

PRDM9 KRAB结构域在减数分裂 DSB位点决定中的作用

丁健¹ 林震² 童明汉^{1,2*}

(¹国科大杭州高等研究院生命与健康科学学院, 浙江省系统健康科学重点实验室, 杭州 310024; ²中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 分子生物学国家重点实验室, 上海市分子男科学重点实验室, 上海 200031)

摘要 同源重组是减数分裂过程中的关键步骤, 对确保同源染色体正确分离和遗传多样性都有重要意义。重组位点并非随机分布于基因组中, 而是被限定在特殊区域, 被称为重组热点。在大多数哺乳动物中减数分裂重组位点的决定是由PRDM9介导的。PRDM9首先识别染色体上的特异结合序列, 然后催化序列附近核小体的H3K4me3修饰, 从而指导SPO11产生程序性的DNA双链断裂。PRDM9主要包括三个保守的结构域: 锌指结构域, 负责特异性DNA结合; PR/SET结构域, 催化H3K4me3修饰; 以及KRAB结构域, 其功能目前尚不清楚。该研究发现PRDM9的KRAB结构域特异敲除小鼠表现为减数分裂前期I阻滞。在机制上, KRAB结构域特异敲除导致H3K4me3无法在重组热点上形成, 继而导致DNA双链断裂产生于基因启动子区域而非重组热点区域。因此, KRAB结构域为PRDM9的组蛋白H3K4甲基转移酶活性所必需。

关键词 减数分裂; 同源重组; PRDM9; KRAB结构域

Role of PRDM9 KRAB Domain in Meiotic DSB Site Determination

DING Jian¹, LIN Zhen², TONG Minghan^{1,2*}

(¹Key Laboratory of Systems Health Science of Zhejiang Province, School of Life Science, Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310024, China; ²State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Key Laboratory of Molecular Andrology, CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Homologous recombination plays a crucial role in meiosis and is vital for ensuring the correct segregation of homologous chromosomes and genetic diversity. Recombination sites are not randomly distributed throughout the genome, but are limited to specific regions known as “recombination hotspots”. In most mammals, PRDM9 mediates the determination of recombination hotspots. PRDM9 recognizes a specific binding sequence on the chromosome, catalyzes the nucleosome H3K4me3 modification near the sequence, and then guides SPO11 to produce programmed DNA double-strand breaks. PRDM9 comprises three conserved structural domains: the zinc finger domain, responsible for specific DNA binding; the PR/SET domain, catalyzing H3K4me3 modification; and the KRAB domain, whose function is currently unclear. This study found that truncation of the KRAB domain of PRDM9 in mice results in the loss of its function, impeding meiotic prophase and gametogenesis. The researchers also identified that the KRAB domain is essential for the methyltransferase activity of PRDM9 and is involved in

收稿日期: 2023-03-20

接受日期: 2023-04-17

国家自然科学基金(批准号: 31930034)和国家自然科学基金青年项目(批准号: 32000585)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54921264, E-mail: minghan@sibcb.ac.cn

Received: March 20, 2023

Accepted: April 17, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31930034) and the Youth Program of National Natural Science Foundation of China (Grant No.32000585)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921264, E-mail: minghan@sibcb.ac.cn

the regulation of meiotic DSB formation at PRDM9-dependent hotspots.

Keywords meiosis; homologous recombination; PRDM9; KRAB domain

减数分裂是有性生殖出现的标志性事件,其生物学过程高度保守,可简述为染色体复制一次,细胞经两次分裂,产生单倍体配子。根据染色体变化,减数分裂可分为第一次减数分裂(meiosis I, MI)和第二次减数分裂(meiosis II, MII)。同源染色体分离发生于MI期,而姐妹染色单体分离发生于MII期。同源染色体配对、联会和同源重组就发生于MI前期。同源重组对于确保同源染色体正确分离和物种遗传多样性具有重要意义。

基于酵母、秀丽线虫、果蝇和小鼠等模式生物的研究,人们对同源重组的分子生物学机制有了初步认识。以小鼠为例,同源重组起始于拓扑异构酶VI(topoisomerase VI) SPO11和GM960(又称TOPOVIBL)所催化产生的DSBs(DNA double-strand breaks)^[1-3]。DSBs在基因组上形成的位点并非随机分布的,而是具有明显的位置偏好性,我们称之为重组热点(hotspots)。

在2006年, HAYASHI和MATSUI^[4]首次发现Meisetz蛋白[即PRDM9(PR domain-containing 9)],证实其为减数分裂所必需的生殖细胞特异性表达蛋白。在2009年, MIHOLA等^[5]证实PRDM9是至今唯一的物种间杂交不育的关键基因。特别是在2010年,有三个研究组共同阐释了在哺乳动物减数分裂过程中PRDM9决定重组热点在染色体上的分布^[6-8]。在人类和多种非人类物种中, PRDM9行使功能的分子机制陆陆续续得到了丰富和确证。

PRDM9主要包括三个结构域,从氨基端到羧基端依次为: KRAB(Krüppel-associated box)结构域、具有组蛋白甲基转移酶活性的PR/SET(PRDIBF1 and RIZ1 homology)结构域和C2H2锌指(C2H2 zinc finger)结构域。近期研究表明, PRDM9通过其锌指结构域识别并结合特异的基因间DNA序列,使得其PR/SET结构域能够作用于序列附近的核小体并催化组蛋白H3K4三甲基化[H3K4me3;也有可能包括H3K36三甲基化(H4K36me3)^[9]修饰,从而参与调控重组热点的分布^[10-11]。PRDM9还含有KRAB结构域,一般认为KRAB结构域可介导蛋白与蛋白之间的互作^[12]。在PRDM大家族中仅有PRDM9与PRDM7具有KRAB结构域^[13],而我们对KRAB的结构功能仍不清楚。

在哺乳动物细胞中,除了在重组热点处PRDM9依赖的H3K4me3修饰外,在基因启动子(promoter)

