

DOI: 10.13376/j.cblls/2017123

文章编号: 1004-0374(2017)10-0919-07



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, 兼任复旦大学生物医学研究院执行院长。中科院“百人计划”引进的学术带头人, 国家杰出青年基金、2015年度陈嘉庚生命科学奖和2016年度上海市自然科学奖一等奖获得者。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* 期刊编辑顾问, *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”和“揭示胚胎发育过程中关键信号通路的表观遗传调控机制”分别入选 2011 年度和 2016 年度“中国科学十大进展”。

TET双加氧酶介导的主动去甲基化分子机制及功能研究

王 超, 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修饰, 在基因表达调控及胚胎生长发育等方面起到重要作用。尽管 5-甲基胞嘧啶 (5mC) 是一种稳定的共价修饰, 但在生物体内仍处于一个动态变化的过程, 也就是说, 它可能会通过某种方式发生去甲基化。而 TET 蛋白功能的揭示为 DNA 主动去甲基化提供了一条途径: TET 双加氧酶可以将 5mC 迭代氧化形成 5-羟甲基胞嘧啶 (5hmC)、5-醛基胞嘧啶 (5fC) 和 5-羧基胞嘧啶 (5caC), 再通过 DNA 糖苷酶 TDG 介导的碱基切除修复 (base excision repair, BER) 途径将 5mC 重新变为未修饰的胞嘧啶。随着人们对 TET 双加氧酶及主动去甲基化研究的深入, 主动去甲基化的生物学功能也被逐渐揭示。现总结了已经揭示的主动去甲基化分子机制和生物学意义, 同时, 概括了本实验室近些年的研究进展。

关键词: DNA 去甲基化; 5mC 氧化; TET 双加氧酶; TDG; 表观遗传

中图分类号: Q523; Q554 **文献标志码:** A

The mechanism and function of DNA active demethylation mediated by TET dioxygenases

WANG Chao, XU Guo-Liang*

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

收稿日期: 2017-08-16

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); 国家自然科学基金项目(90919061, 31230039); 国家基金委创新研究群体项目(31221001, 31521061); 科技部国家重大科学研究计划(2012CB966903)

*通信作者: E-mail: glxu@sibcb.ac.cn

Abstract: DNA methylation, as one of the best characterized epigenetic modifications, has its important roles in the regulation of gene expression and embryogenesis. Although 5-methylcytosine (5mC) is a relatively stable modification, it is dynamically altered during embryo development. 5mC may be reversed to its unmodified state. The discovery of Ten-Eleven Translocation (TET) family dioxygenases has provided insights into a pathway of DNA active demethylation: TET enzymes mediate the iterative oxidation of 5mC to 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), 5-formylcytosine (5fC) and 5-carboxylcytosine (5caC), then 5fC and 5caC are replaced by unmodified cytosine (C) through TDG-mediated base excision repair (BER) pathway. As the research into TET enzymes deepens, a more comprehensive functional assessment of DNA active demethylation has become possible. In this review, we attempt to summarize the recent advances, and share some of our new findings made over the past few years.

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

表观遗传是指在 DNA 序列不发生改变的情况下, 基因的表达发生稳定可遗传的变化, 它主要包括 DNA 甲基化、组蛋白翻译后修饰、组蛋白变体、染色质重塑及非编码 RNA 调控等。在哺乳动物发育过程中, 表观遗传调控 (epigenetic regulation) 对细胞分化和命运决定起着至关重要的作用。

DNA 甲基化作为一种重要的表观遗传修饰, 在生物体内发挥许多不可或缺的功能^[1-2]。哺乳动物中, DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 可以将 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 上的甲基基团转移到胞嘧啶第五位碳原子上, 使胞嘧啶变成 5-甲基胞嘧啶 (5mC)。5mC 主要发生在对称的 CpG 双核苷酸上, 哺乳动物基因组中 60%~80% 的 CpGs 都以甲基化的形式存在^[3]。

