

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.24.001

· 基础研究 ·

利用 cut&tag 技术探究 LHX9 基因在颗粒细胞的调控机制*

吴婧¹ 徐悦² 曹仁³ 张漫漫² 乔洁^{2Δ} 宋怀东^{1Δ}

(1 上海交通大学医学院附属第九人民医院分子诊断科 上海 200001;

2 上海交通大学医学院附属第九人民医院内分泌科 上海 200011; 3 上海科技大学生命科学与技术学院 上海 201210)

摘要 目的:在人卵巢颗粒细胞癌细胞株 KGN 中探索转录因子 LHX9 下游主要的靶基因及其调控。**方法:**首先我们采用实时荧光定量 PCR 观察 KGN 细胞在卵泡刺激素 (FSH) 干预前后性腺分化和性激素合成过程中重要基因的表达情况,同时我们利用 cut&tag 测序技术在两组细胞中识别 LHX9 下游靶基因,并采用双荧光素酶报告实验对重要靶基因 NR5A1 的调控进行了验证。**结果:**实时荧光定量 PCR 结果显示,通过加 FSH 处理 12 小时后,LHX9 和 NR5A1 基因的 mRNA 水平表达降低,相反的,StAR 和 CYP19A1 基因的 mRNA 水平表达增高;通过 cut&tag 测序技术和生物信息学分析,我们发现 LHX9 下游基因主要分布在内吞作用、细胞衰老、肿瘤相关通路、细胞周期、凋亡、卵母细胞减数分裂、雌激素信号转导等通路上。LHX9 可以转录调控性腺分化以及类固醇激素合成的一些重要基因,其中包括 NR5A1 和 SOX9 等,荧光素酶报告基因证实了 LHX9 可以直接结合 NR5A1 基因的启动子区。**结论:**本研究利用 cut&tag 测序技术,发现转录因子 LHX9 对性腺分化和性激素合成的关键基因有转录调控作用,对深入理解 LHX9 基因对生殖系统的作用具有重要意义。

关键词:LHX9; cut&tag; NR5A1; 性腺分化**中图分类号:**R-33; Q593.4; Q492 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)24-4601-06Exploring the Regulatory Mechanism of LHX9
in Granulosa Cell Line by Cut&tag*WU Jing¹, XU Yue², CAO Ren³, ZHANG Man-man², QIAO Jie^{2Δ}, SONG Huai-dong^{1Δ}

(1 The Core Laboratory in Medical Center of Clinical Research, Department of Molecular Diagnostics, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200001, China; 2 Department of Endocrinology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200001, China; 3 School of Life Science and Technology, Shanghai Tech University, Shanghai, 201210, China)

ABSTRACT Objective: To explore the downstream target genes and the regulatory mechanism of transcription factor LHX9 in human ovarian granulocyte cancer cell line KGN. **Methods:** Firstly, we used real-time PCR to observe the expression of key genes in gonadal differentiation and sex hormone synthesis in KGN cells before and after FSH intervention. Next, we used cut&tag sequencing to identify the target genes of LHX9 in two groups of cells, and we verified the transcriptional regulation of NR5A1 by LHX9 with dual-luciferase reporter assay. **Results:** According to real-time PCR result, we found that the expression of LHX9 and NR5A1 genes decreased at mRNA level after 12 hours of FSH treatment, and conversely, the expression of StAR and CYP19A1 gene increased. Through cut&tag sequencing and bioinformatics analysis, we found that LHX9 downstream genes are mainly distributed in endocytosis, cell aging, tumor-related pathways, cell cycle, apoptosis, oocyte meiosis, estrogen signaling and other pathways. LHX9 transcriptional regulates some key genes which regulate gonadal differentiation and steroid hormone synthesis, including NR5A1 and SOX9. And dual-luciferase reporter assay confirmed that LHX9 directly binds to the promoter region of the NR5A1. **Conclusions:** In this study, we use cut&tag sequencing technology to characterize that LHX9 has transcriptional regulation of key genes during the process of gonadal differentiation and sex hormone synthesis, which is of great significance for understanding of the role of LHX9 gene on the reproductive system.

Key words: LHX9; cut&tag; NR5A1; Gonad differentiation**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R593.4; Q492 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2023)24-4601-06

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82270826; 81873652)

作者简介:吴婧(1991-),女,硕士研究生,主要研究方向:性发育异常疾病,E-mail: wujingmirror@163.com

Δ 通讯作者:乔洁,女,博士生导师,主任医师,主要研究方向:性发育异常疾病,E-mail: qiaoj2001@126.com;

宋怀东,男,博士生导师,二级教授,主要研究方向:内分泌代谢疾病,E-mail: huaidong_s1966@163.com

(收稿日期:2023-06-06 接受日期:2023-06-30)

