

文章编号: 1001-6325(2023)04-0524-08

生殖基础研究

RNA N6-甲基腺苷(m6A)修饰 相关酶在哺乳动物精子发生中的研究进展

张 强, 宿文辉*

中国医科大学 生命科学学院 生物化学与分子生物学教研室, 辽宁 沈阳 110122

摘要: N6-甲基腺苷(m6A)核酸修饰是近10年来研究较多的一类表观修饰, RNA通过经典m6A修饰蛋白“Writers”(METTL3/14/WTAP等)、m6A去修饰蛋白“Erasers”(FTO和ALKBH5)和m6A识别蛋白“Readers”(YTHDC1/2、YTHDF1/2/3等)组成的协同调节体系进行转录后核酸m6A修饰、去修饰和识别结合,进而调控转录本下游命运。精子发生是雄性哺乳动物性成熟和维持生育能力的重要过程,涉及生精上皮支持细胞、间质细胞和精原细胞等增殖分化和维持生精微环境过程。多项研究表明m6A调节体系参与哺乳动物精子发生进程,异常的m6A修饰水平和m6A调节体系失衡均会导致睾丸发育异常、精子发生异常和雄性不育。本文综述了精子发生过程中m6A修饰相关酶的作用,深入分析m6A差异修饰转录本之于正常精子发生的作用,对认知哺乳动物精子发生和解析临床生精障碍的分子机制具有重要意义。

关键词: m6A修饰;精子发生;支持细胞;间质细胞;生精细胞

中图分类号: R34 **文献标志码:** A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2023.04.0524

Advances in research on RNA N-6-methyladenosine(m6A) modification related enzymes in mammalian spermatogenesis

ZHANG Qiang, SU Wenhui*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Life Sciences, China Medical University, Shenyang 110122, China

Abstract: N-6-methyladenosine(m6A) has been well-known to be a type of RNA epigenetic modification over the past decade. The m6A modification enzymes include “Writers”(METTL3/14/WTAP, etc.), “Erasers”(FTO and ALKBH5) and “Readers”(YTHDC1/2, YTHDF1/2/3, etc.), which mediate RNA methylation, demethylation, and recognition binding via a synergistic regulatory system, thereby regulating the fate of RNA after transcription. Spermatogenesis is an essential process of sexual maturation and maintenance of fertility in male mammals, involving the proliferation, and differentiation of Sertoli cells, Leydig cells and spermatogonia, and maintenance of spermatogenic microenvironment. More recently, there are some researches showed that the m6A regulatory system was involved in mammalian spermatogenesis. Abnormal m6A modification and imbalances in the m6A regulatory system can lead to abnormal testicular development, abnormal spermatogenesis and male infertility. This review summarizes the function of m6A modification enzymes in spermatogenesis, and

收稿日期: 2022-08-05 修回日期: 2022-12-20

基金项目: 国家自然科学基金(81971442)

*通信作者(corresponding author): whsu@cmu.edu.cn

further analyzes the role of m6A differentially modified transcripts in normal spermatogenesis, which has a great significance for understanding mammalian spermatogenesis and decoding the molecular mechanism of clinical spermatogenesis disorders.

Key words: m6A modification; spermatogenesis; Sertoli cell; Leydig cell; spermatogenic cell

哺乳动物精子发生涉及睾丸中复杂的生精上皮成熟过程,包括青春期前生精小管细胞增殖、青春期启动时下丘脑-垂体-性腺轴精密调控睾丸内各类细胞分化和成年后生精上皮中生精微环境的有序维持^[1]。生精上皮成熟过程中伴随间质细胞和支持细胞等其他细胞的增殖分化和复杂的细胞间信号通讯,逐渐形成供精原细胞分化为成熟精子的微环境,精原细胞通过有丝分裂、减数分裂以及精子特化3个阶段最终形成精子^[1]。最近有多项研究表明,N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m6A)修饰相关酶如METTL3/14/WTAP等参与哺乳动物精子发生过程并发挥重要作用。m6A修饰相关酶通过动态修饰和识别结合m6A,进而影响转录后下游RNA命运。本文旨在讨论m6A修饰相关酶和m6A修饰转录本在哺乳动物精子发生进程中的研究进展。

1 m6A 和 m6A 修饰相关酶

RNA的m6A修饰是目前已知的170余种核酸化学修饰^[2-3]之一,Desrosiers等^[4]在1974年首次发现并阐明m6A修饰是真核生物mRNA和lncRNA中最丰富的化学修饰,哺乳动物中每个mRNA分子平均出现3~5个m6A位点。由于哺乳动物细胞包含超过10 000种mRNA,因此推测每个细胞的mRNA群体中可能存在数万个m6A位点。2011年,何川课题组首次报道了FTO蛋白对RNA中m6A动态修饰的研究^[5],改变了传统认为的RNA化学修饰是静态的观念,学界开始关注m6A修饰之于细胞命运的意义。m6A修饰相关酶包括负责m6A“写入”(修饰)的“Writers”、m6A“擦除”(去修饰)的“Erasers”和m6A“识别”的识别结合蛋白“Readers”。

