

文章编号: 1004-0374(2012)06-0518-03

· 发现的历程 ·

编者按: DNA甲基化是一种非常重要的表观遗传调控方式,在基因印迹、X染色体失活、转座子与外源DNA的沉默及组织特异性基因的表达调控中发挥着重要的作用。在哺乳动物的配子发生过程及从受精到着床的早期胚胎发育阶段,基因组DNA发生大规模的主动去甲基化。但去甲基化的分子机制一直是表观遗传领域的谜题。2009年,Anjana Rao及其同事发现一种DNA双氧化酶TET蛋白能够将5-甲基胞嘧啶氧化成5-羟甲基胞嘧啶,这为DNA去甲基化的机制研究开拓了新的思路。在此基础上,徐国良实验室展开了深入研究,发现TET蛋白能够进一步将5-羟甲基胞嘧啶氧化成5-羧基胞嘧啶,并发现糖苷酶TDG能够特异性地识别并切除DNA中的5-羧基胞嘧啶,进而启动碱基切除修复途径完成DNA去甲基化,从而提出了氧化作用与碱基切除修复途径协同介导的DNA主动去甲基化机制。

DNA主动去甲基化的*Science*之路

李滨忠

(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,上海 200031)

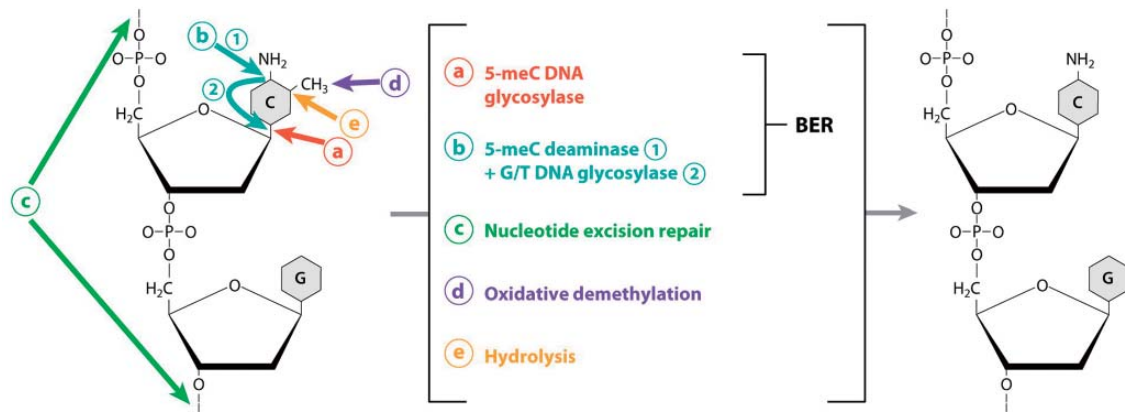
5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)被认为是哺乳动物基因组中除腺嘌呤(adenine)、胸腺嘧啶(thymine)、胞嘧啶(cytosine)及鸟嘌呤(guanine)之外的第五种碱基。它与染色质的另外一种重要组分组蛋白及其翻译后修饰的组合决定了特定基因组区域染色质的结构及基因转录活性,从而形成了一层叠加于碱基序列上的表观遗传信息。胞嘧啶甲基化,也称为DNA甲基化,参与了诸多生物学过程,包括基因印迹、X染色体的失活、基因组稳定性的维持、转座子及逆转录转座子的沉默及组织特异性基因的沉默等^[1-2]。

在哺乳动物的个体发育中,DNA甲基化谱式主要经历了两次大规模的重编程过程,一次发生在从受精至着床的早期胚胎发育时期,另一次发生在配子发生过程中^[3-4]。这两次重编程都涉及了基因组范围的主动去甲基化反应(global demethylation)。相对于基因组范围内的大规模主动去甲基化,在体细胞中会发生局部的、高度位点特异性的主动去甲基化^[5-6]。DNA的去甲基化与DNA甲基化这两个过程相互平衡,维持了DNA甲基化谱式的稳定。任何一方的失调都会导致DNA甲基化谱式的紊乱,进而引起多种神经退行性疾病、免疫系统疾病以及癌症^[7-8]。特别是两次基因组范围的主动去甲基化事件对于生命的起始以及生命的传承具有非常重要的意义。

DNA甲基化是由DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase)催化完成,那DNA去甲基化是如何完