区也有其他酶催化的H3K4me3修饰。研究表明, PRDM9的缺失会导致DSBs发生在非PRDM9依赖的H3K4me3修饰区域,即启动子区。这些非正常的DSBs位点不能被成功修复,导致减数分裂停滞和细胞凋亡,成熟的精子和卵子不能形成^[10-11]。那么, PRDM9介导的H3K4me3是如何引导DSBs发生于其所选择的重组热点的呢?在减数分裂过程中,染色质组装成经典的轴-环结构。重组热点定位于染色质环,而DSBs发生于染色质轴。那么,DSBs起始因子(如Spo11和Gm960)又是如何克服空间障碍被募集到重组热点的呢?我们假设PRDM9是解决这些问题的钥匙,而其未知功能的KRAB结构域是该钥匙的关键。为了证明该假设,我们在小鼠中敲除PRDM9的KRAB结构域,发现突变组小鼠减数分裂阻滞于MI前期阶段,说明PRDM9的KRAB结构域对减数分裂过程是必需的。另外,我们证实KRAB结构域的敲除使PRDM9失去了H3K4me3修饰能力,即失去决定重组热点的功能,导致DSBs发生在错误的区域而无法被成功修复。

1 材料与方法

1.1 实验动物

上海南方模式生物科技有限公司利用CRISPR/Cas9技术构建获得各种基因型小鼠,如下:(1) PRDM9基因前定点敲入3XFlag-HA标签的杂合子小鼠,通过交配获得PRDM9^{HF/HF}基因型C57BL/6J小鼠;(2)在PRDM9基因前定点敲入3XFlag-HA标签并敲除exon1~3(KRAB结构域)的杂合子小鼠,通过交配获得PRDM9^{Km/Km}基因型纯合小鼠;(3)敲除PRDM9基因exon1~3,导致基因阅读框移码、蛋白功能缺失的杂合子小鼠,通过交配获得PRDM9^{KO}基因型纯合子小鼠。所有实验用小鼠均饲养于中国科学院分子细胞科学卓越创新中心SPF动物房(新生化大楼1714室),本研究中所用到的实验动物均为SPF级别小鼠,本研究严格遵循中国科学院分子细胞科学卓越创新中心实验动物管理委员会的规定并得到中国科学院分子细胞科学卓越创新中心科研伦理委员会的许可和支持(编号:2020-018)。

1.2 H&E染色、组织免疫荧光染色及TUNEL染色

睾丸在波恩氏液或4 °C的4%多聚甲醛(para-

formaldehyde, PFA)中固定过夜, 然后将其嵌入石蜡并切成5 μm 厚的切片。波恩氏液固定的切片经去蜡、复水, 然后用苏木精(H)和伊红(E)染色。对于免疫荧光研究, 将PFA固定的切片在10 mmol/L柠檬酸钠缓冲液(pH6.0)中煮沸15 min, 冷却至室温, 用PBST(含0.1% Triton X-100)洗涤, 在封闭液(PBS含10%驴血清、1% BSA、0.1% Triton X-100)中室温孵育60 min。然后于4 $^{\circ}\text{C}$ 用一抗(1:1 000)孵育过夜。在用PBST洗涤后, 孵育Alexa Fluor 488或594偶联二抗(1:500, Jackson ImmunoResearch)。使用荧光显微镜(Olympus)成像。根据原位细胞死亡检测试剂盒(荧光素法, Roche)说明进行TUNEL(TdT-mediated dUTP nick-end labeling)检测。

1.3 核铺展和免疫荧光实验

核铺展和免疫荧光实验方法如文献[26]所述。免疫荧光分析所用一抗如下: 兔源anti-SYCP3抗体(1:200, Abcam)、鼠源anti- γH2AX 抗体(1:1 000, Millipore)、兔源anti-HA抗体[1:500, CST(Cell Signaling Technology)]、鼠源anti-Flag抗体(1:500, Abcam)和兔源anti-PLZF(1:200, Santa Cruz)。所用二抗如下: Alexa Fluor 488或594偶联二抗(1:500, Jackson ImmunoResearch)。用荧光显微镜拍照并分析。

1.4 ChIP-qPCR和ChIP-seq

小鼠睾丸组织于34 $^{\circ}\text{C}$ 经胶原酶和胰酶消化后用含1%甲醛的PBS交联10 min, 用0.125 mmol/L的甘氨酸终止交联。细胞经预冷的PBS(1 mmol/L PMSF)洗两次后, 重悬于预冷的裂解液(20 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 500 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS)中, 于冰上裂解20 min。用Qsonica超声仪将DNA片段化为100~300 bp。15 000 $\times\text{g}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心30 min后收集上清。加入抗体H3K4me3(CST, 货号: #9751s)和蛋白A/G PLUS琼脂糖后4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。依次用以下溶液清洗: 裂解液、低盐缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl、250 mmol/L LiCl、1 mmol/L EDTA、0.5% NP-40、0.5% Na-deoxycholate)、TE缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA)。用洗脱液(50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 10 mmol/L EDTA, 1% SDS)洗脱, 再经解交联、蛋白和RNA消化后, 用PCR产物纯化试剂盒(QIAGEN, 货号: #28006)纯化DNA。一部分DNA样品利用real-time PCR进行分析, 另一部分送去公司进行高通量测序。再将ChIP-seq所有的数据与小鼠基因组序列(GRCm38/mm10)进

行比对。只有被判断有效的数据才会用于峰值分析。蛋白富集峰用MACS程序检测。

1.5 END-seq

将分离睾丸组织细胞获得的单细胞悬液立即嵌入0.75%琼脂糖插块中。分离后, 将细胞浓度控制在 $5\times 10^6\sim 7\times 10^6$ 个/mL, 并在每个1.5 mL管中分装1 mL细胞以用于制块。如有必要, 根据小鼠数量和分离的总细胞数, 每个样品制作多个插块。制备琼脂糖插块及END-seq方法详见文献[27-28]。简述如下, 琼脂糖嵌入细胞在4 $^{\circ}\text{C}$ 下固化15 min, 然后立即裂解并于50 $^{\circ}\text{C}$ 用蛋白酶K消化1 h, 转至37 $^{\circ}\text{C}$ 继续消化7 h。TE缓冲液清洗插块后, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 用RNase消化1 h。继而将插块按以下顺序处理, 用核酸外切酶VII(NEB)在37 $^{\circ}\text{C}$ 下处理1 h, 核酸外切酶T(NEB)在24 $^{\circ}\text{C}$ 下处理45 min。然后, 再对样本依次进行A-tailing adapter链接、染色质片段化和二轮adapter链接, 将最终获得的DNA文库扩增后, 通过NovaSeq平台进行高通量测序。将获得的reads通过Bowtie(v1.1.2)比对至小鼠基因组(GRCm38p2/mm10), 通过MACS(v1.4.3)进行峰值识别。