“Writers”是一类m6A甲基转移酶复合体,负责在核内特定RNA模体“写入”(修饰)m6A甲基化。目前已知,“Writers”的主要成分包括甲基转移催化亚基METTL3^[6-7]、提供支架作用的METTL14^[7-8]和确保复合体的稳定和定位的调节亚基WTAP^[9]。研究发现哺乳动物RNA m6A修饰位点存在特定修饰

偏好的RRACH(R=A/G, H=A/C/U)经典模体序列^[10-11]。此外,与WTAP类似功能还有VIRMA/HAKAI/ZC3H13/TRIM28/HNRNPH^[12]、CBL1^[13]和RBM15/RBM15B^[13-14]作为m6A甲基转移酶复合体调节亚基,配合定位到RNA的RRACH基序上,在不同程度上促进m6A修饰发生。

“Erasers”是具有m6A“擦除”(去修饰)功能的酶,目前已知为FTO^[5]和ALKBH5^[15]。LC-MS/MS定量发现体外FTO、ALKBH5与m6A修饰的RNA共孵育导致其m6A/A水平降低,体内分别敲除和过表达ALKBH5和FTO证实了二者具有m6A去修饰功能。然而也有研究表明FTO可以通过介导snRNA上m6Am(N6,2'-O-二甲基腺苷)的去甲基化动态修饰剪接而间接地影响前体mRNA剪接^[16]。

“Readers”是m6A识别结合蛋白,主要有YTH结构域的蛋白家族YTHDC1/2^[17-18]、YTHDF1/2/3^[19-22]、胰岛素样生长因子2-mRNA结合蛋白IGF2BP1/2/3^[23]、真核起始因子eIF3^[24]和核内不均一核糖核蛋白家族HNRNPC/G/A2B1^[25-27],m6A识别结合蛋白介导转录本上m6A位点识别结合,调控RNA下游命运,如核输出、定位、剪接、降解和翻译效率。

最近多项研究表明,m6A作为RNA经典甲基化修饰可以影响RNA命运,细胞通过m6A修饰相关酶“Writers”、“Erasers”和“Readers”介导进行动态调节和识别RNA的m6A修饰^[28-32],调控RNA剪接^[33]、核输出^[34]、RNA降解^[35]、稳定和翻译效率^[35],进而影响基因表达、细胞信号传导和细胞增殖、分化。

2 m6A 修饰相关酶参与睾丸发育和精子发生

哺乳动物精子发生涉及下丘脑-垂体-性腺轴调控,通过释放GnRH、Gn和FSH等激素促进青春期启动,进而响应睾丸生精上皮发育和精子生成^[1]。精子发生涉及生精上皮中的支持细胞、间质细胞和精原细胞等各类增殖、分化和成熟,生精上皮各类型

细胞发育机制和细胞间复杂信号调控是当前雄性分子生殖研究领域的重要课题。近年来在越来越多的哺乳动物如啮齿类大小鼠^[36-37]、山羊^[38]、绵羊^[39-40]、猪^[41-42]、食蟹猴^[43]和人^[44]的睾丸组织单细胞测序数据中发现 m6A 修饰相关酶“Writers”、“Erasers”和“Readers”的广泛且细胞特异性的转录表达,因此推测睾丸组织不同发育阶段中 m6A 修饰相关酶可能扮演某种重要角色,但其对于睾丸器官发育和精子发生的具体作用和意义仍然知之甚少。

首先,睾丸组织在不同发育阶段的 m6A 修饰水平和 m6A 修饰相关酶存在差异。例如,Sun 等^[45]发现,不同发育阶段(12.5dpc 和 49dpp)的小鼠睾丸组织具有不同的 m6A 水平,同时睾丸组织的 METTL3/14 和 FTO/ALKBH5 蛋白水平在出生前后存在差异。不同发育阶段的小鼠睾丸组织 YTHDF2 蛋白水平也存在差异^[46]。研究发现睾丸中未成熟间质细胞分化为成熟间质细胞的过程中 m6A 修饰水平逐渐降低^[47],m6A 修饰通过影响 CAMKK2 转录物的稳定性和促进 PPMLA 的翻译效率来调节自噬,从而减少了间质细胞中的睾酮合成,这表明 m6A 在介导间质细胞分化中起重要作用。

其次,不同发育阶段睾丸组织具有独特而保守的 m6A 修饰模式。Deng 等^[48]通过 m6A-seq 检测了青春期前、青春期和青春期后的夏南牛睾丸组织,发现了 4 个存在显著 m6A 修饰差异和表达水平差异的节点(hub)基因(PLK4、PTEN、EGR1 和 PSME4),参与哺乳动物睾丸发育和精子发生调节。

