

DOI: 10.13376/j.cblls/2016111

文章编号: 1004-0374(2016)08-0844-05



徐国良, 中国科学院院士, 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研究员、博士生导师。中科院“百人计划”引进的学术带头人, 国家杰出青年基金和 2015 年度陈嘉庚生命科学奖获得者。主持和参加国家、科学院和地方政府的多项重大研究项目。现任 *Development*、*JBC* 和 *Biochemical J* 等国际刊物编委。主要研究方向为表观遗传调控及其与癌症等重大疾病的关系。研究组近年来的主要研究工作包括: (1) DNA 去甲基化发生的分子机理及其生物学意义; (2) 哺乳动物胚胎发育过程中 DNA 甲基化发生的分子机制。研究结果发表在 *Science*、*Nature* 和 *Cell* 及其系列期刊上, 其研究成果“揭示 Tet 双加氧酶在哺乳动物表观遗传调控中的重要作用”入选 2011 年度“中国科学十大进展”。

Tet双加氧酶在哺乳动物表观遗传调控中的作用

程时颂, 杜雅蕊, 徐国良*

(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)

摘要: DNA 甲基化作为一种重要的表观遗传修饰, 在哺乳动物的生长发育过程中发挥着举足轻重的功能。DNA 甲基化谱式并不是一成不变的, 个体发育过程中甲基化谱式如何建立以及如何逆转从而实现基因时空特异性表达, 一直是表观遗传领域的重大科学问题。课题以“干细胞全能性建立的表观遗传调控研究”为主要脉络, 阐明了 Tet 双加氧酶介导的 DNA 去甲基化过程及其在细胞命运决定和哺乳动物发育中的功能。现将对项目启动五年来该课题的主要原创性工作进行综述。

关键词: DNA 去甲基化; Tet 双加氧酶; 5mC 氧化; 表观重编程

中图分类号: R394 **文献标志码:** A

Roles of Tet proteins in mammalian epigenetic regulation

CHENG Shi-Song, DU Ya-Rui, XU Guo-Liang*

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

Abstract: DNA methylation, as an important epigenetic mark, plays crucial roles during development in mammals. Though 5-methylcytosine (5mC) is relatively stable, genome-wide DNA methylation reprogramming has been observed in two developmental stages during embryogenesis. The mechanism of the establishment and reversal of genomic DNA methylation patterns has remained a major scientific question in the field of epigenetics. Our group has focused on the epigenetic mechanism of establishment of pluripotent stem cell identity and has elucidated the Tet dioxygenase mediated DNA demethylation pathway as well as its role in cell fate transition and development in mammals. This article attempts to review the research progress of the five-year project.

Key words: DNA demethylation; Tet dioxygenase; 5mC oxidation; epigenetic reprogramming

收稿日期: 2016-04-01

基金项目: 中国科学院“干细胞与再生医学研究”战略性先导科技专项(XDA01010301)

*通信作者: E-mail: glxu@sibcb.ac.cn, Tel: 021-54921332

DNA 甲基化作为一种重要的表观遗传修饰, 在生物体内发挥着举足轻重的功能。在哺乳动物中, DNA 甲基化主要以 5mC (胞嘧啶第 5 位碳原子的甲基化) 的形式存在于 CpG 双核苷酸位点。DNA 甲基化可以引起染色质结构和活性的改变, 在基因表达调控、遗传印迹、X 染色体失活、转座子和反转录病毒序列的沉默以及胚胎发育和细胞分化等过程中发挥作用。DNA 甲基化的异常可能会引起癌症等一系列人类疾病^[1]。

DNA 甲基化的重要功能表明其必然受到精确的调控, 也暗示 DNA 的甲基化谱式不是一成不变的。在小鼠胚胎发育过程中, DNA 甲基化谱式会出现两次大规模的重编程。第一次是在迁移过程中的原始生殖细胞中, 全基因组, 包括印迹基因在内的大部分基因都发生去甲基化, 但随着生殖细胞的发育而被重新甲基化。第二次发生在受精到着床前的早期胚胎发育阶段, 受精卵内的雌雄原核分别发生 DNA 去甲基化。此外, DNA 去甲基化还会在特定时期发生在基因组特定的位点, 参与调控局部的基因表达^[2]。

