

综述

精子发生过程中翻译后修饰的蛋白质组学研究进展

祝天喻¹, 李妍^{1,2}, 刘小飞¹, 齐雅玲¹, 郭雪江^{1,*}

南京医科大学¹生殖医学国家重点实验室; ²附属逸夫医院病理与临床检验中心, 南京 211166

摘要: 精子发生由一系列多阶段、复杂的生物学事件所组成, 受到多因素的调控。精子发生过程存在翻译延迟的现象, 因此转录和蛋白表达水平变化不完全一致。蛋白质的翻译后修饰作为蛋白质功能的重要调控方式, 在精子发生过程中起着重要调控作用。近年来, 蛋白质组学(proteomics)的发展促进了蛋白质翻译后修饰的解析和功能研究。本文综述了精子发生过程中多种翻译后修饰的蛋白质组学研究进展, 并讨论了它们在精子发生、精子功能和男性生育能力中的作用以及它们在未临床诊疗中的价值。

关键词: 精子发生; 翻译后修饰; 蛋白质组学

中图分类号: R332; R363.2; R329.2

Advances in proteomic studies of post-translational modifications during spermatogenesis

ZHU Tian-Yu¹, LI Yan^{1,2}, LIU Xiao-Fei¹, QI Ya-Ling¹, GUO Xue-Jiang^{1,*}

¹State Key Laboratory of Reproductive Medicine; ²Center of Pathology and Clinical Laboratory, Sir Run Run Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

Abstract: Spermatogenesis is composed of a series of complex biological events, which are regulated by complex factors. There is a phenomenon of delayed translation in spermatogenesis, so the changes of transcription and protein expression are not completely consistent. Thus post-translational modifications (PTMs) play a key role in spermatogenic biological events. In recent years, the development of proteomics has deepened the discovery of PTM. This paper reviews the advances in multiple PTMs proteomic during testicular spermatogenesis. Their effects on sperm function and fertility, as well as their significance for future diagnosis and treatment are discussed.

Key words: spermatogenesis; post-translational modifications; proteomics

精子发生的过程可以被分为三个阶段: 精原细胞的有丝分裂、精母细胞的减数分裂以及圆形精子细胞的精子变形, 最终形成蝌蚪状的精子^[1]。小鼠精子发生中精原细胞的有丝分裂属于增殖阶段, 该阶段开始于精原干细胞(即 A_{single} 型精原细胞)的有

丝分裂, 它既可以保留干细胞的特性, 也可以进入一系列的有丝分裂, 形成 A_{paired} 型、 A_{aligned} 型、分化型 $A_1 \sim A_4$ 、中间型和 B 型精原细胞^[2]。B 型精原细胞分裂为进入减数分裂期的前细线期精母细胞, 前细线期精母细胞历经细线期、偶线期、粗线期和双

Received 2019-07-15 Accepted 2019-11-25

Research from the corresponding author's laboratory was supported by grants from the National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFA0503300), the National Natural Science Foundation of China (No. 81771641, 81971439), Six Talent Peak Projects (No. YY-019), Fok Ying Tung Foundation (No. 161037) and the Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions, China (No. 18KJB310006).

*Corresponding author. Tel: +86-25-86869383; E-mail: guo_xuejiang@njmu.edu.cn

线期的发育阶段, 随后通过中期、后期到达终变期, 从而完成第一次减数分裂, 形成次级精母细胞^[3]。经过第二次减数分裂产生的圆形单倍体精子细胞进一步分化为成熟精子, 这一过程被称为精子变形期。这一阶段包括鞭毛的发育、顶体形成、胞质残余体的丢弃及随后鱼精蛋白对组蛋白的替换^[4]。

精子发生过程受到复杂的转录后调控, 其中有一个经典的现象是翻译延迟, 即 mRNA 的转录不能保证同时有相应蛋白质的表达。鱼精蛋白基因的 mRNA 如果提前翻译会导致核浓缩异常、精子变形和雄性不育^[5]。蛋白质翻译后修饰不仅能够调节生精细胞的蛋白质表达, 还能增加蛋白质形式的多样性。目前, 已经发现蛋白质有 307 种不同形式的翻译后修饰, 如磷酸化、泛素化和 SUMO (small ubiquitin-related modifier) 化等^[6]。在不同的蛋白质中, 翻译后修饰对其结构和功能的影响有所不同, 可以在不同的氨基酸位点修饰发挥不同的效应^[6]。由于抗体的限制, 蛋白质翻译后修饰研究较为困难。但近期随着基于质谱仪的高通量蛋白质组学技术迅速发展, 越来越多的翻译后修饰能够被鉴定及定量解析, 促进了蛋白质翻译后修饰在精子发生等生物学事件中的研究发展^[7-19](表 1)。大量研究表明, 精子发生涉及复杂的蛋白质磷酸化、乙酰化、糖基化等修饰, 这些修饰对精子发生和精子功能具有重要的调控作用^[9-19](图 1)。本文主要对精子发生相关的多种蛋白质翻译后修饰的蛋白质组学解析和功能研究进展进行综述。

1 精子发生过程中磷酸化修饰的蛋白质组学研究

磷酸化调控是由激酶催化下向底物蛋白添加磷酸基团的过程。在原核生物和真核生物中, 蛋白质的可逆磷酸化是一个关键的调节机制^[20, 21]。人类、小鼠和酵母中分别存在 230 000 个、156 000 个及 40 000 个磷酸化位点^[22], 至少 30% 的蛋白质可以进行磷酸化。可逆磷酸化通过改变酶和受体结构的构象, 对相关酶和受体进行激活或失活^[23, 24]。蛋白质磷酸化存在于大多数细胞的信号转导通路中, 调控着许多细胞生物学事件。