不同发育阶段的生殖细胞也存在差异化的 m6A 修饰。Liu 等^[49]对猪精液不同发育阶段的精细胞分析发现,猪和小鼠的精细胞具有保守的 m6A 模式:与小鼠同源的 m6A 修饰转录本在猪的精子发生过程中起调节作用,特别是 m6A 修饰的 SETDB1、FOXO1 和 FOXO3 对精原干细胞的分化至关重要。Lin 等^[6]通过 m6A 抗体结合测序技术获得了小鼠睾丸的 m6A 高分辨率图谱,发现 m6A 修饰转录本在整个精子发生过程中呈动态变化,m6A 甲基化位点主要富集在基因编码区和终止密码子。这与 2012 年两个课题组^[10-11]分别运用“MeRIP-Seq”和“m6A-seq”抗体结合测序法鉴定出的转录本 m6A 分布特征基本相同,说明在精子发生过程中 RNA 需要维持特定特征的 m6A 修饰模式。

最后,某些内分泌干扰物可能通过介导 m6A 修饰发挥其生殖毒性。例如,Zhao 等^[50]用环境内分泌干扰物邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)饲喂大鼠^[50]发现,DEHP 导致提高睾丸组织 m6A 修饰水平,降低 FTO 和提高 YTHDC2 蛋白表达,从而引起 NRF2 mRNA 的 m6A 修饰增加,Nrf2 蛋白水平降低,从而削弱 NRF2 介导的抗氧化能力,导致氧化应激和睾丸损伤。

此外,研究人员比较多种哺乳动物睾丸组织转录组测序分析发现,睾丸中存在比体内其他任一器官更为广泛的转录和复杂的可变剪接模式^[51]。例如,多物种的睾丸转录组分析发现常染色体蛋白质编码基因在睾丸中的转录水平比在其他器官中更高^[51],基因转录在不同年龄小鼠和大鼠睾丸中具有高度动态变化的时空特征^[52-53]。

基于哺乳动物睾丸发育成熟过程中具有广泛且复杂的转录后调节和动态可变剪接的特征,以及 m6A 修饰相关酶“Writers”、“Erasers”和“Readers”介导 m6A 修饰参与生精过程的研究现状,阐明睾丸发育过程中的器官-组织-细胞中转录后 RNA 的 m6A 修饰模式,厘清 m6A 修饰转录本在精子发生中细胞通讯过程的调控关系,可以为临床生精障碍的诊断治疗提供参考依据,对理解雄性哺乳动物生殖发育进程具有重要意义。

2.1 Writers:METTL3/14/WTAP 影响精子发生

m6A 修饰酶 METTL3 在配子形成中起重要作用,具有明显保守特征。在酵母^[54]中敲除 METTL3 的同源蛋白 IME4 会导致其无法减数分裂,影响孢子形成;Vasa-Cre 工具鼠显示,在其胚胎期第 13.5 天时,特异性敲除性原细胞(gonocyte)中的 METTL3 或 METTL14 都会导致其 m6A 水平降低,出生后发现精原干细胞(SSC)因过度增殖而耗竭丢失,从而导致成年后精子发生障碍^[6, 55-56]。在 METTL3 外显子条件性缺失敲除小鼠模型中^[55]发现,METTL3 cKO 小鼠生长正常,但是完全不育,成年后睾丸重量减少 80%,并在其生精小管中观察到罕见的精母细胞,qPCR 鉴定减数分裂起始的标志物 STRA8 在 METTL3 cKO 小鼠睾丸中的表达水平显著降低。在形态学上,与野生型相比,缺乏 METTL3 的精母细胞无法达到减数分裂前期的粗线期,第 8 周时通过苏木精和伊红染色未观察到精子细胞,表明 METTL3

cKO 小鼠的生精功能发生严重障碍;在分子机制上,METTL3 介导的 m6A 修饰调节还参与精子发生的基因可变剪接,与对照组相比,METTL3 缺失导致其减数分裂相关基因显著下调,从而改变了精子发生相关基因的表达模式。可见,METTL3/14 参与维持精原干细胞的有序更新和分化过程,对维持正常精子发生至关重要。

支持细胞是生精上皮中维持生精微环境的“护土细胞”,在 小鼠睾丸支持细胞中特异性敲除 WTAP^[57] 会导致生精上皮中特异性生精微环境破坏,进而导致精原干细胞增殖异常,影响精原细胞分化;同时转录组测序显示,与对照组相比,WTAP 敲除会改变正常支持细胞中富含 m6A 修饰转录本的转录和翻译,这在蛋白水平也得到验证:WTAP 敲除的支持细胞中 CXCL12、GDNF 和 CSF1 蛋白表达显著降低。所以,小鼠支持细胞的 WTAP 正常表达对黏着在支持细胞基底部的精原干细胞维持正常分化发育必不可少。