在哺乳动物中, DNA 的甲基化主要是通过 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, Dnmt) 的催化, 将甲基供体 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 上的甲基基团转移到 DNA 上来实现。DNA 甲基转移酶按其功能可以分为维持性 (maintenance) 甲基转移酶和起始性 (*de novo*) 甲基转移酶两种。DNMT3a/3b 主要负责起始性 DNA 甲基化^[3], 而 DNMT1 则主要结合在半甲基化的 DNA 上, 负责在 DNA 复制过程中甲基化状态的维持^[4]。DNA 的去甲基化主要有两种方式, 分别是依赖 DNA 复制的被动去甲基化和酶活反应介导的主动去甲基化。当 DNMT1 表达被下调或不具有活性的时候, DNA 的甲基化随着其复制被逐步稀释的过程被称为被动去甲基化。而科学家们更专注于研究 DNA 主动去甲基化的机制。随着 2009 年 Tet 双加氧酶家族的发现, DNA 主动去甲基化的研究也取得了重要进展。本篇综述主要论述 Tet 双加氧酶介导的 5mC 氧化在哺乳动物生长发育和细胞谱系转变过程中的生物学作用。

1 Tet双加氧酶-TDG糖苷酶介导的DNA主动去甲基化

TET 蛋白家族共有 3 个成员, 分别为 TET1、TET2 和 TET3。其中 TET1 是在研究一例存在 t(10;

11)(q22; q23) 异位的白血病患者时鉴定成功的, 故而得名^[5]。2009 年, 美国科学院院士 Anjana Rao 实验室发现, DNA 双加氧酶 Tet1 在 Fe²⁺ 和 α -酮戊二酸的存在下可以将 5mC 氧化为 5-羟甲基胞嘧啶 (5hmC)^[6]。同年, 另一实验室发现, 5hmC 在小脑浦肯野细胞中含量很高^[7], 为之提供佐证, 这使得人们对 DNA 去甲基化机理的认识有了新的思路。

在此基础上, 我们首次提出了氧化作用与碱基切除修复 (base excision repair, BER) 途径协同介导的 DNA 主动去甲基化机制^[8]。我们优化了 Tet 蛋白的体外反应条件, 在辅因子二价铁离子、 α -酮戊二酸和 ATP 的存在下, 将含 5mC 或者 5hmC 的 DNA 作为反应底物与 Tet 蛋白反应一段时间后, 通过高效液相色谱 (HPLC) 和薄层层析 (TLC) 分离检测的方法显示, 5mC 或 5hmC 被转化成了一种新的修饰碱基形式。经质谱鉴定, 确定这种新的修饰为 5-羧基胞嘧啶 (5caC)。在正常哺乳动物细胞中, 5caC 含量极低, 常规方法检测不到。在 HEK293T 细胞中过表达 Tet2 蛋白后可在基因组 DNA 中检测到 5caC, 而过表达 Tet2 突变体蛋白则无法检测到 5caC, 表明 Tet 蛋白通过氧化作用将 5mC 转变成了 5caC。进一步的研究显示, TDG 糖苷酶能够在体外特异性地识别并切除 5caC。细胞实验进一步表明, 在外源 Tet 过表达的 293T 细胞中本应该能检测到的 5caC 在过表达 TDG 后消失。Tdg knockdown 或者 Tdg knockout 的 ES 细胞核抽提物切除 5caC 的能力也降低, 并且细胞基因组中呈现 5caC 的积累。以上结果说明, 5mC 和 5hmC 均可以被 Tet 双加氧酶进一步氧化产生一种新的碱基形式 5caC, 并且 5caC 可以被 TDG 糖苷酶特异性识别并切除, 进而启动 BER 修复途径将原来的 5mC 替换成未修饰的 C, 从而实现真正的 DNA 去甲基化过程。同期的 *Science* 杂志上, 美国北卡罗来纳大学华人科学家张毅教授实验室也发现, Tet 蛋白可以在体外将 5mC 氧化成 5-醛基胞嘧啶 (5fC) 和 5caC, 但他们没有继续研究 5caC 如何转变成未修饰的胞嘧啶^[9]。

