

细菌 DNA 甲基化研究进展*

张文婷 姚玉峰**

(上海交通大学医学院基础医学院免疫学与微生物学系, 上海 200025)

摘要 DNA 甲基化修饰是细菌调控基因表达的一种重要方式, 在很多生理过程中发挥非常关键的作用. 本文系统介绍了细菌 DNA 甲基化修饰的起源、DNA 甲基转移酶, 分类总结了 DNA 甲基化调控基因表达的机制. 同时对近年来细菌 DNA 甲基化的功能、DNA 甲基化检测方法的进展进行了综合评述. 这些研究对人类了解细菌 DNA 甲基化表观调控及控制细菌感染具有重要指导意义.

关键词 细菌, DNA 甲基化, 表观遗传调控, 功能, 单分子实时测序技术

学科分类号 R378, R39

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0138

表观遗传是指 DNA 序列不发生改变, 但各个基因的表达却发生了可遗传的改变. DNA 表观遗传修饰即细胞内除了遗传信息以外的可以遗传的染色质修饰, 它广泛存在于生命体的生理生化反应, 比如限制修饰系统 (restriction and modification systems, R-M systems)、DNA 复制与修复、转录、翻译等^[1], 在变化多端的宿主环境例如氧化、缺氧、营养匮乏、酸性 pH 压力下, 细菌协调性地调控基因表达尤为必要. 因此, 细菌适应性进化出表观遗传机制调控基因表达, 从而应对特定环境信号, 例如 DNA 甲基化修饰、DNA 磷硫酰化修饰^[1-2].

长期的研究结果表明, DNA 甲基转移酶调控基因表达的机制种类繁多, 由此形成了丰富多样的甲基化模式, 这有利于细菌快速适应宿主以及免疫逃逸, 对维持细菌在人体组织细胞中的定植非常关键^[3]. 面对错综复杂的环境, 大肠埃希菌 DNA 甲基转移酶介导的甲基化可以在转录和(或)转录后水平上调控基因表达. 细菌基因表达调控与 DNA 甲基化模式之间的复杂关系, 使 DNA 甲基化成为重要的表观调控方式, 发挥着多种多样的功能, 例如增加细菌毒力、增加细菌抗生素耐受以及增加细菌抗氧化能力等. 本文将对近年来细菌 DNA 甲基化

的研究新进展进行综合评述.

1 限制修饰系统

限制修饰系统(R-M systems)发现于 20 世纪 50 年代. R-M 系统是指细菌基因组 DNA 在自身甲基转移酶的作用下, 在特定位点发生甲基化修饰, 而未甲基化的 DNA 将被同源限制性内切酶切割. 因此, 细菌通过 R-M 系统可以防止内源 DNA 降解. 此外, 多数外源 DNA 缺乏特定的甲基化修饰, 会被细菌 R-M 系统的限制性内切酶切割. 由于 R-M 系统既能够防止内源 DNA 降解, 又能够保护细菌防御外源 DNA 如转座子、病毒 DNA 侵入, 从而保护自身遗传的稳定性, 因此该系统被认为是细菌的一种经典的防御机制或细菌的免疫系统^[4].

原核生物 R-M 系统分别由一个携带靶标识别域(target recognition domain, TRD)并可单独发挥功能的甲基转移酶^[5]和另一个只能与 DNA 结合的限

* 国家自然科学基金(81772140)和国家重点基础研究发展计划(973)(2015CB554203)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 021-63846590-776534, E-mail: yfyao@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2018-05-04, 接受日期: 2018-07-09

制性核酸内切酶构成^[6]。目前, R-M 系统有 4 个类型(I, II, III 和 IV)^[7], 它们之间不同之处是限制性内切酶(REase)的功能定位、甲基转移酶(MTase)的活性、是否需要特异性亚基或者其他辅因子。

Type I R-M 系统由 3 种亚基组成: S(特异性亚基), M(甲基转移酶)和 R(限制性核酸内切酶), S 亚基决定了该系统靶序列的特异性, M 亚基和 R 亚基分别是甲基化和 DNA 切割所必需的^[8]。Type II R-M 系统最为普遍, 该系统通过 2 个蛋白质(REase、MTase)发挥功能, 根据甲基化修饰位置的不同可分为 3 类: class I (N⁶- 腺嘌呤甲基化,

m6A)、class II (N⁴- 胞嘧啶甲基化, m4C)和 class III (C⁵- 胞嘧啶甲基化, m5C)^[9](图 1)。Type III R-M 系统由至少两个基因(*res* 和 *mod*)表达产物组成, Res 与限制酶的功能一样, Mod 与 DNA 结合并使之甲基化, Mod 可不依赖于 Res 单独发挥功能, 但 Mod 是 Res 活性所必需的^[10]。Type IV R-M 系统与其他 3 类不同, 它的甲基转移酶和内切酶结合起来, 形成 1 个单酶^[11-12], 且只切割已经发生修饰了的碱基(如甲基化、葡糖基-羟甲基化和羟甲基化)^[7]。

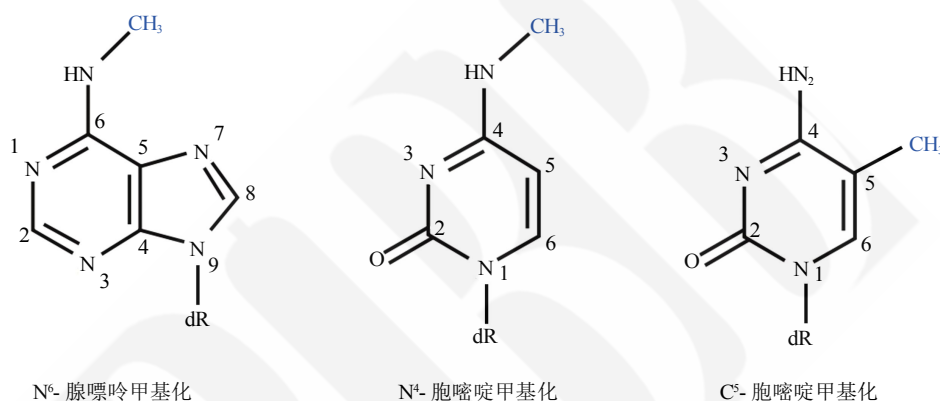


Fig. 1 Molecules related to DNA methylation

图 1 DNA 甲基化相关的碱基结构式

R-M 系统种类多、数量大, 且随着微生物的进化而不断演变。相比于其他细菌, 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)R-M 系统编码基因数量庞大, 对幽门螺杆菌基因组测序分析表明, 该细菌基因组能够编码 30 个 R-M 系统^[13], 编码基因数目达到整个基因组数目 2%^[13-14], 并且表现出具有菌株特异性的 DNA 甲基化模式^[15-16]。

Morgan 等^[17]的研究表明, Type I R-M 系统除了利用 m6A 修饰外, 还能够利用 m4C 修饰保护细菌, 而在此之前 Type I R-M 系统被认为只能发生 m6A 修饰。不同亚群之间产生 R-M 系统多样性的原因有很多, 点突变、等位基因重组以及 TRD 识别域移动等^[18]。R-M 系统的多样性对于细菌菌群之间遗传信息的传递是非常重要的^[19]。

2 细菌 DNA 甲基转移酶

细菌利用 m6A 作为主要信号进行表观基因调控, 而哺乳动物和植物主要利用 m5C 作为表观遗传信号^[20-21]。目前发现, m4C 仅在细菌中存在, 而在其他原核生物以及真核生物中不存在^[22]。

细菌以 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine, SAM)作为甲基供体, 通过两类 DNA 甲基转移酶实现 m6A、m5C 和 m4C 甲基化修饰, 一种是与 R-M 系统相关, 另一种是孤儿甲基转移酶(orphan methylase)^[23]。除了具有防御功能, R-M 系统相关甲基转移酶或孤儿甲基转移酶在细菌进化以及表观基因调控中发挥了许多其他重要的作用^[24]。

