

· 基础研究 ·

DNAJB8 在小鼠睾丸生殖细胞中的表达定位

李鑫¹, 叶岚^{1*}, 白顺^{2*}

¹南京医科大学生殖医学国家重点实验室, 江苏 南京 211166; ²中国科学技术大学附属第一医院生殖中心, 安徽 合肥 230001

[摘要] 目的:探究DNAJB8[DnaJ heat shock protein family(HSP40) member B8]在小鼠精子发生过程中的表达模式。方法:分别采用实时荧光定量PCR和蛋白免疫印迹实验检测小鼠各脏器、不同发育时期睾丸组织以及不同生精细胞DNAJB8的mRNA转录和蛋白表达量;免疫荧光检测DNAJB8在生精细胞中的表达定位。结果:DNAJB8基因在睾丸组织中特异表达,从小鼠出生后21 d(P21)即圆形精子阶段开始DNAJB8 mRNA保持较高的表达,而DNAJB8蛋白在精子变形晚期出生后35 d(P35)才开始表达。DNAJB8蛋白主要定位在晚期精子细胞及精子鞭毛中段。结论:DNAJB8可能参与小鼠精子变形晚期的发育过程。

[关键词] DNAJB8; 睾丸; 生殖细胞; 小鼠

[中图分类号] R339.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)09-1269-06

doi:10.7655/NYDXBNS20200905

Localization and expression of DNAJB8 in male germ cells

LI Xin¹, YE Lan^{1*}, BAI Shun^{2*}

¹State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ²Reproductive Center, the First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230001, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the expression pattern of heat shock protein DNAJB8[DnaJ heat shock protein family(HSP40)member B8] in spermatogenesis. **Methods:** Quantitative real-time PCR and Western blot were used to determine the transcript levels and protein abundance of DNAJB8 in various mouse tissues, testes at different developmental stages and different germ cell populations. The subcellular localization of DNAJB8 was further assessed by immunofluorescence analysis. **Results:** DNAJB8 was specifically expressed in the mouse testis. The transcripts of DNAJB8 mRNA increased significantly at postnatal day 21 (P21), when round spermatids appeared. However, the protein of DNAJB8 was detected until in P35 mouse testis, where elongating spermatids were highly enriched at this stage. Immunostaining on frozen adult mouse testis and spermatozoa showed that DNAJB8 was observed in late stages of spermatids, and its signal was also present in middle-piece flagellum of spermatozoa. **Conclusion:** DNAJB8 may function in the elongation of round spermatids during late stages of spermiogenesis.

[Key words] DNAJB8; testis; germ cell; mouse

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(09): 1269-1274]

哺乳动物雄性精子发生包括精原干细胞通过有丝分裂的自我更新及分化、精母细胞减数分裂和圆形精子变形为精子细胞3个主要环节^[1-2]。该过程最明显的形态学变化发生在精子变形阶段,包括顶体生成,核内染色质重塑,中心粒迁移和分化形

[基金项目] 国家自然科学基金(81901543)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: bssj520@163.com; lanye@njmu.edu.cn

成精子鞭毛的中轴,线粒体鞘形成,胞质残余体去除等^[3]。这些精子形态上的变化需要大量特异表达的蛋白参与。值得注意的是,在圆形精子分化为长形精子过程中,基因转录开始沉默,表明精子变形后期即长形精子之后的分化过程,蛋白质表达更多地受到转录后的调控^[4-5]。此过程相关蛋白的精准调控,包括蛋白翻译、折叠和转运等,对于高质量精子的产生以及异常精子的识别和降解至关重要。

DNAJB8[DnaJ heat shock protein family(HSP40) member B8]属于热休克蛋白DNAJ家族,该家族蛋白广泛参与蛋白质折叠、转运、组装和解离过程^[6]。DNAJ蛋白均含有1个氨基酸序列高度保守的J结构域,作为同家族蛋白HSP70分子伴侣参与ATP水解等功能。根据结构域不同(J结构域、富含甘氨酸/苯丙氨酸区连接的锌指结构域和羧基末端区)DNAJ蛋白分为I、II、III(A、B、C)3个亚型^[7]。同时,DNAJ蛋白含有多个其他蛋白结构域,例如泛素-互作序列和网格蛋白-互作结构域,能够靶向降解蛋白和伴侣蛋白自噬。DNAJ蛋白还含有内质网信号肽和线粒体导肽,可以识别细胞内特定细胞器^[8]。DNAJ蛋白的异常表达能够引起错误折叠蛋白的聚集和细胞损伤,导致神经退行性疾病的发生^[9],例如DNAJB6和DNAJB8与组蛋白去乙酰化酶(HDAC4、HDAC6和SIRT2)相互作用,抑制多聚谷氨酰胺蛋白(polyQ)的聚集,后者作为细胞毒性蛋白参与亨廷顿病的发生^[10]。然而,一些DNAJ蛋白的突变也可导致非神经退行性疾病,例如DNAJB13的突变导致原发性纤毛运动障碍,影响精子尾部鞭毛形态。