2 结果

2.1 PRDM9的KRAB结构域是减数分裂所必需的

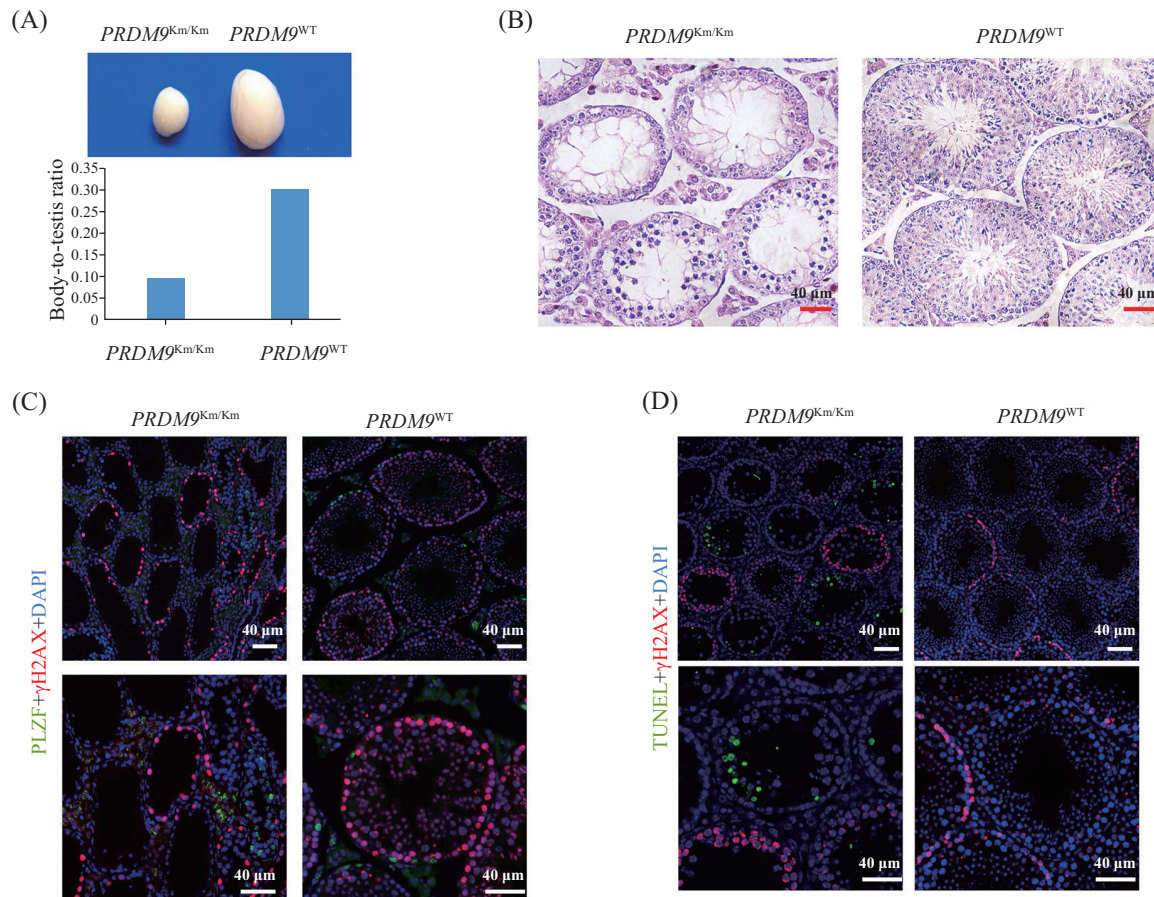
小鼠PRDM9基因位于第17号染色体(人类PRDM9基因位于第5号染色体), 包含10个外显子(10 exons), 其所编码的蛋白由843个氨基酸组成。为了研究PRDM9 KRAB结构域的功能, 我们采用CRISPR/Cas9技术, 通过同源重组的方式在PRDM9基因起始密码子ATG前插入3XFlag-HA, 并敲除部分exon1~3(KRAB结构域), 从而制备了KRAB结构域敲除的C57BL/6J小鼠(PRDM9^{Km/Km})。同时, 我们还制备了仅在Prdm9基因前插入3XFlag-HA的C57BL/6J小鼠(PRDM9^{HF/HF})。研究结果显示, 在形态学上, PRDM9^{Km/Km}基因型成年小鼠的睾丸与野生型(PRDM9^{WT})对照组相比显著变小(图1A)。H&E染色分析发现, PRDM9^{Km/Km}基因型小鼠生精上皮呈现第四期(Stage IV)异常, 揭示一些生精小管内的精子发生停滞于精母细胞阶段; 另一些生精小管上皮则严重空泡化, 仅存支持细胞和少量精原细胞, 该基因型小鼠表现为减数分裂前期I发育障碍, 最终出现雄性不育(图1B)。为了进一步证实, 我们对睾丸组织切片进行了PLZF(promyelocytic leukemia zinc finger, 精原细胞标

志物)和 γ H2AX(gamma H2AX, B型精原细胞和前期I精母细胞标志物)免疫荧光染色,发现 $PRDM9^{Km/Km}$ 基因型小鼠生精上皮包含有精原细胞、早期精母细胞,这与之前的结果一致(图1C)。

为了初步探究导致 $PRDM9$ KRAB结构域敲除小鼠无晚期精母细胞的原因,我们进行了TUNEL和 γ H2AX染色。结果表明,相比较于对照组, $PRDM9^{Km/Km}$ 基因型小鼠第四期生精上皮内有大量生精细胞凋亡(图1D)。综上所述,与已报道的 $PRDM9$ 敲除小鼠精子发生障碍表型一致,KRBA结构域的缺失导致减数分裂前期I精母细胞阶段的阻滞,并引起精母细胞的凋亡。

2.2 缺失KRAB结构域的 $PRDM9$ 蛋白正常表达且定位于核内

根据染色质形态,减数分裂前期I可分为细线期(leptotene)、偶线期(zygotene)、粗线期(pachytene)、双线期(diplotene)和终变期(diakinesis)等5个阶段^[14]。在细线期前期 $PRDM9$ 蛋白水平从无到有并快速升高,于偶线期末期迅速消失。一般认为 $PRDM9$ 的KRAB结构域位于其第23到86位氨基酸之间,而 $PRDM9^{Km/Km}$ 基因型小鼠中 $PRDM9$ 氨基端第21到91位共69个氨基酸被敲除,即KRAB结构域完全被敲除(图2A)。为了探明缺失KRAB结构域的 $PRDM9$ 是否正常转录与翻译,我们应用流式细胞分



