosomes, recombination, and chromatin conformation. *Chromosoma*, 1993, 102: 71–80

5 Hoyer-Fender S. Molecular aspects of XY body formation. *Cytogenet Genome Res*, 2003, 103: 245–255

6 Handel M. The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. *Exp Cell Res*, 2004, 296: 57–63

7 Alavattam K G, Maezawa S, Andreassen P R, et al. Meiotic sex chromosome inactivation and the XY body: a phase separation hypothesis. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 79: 18

8 Xu Y, Qiao H. A hypothesis: linking phase separation to meiotic sex chromosome inactivation and sex-body formation. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 674203

- 9 Ichijima Y, Sin H S, Namekawa S H. Sex chromosome inactivation in germ cells: emerging roles of DNA damage response pathways. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69: 2559–2572
- 10 Turner J M A. Meiotic silencing in mammals. *Annu Rev Genet*, 2015, 49: 395–412
- 11 Perera D, Perez-Hidalgo L, Moens P B, et al. TopBP1 and ATR colocalization at meiotic chromosomes: role of TopBP1/Cut5 in the meiotic recombination checkpoint. *Mol Biol Cell*, 2004, 15: 1568–1579
- 12 Royo H, Prosser H, Ruzankina Y, et al. ATR acts stage specifically to regulate multiple aspects of mammalian meiotic silencing. *Genes Dev*, 2013, 27: 1484–1494
- 13 Ellnati E, Russell H R, Ojarikre O A, et al. DNA damage response protein TOPBP1 regulates X chromosome silencing in the mammalian germ line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 12536–12541
- 14 Ichijima Y, Ichijima M, Lou Z, et al. MDC1 directs chromosome-wide silencing of the sex chromosomes in male germ cells. *Genes Dev*, 2011, 25: 959–971
- 15 Sin H S, Barski A, Zhang F, et al. RNF8 regulates active epigenetic modifications and escape gene activation from inactive sex chromosomes in post-meiotic spermatids. *Genes Dev*, 2012, 26: 2737–2748
- 16 Hirota T, Blakeley P, Sangrithi M N, et al. SETDB1 links the meiotic DNA damage response to sex chromosome silencing in mice. *Dev Cell*, 2018, 47: 645–659.e6
- 17 Robert Finestra T, Gribnau J. X chromosome inactivation: silencing, topology and reactivation. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 46: 54–61
- 18 Minajigi A, Froberg J E, Wei C, et al. A comprehensive Xist interactome reveals cohesin repulsion and an RNA-directed chromosome conformation. *Science*, 2015, 349: aab2276
- 19 McCarrey J R, Watson C, Atencio J, et al. X-chromosome inactivation during spermatogenesis is regulated by an *Xist/Tsix*-independent mechanism in the mouse. *genesis*, 2002, 34: 257–266
- 20 Marahrens Y, Panning B, Dausman J, et al. Xist-deficient mice are defective in dosage compensation but not spermatogenesis. *Genes Dev*, 1997, 11: 156–166
- 21 Szalaj P, Tang Z, Michalski P, et al. An integrated 3-Dimensional Genome Modeling Engine for data-driven simulation of spatial genome organization. *Genome Res*, 2016, 26: 1697–1709
- 22 Bonora G, Deng X, Fang H, et al. Orientation-dependent Dlx4 contacts shape the 3D structure of the inactive X chromosome. *Nat Commun*, 2018, 9: 1445
- 23 Giorgetti L, Lajoie B R, Carter A C, et al. Structural organization of the inactive X chromosome in the mouse. *Nature*, 2016, 535: 575–579
- 24 Wang C Y, Jégu T, Chu H P, et al. SMCHD1 merges chromosome compartments and assists formation of super-structures on the inactive X. *Cell*, 2018, 174: 406–421.e25
- 25 Wang Y, Wang H, Zhang Y, et al. Reprogramming of meiotic chromatin architecture during spermatogenesis. *Mol Cell*, 2019, 73: 547–561.e6
- 26 Patel L, Kang R, Rosenberg S C, et al. Dynamic reorganization of the genome shapes the recombination landscape in meiotic prophase. *Nat Struct Mol Biol*, 2019, 26: 164–174
- 27 Biggs R J, Liu N, Peng Y, et al. Micromanipulation of prophase I chromosomes from mouse spermatocytes reveals high stiffness and gel-like chromatin organization. *Commun Biol*, 2020, 3: 542
- 28 Schmidt H B, Görlich D. Transport selectivity of nuclear pores, phase separation, and membraneless organelles. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41: 46–61
- 29 Feric M, Vaidya N, Harmon T S, et al. Coexisting liquid phases underlie nucleolar subcompartments. *Cell*, 2016, 165: 1686–1697
- 30 Strom A R, Emelyanov A V, Mir M, et al. Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature*, 2017, 547: 241–245
- 31 Larson A G, Elnatan D, Keenen M M, et al. Liquid droplet formation by HP1 α suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature*, 2017, 547: 236–240
- 32 Metzler-Guillemain C, Metzler-Guillemain C, Luciani J, et al. HP1 β and HP1 γ , but not HP1 α , decorate the entire XY body during human male meiosis. *Chromosome Res*, 2003, 11: 73–81
- 33 Gai X, Xin D, Wu D, et al. Pre-ribosomal RNA reorganizes DNA damage repair factors in nucleus during meiotic prophase and DNA damage response. *Cell Res*, 2022, 32: 254–268
- 34 Kilic S, Lezaja A, Gatti M, et al. Phase separation of 53^{BP1} determines liquid-like behavior of DNA repair compartments. *EMBO J*, 2019, 38: e101379