DNA 甲基化谱式的建立及维持主要依赖于甲基转移酶 DNMT1、DNMT3A 及 DNMT3B。DNMT1 是维持性 DNA 甲基转移酶, 广泛分布于各种组织中, 它更偏好作用于半甲基化的 CpG 位点, 在细胞复制过程中发挥维持甲基化谱式不变的功能。*Dnmt1* 敲除的小鼠胚胎在发育早期死亡, 伴随着严重的 DNA 低甲基化^[2]。另外, UHRF1 (ubiquitin-like with PHD and RING finger domains 1) 作为 DNA 甲基化的调控蛋白, 可以和 DNMT1 相互作用, 将 DNMT1 招募到半甲基化的 CpG 位点, 完成甲基化的维持^[4]。

DNMT3A 和 DNMT3B 是起始性 DNA 甲基转移酶, 相比起 DNMT1, DNMT3A/3B 更倾向于作用未甲基化的 CpG 位点, 对小鼠胚胎早期发育过程中甲基化谱式的建立起着决定性的作用。DNMT3A 对于配子形成过程中父本及母本印记的建立和维持、早期胚胎中 X 染色体失活, 以及主要卫星 DNA 序列 (major satellite DNA) 的甲基化具有重要

的作用^[5]; DNMT3B 则更倾向于甲基化次要卫星 DNA 序列 (minor satellite DNA)。

最新发现的 DNMT3C 也属于起始性 DNA 甲基转移酶, 从生物进化上看是由 *Dnmt3b* 复制后产生的, 不过生物信息学分析结果显示, *Dnmt3c* 只存在于啮齿动物基因组 (rodent genomes) 中。DNMT3C 在雄性配子发生过程中负责在进化上年轻的逆转座子 (young retrotransposons) 启动子区域建立甲基化, 这一特定的甲基转移酶活性对小鼠的生育能力至关重要^[6]。然而, 研究人员对于 DNMT3C 的活性及功能还存在争议, 有待进一步分析。

DNA 甲基化是一种稳定的修饰, 然而, 它在生物体内并不是一成不变的。哺乳动物的个体发育过程中, 基因组的甲基化谱式会经历两次大规模的重编程过程^[7-8]。第一次去甲基化发生在配子形成过程中, 原始生殖细胞在向生殖嵴迁徙过程中发生去甲基化, 而后再重新建立甲基化。雄性原始生殖细胞基因组在胚胎第 16 天重新被甲基化; 而雌性生殖细胞基因组的再甲基化则发生于出生后的卵细胞生长时期。第二次去甲基化发生在受精至着床前的胚胎早期发育阶段。受精发生后, 雄原核会在几个小时内发生迅速的大规模的去甲基化, 而雌原核则主要以相对较慢的速度去甲基化。着床之后, 随着各个组织器官的发生, 不同类型的细胞在 DNA 甲基转移酶的作用下重新建立起相应的甲基化谱式。

DNA 的去甲基化目前看来有两种方式: (1) DNMT1 表达下调或被阻滞在细胞核外无法发挥活性, DNA 甲基化会随着 DNA 复制逐渐被稀释, 这个过程称为被动去甲基化; (2) 以 TET 家族蛋白为代表, TET 可以将 5mC 进行迭代氧化, 分别形成 5hmC、5fC 和 5caC, 再通过 DNA 糖苷酶 TDG 介导的 BER 途径将 5mC 重新变为未修饰的 C, 这个

过程称之为主动去甲基化。本文主要介绍 TET 介导氧化去甲基化的机制及其生物学功能。

1 5hmC及TET蛋白的发现

2009年,人们首先在胚胎干细胞基因组 DNA 中发现了一种新的碱基,即 5-羟甲基胞嘧啶,并且发现在小鼠的脑部组织,尤其是 Purkinje 神经元内也存在胞嘧啶的羟甲基化修饰^[9]。与此同时,Anjana Rao 实验室发现人源双加氧酶 TET1 在 Fe²⁺ 和 α -酮戊二酸存在的情况下可以将 5mC 氧化形成 5hmC^[10]。这两项突破性的工作为 DNA 去甲基化机制的研究奠定了基础。