总而言之,Mettl3/14 和 WTAP 条件性敲除小鼠模型说明了维持正常 m6A 甲基化模式对小鼠精子发生过程中具有重要意义,但是仍未进一步解释正常 m6A 甲基化的转录本的下游命运,即如何通过转录本的差异 m6A 修饰调控正常精子发生。

2.2 Erasers: FTO/ALKBH5 影响精子发生

甲氯芬那酸(meclofenamic acid, MA2)是 FTO 的一种选择性抑制剂^[58],Huang 等^[59]用 MA2 处理小鼠 GC-1 spg 细胞,发现处理后可以显著提高细胞 m6A 水平,并下调 CDK1、CDK2、CDK6 和 Cdc25a 的表达,导致 GC-1 spg 细胞 G1/S 转变停滞,细胞增殖减少;在分子机制上,MA2 降低了 CDK2 mRNA 的稳定性,回复实验显示,CDK2 -3'UTR 中 m6A 位点的突变可以减轻 MA2 处理后 CDK2 mRNA 的降解。

比较 ALKBH5 mRNA 在小鼠多组织的表达情况,发现其在睾丸中的表达水平最高^[15],为了探索 m6A 去修饰动态调节在生精过程中的意义,Zheng 等^[15]通过构建生殖细胞条件性 ALKBH5^{-/-}敲除小鼠模型,发现其睾丸内精子显著减少和形态异常,ALKBH5 缺陷型雄性小鼠的生殖细胞中 m6A mRNA 转录本增加,影响减数分裂中期精母细胞的细胞凋亡,导致生育能力受损。将 ALKBH5^{-/-}敲除小鼠模型和正常成年小鼠睾丸中纯化的粗线期

精母细胞和成熟精子进行转录组测序,发现精子发生过程的粗线期精母细胞和成熟精子之间整体转录组的最大变化在于成熟精子中的 mRNA 整体缩短,具有较长 3'-UTR(>500 nt)片段的转录本在约 60%的成熟精子中显著下调,约 70%的较短 3'-UTR(<500 nt)转录本显著增加。所以,m6A 去修饰可以控制精母细胞和圆形精细胞中的长 3'-UTR 转录本的正确剪接,换言之,精子发育过程中转录本的 m6A 去修饰异常会导致错误的转录本剪接。与之相印证的研究表明,在精子发生过程中,m6A 倾向于修饰在正常发育中将被降解的较长 mRNA 的 3'-UTR^[60]。最近一项 ALKBH5 敲除的单细胞测序研究表明^[61],ALKBH5 全敲除的小鼠间质细胞和支持细胞的比例和数量远远超过野生型小鼠,与野生型小鼠相比,ALKBH5 敲除小鼠睾丸中粗线期精母细胞和圆形精细胞的数量在成年后显著减少;此外还发现敲除 ALKBH5 导致睾丸中 TNF 的异常表达,而 TNF 作为血睾屏障(BTB)经典调节因子^[62],可能干扰成年后正常精子发生过程。

综上,在精细胞成熟过程中,m6A 去甲基化的意义主要在降解较长 mRNA,避免产生异常的转录本剪接,但是对于特定的转录本,m6A 修饰如何选择性去除?从转录活跃的精原细胞到转录克制的成熟精子发育过程中是否存在 m6A 去修饰的保守调节网络仍然未知。同时,在生精上皮的其他细胞中,m6A 去甲基化的生理意义还未得知。

2.3 Readers: m6A 识别结合蛋白影响精子发生

在小鼠精原细胞特异性敲除 YTHDC1 会导致生精小管中只有支持细胞的表型^[63],说明 YTHDC1 对于维持小鼠雄性精原细胞的发育至关重要。在 YTHDC1 识别结合生化通路研究方面,Roundtree 等^[64]发现 YTHDC1 通过招募前体 mRNA 剪接因子 SRSF3,同时阻断 SRSF10 与 mRNA 结合来促进 mRNA 剪接,体外 pull-down 实验表明 SRSF3 和 SRSF10 与 YTHDC1 存在竞争性结合^[8]。此外,YTHDC1 可以通过 SRSF3 和 NXF1 促进带有 m6A 修饰的 mRNA 核输出^[63]。

同一家族的 YTHDC2 也在睾丸生殖细胞中高度表达,主要发挥识别 m6A 促进翻译的作用,因此对减数分裂至关重要^[65]。在精子发生过程中,野生

型小鼠睾丸中 YTHDC2 转录本和蛋白在出生后 7~12 d 升高,并在成年期保持稳定^[18]。CRISPR/Cas9 靶向 YTHDC2 基因的外显子 5 基因敲除小鼠则显示不育;与野生型相比,敲除组睾丸和卵巢均减小;Ythdc2^{-/-}小鼠可以发育出正常的精原细胞和支持细胞,但是生殖细胞发育停滞在减数分裂前期 I 之前^[18]。但是也有研究认为 YTHDC2 缺失可能通过其他间接途径进而影响减数分裂。例如,如果 YTHDC2 的 YTH 结构域发生如 YTHDC2^{ketu/ketu}的错义突变,将会导致雄性和雌性均不育^[66]。在小鼠和果蝇中的实验证明 YTHDC2 和减数分裂特异性蛋白 MEIOC 形成复合体,通过控制 mRNA 的稳定性而精密地调节精细胞的减数分裂进程^[66]。