成的呢?也存在类似于DNA甲基转移酶的DNA去甲基化酶(DNA demethylase),抑或是其他的机制呢?就此,著名的华生物学家、美国科学院院士朱健康教授在一篇综述中提出以下几种DNA去甲基化的可能方式(图1)^[5]。(1)存在特异性识别并切除5mC的糖苷酶(glycosylase),切除5mC产生AP位点(apurinic/apyrimidinic site),进而启动碱基切除修复途径(base excision repair, BER),用没有修饰的胞嘧啶取代原有的甲基胞嘧啶,最终完成DNA的去甲基化。(2)存在特异性识别5mC的脱氨酶(deaminase),通过脱氨作用将5mC转变成胸腺嘧啶,形成G/T错配。进而由识别G/T错配的糖苷酶,如TDG、MBD4等,启动BER途径,完成DNA的去甲基化。(3)通过核苷酸切除修复途径(nucleotide excision repair, NER)切除含有5mC的一段DNA,并用含有未修饰胞嘧啶的同样序列进行替换,进而完成DNA的去甲基化。(4)通过氧化作用将甲基基团氧化成羧基基团,再通过脱羧作用完成DNA去甲基化。(5)通过水解作用直接将甲基基团去掉。朱健康教授实验室发现在拟南芥中存在一种由DNA糖苷酶(DME、DML2、DML3和ROS1等)介导的主动去甲基化机制。ROS1等可以切除5-甲基胞嘧啶,启动碱基切除-修复途径(base excision repair, BER)完成DNA去甲基化^[5]。但在哺乳动物

收稿日期: 2012-01-09

图1 DNA主动去甲基化的可能机理^[5]

中并没有鉴定到这些糖苷酶的同源蛋白,提示哺乳动物中可能存在不同的DNA去甲基化机制。

长期以来, DNA主动去甲基化的机制一直是表观遗传领域的一个最基本的问题。但由于DNA主动去甲基化事件只限于卵子受精后分裂前和生殖细胞生成过程,时间窗口很短,细胞来源有限,无法获得足够数量的细胞或组织进行分子生物学操作来鉴定基因,更无法进行生化操作去纯化酶,因此研究起来极其困难。但这个难题从来没有缺少过关注,很多实验室试图用其他方法来解决这个问题,也包括本实验室。1999年,加拿大McGill大学的犹太裔生物学家Moshe Szyf教授在Nature上发表文章,声称他们实验室鉴定到了DNA去甲基化酶,这个酶含有甲基化CpG结合结构域,能够在体外将5mC转变成C^[9]。这在表观遗传领域引起了一时的轰动,但其他实验室重复不出来这个结果。直到2007年,德国海德堡的Christof Niehrs实验室利用大规模筛选的方法鉴定能够重新激活被DNA甲基化沉默的荧光素酶(luciferase)报告基因的蛋白。他们发现DNA损伤诱导蛋白Gadd45a(growth arrested and DNA-damage-inducible protein 45 alpha)能够促进修复途径介导的DNA去甲基化^[10]。但Gadd45a基因敲除并不妨碍胚胎发育,也不影响受精卵分裂前雄原核的主动去甲基化过程。另外,Gadd45a只是启动一种DNA修复机制,并不是真正的去甲基化酶。2008年,美国犹他大学的David Jones实验室与Bradley Cairns实验室合作,将甲基化的DNA注射入斑马鱼的胚胎中来研究DNA去甲基化。他们提出脱氨酶AID(activation induced deaminase)、糖苷酶MBD4及Gadd45a蛋白相互协作,通过脱氨偶联的碱基切除修复途径完成DNA去甲基化^[11]。2010年,英国剑桥大学的Wolf Reik教授实验室报

道AID蛋白的缺失影响了原始生殖细胞中的去甲基化事件^[12]。这为AID蛋白通过脱氨作用参与DNA去甲基化提供了进一步的证据。但还是不能完全解释基因组范围的主动去甲基化事件。在2009年,DNA去甲基化研究出现了一个全新的突破。美国科学院院士Anjana Rao实验室发现DNA双加氧酶Tet1蛋白在体外可以将5-甲基胞嘧啶氧化成5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5hmC)^[13],且5hmC稳定存在于胚胎干细胞及浦肯野细胞中^[14],这提示5mC可能通过氧化途径经由5hmC最终转化成非甲基化的胞嘧啶^[6]。

在粗糙脉胞菌(*Neurospora crassa*)中存在一种尿嘧啶代谢补偿途径。胸腺嘧啶在胸腺嘧啶水解酶(thymine-7-hydrolyase, T7H)的催化下经三步氧化反应被转变成5-羧基尿嘧啶,随后5-羧基胞嘧啶在异乳清酸脱羧酶(iso-orotate decarboxylase, IDCase)的作用下转变成尿嘧啶^[6,15]。那Tet蛋白是否具有类似于T7H的功能,通过多步氧化反应将5mC转变成5-羧基胞嘧啶(5-carboxylcytosine, 5caC)呢?本实验室正是在这个假说的推动下开始了哺乳动物DNA主动去甲基化机制的研究。首先,优化了Tet蛋白的体外反应条件,除了加入辅因子2-OG(2-oxoglutarate)及二价铁离子,还加入了1 mmol/L ATP。高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)及薄层层析(thin layer chromatography, TLC)的结果显示5mC被转变成一种新的形式。经质谱鉴定,这种新的修饰形式为5caC。在293T细胞中过表达Flag-Tet2蛋白可在基因组DNA中检测到5caC,而Tet2突变体蛋白则不能产生5caC。这些结果表明Tet蛋白确实可以通过氧化作用将5mC转变成5caC。接下去的问题是5caC如何转变成非甲基化的胞嘧啶的呢?是存在类似于IDCase的