TET 家族蛋白共有 3 个成员,分别为 TET1、TET2 和 TET3。这是一类依赖于 Fe²⁺ 和 α -酮戊二酸的双加氧酶,其 C 端催化中心由双链 β 折叠结构域 (DSBH) 和半胱氨酸富集区 (cysteine-rich region) 组成。DSBH 结构域可以结合 Fe²⁺ 和 α -酮戊二酸,对 5mC 底物进行氧化,而 Cys-rich 结构域可以帮助稳定 DSBH 与 5mC 的相互作用。全长的 TET1 和 TET3 的 N 端有一个 CXXC 结构域,CXXC 结构域存在于许多与染色质相关的蛋白中,在区分甲基化和未甲基化 DNA 的过程中起到重要作用。TET2 此部分结构丢失,推测在进化过程中 5' 端形成一个独立的基因——*IDAX*,也被称为 *CXXC4*,可以介导 TET2 与 DNA 的相互作用。最新的研究发现,TET1 在体细胞中以一种 N 端截短的变体存在,而在早期胚胎和原始生殖细胞 PGC 中则以全长的形式存在,通过 TET1 的不同变体来调控 DNA 的甲基化^[11]。与之类似,TET3 在体细胞和卵细胞中也有不同的亚型。

2 TET介导的DNA去甲基化

植物中存在一种 DNA 糖苷酶——ROS1/DME 家族蛋白,可直接切除甲基化修饰的碱基,激活生物体内的 BER 途径来达到去甲基化的目的。然而,在哺乳动物中,并未发现具有类似 ROS1 功能的糖苷酶。哺乳动物中 DNA 的主动去甲基化以依赖于 TET 的形式发生。

2011年,徐国良课题组首次提出了 TET 蛋白参与的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^[12]。他们发现 TET 蛋白在辅因子 Fe²⁺、 α -酮戊二酸和 ATP 的存在下,能够将 5mC 或 5hmC 转化成一种新的修饰碱基形式,质谱鉴定确定这种新的修饰为 5-羧基胞嘧啶。进一步

的研究显示,TDG 糖苷酶能够特异性切除 5caC,并且启动 BER 修复途径将原来的 5mC 替换成未修饰的 C,从而实现 DNA 的主动去甲基化(图 1)。同期的 *Science* 杂志上,哈佛大学张毅教授实验室也发现,TET 蛋白可以在体外将 5mC 氧化成 5fC 和 5caC^[13]。