2 Tet双加氧酶介导的5mC氧化在受精卵中的作用

精子和卵细胞的表观遗传组 (epigenomes) 具有十分显著的差别, 其中精子具有很高水平的 DNA 甲基化, 而卵细胞的 DNA 甲基化水平相对较低^[10]。受精后, 精子和卵细胞都会经历一系列 DNA 甲基化组的重编程, 从而建立起早期胚胎的发育全能性。

传统观念认为受精后父本基因组 DNA 会经历大规模的主动去甲基化, 母本基因组 DNA 会伴随着卵裂的进行发生被动去甲基化^[11]。然而, 徐国良实验室的工作显示父本和母本基因组 DNA 都会发生 Tet3 依赖的主动去甲基化和 DNA 复制依赖的被动去甲基化^[12]。

TET 家族 3 个蛋白中只有 Tet3 双加氧酶高表达于卵细胞内, 且受精后 Tet3 蛋白特异性地在雄原核内富集, 暗示 Tet3 介导的 5mC 氧化有可能在雄原核 DNA 的去甲基化过程中发挥作用。利用 5hmC 特异性的抗体通过免疫荧光实验证实精子受精后不久, 雄原核中 5hmC 的荧光信号逐渐增强; 与此相应地, 5mC 的信号逐渐减弱。针对 5caC 的免疫荧光实验显示, 小鼠受精卵中的 5mC 还被进一步氧化成 5caC。进一步实验发现, 母源 Tet3 缺失的受精卵中, 雄原核 5mC 水平维持恒定, 而 5mC 向 5hmC 和 5caC 的转变无法正常发生。Tet3 的缺失使父本 *Line1* 重复序列和 *Oct4*、*Nanog* 等基因的去甲基化受阻, 早期胚胎 *Oct4* 激活延迟。生殖系特异性敲除 Tet3 的雌鼠生育力显著下降, 与野生型雄鼠交配后产生的杂合子胚胎中接近半数无法正常发育至出生。此外, 在体细胞核移植实验中, 缺失了 Tet3 的卵细胞对移入的供体细胞核的重编程能力也显著下降。

由于在受精卵中 5hmC 信号的增强和 5mC 信号的减弱主要发生在父本雄原核中, 起初认为母本雌原核基因组并没有发生 Tet3 介导的 5mC 氧化。利用最近发展的单细胞简并代表性甲基化测序 (scRRBS)、发夹 DNA 甲基化测序 (hairpin BS-seq) 以及测定 5fC/5caC 的 MAB-Seq (M.SssI-Assisted Bisulfite Sequencing) 等单碱基分辨率的 DNA 甲基化等几种表观修饰分析技术, 结合 Tet3 和 Tdg 生殖系选择性敲除的小鼠模型, 我们对受精卵中母本和父本基因组 DNA 去甲基化的分子机制进行了系统的研究。受精后父本和母本基因组都会发生大规模的 Tet3 依赖的主动去甲基化和 DNA 复制依赖的被动去甲基化。父本基因组上的重复元件, 如 *B1/SINE*、*LINE-1* 等在受精后会发生复制依赖的被动去甲基化, 而精子中高甲基化的 *Nanog* 和卵子中高甲基化的 *Dnmt3b* 等在受精后都会发生 Tet3 依赖的主动去甲基化。Tet 介导的 5mC 氧化一方面可以继续通过主动去甲基化机制完成 DNA 去甲基化; 另一方面, 由于 5hmC 产物不利于 DNMT1 甲基转移酶辅助因子 UHRF1 结合到基因组中而加速 DNA 甲基化的