DNAJB8同时也是肿瘤-睾丸(CT)基因,维持肿瘤干细胞样细胞的自我更新^[11]。然而,DNAJB8蛋白在睾丸精子发生中的时空表达还不明确。本课题组前期完成了转录因子SOX30的转录组(RNA-seq)和表观组高通量测序(ChIP-seq)工作,深入分析了SOX30在精母细胞和圆形精子中调控基因转录的作用,并且从捕获到的靶基因中筛选到DNAJB8基因。在SOX30基因敲除小鼠精母细胞和圆形精子中DNAJB8 mRNA水平显著下降,并且RNA-seq显示几乎没有测试片段覆盖在DNAJB8基因外显子区域。ChIP-seq进一步分析发现SOX30结合DNAJB8基因的启动子区域,直接调控DNAJB8基因的转录过程。这些数据提示DNAJB8可能在精子变形阶段发挥功能作用^[12]。本研究对DNAJB8在小鼠精子发生过程中的表达模式进行探究,为DNAJB8的功能机制研究提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所使用的小鼠为1~8周龄C57BL/6J(SPF级)小鼠,利用CRISPR/Cas9技术构建敲除小鼠模型,并通过合笼获得纯合突变小鼠(Dnajb8^{-/-})。RT-PCR和免疫荧光实验所使用的小鼠均为野生型C57BL/6J小鼠(Dnajb8^{+/+})。胰酶、胎牛血清(FBS)、

DMEM(Gibco公司,美国);琼脂糖(上海生工公司);TRIzol(Ambion公司,美国);RT reagent Kit(TaKaRa公司,日本);ECL发光液(南京诺唯赞公司);DAPI(Sigma公司,美国);荧光标记的山羊抗兔IgG、Rhodamine Peanut Agglutinin(Vectorlabs,美国)。本研究经南京医科大学实验动物福利伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 抗体制备

为了明确DNAJB8的时空表达模式,首先进行DNAJB8抗体的制备工作。综合DNAJB8的结构域、序列特异性和保守性、线性表位、亲水性、免疫原性和表位暴露性数据,合成多肽进行抗体制备。偶联KLH后免疫两只实验级日本大耳白兔,处死兔子后获取血清,通过Protein A抗原亲和层析纯化抗体。

1.2.2 分选不同生精细胞

选取出生后第6天(P6)~P8小鼠用于分离支持细胞和精原细胞,以及成年小鼠用于分离粗线期精母细胞、圆形精子和长形精子。去除小鼠睾丸包膜,胶原酶和胰酶消化组织为单细胞悬液,加入含2%~4%的DMEM培养液中并静置2 h,自动收集器将细胞收集到80个15 mL玻璃管中,每管10 mL,注意控制液体一滴一滴地流下,不能过快或过慢;500 g离心5 min后通过正置显微镜下观察筛选各级生精细胞。

1.2.3 qRT-PCR

组织或细胞加入TRIzol试剂,冰上研磨至组织充分裂解,12 000 r/min 4 °C离心30 min,取上清并加入200 μL氯仿,剧烈摇晃后室温静置3 min,12 000 r/min 4 °C离心30 min,取上清并加入等体积的异丙醇,静置10 min后12 000 r/min 4 °C离心15 min,75%乙醇清洗沉淀后加入适量DEPC水溶解RNA。通过紫外可见分光光度计检测RNA浓度和纯度;采用TaKaRa的PrimeScript RT reagent Kit逆转录试剂盒合成cDNA,qPCR反应程序:95 °C 30 s,95 °C 5 s,60 °C 30 s;熔解曲线(95 °C 15 s,60 °C 1 min,0.5 °C/s~95 °C 15 s)。PCR引物序列:Dnajb8-F,5'-TTGT-CAGACTCTAAGAAGCGTT-3',Dnajb8-R,5'-CCAA-AGAAGCTCGCGAAAATAT-3';36B4-F,5'-GCA-GATCGGGTACCCAACTGTTG-3',36B4-R,5'-CAG-CAGCCGCAAATGCAGATG-3'(内参照)。

