

DNA 去甲基化机制的研究进展 *

曹领改 张 旻 蓝兴国 李玉花[△]

(东北林业大学生命科学学院发育生物学研究室 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要 :DNA 甲基化作为动植物体内一种重要的表观遗传修饰形式,在调控基因表达、维持基因组的稳定性等方面发挥重要的生物学作用。固有 DNA 甲基化水平和模式的变化会导致生物的表型异常甚至死亡。而 5- 甲基胞嘧啶的水平和模式是由 DNA 甲基化和去甲基化共同决定的。DNA 去甲基化可以分为主动去甲基化与被动去甲基化,而基因组甲基化模式的形成主要依赖于主动去甲基化。本文综述了生物体内 DNA 主动去甲基化五种潜在机制:DNA 转葡糖基酶参与的碱基切除修复途径、脱氨酶参与的碱基切除修复途径、核苷酸切除修复途径、氧化作用去甲基化与水解作用去甲基化。

关键词 :DNA 去甲基化 ;DNA 转葡糖基酶 ;碱基切除修复 ;核苷酸切除修复

中图分类号 :Q341 ;Q75 **文献标识码** :A **文章编号** :1673-6273(2012)01-160-03

Progress in Study on Mechanism of DNA Demethylation*

CAO Ling-gai, ZHANG Yang, LAN Xing-guo, LI Yu-hua[△]

(Department of Developmental Biology, College of Life Sciences, Northeast Forestry University, 150040, Harbin, China)

ABSTRACT: As a significant epigenetic modification, DNA methylation plays a critical role in regulating gene expression and maintaining genomic stability in mammals and flowering plants. DNA methylation level and pattern of change will lead to abnormal phenotype or even death. The level and pattern of 5-mC are determined by both DNA methylation and demethylation processes. Demethylation of DNA can be passive and active. The formation of DNA methylation pattern depends on the active demethylation. Five potential mechanisms of DNA active demethylation are reviewed in this paper: base excision repair involved with DNA glycosylases, base excision repair involved with enzymatic deamination, nucleotide excision repair, oxidative demethylation and hydrolysis.

Key words: DNA demethylation; DNA glycosylases/lyase; Base excision repair; Nucleotide excision repair

Chinese Library Classification(CLC): Q341, Q75 **Document code**: A

Article ID :1673-6273(2012)01-160-03

前言

在大多数真核生物基因组中,DNA 甲基化是一种常见的非基因影响引起的表观遗传修饰,它广泛存在于植物和脊椎动物细胞的有丝分裂过程中。DNA 甲基化主要发生在胞嘧啶上,通过暴露非甲基化 CpG 岛的启动子和屏蔽其他基因组来限制基因组的规模^[1]。然而,5- 甲基胞嘧啶(5-mC)的水平和模式是由 DNA 甲基化和去甲基化共同决定的。DNA 去甲基化有被动和主动之分。在细胞分裂 S 期 DNA 复制时维持性甲基转移酶类失活,导致新合成的 DNA 链未被甲基化,此种情况称为 DNA 被动去甲基化。DNA 主动去甲基化不涉及 DNA 复制,但是需要一个或多个酶的参与^[2]。DNA 主动去甲基化已经成为开花植物的基因组甲基化模式形成的重要机制^[3]。本文就目前报道的 DNA 主动去甲基化的机制的研究进展进行综述。

1 DNA 去甲基化机制

长期以来 DNA 去甲基化被认为是一个依赖 DNA 复制的被动去甲基的过程,目前,对于机体内主动去甲基化调控机制备受关注。DNA 主动去甲基化可能存在的五种机制:① DNA

转葡糖基酶参与的碱基切除修复 (base excision repair, BER): 5-mC 由 DNA 转葡糖基酶直接去除。此途径主要存在于植物体内,动物体内也可能存在。② 脱氨酶参与的碱基切除修复: 5-mC 脱氨变成胸腺嘧啶 T,形成 G/T 错配,进入 BER 途径。这一途径主要存在于动物体内,植物体内也可能存在。③ 核苷酸外切修复机制(nucleotide excision repair, NER):直接移除甲基化的 CpG 二核苷酸。④ 氧化去甲基化:发生氧化反应打开碳-碳键,直接去除甲基基团。⑤ 水解去甲基化:水解胞嘧啶的甲基基团,使其以甲醇的形式被释放。