2.1 DNA 甲基转移酶的结构

现已发现 5-甲基胞嘧啶甲基转移酶有 10 个保守的氨基酸基序^[25]。1987 年, Lauster 等^[26]发现细菌 6-甲基腺嘌呤甲基转移酶也包含保守的氨基酸基序。这些研究鉴定了甲基转移酶的关键结构域, 并且发现许多保守的催化残基直接参与了酶促反应进程。此外, 早期发现的一些氨基酸基序后来也被确定是保守的甲基转移酶折叠结构的组分^[27]。

1993 年, Cheng 等^[28]首次对 DNA 甲基转移酶的结构做了解析。随后, Klimasauskas 等^[29]针对

DNA 甲基转移酶的催化机制提出了具有突破性的概念, 即甲基化反应的靶向碱基完全翻转在 DNA 双螺旋结构之外, 并且被插入到催化囊中(这一过程也叫“碱基翻转”), 这样甲基转移酶催化残基就能够接触到该碱基。这一概念强调了 DNA 结构的灵活性以及与之相伴的酶催化动力学过程。如今, 碱基翻转不但普遍存在于 DNA 甲基化反应, 而且也存在于 DNA 修复等其他反应^[30]。图 2 展示了 EcoDam DNA 甲基转移酶结构域的三维结构(修改自 Jeltsch 等^[31])。

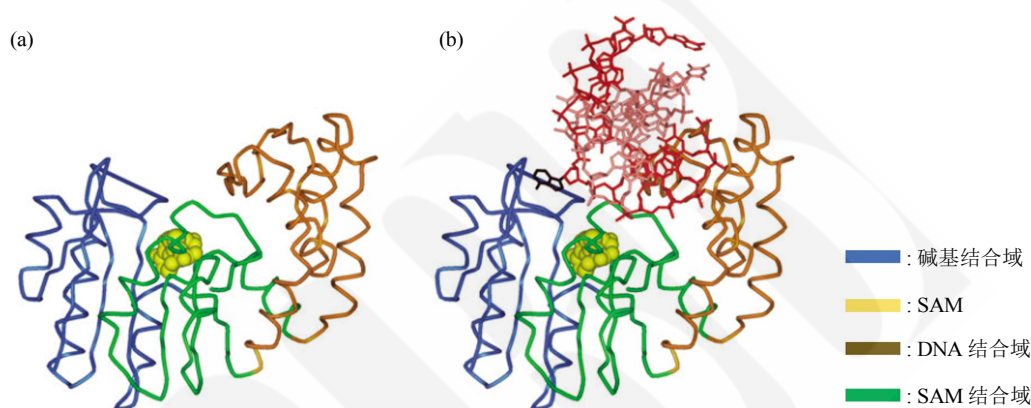


Fig. 2 3-D structure of EcoDam DNA MTase domains

图 2 DNA 腺嘌呤甲基转移酶 Dam 结构域的三维结构

(a) EcoDam-SAM 复合体结构. (b) EcoDam 与底物 DNA 结合形成的复合物结构.

2.2 R-M 系统相关的甲基转移酶

R-M 系统使用限制性内切酶识别并防止外源 DNA 侵入, 同时利用甲基转移酶保护细菌自身 DNA。幽门螺杆菌 26695 Type II S R-M 系统, 是由一个 M1. HpyA II 甲基转移酶、一个 M2. HpyA II 甲基转移酶以及一个 Type II S 内切酶 R. HpyA II 构成的^[32]。M1. HpyA II 识别并甲基化 5' GAAGA 3', M2. HpyA II 则甲基化 5' TCTTC 3'^[16], M2. HpyA II 是目前唯一发现的幽门螺杆菌的 m4C 甲基转移酶。

对致病性大肠埃希菌 O104:H4 C227-11 和 C227ΔRM(M. EcoG III 及其内切酶缺失菌株)进行转录组学分析, 结果表明在 C227 中敲除该 R-M 系统后, 部分离子转运、鞭毛合成、细胞运动性相关的必需基因的表达水平显著变化了^[33]。这表明, 甲基转移酶可以被整合到生物体的生理机能中发挥作用。除此之外, 幽门螺杆菌的甲基转移酶, 如

Type I S HPP12_0797、Type II M. Hyp I 和 M. HypIV 以及 Type III ModH 也与基因表达调控有关^[34-35]。这些表明, R-M 系统甲基转移酶发挥了除细菌防御外的其他作用。

2.3 孤儿甲基转移酶

与 R-M 系统不同的是, 孤儿甲基转移酶没有与之对应的有功能的限制性核酸内切酶。这很有可能是因为与之对应的内切酶编码基因不表达或者受突变影响, 导致无功能的表达产物^[3], 单独留下了“孤儿”甲基转移酶为表观基因组修饰做贡献。表 1 汇总了 DNA 腺嘌呤甲基化酶(DNA adenine methylase, Dam)、细胞周期调控性甲基化酶(cell cycle-regulated methylase, CcrM)和 DNA 胞嘧啶甲基化酶(DNA cytosine methylase, Dcm)等已被报道的细菌孤儿甲基化酶编码基因、靶序列、是否毒力必需等。

Table 1 Orphan methylase genes, target sequences and virulence in bacterial pathogens

表 1 细菌孤儿甲基化酶编码基因、靶序列、是否毒力必需等

细菌	孤儿甲基转移酶	靶序列	是否生存必需	是否毒力必需	参考文献
<i>Escherichia coli</i>	Dam	GATC	否	是	[36]
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Dam	GATC	否	是	[37–38]
<i>Neisseria meningitidis</i>	Dam	GATC	否	是	[39]
<i>Haemophilus influenzae</i>	Dam	GATC	否	是	[40]
<i>Shigella flexneri</i>	Dam	GATC	否	否	[41]
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Dam	GATC	否	否	[42]
<i>Vibrio cholerae</i>	Dam	GATC	是	是	[43]
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Dam	GATC	是	是	[43]
<i>Brucella abortus</i>	CcrM	GANTC	是	是	[44]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	CcrM	GANTC	是	未知	[45]
<i>Caulobacter crescentus</i>	CcrM	GANTC	是	未知	[46]
<i>Rhizobium meliloti</i>	CcrM	GANTC	是	未知	[47]
<i>Brevundimonas subvibrioides</i>	CcrM	GANTC	否	未知	[48]
<i>Vibrio cholerae</i>	VchM	RCCGGY	否	未知	[49]
<i>Escherichia coli</i>	YhdJ	ATGCAT	否	未知	[50]
<i>Escherichia coli</i>	Dcm	CC(A/T)GG	否	未知	[51]

2.3.1 Dam

Dam 是大肠埃希菌第一个被发现的孤儿甲基转移酶^[52], 蛋白质分子质量 31 ku, 以单体形式发挥功能^[53]. 当 DNA 被 Dam 催化发生甲基化修饰, 则不会被限制性内切酶 Mbo I 切割^[54–55]. *dam* 序列在包括大肠埃希菌、鼠伤寒沙门菌、灵杆菌、假结核耶尔森菌和霍乱弧菌在内的许多肠道细菌中高度保守, 除此之外, 在脑膜炎奈瑟氏球菌中也存在 *dam* 序列^[36], 而在幽门螺杆菌中未发现 *dam* 序列.

Dam 及其同源蛋白质一直是细菌表观调控最重要的范例之一. Dam 甲基化介导的基因表达调控将在本文 3.1 中介绍. Dam 介导的甲基化有多重功能, 如 DNA 错配修复、抑制转座子、调节细胞周期基因表达等^[56–59]. *dam* 缺失后基因突变率升高^[60], 许多基因表达发生改变^[61–62], 其中一部分是因为特定基因启动子甲基化状态变化了, 但大部分可能是因为细胞周期改变以及错乱的 DNA 修复所致^[63–64]. 图 3 展示了沙门菌 Dam 突变株在小鼠动物模型中表现出致病力受损^[65–67].