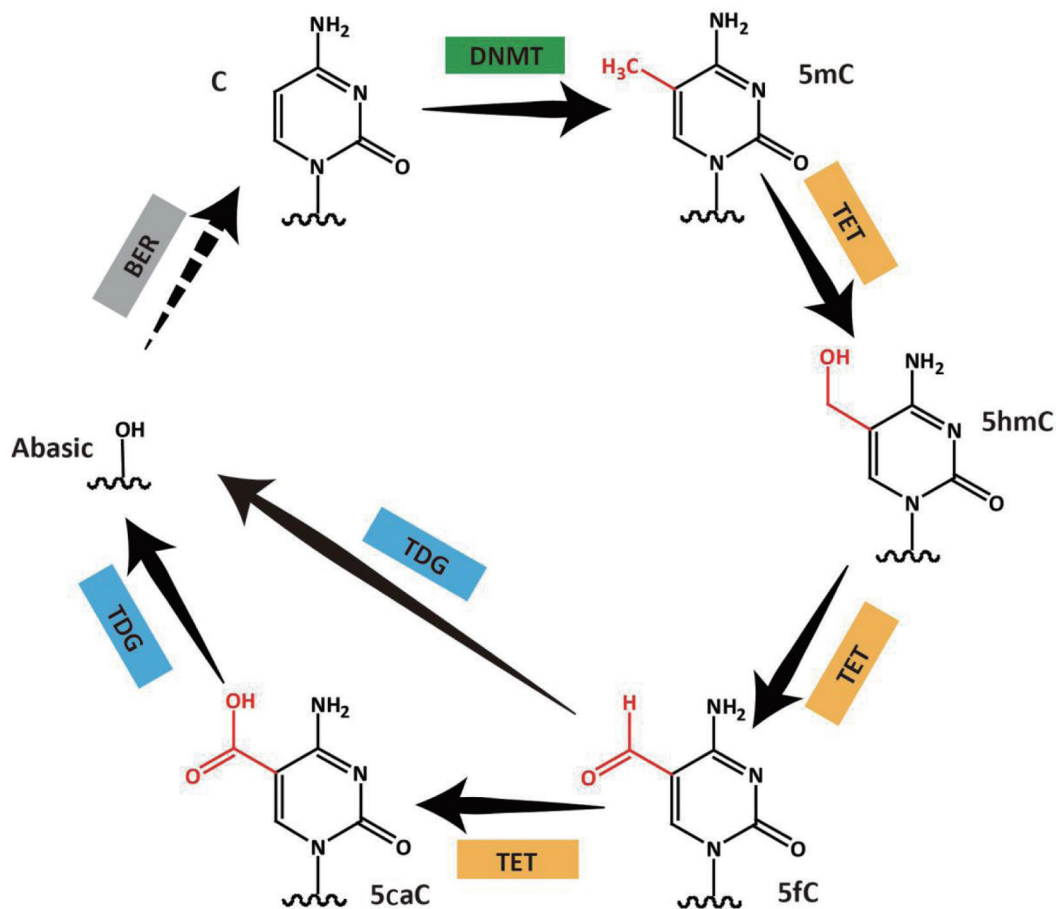
另一方面,TET 介导的氧化作用在 DNA 被动去甲基化中也发挥着作用。正常情况下,DNA 在复制过程中,如果维持性甲基转移酶 DNMT1 不能对新合成的 DNA 进行甲基化,那么 DNA 就会发生依赖于复制的被动去甲基化。比如说在合子一细胞时期,DNA 发生复制时,DNMT1 会被阻滞在胞质中,无法进入原核,从而发生被动去甲基化^[14]。Hashimoto 等^[15]研究发现,5hmC 产物不利于 DNMT1 的辅助因子 UHRF1 结合到基因组上,从而加速 DNA 甲基化的被动稀释,而且体外实验也证明,DNMT1 在复制过程中不能有效地识别 5mC 的氧化产物。

3 合子中的DNA去甲基化

2000年,Mayer 等^[16]利用免疫荧光染色的方法发现在哺乳动物发育过程中,5mC 的水平会发生剧烈的变化,卵子受精后几小时内,雄原核上的 5mC 信号会发生剧烈的降低,而雌原核上的信号则相对不变。Oswald 等^[17]利用亚硫酸氢盐测序(bisulfite sequencing)的方法发现,雄原核上一些位点上的 5mC 的确发生了部分擦除。因为此时合子 DNA 仍未发生复制,所以,这些研究充分证明了父本 DNA 的确发生了主动去甲基化。

徐国良课题组利用免疫荧光实验发现合子中雄原核上有 5hmC 的形成,PN3 时期会开始显著增加。他们发现雄原核上伴随着 5hmC 的出现,5mC 逐渐消失。而 TET 家族蛋白中只有 TET3 高表达于卵细胞内,卵子受精后 TET3 又特异性富集在雄原核上。在卵细胞中将 TET3 敲除之后,雄原核上发生了 5mC 的积累,并且一些关键的位点也无法去甲基化,如 *Nanog* 和 *Oct4* 等^[18]。这些证据说明了合子中雄原核发生了依赖于 TET3 的主动去甲基化,并且 TET3 是一种母源因子,敲除后会显著影响雌鼠的生育力。与之相对的,由于合子中维持性甲基转移酶 DNMT1 被阻滞在胞质中,无法进入细胞核进行甲基化,雌原核在受精后会发生依赖于复制的被动去甲基化。