- 35 Maezawa S, Alavattam K G, Tatara M, et al. A rapidly evolved domain, the SCML2 DNA-binding repeats, contributes to chromatin binding of mouse SCML2. *Biol Reprod*, 2019, 100: 409–419
- 36 Alavattam K G, Maezawa S, Sakashita A, et al. Attenuated chromatin compartmentalization in meiosis and its maturation in sperm development. *Nat Struct Mol Biol*, 2019, 26: 175–184
- 37 Guillon H, Baudat F, Grey C, et al. Crossover and noncrossover pathways in mouse meiosis. *Mol Cell*, 2005, 20: 563–573
- 38 Bolcun-Filas E, Handel M A. Meiosis: the chromosomal foundation of reproduction. *Biol Reprod*, 2018, 99: 112–126
- 39 Solari A J. The evolution of the ultrastructure of the sex chromosomes (sex vesicle) during meiotic prophase in mouse spermatocytes. *J Ultrastruct Res*, 1969, 27: 289–305
- 40 Goetz P, Chandley A C, Speed R M. Morphological and temporal sequence of meiotic prophase development at puberty in the male mouse. *J Cell Sci*, 1984, 65: 249–263
- 41 Baarends W M, Wassenaar E, van der Laan R, et al. Silencing of unpaired chromatin and histone H2A ubiquitination in mammalian meiosis. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 1041–1053
- 42 Turner J M A, Mahadevaiah S K, Fernandez-Capetillo O, et al. Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat Genet*, 2005, 37: 41–47
- 43 Chen Y, Zheng Y, Gao Y, et al. Single-cell RNA-seq uncovers dynamic processes and critical regulators in mouse spermatogenesis. *Cell Res*, 2018, 28: 879–896
- 44 Green C D, Ma Q, Manske G L, et al. A comprehensive roadmap of murine spermatogenesis defined by single-cell RNA-seq. *Dev Cell*, 2018, 46: 651–667.e10
- 45 Lukassen S, Bosch E, Ekici A B, et al. Single-cell RNA sequencing of adult mouse testes. *Sci Data*, 2018, 5: 180192
- 46 Jung M, Wells D, Rusch J, et al. Unified single-cell analysis of testis gene regulation and pathology in five mouse strains. *eLife*, 2019, 8: e43966
- 47 Daniel K, Lange J, Hached K, et al. Meiotic homologue alignment and its quality surveillance are controlled by mouse HORMAD1. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 599–610
- 48 Broering T J, Alavattam K G, Sadreyev R I, et al. BRCA1 establishes DNA damage signaling and pericentric heterochromatin of the X chromosome in male meiosis. *J Cell Biol*, 2014, 205: 663–675
- 49 Turner J M A, Aprelikova O, Xu X, et al. BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Curr Biol*, 2004, 14: 2135–2142
- 50 Gómez-H L, Felipe-Medina N, Sánchez-Martín M, et al. C14ORF39/SIX6OS1 is a constituent of the synaptonemal complex and is essential for mouse fertility. *Nat Commun*, 2016, 7: 13298
- 51 de Vries F A T, de Boer E, van den Bosch M, et al. Mouse *Sycp1* functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev*, 2005, 19: 1376–1389
- 52 Bolcun-Filas E, Costa Y, Speed R, et al. SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *J Cell Biol*, 2007, 176: 741–747
- 53 Kouznetsova A, Wang H, Bellani M, et al. BRCA1-mediated chromatin silencing is limited to oocytes with a small number of asynapsed chromosomes. *J Cell Sci*, 2009, 122: 2446–2452
- 54 Shin Y H, Choi Y, Erdin S U, et al. *Hormad1* mutation disrupts synaptonemal complex formation, recombination, and chromosome segregation in mammalian meiosis. *PLoS Genet*, 2010, 6: e1001190
- 55 Wojtasz L, Cloutier J M, Baumann M, et al. Meiotic DNA double-strand breaks and chromosome asynapsis in mice are monitored by distinct HORMAD2-independent and -dependent mechanisms. *Genes Dev*, 2012, 26: 958–973
- 56 Kogo H, Tsutsumi M, Inagaki H, et al. HORMAD2 is essential for synapsis surveillance during meiotic prophase via the recruitment of ATR activity. *Genes Cells*, 2012, 17: 897–912
- 57 Royo H, Polikiewicz G, Mahadevaiah S K, et al. Evidence that meiotic sex chromosome inactivation is essential for male fertility. *Curr Biol*, 2010, 20: 2117–2123
- 58 Abe H, Alavattam K G, Hu Y C, et al. The initiation of meiotic sex chromosome inactivation sequesters DNA damage signaling from autosomes in mouse spermatogenesis. *Curr Biol*, 2020, 30: 408–420.e5
- 59 Abe H, Yeh Y H, Munakata Y, et al. Active DNA damage response signaling initiates and maintains meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Commun*, 2022, 13: 7212