同样地,不管是小鼠睾丸特异性敲除生殖细胞中的 YTHDF2^[46]还是 CRISPR/Cas9 介导 YTHDF2 外显子 4 敲除^[56]的小鼠中均发现,雄鼠生育力低下,曲细精管中出现轻度退化,附睾精子严重丢失,睾丸中细胞凋亡诱导剂 TNFRSF12a 上调。Lasman 等^[56]利用 CRISPR/Cas9 产生外显子 3 缺失的 YTHDF1^{-/-}和 YTHDF3^{-/-}小鼠,二者出生后可以存活,并没有表现出明显的严重缺陷。然而,外显子 4 缺失的 YTHDF2^{-/-}幼崽约 80%在出生后不久死亡。尽管 YTHDF1、YTHDF2 与 YTHDF3 蛋白序列高度相似^[56],但它们不能完全互相补偿其在配子发生过程中的缺失,推测认为 YTHDF1、YTHDF2 与 YTHDF3 在精子发生过程中在不同时空中表达。

综上,YTHDC1、YTHDC2 和 YTHDF2 可以促进生殖细胞正常发育,在精子发生过程中起关键作用,但是 m6A 识别蛋白在睾丸其他细胞如支持细胞中的作用仍然是未知的。

3 m6A 水平和 m6A 修饰相关酶异常可能导致生精障碍和生殖细胞肿瘤

最近有研究表明,临床生精障碍可能与 m6A 水平和 m6A 修饰相关酶异常有关。基于转录组研究,Bai 等^[67]比较 GSE45887 和 GTEx 表达数据,分析正常人与唯支持细胞综合征(SCOS)、减数分裂停滞(MA)和减数分裂后停滞(PA)3 种非梗阻性无精症睾丸组织的差异基因转录,发现 m6A 修饰相关酶呈差异表达。与正常组相比,PA、MA 和 SCOS 组中, METTL3、IGF2BP2 和 PRRC2A 表达水平均降低,另

外有 15 个 m6A 修饰相关酶在不同程度上差异表达: CBLL1、METTL3、METTL5、ZC3H13、ALKBH5、FTO、EIF3A、ELAVL1、FMR1、IGF2BP1、IGF2BP2、IGF2BP3、PRRC2A、YTHDF3 和 ZNF217。

在生殖细胞肿瘤方面,利用 GEPIA^[68](<http://gepia.cancer-pku.cn/>)的分析 TCGA 数据显示,与正常组织相比,生殖细胞肿瘤 METTL3/14 表达水平降低,IGF2BP1/2 表达水平升高。

临床发现弱精子症患者精液的 RNA m6A 修饰水平高于正常人^[69], METTL3/14 mRNA 水平上调^[69]。糖尿病是临床少弱精症的危险因素^[70],应用全基因组分析 2 型糖尿病患者的精液发现,2 型糖尿病患者 FTO 基因存在与正常人差异的 DNA 甲基化区域^[71],这可能引起 FTO 转录异常。Miriam 等^[72]对 77 例精液异常患者的睾丸经皮穿刺活检提取 DNA 检测 ALKBH5 和 FTO 基因,发现睾丸中 FTO 遗传变异与精液质量下降有关,并鉴定出两种 FTO 错义变体: p. Cys326Ser 和 p. Ser256Asn,去甲基化酶突变可能导致 mRNA 的去甲基化异常,进而会降低男性生育能力。总而言之,高水平的 m6A 修饰可能是临床弱精症的高风险因素。

4 总结和展望

当前哺乳动物精子发生领域的 m6A 表观修饰研究仍然鲜见,几乎所有研究都是从检查 m6A 修饰相关酶在生殖系统某些细胞内特异性缺失造成的表型效应开始,通过 m6A 抗体结合测序进一步探索 m6A 调节酶体系失衡造成的转录本 m6A 修饰异常,解释 m6A 调节酶体系失衡与特定细胞表型的关联性。由于目前对 m6A 调节酶体系在哺乳动物精子发生过程中的研究只是冰山一角,仍有很多问题亟待解答。例如,在生殖细胞发育过程中 m6A 水平调节体系如何实现对转录本 m6A 位点的选择修饰和 RNA 命运决定? 对于大多数哺乳动物的精子发生过程, m6A 调控转录本机制是否存在共性? 不同发育阶段的睾丸体细胞如支持细胞、间质细胞是否存在 m6A 调控机制? 此外,研究 m6A 修饰失衡的挽救措施是否可用于临床生精障碍治疗也是非常重要的课题。