精子发生是男性生育力产生和维持的关键生物学事件, 在激酶 - 磷酸化信号通路调节下, 持续的精原干细胞自我更新和分化确保了持续的生精。其中, 通过对 p70s6K、rps6 和 4e-bp1 蛋白的磷酸化水平的调控, 雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路可以促进精原干细胞的增殖和精子发生^[25]。牛痘相关激酶 (vaccinia-related kinases, VRK) 属于酪蛋白激酶家族, 其中 VRK1 可以磷酸化组蛋白 H3, 是有丝分裂调控的重要蛋白激酶^[26]。Choi 等人发现, VRK1 在精原细胞群中高度表达, 对于精原干细胞的增殖和分化是必需的, 对于生精细胞的维持必不可少^[27]。雄性生殖细胞通过一系列高度调控的步骤, 从单倍体圆形精子转化为成熟精子的过程称为精子变形。精子变形的过程受到磷酸化修饰的调控。Ben Khelifa 等人在大头精子症患者中检测到 *AURKC* 基因突变, 证实 *AURKC*

表 1. 精子发生相关蛋白的翻译后修饰蛋白质组学研究综述

Table 1. A brief review of proteomic studies of post-translational modifications (PTMs) during spermatogenesis

Types of PTMs	Samples studied	References
Phosphorylation	Adult mouse testis	Qi <i>et al.</i> , 2014 ^[9]
	Mouse spermatids	Li <i>et al.</i> , 2019 ^[10]
	Adult human testis	Castillo <i>et al.</i> , 2019 ^[11]
	Human sperm before and after capacitation	Wang <i>et al.</i> , 2015 ^[12]
Glycosylation	Human seminal plasma	Yang <i>et al.</i> , 2015 ^[13]
	Human sperm	Wang <i>et al.</i> , 2013 ^[14]
Acetylation	Mouse testis in response to heat shock and X-ray exposure	Xie <i>et al.</i> , 2018 ^[15]
	Capacitated human sperm	Sun <i>et al.</i> , 2014 ^[16]
	Human sperm before and after capacitation, healthy and asthenospermic human sperm	Yu <i>et al.</i> , 2015 ^[17]
SUMOylation	Adult mouse testis	Cai <i>et al.</i> , 2017 ^[18]
Post-translation modifications of histones	Mouse and human male germ cells	Luense <i>et al.</i> , 2016 ^[19]

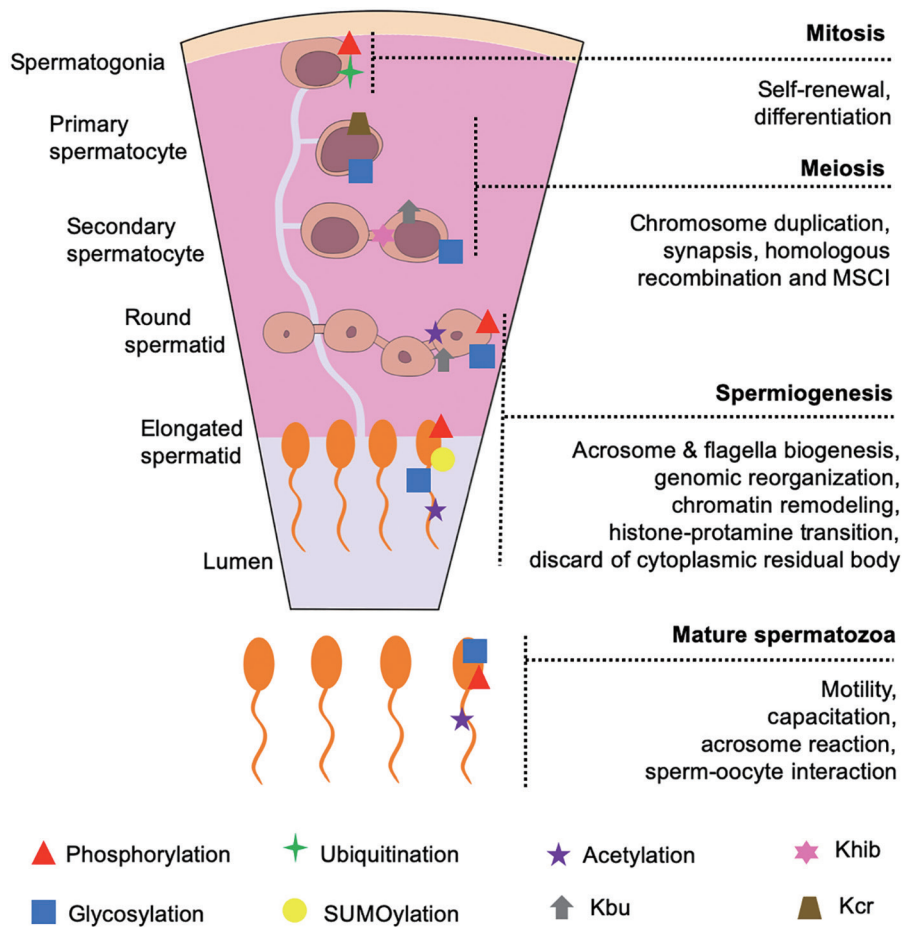


图 1. 精子发生过程中的蛋白质翻译后修饰研究示意图

Fig. 1. Diagram of protein post-translational modifications (PTMs) studied during spermatogenesis. Spermatogenesis is consisted of a series of complex biological processes, including mitosis of spermatogonia, meiosis of spermatocytes, and spermiogenesis of spermatids to form mature spermatozoa. Diverse PTMs have been studied in these processes, and shown in the diagram. Kbu, lysine butyrylation; Khib, lysine 2-hydroxyisobutyrylation; Kcr, lysine crotonylation; MSCI, meiotic sex chromosome inactivation.