被动稀释。在发生主动去甲基化的区域, 5mC 会被未修饰的胞嘧啶 (cytosine) 取代, 而几乎没有高级氧化产物 5fC/5caC 的残留。

虽然 DNA 双加氧酶 Tet3 介导了这一主动去甲基化过程的发生, 但 5fC/5caC 的清除并不依赖于糖苷酶 TDG。首先, TDG 并不是一个母源因子, 在受精卵中几乎不表达^[13]; 其次, TDG 介导的 BER 途径涉及基因组 DNA 双链的断裂与修复, 在受精卵早期胚胎发育中以这种途径来完成 DNA 主动去甲基化过程风险相对很高; 最后, 母源缺失 TDG 的受精卵中 5mC 到 C 的转变仍能正常发生。以上结果暗示在 Tet3 介导的 5mC 氧化途径的下游存在着其他蛋白质负责 5hmC/5fC/5caC 等氧化产物的清除, 实现 DNA 的主动去甲基化。5caC 脱羧酶有可能是一个更为理想的 DNA 去甲基化接棒者, 目前探索这一酶的研究还在继续进行。

3 Tet双加氧酶介导的5mC氧化在干细胞和重编程中的作用

在小鼠胚胎干细胞分化和体细胞重编程过程中也存在 DNA 甲基化的动态变化。在胚胎期 3.5 d, 内细胞团来源的胚胎干细胞 DNA 甲基化水平处于最低状态, 多能性相关转录因子大量表达; 随着囊胚期内细胞团上胚层的分化, 基因组 DNA 甲基化状态逐渐恢复到正常水平, 各种成体分化相关基因开始特异性表达^[14]。在胚胎干细胞中, 起始性 DNA 甲基转移酶 *Dnmt3a* 和 *Dnmt3b*, 双加氧酶 Tet1 和 Tet2 以及糖苷酶 TDG 都高表达, 暗示这些蛋白质因子所介导的甲基化动态变化对干细胞多能性的维持和分化有着重要调控作用。

然而, TET 家族蛋白对于胚胎干细胞多能性的维持并没有想象中的重要^[15], 但在体细胞重编程过程中却发挥着重要的调控作用。2006 年, 日本科学家山中伸弥实验室利用 *Oct4*、*Klf2/4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 4 个转录因子将小鼠成纤维细胞诱导成多能性干细胞, 这种诱导形成的干细胞被称为诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs)^[16]。Costa 等^[17] 研究发现, Tet2 被招募到 *Nanog* 和 *Esrrb* 位点来激活它们的表达, 并且 Tet1 和 Tet2 通过与 *Nanog* 蛋白相互作用来促进诱导重编程过程。我国科学家高绍荣课题组发现, TET1 不仅可以通过促进多能性基因的去甲基化以及重新激活 *Oct4* 来提升诱导重编程的效率, 甚至还可以在诱导重编程中代替 *Oct4* 来完成这一过程^[18]。最近几年关于维生

素 C 通过与 TET 家族蛋白相互作用来调控诱导重编程效率的研究也有不少报道, 其中就包括裴端卿与徐国良课题组合作的成果。这一研究发现, 当 Tet1 敲除时, 维生素 C 可以促进诱导重编程过程; 但当 Tet1 超量表达时, 维生素 C 就会抑制诱导重编程过程^[19]。

此外, 徐国良课题组联合广州与北京的相关科研人员, 制备了敲除 Tet 家族的 3 个成员及 Tdg 基因的成纤维细胞, 观察其重编程为诱导性多能干细胞 (iPSCs) 的能力。研究发现, Tet1/2/3 或者 Tdg 的缺失阻断 5mC 的氧化去甲基化过程, 缺乏氧化去甲基化能力的间充质类型的成纤维细胞完全丧失了发生重编程的能力。随后研究发现, Tet 或者 Tdg 缺失的成纤维细胞被阻断在诱导重编程起始阶段的 MET 转变阶段。进一步的研究发现, Tet 家族蛋白或 Tdg 的缺失导致 MET 发生过程中关键的 miR-200 家族基因不能被激活, 而且将 miR-200 基因转入 Tet 或者 Tdg 缺失的成纤维细胞中则可以恢复它们的诱导重编程能力。由此可以推断, Tet 和 TDG 使 miR-200 家族基因去甲基化来促进它们的表达, 而 miR-200 家族基因能够促进成纤维细胞越过 MET 障碍, 从而顺利完成重编程。对于已经跨过 MET 转变过程的上皮类型的神经前体细胞, 或者新生鼠皮肤角质细胞则不需要 Tet 和 TDG 就能发生重编程, 显示出了这种调控的特异性。即成纤维细胞越过 MET 障碍之后, 即使没有 Tet 和 TDG 也能顺利完成重编程。以上结果表明, Tet-TDG 介导的去甲基化对于多能性基因 (如 Oct4 和 Nanog 等) 的激活等后续事件并不是必需的, 更正了之前关于多能性基因激活机理的错误认识^[20]。