1.2.4 Western blot

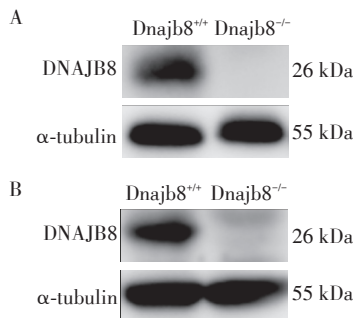
组织或分离的细胞加入适量的RIPA裂解液,轻轻吹打混匀,旋转摇床充分裂解15 min后12 500 r/min离心10 min(4 °C),收集上清至干净的

blot 实验显示, Dnajb8^{+/+}小鼠睾丸、精子蛋白中有目的条带(26 kDa)表达, 而 Dnajb8^{-/-}小鼠睾丸、精子中无目的条带表达(图2), 说明制备的 DNAJB8 抗体特异性结合 DNAJB8 蛋白。

2.3 DNAJB8 mRNA 和蛋白高度表达于减数分裂后的生精细胞

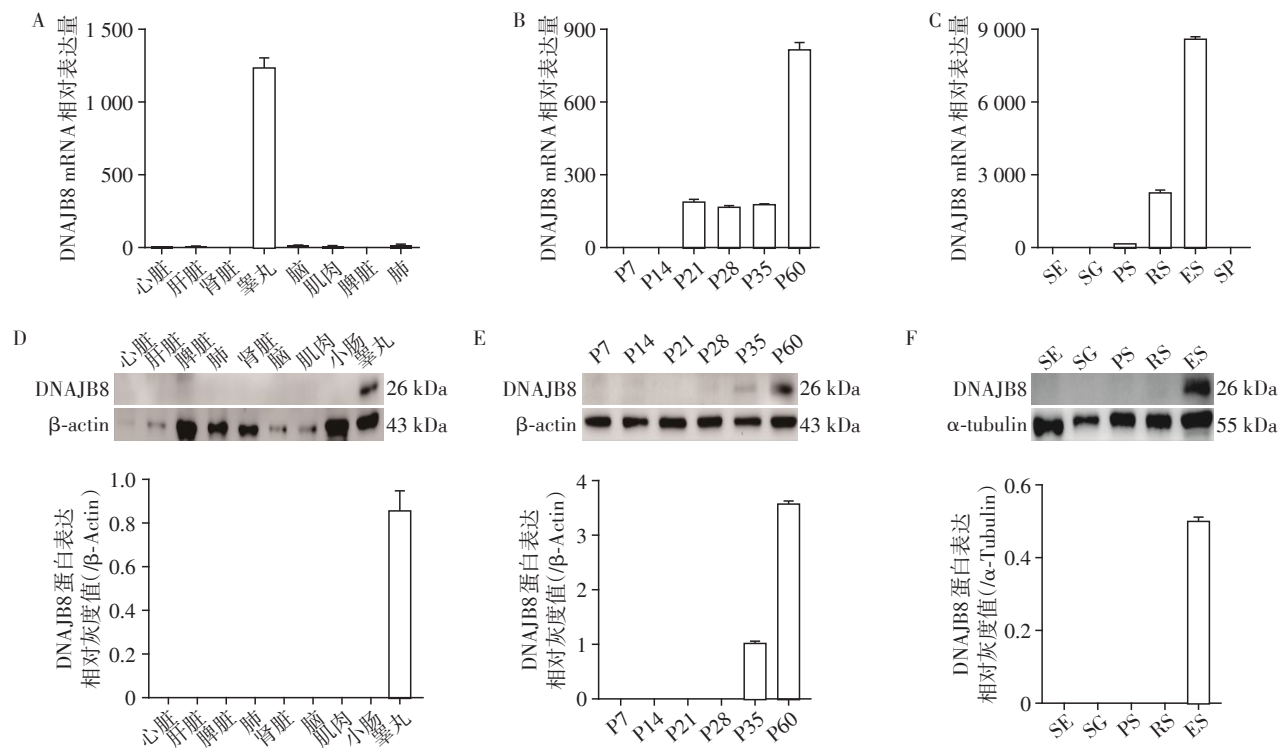
首先通过 qRT-PCR 检测 DNAJB8 mRNA 在睾丸组织中特异表达(图3A)。随后选取出生后不同发