是人类大头精子症的致病位点^[28]。此外，临床样本检测表明 *AURKC* 突变精子都会出现染色体异常，不具备卵胞浆内单精子显微注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 治疗前景^[28, 29]。

随着磷酸化蛋白质组学技术的发展，激酶 - 底物调控网络构建技术及靶向蛋白质组学技术为研究精子发生相关磷酸化修饰的系统解析奠定了基础^[30, 31]。Qi 等人通过固定金属亲和层析 (immobilized metal affinity chromatography, IMAC) 和二氧化钛 (titanium dioxide, TiO₂) 富集技术，对成年小鼠睾丸进行大规模磷酸化修饰蛋白组学鉴定，在 3 955 种磷酸化蛋白中鉴定出 17 829 个磷酸化位点。研究显示，激酶 MAPKs、CDK2 和 CDC2 在精子发生过程中具有富集的位点特异性激酶 - 底物关系，提示它们在精子

发生中起着重要作用^[9]。

围绕精子发生中的精子变形过程，Li 等人纯化了处于变形过程中的小鼠精子细胞，采用 IMAC 和 TiO₂ 富集技术进行了大规模的磷酸化蛋白组学分析，在精子细胞中鉴定出 4 196 种磷酸化蛋白和 13 835 个磷酸化位点，其中 735 个睾丸特异性蛋白被鉴定为磷酸化蛋白，它们在精子变形过程中呈现高水平表达；Gene Ontology (GO) 分析显示，所鉴定的磷酸化修饰蛋白在组蛋白修饰、纤毛组织、中心和细胞间黏附连接中显著富集^[10]。激酶 - 底物磷酸化网络的进一步分析表明，磷酸化底物的富集与精子变形的调控有关。激酶 CDK16 (Pctaire1) 是磷酸化底物位点最富集的激酶之一，在小鼠中敲除该基因导致精子头部畸形、鞭毛弯曲和运动能力异常，最终

引起雄鼠不育^[32]。Li 等人的研究提示 CDK16 在精子细胞中的底物功能主要富集在基于微管的转运蛋白、染色体、中心体和染色质结合部位,说明 CDK16 可能通过调控鞭毛发生和染色质蛋白替换调节精子发生^[10]。

为了提高对精子发育过程中信号转导的认识,Castillo 等人采用金属氧化物亲和色谱结合液相色谱 (liquid chromatography, LC)/质谱技术,对人类男性睾丸中的磷酸化蛋白进行了大规模的鉴定,从而鉴定出 2 661 个磷酸化蛋白及 8 187 个磷酸化肽段。研究表明,磷酸化蛋白在精子发生有关的功能事件上高度富集,如转录和翻译调节、细胞骨架组织、DNA 包装、细胞周期和凋亡。Castillo 等人据所鉴定的磷酸化肽段和激酶激活环预测了人睾丸中最活跃的蛋白激酶,其中细胞周期蛋白依赖激酶 12 (cyclin-dependent kinase 12, CDK12) 和 p21 激活激酶 4 (p21-activated kinase 4, PAK4) 高度富集。CDK12 和 PAK4 分别在精子顶体形成与精原细胞有丝分裂中具有潜在的关键作用^[11]。该研究证实了蛋白激酶的磷酸化调节在人类精子发生中非常活跃,并为男性生育问题的深度探究及潜在靶点的药物开发奠定了基础。

精子获能期间最重要的变化之一是酪氨酸磷酸化水平的增强,磷酸化蛋白质组学为研究酪氨酸磷酸化修饰在精子获能过程中的作用提供了方法。Wang 等人使用无标记定量磷蛋白组学研究人类精子获能过程中的整体磷酸化事件,发现了 231 个磷酸化位点修饰水平在获能过程中增加。在获能上调的磷酸化位点中,酪氨酸磷酸化激酶胰岛素生长因子 1 受体 (insulin growth factor 1 receptor, IGF1R)/胰岛素受体的底物磷酸化位点显著富集。在抑制剂 GSK1904529A 和 NVP-AEW541 对 IGF1R 的抑制作用下,精子获能期间酪氨酸磷酸化水平的增加受到了抑制^[12]。这提示 IGF1R 介导的酪氨酸磷酸化通路在调节人类精子获能中起到重要作用,并可能成为改善人类精子功能的靶点。

精子发生和精子功能中复杂的磷酸化修饰解析揭示了磷酸化修饰在精子发生中的重要调控作用,为精子发生分子机制的阐明提供了帮助。

2 精子发生过程中糖基化修饰的蛋白质组学研究

糖基化是碳水化合物 (即糖基供体) 与另一分

子 (糖基受体) 的羟基或其他官能团相连的反应。在细胞生物学中,糖基化主要是指将聚糖附着到蛋白质或其他有机分子上的酶促过程。在粗面内质网中合成的大多数蛋白质都发生糖基化修饰。糖基化修饰蛋白的 N-连接的糖链和 O-连接的糖链两种修饰类型,分别在內质网和高尔基体中进行。糖基化修饰能改变多肽的构象和蛋白质的稳定性,从而调控生物学事件的进展^[33]。

糖基化修饰调控是配子发生调控的重要形式。在小鼠中,N-聚糖、O-聚糖、蛋白聚糖、糖磷脂酰肌醇 (glycophosphatidylinositol, GPI) 锚定蛋白和糖脂 (glycolipids) 合成的改变都会影响精子发生。Gupta 等人通过糖基化基因 *Man2a2* 敲除研究首次揭示了 N-聚糖在精子发生中的作用^[33]。*Man2a2* 作为一种 α -甘露糖苷酶 II,能从 *Mgat1* 的 N-糖基化产物中去除两个甘露糖残基生成 *Mgat2* 的底物,*Man2a2* 仅在生精细胞 (精原细胞和长形精子除外) 表达,在体细胞 (支持细胞和 Leydig 细胞) 中不表达。*Man2a2* 敲除小鼠睾丸明显变小,生殖细胞发生凋亡,无法产生成熟精子,引起雄性不育^[34]。

糖基化修饰对精子的成熟至关重要,赤道段蛋白 1 (equatorial segment protein 1, ESP1) 是一种在顶体基质和成熟精子顶体内外膜腔表面发现的赤道段结构域蛋白,其编码基因是一种睾丸特异性的基因,在减数分裂之后的精子细胞中开始表达。二维 SDS-PAGE 电泳和糖类分析染色实验显示 ESP1 蛋白在睾丸中具有显著的糖基化修饰,当精子在附睾时,ESP1 蛋白上的大多数糖复合物被移除。研究显示针对 ESP1 蛋白的糖基化修饰对精子变形期间的顶体形成有关键的调控作用^[35]。