前言

LHX9 是转录因子 LIM 同源盒基因家族的成员^[1],在诸多神经系统结构中均有表达,比如脊髓^[2]、间脑^[3]、下丘脑^[4]、小脑^[5],以及发育中的四肢^[6],同时广泛分布在早期胚胎的泌尿生殖嵴^[9]。研究发现,小鼠缺乏 Lhx9 表达导致生殖原嵴和性腺分化异常^[7,8]。Birk^[9]等学者研究了 lhx9 在性腺发育过程中的关键作用,发现在 lhx9 基因敲除的小鼠,性腺体细胞增殖障碍,性腺发育异常,雄性小鼠性别出现逆转;且这种缺乏睾酮以及抗苗勒氏管激素(AMH)的雄性小鼠,在发育过程中会出现雌性化表型。此外,Lhx9 的表达与不同类别性腺细胞的分化相关。Mazaud 等^[9]发现当体腔上皮细胞分化为 Sertoli 细胞时,未分化性腺中的 Lhx9 表达消失,提出 Lhx9 是睾丸发育不可或缺的。

Lhx9 有助于诱导类固醇生成因子 1 [核受体亚家族 5, A 组,成员 1(NR5A1)]^[10]的基因表达,该基因控制着以下基因的表达:参与类固醇发生,包括编码各种类固醇生成酶(CYP19, CYP11, 3 β -HSD),肽类激素,膜结合激素受体和 STAR^[11]的类固醇发生。因此,Lhx9 对于器官发生后的类固醇生成至关重要。在 46,XY 性发育异常(46,XY Disorder of sexual development, 46,XY DSD)的患者中,我们发现了两例患者分别存在 LHX9 基因的杂合突变和纯合突变。由于在 DSD 患者群体中,已经出现了许多不伴有其他系统综合症的性腺发育异常^[12],因此,lhx9 基因可能在这些人群的发病中起关键作用。然而,目前国内外学者对于 lhx9 在性腺方面的研究还很少。

Cut&tag 技术是一项新的研究 DNA 与蛋白质互作的高通量技术,在抗体引导下,利用 Tn5 转座酶仅在目的组蛋白修饰标志、转录因子或染色质调控蛋白结合染色质的局部进行目的 DNA 的片段化并完成建库^[13]。2021 年,Bartosovic M^[14]等,在单细胞水平,利用 cut&tag 技术分析小鼠中枢神经系统中复杂的组蛋白修饰和转录因子,阐述了关于活跃启动子、增强子、基因体(H3K4me3, H3K27ac 和 H3K36me3) 和非活跃区域(H3K27me3)组蛋白修饰的特征,并通过单细胞 Cut&tag 探索了研究转录因子 OLIG2 和黏连蛋白复合物成分 RAD21 在单细胞染色质中的占据。2022 年,Xu^[15]等,采用 cut&tag 勾画出急性髓性白血病的亚型特异性 3D 基因组改变。本研究使用 cut&tag 技术在人卵巢颗粒细胞株 KGN^[16]中研究 LHX9 下游调控基因,并验证 LHX9 调控性腺分化关键基因 NR5A1 的调控。

1 材料与方 法

1.1 细胞及主要试剂

KGN 细胞(中国科学院细胞库),DMEM/F-12 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(Gibco 公司),卵泡刺激素 FSH(北京索莱宝),Hyperactive® Universal CUT&Tag Assay Kit for Illumina (Vazyme, TD903),LHX9 单克隆抗体(SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY),羊抗鼠二抗(南京诺唯赞生物科技股份有限公司),Trizol(Invitrogen),RT-PCR 试剂(TAKARA),Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Waltham, MA, USA)。

1.2 实验方法

1.2.1 KGN 细胞培养 将 KGN 细胞从液氮中取出,放置在 37℃ 恒温水浴箱内快速复苏,依据细胞密度接种至合适的培养

皿中,隔日更换 1 次培养基。

1.2.2 KGN 细胞加药处理 取对数生长期细胞,经胰蛋白酶-EDTA 消化液消化,按每孔 3.5×10^5 细胞接种于 6 孔板中,放置于 37℃、5% CO₂ 培养箱过。使用浓度为 100 ng/mL^[17]的 FSH 处理细胞 12 h,对照组加入等量生理盐水,收集细胞加入 Trizol 总 RNA 提取试剂提取细胞内总 RNA,Nanodrop 分光光度计测定 RNA 浓度及纯度。严格按照 TAKARA RT-PCR 试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA 后进行扩增。GAPDH 为内参。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法进行计算。