由于传统的亚硫酸氢盐测序无法区分 5fC、



DNMT在C的第五位碳原子上加上甲基基团，形成5mC。5mC经过TET迭代氧化形成5hmC、5fC、5caC，而5fC和5caC经过DNA糖苷酶TDG切除和BER修复途径重新被还原成未修饰的C。

图1 DNA主动去甲基化途径

5caC 和未甲基化的 C，并不能确认雄原核某些位点是否真正发生了主动去甲基化。另外，在合子中主动去甲基化和被动去甲基化分别占有的比例也不甚清楚。徐国良实验室将新建立的 M.SssI-Assisted Bisulfite Sanger Sequencing 与传统的 Bisulfite Sanger Sequencing 方法相结合，证明在 TET3 介导的主动去甲基化位点处，5mC 转变成了未修饰的胞嘧啶，发生了真正的主动去甲基化，并且发现不论是雄原核还是雌原核，相对于各自的配子基因组来说，它们除了发生被动去甲基化外，确实也发生了 TET3 介导的主动去甲基化。在发生去甲基化的位点中，有些只依赖于 DNA 复制发生被动去甲基化，有些只依赖于 TET3 发生主动去甲基化，而另外一些则在 TET3 和 DNA 复制的共同作用下才会发生去甲基化。虽然在 ES 细胞中，TDG 作为 TET 的下游构成了完整的氧化去甲基化途径，但在受精卵中，TDG 并没有参与到雌雄原核的主动去甲基化过程，

说明了去甲基化途径存在背景特异性的差别，也暗示了在受精卵中 TET3 的下游可能存在其他蛋白介导了主动去甲基化^[19]。

4 TET蛋白在干细胞及重编程中的功能

小鼠胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 中可以检测到 TET1 和 TET2 的高表达，然而，在研究 TET 蛋白在 ESC 中的功能时，得到的结果却并不统一。例如研究 TET 蛋白在 ESC 自我更新及干性维持过程中，有实验室发现敲低 *Tet1* 后会降低 ESC 的自我更新及干性维持^[20]，而另外的实验室将 *Tet* 敲除之后却发现 ESC 的自我更新和干性维持并没有受到影响^[21-22]。Huang 等^[23] 研究表明，TET1 蛋白在 ESC 中倾向作用于启动子，而 TET2 则更倾向作用于高表达基因的基因体 (gene body) 和增强子。*Tet1/2* 双基因敲除 (double knockout, DKO) 之后，小鼠 ESC 仍然具有全能性，在畸胎瘤实验中可以

形成三胚层,但ESC的分化和发育能力受阻。*Tet*三基因敲除(triple knockout,TKO)的ESC中完全检测不到5hmC的存在,表型与*Tet1/2*DKO类似,仍然存在全能性,但分化和发育能力受阻^[24]。与之对应的,徐国良课题组在小鼠体内将*Tet*TKO之后,发现小鼠胚胎的原肠运动存在缺陷^[25]。

体细胞重编程是指将小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast,MEF)转变成诱导型多能干细胞(induced pluripotent stem cell,iPSC),是体外细胞命运转变的经典模型。徐国良实验室发现TET-TDG所介导的DNA主动去甲基化对细胞命运转变至关重要。*Tet1/2*DKO的MEF仍然可以产生iPS克隆,但是*Tet*TKO的MEF完全不能产生iPS克隆。进一步研究发现,TET蛋白可以通过控制miR-200家族基因来调节间充质向上皮细胞的转换(mesenchymal-to-epithelial transition,MET),进而完成重编程。在TDG缺失之后,MEF也不能发生MET。以上结果表明,TET-TDG通过DNA主动去甲基化调控miR-200家族基因的表达。而在没有TET蛋白的情况下,只要MEF能越过MET障碍,其启动子也可以通过依赖DNA复制的被动方式发生去甲基化^[22]。