A: 突变组($PRDM9^{Km/Km}$)与同龄对照组($PRDM9^{WT}$)小鼠代表性睾丸总体形态; B: 突变组($PRDM9^{Km/Km}$, 左)与对照组($PRDM9^{WT}$, 右)小鼠睾丸组织切片的H&E染色; C: 突变组($PRDM9^{Km/Km}$, 左)与对照组($PRDM9^{WT}$, 右)小鼠的免疫荧光染色, PLZF(精原细胞特异性转录因子, 绿色), γ H2AX(红色), DAPI(蓝色); D: 对突变组($PRDM9^{Km/Km}$, 左)与对照组($PRDM9^{WT}$, 右)小鼠睾丸组织切片进行TUNEL染色以检测精母细胞凋亡情况。TUNEL阳性为绿色, γ H2AX(红色), DAPI(蓝色)。

A: gross morphology of representative testes from an adult mutant ($PRDM9^{Km/Km}$) and age-matched control ($PRDM9^{WT}$) mice; B: H&E staining of mutant ($PRDM9^{Km/Km}$, left) and control ($PRDM9^{WT}$, right) testes; C: fluorescence staining of testis sections from mutant ($PRDM9^{Km/Km}$, left) and adult control ($PRDM9^{WT}$, right) mice with PLZF (spermatogonia-specific transcription factor, green), γ H2AX (red) and DAPI (blue); D: detection of apoptotic spermatogenic cells (TUNEL assay, green) from age-matched mutant ($PRDM9^{Km/Km}$, left) and control ($PRDM9^{WT}$, right) testes, with co-staining for γ H2AX (red) and DAPI (blue).

图1 $PRDM9$ 缺失KRAB导致精子发生障碍

Fig.1 KRAB domain deficiency of RPD $M9$ leads to impaired spermatogenesis

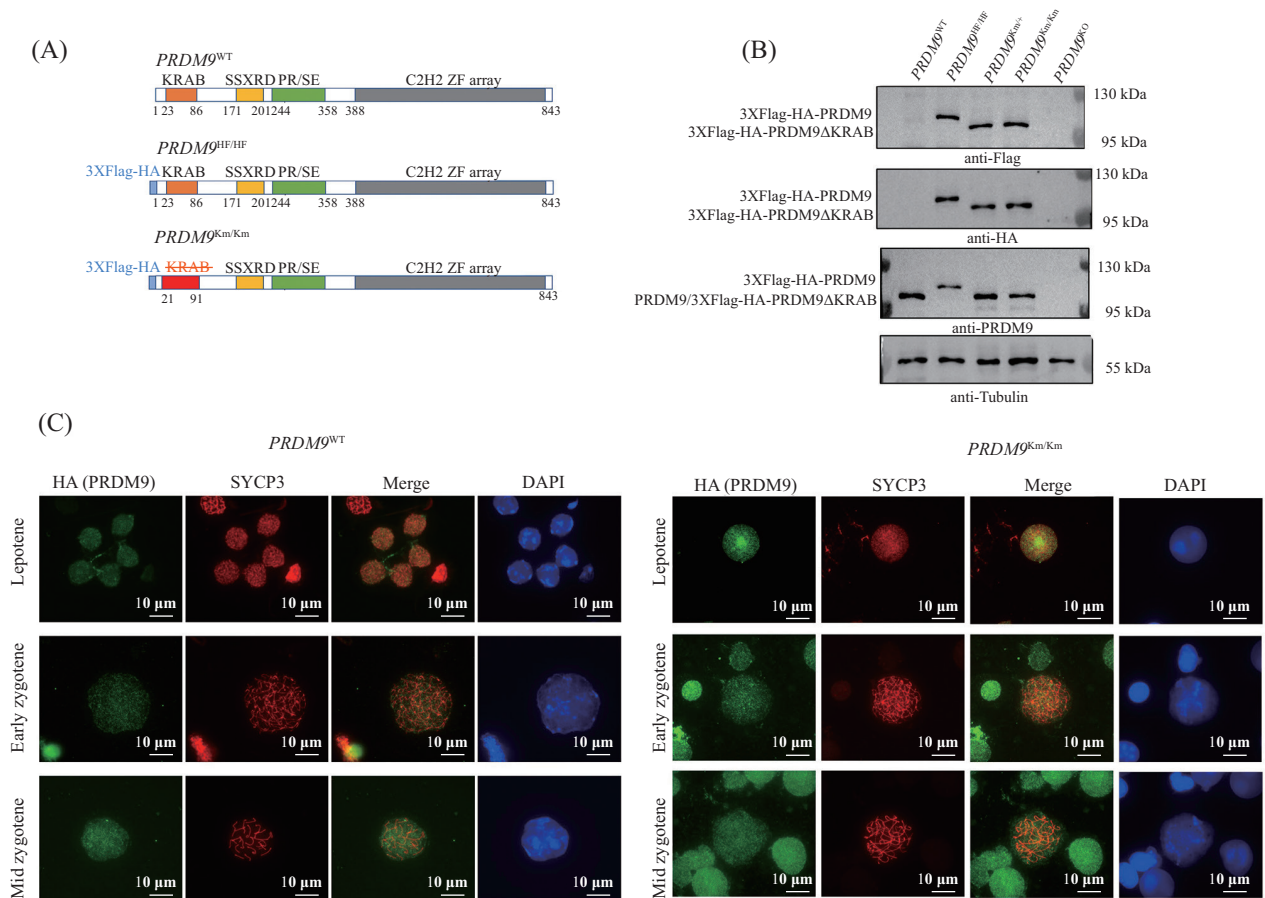
选方法分离纯化实验组和对照组小鼠的细线期和偶线期精母细胞。细胞裂解后抽提蛋白,通过Western blot成功检测到缺失KRAB结构域的PRDM9截短体(称为PRDM9 Δ KRAB),同时证明带有3XFlag-HA标签的PRDM9和PRDM9 Δ KRAB敲入小鼠构建成功。PRDM9完全敲除小鼠(PRDM9 KO)作为阴性对照,在其中未检测到PRDM9蛋白(图2B)。

已知PRDM9是在细胞核内发挥其功能的,那么PRDM9 Δ KRAB是否会丢失其核定位能力呢?于是,应用精母细胞染色体铺片技术,结合SYCP3(标记联会复合体侧轴组分)和HA(标记PRDM9)免疫荧光染色,我们发现在PRDM9 $^{Km/Km}$ 基因型小鼠中PRDM9 Δ KRAB正常分布在细线期和偶线期精母细胞核内,与野生型小鼠(PRDM9 $^{HF/HF}$)中PRDM9的核分