2.3.2 CcrM

CcrM 是另一类重要的孤儿甲基转移酶, 在新月柄杆菌(*Caulobacter crescentus*)中被首先发现. *Hinf* I 限制性内切酶可以切割未甲基化的 GANTC,

而不能切割 CcrM 催化的甲基化序列^[68]. 与 Dam 不同的是, CcrM 不是续进式的酶, Dam 在整个生命周期都一直存在, 但 CcrM 的表达只限制在染色体复制后期^[69].

CcrM 甲基转移酶对于新月柄杆菌生命周期调控非常关键. 新月柄杆菌的生命周期存在两种细胞类型, 一种分化为游动细胞, 具有运动性, 另一种分化为柄状细胞, 能够黏附细胞并复制增殖. 柄状子代细胞迅速启动 DNA 复制及细胞分裂, 而游动型子代细胞首先分化为柄状细胞才能进行复制和分裂^[70]. 在游动型细胞中, GANTC 序列被认为全部甲基化(2 条链全部甲基化), 而在柄状细胞复制过程中, DNA 变为半甲基化(只有 1 条链甲基化), 这种半甲基化状态一直保持着, 直到复制结束^[71]. 通过过表达 CcrM 保持染色体持续甲基化状态会导致细菌细胞形态以及细胞周期受损, 表明从甲基化向半甲基化过渡的暂时调控具有生物学意义^[72]. 在新月柄杆菌中, GANTC 甲基化的状态对直接影响着至少 4 个基因的转录表达: *ctrA* 和 *dnaA* 是编码细胞周期的主要调控子, *ftsZ* 和 *mipZ* 是细胞分裂所必需的^[73–74], 当然也会影响 *ccrM* 自身的表达^[75]. 顺式元件(*cis*)GANTC 从甲基化向半甲基化转变足够引起上述基因转录发生重要改变. Gonzalez 等^[70]发

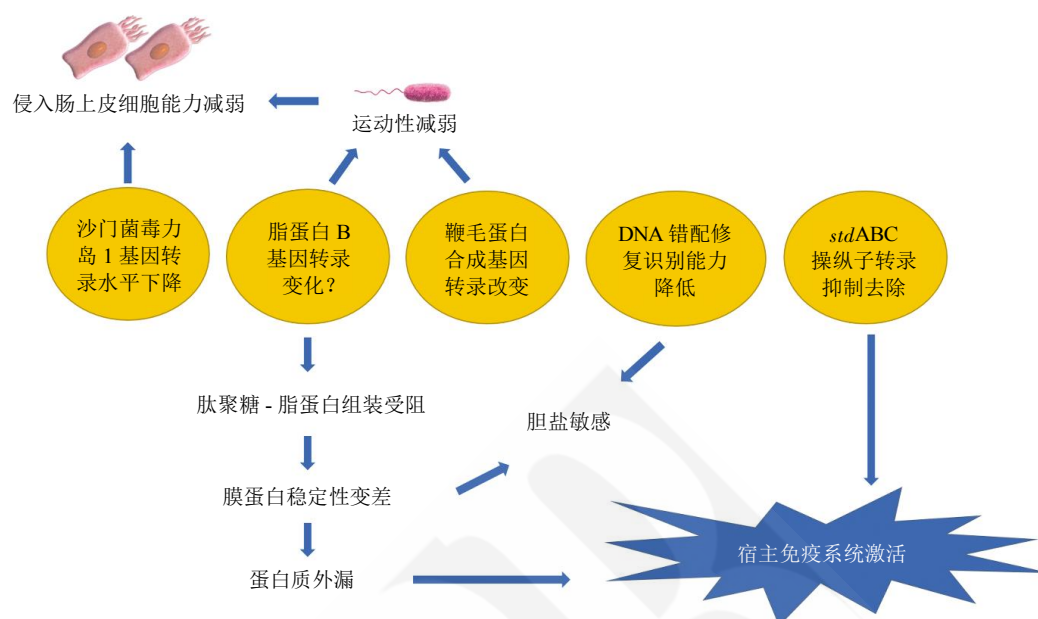


Fig. 3 Pleiotropic defects displayed by *Salmonella* *Dam*⁻ mutants in the mouse model

图3 沙门菌 *Dam* 突变株在小鼠动物模型中表现出致病力受损

现 *fisZ* 转录的升高能够回复 $\Delta ccrM$ 突变株在丰富培养基中生长受到抑制的表型，证明了新月柄杆菌 CcrM 介导的 DNA 甲基化直接激活 *fisZ* 的转录。

3 细菌 DNA 甲基化调控基因表达

DNA 甲基化介导的基因表达调控不止一种机制。DNA 甲基化通过直接的原子空间位阻效应^[24]，或者间接改变 DNA 结构进而降低双螺旋结构的热力学稳定性^[76]，从而改变 DNA 与调控蛋白质之间的相互作用^[77]，导致基因表达产生差异^[24]。同时，一些 DNA 结合蛋白也会抑制特定 DNA 序列的甲基化，例如通过与非甲基化 DNA 以高亲和力结合，从而保护特定 DNA 不被甲基化。总的来说，甲基化位点位于启动子的位置、调节蛋白质是正调控还是负调控、调节蛋白质与未甲基化 / 甲基化 DNA 靶序列位点结合的差异均会导致整体转录的抑制或者激活。事实上，DNA 甲基化介导的基因表达调控可以发生在转录、转录后水平等。

3.1 DNA 甲基化调控基因转录

pap 操纵子指导菌毛蛋白合成的相变异(phase variable)，即 Pap 激活(ON)和 Pap 抑制(OFF)，受到 *Dam* 介导的 GATC 甲基化的调控，导致不同亚群的细菌出现。GATC 甲基化对于 Lrp(leucine-

responsive regulatory protein)的结合以及 *pap* 表达是非常重要的。*pap* 操纵子有 6 个 Lrp 结合位点，在 OFF 状态时，位点 1~3 处于未甲基化，位点 4~6 处于甲基化，由于 Lrp 与未甲基化位点 1~3 有高亲和力，抑制了 RNA 聚合酶与启动子结合，从而抑制了 *papBA* 表达，从而保持未甲基化状态^[78]。当染色体复制叉经过时，Lrp 从 DNA 上解离，在 Pap I 的帮助下与甲基化位点 4~6 结合后成为半甲基化状态(母链甲基化，而新合成链未甲基化)，而此时未甲基化位点 1~3 在 *Dam* 催化下被甲基化，抑制了 Lrp 与位点 1~3 结合，引起 *pap* 表达，即 ON 状态^[79]。

沙门菌毒力质粒 pSLT *tra* 操纵子编码接合菌毛。*tra* 操纵子的激活需要转录激活因子 TraJ，而 *traJ* 的转录受到全局性转录调控因子 Lrp 的激活^[80]。*traJ* 上游激活序列有 2 个 Lrp 结合位点，其中一个 Lrp 结合位点有 GATC，由于 Lrp 对非甲基化或半甲基化 DNA 亲和力更强，当 GATC 被 *Dam* 全甲基化时，Lrp 与 *traJ* 上游激活序列的结合能力变弱，*traJ* 表达受到抑制。因此，当质粒不复制的时候，*traJ* 启动子是受到抑制的。质粒复制后，GATC 位点成为半甲基化状态，Lrp 与半甲基化的子链结合，*traJ* 表达升高^[81]。

3.2 DNA 甲基化参与基因转录后调控

Dam 介导的甲基化在转录后水平也可以调控基因表达. Campellone 等^[82]发现, 肠出血性大肠埃希氏菌 Dam 缺失后, 毒力蛋白 EspFU、Tir 和紧密连接素表达升高, 但这些蛋白质 mRNA 水平却没有变化, 表明 Dam 介导的调控作用发生在转录后阶段. López-Garrido 等^[83]的研究也表明, Dam 可能通过影响 *hilD* mRNA 稳定性, 在转录后水平上调 *hilD*, 即调控沙门菌毒力岛 1(SPI-1) 基因表达. DNA 甲基化也可能调节小非编码 RNAs (sRNA) 和反义 RNA 表达, 这会影响相应靶基因转录后的翻译过程. 例如, sRNA 可能与靶 mRNA 结合, 抑制翻译, 实现负调控, sRNA 还可能解除一些与靶 mRNA 结合的抑制翻译物, 使翻译开始^[84]. 然而这种科学假说还需要更多的实验验证.