2 碱基切除修复与 DNA 去甲基化

2.1 DNA 转葡糖基酶参与的 DNA 去甲基化

植物体内 DNA 主动去甲基化主要的模式是碱基切除修复机制(BER)^[4,5]。BER 途径中,首先脱氧核糖和 5-mC 之间的糖苷键断裂使 DNA 形成 AP(apurilic/apyrimidinic)位点,然后 AP 核酸内切酶切掉 AP 位点的脱氧核糖。最后,由 DNA 聚合酶与 DNA 连接酶填补此缺口,最终结果是胞嘧啶 C 取代 5-mC。在植物体内,DNA 糖基化酶沉默抑制因子 ROS1(REPRESSOR OF SILENCING1)和 DME(DEMETER)参与印迹基因的去甲基

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30900115, 31070275),中央高校基本科研业务费专项资金(DL09AB13);

黑龙江省发展高新技术产业专项资金项目(FW11C201)

作者简介:曹领改(1985-),女,硕士,主要研究方向:发育生物学,Email: caolinggai@163.com

[△]通讯作者:李玉花,教授,Email: lyhshen@126.com

(收稿日期:2011-10-05 接受日期:2011-10-28)

化和转基因的沉默^[6,7]。因此,植物可以利用 BER 途径来实现 DNA 的去甲基化^[8]。

以 BER 为基础的去甲基化机制关键在于 DNA 链断裂的产生,而 ROS1 和 DME 在体外均具有 DNA 糖基化酶和 AP 裂解酶活性^[9,10]。此外,在植物基因中,无论是在 CpG 还是非 CpG 区域(CpNpG 和不对称 CpG),ROS1 和 DME 蛋白均可消除寡核苷酸上的 5-mC。在整个植物发育过程中,ROS1 均有表达^[11]。其在内源性基因和沉默转基因去甲基化中均发挥作用^[12,13]。低温调节基因 COR 78(COLD REGULATED 78)的启动子与内源 COR 78 基因的启动子同源,并产生这些序列的 siRNA^[7]。在野生型植株中,这些序列的 siRNA 不能引起变化,但在 *ros1* 突变体中,情况正好相反,发生了基因甲基化以及外源和内源基因的转录沉默。这说明,ROS1 蛋白能够阻碍 siRNA 介导的 DNA 甲基化和基因沉默作用。而另一个转葡萄糖基酶 DME 则在雌配子体发生中起作用^[14]。种子发育时期,印迹基因 FWA 在胚乳中表达,这一功能是通过 DME 基因在雌配子体中特异表达,并伴随着 FWA 基因的去甲基化。目前还不清楚参与胚乳形成的中央细胞中 DNA 去甲基化是只发生在少数印迹基因位点,还是发生在更广泛的位点。与其他植物相比,玉米胚乳的基因组是显著低甲基化的,这表明胚乳中许多序列受到了去甲基化的修饰^[14]。这种现象在拟南芥的胚乳中也得到了证实^[15]。这表明双功能的 DNA 糖基化酶参与植物体内 DNA 去甲基化。

动物体内也可能存在 BER 机制。一些从 HeLa 细胞核提取物中纯化的酶也可以通过 DNA 转葡萄糖基酶机制起始 DNA 的去甲基化^[16]。从鸡中克隆得到的胸腺嘧啶 DNA 转葡萄糖基酶(TDG)在体外有弱的 5-mC DNA 转葡萄糖基酶活性^[17]。有趣的是:人与鸡的 DNA 甲基化结合蛋白(MBD4)在体外有相似的 5-mC DNA 转葡萄糖基酶活性^[18]。但是,TDG 和 MBD4 也具有强的 G/T 错配转葡萄糖基酶活性。此外,mbd4 敲除的小鼠中并未观察到 DNA 甲基化的减少。因此,这些 DNA 转葡萄糖基酶在哺乳动物体内对于 DNA 主动去甲基化的重要性仍有待证实。

