

DNA 羟甲基化在小鼠胚胎干细胞中的研究进展*

谭理**

(复旦大学生物医学研究院表观遗传学实验室, 上海 200032)

摘要 简要总结 DNA 羟甲基化在小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESC)中的最新研究进展. DNA 甲基化(DNA methylation)影响染色质的结构与功能, 在发育与疾病发生过程中具有重要作用. 2009 年 Tahiliani 等发现 TET1 可以催化甲基化胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)氧化为羟甲基化胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5hmC). DNA 羟甲基化(DNA hydroxymethylation)被认为是调节 DNA 甲基化的一种重要方式, 成为了表观遗传学的研究热点之一.

关键词 小鼠胚胎干细胞, DNA 羟甲基化, Tet1

学科分类号 Q75

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00280

DNA 甲基化(DNA methylation)影响染色质的结构与功能, 在发育与疾病发生过程中具有重要作用^[1]. 2009 年 Tahiliani 等^[2]发现 TET (ten-eleven translocation)家族基因编码的蛋白质分子具有加氧酶(dioxygenase)结构域, 在铁离子(Fe^{2+})与 α 酮戊二酸(2-oxoglutarate, 2OG)存在的条件下可以把甲基化胞嘧啶(5mC)氧化为羟甲基化胞嘧啶(5hmC). DNA 羟甲基化被认为是调节 DNA 甲基化的一种重要方式, 迅速成为了表观遗传学的研究热点之一^[3]. 最近多篇研究论文(包括我们实验室在 Molecular Cell 杂志发表的一篇研究论文: Xu Y, Wu F, Tan L, *et al.* Mol Cell, 2011: 451-464)同时报道了 5hmC 在小鼠 ES 细胞全基因组范围的分布规律, 本文将简要总结这些最新的研究进展^[4-8].

1 小鼠 ES 细胞中 5hmC 的来源

小鼠脑组织与胚胎干细胞中 5hmC 的含量高^[2, 9-11]. 在 *Dnmt1* 或 *Np95/Uhrf1* 基因敲除的小鼠 ES 细胞中 5hmC 含量显著少于野生型小鼠 ES 细胞, 而在 *Dnmt1*、*Dnmt3a* 及 *Dnmt3b* 三基因敲除的小鼠 ES 细胞中 5hmC 几乎全部消失, 提示小鼠 ES 细胞中的 5hmC 来源于之前存在 5mC^[4, 7-8, 10]. 小鼠 ES 细胞中 5hmC 含量相对较高, 但在分化过程中先逐渐降低, 随着分化的进行又逐渐回升^[2, 12-13]. 小鼠 ES 细胞中 Tet1 与 Tet2 高表达, 分化后迅速下降, 但 Tet2 的表达随着分化的进行又逐渐回升; 在小鼠 ES 细胞中 Tet3 低表达, 分化后逐渐上

升^[10, 12-13]. RNA 干扰下调 *Tet1* 或 / 和 *Tet2* 表达引起小鼠 ES 细胞中 5hmC 水平的显著降低, 提示小鼠 ES 细胞的高 5hmC 水平由 Tet1 和 Tet2 负责建立, 而分化细胞的 5hmC 建立可能与 Tet2 和 Tet3 有关^[2, 4-8, 12-13].

2 5hmC 在染色质不同区域的分布规律

亚硫酸盐测序技术不能区分 5mC 和 5hmC^[14-16]. 目前 5hmC 在全基因组范围的分布规律一般采用羟甲基化 DNA 免疫沉淀(hMeDIP)结合高通量测序(high throughput sequencing)或启动子芯片(promoter/chromosome tiling chip)技术进行检测^[4-6, 8]. 此外, Pastor 等发现选择性标记 5hmC 后再对标记物进行免疫沉淀比直接采用 5hmC 抗体免疫沉淀羟甲基化 DNA 具有更高的灵敏度^[7, 17-18]. hMeDIP-seq 与 MeDIP-seq 测序结果显示, 5hmC 主要分布于非重复序列区域(常染色质或基因富含区域), 基本不出现在重复序列区域(中心粒外周异染色质区域), 而 5mC 除了在非重复序列区域存在, 在重复序列区域(如 IAP 和微卫星重复等) 更加富

* 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2009CB825602, 2009CB825603).