当利用某个甲基转移酶敲除株研究 DNA 甲基化时, 需要谨慎解读所观察到的基因表达现象, 它可能是由于某一个全局性的甲基转移酶的酶活力缺失导致 DNA 损伤产生细胞压力, 从而引起间接的结果. 相反, 利用过表达甲基转移酶菌株研究其介导的基因表达调控也会导致全局基因表达的间接效果, 这可能是由于所有全甲基化 DNA 数量升高, 使 DNA 发生异常改变^[62].

4 细菌 DNA 甲基化的功能

细菌 DNA 甲基化修饰在 DNA 复制起始、错配修复、细菌毒力、耐药等方面发挥着重要功能^[56, 84]. 下文将对细菌 DNA 甲基化功能的研究进展进行归纳总结.

4.1 DNA 甲基化与 DNA 复制起始、错配修复

Dam 在 DNA 复制起始过程中发挥作用. Sugimoto 等^[85-86]的研究表明, 大肠埃希菌复制起始点 *oriC* GATC 序列甲基化频率非常高, 并且在冈崎片段附近甲基化频率也很高^[87-88]. 为了有效引发复制起始, *oriC* 和 *dnaA* 启动子区必须全部甲基化. 复制开始后, 由于半保留特性, 全部甲基化的染色体变为半甲基化(母链保持甲基化, 新合成链非甲基化). 大部分 GATC 在 Dam 催化 2~4 s 后成为甲基化状态. 然而, *oriC* 和 *dnaA* 启动子区仍然持续一段时间的半甲基化的状态, 这是因为复制起始调节蛋白 SeqA 以二聚体形式与半甲基化 DNA 结合, 负反馈调节 DNA 复制, 并依赖其他组分共同调节, 实现 DNA 复制起始的精准调控^[89]. 隔离时间持续 10 min, 为其他机制确保 DnaA 活性被除去提供了足够时间, 因此复制起始直到细胞分裂后才能再次发生^[90](图 4).

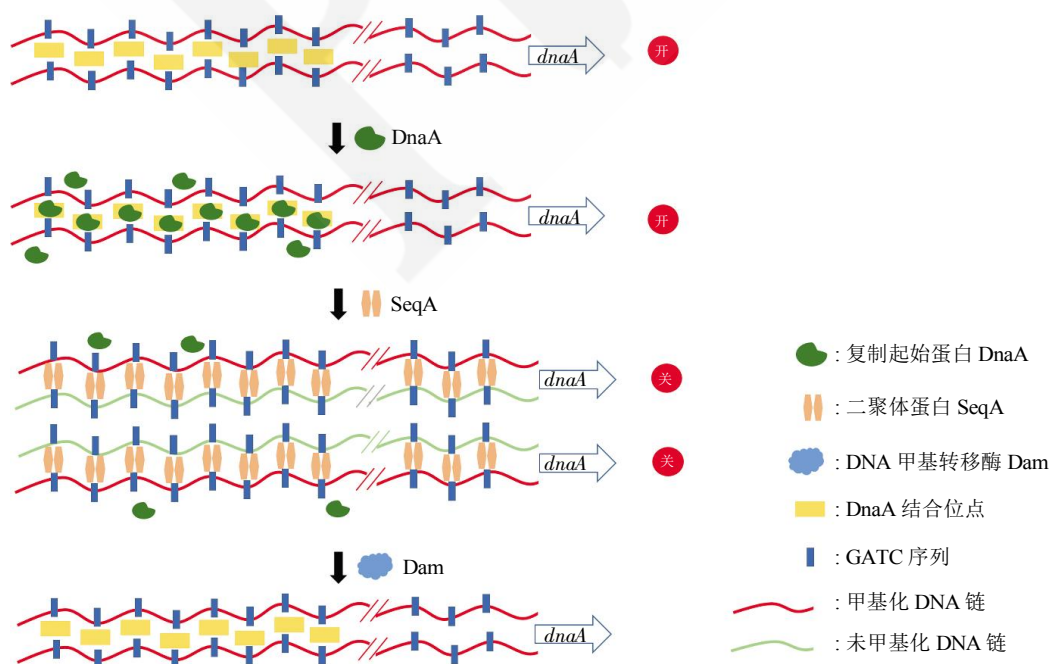


Fig. 4 The role of Dam in the DNA replication initiation

图 4 Dam 在复制起始中的作用

Dam 在复制后错配修复中也发挥作用. DNA 复制中产生的错误需要从新生成的 DNA 链中除去. 大肠埃希菌的错配修复系统能够识别非互补的碱基对, 通过定点切除和重新合成, 取代发生错配的碱基^[91]. 碱基错配(G-T)被 MutS 识别并结合, 招募 MutL 蛋白, 并与 MutH 形成三元复合物. MutH 发挥它潜在的核酸内切酶功能, 切割未甲基化的鸟嘌呤核苷酸 5'端的磷酸二酯键. 然后暴露的单链被外切酶 UvrD 降解, 直到错配被最终清除, 结果缺口处在 DNA 聚合酶 III 的催化以及单链结合蛋白、DNA 连接酶的作用下重新合成. 最后, 半甲基化的 GATC 再被 Dam 甲基化. 由于 MutH 只能在半甲基化的 DNA 序列上被激活, 过表达 Dam 会导致新生成的 DNA 链不成熟的被甲基化, 如果错配发生了, 则会阻碍 MutH 作用. 相反, Dam 缺失则导致错配识别能力降低. *dam* 酶活位点突变, 加之 *polA*、*lexA*、*recA*、*recB*、*recC* 等具有 DNA 修复功能的基因突变, 将会直接致死^[92].

4.2 DNA 甲基化与毒力

Kumar 等^[93]的研究表明, 幽门螺杆菌利用特异的 m5C 甲基化修饰信号参与调控基因表达, 在细菌运动性、黏附和毒力中起着重要作用. 而细菌 m4C 修饰除了能够防止限制性内切酶切割^[94], 其生理学意义一直不清楚. Kumar 等^[22]的研究首次发现, m4C 信号作为一个全局性表观调控因子参与了幽门螺杆菌致病机制. 蛋白质组学分析表明, m4C 修饰的缺失使许多毒力因子如 CagA、GroES、CagZ、过氧化氢酶(KatA)超氧化物歧化酶(SOD)下调, 定植关键因子如巯基过氧化物酶、铁蛋白非血红素结合蛋白、Ni/Fe 氢化酶、HslV 也下调了^[95-96]. 此外, m4C 缺失会减弱自然转化能力, 而自然转化在基因多样性、适应性进化以及毒力调控中发挥重要作用^[97-98]. 幽门螺杆菌 Type II S 甲基转移酶 M2. HpyA II 敲除后, 即 m4C 修饰消失后, 许多管家基因的表达发生了变化, 这表明 m4C 可能间接影响了细胞的生理机能, 进而影响了毒力^[22].

Wion 等^[99]的研究表明, Dam 缺失导致的 GATC 甲基化缺失, 会引起不同步的细胞分裂和毒力丧失. 沙门菌 *dam* 突变株中许多基因转录水平发生了改变, 很有可能是由于细胞表面蛋白质成分和(或)分泌蛋白质变化引起的毒力减弱^[67]. Dam 介导的甲基化通过调控其他基因转录, 间接调控关键毒力因子的表达^[100]. Kumar 等^[22, 24]认为, m4C 甲基

化修饰也可能会像大肠埃希菌和沙门菌 Dam 介导的 m6A 修饰一样间接调控基因表达.