5 TET在小鼠发育过程中的重要功能

TET家族蛋白的3个成员都具有氧化5mC的活性,但其在细胞和各组织中的表达谱式有很大差别,表明这3个蛋白在小鼠的发育中可能既有重叠的又分别有时空特异的生物学功能^[20]。徐国良实验室利用经典打靶技术得到*Tet1*敲除(knock out,KO)小鼠,发现这种小鼠可以存活且可育,没有明显的形态缺陷和生长异常。但这种成年小鼠海马神经前体细胞增殖能力降低,成体神经发生过程受损,导致空间学习和短期记忆能力下降。同时,*Tet1*KO使与神经前体细胞增殖及成体神经发生相关的基因启动子区发生异常的高甲基化,从而使其表达水平降低^[26]。然而,利用基因捕获技术(gene-trap mutagenesis)得到的*Tet1*突变小鼠的表型与经典的*Tet1*KO小鼠表型还是有些差异,其中雌性*Tet1*突变体表现为减数分裂过程中染色体联会存在缺陷,导致生殖细胞大量减少,生育力减弱,而雄性*Tet1*突变体的表型与*Tet1*KO小鼠的类似^[27-28]。

*Tet2*KO小鼠生存及生育均没有问题,但随着小鼠年龄的增长,小鼠造血系统会逐渐出现异常,导致髓系恶性肿瘤(myeloid malignancies)等血液疾

病的发生^[29-30]。

在研究TET3蛋白在受精卵去甲基化中的作用时,徐国良实验室发现生殖系特异性敲除*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很大部分无法正常发育至出生。而*Tet3*KO小鼠会在出生后约1d内死亡,但小鼠体型和野生型小鼠无明显差别,只是表现为不能吸奶,是否主要由于不能吃奶导致饥饿致死尚不清楚^[18]。

虽然大多数*Tet1/2*DKO小鼠可以存活且可育,但还是有很多小鼠在胚胎晚期及出生后不久发生不明原因的死亡^[31]。在胚胎发育时期,通过敲低脑部*Tet2*和*Tet3*的表达,Hahn等^[32]发现小鼠神经前体细胞向神经元的分化受到了抑制。因此可见,TET蛋白家族3个成员在小鼠的发育中可能既有重叠又分别有时空特异的生物学功能,其中TET3在小鼠发育的整个过程中作用较TET1和TET2更为重要。

为了进一步探究TET蛋白在小鼠胚胎早期发育中的功能,徐国良课题组利用生殖系特异性敲除小鼠得到*Tet*TKO胚胎,发现这种*Tet*TKO小鼠胚胎的原肠运动(gastrulation)存在缺陷,主要表现为原条(primitive streak)形成异常、轴中胚层(axial mesoderm)成熟受损、轴旁中胚层(paraxial mesoderm)不能特化,这些发育缺陷和Nodal信号通路过度激活的表型类似。检测Nodal通路后发现其拮抗蛋白Lefty1和Lefty2表达显著下调,Lefty调控元件上甲基化水平显著升高。而在*Tet*缺失遗传背景下,Nodal一条等位基因的突变或者将DNA甲基化酶*Dnmt3a*或者*Dnmt3b*敲除即可部分恢复发育缺陷,暗示TKO胚胎的原肠运动缺陷主要是由于Nodal信号通路异常激活造成的。该项工作发现了TET蛋白家族3个成员之间功能上相互协作,其介导的DNA去甲基化与DNMT介导的DNA甲基化相互拮抗,通过调控Lefty-Nodal信号通路控制胚胎原肠运动^[25]。另一方面,此项工作也证明胚胎从囊胚阶段重新建立甲基化模式的同时会发生TET介导的主动去甲基化,也就是说在早期胚胎大规模建立甲基化模式的过程中仍然会有一些位点发生去甲基化。全基因组甲基化检测(whole-genome bisulfite sequencing)表明,在*Tet*TKO胚胎中高甲基化的CpGs趋向于集中在具有调控潜能的特定基因组位点,如启动子和增强子等,进一步说明胚胎早期的正常发育需要DNA甲基化和去甲基化的动态平衡。