1.2.3 KGN 细胞轻交联和 cut&tag 文库构建以及测序 使用胰蛋白酶消化液常规消化收集细胞,分别收取加 FSH 处理 12 h 和对照组细胞,加入 $1 \times$ PBS 重悬洗涤两次,使用细胞计数仪计数,吸取 1×10^5 细胞进行轻交联,离心去除上清,加入细胞裂解液裂解细胞,而后使用 16% 甲醛室温固定 2 分钟,再加入 2.5M 甘氨酸中和,离心去上清后重悬细胞,接下来使用 Hyperactive® Universal CUT&Tag Assay Kit for Illumina (Vazyme, TD903)进行文库构建,使用 ConA Beads 与前面轻交联的细胞核进行孵育,将 PCR 管放置于磁力架上去上清加入一抗上下颠倒混匀孵育过夜,第二天将 PCR 管放置于磁力架上去上清并加入二抗上下颠倒混匀室温孵育 1 小时,而后使用 pG-Tn5 进行酶切,最后使用 DNA Extract Beads 提取核酸并进行 PCR 扩增。所有 CUT&Tag 文库均在 Illumina Nova Seq 6000 平台上以 PE150 模式测序。

1.2.4 生物信息学分析 首先,我们使用 TrimGalore (版本 0.6.10)去除接头序列,具体参数为: -q 25 -phred 33 --length 20 -e 0.1 --stringency 3 -paired。然后,我们使用 bowtie2^[18](版本 2.2.5) 将去除接头后的序列比对到人类参考基因组(版本 GRCh38),具体参数为: --very-sensitive -X 2000 --no-mixed --no-discordant,同时使用 samtools^[19] view 工具转换为 bam 文件。下一步,我们使用 sambamba^[20](版本 0.6.6)去除 PCR 冗余序列。然后,我们使用 deeptools^[21](版本 3.5.1)工具中的 alignmentSieve --ATACshift 工具去除 Tn5 酶插入的 9bp 碱基。为了可视化 cut&tag 数据,我们使用 deeptools 工具的 bamCoverage 生成 bigWig 文件,具体参数为: --binSize 10 -normalizeUsing RPKM。最后,我们使用 SEACR(版本 1.3)工具的 stringent 模式对数据进行叫峰。我们进一步使用 R 语言(版本 4.2.2)进行后续分析。首先使用 ChIPseeker^[22]包进行峰的注释,其中 tssRegion 设置为 -2500, 2500。随后使用 clusterProfiler^[23]包进行 Kegg 及 GO 的注释。

1.2.5 质粒转染和荧光素酶活性测定 293T 细胞培养于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的孵箱中,转染前一天以 2×10^4 的密度接种于 24 孔培养板;转染时细胞密度达到 70% ~ 80%。将 1 μ L lipofectamine 2000 转染试剂(1 μ L/孔)稀释到 50 μ L Opti-MEM 培养基中;同时,将空载对照或野生型 LHX9 过表达质粒(pcDNA3.1-Vector 或 pcDNA3.1-LHX9-WT)(200 ng/孔),含荧光素酶基因的质粒(pGL3-Basic-NR5A1 promoter)(200 ng/孔)和含海肾荧光素酶基因的内参质粒(pRL-TK)(10 ng/孔)三者共稀释至 50 μ L Opti-MEM 培养基中,室温孵育 5 min 后,将上述两者混合以制备转染复合物,室温孵育 20 min 后,加入细胞培养液中,6 h 后,更换新的含血清培养液。37℃ 继

续培养 48 h 后, 根据试剂盒说明书进行双荧光素酶报告基因检测: 每孔中加入 100 μL 细胞裂解液, 室温震荡 20 min 后, 每孔吸取 20 μL 裂解液上清于白色 96 孔板中, 每孔加入 50 μL LAR II, 吹打混匀后用酶标仪进行读取发光值; 再在同一孔中加入 50 μL Stop & Glo Reagent, 吹打混匀后用酶标仪进行读取发光值; 依次读完所有孔的数值, 计算两者之间的比值, 即为相对荧光强度。

1.2.6 统计学方法 应用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料比较采用 t 检验, Graphpad 8.3.0 软件作图, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FSH 处理 KGN 细胞 12 h 后发现 LHX9 和 NR5A1 表达降低, StAR 和 CYP19A1 表达增高

我们对 FSH 处理 12 h 后的细胞和对照组细胞进行了 LHX9、NR5A1、StAR 和 CYP19A1 基因的荧光定量 PCR 检测, 结果发现 LHX9 和 NR5A1 在 FSH 处理 12 h 后, mRNA 水平出现下调, StAR 和 CYP19A1 基因的 mRNA 水平表达增高, 如图 1 所示。