布并没有差异(图2C)。而且结合之前Western blot结果表明,在核内PRDM9 Δ KRAB蛋白水平也与对照组无明显差异。综上所述,KRAB结构域的缺失不会影响PRDM9的正常表达,以及其核内定位和分布。

2.3 PRDM9的KRAB结构域对其甲基化酶活性是必需的

PRDM9催化H3K4me3修饰参与调控重组热点的选择。虽然体外表达纯化的PRDM9 SET结构域独自具有组蛋白H3甲基化酶活性^[15],但在体内面对复杂的染色质环境和特殊的调控需求,其催化活性的发挥可能需要KRAB结构域的参与辅助。为了研究PRDM9的KRAB结构域缺失引起减数分裂前期I发育障碍的机制,我们采用染色质免疫共沉淀-测序(chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq)方法,对H3K4me3在

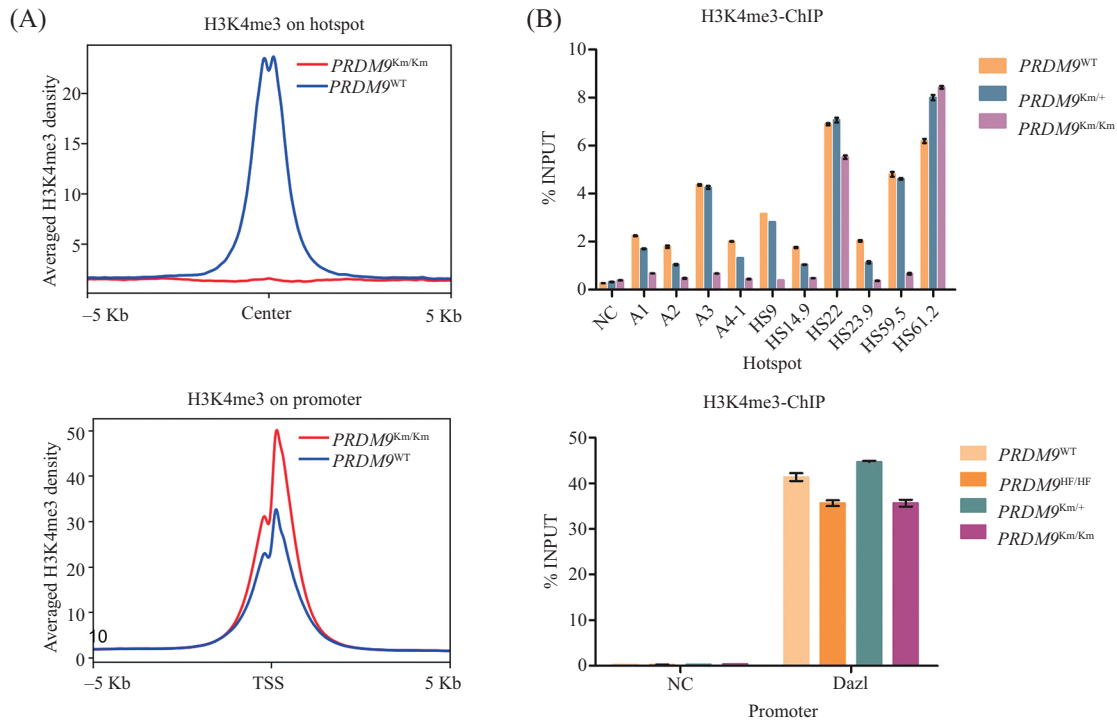


A: PRDM9 WT 、PRDM9 $^{HF/HF}$ 和PRDM9 $^{Km/Km}$ 基因型小鼠PRDM9蛋白表达示意图; B: Western blot验证PRDM9蛋白在PRDM9 WT 、PRDM9 $^{HF/HF}$ 、PRDM9 $^{Km/+}$ 、PRDM9 $^{Km/Km}$ 和PRDM9 KO 基因型小鼠精母细胞(细线期和偶线期)中的表达; 同一样品使用Tubulin作为内参; C: PRDM9 WT (右边)和PRDM9 $^{Km/Km}$ (左边)小鼠细线期和偶线期精母细胞核铺展后,应用HA(PRDM9,绿色)、SYCP3(红色)和DAPI(蓝色)进行免疫荧光染色。

A: schematic representation of the PRDM9 proteins expressed in PRDM9 WT , PRDM9 $^{HF/HF}$ and PRDM9 $^{Km/Km}$ mice; B: Western blot was used to verify PRDM9 expression in spermatocyte (leptotene and zygotene) of PRDM9 WT , PRDM9 $^{HF/HF}$, PRDM9 $^{Km/+}$, PRDM9 $^{Km/Km}$, PRDM9 KO mice. The same member was stained with an anti-Tubulin antibody as loading control; C: immunofluorescent analysis of HA (PRDM9, green), SYCP3 (red), and DAPI (blue) in chromosome spreads of PRDM9 WT (left) and PRDM9 $^{Km/Km}$ (right) spermatocytes at leptotene and zygotene.

图2 PRDM9缺失KRAB不影响其核定位及分布

Fig.2 Loss of KRAB in PRDM9 does not affect its nuclear localization and distribution



A: 在 *PRDM9^{WT}* (蓝色) 和 *PRDM9^{Km/Km}* (红色) 精母细胞(细线期和偶线期)中, 以 hotspot 相关的 H3K4me3 富集中心或 TSS 中心附近区域(-5 Kb~5 Kb) 为基础, 绘制了 H3K4me3 tag 密度的量化曲线。使用 50 bp 分辨率的 ChIP-seq 数据覆盖度计算 H3K4me3 tag 密度; B: qRT-PCR 分析 H3K4me3 免疫富集到的 DNA 片段。在 10 个已知经典重组热点处设计引物。阴性对照组(NC)引物设计在非 H3K4me3 富集区域。

A: profile of the averaged H3K4me3 tag density on hotspot-associated H3K4me3 peaks or TSS (transcription start site) peaks in *PRDM9^{WT}* (blue) and *PRDM9^{Km/Km}* (red) spermatocytes (leptotene and zygotene). H3K4me3 tag density was calculated using H3K4me3 ChIP-seq read coverage with 50 bp resolution; B: qRT-PCR is performed to analyze H3K4me3 immune-enriched DNA fragments. Primer designed in 10 well known hotspot. NC (negative control) primer is designed in no H3K4me3 region.