精子中的蛋白糖基化水平得到了系统性鉴定,Wang 等人利用糖类过滤辅助样品制备 (glyco-filter aided sample preparation, glyco-FASP) 方法,结合串联质谱 (tandem mass spectrometry, MS/MS) 的方法在人类精子中鉴定出 297 个 N-糖基化蛋白的 554 个 N-糖基化位点。生物信息学分析结果显示这些蛋白的功能主要是细胞识别和受精,其中,谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 是一种保守的抗氧化剂酶,可降低过氧化磷脂^[14]。GPX4 也是一种线粒体蛋白,在精子和男性生育中异常的线粒体结构中必不可少。这些蛋白质组学研究显示,糖基化修饰在精子发生中的调节作用是关键而广泛的。

精液中的精浆是多个附属腺体分泌的混合物，其含有的多种分泌蛋白对精子功能和男性生育有重要意义。Yang 等人采用 N-糖基化肽段富集，结合 LC-MS/MS 分析，鉴定出 372 种蛋白质的 720 个 N-糖基化位点，建立了大规模的人精液 N-糖基化蛋白质谱系^[13]。该数据集也可以作为进一步筛选男性不育和前列腺肿瘤等男性疾病的生物标志物。例如，精浆中能检测到细胞外基质蛋白 1 (extracellular matrix protein 1, ECM1) 糖基化修饰，ECM1 表达于附睾中，是诊断无精子症的生物标志物。此外，精浆中还能鉴定到大量糖基化修饰睾丸特异蛋白： α 2-HS 糖蛋白 (α 2-HS glycoprotein, AHSG)、血管紧张素转换酶 (angiotensin I converting enzyme, ACE)、纤维蛋白原 γ 链 (fibrinogen γ chain, FGG)、蔗糖酶异麦芽糖酶 (sucrase-isomaltase, SI)、透明带结合蛋白 (zona pellucida binding protein, ZBPB)、朊样蛋白 (prion like protein doppel, PRND)、血管紧张素转换酶 2 (angiotensin I converting enzyme 2, ACE2)、二肽酶 3 (dipeptidase 3, DPEP3)、肽聚糖识别蛋白 2 (peptidoglycan recognition protein 2, PGLYRP2) 和跨膜 p24 转运蛋白 4 (transmembrane p24 trafficking protein 4, TMED4)^[13]。睾丸特异糖基化蛋白的存在提示了糖基化修饰在精子功能中的重要意义。

3 精子发生过程中赖氨酸乙酰化修饰的蛋白质组学研究

蛋白质乙酰化是真核生物主要的翻译后修饰之一，其中乙酰辅酶 A (acetyl coenzyme A, Ac-CoA) 的乙酰基转移到多肽链上的一个特定位置^[36]。在人类中，80%~90% 的蛋白质在新生多肽链的 N 端发生乙酰化修饰^[37]，除此之外主要是赖氨酸的 ϵ -氨基酸发生乙酰化修饰^[38]。小鼠 VASA 同源物 (mouse VASA homolog, MVH) 仅在生殖细胞中表达，它是雄性生殖细胞分化中必不可少的关键因子，MVH 缺陷的小鼠精子发生完全阻滞^[39]。在精子发生的过程中，MVH 蛋白具有乙酰化修饰。Nagamori 等人研究表明，乙酰转移酶 HAT1 及其辅因子 P46 与 MVH 在染色质小体 (chromatoid body, CB) 中特异性共定位，并且可以使 MVH 发生 Lys405 乙酰化修饰，失活其 RNA 结合活性。目前已确定 858 个 mRNA 为 MVH 靶点，其中大部分为已知的翻译抑制基因。其中，当 MVH 发生乙酰化时，MVH-RNP 复合物选择性释放 MVH-核糖核蛋白 (ribonucleop-

rotein, RNP) 靶向的 eIF4B mRNA，伴随 eIF4B 蛋白表达增加^[40]。这些研究揭示了在调控精子发生过程中，蛋白乙酰化与 RNA 加工之间存在联系。

乙酰化修饰的蛋白质组学研究可以在分子层面上为我们揭示一些疾病或损伤的致病机制。Xie 等人采用定量蛋白质组学技术分析了热休克和 X 射线照射后小鼠睾丸蛋白质乙酰化修饰的变化，在其鉴定的 587 种蛋白质的 1 139 个赖氨酸乙酰化位点中，1 020 个赖氨酸乙酰化位点可以被定量。这些乙酰化蛋白主要参与了前体代谢产物的生成和代谢过程，亚细胞定位主要集中在胞质和线粒体中。与对照组相比，28 个乙酰化蛋白的 36 个位点乙酰化水平在热休克后发生了变化，43 个乙酰化蛋白的 49 个位点乙酰化水平在 X 射线照射下发生了变化。其中组蛋白乙酰转移酶 Kat7 的 K279 乙酰化水平在热处理和 X 射线处理中均下调，表明 K279 可能是一个关键的乙酰化位点，在精子发生中起重要的调控作用^[15]。

随着蛋白质组学技术的发展，人精子乙酰化水平研究得到深入解析。Sun 等人利用抗赖氨酸乙酰化抗体和高效 LC-MS/MS 技术，对人类获能精子中的 576 种赖氨酸乙酰化蛋白及 1 206 个赖氨酸乙酰化位点进行了鉴定。生物信息学分析表明，这些蛋白与精子功能 (包括运动能力、获能、顶体反应和精子-卵相互作用) 有关。赖氨酸脱乙酰基酶抑制剂能抑制精子运动能力，而抗赖氨酸乙酰化抗体处理精子，可以降低精子受精率，赖氨酸乙酰化是精子功能的重要调控机制^[16]。此外，Yu 等人通过泛抗乙酰赖氨酸单克隆抗体对正常人获能前精子的赖氨酸乙酰化肽段进行富集，鉴定出 456 种人类精子赖氨酸乙酰化蛋白和 973 个赖氨酸乙酰化位点，包括 671 个新的赖氨酸乙酰化位点和 205 个新的赖氨酸乙酰化蛋白，并发现正常精子和弱精子症精子中赖氨酸乙酰转移酶和赖氨酸脱乙酰基酶的差异表达。活力下降的精子由于电压依赖性阴离子通道 2 蛋白的 Lys74 乙酰化受到阻断，ATP 水平和线粒体膜电位降低，从而影响运动功能^[17]。综上所述，由于蛋白质组学研究的进展，蛋白乙酰化与精子功能的关系得到了揭示与探究。