本文总结了近几年有关 m6A 修饰在哺乳动物精子发生中的研究进展,讨论了细胞系、正常哺乳动

物、基因敲除动物模型和临床案例中有关 m6A 修饰相关酶在哺乳动物精子发生进程中的生理功能,为进一步解读哺乳动物生精上皮成熟过程各类细胞

中 m6A 修饰转录本提供参考,对深入理解哺乳动物精子发生分子机制和解析临床生精障碍综合征具有重要意义。

参考文献:

- [1] Cole LA. Human male spermatogenesis [M]//Cole LA. Biology of life. Online; Academic Press, 2016: 135-141.
- [2] Roundtree IA, Evans ME, Pan T, *et al.* Dynamic rna modifications in gene expression regulation [J]. Cell, 2017, 169: 1187-1200.
- [3] Boccaletto P, Baginski B. Modomics: An operational guide to the use of the rna modification pathways database [J]. Methods Mol Biol, 2021, 2284: 481-505.
- [4] Desrosiers R, Friderici K, Rottman F. Identification of methylated nucleosides in messenger rna from novikoff hepatoma cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974, 71: 3971-3975.
- [5] Jia G, Fu Y, Zhao X, *et al.* N6-methyladenosine in nuclear rna is a major substrate of the obesity-associated fto [J]. Nat Chem Biol, 2011, 7: 885-887.
- [6] Lin Z, Hsu PJ, Xing X, *et al.* Mettl3-/mettl14-mediated mrna n(6)-methyladenosine modulates murine spermatogenesis[J]. Cell Res, 2017, 27: 1216-1230.
- [7] Wang P, Doxtader KA, Nam Y. Structural basis for cooperative function of mettl3 and mettl14 methyltransferases [J]. Mol Cell, 2016, 63: 306-317.
- [8] Xiao W, Adhikari S, Dahal U, *et al.* Nuclear m6a reader ythdc1 regulates mrna splicing[J]. Mol Cell, 2016, 61: 507-519.
- [9] Ping XL, Sun BF, Wang L, *et al.* Mammalian wtap is a regulatory subunit of the rna n6-methyladenosine methyltransferase[J]. Cell Research, 2014, 24: 177-189.
- [10] Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, *et al.* Comprehensive analysis of mrna methylation reveals enrichment in 3' utrs and near stop codons[J]. Cell, 2012, 149: 1635-1646.
- [11] Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, *et al.* Topology of the human and mouse m6a rna methylomes revealed by m6a-seq[J]. Nature, 2012, 485: 201-206.
- [12] Yue Y, Liu J, Cui X, *et al.* Virma mediates preferential m(6)a mrna methylation in 3'utr and near stop codon and associates with alternative polyadenylation [J]. Cell Discov, 2018, 4: 10.
- [13] Ruan H, Yang F, Deng L, *et al.* Human m(6)a-mrna and lncrna epitranscriptomic microarray reveal function of rna methylation in hemoglobin h-constant spring disease [J]. Sci Rep, 2021, 11: 20478.
- [14] Patil DP, Chen CK, Pickering BF, *et al.* M(6)a rna methylation promotes xist-mediated transcriptional repression[J]. Nature, 2016, 537: 369-373.
- [15] Zheng GQ, Dahl JA, Niu YM, *et al.* Alkbh5 is a mammalian rna demethylase that impacts rna metabolism and mouse fertility[J]. Mol Cell, 2013, 49: 18-29.
- [16] Mauer J, Sindelar M, Despic V, *et al.* Fto controls reversible m(6)am rna methylation during snrna biogenesis [J]. Nat Chem Biol, 2019, 15: 340-347.
- [17] Roundtree IA, Luo GZ, Zhang Z, *et al.* Ythdc1 mediates nuclear export of n(6)-methyladenosine methylated mrnas [J]. Elife, 2017, 6. e31311.doi: 10.7554/eLife.31311.
- [18] Hsu PJ, Zhu Y, Ma H, *et al.* Ythdc2 is an n(6)-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis[J]. Cell Res, 2017, 27: 1115-1127.
- [19] Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, *et al.* N(6)-methyladenosine modulates messenger rna translation efficiency [J]. Cell, 2015, 161: 1388-1399.
- [20] Wang X, Lu Z, Gomez A, *et al.* N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger rna stability[J]. Nature, 2014, 505: 117-120.
- [21] Shi H, Wang X, Lu Z, *et al.* Ythdf3 facilitates translation and decay of n(6)-methyladenosine-modified rna [J]. Cell Res, 2017, 27: 315-328.
- [22] Li A, Chen YS, Ping XL, *et al.* Cytoplasmic m(6)a reader ythdf3 promotes mrna translation [J]. Cell Res, 2017, 27: 444-447.
- [23] Huang H, Weng H, Sun W, *et al.* Recognition of rna n(6)-methyladenosine by igf2bp proteins enhances mrna stability and translation [J]. Nat Cell Biol, 2018, 20: 285-295.
- [24] Meyer KD, Patil DP, Zhou J, *et al.* 5' utr m(6)a promotes cap-independent translation [J]. Cell, 2015, 163:

- 999-1010.
- [25] Alarcon CR, Goodarzi H, Lee H, *et al.* Hnrnpa2b1 is a mediator of m(6)a-dependent nuclear rna processing events[J]. *Cell*, 2015, 162: 1299-1308.
 - [26] Liu N, Dai Q, Zheng G, *et al.* N(6)-methyladenosine-dependent rna structural switches regulate rna-protein interactions[J]. *Nature*, 2015, 518: 560-564.
 - [27] Liu N, Zhou KI, Parisien M, *et al.* N6-methyladenosine alters rna structure to regulate binding of a low-complexity protein[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 6051-6063.
 - [28] Fu Y, Dominissini D, Rechavi G, *et al.* Gene expression regulation mediated through reversible m6a rna methylation[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15: 293-306.
 - [29] Bi Z, Liu Y, Zhao Y, *et al.* A dynamic reversible rna n(6)-methyladenosine modification: Current status and perspectives[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234: 7948-7956.
 - [30] Cao G, Li HB, Yin Z, *et al.* Recent advances in dynamic m6a rna modification[J]. *Open Biol*, 2016, 6: 160003.
 - [31] Shi H, Wei J, He C. Where, when, and how: Context-dependent functions of rna methylation writers, readers, and erasers[J]. *Mol Cell*, 2019, 74: 640-650.
 - [32] Zaccara S, Ries RJ, Jaffrey SR. Reading, writing and erasing mrna methylation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20: 608-624.
 - [33] Adhikari S, Xiao W, Zhao YL, *et al.* M(6)a: Signaling for mrna splicing[J]. *RNA Biol*, 2016, 13: 756-759.
 - [34] Lesbirel S, Wilson SA. The m(6)a methylase complex and mrna export [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2019, 1862: 319-328.
 - [35] Frye M, Harada BT, Behm M, *et al.* Rna modifications modulate gene expression during development [J]. *Science*, 2018, 361: 1346-1349.
 - [36] Lukassen S, Bosch E, Ekici AB, *et al.* Characterization of germ cell differentiation in the male mouse through single-cell rna sequencing[J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 6521.
 - [37] Kalucka J, de Rooij L, Goveia J, *et al.* Single-cell transcriptome atlas of murine endothelial cells [J]. *Cell*, 2020, 180: 764-779 e720.
 - [38] Yu XW, Li TT, Du XM, *et al.* Single-cell rna sequencing reveals atlas of dairy goat testis cells[J]. *Zool Res*, 2021, 42: 401-405.
 - [39] Wu Y, Guo T, Li J, *et al.* The transcriptional cell atlas of testis development in sheep at pre-sexual maturity [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2022, 44: 483-497.
 - [40] Yang H, Ma J, Wan Z, *et al.* Characterization of sheep spermatogenesis through single-cell rna sequencing [J]. *FASEB J*, 2021, 35: e21187.
 - [41] Zhang L, Li F, Lei P, *et al.* Single-cell rna-sequencing reveals the dynamic process and novel markers in porcine spermatogenesis [J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2021, 12: 122.
 - [42] Zhang L, Guo M, Liu Z, *et al.* Single-cell rna-seq analysis of testicular somatic cell development in pigs[J]. *J Genet Genomics*, 2022, 49: 1016-1028.
 - [43] Lau X, Munusamy P, Ng MJ, *et al.* Single-cell rna sequencing of the cynomolgus macaque testis reveals conserved transcriptional profiles during mammalian spermatogenesis[J]. *Dev Cell*, 2020, 54: 548-566 e547.
 - [44] Wang M, Liu X, Chang G, *et al.* Single-cell rna sequencing analysis reveals sequential cell fate transition during human spermatogenesis[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23: 599-614 e594.
 - [45] Sun X, Zhang J, Jia Y, *et al.* Characterization of m6a in mouse ovary and testis [J]. *Clin Transl Med*, 2020, 10: e141.
 - [46] Zhao X, Lin Z, Fan Y, *et al.* Ythdf2 is essential for spermatogenesis and fertility by mediating a wave of transcriptional transition in spermatogenic cells[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2021, 53: 1702-1712.
 - [47] Chen Y, Wang J, Xu D, *et al.* M(6)a mrna methylation regulates testosterone synthesis through modulating autophagy in leydig cells[J]. *Autophagy*, 2021, 17: 457-475.
 - [48] Liu SH, Ma XY, Yue TT, *et al.* Transcriptome-wide m6a analysis provides novel insights into testicular development and spermatogenesis in xia-nan cattle[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 791221.
 - [49] Liu Z, Chen X, Zhang P, *et al.* Transcriptome-wide dynamics of m(6)a mrna methylation during porcine spermatogenesis [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2021, S1672-0229 (21) 00181-9. doi: 10.1016/j.gpb.2021.08.006.
 - [50] Zhao TX, Wang JK, Shen LJ, *et al.* Increased m6a rna modification is related to the inhibition of the nrf2-mediated antioxidant response in di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced prepubertal testicular injury [J]. *Environ Pollut*, 2020, 259: 113911.
 - [51] Soumillon M, Necseulea A, Weier M, *et al.* Cellular source and mechanisms of high transcriptome complexity in the mammalian testis [J]. *Cell Rep*, 2013, 3: 2179-2190.