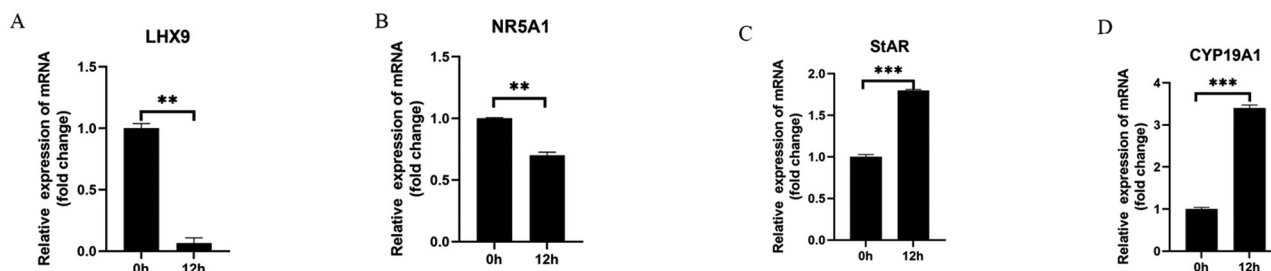


图 1 KGN 细胞加 FSH 处理后 LHX9、NR5A1、StAR 及 CYP19A1 基因的 mRNA 表达变化

Fig.1 The expression changes of LHX9, NR5A1, StAR and CYP19A1 at mRNA level in KGN cell line after FSH intervention, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.2 cut&tag 结果质量控制

我们对 FSH 干预前后的两组细胞进行了 cut&tag 测序。FSH 处理组和对照组细胞, 我们分别得到了 15876 和 16110 个峰。我们使用 ChIPseeker 对峰进行了注释。如图 2 所示, 我们发

现两组细胞的测序片段主要分布在以转录起始位点(Transcription Start Site, TSS)为中心的区域。同时, 如图 3 所示, 两组细胞的峰均主要分布在启动子区域, 其次依次为基因间区, 内含子区, UTR 区, 外显子区。

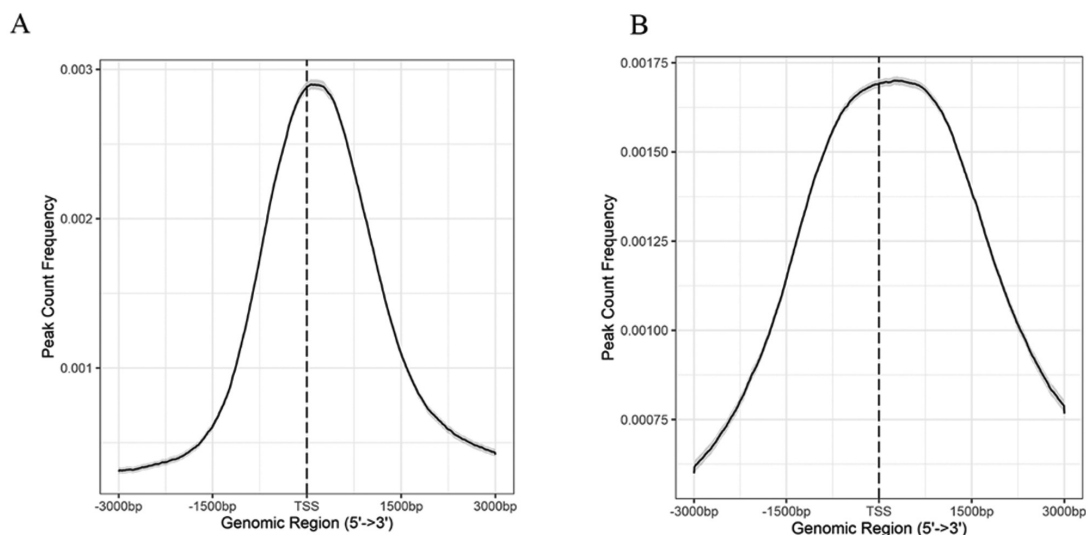


图 2 对照组(A)和 FSH 处理 12 h 组(B)cut&tag 峰在转录起始位点(TSS)周围分布情况

Fig.2 Distribution of peaks identified by cut&tag around the transcription start site (TSS) in the control (A) and FSH treated group (B)

2.3 cut&tag 结果 KEGG 注释

下一步我们利用 KEGG 信号通路分析, 探究 LHX9 下游基因的生物学效应。如图 4 所示, 我们发现在 FSH 未处理 KGN 细胞中, LHX9 下游基因主要分布在内存作用、细胞衰老、肿瘤相关通路、细胞周期、凋亡、卵母细胞减数分裂、雌激素信号转导等通路上。FSH 处理 12 小时后的 KGN 细胞与 FSH 处理前细胞的信号通路基本一致。有意义的是, 我们发现 LHX9 结合 NR5A1 和 SOX9 的启动子区, 与既往报道认为 LHX9 可

能通过 NR5A1(SF1)调节哺乳动物的性别分化一致^[6]。如图 5 所示, 我们的 cut&tag 数据表明 LHX9 可以结合 NR5A1 的启动子(Promoter)区域。不仅如此, 我们还发现 LHX9 还可以结合另外一个雄性分化关键转录因子 SOX9 的 promoter 区域。