4 精子发生过程中泛素化修饰研究

泛素化是已知的最重要的翻译后修饰之一。泛素化是泛素——一种在进化中高度保守的 8.5 kDa

大小肽段, 与靶蛋白共价结合的过程^[41, 42]。泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 可以结合许多底物^[43], 泛素的结合由复杂的三步酶级联介导^[44]。泛素化过程所涉及的酶包括泛素激活酶 E1、泛素结合酶 E2 和泛素连接酶 E3^[45-47], 最终通过靶蛋白的降解调控生物学事件, 并在精子发生中有重要的调控作用^[48, 49]。

E1 泛素激活酶 UBE1 在睾丸中特异性表达, Dou 等人发现 UBE1 具有精原细胞优势表达, 它可能通过底物蛋白的泛素化调节精原细胞的干性和分裂分化, 从而影响精子发生^[50]。E2 泛素结合酶和 E3 泛素连接酶也有着重要功能, 比如, 睾丸特异表达的环指蛋白 (RING finger protein, RNF) 属于 E3 家族之一, 在精子发生过程中发挥重要作用^[51-54]。泛素化修饰在精子发生中的功能广泛而重要, 已有的研究说明了泛素化修饰在精子发生中的调节作用, 但是关于精子发生中的泛素化修饰大规模系统性鉴定研究目前较少, 这方面研究将有助于系统阐明泛素化修饰调节在精子发生过程中的功能。

5 精子发生过程中SUMO化修饰的蛋白质组学研究

SUMO 是一种类泛素蛋白修饰分子, 分子量 11 kDa。类似于泛素化修饰, SUMO 化修饰也需要三种酶: E1 激活酶、E2 结合酶和 E3 蛋白连接酶^[55, 56]。SUMO 化修饰是一种重要的蛋白质调控机制, 在精子发生和卵子发生中起着重要作用^[57]。

在精子细胞中, SUMO-1 表达于核周环和颈部/中心体区域, SUMO-1 可能在 RAN 介导的核浆转运过程中发挥功能, 调节精子变形的组蛋白-鱼精蛋白置换和/或转录抑制^[58]。蛋白质组学对精子发生中 SUMO 修饰系统解析提供了重要的研究手段, Cai 等人对小鼠睾丸蛋白进行胰蛋白酶/Lys-C 蛋白酶消化, 利用高亲和力 SUMO-1 抗体对内源性 SUMO-1 修饰肽段进行富集, 进而通过高分辨率质谱从小鼠睾丸中鉴定出 53 个高度可信的 SUMO-1 修饰位点。生物信息学分析表明, 睾丸 SUMO-1 修饰蛋白具有丰富的转录调控和 DNA 修复功能, 提示 SUMO 调控在精子变形期间染色体重构中扮演重要角色^[18]。SUMO 修饰的蛋白质组学研究将使人们更好地理解 SUMO 修饰在精子细胞分化为成熟、可育精子中的作用与机制。

6 精子发生过程中组蛋白修饰及其他类型翻译后修饰的蛋白质组学研究

组蛋白在精子发生中具有重要的作用, 核心组蛋白 H2A、H2B、H3 以及 H4 形成一个八聚体, 将 DNA 打包到核小体中, 而连接组蛋白 H1 则保护核小体间的 DNA^[59]。在精子发生过程中, 组蛋白被过渡蛋白 (transition protein, TP) 暂时取代, 随后被鱼精蛋白取代^[60, 61]。组蛋白有着多种翻译后修饰, 其中组蛋白乙酰化在染色质重塑、DNA 修复和基因表达的表观遗传调控中起着关键作用。乙酰化还能调节组蛋白的降解, 在小鼠中, 蛋白酶体激活因子 PA200 的缺失能抑制体细胞核心组蛋白在 DNA 双链断裂期间的乙酰化依赖降解, 导致长形精子细胞中核心组蛋白的消失推迟^[59]。

Luense 等人对生殖系细胞中的组蛋白翻译后修饰进行了系统性鉴定, 利用“自下而上”的纳升级 LC-MS/MS, 对组蛋白翻译后修饰进行鉴定, 解析了小鼠精子发生的不同阶段 (减数分裂、圆形精细胞、伸长/浓缩精细胞和成熟精子) 和人类精子中的组蛋白修饰的相对丰度, 发现组蛋白 H3 和 H4 的翻译后修饰在小鼠和人类精子之间有很强的保守性; 但是, 在 H1、H2A 和 H2B 之间几乎没有保守性^[19]。组蛋白除了乙酰化等常见修饰, 近年来, 一些新型翻译后修饰逐渐被发现和鉴定^[62]。减数分裂性染色体沉默 (meiotic sex chromosome inactivation, MSCi) 是发生在精子发生减数分裂阶段的 X 和 Y 染色体转录沉默的过程^[63]。小鼠精母细胞 MSCi 期间组蛋白有着特殊的翻译后修饰模式, 减数分裂性染色体失活与组蛋白的赖氨酸乙酰化 (lysine acetylation, Kac)、赖氨酸丁酰化 (lysine butyrylation, Kbu)、赖氨酸 2-羟基异丁基酰化 (lysine 2-hydroxyisobutyrylation, Khib) 的耗竭有关^[64, 65]。在减数分裂后的圆形精子细胞中, 组蛋白的赖氨酸巴豆酰化 (lysine crotonylation, Kcr) 和赖氨酸 2-羟基异丁基酰化与不受 MSCi 影响的性染色体连锁基因的转录起始位点特异相关, 表明这些翻译后修饰与转录激活密切相关^[64, 66, 67]。在精子发生的后期, 组蛋白也具有独特的翻译后修饰模式。组蛋白赖氨酸丁酰化可以促进转录, 与赖氨酸乙酰化相比, 组蛋白 H4 赖氨酸丁酰化修饰在精子变形晚期更为富集, 标志着组蛋白去除的延迟^[65]。这表明位点特异性赖氨酸丁酰化可能在精子发生后期的基因组重组中起重要作用, 并可以标记在这一生物学过程中保持组蛋白的染色体