DNA甲基化和去甲基化的动态平衡在干细胞增殖分化和小鼠发育过程中都起着很重要的作用。

TET 通过氧化去甲基化在基因组上通过 2 种形式发挥功能 (图 2)。第一, 在一些高甲基化的位点发生去甲基化, 如在合子中, TET 通过氧化去甲基化激活 *Nanog*、*Oct4* 等一些全能性基因的表达。敲除 *Tet3* 之后, 卵子对体细胞核的重编程能力受阻^[18]。第二, TET 蛋白通过拮抗 DNMT 作用, 来维持一些位点的低甲基化状态。如在小鼠的前体神经细胞中需要 TET1 维持 *Galanin* 启动子区域的低甲基化, 敲除 *Tet1* 之后, *Galanin* 启动子甲基化程度会随着小鼠年龄的增长而逐渐增加, 导致小鼠的成体神经发生过程受阻, 小鼠空间学习和短期记忆力下降^[26]。

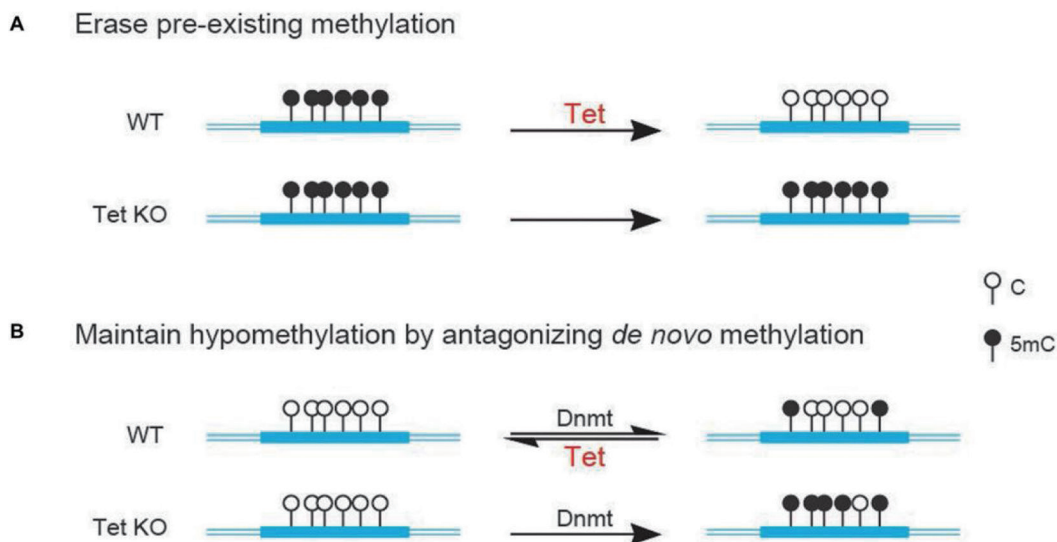
6 总结与展望

DNA 的甲基化与去甲基化对细胞命运的决定和胚胎发育的调控都起着至关重要的作用。5hmC 的发现及 TET 家族蛋白的功能研究为 DNA 主动去甲基化提出了一条完整而可信的途径, 随着人们对 TET 蛋白的深入研究, DNA 去甲基化的机制和功能也越发清晰。然而, 仍有许多重要的问题亟待解决: (1) 在合子中, 虽然 TET3 介导了雌雄原核上 DNA 氧化去甲基化的发生, 但是在缺失糖苷酶 TDG 的情况下, 并不影响 DNA 去甲基化的发生, 暗示可能存在其他的途径将 5mC 及其高级氧化产物变成未甲基化的 C; (2) 5hmC、5fC、5caC 这些氧化产物能否像 5mC 一样作为一种稳定的表观修饰存在, 调控基因的表达, 如在小鼠大脑中存在大