4.3 DNA 甲基化与抗生素耐受

在产业化的生物医药产品如化学物质的滥用下, 细菌自身的生长通常会面临一系列压力胁迫. 在抗生素压力下, 细菌为了促使自身生存, 会增加许多复杂的应激反应^[101]. Cohen 等^[102]的研究表明, *dam* 敲除使大肠埃希菌对抗生素更加敏感, 通过 SMRT 技术检测到野生型大肠埃希菌在氨苄青霉素压力前后的 DNA 甲基化图谱并无明显改变, 由此推测 DNA 腺嘌呤甲基化修饰为细菌在抗生素压力下的生存提供了结构性而非调控性的保护作用. 在幽门螺杆菌敲除 m4C 甲基转移酶后, 与抗生素耐受和同源重组相关的 *mfd* 同源序列(*hp1541*)表达上调^[103].

4.4 DNA 甲基化与抗氧化

好氧生物利用分子氧进行呼吸作用从而获得能量, 同时也会伴随产生一些氧的副产物, 例如超氧离子自由基($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)、高反应性的羟自由基($OH^{\cdot}$)等活性氧产物(reactive oxygen species, ROS); 自然界中的一些因素也可以诱导细菌产生氧化压力, 比如电离辐射、近紫外辐射等. 当这些活性氧分子的浓度达到一定量时就可以诱导细胞产生响应, 损伤 DNA、脂质体、蛋白质等生物大分子^[104], 大部分的氧化损伤都来自于过氧化氢与铁离子(Fe^{2+})反应产生的羟自由基. DNA 氧化损伤可以发生在 DNA 的脱氧核糖上而导致 DNA 链的断裂, 也可以发生在核苷酸的碱基上面而使碱基受到氧化损伤. 在组成 DNA 的 4 种碱基中, 鸟嘌呤因其自身较低的还原电势而比其他 3 种碱基更易被氧化^[105].

因此, 微生物必须拥有防御机制, 既保持氧气衍生的自由基在可接受的浓度范围, 又要修复因氧化造成的损伤. 除了一些非酶和酶类的抗氧化分子, 面对氧化压力, 细菌还可以采取遗传上的响应.

Yallaly 等^[106]发现, 与野生型相比, Dam 酶活力缺陷菌对 H_2O_2 会更加敏感, 表现在缺陷菌的存活率降低. 然而, 在使用了 pGG503 质粒(用于过表达 Dam)后, 他们发现过表达 Dam 并没有增强野生型大肠埃希菌对 H_2O_2 抵抗力, 反而使菌株对 H_2O_2 更加敏感了. 他们推测, 可能是合适量的 Dam, 保护了细菌免受氧化、辐照压力, 赋予细菌一定的损伤修复能力.

4.5 DNA 甲基化的其他功能

m4C 甲基化修饰能够增加幽门螺杆菌黏附人胃腺癌细胞比率, 敲除了 m4C 甲基转移酶编码基因 *M2.hpyA II* 后, 与野生型相比, 幽门螺杆菌黏附率降低了 50%, 这可能与 m4C 调节 O 抗原的表达相关。幽门螺杆菌 m4C 甲基化还会进一步诱导人胃腺癌细胞凋亡, m4C 甲基化的缺失会导致幽门螺杆菌诱导的人胃腺癌细胞凋亡程度显著降低^[22]。

5 DNA 甲基化的检测方法

5.1 检测 DNA 整体水平与特定碱基甲基化

DNA 甲基化的检测方法按照原理可分为两类: 一是用甲基化敏感的限制性内切酶鉴定 DNA 序列的甲基化状态, 例如 Mbo I 能够切割未甲基化的 GATC, 可以用来比较不同样品基因组 DNA 甲基化的整体差异^[107]; 二是用亚硫酸钠处理甲基化的 DNA, 经 PCR 及测序技术鉴定序列差异性^[108-111], 未甲基化的胞嘧啶经亚硫酸钠处理会变为尿嘧啶, 在 PCR 测序过程中会被读成胸腺嘧啶, 但甲基化的胞嘧啶不受影响。这个方法的缺点是不能够检测腺嘌呤甲基化。除此以外, Xiao 等^[112]使用变性高效液相色谱 (denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC) 分析 DNA 分子, 检测基因组甲基化的整体水平, Deng 等^[113]使用 DHPLC 与 PCR 联用的技术检测了基因组的甲基化程度。m6A 的鉴定可以用放射性同位素 [³H] 标记的 SAM 在特定甲基转移酶的作用下与 DNA 反应, 随后显影以及对单个位点进行测序^[5, 114]; 也可以用免疫化学法如单克隆抗体 anti-m6A、anti-m4C 检测特定位点的甲基化^[115], 如 Kumar 等^[22]使用 anti-m4C 抗体检测幽门螺杆菌 26695 野生型和 $\Delta R-M2$ 突变株中 m4C 碱基修饰的差异。

5.2 绘制全基因组 DNA 甲基化图谱

传统的检测方法具有局限性, 不仅费时费力, 而且不能够对全基因组甲基化进行分析。近几年, 随着单分子实时 DNA 测序技术 (single molecule real-time, SMRT) 的快速发展与应用, 使得在全基因组水平上分析 DNA 甲基化图谱得以实现, 它能够直接、同时检测 m6A、m5C 和 m4C^[116]。SMRT 技术利用荧光标记的核苷酸边合成边测序, 通过两种动力学参数, PW (pulse width) 和 IPD (interpulse duration), 反映每一种 dNTP 在 DNA 聚合酶作用下聚合的速率^[117]。PW 是指脉冲宽度, 源于核苷酸聚合信号; IPD 是指 2 次连续脉冲的间隔时间, 每

一个核苷酸的 PW 和 IPD 都具有特异性。当 DNA 聚合酶遇到模板链的修饰甲基如 m6A、m5C 或者 5-羟甲基胞嘧啶时, dNTP 聚合的速率就会发生改变, PW 和 IPD 相应改变。运用这两种动力学参数能够鉴定出特定 DNA 模板碱基修饰的类型以及位置。这一技术的主要优势在于它能够对整个基因组创造出 m6A、m5C 等检测信号。

利用 SMRT 技术可以确定野生型和某种感兴趣的甲基转移酶突变株的甲基化图谱, 如此就能发现 DNA 甲基转移酶许多新的特征, 如新的识别位点^[118]。研究甲基化图谱极大增强了我们深入获得并了解 R-M 系统多样性甚至是甲基转移酶潜在作用的能力。当然鉴定只是为了发现甲基化的存在, 而甲基化的生理学意义才是这些技术得以进步的驱动力。

6 展 望

甲基转移酶是如何在分子水平上表观调控基因表达的? 这里还有许多问题需要一一解答。例如, 编码区 DNA 甲基化是如何影响转录或者翻译的? 是否甲基转移酶调控基因表达都通过大肠埃希菌 Dam 类似的机制? 在转录/翻译调控中有哪些其他的调节蛋白质与甲基转移酶相互作用? 编码链甲基化与模板链甲基化调控有什么区别以及背后的机制是什么? 越来越多的研究表明, 细菌 DNA 甲基化可以在转录和(或)转录后水平上调控基因表达, 这其中包含的许多复杂的分子机制还有待于探索。如果甲基转移酶在细菌毒力调控中发挥重要作用, 那么将其作为新的抗感染靶点在未来将会备受关注。

我实验团队前期筛选到了一些与鼠伤寒沙门菌抗氧化表型相关的 DNA 甲基转移酶, 结合单分子实时测序技术, 研究沙门菌 DNA 甲基化修饰的抗氧化功能; 同时我们发现, 沙门菌毒力调控蛋白的甲基化修饰是广泛存在的, 通过质谱技术, 鉴定到了甲基化位点, 并筛选了这些甲基化修饰位点可能的甲基转移酶, 研究其在沙门菌毒力调控中的作用 (未发表的研究数据)。这些研究将有助于我们更好地理解细菌 DNA 表观修饰、蛋白质翻译后修饰的功能及它们之间可能存在的联系。

不同生物学条件、不同时间点下甲基转移酶具有多样性, 而 SMRT 在甲基化比较组学研究中具有快捷、方便的优势, 因此能够检测不同条件下样品的甲基化水平; 结合 SMRT 等技术, 获得细菌全基因组甲基化位点及精准分布、特定甲基转移酶

相关基因表达的特征,将有助于解释在细菌感染过程中甲基化图谱以及甲基转移酶相关基因是怎样变化的,从而有助于更好地理解DNA甲基化和甲基转移酶在细菌致病机制中的作用;由于菌株之间甲基化图谱的显著差异性,在未来,SMRT可以用来研究不同菌株“表观基因型”与疾病发生之间的联系;也可以将DNA甲基化图谱作为新的生物标志,预测疾病风险(如胃癌风险评估);此外,细菌甲基化图谱也是分析细菌耐药、细菌抗氧化的有利工具.综上所述,更进一步研究DNA甲基化图谱及甲基转移酶功能将会揭开细菌致病机制的许多秘密.甲基化图谱作为新的生物学标志,为疾病预测、细菌耐药、细菌抗氧化领域打开新的大门^[3].