** 通讯联系人.

Tel/Fax: 021-54237876, E-mail: litan@fudan.edu.cn

收稿日期: 2011-06-22, 接受日期: 2011-07-11

集^[4-8]。5hmC 与组蛋白修饰的相关性分析也发现 H3K9 和 H4K20 三甲基化的异染色质标志性区域通常没有 5hmC(与 5mC 相反)^[9]。细胞免疫荧光检测结果也证实 5hmC 主要位于常染色质区域,而中心粒外周异染色质区域几乎没有 5hmC,但 5mC 不仅存在于常染色质,更主要是在中心粒外周异染色质区域高度富集^[4,6]。5hmC 特异性分布于常染色质区域而不出现在中心粒外周异染色质区域的现象提示中心粒外周异染色质区域的 5mC 可能受到某种机制保护(如 5mC 结合蛋白或组蛋白的某种异染色质特异性修饰),从而避免了被 Tet1 或 Tet2 (小鼠 ES 细胞里主要表达 Tet1 和 Tet2, Tet3 低表达)羟化(图 1)。染色质免疫沉淀测序(chromatin immunoprecipitation-sequencing, ChIP-seq)结果也证实 Tet1 不会结合在中心粒外周异染色质区^[5-8]。

3 5hmC 在基因不同区域的分布规律

小鼠 ES 细胞中 5hmC 和 5mC 在基因内部 (genebody) 特别是外显子区域 (CpG 高密度区域) 高度富集^[4-8]。与 5mC 不同, 5hmC 在 TSS (transcriptional start site, 转录起始位点) 和 5' UTR (5' un-translated regions, 5' 非翻译区) 也有富集, 提示这些区域的 5mC 被高效地催化成了 5hmC^[4-8]。5hmC 在基因启动子、LINE1 元件 5' 端、增强子 (H3K4me1+/H3K3me3-)、绝缘子 (CTCF binding) 及多能性转录因子结合位点 (Sox2/Oct4/Nanog) 区域的富集度也显著高于 5mC, 但细胞分化后这些区域的 5hmC 消失而 5mC 出现^[4-5,7]。下调小鼠 ES 细胞中 Tet1 和 / 或 Tet2 的表达也导致外显子及 LINE 元件 5' 端的 5hmC 减少^[4-7]。

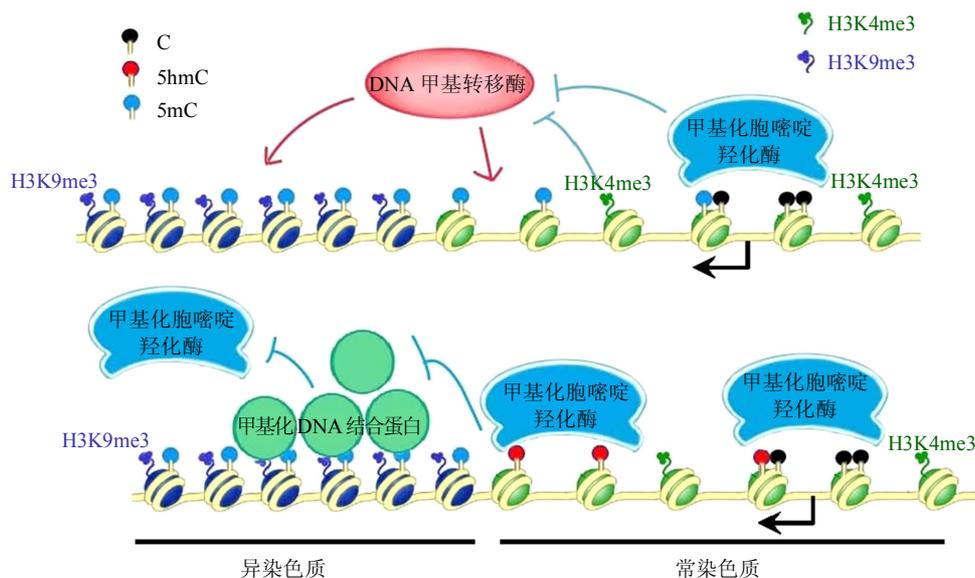


Fig. 1 Dynamic regulation of DNA hydroxymethylation and methylation in different chromatin regions of mouse ES cells (From ref [6])