图3 PRDM9 缺失 KRAB 结构域导致其失去甲基转移酶活性

Fig.3 PRDM9 without the KRAB domain loses its histone methyltransferase activity

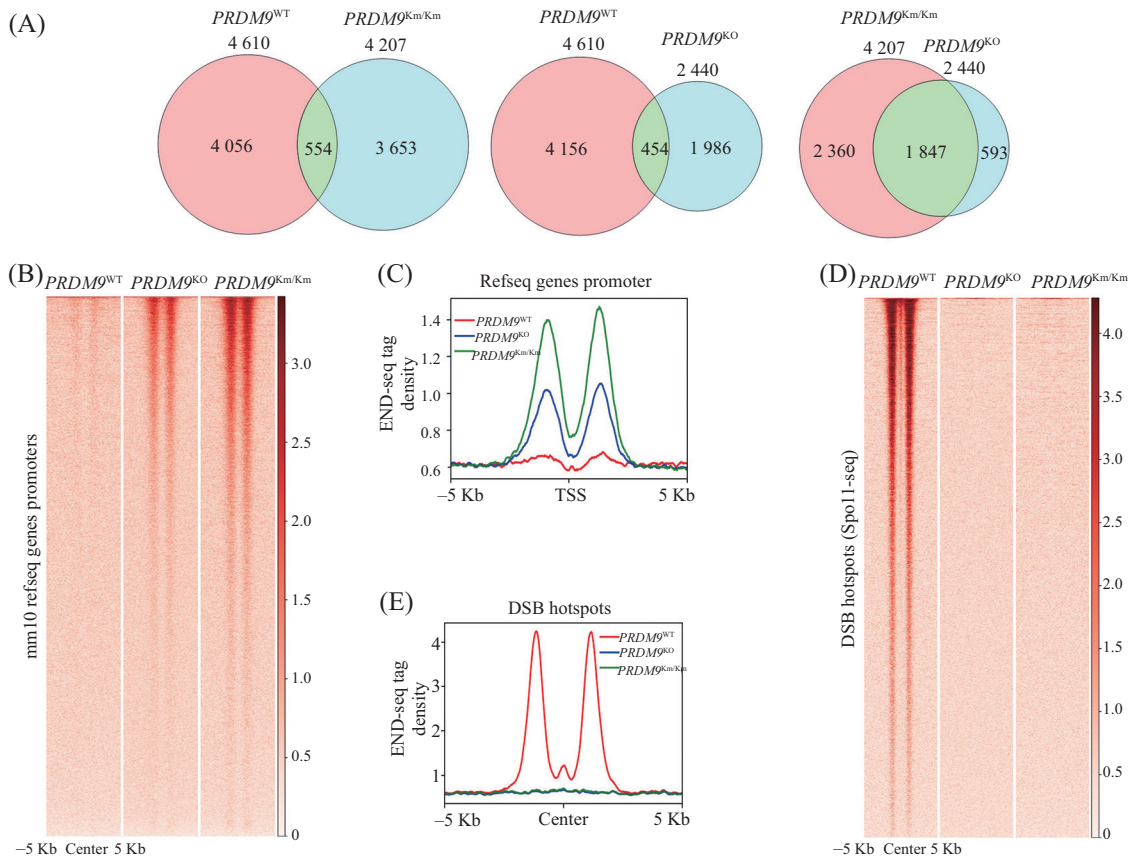
表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

名称 Name	正义序列(5'→3') Forward sequence (5'→3')	反义序列(5'→3') Reverse sequence (5'→3')
A1	AGT CAG CAC TCG GGT GTC TAT CA	CAG GCT GTC ACT GTA TTC TGT ATC AC
A2	CCT ATG GGG TAT CTT CTT TTG AAG A	AAG AAG CTG TTG CCA CAT TTC TAG
A3	AGT CTG GTC CTT GAT TAT CTC ATG C	GCA AGT GCC TAC TTG AAC TTC TAC AT
A4-1	CAA ATG GTG GCA TCT GAT TCT AC	CCT ACT TGT TTT CAT TTG ACC CA
HS9	TGG GAC TAC AGG GTG AAA CCA	TTG ACA AGC AAA GGC AGG AGA
HS14.9	CAC TGT GGG CTT TGT GTC TGC	ACG AAT GGG TGG GGA GAG AG
HS22	GCA TTC GCT TCT GAA AAC TGT G	GAG AAC ACT GAG AAG GGA GGT AGC
HS23.9	TCC AGG AAT CCA GTG TTG AGC	CAT TTG AAT GTT GGG TGA GGG
HS59.5	TTC GGA CCC TAA TAC TTC CCT G	GAG CAT CTG TCT GTC CTC CAT CT
HS61.2	CAT CAT CAA GGC ATC TCG TAG C	CAA GGC AAA CAA GAA TCC AAA CT
NC	CGC TCA ATA TCT AGG TTA CGG C	CAT ACC ACC CTG GAA CAC TCA GA

重组热点区 (hotspot, Center 上下游各 5 Kb) 和启动子区 [promoter, 转录起始位点(transcription start site, TSS) 上下游各 5 Kb] 的富集状况分析后作出量化曲线(图3A)。结果显示相对于野生型小鼠, *PRDM9^{Km/Km}* 基因型小鼠精

母细胞中, H3K4me3 修饰在重组热点区的富集消失了, 而在启动子区的富集水平显著升高。为了进一步证实, 我们应用 ChIP-qPCR 方法, 选择在已知的 10 个重组热点处检测 H3K4me3 修饰水平(表1), 与之前的结果一致,



A: 对 $PRDM9^{WT}$ 、 $PRDM9^{KO}$ 和 $PRDM9^{Km/Km}$ 小鼠进行 END-seq 所获得的 peaks 数量及其重叠分析; B、D: heatmaps 分析, END-seq tag (DSB) 在 TSS (promoter, B) 或重组热点中心 (Spo11-oligo 定义, D) 前后 5 Kb 范围内的分布密度; C、E: 在 $PRDM9^{WT}$ (红色)、 $PRDM9^{KO}$ (蓝色) 和 $PRDM9^{Km/Km}$ (绿色) 小鼠精母细胞中 TSS (C) 或重组热点中心 (E) 前后 5 Kb 范围内 END-seq tag 的量化曲线。

A: number of END-seq peaks and overlap analysis of called peaks between $PRDM9^{WT}$, $PRDM9^{KO}$ and $PRDM9^{Km/Km}$ mice; B, D: heatmaps of END-seq ± 5 Kb around TSS (B) or hotspot (D) centers (determined by SPO11-oligo summits), ordered by total read count of END-seq from $PRDM9^{WT}$ (red), $PRDM9^{KO}$ (blue) and $PRDM9^{Km/Km}$ (green); C, D: profile of the averaged END-seq tag density ± 5 Kb around TSS (C) or DSB hotspots centers (E) in $PRDM9^{WT}$ (red), $PRDM9^{KO}$ (blue) and $PRDM9^{Km/Km}$ (green) mouse spermatocyte.