育时间点的野生型小鼠睾丸组织, 即 P7(主要为精原细胞)、P14(出现早期精母细胞)、P21(发育到粗线期精母细胞)、P28(生精管腔出现早期圆形精子)、P35(第1波生精波结束)、P60(成熟精子), 同样采用 qRT-PCR 检测, 发现精原和早期精母细胞几乎检测不到 DNAJB8 mRNA 表达, 从 P21 开始 DNAJB8 mRNA 保持较高的表达水平, 成年达到最高(图3B)。为了明确 DNAJB8 基因在睾丸不同生殖细胞中的表达情况, 对各级生精细胞和支持细胞进行 DNAJB8 mRNA 水平检测, 发现在支持细胞(sertoli, SE)和精原细胞(spermatogonia, SG)中几乎没有 DNAJB8 表达, 粗线期精母细胞(pachytene spermatocytes, PS)阶段 DNAJB8 mRNA 出现微弱上升, 圆形精子(round spermatid, RS)阶段明显升高, 长形精子(elongated spermatid, ES)阶段达到顶峰, 随后在附睾尾成熟精子(sperm, SP)里出现极微弱的表达(图3C)。随后, 利用 Western blot 进一步验证 DNAJB8 蛋白在睾丸组织中的特异表达(图3D)。检测不同年龄段的小鼠睾丸组织, 发现 DNAJB8 蛋白在出生后第35天(P35)的小鼠中开始表达(图3E), 明确 DNAJB8 蛋白在精子变形晚期 ES 阶段才开始表达(图3F)。



A: 在 Dnajb8^{+/+}和 Dnajb8^{-/-}小鼠睾丸中 DNAJB8 抗体特异性鉴定结果。B: 在 Dnajb8^{+/+}和 Dnajb8^{-/-}小鼠精子中 DNAJB8 抗体特异性鉴定结果。

图2 Western blot 鉴定 DNAJB8 抗体特异性
Figure 2 DNAJB8 antibody specificity detected by Western blot



A~C: qRT-PCR 检测 DNAJB8 mRNA 在小鼠不同组织(A)、不同发育时间点(B)的表达以及各级生精细胞及支持细胞中(C)的表达(n=3)。SE: 支持细胞; SG: 精原细胞; PS: 粗线期精母细胞; RS: 圆形精子; ES: 长形精子; SP: 附睾尾成熟精子。D~F: Western blot 检测 DNAJB8 在小鼠不同组织(D)、睾丸不同发育时间点(E)以及各级生精细胞和支持细胞(F)的表达(n=3)。