2.2 脱氨酶参与的 DNA 去甲基化

DNA 主动去甲基化也可由以下过程实现:5-mC 脱氨酶使其脱氨形成胸腺嘧啶 T,接着 T/G 错配修复使未甲基化的 C 取代 T。此过程的第一步可由以下两种不同类型的酶来完成:脱氨酶和 DNA 甲基转移酶。DNA 脱氨使其转化为尿嘧啶,在 RNA 编辑、病毒防御和抗体亲和力成熟中发挥作用^[19]。激活诱导脱氨酶(AID)负责体细胞高度突变和 B 淋巴细胞中免疫球蛋白基因类群重组。AID 和 APOBEC1 被确定为胞嘧啶脱氨酶并在小鼠卵母细胞中表达^[20]。如果这些脱氨酶紧密有效的结合到 G/T 错配的碱基对,那么他们的活性可以导致 DNA 去甲基化。

5-mC 也可以由 DNA 甲基转移酶来完成脱氨而最终致使 DNA 去甲基化。最近研究发现,在培养的人乳腺癌细胞中 DNA 甲基转移酶 Dnmt3a 和 Dnmt3b 可以将 5-mC 脱氨变成 T。T 通过 G/T 错配碱基切除修复途径被移除。已知 Dnmt3a 和 Dnmt3b 能与 G/T 错配修复的 DNA 转葡萄糖基酶相互作用。这一相互作用表明了 Dnmt3 的 5-mC 脱氨活性与 G/T 错配修复的 DNA 转葡萄糖基酶活性的潜在偶联共同完成了 DNA 的去甲基

化^[21]。这一相互作用使 DNA 转葡萄糖基酶被招募到甲基化的 DNA 上,避免自发引起的 5-mC 脱氨形成的 C/T 的突变。

3 核苷酸外切修复与 DNA 去甲基化

DNA 主动去甲基化的另一条途径是核苷酸外切修复(NER)^[22]。NER 是负责消除由紫外线和致癌物质诱导产生的螺旋扭曲损伤,这种损伤会延缓复制和转录。DNA 扭曲可被 XPC 蛋白(Xeroderma pigmentosum)识别,有利于解旋酶、DNA 结合蛋白和核酸内切酶形成一个预切口复合物。损伤附近的 DNA 展开并且由 NER 核酸酶 XPF 和 XPG 从任意一边切开,切掉 25-30 nt 长度的 DNA,此缺口通过 DNA 聚合酶和连接酶填补。这一过程在 DNA 聚合酶的作用下 C 会取代 5-mC,导致 DNA 甲基化的丢失。

非洲爪蟾中 DNA 损伤诱导蛋白 Gadd45a (growth arrest and DNA-damage-inducible alpha)由 p53 诱导表达,参与复杂的细胞过程,可能间接参与 NER 途径^[22]。Gadd45a 蛋白异位表达与内源性 Oct4 启动子区甲基化减少有关,也与细胞内总 5-mC 含量减少有关。同时,Gadd45a 蛋白或 XPG 蛋白会增加 5-mC 的含量。总而言之,DNA 去甲基化可以通过 NER 实现。

4 氧化去甲基化

DNA 主动去甲基化可以由氧化去甲基化机制来完成。Alkb 酶家族能通过氧化去甲基化途径移除 1- 甲基腺嘌呤(1-mA)和 3- 甲基胞嘧啶(3-mC),Fe(II)与 α - 酮戊二酸做辅助因子,释放甲醛^[23]。通过氧化作用 5-mC 可被转化成 5- 羟甲基胞嘧啶(5-hmC)。5-hmC 曾作为细胞核 DNA 碱基在哺乳动物干细胞、Purkinje 神经元和脑中发现。TET1 是 α - 酮戊二酸与 Fe(II) 依赖的酶,可以在体外培养的细胞中催化 5-mC 转化成 5-hmC。通过基于 DNA 转葡萄糖基酶修复途径或其他未知途径将 5-hmC 进一步转化成 C。目前,5-hmC 是否在植物体内存在尚不清楚。

另外,组蛋白的去甲基化涉及氧化反应。含有 JmjC(JumonjiC)结构域的组蛋白去甲基化酶通过氧化去甲基化方式去除 H3K9K36 的甲基基团^[24],同时需要 Fe(II)与 α - 酮戊二酸做辅助因子,释放甲醛。最近研究新发现了一个含有 JmjC 结构域的蛋白质 KIAA1718 (KDM7A),该蛋白能够特异地去除 H3K9K27 的甲基基团^[25]。另外,组蛋白去甲基化酶 LSD1 对组蛋白 H3K4 的去甲基化涉及氧化反应,此反应需要 FAD 做辅助因子,同时释放副产物甲醛^[26]。