2.4 双荧光素酶报告基因检测

为了进一步明确 LHX9 对 NR5A1 的调控关系, 我们进行了双荧光素酶报告基因检测, 在 293T 细胞中共转染了 pcDNA3.1-Vector/pcDNA3.1-LHX9-WT、pGL3-Basic-NR5A1 pro-

moter 和 pRL-TK 三种质粒,发现 LHX9 过表达组相对对照组, NR5A1 的启动子区域,对其发挥转录调控作用(图 6)。相对荧光强度明显升高($P=0.0019$),从而证实 LHX9 可结合于

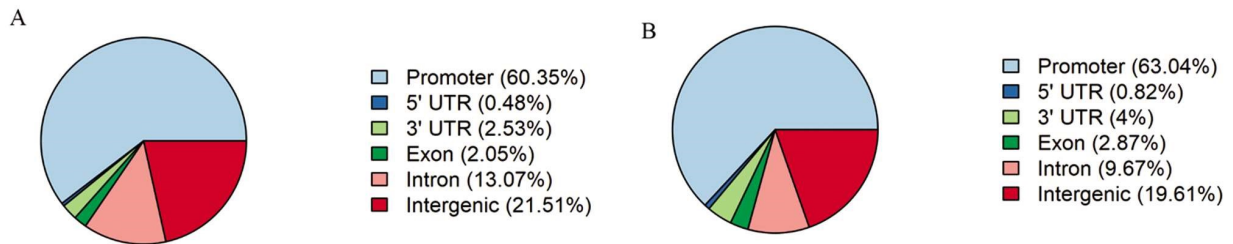


图3 对照组(A)和FSH处理12h组(B)cut&tag峰在基因组的功能区域的分布
Fig.3 Functional annotation of peaks identified by cut&tag in the control (A) and FSH treated group (B)

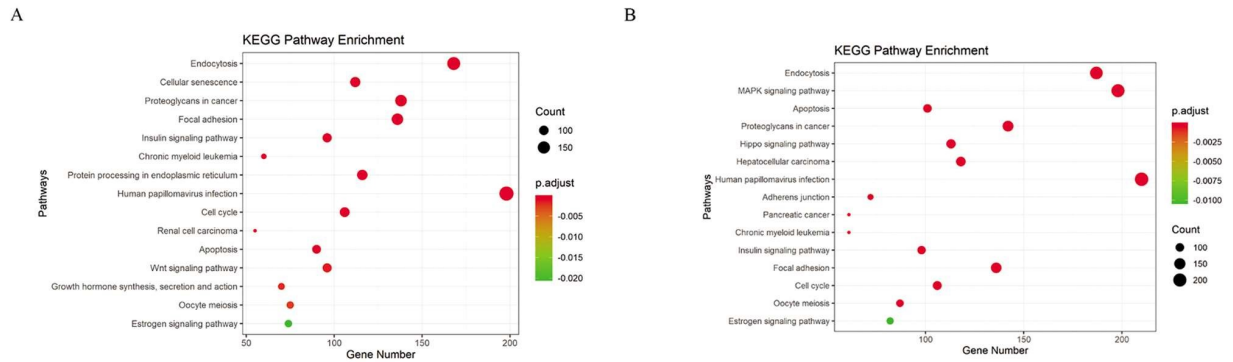


图4 对照组(A)和FSH处理12h组(B)的KEGG富集分析
Fig.4 KEGG pathway annotation in the control (A) and FSH treated group (B)