位点。上述研究表明，组蛋白的新型翻译后修饰种类丰富，这些修饰在精子发生中的作用将会是未来的研究热点。

7 结语

翻译后修饰作为蛋白质功能调控的重要形式，调控精子发生过程中多个细胞生物学事件，在精子发生中起重要作用。已有的修饰蛋白质组学研究结合功能分析显示，磷酸化、乙酰化、糖基化、泛素化和 SUMO 化等修饰都是重要的翻译后修饰，广泛参与调控了精子发生过程，例如精原细胞的增殖与干性维持、减数分裂与同源重组以及圆形精子变形中的核浓缩、顶体形成、组蛋白替换、残余体的丢失、鞭毛发生以及成熟精子的运动、获能、受精等功能。随着蛋白质组学技术发展的日新月异，进一步围绕新型蛋白翻译后修饰、翻译后修饰的亚细胞定位、修饰蛋白质组学的定量化以及翻译后修饰的蛋白相互作用调控网络等的深入研究，将有助于我们更深入地探究精子发生的分子生物学机制，为男性不育的病理生理学分析、遗传学病因解析及临床诊断治疗奠定坚实的基础。

参考文献

- 1 Chu DS, Shakes DC. Spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol* 2013; 757: 171–203.
- 2 Mäkelä JA, Hobbs RM. Molecular regulation of spermatogonial stem cell renewal and differentiation. *Reproduction* 2019. pii: REP-18-0476.R2.
- 3 Berrios S. Nuclear architecture of mouse spermatocytes: chromosome topology, heterochromatin, and nucleolus. *Cytogenet Genome Res* 2017; 151(2): 61–71.
- 4 Hao SL, Ni FD, Yang WX. The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene* 2019; 706: 201–210.
- 5 Lee K, Haugen HS, Clegg CH, Braun RE. Premature translation of protamine 1 mRNA causes precocious nuclear condensation and arrests spermatid differentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(26): 12451–12455.
- 6 Brohi RD, Huo LJ. Posttranslational modifications in spermatozoa and effects on male fertility and sperm viability. *OMICS* 2017; 21(5): 245–256.
- 7 Baker MA. Proteomics of post-translational modifications of mammalian spermatozoa. *Cell Tissue Res* 2016; 363(1): 279–287.
- 8 Wang Y, Wan J, Ling X, Liu M, Zhou T. The human sperm proteome 2.0: An integrated resource for studying sperm functions at the level of posttranslational modification. *Proteomics* 2016; 16(19): 2597–2601.
- 9 Qi L, Liu Z, Wang J, Cui Y, Guo Y, Zhou T, Zhou Z, Guo X, Xue Y, Sha J. Systematic analysis of the phosphoproteome and kinase-substrate networks in the mouse testis. *Mol Cell Proteomics* 2014; 13(12): 3626–3638.
- 10 Li Y, Cheng Y, Zhu T, Zhang H, Li W, Guo Y, Qi Y, Chen X, Zhang J, Sha J, Zhou Z, Zhu H, Guo X. The protein phosphorylation landscape of mouse spermatids during spermiogenesis. *Proteomics* 2019; 19(11): e1900055.
- 11 Castillo J, Knol JC, Korver CM, Piersma SR, Pham TV, de Goeij-de Haas RR, van Pelt AMM, Jimenez CR, Jansen BJH. Human testis phosphoproteome reveals kinases as potential targets in spermatogenesis and testicular cancer. *Mol Cell Proteomics* 2019; 18(Suppl 1): S132–S144.
- 12 Wang J, Qi L, Huang S, Zhou T, Guo Y, Wang G, Guo X, Zhou Z, Sha J. Quantitative phosphoproteomics analysis reveals a key role of insulin growth factor 1 receptor (IGF1R) tyrosine kinase in human sperm capacitation. *Mol Cell Proteomics* 2015; 14(4): 1104–1112.
- 13 Yang X, Liu F, Yan Y, Zhou T, Guo Y, Sun G, Zhou Z, Zhang W, Guo X, Sha J. Proteomic analysis of N-glycosylation of human seminal plasma. *Proteomics* 2015; 15(7): 1255–1258.
- 14 Wang G, Wu Y, Zhou T, Guo Y, Zheng B, Wang J, Bi Y, Liu F, Zhou Z, Guo X, Sha J. Mapping of the N-linked glycoproteome of human spermatozoa. *J Proteome Res* 2013; 12(12): 5750–5759.
- 15 Xie C, Shen H, Zhang H, Yan J, Liu Y, Yao F, Wang X, Cheng Z, Tang TS, Guo C. Quantitative proteomics analysis reveals alterations of lysine acetylation in mouse testis in response to heat shock and X-ray exposure. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 2018; 1866(3): 464–472.
- 16 Sun G, Jiang M, Zhou T, Guo Y, Cui Y, Guo X, Sha J. Insights into the lysine acetylproteome of human sperm. *J Proteomics* 2014; 109: 199–211.
- 17 Yu H, Diao H, Wang C, Lin Y, Yu F, Lu H, Xu W, Li Z, Shi H, Zhao S, Zhou Y, Zhang Y. Acetylproteomic analysis reveals functional implications of lysine acetylation in human spermatozoa (sperm). *Mol Cell Proteomics* 2015; 14(4): 1009–1023.
- 18 Cai L, Tu J, Song L, Gao Z, Li K, Wang Y, Liu Y, Zhong F, Ge R, Qin J, Ding C, He F. Proteome-wide mapping of endogenous SUMOylation sites in mouse testis. *Mol Cell Proteomics* 2017; 16(5): 717–727.
- 19 Luense LJ, Wang X, Schon SB, Weller AH, Lin Shiao E, Bryant JM, Bartolomei MS, Coutifaris C, Garcia BA, Berger SL. Comprehensive analysis of histone post-translational modifications in mouse and human male germ cells. *Epigenetics Chromatin* 2016; 9: 24.

