

## 特约综述

## DNA 甲基化修饰研究概述

李佳佳 陈德桂\*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

**摘要** DNA 甲基化修饰作为一种重要的表观遗传修饰, 能通过影响染色质结构, DNA 构象、稳定性以及与蛋白质相互作用方式等, 起到调控基因表达的作用。在正常的生理条件以及一些疾病发生过程中均起着重要作用。本文概述了 DNA 甲基化修饰的动态变化, 并着重论述了最近一项与 DNA 修饰有着密切关系的发现。TET1 是一个 5mC 加氧酶, 可以将 5mC 转变为 5hmC, 在 DNA 去甲基化过程中可能扮演着重要角色。

**关键词** 表观遗传学; DNA 甲基化; DNA 去甲基化; *tet1*

近些年来, 表观遗传学领域发展迅速, 相关研究方兴未艾。其中一个非常重要的部分就是 DNA 甲基化修饰。目前, 该领域已经取得了一些进展, 发现了 DNA 甲基化酶-DNMT 家族, 并对其作用机制、生理功能进行了一些研究。但是仍然存在有部分空白, 比如, 对于 DNA 去甲基化酶的研究到目前为止, 仍然没有定论。本文概述了 DNA 甲基化修饰的动态变化, 并就 DNA 甲基化相关研究进展、去甲基化酶的研究历史以及最近一项与 DNA 修饰有着密切关系的发现进行了简要阐述, 并对该领域的研究进行了展望。

## 1 表观遗传

表观遗传, 包括组蛋白共价修饰(covalent histone modification), DNA 甲基化修饰(DNA methylation), 染色体重塑(chromatin remodeling)以及非编码RNA(non-coding RNA)等, 是指在 DNA 序列不发生改变的情况下, 生物的表型或基因表达发生了稳定的可遗传变化。即指亲代细胞在有丝分裂时, 有能力把自己的一整套基因表达程序传递给子代细胞<sup>[1]</sup>。在生命发生过程中起着极其重要的作用。这一现象的最典型例子就是在生物体发育时的细胞命运决定。在形态发生过程中, 一个全能干细胞分化形成多种多能干细胞系并进一步分化形成各种完全分化的细胞, 很大程度上是通过各种表观修饰, 激活一些基因的表达同时抑制另外一些基因表达而完成的。

现在人们认为, 表观遗传的分子机制可以通过 DNA 和组蛋白的共价修饰, 以及包装 DNA 的蛋白起

作用的。这些 DNA 和组蛋白的共价修饰决定了特定的基因表达形式。其中组蛋白有着众多的共价修饰形式, 包括甲基化、乙酰化、泛素化以及磷酸化等。根据修饰的种类, 位点以及修饰的个数不同, 这些修饰可引发不同的效果, 或者引起基因沉默, 或者引起基因激活<sup>[2-5]</sup>。与此不同, 真核生物中 DNA 的共价修饰仅限于胞嘧啶的甲基化, 可引起基因失活以及转座子沉默<sup>[6]</sup>。

## 2 DNA 甲基化

DNA 甲基化是一种常见的表观遗传修饰, 由 DNA 甲基转移酶(DNA methyl-transferase, Dnmt) 催化, 以 S-腺苷甲硫氨酸(SAM) 作为甲基供体而发生反应。催化反应有 3 类类型, 包括将腺嘌呤转变为 N-甲基腺嘌呤、将胞嘧啶转变为 N-甲基胞嘧啶以及将胞嘧啶转变为 C-甲基胞嘧啶。原核生物中这 3 种类型均存在, 但是在高等真核生物中只存在第 3 种类型, 即将胞嘧啶(C) 转变为 5-甲基胞嘧啶(5mC)<sup>[7]</sup>。

一般而言, 甲基化模式有两种。一是维持性甲基化(maintenance methylation), 指在细胞分裂过程中, 根据亲本链上特异的甲基化位点, 在新生链相应位置上进行甲基化修饰; 二是从头甲基化(*de novo* methylation), 即催化未甲基化的 CpG 位点甲基化。分别由不同的 DNA 甲基化转移酶催化完成。

在细胞中, CG 二核苷酸是最主要的甲基化位点, 它在基因组中呈不均匀分布。在一些区域, CpG 保持或高于正常概率, 这些区段被称作 CpG 岛。CpG 岛

\* 通讯作者。Tel: 021-54921148, E-mail: cdchen@sibs.ac.cn

主要位于基因的启动子和第一外显子区域,在基因组中,约有60%以上基因的启动子区含有CpG岛<sup>[8,9]</sup>。

通常,DNA的甲基化会抑制基因表达。DNA的甲基化状态对染色体的结构维持、X染色体失活、基因印记以及胚胎发育、正常细胞功能的维持,乃至疾病的发生是十分重要的。在胚胎期,基因组范围的DNA甲基化模式异常会导致胚胎致死<sup>[10]</sup>,而在成体中,异常的甲基化则意味着疾病,特别是肿瘤的发生。因此,对可调节DNA甲基化状态的酶类的研究显得至关重要<sup>[9,11]</sup>。