参 考 文 献

- [1] Yang Y, Xu G, Liang J, *et al.* DNA backbone sulfur-modification expands microbial growth range under multiple stresses by its anti-oxidation function. *Scientific Reports*, 2017, **7**(1): 3516–3524
- [2] Shell S S, Prestwich E G, Baek S H, *et al.* DNA methylation impacts gene expression and ensures hypoxic survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *Plos Pathogens*, 2013, **9** (7): 1046–1060
- [3] Gorrell R, Kwok T. The *Helicobacter pylori* methylome: roles in gene regulation and virulence. *Current Topics in Microbiology & Immunology*, 2017, **400**(1): 105–127
- [4] Gorrell R, Kwok T. The *Helicobacter pylori* methylome: roles in gene regulation and virulence. Springer International Publishing, 2017
- [5] Bächli B, Reiser J, Pirrotta V. Methylation and cleavage sequences of the EcoP1 restriction-modification enzyme. *Journal of Molecular Biology*, 1979, **128**(2): 143–163
- [6] Meisel A, Mackeldanz P, Bickle T A, *et al.* Type III restriction endonucleases translocate DNA in a reaction driven by recognition site-specific ATP hydrolysis. *Embo Journal*, 1995, **14**(12): 2958–2966
- [7] Roberts R J, Belfort M, Bestor T, *et al.* A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Research*, 2003, **31**(7): 1805–1812
- [8] Murray N E. Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a Legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, **64**(2): 412–434
- [9] Murphy J, Mahony J, Ainsworth S, *et al.* Bacteriophage orphan DNA methyltransferases: insights from their bacterial origin, function, and occurrence. *Applied & Environmental Microbiology*, 2013, **79**(24): 7547–7555
- [10] Bickle T A, Krüger D H. Biology of DNA restriction. *Microbiological Reviews*, 1993, **57**(2): 434–450
- [11] Lepikhov K, Tchernov A, Zheleznaia L, *et al.* Characterization of the type IV restriction modification system BspLU11III from *Bacillus* sp. LU11. *Nucleic Acids Research*, 2001, **29** (22): 4691–4698
- [12] Janulaitis A, Petrusyte M, Maneliene Z, *et al.* Purification and properties of the Eco57I restriction endonuclease and methylase—prototypes of a new class (type IV). *Nucleic Acids Research*, 1992, **20**(22): 6043–6049
- [13] Roberts R J, Vincze T, Posfai J, *et al.* REBASE—enzymes and genes for DNA restriction and modification. *Nucleic Acids Research*, 2007, **35**(Database issue): 269–270
- [14] Oh J D, Kling-Bäckhed H, Giannakis M, *et al.* The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(26): 9999–10004
- [15] Furuta Y, Nambafukuyo H, Shibata T F, *et al.* Methylome diversification through changes in DNA methyltransferase sequence specificity. *Plos Genetics*, 2014, **10**(4): e1004272
- [16] Krebs J, Morgan R D, Bunk B, *et al.* The complex methylome of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Research*, 2014, **42**(4): 2415–2432
- [17] Morgan R D, Luyten Y A, Johnson S A, *et al.* Novel m4C modification in type I restriction-modification systems. *Nucleic Acids Research*, 2016, **44**(19): 9413–9425
- [18] Furuta Y, Kobayashi I. Mobility of DNA sequence recognition domains in DNA methyltransferases suggests epigenetics-driven adaptive evolution. *Mobile Genetic Elements*, 2012, **2**(6): 292–296
- [19] Humbert O. Characterization of *Helicobacter pylori* factors that control transformation frequency and integration length during inter-strain DNA recombination. *Molecular Microbiology*, 2011, **79**(2): 387–401
- [20] Kim J K, Samaranyake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 2009, **66** (4): 596–612
- [21] Vanyushin B F, Ashapkin V V. DNA methylation in higher plants: past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 2011, **1809**(8): 360–368
- [22] Kumar S, Karmakar B C, Nagarajan D, *et al.* N4-cytosine DNA methylation regulates transcription and pathogenesis in *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Research*, 2018, **46** (7): 3429–3445
- [23] Wion D, Casadesús J. N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, **4**(3): 183–192
- [24] Sánchezromero M A, Cota I, Casadesús J. DNA methylation in bacteria: from the methyl group to the methylome. *Current Opinion in Microbiology*, 2015, **25**(1): 9–16
- [25] Posfai J, Bhagwat A S, Posfai G, *et al.* Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucleic Acids Research*, 1989, **17**(7): 2421–2435
- [26] Lauster R, Kriebardis A, Guschlbauer W. The GATATC-modification enzyme EcoRV is closely related to the GATC-recognizing methyltransferases Dpn II and dam from *E. coli* and phage T4. *FEBS Letters*, 1987, **220**(1): 167–176