- 20 Jones LH. Small-molecule kinase downregulators. *Cell Chem Biol* 2018; 25(1): 30–35.
- 21 Munk S, Refsgaard JC, Olsen JV, Jensen LJ. From phospho-sites to kinases. *Methods Mol Biol* 2016; 1355: 307–321.
- 22 Vlastaridis P, Kyriakidou P, Chaliotis A, Van de Peer Y, Oliver SG, Amoutzias GD. Estimating the total number of phosphoproteins and phosphorylation sites in eukaryotic proteomes. *Gigascience* 2017; 6(2): 1–11.
- 23 Miller CJ, Turk BE. Homing in: Mechanisms of substrate targeting by protein kinases. *Trends Biochem Sci* 2018; 43(5): 380–394.
- 24 Watanabe N, Osada H. Small molecules that target phosphorylation dependent protein-protein interaction. *Bioorg Med Chem* 2016; 24(15): 3246–3254.
- 25 Xu H, Shen L, Chen X, Ding Y, He J, Zhu J, Wang Y, Liu X. mTOR/P70S6K promotes spermatogonia proliferation and spermatogenesis in Sprague Dawley rats. *Reprod Biomed Online* 2016; 32(2): 207–217.
- 26 Kang TH, Park DY, Choi YH, Kim KJ, Yoon HS, Kim KT. Mitotic histone H3 phosphorylation by vaccinia-related kinase 1 in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2007; 27(24): 8533–8546.
- 27 Choi YH, Park CH, Kim W, Ling H, Kang A, Chang MW, Im SK, Jeong HW, Kong YY, Kim KT. Vaccinia-related kinase 1 is required for the maintenance of undifferentiated spermatogonia in mouse male germ cells. *PLoS One* 2010; 5(12): e15254.
- 28 Ben Khelifa M, Zouari R, Harbuz R, Halouani L, Arnoult C, Lunardi J, Ray PF. A new AURKC mutation causing macrozoospermia: implications for human spermatogenesis and clinical diagnosis. *Mol Hum Reprod* 2011; 17(12): 762–768.
- 29 Molinari E, Mirabelli M, Raimondo S, Brussino A, Gennarelli G, Bongioanni F, Revelli A. Sperm macrocephaly syndrome in a patient without AURKC mutations and with a history of recurrent miscarriage. *Reprod Biomed Online* 2013; 26(2): 148–156.
- 30 Invergo BM, Beltrao P. Reconstructing phosphorylation signalling networks from quantitative phosphoproteomic data. *Essays Biochem* 2018; 62(4): 525–534.
- 31 Osinalde N, Aloria K, Omaetxebarria MJ, Kratchmarova I. Targeted mass spectrometry: An emerging powerful approach to unblock the bottleneck in phosphoproteomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2017; 1055–1056: 29–38.
- 32 Mikolcevic P, Sigl R, Rauch V, Hess MW, Pfaller K, Barisic M, Pelliniemi LJ, Boesl M, Geley S. Cyclin-dependent kinase 16/PCTAIRE kinase 1 is activated by cyclin Y and is essential for spermatogenesis. *Mol Cell Biol* 2012; 32(4): 868–879.
- 33 Gupta SK, Shukla P. Glycosylation control technologies for recombinant therapeutic proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018; 102(24): 10457–10468.
- 34 Akama TO, Nakagawa H, Wong NK, Sutton-Smith M, Dell A, Morris HR, Nakayama J, Nishimura S, Pai A, Moremen KW, Marth JD, Fukuda MN. Essential and mutually compensatory roles of α -mannosidase II and α -mannosidase IIx in N-glycan processing *in vivo* in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(24): 8983–8988.
- 35 Suryavathi V, Panneerdoss S, Wolkowicz MJ, Shetty J, Sherman NE, Flickinger CJ, Herr JC. Dynamic changes in equatorial segment protein 1 (SPESP1) glycosylation during mouse spermiogenesis. *Biol Reprod* 2015; 92(5): 129.
- 36 Drazic A, Myklebust LM, Ree R, Arnesen T. The world of protein acetylation. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1864(10): 1372–1401.
- 37 Aksnes H, Van Damme P, Goris M, Starheim KK, Marie M, Stove SI, Hoel C, Kalvik TV, Hole K, Glomnes N, Furnes C, Ljostveit S, Ziegler M, Niere M, Gevaert K, Arnesen T. An organellar α -acetyltransferase, *naa60*, acetylates cytosolic N termini of transmembrane proteins and maintains Golgi integrity. *Cell Rep* 2015; 10(8): 1362–1374.
- 38 Allis CD, Berger SL, Cote J, Dent S, Jenuwien T, Kouzarides T, Pillus L, Reinberg D, Shi Y, Shiekhhattar R, Shilatifard A, Workman J, Zhang Y. New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* 2007; 131(4): 633–636.
- 39 Wenda JM, Homolka D, Yang Z, Spinelli P, Sachidanandam R, Pandey RR, Pillai RS. Distinct roles of RNA helicases MVH and TDRD9 in PIWI slicing-triggered mammalian piRNA biogenesis and function. *Dev Cell* 2017; 41(6): 623–637.e9.
- 40 Nagamori I, Cruickshank VA, Sassone-Corsi P. Regulation of an RNA granule during spermatogenesis: acetylation of MVH in the chromatoid body of germ cells. *J Cell Sci* 2011; 124(Pt 24): 4346–4355.
- 41 Akutsu M, Dikic I, Bremm A. Ubiquitin chain diversity at a glance. *J Cell Sci* 2016; 129(5): 875–880.
- 42 Nakamura N. Ubiquitin system. *Int J Mol Sci* 2018; 19(4): pii: E1080.
- 43 Kleiger G, Mayor T. Perilous journey: a tour of the ubiquitin-proteasome system. *Trends Cell Biol* 2014; 24(6): 352–359.
- 44 Zheng N, Shabek N. Ubiquitin ligases: structure, function, and regulation. *Annu Rev Biochem* 2017; 86: 129–157.
- 45 Buetow L, Huang DT. Structural insights into the catalysis and regulation of E3 ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016; 17(10): 626–642.
- 46 Middleton AJ, Wright JD, Day CL. Regulation of E2s: A Role for additional ubiquitin binding sites? *J Mol Biol* 2017; 429(22): 3430–3440.