量 5hmC (约占 5mC 的 40%), 如果说 5hmC 只是作为 5mC 的一种氧化产物来达到去甲基化的目的, 那么为什么会有如此高比例 5hmC 的积累, 这些 5hmC 的功能是什么; (3) 在卵子受精后, 合子基因组甲基化水平会迅速地降低, 然而在这个过程中, 印记基因的甲基化状态并未发生改变, 这些位点的 5mC 为什么没有被氧化, TET 蛋白又是如何特异性选择氧化底物。后续关于 DNA 主动去甲基化的研究仍将会是这一领域的研究热点。

[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] Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 1992, 69: 915-26
- [3] Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 1992, 14: 204-20
- [4] Bostick M, Kim JK, Esteve PO, et al. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science*, 2007, 317: 1760-4
- [5] Kaneda, M, Okano M, Hata K, et al. Essential role for *de novo* DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature*, 2004, 429: 900-3
- [6] Barau J, Teissandier A, Zamudio N, et al. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. *Science*, 2016, 354: 909-12
- [7] Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in



TET通过氧化去甲基化在基因组上通过2种形式发挥功能。(A)介导一些高甲基化的位点发生去甲基化。(B)通过拮抗DNMT的作用, 来维持一些位点的低甲基化状态。

图2 DNA去甲基化过程中TET发挥作用的两种方式

- mammalian development. *Science*, 2001, 293: 1089-93
- [8] Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 1: 607-20
- [9] Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*, 2009, 324: 929-30
- [10] 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
- [11] Zhang W, Xia W, Wang Q, et al. Isoform switch of TET1 regulates DNA demethylation and mouse development. *Mol Cell*, 2016, 64: 1062-73
- [12] 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
- [13] 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
- [14] Carlson LL, Page AW, Bestor TH. Properties and localization of DNA methyltransferase in preimplantation mouse embryos: implications for genomic imprinting. *Genes Dev*, 1992, 6: 2536-41
- [15] Hashimoto H, Liu Y, Upadhyay AK, et al. Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 4841-9
- [16] Mayer W, Niveleau A, Walter J, et al. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 2000, 403: 501-2
- [17] Oswald J, Engemann S, Lane N, et al. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol*, 2000, 10: 475-8
- [18] Gu TP, Guo F, Yang H, et al. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, 2011, 477: 606-10
- [19] 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
- [20] Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 2010, 466: 1129-33
- [21] Dawlaty MM, Ganz K, Powell BE, et al. Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 166-75
- [22] 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
- [23] Huang Y, Chavez L, Chang X, et al. Distinct roles of the methylcytosine oxidases Tet1 and Tet2 in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 1361-6
- [24] Dawlaty MM, Breiling A, Le T, et al. Loss of Tet enzymes compromises proper differentiation of embryonic stem cells. *Dev Cell*, 2014, 2: 102-11
- [25] Dai HQ, Wang BA, Yang L, et al. TET-mediated DNA demethylation controls gastrulation by regulating Lefty-Nodal signalling. *Nature*, 2016, 538: 528-32
- [26] Zhang RR, Cui QY, Murai K, et al. Tet1 regulates adult hippocampal neurogenesis and cognition. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 237-45
- [27] Yamaguchi S, Hong K, Liu R, et al. Tet1 controls meiosis by regulating meiotic gene expression. *Nature*, 2012, 492: 443-7
- [28] Yamaguchi S, Shen L, Liu Y, et al. Role of Tet1 in erasure of genomic imprinting. *Nature*, 2013, 504: 460-4
- [29] Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell*, 2011, 20: 11-24
- [30] Li Z, Cai X, Cai CL, et al. Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood*, 2011, 118: 4509-18
- [31] 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
- [32] Hahn MA, Qiu R, Wu X, et al. Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine and chromatin marks in mammalian neurogenesis. *Cell Rep*, 2013, 3: 291-300