4 Tet双加氧酶介导的5-mC氧化在成体神经发生过程中的作用

大脑神经系统是一个高度复杂有序的智慧系统, 既涉及到生长发育这些形态学变化, 也涉及到学习、记忆与认知等高层次思维活动。DNA 甲基化水平的异常以及 DNA 甲基转移酶 DNMT 的异常表达可以引起多种神经系统疾病。近年来发现 5hmC 在小鼠神经元中含量很高 (大约占甲基化胞嘧啶总量的 40%)^[7], 并且 Tet 家族 3 个蛋白在神经元中都高表达, 这些似乎在暗示 Tet 蛋白介导的 5mC 氧化在神经系统发挥着重要作用。

在早期胚胎的大脑皮层的神经发生过程中, 随着神经元逐渐分化, Tet2 和 Tet3 的表达水平逐渐上

升。当降低 Tet2 和 Tet3 的表达时, 早期胚胎会表现出明显的神经发生缺陷表型; 相反, 当提高 Tet2 和 Tet3 的表达时, 早期胚胎的神经发生过程会被促进^[21]。此外, 在非洲爪蟾中 Tet3 被沉默后, 爪蟾会表现出明显的眼部发育缺陷和神经发育缺陷^[22]。

不仅在早期胚胎的神经发生阶段, 即使在成体神经发育阶段, Tet 家族蛋白也被证明在其中发挥重要作用。2013 年, 徐国良课题组的研究发现, Tet1 基因敲除虽然不影响小鼠的生长发育, 但对成年小鼠海马区神经前体细胞的增殖具有调控作用。Tet1 蛋白缺失后, 成年小鼠神经前体细胞增殖能力降低, 神经发生过程受损, 并伴有空间学习和短期记忆能力的下降。同时, Tet1 的敲除致使与神经前体细胞增殖及成体神经发生相关的基因发生异常的高甲基化, 从而使其表达水平下调, 在一定程度上导致了小鼠成体神经发生过程的缺陷^[23]。此外, 其他实验室也得到类似的结果, 都发现 Tet1 缺失的小鼠神经元中 DNA 甲基化谱式异常, 并且有大量基因表达异常, 以致小鼠的学习记忆都受到明显的损害^[24-25]。

5 总结与展望

随着 Tet 家族蛋白功能的揭示, 以及 5hmC、5fC 和 5caC 这些不同修饰胞嘧啶碱基的发现, 大家逐渐加深了对于 DNA 主动去甲基化机制和功能的了解。人们一直认为 DNA 甲基化在哺乳动物生长发育过程中和细胞谱系转变中发挥着重要的作用, Tet 家族蛋白介导的 5mC 氧化通过丰富 DNA 甲基化动态变化的方式来增强细胞和组织可塑性。尽管 Tet-TDG 介导的 DNA 主动去甲基化在早期胚胎发育、成体神经发生以及体细胞重编程等过程中的作用被本实验室和国际同行广泛研究, 仍有很多未解之谜等待大家去解开, 如受精卵中 Tet3 介导的 5mC 氧化去甲基化的下游可能存在不依赖于 TDG 的其他的去甲基化途径, 其他糖苷酶介导的 BER 途径或者是否存在潜在的 5fC 脱醛酶和 5caC 脱羧酶在受精卵中发挥作用; 5hmC、5fC 以及 5caC 仅仅是去甲基化过程中的中间产物还是能和 5mC 一样独立地作为一种表观遗传标记起到生物学作用。Dnmt1、Dnmt3a 或 Dnmt3b 基因敲除小鼠都产生致死表型, 表型相对较为严重, 这也表明 DNA 甲基化谱式的建立与维持对于生物体生长发育的重要性; 但是 Tet 家族基因敲除的小鼠表型相对较为温和, Tet1 和 Tet2 双敲除小鼠也可以存活, Tet3 基因