图4 END-seq探究减数分裂DSBs形成位点

Fig.4 END-seq detects meiotic DSBs formation sites

相比于对照组 ($PRDM9^{WT}$ 、 $PRDM9^{HF/HF}$ 、 $PRDM9^{Km/+}$), 实验组 ($PRDM9^{Km/Km}$) H3K4me3 修饰在其中 8 个重组热点的富集近乎消失, 而在 *Dazl* 基因启动子区则没有变化 (图 3B)。有趣的是, H3K4me3 富集水平在 HS22 位点略有减少, 在 HS61.2 位点反而略有增加, 可能是因为这些位点的 H3K4me3 修饰是 PRDM9 非依赖的。综上所述, PRDM9 的 PR/SET 结构域发挥甲基化酶活性需要其 KRAB 结构域的参与。我们猜测 KRAB 结构域可能辅助 PRDM9 结合 DNA 或是靶向组蛋白修饰位点。

2.4 PRDM9 的 KRAB 结构域对 DSBs 正确形成是必需的

KRAB 的缺失导致 PRDM9 失去了 H3K4me3 修饰能力, 即失去了重组热点选择的功能。那么其会不会进一步影响 DSBs 的正确形成呢? 为了探究这一点,

我们应用 END-seq 方法, 对实验组 (P9 Δ KRAB, $PRDM9^{Km/Km}$; P9 KO, $PRDM9^{KO}$) 和对照组 (WT, $PRDM9^{WT}$) DSBs 形成位点的分布进行深入分析。首先, 与已报道的一致, 在 P9 KO 组的 2 440 个 DSBs 位点中, 绝大多数位点 (1 986 个位点, 约 81%) 不再与 $PRDM9^{WT}$ 组共定位。与此相似, 我们发现在 P9 Δ KRAB 组 4 207 个 DSBs 位点 (END-seq peaks) 中, 绝大多数 (3 653 个位点, 约 87%) 不再与 $PRDM9^{WT}$ 组共定位。而 P9 Δ KRAB 组和 P9 KO 组 DSBs 位点的共定位程度较高, 共有 1 847 个 DSBs 位点共定位, 分别约占它们各自总量的 44% 和 76% (图 4A)。接下来, 对于各组具体 DSBs 发生位点的分析以热图 (heatmaps) 和量化曲线形式呈现 (图 4B~图 4D), 结果显示, P9 Δ KRAB 组和 P9 KO 组类似, DSBs 发生位点不在通常的重组热点区域 (DSB hotspots), 而

是出现在基因启动子区(图4E)。综上所述, PRDM9 KRAB结构域的缺失导致DSBs错误的发生在基因启动子区, 而非经典的重组热点区。

3 讨论

PRDM9包括三个不同的结构域: KRAB、PR/SET、C2H2 zinc finger。对后两个结构域研究最多, 对其功能也了解得最清晰, 而KRAB结构域的功能却一直不明确。经典的KRAB结构域存在于KRAB-ZFP蛋白家族, 它能够通过与其他蛋白的互作来发挥转录抑制作用^[12]。PRDM9的KRAB结构域具有非经典的特异性结构。据报道PRDM9(可预期的)不具有基因转录调控的作用^[16], 但其KRAB结构域介导蛋白互作的潜力引导我们去寻找PRDM9调控重组热点的辅助因子。2017年, 有研究利用酵母双杂交方法, 鉴定出小鼠PRDM9通过KRAB结构域结合CXXC1蛋白(SETD1A和SETD1B H3K4甲基化酶复合物的组成亚基), 而CXXC1又可以结合IHO1蛋白(募集在染色质轴上参与DSBs形成)^[17-19]。因此, 通过CXXC1的介导, 重组热点(PRDM9依赖的)与DSBs形成复合物连接起来。然而这一结论缺少体内的直接证据。经另一篇文章证实, 小鼠中CXXC1并不是DSBs形成所必需的^[20]。因此, CXXC1不可能承担之前认为的角色。出于同样的推测, 我们利用3XFlag-HA-PRDM9标签小鼠(*PRDM9^{Km/Km}*和*PRDM9^{HF/HF}*)作免疫沉淀-质谱(IP-MS)分析PRDM9的互作蛋白, 遗憾的是未发现可被证实的、与DSBs形成相关的互作蛋白。

在本文中, 我们证实PRDM9的KRAB结构域缺失小鼠(*PRDM9^{Km/Km}*)表现为减数分裂前期I阻滞和雄性不育, 这与之前文献报道的PRDM9完全缺失表型一致。为了探究其原因, 我们通过Western blot和免疫荧光染色方法, 揭示了缺失KRAB结构域的PRDM9(*PRDM9ΔKRAB*)正常表达且分布于精母细胞核内。在此基础上, 我们利用ChIP-qPCR、ChIP-seq以及END-seq技术, 阐明了KRAB结构域的缺失使PRDM9失去其组蛋白H3K4甲基化酶活性, 继而导致DSBs发生于错误的基因启动子区, 而非经典的重组热点。我们知道这样的DSBs是不能被成功修复的, 它们后续将引起染色体联会失败, 使减数分裂阻滞于MI前期阶段。

PRDM9的KRAB结构域如何影响其PR/SET结

构域的甲基化酶活性呢? 我们假设: (1) KRAB结构域辅助PR/SET结构域募集到H3K4修饰位点处; (2) KRAB结构域阻止去甲基化酶募集到H3K4修饰位点处; (3) KRAB结构域介导自身形成多聚体, 催化H3K4me3修饰的迅速富集, 从而增强该处染色体的可接近性^[21]。为了证实假设, 我们尝试解析PRDM9的高分辨率冷冻3D结构。到目前为止, 虽然PRDM9已经有十多年的研究历史, 但我们仅获得了PRDM9 PR/SET结构域单独的晶体结构^[15]以及小部分C2H2 zinc finger结构域结合DNA的三维结构^[22]。随着冷冻电镜技术的发展, 我们有望获得PRDM9蛋白完整的高分辨率3D结构。