5caC 脱羧酶, 还是其他途径, 比如碱基切除修复途径呢? 2010年, 英国剑桥大学的 Azim Surani 实验室的研究工作显示碱基切除修复途径参与了小鼠生殖系的重编程^[16]。糖苷酶是 BER 途径最上游的蛋白分子。本实验室纯化了目前已知的四种针对 G/U 错配的糖苷酶, 即 TDG、MBD4、UNG1 及 SMUG1, 并检测这些糖苷酶是否可以特异性地切除 5caC, 结果显示这四种糖苷酶中只有 TDG 可以特异性地切除 5caC。用 anti-TDG 抗体免疫去除 ES 核抽提物中内源的 TDG 蛋白导致核抽提物中 5caC 切除活性的大大降低。而共转染 TDG 和 Tet2 则可以消除基因组中 Tet 催化产生的 5caC, 丧失酶活的 TDG 突变体蛋白则没有这种作用。Tdg knockdown 的 ES 细胞或者 Tdg knockout 的 iPS 细胞的核抽提物中 5caC 切除活性基本消失, 同时在这两种细胞中均可以用 HPLC-MS-QQQ 的方法检测到 5caC 的积累。上述结果证明 5mC 可在双加氧酶 Tet 的催化下转变成 5caC, 而 5caC 则进一步通过 TDG 介导的 BER 途径转变成未甲基化的胞嘧啶^[17]。在本实验室开展 Tet 蛋白通过氧化作用将 5hmC 转变成 5caC 工作的同时, 美国北卡罗来纳大学、霍华德休斯医学研究所的著名华人科学家张毅教授实验室也发现了同样的生化机制。他们发现 Tet 蛋白可以在体外将 5hmC 顺序氧化成 5-醛基胞嘧啶 (5-formylcytosine, 5fC) 和 5caC, 并用质谱方法在 ES 细胞及多种小鼠组织中检测到 5fC 和 5caC 的存在^[18]。但他们没有继续深入研究 5caC 如何转变成未修饰的胞嘧啶。

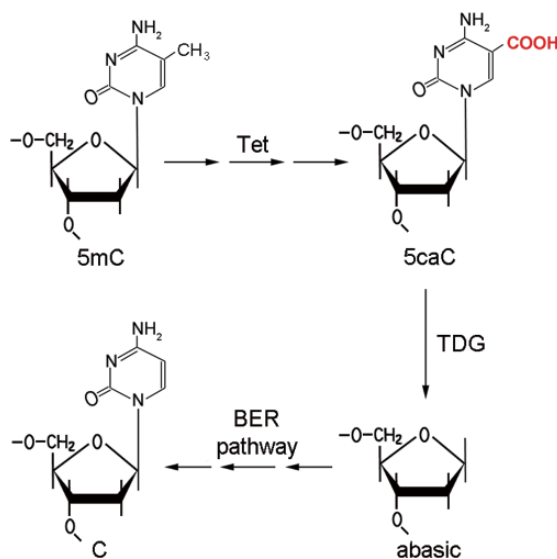


图2 氧化作用偶联碱基切除修复途径介导的DNA主动去甲基化模型

所以, 本实验室首次相对完整地提出了哺乳动物 DNA 主动去甲基化的一种全新分子机制 (图 2)。

致谢: 感谢徐国良老师对工作的指导和支持!

[参 考 文 献]

- [1] Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 2003, 33 (Suppl): 245-54
- [2] Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74: 481-514
- [3] Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 2001, 293: 1089-93
- [4] Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, 2007, 447: 425-32
- [5] Zhu JK. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu Rev Genet*, 2009, 43: 143-66
- [6] Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 607-20
- [7] Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet*, 2000, 1: 11-9
- [8] Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 597-610
- [9] Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, et al. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature*, 1999, 397: 579-83
- [10] Barreto G, Schäfer A, Marhold J, et al. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature*, 2007, 445: 671-5
- [11] Rai K, Huggins IJ, James SR, et al. DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. *Cell*, 2008, 135: 1201-12
- [12] Popp C, Dean W, Feng S, et al. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature*, 2010, 463: 1101-5
- [13] Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 2009, 324: 930-5
- [14] Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*, 2009, 324: 929-30
- [15] Smiley JA, Kundracik M, Landfried DA, et al. Genes of the thymidine salvage pathway: thymine-7-hydroxylase from a *Rhodotorula glutinis* cDNA library and iso-oxotetrahydrocarboxylase from *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1723: 256-64
- [16] Hajkova P, Jeffries SJ, Lee C, et al. Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway. *Science*, 2010, 329: 78-82
- [17] He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*, 2011, 333: 1303-7
- [18] Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*, 2011, 333: 1300-3