- [27] Malone T, Blumenthal R M, Cheng X. Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyl-transferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes. *Journal of Molecular Biology*, 1995, **253** (4): 618-632
- [28] Cheng X, Kumar S, Posfai J, *et al.* Crystal structure of the HhaI DNA methyltransferase complexed with S-adenosyl-L-methionine. *Cell*, 1993, **74**(2): 299-307
- [29] Klimasauskas S, Kumar S, Roberts R J, *et al.* HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell*, 1994, **76** (2): 357-369
- [30] Roberts R J. On base flipping. *Cell*, 1995, **82**(1): 9-12
- [31] Jeltsch A, Jurkowska R Z. DNA Methyltransferases - Role and Function [M]. Springer International Publishing, 2016
- [32] Lin L F, Posfai J, Roberts R J, *et al.* Comparative genomics of the restriction-modification systems in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(5): 2740-2745
- [33] Fang G, Munera D, Friedman D I, *et al.* Genome-wide mapping of methylated adenine residues in pathogenic *Escherichia coli* using single-molecule real-time sequencing. *Nature Biotechnology*, 2012, **30**(12): 1232
- [34] Skoglund A, Björkholm B, Nilsson C, *et al.* Functional analysis of the MHPyAIV DNA methyltransferase of *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*, 2007, **189**(24): 8914-8921
- [35] Donahue J P, Israel D A, Torres V J, *et al.* Inactivation of a *Helicobacter pylori* DNA methyltransferase alters dnaK operon expression following host-cell adherence. *Fems Microbiology Letters*, 2002, **208**(2): 295-301
- [36] Low D A, Weyand N J, Mahan M J. Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence. *Infection & Immunity*, 2001, **69**(12): 7197-7204
- [37] Heithoff D M, Enioutina E Y, Daynes R A, *et al.* *Salmonella* DNA adenine methylase mutants confer cross-protective immunity. *Infection & Immunity*, 2001, **69**(11): 6725-6730
- [38] Chatti A, Daghfous D, Landoulsi A. Effect of repeated *in vivo* passage (in mice) on *Salmonella* Typhimurium *dam* mutant virulence and fitness. *Pathologie-biologie*, 2008, **56**(3): 121-124
- [39] Bucci C, Lavitola A, P, Del G L, *et al.* Hypermutation in pathogenic bacteria: frequent phase variation in meningococci is a phenotypic trait of a specialized mutator Biotype. *Molecular Cell*, 1999, **3**(4): 435-445
- [40] Jr M E W, Jarisch J, Smith A L. Inactivation of deoxyadenosine methyltransferase (*dam*) attenuates *Haemophilus influenzae* virulence. *Molecular Microbiology*, 2010, **53**(2): 651-664
- [41] Honma Y, Fernández R E, Maurelli A T. A DNA adenine methylase mutant of *Shigella flexneri* shows no significant attenuation of virulence. *Microbiology*, 2004, **150**: 1073-1078
- [42] James A E, Rogovskyy A S, Crowley M A, *et al.* Characterization of a DNA Adenine methyltransferase gene of *Borrelia hermslandi* and its dispensability for murine infection and persistence. *Plos One*, 2016, **11**(5): e0155798
- [43] Julio S M, Heithoff D M, Provenzano D, *et al.* DNA adenine methylase is essential for viability and plays a role in the pathogenesis of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Vibrio cholerae*. *Infection & Immunity*, 2001, **69**(12): 7610-7615
- [44] Robertson G T, Reisenauer A, Wright R, *et al.* The *Brucella abortus* CcrM DNA methyltransferase is essential for viability, and its overexpression attenuates intracellular replication in murine macrophages. *Journal of Bacteriology*, 2000, **182**(12): 3482-3489
- [45] Kahng L S, Shapiro L. The CcrM DNA methyltransferase of *Agrobacterium tumefaciens* is essential, and its activity is cell cycle regulated. *Journal of Bacteriology*, 2001, **183**(10): 3065-3075
- [46] Stephens C, Reisenauer A, Wright R, *et al.* A cell cycle-regulated bacterial DNA methyltransferase is essential for viability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(3): 1210-1214
- [47] Wright R, Stephens C, Shapiro L. The CcrM DNA methyltransferase is widespread in the alpha subdivision of proteobacteria, and its essential functions are conserved in *Rhizobium meliloti* and *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**(18): 5869-5877
- [48] Curtis P D, Brun Y V. Identification of essential alphaproteobacterial genes reveals operational variability in conserved developmental and cell cycle systems. *Molecular Microbiology*, 2014, **93**(4): 713-735
- [49] Banerjee S, Chowdhury R. An orphan DNA (cytosine-5-)-methyltransferase in *Vibrio cholerae*. *Microbiology*, 2006, **152**(Pt 4): 1055-1062
- [50] Broadbent S E, Balbontin R, Casades J, *et al.* YhdJ, a nonessential CcrM-like DNA methyltransferase of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, 2007, **189**(11): 4325-4327
- [51] Brunovsky P, Kme' T. Conservation of Dcm-mediated cytosine DNA methylation in *Escherichia coli*. *Fems Microbiology Letters*, 2012, **328**(1): 78-85
- [52] Marinus M G, Morris N R. Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 1973, **114**(3): 1143-1150
- [53] Herman G E, Modrich P. *Escherichia coli dam* methylase. Physical and catalytic properties of the homogeneous enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 1982, **257**(5): 2605-2612
- [54] Lacks S, Greenberg B. Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *Journal of Molecular Biology*, 1977, **114**(1): 153-168
- [55] Dreiseikelmann B, Eichenlaub R, Wackernagel W. The effect of differential methylation by *Escherichia coli* of plasmid DNA and phage T7 and lambda DNA on the cleavage by restriction endonuclease MboI from *Moraxella bovis*. *Bba*, 1979, **562** (3): 418-428
- [56] Casades J, Low D. Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiology & Molecular Biology Reviews* Mmbr, 2006, **70**(3): 830-856
- [57] Kedar G C, Ozcan F, Guzmán E C, *et al.* Role of DNA methylation at GATC sites in the *dnaA* promoter, *dnaAp2*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2000, **2**(3): 301-310

- [58] Iyer R R, Pluciennik A, Burdett V, *et al.* DNA Mismatch Repair: functions and mechanisms. *Cheminform*, 2006, **37**(20): 302–323
- [59] Wallecha A, Munster V, Correnti J, *et al.* Dam- and OxyR-dependent phase variation of *agn43*: essential elements and evidence for a new role of DNA methylation. *Journal of Bacteriology*, 2002, **184**(12): 3338–3347
- [60] Bale A, D'alarcao M, Marinus M G. Characterization of DNA adenine methylation mutants of *Escherichia coli* K12. *Mutation Research*, 1979, **59**(2): 157–165
- [61] Robbinsmanke J L, Zdravski Z Z, Marinus M, *et al.* Analysis of global gene expression and double-strand-break formation in DNA adenine methyltransferase- and mismatch repair-deficient *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2005, **187**(20): 7027–7037
- [62] LBner-Olesen A, Marinus M, Hansen F. Role of SeqA and Dam in *Escherichia coli* gene expression: a global/microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(8): 4672–4677
- [63] Brunet Y R, Bernard C S, Gavioli M, *et al.* An epigenetic switch involving overlapping fur and DNA methylation optimizes expression of a type VI secretion gene cluster. *Plos Genetics*, 2011, **7**(7): e1002205
- [64] Haagmans W, Van D W M. Phase variation of Ag43 in *Escherichia coli*: Dam-dependent methylation abrogates OxyR binding and OxyR-mediated repression of transcription. *Molecular Microbiology*, 2000, **35**(4): 877–887
- [65] García-Del P F, Pucciarelli M G, Casadesús J. DNA adenine methylase mutants of *Salmonella* Typhimurium show defects in protein secretion, cell invasion, and M cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(20): 11578–11583
- [66] Prieto A I, Ramos-Morales F, Casadesús J. Bile-induced DNA damage in *Salmonella enterica*. *Genetics*, 2004, **168**(4): 1787–1794
- [67] Pucciarelli M G, Prieto A I, Casadesús J, *et al.* Envelope instability in DNA adenine methylase mutants of *Salmonella enterica*. *Microbiology*, 2002, **148**(4): 1171–1182
- [68] Zweiger G, Marczyński G, Shapiro L A. *Caulobacter* DNA methyltransferase that functions only in the predivisional cell. *Journal of Molecular Biology*, 1994, **235**(2): 472–485
- [69] Albu R F, Jurkowski T P, Jeltsch A. The *Caulobacter crescentus* DNA-(adenine-N6)-methyltransferase CcrM methylates DNA in a distributive manner. *Nucleic Acids Research*, 2012, **40**(4): 1708–1716
- [70] Gonzalez D, Kozdon J B, Mcadams H H, *et al.* The functions of DNA methylation by CcrM in *Caulobacter crescentus*: a global approach. *Nucleic Acids Research*, 2014, **42**(6): 3720–3735
- [71] Marczyński G T. Chromosome methylation and measurement of faithful, once and only once per cell cycle chromosome replication in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, 1999, **181**(7): 1984–1993
- [72] Stephens C, Reisenauer A, Wright R, *et al.* A cell cycle-regulated bacterial DNA methyltransferase is essential for viability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(3): 1210–1214
- [73] Collier J, Mcadams H H, Shapiro L A. DNA methylation ratchet governs progression through a bacterial cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(43): 17111–17116
- [74] Reisenauer A, Shapiro L. DNA methylation affects the cell cycle transcription of the CtrA global regulator in *Caulobacter*. *Embo Journal*, 2002, **21**(18): 4969–4977
- [75] Stephens C M, Zweiger G L. Coordinate cell cycle control of a *Caulobacter* DNA methyltransferase and the flagellar genetic hierarchy. *Journal of Bacteriology*, 1995, **177**(7): 1662–1669
- [76] Diekmann S. DNA methylation can enhance or induce DNA curvature. *Embo Journal*, 1987, **6**(13): 4213–4217
- [77] Polaczek P, Kwan K, Campbell J L. GATC motifs may alter the conformation of DNA depending on sequence context and N6-adenine methylation status: possible implications for DNA-protein recognition. *Molecular & General Genetics Mgg*, 1998, **258**(5): 488–493
- [78] Wion D, Casadesús J. N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, **4**(3): 183–192
- [79] Adhikari S, Curtis P D. DNA methyltransferases and epigenetic regulation in bacteria. *Fems Microbiology Reviews*, 2016, **40**(5): 575–591
- [80] Camacho E M, Casadesús J. Regulation of *traJ* transcription in the *Salmonella* virulence plasmid by strand-specific DNA adenine hemi-methylation. *Molecular Microbiology*, 2010, **57**(6): 1700–1718
- [81] Low D A, Casadesús J. Clocks and switches: bacterial gene regulation by DNA adenine methylation. *Current Opinion in Microbiology*, 2008, **11**(2): 106–112
- [82] Campellone K, Roe A, Lobner-Olesen A, *et al.* Increased adherence and actin pedestal formation by *dam*-deficient *Enterohaemorrhagic Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Microbiology*, 2007, **63**(5): 1468–1481
- [83] López-Garrido J, Casadesús J. Regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by DNA adenine methylation. *Genetics*, 2010, **184**(3): 637–649
- [84] Marinus M G, Casadesús J. Roles of DNA adenine methylation in host & pathogen interactions: mismatch repair, transcriptional regulation, and more. *Fems Microbiology Reviews*, 2009, **33**(3): 488–503
- [85] Sugimoto K, Oka A, Sugisaki H, *et al.* Nucleotide sequence of *Escherichia coli* K-12 replication origin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**(2): 575–579
- [86] Meijer M, Beck E, Hansen F G, *et al.* Nucleotide sequence of the origin of replication of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**(2): 580–584
- [87] Gomezeichmann M C, Lark K G, Endo R. DpnI restriction of *Escherichia coli* DNA synthesized *in vitro* Evidence that the ends of Okazaki pieces are determined by template deoxynucleotide sequence. *Journal of Molecular Biology*, 1977, **117**(3): 621–635
- [88] Marinus M G. Adenine methylation of Okazaki fragments in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1976, **128**(3): 853–854
- [89] Kang S, Lee H, Han J S, *et al.* Interaction of SeqA and Dam