敲除小鼠在出生后 1 d 死亡。我们推测, 小鼠中 TET 家族蛋白 3 个成员之间存在着某种程度上互补作用, 也许通过在小鼠中实现 3 个 Tet 基因同时敲除, 才能更为深刻地展示 Tet 家族蛋白及其介导的 5mC 氧化对于生物体生长发育的重要性。

[参 考 文 献]

- [1] Li E, Zhang Y. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*, 2014, 6: a019133
- [2] Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 607-20
- [3] Okano M, Bell DW, Haber DA, et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 1999, 99: 247-57
- [4] Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*, 1998, 19: 219-20
- [5] Lorschach RB, Moore J, Mathew S, et al. 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: 637-41
- [6] Tahiliani M, Koh KP, Shen YH, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 2009, 324: 930-5
- [7] Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*, 2009, 324: 929-30
- [8] He YF, Li BZ, Li Z, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*, 2011, 333: 1303-7
- [9] 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
- [10] Kobayashi H, Sakurai T, Imai M, et al. Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks. *PLoS Genet*, 2012, 8: e1002440
- [11] Gu TP, Guo F, Yang H, et al. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, 2011, 477: 606-10
- [12] Guo F, Li X, Liang D, et al. Active and passive demethylation of male and female pronuclear DNA in the mammalian zygote. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 447-58
- [13] Tang FC, Barbacioru C, Nordman E, et al. Deterministic and stochastic allele specific gene expression in single mouse blastomeres. *PLoS One*, 2011, 6: e21208
- [14] Smith ZD, Chan MM, Mikkelsen TS, et al. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature*, 2012, 484: 339-44
- [15] Dawlaty MM, Breiling A, Le T, et al. Combined deficiency of Tet1 and Tet2 causes epigenetic abnormalities but is compatible with postnatal development. *Dev Cell*, 2013, 24: 310-23
- [16] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663-76
- [17] Costa Y, Ding J, Theunissen TW, et al. NANOG-dependent function of TET1 and TET2 in establishment of pluripotency. *Nature*, 2013, 495: 370-4
- [18] Gao Y, Chen J, Li K, et al. Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC induction reveals an important role of DNA methylation and hydroxymethylation in reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2013, 12: 453-69
- [19] Chen J, Guo L, Zhang L, et al. Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming. *Nat Genet*, 2013, 45: 1504-9
- [20] Hu X, Zhang L, Mao SQ, et al. Tet and TDG mediate DNA demethylation essential for mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 512-22
- [21] Hahn MA, Qiu RX, Wu XW, et al. Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine and chromatin marks in mammalian neurogenesis. *Cell Rep*, 2013, 3: 291-300
- [22] Xu Y, Xu C, Kato A, et al. Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for *Xenopus* eye and neural development. *Cell*, 2012, 151: 1200-13
- [23] Zhang RR, Cui QY, Murai K, et al. Tet1 regulates adult hippocampal neurogenesis and cognition. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 237-45
- [24] Rudenko A, Dawlaty MM, Seo J, et al. Tet1 is critical for neuronal activity-regulated gene expression and memory extinction. *Neuron*, 2013, 79: 1109-22
- [25] Kaas GA, Zhong C, Eason DE, et al. TET1 controls CNS 5-methylcytosine hydroxylation, active DNA demethylation, gene transcription, and memory formation. *Neuron*, 2013, 79: 1086-93