图3 DNAJB8 高表达于小鼠雄性生殖细胞

Figure 3 DNAJB8 was highly expressed in mouse male germ cells

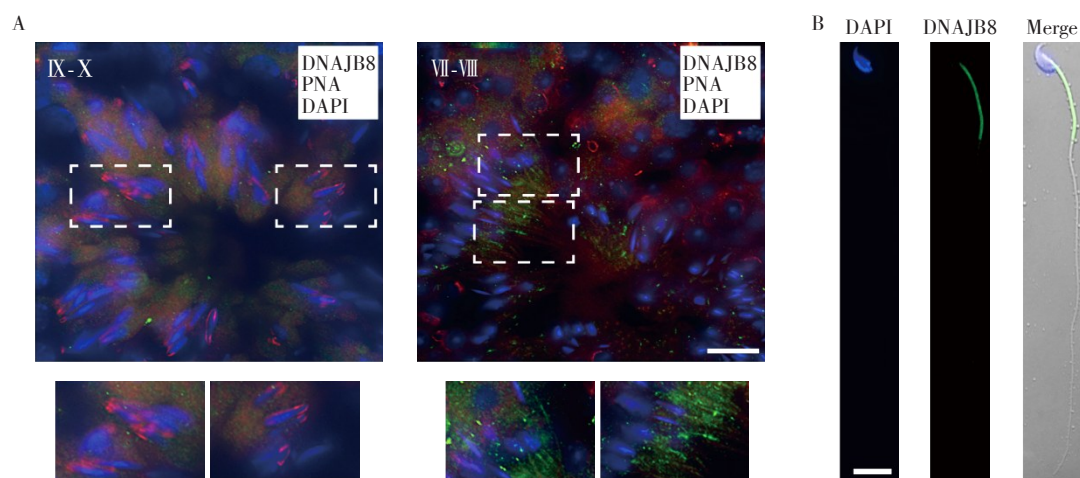
2.4 DNAJB8的定位

运用免疫荧光检测DNAJB8在生精细胞中的定位。IX~X时期管腔内发育至长形阶段的精子细胞没有检测到DNAJB8的表达,而在VII~VIII时期管腔中可见DNAJB8在精子细胞尾部鞭毛有明显信号(图4A),明确DNAJB8在精子变形晚期阶段才开始表

达。同时,检测附睾尾精子,发现DNAJB8主要定位在精子鞭毛中段(图4B),提示DNAJB8可能参与线粒体鞘形成。

3 讨论

本研究主要对DNAJ家族II型蛋白DNAJB8在



A: DNAJB8在野生型小鼠IX~X和VII~VIII时期生精管腔中的定位和表达情况,PNA为顶体标志物,标尺=25 μm ; B: DNAJB8在附睾尾精子的表达定位,标尺=15 μm 。

图4 免疫荧光检测DNAJB8在生精细胞中的定位

Figure 4 The localization of DNAJB8 in spermatogenic cells detected by immunofluorescence

小鼠睾丸生精细胞中的时空表达模式展开探索。分析小鼠体内各组织的Western blot结果,提示DNAJB8在睾丸组织中特异表达。从P21即圆形精子阶段开始,DNAJB8 mRNA保持较高的表达,而DNAJB8蛋白在精子变形晚期P35才开始表达。DNAJB8主要定位在睾丸晚期精子细胞及精子鞭毛中段,提示DNAJB8可能参与小鼠精子变形发育过程。

DNAJ家族蛋白广泛参与蛋白折叠、转运、组装和解离,涉及多种生物学过程,包括精子发生等。DNAJA1主要在精子变形阶段表达,参与雄激素合成信号通路。DNAJB1在雄性小鼠精母细胞、圆形精子、长形精子、精子尾部以及顶体中高表达。DNAJB3在减数分裂后的生精细胞顶体形成过程中特异表达。此外,DNAJB13定位在精子鞭毛轴丝上,且在长形精子阶段能够与SUN5结合参与精子头尾的连接^[13]。SUN5突变能够引起自身折叠的异常,可能是DNAJB13互作异常导致^[14]。本研究DNAJB8在精子变形阶段高表达,与同家族许多成员的表达模式相似。值得注意的是,DNAJB8特异定位在精子鞭毛中段,提示DNAJB8与同家族蛋白相比,在精子发生不同发育阶段起作用。

精子变形起始阶段组蛋白开始乙酰化,基因转录活性增加,参与精子核重塑、顶体和鞭毛形成以及细胞质去除等事件所需的基因开始大规模转录。这一过程中,转录因子直接结合靶基因的启动子区域和染色质复合体,参与精子变形关键事件的精准调控^[5]。本研究前期结果显示,转录因子SOX30直接调控DNAJB8基因的转录过程,影响该基因的表达,进而导致精子变形阻滞在圆形精子阶段,提示DNAJB8可能参与精子变形过程。

精子变形阶段,精子鞭毛轴丝从附着于圆形精子细胞核植入窝的中心粒残余部分延伸出来,伴随Manchette、纤维鞘和外周致密纤维的组装,直到晚期阶段75~100个线粒体螺旋状地组装在精子尾部中段的外周致密纤维周围形成线粒体鞘,其余线粒体则随着胞质残余体丢弃^[15]。已有一些蛋白被报道参与精子线粒体鞘的形成过程,例如维持外周致密纤维和线粒体之间联系的GPX4和KLC3^[16-17]、调控线粒体结构蛋白表达的SPATA19和TPPP2^[18-19]、参与线粒体聚集的GK2和Gyk1^[20]。值得注意的是,精子鞭毛中段结构及线粒体鞘组装完整性与男性弱精症密切相关,该类型患者的精子常具有较短的鞭毛中

段和较少的螺旋状线粒体,线粒体无序排列且相互之间有较大空隙^[21]。基于以上研究,结合本研究发现的DNAJB8蛋白定位在鞭毛中段,提示DNAJB8可能参与精子变形晚期线粒体鞘形成过程中所需蛋白的转运和翻译等生理功能,以后需要对DNAJB8基因敲除小鼠进行基因功能及作用机制方面的深入探索。