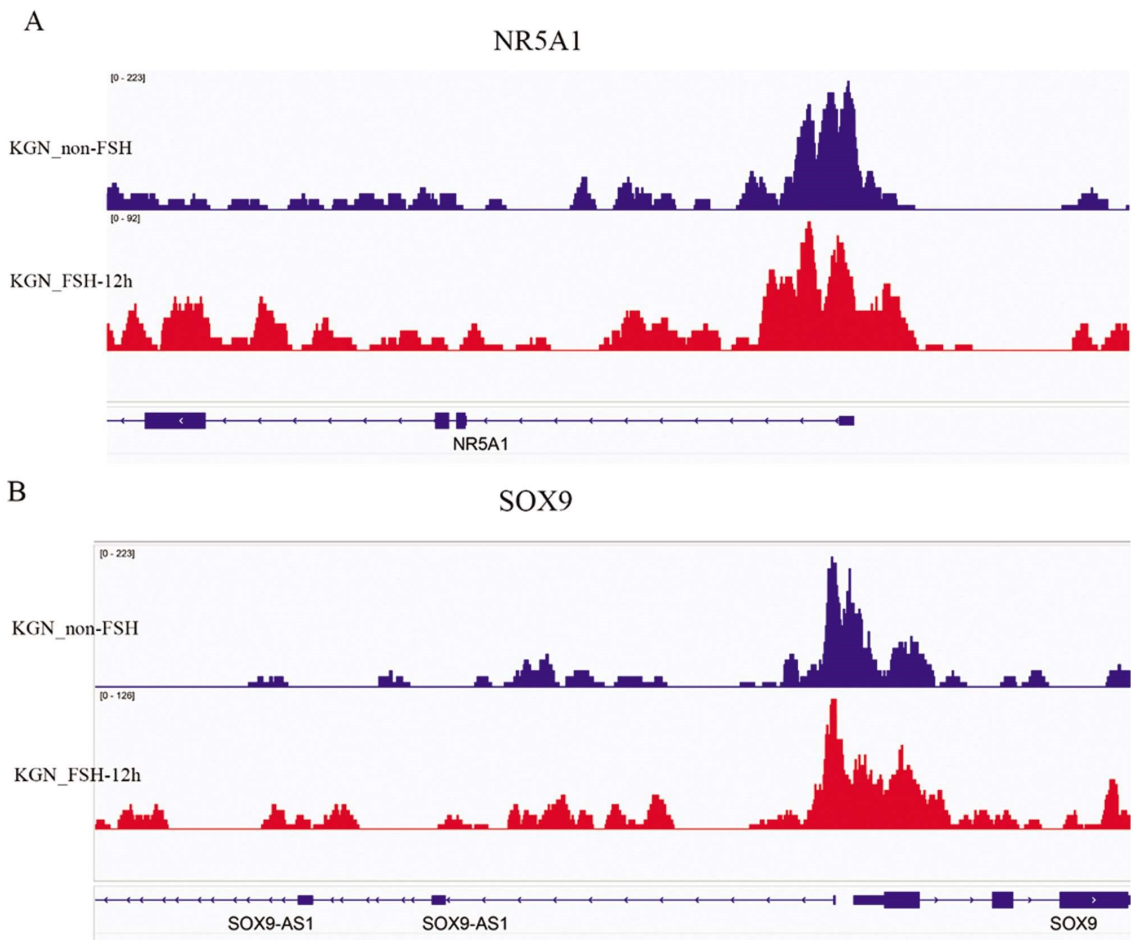


图5 LHX9结合NR5A1及SOX9的启动子区域

Fig.5 LHX9 binds to promoter of NR5A1 and SOX9, KGN_non-FSH represents control group; KGN_FSH-12h represents FSH treatment group.

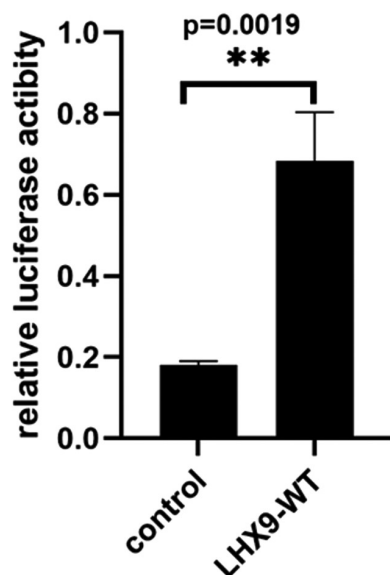


图6 双荧光素酶报告基因证实 LHX9 结合 NR5A1 的启动子区

Fig.6 The result of dual-luciferase reporter assay verified the binding of LHX9 to the promoter of NR5A1

3 讨论

既往报道 LHX9 基因的突变和性发育异常(DSD)相关^[24-26],但 LHX9 导致 DSD 发生的机制尚不明确。Birk^[6]等学者就发现 *lhx9* 基因敲除的小鼠,出现性腺体细胞增殖障碍,性腺发育异常,雄性小鼠出现性反转,在发育过程中会出现雌性化表现,类似于人类 DSD 患者,提出 *Lhx9* 调节性发育的作用可能是由于 *Sfl* (*Nr5a1*) 介导的,但并未予以证实。

近年来,表观遗传学领域的金标准检测一直是染色质免疫沉淀(ChIP)与深度测序(ChIP-seq)相结合。然而,ChIP-seq 实验存在低信噪比、免疫沉淀均一性差以及对样品要求量大等问题。*cut&tag* 技术是在抗体引导下,利用 Tn5 转座酶仅在目的组蛋白修饰标志、转录因子或染色质调控蛋白结合染色质的局部进行目的 DNA 的片段化,同时添加测序接头,并释放到细胞外。由于绝大部分无关的染色质还留在细胞核内,因此整个实验的信噪比大幅提高,同时简化了实验步骤。该技术与传统的 ChIP-seq 相比,简便易行,信噪比高,重复性好,需要的细胞数量少等优点^[27,28]。在我们的研究中,我们发现 LHX9 基因在 KGN 细胞中表达不高,属于低丰度目标蛋白,为此我们加入轻交联步骤,增强抗体与靶基因的结合,使检出结果更可信。我们的研究利用 *cut&tag* 技术,发现 LHX9 基因可以结合 NR5A1 的启动子区,同时利用双荧光素酶报告基因实验证实了 LHX9 对 NR5A1 的转录激活作用。同时在 KGN 细胞采用 FSH 干预,我们看到了 LHX9 基因的下调,同时还有 NR5A1 下调,这一结果说明 LHX9 对 NR5A1 有转录调控作用。