当然PRDM9的KRAB结构域也许还有其他作用方式。毕竟就哺乳动物减数分裂同源重组研究现状而言, 对其主要生物学事件包括重组热点决定和DSBs形成与修复调控机制等仍有许多未解之谜。PRDM9是决定重组热点选择的唯一因子吗? 是否存在辅助因子或共同作用因子? 比如ZCWPW1通过识别PRDM9介导的H3K4me3修饰来辅助其功能^[23]。SPO11等DSBs形成机器成员是如何被募集到重组热点上的? 其切割DNA双链是如何动态完成的? 是否存在相分离的过程^[24]? 决定DSBs修复后交叉形成命运的决定因素有哪些? 是否存在调控交叉位点选择的关键分子? 以及如何在体外模拟完成精子发生过程^[25]? 路漫漫其修远兮, 吾将上下而求索。

参考文献 (References)

- [1] KEENEY S, GIROUX C N, KLECKNER N. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family [J]. *Cell*, 1997, 88(3): 375-84.
- [2] ROBERT T, NORE A, BRUN C, et al. The TopoVIB-like protein family is required for meiotic DNA double-strand break formation [J]. *Science*, 2016, 351(6276): 943-9.
- [3] BERGERAT A, DE MASSY B, GADELLE D, et al. An atypical topoisomerase II from archaea with implications for meiotic recombination [J]. *Nature*, 1997, 386(6623): 414-7.
- [4] HAYASHI K, MATSUI Y. Meisetz, a novel histone tri-methyltransferase, regulates meiosis-specific epigenesis [J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(6): 615-20.
- [5] MIHOLA O, TRACHTULEC Z, VLCEK C, et al. A mouse speciation gene encodes a meiotic histone H3 methyltransferase [J]. *Science*, 2009, 323(5912): 373-5.
- [6] MYERS S, BOWDEN R, TUMIAN A, et al. Drive against hotspot motifs in primates implicates the PRDM9 gene in meiotic recombination [J]. *Science*, 2010, 327(5967): 876-9.
- [7] BAUDAT F, BUARD J, GREY C, et al. PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice

- [J]. *Science*, 2010, 327(5967): 836-40.
- [8] PARVANOV E D, PETKOV P M, PAIGEN K. PRDM9 controls activation of mammalian recombination hotspots [J]. *Science*, 2010, 327(5967): 835.
- [9] POWERS N R, PARVANOV E D, BAKER C L, et al. The meiotic recombination activator PRDM9 trimethylates both h3k36 and h3k4 at recombination hotspots *in vivo* [J]. *PLoS Genet*, 2016, 12(6): e1006146.
- [10] GREY C, BAUDAT F, DE MASSY B. PRDM9, a driver of the genetic map [J]. *PLoS Genet*, 2018, 14(8): e1007479.
- [11] PAIGEN K, PETKOV P M. PRDM9 and its role in genetic recombination [J]. *Trends Genet*, 2018, 34(4): 291-300.
- [12] LUPO A, CESARO E, MONTANO G, et al. KRAB-zinc finger proteins: a repressor family displaying multiple biological functions [J]. *Curr Genomics*, 2013, 14(4): 268-78.
- [13] HOHENAUER T, MOORE A W. The PRDM family: expanding roles in stem cells and development [J]. *Development*, 2012, 139(13): 2267-82.
- [14] COBB J, HANDEL M A. Dynamics of meiotic prophase I during spermatogenesis: from pairing to division [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 1998, 9(4): 445-50.
- [15] WU H, MATHIOUDAKIS N, DIAGOURAGA B, et al. Molecular basis for the regulation of the H3K4 methyltransferase activity of PRDM9 [J]. *Cell Rep*, 2013, 5(1): 13-20.
- [16] THIBAUT-SENNETT S, YU Q, SMAGULOVA F, et al. Interrogating the functions of PRDM9 domains in meiosis [J]. *Genetics*, 2018, 209(2): 475-87.
- [17] PARVANOV E D, TIAN H, BILLINGS T, et al. PRDM9 interactions with other proteins provide a link between recombination hotspots and the chromosomal axis in meiosis [J]. *Mol Biol Cell*, 2017, 28(3): 488-99.
- [18] IMAI Y, BAUDAT F, TAILLEPIERRE M, et al. The PRDM9 KRAB domain is required for meiosis and involved in protein interactions [J]. *Chromosoma*, 2017, 126(6): 681-95.
- [19] STANZIONE M, BAUMANN M, PAPANIKOS F, et al. Meiotic DNA break formation requires the unsynapsed chromosome axis-binding protein IHO1 (CCDC36) in mice [J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(11): 1208-20.
- [20] TIAN H, BILLINGS T, PETKOV P M. CXXC1 is not essential for normal DNA double-strand break formation and meiotic recombination in mouse [J]. *PLoS Genet*, 2018, 14(10): e1007657.
- [21] LIU G, SUN Y, JIA L, et al. Chromatin accessibility shapes meiotic recombination in mouse primordial germ cells through assisting double-strand breaks and loop formation [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2022, 1865(5): 194844.
- [22] PATEL A, HORTON J R, WILSON G G, et al. Structural basis for human PRDM9 action at recombination hotspots [J]. *Genes Dev*, 2016, 30(3): 257-65.
- [23] YUAN S, HUANG T, BAO Z, et al. The histone modification reader ZCWPW1 promotes double-strand break repair by regulating cross-talk of histone modifications and chromatin accessibility at meiotic hotspots [J]. *Genome Biol*, 2022, 23(1): 187.
- [24] ZHANG R, LIU Y, GAO J. Phase separation in controlling meiotic chromosome dynamics [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2023, 151: 69-90.
- [25] LEI Q, VAN PELT A M M, HAMER G. *In vitro* spermatogenesis: why meiotic checkpoints matter [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2023, 151: 345-69.
- [26] SCHERTHAN H, JERRATSCH M, LI B, et al. Mammalian meiotic telomeres: protein composition and redistribution in relation to nuclear pores [J]. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(12): 4189-203.
- [27] CANELA A, MAMAN Y, HUANG S N, et al. Topoisomerase II-induced chromosome breakage and translocation is determined by chromosome architecture and transcriptional activity [J]. *Mol Cell*, 2019, 75(2): 252-66.
- [28] CANELA A, MAMAN Y, JUNG S, et al. Genome organization drives chromosome fragility [J]. *Cell*, 2017, 170(3): 507-21.