[参考文献]

- [1] 刘媛媛,宋小玲,王仿竹,等. m6A识别蛋白Ythdf1在精子发生中的作用研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(2):171-175
- [2] 宋小玲,刘媛媛,王仿竹,等. m6A识别蛋白Ythdf3在精子发生中的作用研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(6):846-850
- [3] NISHIMURA H, L'HERNAULT S W. Spermatogenesis [J]. *Curr Biol*,2017,27(18):R988-R994
- [4] DUN M D, AITKEN R J, NIXON B. The role of molecular chaperones in spermatogenesis and the post-testicular maturation of mammalian spermatozoa [J]. *Hum Reprod Update*,2012,18(4):420-435
- [5] MAEZAWA S, YUKAWA M, ALAVATTAM K G, et al. Dynamic reorganization of open chromatin underlies diverse transcriptomes during spermatogenesis [J]. *Nucleic Acids Res*,2018,46(2):593-608
- [6] ZININGA T, RAMATSUI L, SHONHAI A. Heat shock proteins as immunomodulators [J]. *Molecules*, 2018, 23(11):28-46
- [7] PULIDO P, LEISTER D. Novel DNAJ-related proteins in *Arabidopsis thaliana* [J]. *New Phytol*,2018,217(2):480-490
- [8] ZAROUCHLIOTI C, PARFITT D A, LI W, et al. DNAJ proteins in neurodegeneration: essential and protective factors [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*,2018,373(1738):20160534
- [9] RUAN L, ZHOU C, JIN E, et al. Cytosolic proteostasis through importing of misfolded proteins into mitochondria [J]. *Nature*,2017,543(7645):443-446
- [10] HAGEMAN J, RUJANO M A, VAN WAARDE M A, et al. A DNAJB chaperone subfamily with HDAC-dependent activities suppresses toxic protein aggregation [J]. *Mol Cell*,2010,37(3):355-369
- [11] NISHIZAWA S, HIROHASHI Y, TORIGOE T, et al. HSP DNAJB8 controls tumor-initiating ability in renal cancer stem-like cells [J]. *Cancer Res*,2012,72(11):2844-2854
- [12] BAI S, FU K, YIN H, et al. Correction: Sox30 initiates transcription of haploid genes during late meiosis and spermiogenesis in mouse testes [J]. *Development*, 2019, 146(10):dev179978
- [13] EL KHOURI E, THOMAS L, JEANSON L, et al. Mutations in DNAJB13, encoding an HSP40 family member, cause primary ciliary dyskinesia and male infertility [J]. *Am J Hum Genet*,2016,99(2):489-500
- [14] SHANG Y, YAN J, TANG W, et al. Mechanistic insights into acephalic spermatozoa syndrome-associated mutations in the human SUN5 gene [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(7):2395-2407
- [15] LEHTI MS, SIRONEN A. Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects [J]. *Biol Reprod*,2017,97(4):522-536
- [16] SUZUKI-TOYOTA F, ITO C, TOYAMA Y, et al. Factors maintaining normal sperm tail structure during epididymal maturation studied in *Gopc^{-/-}* mice [J]. *Biol Reprod*, 2007, 77(1):71-82
- [17] INGOLD I, AICHLER M, YEFREMOVA E, et al. Expression of a catalytically inactive mutant form of glutathione peroxidase 4(*Gpx4*) confers a dominant-negative effect in male fertility [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(23):14668-14678
- [18] MI Y, SHI Z, LI J. Spata19 is critical for sperm mitochondrial function and male fertility [J]. *Mol Reprod Dev*, 2015, 82(11):907-913
- [19] ZHU F, YAN P, ZHANG J, et al. Deficiency of TPPP2, a factor linked to oligoasthenozoospermia, causes subfertility in male mice [J]. *J Cell Mol Med*,2019,23(4):2583-2594
- [20] CHEN Y, LIANG P, HUANG Y, et al. Glycerol kinase-like proteins cooperate with *Pld6* in regulating sperm mitochondrial sheath formation and male fertility [J]. *Cell Discov*,2017,3:17030
- [21] PELLICCIONE F, MICILLO A, CORDESCHI G, et al. Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is strongly associated with unexplained asthenozoospermia [J]. *Fertil Steril*,2011,95(2):641-646

[收稿日期] 2020-04-03