- [52] Yu Y, Fuscoe JC, Zhao C, *et al.* A rat rna-seq transcriptomic bodymap across 11 organs and 4 developmental stages[J]. Nat Commun, 2014, 5: 3230.
- [53] Zimmermann C, Stevant I, Borel C, *et al.* Research resource: The dynamic transcriptional profile of sertoli cells during the progression of spermatogenesis[J]. Mol Endocrinol, 2015, 29: 627-642.
- [54] Schwartz S, Agarwala Sudeep D, Mumbach Maxwell R, *et al.* High-resolution mapping reveals a conserved, widespread, dynamic rna methylation program in yeast meiosis[J]. Cell, 2013, 155: 1409-1421.
- [55] Xu K, Yang Y, Feng GH, *et al.* Mettl3-mediated m(6)a regulates spermatogonial differentiation and meiosis initiation[J]. Cell Res, 2017, 27: 1100-1114.
- [56] Lasman L, Krupalnik V, Viukov S, *et al.* Context-dependent functional compensation between ythdf m(6)a reader proteins[J]. Genes Dev, 2020, 34: 1373-1391.
- [57] Jia GX, Lin Z, Yan RG, *et al.* Wtap function in sertoli cells is essential for sustaining the spermatogonial stem cell niche[J]. Stem Cell Reports, 2020, 15: 968-982.
- [58] Huang Y, Yan J, Li Q, *et al.* Meclofenamic acid selectively inhibits fto demethylation of m6a over alkbh5[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43: 373-384.
- [59] Huang T, Guo J, Lv Y, *et al.* Meclofenamic acid represses spermatogonial proliferation through modulating m(6)a rna modification[J]. J Anim Sci Biotechnol, 2019, 10: 63.
- [60] Tang C, Klukovich R, Peng H, *et al.* Alkbh5-dependent m6a demethylation controls splicing and stability of long 3'-utr mrnas in male germ cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115: E325-E333.
- [61] Hong S, Shen X, Luo C, *et al.* Comparative analysis of the testes from wild-type and alkbh5-knockout mice using single-cell rna sequencing[J]. G3 (Bethesda), 2022, 12: jkac130. doi: 10.1093/g3journal/jkac130
- [62] Cheng CY, Mruk DD. The blood-testis barrier and its implications for male contraception [J]. Pharmacol Rev, 2012, 64: 16-64.
- [63] Kasowitz SD, Ma J, Anderson SJ, *et al.* Nuclear m6a reader ythdc1 regulates alternative polyadenylation and splicing during mouse oocyte development [J]. PLoS Genet, 2018, 14: e1007412.
- [64] Roundtree IA, He C. Nuclear m6a reader ythdc1 regulates mrna splicing[J]. Trends Genet, 2016, 32: 320-321.
- [65] Wojtas MN, Pandey RR, Mendel M, *et al.* Regulation of m(6)a transcripts by the 3'-->5' rna helicase ythdc2 is essential for a successful meiotic program in the mammalian germline [J]. Mol Cell, 2017, 68: 374-387 e312.
- [66] Jain D, Puno MR, Meydan C, *et al.* Ketu mutant mice uncover an essential meiotic function for the ancient rna helicase ythdc2 [J]. Elife, 2018, 7: e30919. doi: 10.7554/eLife.30919
- [67] Bai G, Zhai X, Liu L, *et al.* The molecular characteristics in different procedures of spermatogenesis [J]. Gene, 2022, 826: 146405.
- [68] Tang Z, Li C, Kang B, *et al.* Gepia: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45: W98-W102.
- [69] Yang Y, Huang W, Huang JT, *et al.* Increased n6-methyladenosine in human sperm rna as a risk factor for asthenozoospermia[J]. Sci Rep, 2016, 6: 24345.
- [70] Glazer CH, Bonde JP, Giwercman A, *et al.* Risk of diabetes according to male factor infertility: A register-based cohort study[J]. Hum Reprod, 2017, 32: 1474-1481.
- [71] Chen X, Lin Q, Wen J, *et al.* Whole genome bisulfite sequencing of human spermatozoa reveals differentially methylated patterns from type 2 diabetic patients [J]. J Diabetes Investig, 2020, 11: 856-864.
- [72] Landfors M, Nakken S, Fusser M, *et al.* Sequencing of fto and alkbh5 in men undergoing infertility work-up identifies an infertility-associated variant and two missense mutations[J]. Fertil Steril, 2016, 105: 1170-1179.e1175.