- 60 van der Heijden G W, Derijck A A H A, Pósfai E, et al. Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. [Nat Genet](#), 2007, 39: 251–258
- 61 Ueda J, Harada A, Urahama T, et al. Testis-specific histone variant *H3t* gene is essential for entry into spermatogenesis. [Cell Rep](#), 2017, 18: 593–600
- 62 Motzkus D, Singh P B, Hoyer-Fender S. M31, a murine homolog of *Drosophila* HP1, is concentrated in the XY body during spermatogenesis. [Cytogenet Genome Res](#), 1999, 86: 83–88
- 63 Ernst C, Eling N, Martinez-Jimenez C P, et al. Staged developmental mapping and X chromosome transcriptional dynamics during mouse spermatogenesis. [Nat Commun](#), 2019, 10: 1251
- 64 Holloway J K, Mohan S, Balmus G, et al. Mammalian BTBD12 (SLX4) protects against genomic instability during mammalian spermatogenesis. [PLoS Genet](#), 2011, 7: e1002094
- 65 Xu L, Xu W, Li D, et al. FANCI plays an essential role in spermatogenesis and regulates meiotic histone methylation. [Cell Death Dis](#), 2021, 12: 780
- 66 Kato Y, Alavattam K G, Sin H S, et al. FANCB is essential in the male germline and regulates H3K9 methylation on the sex chromosomes during meiosis. [Hum Mol Genet](#), 2015, 24: 5234–5249
- 67 Alavattam K G, Kato Y, Sin H S, et al. Elucidation of the fanconi anemia protein network in meiosis and its function in the regulation of histone modifications. [Cell Rep](#), 2016, 17: 1141–1157
- 68 Hasegawa K, Sin H S, Maezawa S, et al. SCML2 establishes the male germline epigenome through regulation of histone H2A ubiquitination. [Dev Cell](#), 2015, 32: 574–588
- 69 Luo M, Zhou J, Leu N A, et al. Polycomb protein SCML2 associates with USP7 and counteracts histone H2A ubiquitination in the XY chromatin during male meiosis. [PLoS Genet](#), 2015, 11: e1004954
- 70 Molliex A, Temirov J, Lee J, et al. Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. [Cell](#), 2015, 163: 123–133
- 71 Lafontaine D L J, Riback J A, Bascetin R, et al. The nucleolus as a multiphase liquid condensate. [Nat Rev Mol Cell Biol](#), 2021, 22: 165–182
- 72 Harlen K M, Churchman L S. The code and beyond: transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. [Nat Rev Mol Cell Biol](#), 2017, 18: 263–273
- 73 McCracken S, Fong N, Yankulov K, et al. The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. [Nature](#), 1997, 385: 357–361
- 74 Iborra F J, Pombo A, Jackson D A, et al. Active RNA polymerases are localized within discrete transcription ‘factories’ in human nuclei. [J Cell Sci](#), 1996, 109: 1427–1436
- 75 Zobeck K L, Buckley M S, Zipfel W R, et al. Recruitment timing and dynamics of transcription factors at the Hsp70 loci in living cells. [Mol Cell](#), 2010, 40: 965–975
- 76 Cisse I I, Izeddin I, Causse S Z, et al. Real-time dynamics of RNA polymerase II clustering in live human cells. [Science](#), 2013, 341: 664–667
- 77 Chong S, Dugast-Darzacq C, Liu Z, et al. Imaging dynamic and selective low-complexity domain interactions that control gene transcription. [Science](#), 2018, 361: eaar2555
- 78 Alberti S, Gladfelter A, Mittag T. Considerations and challenges in studying liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates. [Cell](#), 2019, 176: 419–434
- 79 Alberti S, Saha S, Woodruff J B, et al. A user’s guide for phase separation assays with purified proteins. [J Mol Biol](#), 2018, 430: 4806–4820
- 80 Ye S, Latham A P, Tang Y, et al. Micropolarity governs the structural organization of biomolecular condensates. [Nat Chem Biol](#), 2023, doi: 10.1038/s41589-023-01477-1
- 81 Wei M, Huang X, Liao L, et al. SENP1 decreases RNF168 phase separation to promote DNA damage repair and drug resistance in colon cancer. [Cancer Res](#), 2023, 83: 2908–2923
- 82 Keenen M M, Brown D, Brennan L D, et al. HP1 proteins compact DNA into mechanically and positionally stable phase separated domains. [eLife](#), 2021, 10: e64563
- 83 Gates R R. Nucleoli, satellites and sex chromosomes. [Nature](#), 1939, 144: 794–795
- 84 Tres L L. XY chromosomal bivalent: nucleolar attraction. [Mol Reprod Dev](#), 2005, 72: 1–6
- 85 Weipoltshammer K, Schöfer C, Almeder M, et al. Spatial distribution of sex chromosomes and ribosomal genes: a study on human lymphocytes