哺乳动物的性腺的发育起源于性腺原基,早期的性腺原基具有双向分化潜能,如果存在睾丸决定因子 *SRY*^[29] 基因,则性腺原基发育成睾丸,同时睾丸间质细胞分泌雄激素,而支持细胞分泌抗缪勒氏管激素(AMH),促使胚胎的雄性化发育;相反的,若无 *SRY* 基因的存在,胚胎则会向雌性化方向进行^[29,30]。这个过程中参与的基因目前已知的主要有 *SRY*, *NR5A1*, *DM-*

RT1, *SOX9*^[31-33] 等。近年,研究者发现发现在睾丸间质细胞中,人绒毛膜性腺激素(hCG)可以升高 *Lhx9* 的表达,使睾酮分泌升高。*Smad* 泛素化调节因子 1 (*Smurf1*) 是一种 E3 泛素连接酶,针对 *Lhx9* 进行泛素介导的蛋白酶体降解,从而负向调节其功能。增加 *Smurf1* 降低了 *Lhx9* 水平,抑制了 *Lhx9* 对 *Nr5a1* 的转录激活能力;而 *Lhx9* 降解会抑制睾酮的生成,进而影响性腺发育^[34]。然而,LHX9 对卵巢颗粒细胞重要转录因子以及激素分泌的调控作用目前尚无研究涉及。

Lhx9 作为核心基因,主要表达在哺乳动物早期未分化性腺的体细胞中。2022 年, Garcia-Alonso^[26] 等通过绘制人类性腺单细胞图谱发现 LHX9 是性腺分化的关键基因。新近,在对 40dpf 斑马鱼卵巢发育的单细胞转录组学研究中, Liu 等^[35] 发现, *lhx9* 表达较为特异地表达在斑马鱼卵巢的前颗粒细胞中;且 *lhx9* 的高表达细胞形成卵巢发育过程中的翼弦状结构,与早期发育的生殖细胞群之间有密切接触,提示这个重要的转录因子可能参与颗粒细胞对生殖细胞发育的调控。

以往的研究发现,FSH 作用可促进 KGN 细胞的增殖,使细胞中孕酮的分泌显著升高,而对雌激素分泌的刺激作用需要脑源性生长因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的协同作用^[7],与我们观察到 FSH 干预后 *StAR* 和 *CYP19A1* 的表达相一致;但与 hCG 作用后的睾丸间质细胞中 LHX9 表达升高不同,颗粒细胞中 FSH 作用后 LHX9 及其下游基因 *NR5A1* 表达下降。这些结果提示,在垂体促性腺激素作用于不同的类固醇分泌细胞中,对 LHX9 的调控有所不同。更重要的是,我们的研究发现,LHX9 对 *SOX9* 具有转录激活作用,提示 *SOX9* 是 LHX9 的下游基因,说明 LHX9 对于性腺分化的调控作用可能在胚胎发育更早期阶段。同时,在对 LHX9 结合的基因进行 KEGG 信号通路分析时,我们发现 LHX9 结合的基因除具有肿瘤相关信号通路外,还有卵母细胞减数分裂、雌激素信号传导等信号通路,进一步说明 LHX9 在性分化和类固醇激素合成过程中起重要作用。

本研究通过 *cut&tag* 技术,找到 LHX9 下游调控基因,对日后深入研究 LHX9 基因对性腺发育以及对性激素合成的调控等有重要意义。

参考文献(References)

- [1] Hobert O, Westphal H. Functions of LIM-homeobox genes [J]. Trends Genet, 2000, 16(2): 75-83
- [2] Wilson SI, Shafer B, Lee KJ, et al. A molecular program for contralateral trajectory: *Rig-1* control by LIM homeodomain transcription factors[J]. Neuron, 2008, 59(3): 413-424
- [3] Lakhina V, Subramanian L, Huilgol D, et al. Seizure evoked regulation of LIM-HD genes and co-factors in the postnatal and adult hippocampus[J]. F1000Res, 2013, 2: 205
- [4] Bertuzzi S, Porter FD, Pitts A, et al. Characterization of *Lhx9*, a novel LIM/homeobox gene expressed by the pioneer neurons in the mouse cerebral cortex[J]. Mech Dev, 1999, 81(1-2): 193-198
- [5] Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, et al. WT-1 is required for early kidney development[J]. Cell, 1993, 74(4): 679-691
- [6] Birk OS, Casiano DE, Wassif CA, et al. The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation [J]. Nature, 2000, 403(6772): 909-913