图 1 小鼠胚胎干细胞中不同染色质区域 DNA 羟甲基化与 DNA 甲基化的动态平衡调节示意图 (摘自参考文献 [6])

4 5hmC 在基因启动子区域的分布规律

在小鼠 ES 细胞中 5hmC 存在于高或中 CpG 含量启动子(这些启动子通常低甲基化),这可能与 5mC 和 5hmC 一般发生在 CpG 位置有关,也可能与 Tet1 的 CXXC 结构域选择性结合高 CpG 的 DNA 序列有关^[4-8]。小鼠 ES 细胞中高 CpG 含量启动子区域存在 5hmC 但基本没有 5mC 的现象说明这些位置的 5mC 基本上都被催化成为 5hmC。小

鼠 ES 细胞中有部分基因的启动子区域具有独特的组蛋白修饰二价区域(bivalent domain),即组蛋白 H3 同时存在 K4 与 K27 的三甲基化 (H3K4me3+/H3K27me3+),这些基因的转录活性维持在“待激活(poised)”状态^[19]。5hmC 在具有二价区域的基因启动子上有明显富集^[4-8]。此外,5hmC 在 PRC2 复合物(polycomb repressive complex 2)结合的基因启动子区域也有富集^[5,7,20]。

5 5hmC 与基因转录活性的关系

小鼠 ES 细胞中 5hmC 与基因转录活性的关系已有多篇研究报道, 但结论并不一致. a. Williams 等报道 5hmC 富集与基因转录激活没有相关性, 大部分 5hmC 富集的基因在 ES 细胞里并不表达, 并且 Tet1 调节基因表达变化并不依赖其羟化酶活性^[8]. b. Pastor 等发现: 有 5hmC 富集的基因通常比没有 5hmC 富集的基因表达水平低; 有 5hmC 富集的基因在细胞分化后通常表达上升; 在启动子区域有 5hmC 富集的基因与下调 Tet1 表达后 mRNA 水平上升的基因之间具有很好的相关性, 说明这些基因启动子区域的 5hmC 对基因转录具有负调控的作用^[7]. c. Ficiz 等对全基因组范围的分析结果显示, 基因启动子区域的 5hmC 富集与基因转录水平正相关, 外显子区域的 5hmC 富集也与基因转录水平正相关, 与之前在小鼠小脑中的发现一致^[4, 16]. 在小鼠 ES 细胞分化过程中表达下降的基因通常在分化过程中出现启动子区域 5hmC 减少以及 5mC 增加的现象^[4]. d. Wu 等发现 5hmC 与转录激活或沉默都存在关系: 启动子区域的 5hmC 可能起着转录沉默的作用, 而基因内部的 5hmC 与转录激活有关^[5, 20]. 我们的研究也显示 5hmC 在低表达(而不是中或高表达)基因的启动子区域有富集, 基因内部(靠近转录终止位点)的 5hmC 在高或中表达的基因中更加富集, 但也有一些高表达基因(例如管家基因)无论是基因内部还是启动子区域 5hmC 水平都低^[6]. 这些研究结果不一致的原因可能是分析方法以及基因研究范围的差异导致. 此外, 5hmC 与基因转录活性之间的相关性是否存在直接的因果关系也还有待于进一步的验证.

6 展 望

虽然最近的研究初步勾勒了 5hmC 在小鼠 ES 细胞基因组中的分布规律, 但还存在以下几个重要的问题尚未解决: a. 小鼠 ES 细胞中 5hmC 特异性分布模式的建立机制(包括小鼠 ES 细胞有丝分裂过程中 5mC 与 5hmC 的动态平衡); b. 5hmC 对 5mC 的调节作用(去甲基化还是稳定甲基化? 重新评价 5hmC 在已经报道 5mC 功能中发挥的作用); c. 5hmC 发挥效应的分子机制(寻找 5hmC 的特异性识别蛋白、揭示 5hmC 与其它染色质修饰之间的串话等); d. 5hmC 在小鼠 ES 细胞定向分化成不同类型细胞过程中的变化与作用. 随着 Tet 家族基因敲除

动物(及细胞)模型的建立以及生物医学不同领域对 DNA 羟甲基化研究的开展, 人们对 DNA 羟甲基化的功能和作用机制将会有全面和深入的认识.