- and testicular cells. *Cytogenet Genome Res*, 1996, 73: 108–113
- 86 Schöfer C, Weipoltshammer K. Nucleolus and chromatin. *Histochem Cell Biol*, 2018, 150: 209–225
- 87 Handel M A. The XY body: an attractive chromatin domain. *Biol Reprod*, 2020, 102: 985–987
- 88 Barr M L, Bertram E G. A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature*, 1949, 163: 676–677
- 89 Zhang L F, Huynh K D, Lee J T. Perinucleolar targeting of the inactive X during s phase: evidence for a role in the maintenance of silencing. *Cell*, 2007, 129: 693–706
- 90 Dillinger S, Straub T, Nemeth A. Nucleolus association of chromosomal domains is largely maintained in cellular senescence despite massive nuclear reorganisation. *PLoS ONE*, 2017, 12: e0178821
- 91 Pandya-Jones A, Markaki Y, Serizay J, et al. A protein assembly mediates Xist localization and gene silencing. *Nature*, 2020, 587: 145–151
- 92 Rajshekar S, Adame-Arana O, Bajpai G, et al. Affinity hierarchies and amphiphilic proteins underlie the co-assembly of nucleolar and heterochromatin condensates. *bioRxiv*, 2023, doi:10.1101/2023.07.06.547894
- 93 MacQueen A J, Hochwagen A. Checkpoint mechanisms: the puppet masters of meiotic prophase. *Trends Cell Biol*, 2011, 21: 393–400
- 94 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. *Dev Cell*, 2003, 4: 497–508
- 95 Li M, Zheng J, Li G, et al. The male germline-specific protein MAPS is indispensable for pachynema progression and fertility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: e2025421118
- 96 Manterola M, Brown T M, Oh M Y, et al. BRDT is an essential epigenetic regulator for proper chromatin organization, silencing of sex chromosomes and crossover formation in male meiosis. *PLoS Genet*, 2018, 14: e1007209