- methylase on the hemi-methylated origin of *Escherichia coli* chromosomal DNA replication. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**(17): 11463–11468
- [90] Boye E, Løbner-orelsen A, Skarstad K. Limiting DNA replication to once and only once. *Embo Reports*, 2000, **1**(6): 479–483
- [91] Doutriaux M P, Wagner R, Radman M. Mismatch-stimulated killing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**(8): 2576–2578
- [92] Marinus M G, Morris N R. Biological function for 6-methyladenine residues in the DNA of *Escherichia coli* K12. *Journal of Molecular Biology*, 1974, **85**(2): 309–322
- [93] Kumar R, Mukhopadhyay A K, Ghosh P, *et al.* Comparative transcriptomics of *H. pylori* strains AM5, SS1 and their *hpyAVIBM* deletion mutants: possible roles of cytosine methylation. *Plos One*, 2012, **7**(8): e42303
- [94] Chung D, Farkas J, Huddleston J R, *et al.* Methylation by a unique α -class N4-Cytosine methyltransferase is required for DNA transformation of *Caldicellulosiruptor bescii* DSM6725. *Plos One*, 2012, **7**(8): e43844
- [95] Wang G, Olczak A A, Walton J P, *et al.* Contribution of the *Helicobacter pylori* thiol peroxidase bacterioferritin comigratory protein to oxidative stress resistance and host colonization. *Infection & Immunity*, 2005, **73**(1): 378–384
- [96] Du R J, Ho B. Surface localized heat shock protein 20 (HslV) of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 2003, **8**(4): 257–267
- [97] Baltrus D A, Guillemin K, Phillips P C. Natural transformation increases the rate of adaptation in the human pathogen *Helicobacter pylori*. *Evolution*, 2008, **62**(1): 39–49
- [98] Dorer M S, Cohen I E, Sessler T H, *et al.* Natural competence promotes *Helicobacter pylori* Chronic Infection. *Infection & Immunity*, 2013, **81**(1): 209–215
- [99] Wion D, Casadesús J. N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, **4**(3): 183–192
- [100] Marinus M G, Casadesús J. Roles of DNA adenine methylation in host-pathogen interactions: mismatch repair, transcriptional regulation, and more. *Fems Microbiology Reviews*, 2009, **33**(3): 488–503
- [101] Laureti L, Matic I, Gutierrez A. Bacterial responses and genome instability induced by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Antibiotics*, 2013, **2**(1): 100–114
- [102] Cohen N R, Ross C A, Jain S, *et al.* A role for the bacterial GATC methylome in antibiotic stress survival. *Nature Genetics*, 2016, **48**(5): 581–587
- [103] Dorer M S, Sessler T H, Salama N R. Recombination and DNA repair in *Helicobacter pylori*. *Annual Review of Microbiology*, 2011, **65**(65): 329–348
- [104] Imlay J A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, **11**(7): 443–454
- [105] Steen Steenken A, Jovanovic S V. How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, **119**(3): 617–618
- [106] Yallaly P, Eisenstark A. Influence of DNA adenine methylase on the sensitivity of *Escherichia coli* to near-ultraviolet radiation and hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, **169**(1): 64–69
- [107] Heithoff D M, Sinsheimer R L, Low D A, *et al.* An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science*, 1999, **284**(5416): 967–970
- [108] Costello J F, Plass C. Methylation matters. *Journal of Medical Genetics*, 2001, **38**(5): 285–303
- [109] Grunau C, Clark S J, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Research*, 2001, **29**(13): 65–71
- [110] Frommer M, McDonald L E, Millar D S, *et al.* A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(5): 1827–1831
- [111] Herman J G, Graff J R, Myöhänen S, *et al.* Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(18): 9821–9826
- [112] Xiao W, Oefner P J. Denaturing high-performance liquid chromatography: a review. *Human Mutation*, 2001, **17**(6): 439–474
- [113] Deng D, Deng G, Lü Y. Analysis of the methylation in CpG island by denaturing high-performance liquid chromatography. *National Medical Journal of China*, 2001, **81**(3): 158–161
- [114] Bitinaite J, Maneliene Z, Menkevicius S, *et al.* Alw26I, Eco31I and Esp31I-type IIs methyltransferases modifying cytosine and adenine in complementary strands of the target DNA. *Nucleic Acids Research*, 1992, **20**(19): 4981–4985
- [115] Oakeley E J, Podestà A, Jost J P. Developmental changes in DNA methylation of the two tobacco pollen nuclei during maturation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(21): 11721–11725
- [116] Clark T A, Murray I A, Morgan R D, *et al.* Characterization of DNA methyltransferase specificities using single-molecule, real-time DNA sequencing. *Nucleic Acids Research*, 2012, **40**(4): e29
- [117] Kozdon J B, Melfi M D, Luong K, *et al.* Global methylation state at base-pair resolution of the *Caulobacter* genome throughout the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(48): 4658–4667

Research Progress on Bacterial DNA Methylation*

ZHANG Wen-Ting, YAO Yu-Feng**

(Department of Microbiology and Immunology, Institutes of Medical Sciences, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China)

Abstract DNA methylation is a robust type of gene regulation and plays an important role in physiological processes. This review summarizes the origin of DNA methylation in bacteria, DNA methyltransferases, transcriptional and post-transcriptional regulatory mechanisms by DNA methylation, comments on research progress on DNA methylation functions as well as detection methods. The achievements will be significant for understanding bacterial epigenetic regulation and controlling bacterial infections in the future.

Key words bacteria, DNA methylation, epigenetic regulation, functions, SMRT

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0138

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81772140) and National Basic Research Program of China (2015CB554203).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-63846590-776534, E-mail: yfyao@sjtu.edu.cn

Received: May 4, 2018 Accepted: July 9, 2018