- 47 Cappadocia L, Lima CD. Ubiquitin-like protein conjugation: structures, chemistry, and mechanism. *Chem Rev* 2018; 118(3): 889–918.
- 48 Bose R, Manku G, Culty M, Wing SS. Ubiquitin-proteasome system in spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol* 2014; 759: 181–213.
- 49 Hou CC, Yang WX. New insights to the ubiquitin-proteasome pathway (UPP) mechanism during spermatogenesis. *Mol Biol Rep* 2013; 40(4): 3213–3230.
- 50 Du Y, Liu ML, Jia MC. Identification and characterization of a spermatogenesis-related gene *Ube1* in rat testis. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2008; 60(3): 382–390.
- 51 Richburg JH, Myers JL, Bratton SB. The role of E3 ligases in the ubiquitin-dependent regulation of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 30: 27–35.
- 52 Xu W, Li H, Dong Z, Cui Z, Zhang N, Meng L, Zhu Y, Liu Y, Li Y, Guo H, Ma J, Wei Z, Zhang N, Yang Y, Chen S. Ubiquitin ligase gene *neur13* plays a role in spermatogenesis of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) by regulating testis protein ubiquitination. *Gene* 2016; 592(1): 215–220.
- 53 Guo Y, Song Y, Guo Z, Hu M, Liu B, Duan H, Wang L, Yuan T, Wang D. Function of *RAD6B* and *RNF8* in spermatogenesis. *Cell Cycle* 2018; 17(2): 162–173.
- 54 Melnick AF, Gao Y, Liu J, Ding D, Predom A, Kelly C, Hess RA, Chen C. *RNF216* is essential for spermatogenesis and male fertility. *Biol Reprod* 2019; 100(5): 1132–1134.
- 55 Pichler A, Fatouros C, Lee H, Eisenhardt N. SUMO conjugation - a mechanistic view. *Biomol Concepts* 2017; 8(1): 13–36.
- 56 Wilson VG. Introduction to sumoylation. *Adv Exp Med Biol* 2017; 963: 1–12.
- 57 Rodriguez A, Pangas SA. Regulation of germ cell function by SUMOylation. *Cell Tissue Res* 2016; 363(1): 47–55.
- 58 Vigodner M, Morris PL. Testicular expression of small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) supports multiple roles in spermatogenesis: silencing of sex chromosomes in spermatocytes, spermatid microtubule nucleation, and nuclear reshaping. *Dev Biol* 2005; 282(2): 480–492.
- 59 Qian MX, Pang Y, Liu CH, Haratake K, Du BY, Ji DY, Wang GF, Zhu QQ, Song W, Yu Y, Zhang XX, Huang HT, Miao S, Chen LB, Zhang ZH, Liang YN, Liu S, Cha H, Yang D, Zhai Y, Komatsu T, Tsuruta F, Li H, Cao C, Li W, Li GH, Cheng Y, Chiba T, Wang L, Goldberg AL, Shen Y, Qiu XB. Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis. *Cell* 2013; 153(5): 1012–1024.
- 60 Steger K, Balhorn R. Sperm nuclear protamines: A checkpoint to control sperm chromatin quality. *Anat Histol Embryol* 2018; 47(4): 273–279.
- 61 Soler-Ventura A, Castillo J, de la Iglesia A, Jodar M, Barrachina F, Balleca JL, Oliva R. Mammalian sperm protamine extraction and analysis: A step-by-step detailed protocol and brief review of protamine alterations. *Protein Pept Lett* 2018; 25(5): 424–433.
- 62 Sabari BR, Zhang D, Allis CD, Zhao Y. Metabolic regulation of gene expression through histone acylations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017; 18(2): 90–101.
- 63 Huynh KD, Lee JT. Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. *Nature* 2003; 426(6968): 857–862.
- 64 Dai L, Peng C, Montellier E, Lu Z, Chen Y, Ishii H, Debernardi A, Buchou T, Rousseaux S, Jin F, Sabari BR, Deng Z, Allis CD, Ren B, Khochbin S, Zhao Y. Lysine 2-hydroxyisobutyrylation is a widely distributed active histone mark. *Nat Chem Biol* 2014; 10(5): 365–370.
- 65 Goudarzi A, Zhang D, Huang H, Barral S, Kwon OK, Qi S, Tang Z, Buchou T, Vitte AL, He T, Cheng Z, Montellier E, Gaucher J, Curtet S, Debernardi A, Charbonnier G, Puthier D, Petosa C, Panne D, Rousseaux S, Roeder RG, Zhao Y, Khochbin S. Dynamic competing histone H4 K5K8 acetylation and butyrylation are hallmarks of highly active gene promoters. *Mol Cell* 2016; 62(2): 169–180.
- 66 Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, Buchou T, Cheng Z, Rousseaux S, Rajagopal N, Lu Z, Ye Z, Zhu Q, Wysocka J, Ye Y, Khochbin S, Ren B, Zhao Y. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 2011; 146(6): 1016–1028.
- 67 Sin HS, Barski A, Zhang F, Kartashov AV, Nussenzweig A, Chen J, Andreassen PR, Namekawa SH. *RNF8* regulates active epigenetic modifications and escape gene activation from inactive sex chromosomes in post-meiotic spermatids. *Genes Dev* 2012; 26(24): 2737–2748.