### 3 DNA去甲基化

#### 3.1 DNA去甲基化研究背景

DNA甲基化状态并不是固定不变的。与甲基化相似,去甲基化也有两种形式。一种是复制依赖性的“被动去甲基”,即通过阻止新生链上发生DNA甲基化而达到去甲基的效果;另一种则是非复制依赖性的“主动去甲基”<sup>[12]</sup>。这一方面目前已经有了很多相关研究,在植物中的路径机制已经比较清楚,通过5-甲基胞嘧啶糖苷酶和碱基去除修复路径清除多余胞嘧啶的甲基化<sup>[13]</sup>。但是在动物中,虽然已经有各种证据证明了主动去甲基化的存在<sup>[14-16]</sup>,但是其作用机制仍然存在争议。

#### 3.2 DNA去甲基化酶研究历史

动物中关于去甲基化酶的研究最早可以追溯到1982年,Martin小组报道称在红细胞白血病鼠的细胞核提取物中发现了一种蛋白酶敏感的物质具DNA去甲基酶活性<sup>[17]</sup>,但是却没有与之相关的后续报道。1996年,Weiss小组在大鼠成肌细胞全细胞裂解液中又发现了RNase敏感的去甲基化活性,因而推断DNA去甲基化酶为核酶类似物<sup>[18]</sup>,但这一发现很快就遭到了质疑<sup>[19]</sup>。之后Bhattacharay小组认为MBD2(methyl-binding domain 2)可以直接去除5mC,不需要除水以外的任何辅因子<sup>[20]</sup>,但是这一发现并不能被重复,而且这一过程从能量的角度而言是不受欢迎的,后来发现MBD2敲除小鼠也拥有正常的甲基化模式,并未显示任何可见表型<sup>[21]</sup>。2007年,Barreto小组研究认为GADD45a(growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45  $\alpha$ )可以通过DNA损伤修复的机制来去除5mC<sup>[22]</sup>,之后犹他州立大学的两个实验室也合作在斑马鱼中进行了研究,认为GADD45参与了DNA去甲基化过程<sup>[23]</sup>。但是2008年,这一结论又遭到了质疑<sup>[24]</sup>。最近,在2009年5月,有关Tet1的研

究<sup>[25]</sup>表明TET1可以羟甲基化5mC,有可能在DNA去甲基化过程中扮演重要角色,从而又掀起了新一轮的DNA去甲基机制讨论。

## 4 tet1

### 4.1 tet1发现历史

*tet1*,全名*ten-eleven translocation 1*,起初因其CXXC结构域而被命名为*cxxc6*。后来,RB Lorscheid和Yasuhide Hayashi两个小组各自独立的从含t(10;11)(q22;q23)(十号染色体的q22片段易位至十一号染色体的q23区段之后)的急性骨髓状白血病(AML)患者的十号衍生染色体中克隆出了该基因,自此之后该基因便正式更名为*tet1*<sup>[26,27]</sup>。

### 4.2 TET1酶活研究

2009年5月,Tahiliani等<sup>[25]</sup>研究发现:TET1是一个2-OG,Fe<sup>2+</sup>依赖性的5mC加氧酶,可以将5mC转变为5hmC(5-hydroxymethyl cytosine)。

本着发现新的5mC修饰蛋白的想法,他们用JBP(base J binding protein,存在于椎体虫中,可对胸腺嘧啶进行羟甲基化修饰)家族蛋白的酶活结构域进行了迭代的序列比对(PSI-BLAST),找到了TET1-3,并预测其具有催化5mC羟甲基化的酶活性。后来,他们将研究集中到了TET1上,并通过TLC、MS等一系列生化实验以及过表达,RNAi等细胞学实验证明了其预测。同期发表的另一篇文章<sup>[28]</sup>在机体内也发现了5hmC的存在,侧面印证了这一研究。

### 4.3 仍然存在的问题

到目前为止,关于5hmC的去向还是未知的,到底是作为一个去甲基中间物,通过自发的或酶催化或DNA修复的机制去除羟甲基,最终实现去甲基;还是通过阻碍DNMTs的结合实现被动去甲基;还是这种修饰驱除5mC结合蛋白抑或招募5hmC特异的结合蛋白从而改变基因的表达情况,迄今还没有答案<sup>[29]</sup>。

## 5 展望

对表观遗传的研究不仅仅在于发现新的修饰及其酶,更在于发掘出其深层的生物学意义。将特定的表观修饰与生物学过程连接起来,是表观遗传研究者的一大目标。同时,构建调控网络,找出该修饰在特定生物学过程中赖以起作用的关键基因,在表观遗传与疾病发生的研究中也有着重要的意义。