致谢 感谢许于飞博士及叶守东在本文撰写过程中提供的帮助.

参 考 文 献

- [1] Li E, Bird A. DNA methylation in mammals // Allis C D, Jenuwein T, Reinberg D. Epigenetics. New York: Cold Spring Harbor Press, 2007: 341-355
- [2] Tahiliani M, Koh K P, Shen Y, *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 2009, **324**(5929): 930-935
- [3] Dahl C, Gr?nb?k K, Guldberg P. Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. *Clin Chim Acta*, 2011, **412**(11-12): 831-836
- [4] Ficiz G, Branco M R, Seisenberger S, *et al.* Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature*, 2011, **473**(7347): 398-402
- [5] Wu H, D'Alessio A C, Ito S, *et al.* Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Genes Dev*, 2011, **25**(7): 679-684
- [6] Xu Y, Wu F, Tan L, *et al.* Genome-wide Regulation of 5hmC, 5mC, and Gene Expression by Tet1 Hydroxylase in Mouse Embryonic Stem Cells. *Mol Cell*, 2011, **42**(4): 451-464
- [7] Pastor W A, Pape U J, Huang Y, *et al.* Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature*, 2011, **473**(7347): 394-397
- [8] Williams K, Christensen J, Pedersen M T, *et al.* TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature*, 2011, **473**(7347): 343-348
- [9] Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*, 2009, **324**(5929): 929-930
- [10] Szlagierczak A, Bultmann S, Schmidt C S, *et al.* Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acids Res*, 2010, **38**(19): e181
- [11] Globisch D, Mü nzel M, Mü ller M, *et al.* Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One*, 2010, **5**(12): e15367
- [12] Ito S, D'Alessio A C, Taranova O V, *et al.* Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 2010, **466**(7310): 1129-1133
- [13] Koh K P, Yabuuchi A, Rao S, *et al.* Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2011, **8** (2): 200-213
- [14] Nestor C, Ruzov A, Meehan R, *et al.* Enzymatic approaches and bisulfite sequencing cannot distinguish between 5-methylcytosine

- and 5-hydroxymethylcytosine in DNA. *Biotechniques*, 2010, **48**(4): 317–319
- [15] Jin S G, Kadam S, Pfeifer G P. Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nucleic Acids Res*, 2010, **38** (11): e125
- [16] Huang Y, Pastor WA, Shen Y, *et al.* The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. *PLoS One*, 2010, **5**(1): e8888
- [17] Jin S G, Wu X, Li A X, *et al.* Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain. *Nucleic Acids Res*, 2011, **39**(12): 5015–5024
- [18] Song C X, Szulwach K E, Fu Y, *et al.* Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Biotechnol*, 2011, **29**(1): 68–72
- [19] Bernstein B E, Mikkelsen T S, Xie X, *et al.* A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 2006, **125**(2): 315–326
- [20] Wu H, D'Alessio A C, Ito S, *et al.* Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 2011, **473**(7347): 389–393

Research Progress of DNA Hydroxymethylation in Mouse Embryonic Stem Cells*

TAN Li**

(Laboratory of Epigenetics, Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract DNA methylation regulates chromatin structure and function, playing key roles during development and in diseases. Since Tahiliani *et al.* identified TET1 as the first hydroxylase of 5mC in 2009, DNA hydroxymethylation, an important regulating way for DNA methylation, has become the hotspot of epigenetics. Here, the recent research progress of DNA hydroxymethylation in mouse embryonic stem cells was summarized.

Key words mouse ES cells, DNA hydroxymethylation, Tet1

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00280

*This work was supported by a grant from National Basic Research Program of China (2009CB825602, 2009CB825603).

**Corresponding author.

Tel/Fax: 86-21-54237876, E-mail: litan@fudan.edu.cn

Received: June 22, 2011 Accepted: July 11, 2011