- [7] Peukert D, Weber S, Lumsden A, et al. Lhx2 and Lhx9 determine neuronal differentiation and compartment in the caudal forebrain by regulating Wnt signaling[J]. *PLoS Biol*, 2011, 9(12): e1001218
- [8] Takasawa K, Kashimada K, Pelosi E, et al. FOXL2 transcriptionally represses Sfl expression by antagonizing WT1 during ovarian development in mice[J]. *FASEB J*, 2014, 28(5): 2020-2028
- [9] Mazaud S, Oreal E, Guigon CJ, et al. Lhx9 expression during gonadal morphogenesis as related to the state of cell differentiation [J]. *Gene Expr Patterns*, 2002, 2(3-4): 373-377
- [10] Wilhelm D, Englert C. The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sfl[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(14): 1839-1851
- [11] Clark BJ, Soo SC, Caron KM, et al. Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein [J]. *Mol Endocrinol*, 1995, 9(10): 1346-1355
- [12] Wu RS, Lam, II, Clay H, et al. A Rapid Method for Directed Gene Knockout for Screening in G0 Zebrafish [J]. *Dev Cell*, 2018, 46(1): 112-125
- [13] Kaya-Okur HS, Wu SJ, Codomo CA, et al. CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1930
- [14] Bartosovic M, Kabbe M, Castelo-Branco G. Single-cell CUT&Tag profiles histone modifications and transcription factors in complex tissues[J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(7): 825-835
- [15] Xu J, Song F, Lyu H, et al. Subtype-specific 3D genome alteration in acute myeloid leukaemia[J]. *Nature*, 611(7935): 387-398
- [16] Nishi Y, Yanase T, Mu Y, et al. Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(1): 437-445
- [17] Xie M, Li M, Zhou J, et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes human granulosa-like tumor cell steroidogenesis and proliferation by activating the FSH receptor-mediated signaling pathway[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 180
- [18] Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 [J]. *Nat Methods*, 2012, 9(4): 357-359
- [19] Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools[J]. *Gigascience*, 2021, 10(2): giab008
- [20] Tarasov A, Vilella AJ, Cuppen E, et al. Sambamba: fast processing of NGS alignment formats[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(12): 2032-2034
- [21] Ramirez F, Dundar F, Diehl S, et al. deepTools: a flexible platform for exploring deep-sequencing data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42 (Web Server issue): W187-191
- [22] Yu G, Wang LG, He QY. ChIPseeker: an R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(14): 2382-2383
- [23] Yu G, Wang LG, Han Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. *OMICS*, 2012, 16(5): 284-287
- [24] Kunitomo M, Khokhar A, Kresge C, et al. 46, XY DSD and limb abnormalities in a female with a de novo LHX9 missense mutation[J]. *Am J Med GenetA*, 2020, 182(12): 2887-2890
- [25] Wang H, Zhang L, Wang N, et al. Next-generation sequencing reveals genetic landscape in 46, XY disorders of sexual development patients with variable phenotypes[J]. *Hum Genet*, 2018, 137(3): 265-277
- [26] Garcia-Alonso L, Lorenzi V, Mazzeo CI, et al. Single-cell roadmap of human gonadal development[J]. *Nature*, 2022, 607(7919): 540-547
- [27] Skene PJ, Henikoff S. An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites [J]. *Elife*, 2017, 6: e21856
- [28] Skene PJ, Henikoff JG, Henikoff S. Targeted in situ genome-wide profiling with high efficiency for low cell numbers [J]. *Nat Protoc*, 2018, 13(5): 1006-1019
- [29] Koopman P. Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes[J]. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 55(6-7): 839-856
- [30] Swain A, Lovell-Badge R. Mammalian sex determination: a molecular drama[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(7): 755-767
- [31] Weidinger G, Wolke U, Kopranner M, et al. Regulation of zebrafish primordial germ cell migration by attraction towards an intermediate target[J]. *Development*, 2002, 129(1): 25-36
- [32] Gonen N, Futtner CR, Wood S, et al. Sex reversal following deletion of a single distal enhancer of Sox9 [J]. *Science*, 2018, 360(6396): 1469-1473
- [33] Zarkower D, Murphy MW. DMRT1: An Ancient Sexual Regulator Required for Human Gonadogenesis [J]. *Sex Dev*, 2022, 16(2-3): 112-125
- [34] Hu F, Zhu Q, Sun B, et al. Smad ubiquitylation regulatory factor 1 promotes LIM-homeobox gene 9 degradation and represses testosterone production in Leydig cells [J]. *FASEB J*, 2018, 32(9): 4627-4640
- [35] Liu Y, Kossack ME, McFaul ME, et al. Single-cell transcriptome reveals insights into the development and function of the zebrafish ovary[J]. *Elife*, 2022, 11: e76014