就DNA表观修饰研究而言,一方面,对于新发现的真核生物中5hmC存在的意义有待进一步研究,

另一方面, 确定 DNA 去甲基化酶及其作用机理、生物学意义及其在疾病过程中所发挥的作用, 仍需要更进一步的探索。

### 参考文献(References)

- 1 Rakyan V, Whitelaw E. Transgenerational epigenetic inheritance. *Curr Biol* 2003; 13(1): R6.
- 2 Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(11): 838-49.
- 3 Zhang Y. Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes Dev* 2003; 17(22): 2733-40.
- 4 Margueron R, Trojer P, Reinberg D. The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15(2): 163-76.
- 5 Thiriet C, Hayes JJ. Chromatin in need of a fix: phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair. *Mol Cell* 2005; 18(6): 617-22.
- 6 Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 2006; 31(2): 89-97.
- 7 Santi DV, Garrett CE, Barr PJ. On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs. *Cell* 1983; 33(1): 9-10.
- 8 Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG Islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 1987; 196(2): 261-82.
- 9 Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986; 321(6067): 209-13.
- 10 Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992; 69(6): 915-26.
- 11 Meehan RR. DNA methylation in animal development. *Semin Cell Dev Biol* 2003; 14(1): 53-65.
- 12 Ooi SKT, Bestor TH. The colorful history of active DNA demethylation. *Cell* 2008; 133(7): 1145-48.
- 13 Penterman J, Zilberman D, Huh JH, Ballinger T, Henikoff S, Fischer RL. DNA demethylation in the *Arabidopsis* genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(16): 6752-57.
- 14 Kangaspeska S, Stride B, Metivier R, Polycarpou-Schwarz M, Ibberson D, Carmouche RP, *et al.* Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* 2008; 452(7183): 112-15.
- 15 Metivier R, Gallais R, Tiffoche C, Le Peron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, *et al.* Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 2008; 452(7183): 45-50.
- 16 Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, *et al.* Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 2000; 10(8): 475-78.
- 17 Gjerset RA, Martin DW. Presence of a DNA demethylating activity in the nucleus of murine erythroleukemic cells. *J Biol Chem* 1982; 257(15): 8581-83.
- 18 Weiss A, Keshet I, Razin A, Cedar H. DNA Demethylation *in vitro*: involvement of RNA. *Cell* 1996; 86(5): 709-18.
- 19 Swisher JF, Rand E, Cedar H, Marie Pyle A. Analysis of putative RNase sensitivity and protease insensitivity of demethylation activity in extracts from rat myoblasts. *Nucleic Acids Res* 1998; 26(24): 5573-80.
- 20 Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 1999; 397(6720): 579-83.
- 21 Hendrich B, Guy J, Ramsahoye B, Wilson VA, Bird A. Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes Dev* 2001; 15(6): 710-23.
- 22 Barreto G, Schafer A, Marhold J, Stach D, Swaminathan SK, Handa V, *et al.* *Gadd45a* promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 2007; 445(7128): 671-75.
- 23 Rai K, Huggins IJ, James SR, Karpf AR, Jones DA, Cairns BR. DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and *gadd45*. *Cell* 2008; 135(7): 1201-12.
- 24 Jin SG, Guo C, Pfeifer GP. *GADD45A* does not promote DNA demethylation. *PLoS Genet* 2008; 4(3): e1000013.
- 25 Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009; 324(5929): 930-35.
- 26 Lorsbach RB, Moore J, Mathew S, Raimondi SC, Mukatira ST, Downing JR. TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). *Leukemia* 2003; 17(3): 637-41.
- 27 Ono R, Taki T, Taketani T, Taniwaki M, Kobayashi H, Hayashi Y. LCX, Leukemia-associated protein with a CXXC domain, is fused to MLL in acute myeloid leukemia with trilineage dysplasia having t(10;11)(q22;q23). *Cancer Res* 2002; 62(14): 4075-80.
- 28 Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in purkinje neurons and the brain. *Science* 2009; 324(5929): 929-30.
- 29 Loenarz C, Schofield CJ. Oxygenase catalyzed 5-methylcytosine hydroxylation. *Chem Biol* 2009; 16(6): 580-83.

## A Summarization of DNA Methylation Modification Research

Jia-jia Li, Charlie Degui Chen\*

(State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract** DNA methylation is an important epigenetic modification and regulates gene activity through chromatin structural alteration, DNA stability, and interacting proteins. The modification plays an essential role in normal physiological and pathological processes. Here we summarized the dynamic change of DNA modification, with an emphasis on a recent discovery that TET1 (ten-eleven translocation 1) is an oxygenase for DNA methylation. TET1 changes DNA methylation state by converting 5-methyl cytosine (5mC) to its hydroxylated form, 5-hydroxymethyl cytosine (5hmC), and consequently, is involved in the dynamic change of DNA demethylation.

**Key words** epigenetics; DNA methylation; DNA demethylation; *tet1*

---

\*Corresponding author. Tel: 86-21-54921148, E-mail: cdchen@sibs.ac.cn