A missing link in male meiotic sex chromosome inactivation: the effectors of DDR factors

LI MengJing^{1,2,3,4,5}, LI HanZhen^{1,2,3,4,5} & LIU HongBin^{1,2,3,4,5,6}

1 Institute of Women, Children and Reproductive Health, Shandong University, Jinan 250012, China;

2 State Key Laboratory of Reproductive Medicine and Offspring Health, Shandong University, Jinan 250012, China;

3 National Research Center for Assisted Reproductive Technology and Reproductive Genetics, Jinan 250012, China;

4 Key laboratory of Reproductive Endocrinology (Shandong University), Ministry of Education, Jinan 250012, China;

5 Shandong Technology Innovation Center for Reproductive Health, Jinan 250012, China;

6 CUHK-SDU Joint Laboratory on Reproductive Genetics, School of Biomedical Sciences, the Chinese University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China

In mammalian male meiosis, the X and Y chromosomes only synapse in the pseudoautosomal region, and the extensive unsynapsed regions trigger meiotic silencing of sex chromosomes (MSCI). MSCI is essential for spermatogenesis and, upon its initiation, leads to a remodeling of the X and Y chromosome structure, forming a distinct region separated from the autosomes, known as the XY body. In this study, we review the mechanisms underlying MSCI and XY body formation. The initiation of MSCI is mediated by the DNA damage response (DDR) pathway. Downstream of DDR, multiple pathways are involved; however, there is a gap in the evidence chain regarding the mechanisms from late pachytene to early/mid-diplotene. Additionally, increasing evidence suggests that MSCI and subsequent XY body formation may be driven by phase separation, a physical process governing the formation of membrane-less organelles and other biomolecular condensates. Here, we review recent studies on the mechanisms of MSCI and liquid-liquid phase separation (LLPS), highlighting the potential link between LLPS and XY body, and discuss the challenges for further investigation.

XY chromosomes, XY body, germ cell, epigenetics, liquid-liquid phase separation

doi: 10.1360/SSV-2023-0198