5 水解去甲基化

DNA 主动去甲基化还可以通过水解作用,由氢原子取代甲基基团同时释放甲醇,这一过程可能由 MBD2、CpG 甲基化结合蛋白来完成的^[27]。由于甲基基团与胞嘧啶环间的共价键是热力学稳定的,不可能只是共价键的简单水解^[5],它是需要其他蛋白质辅助才能完成的复杂过程。

6 结语

DNA 去甲基化机制的探索将为研究动植物发育的分子水平调控方面起到重要作用。在植物体内,有直接的遗传和生化

证据表明 BER 导致 DNA 去甲基化。但是 BER 是否也在哺乳动物体内负责清除甲基基团尚不清楚。DNA 去甲基化机制中控制靶基因识别的起始步骤是完全未知的。此外,是染色质的状态影响 DNA 去甲基化,还是 DNA 去甲基化影响染色质的状态,这些都尚未清楚。随着高分辨率甲基化定位技术、可区分父母方基因组技术以及分子水平检测基因组去甲基化活动技术的发展,这些情况可能会得到改变。

参考文献(References)

- [1] Ooi SK, Bestor TH. The colorful history of active DNA demethylation [J]. *Cell*, 2008, 133(7): 1145-1148
- [2] Zhu JK. Active DNA Demethylation Mediated by DNA Glycosylases [J]. *Annu Rev Genet*, 2009, 43:143-166
- [3] Gehring M, Reik W, Henikoff S. DNA demethylation by DNA repair [J]. *Trends in Genetics*, 2009, 25(2):82-90
- [4] Jost JP, Siegmund M, Sun L, Leung R. Mechanisms of DNA demethylation in chicken embryos. Purification and properties of a 5-methylcytosine-DNA glycosylase [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270 (17): 9734-9739
- [5] Kress C, Thomassin H, Grange T. Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted [J]. *FEBS Lett*, 2001, 494(3):135-140
- [6] Choi Y, Gehring M, Johnson L, et al. DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in Arabidopsis [J]. *Cell*, 2002, 110(1):33-42
- [7] Gong Z, Morales-Ruiz T, Ariza RR, et al. ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase [J]. *Cell*, 2002, 111(6):803-814
- [8] Ikeda Y, Kinoshita T. DNA demethylation: a lesson from the garden [J]. *Chromosoma*, 2009, 118:37-41
- [9] Gehring M, Huh JH, Hsieh TF, et al. DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation [J]. *Cell*, 2006, 124(3):495-506
- [10] Morales-Ruiz T, Ortega-Galisteo AP, Ponferrada-Marín MI, et al. DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103 (18):6853-6858
- [11] 夏晗,刘美芹,尹伟伦,等.植物 DNA 甲基化调控因子研究进展 [J]. *遗传*, 2008, 30(4) :426-432
Xia Han, Liu Mei-qin, Yin Wei-lun, et al. DNA methylation regulating factors in plants [J]. *Hereditas*, 2008, 30(4) :426-432
- [12] Penterman J, Zilberman D, Huh JH, Ballinger T, et al. DNA demethylation in the Arabidopsis genome [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(16):6752-6757
- [13] Zhu J, Kapoor A, Sridhar VV, et al. The DNA glycosylase/lyase ROS1 functions in pruning DNA methylation patterns in Arabidopsis [J]. *Curr.Biol*, 2007, 17(1):54-59
- [14] Lauria M, Rupe M, Guo M, et al. Extensive maternal DNA hypomethylation in the endosperm of Zea mays [J]. *Plant Cell*, 2004, 16 (2):510-522
- [15] Hsieh TF, Ibarra CA, Silva P, et al. Genome-wide demethylation of Arabidopsis endosperm [J]. *Science*, 2009, 324(5933):1451-1454
- [16] Vairapandi M, Liebermann DA, Hoffman B, et al. Human DNA-demethylating activity:a glycosylase associated with RNA and PCNA [J]. *J Cell Biochem*, 2000, 79(2):249-260
- [17] Zhu B, Zheng Y, Hess D, et al. 5-methylcytosine-DNA glycosylase activity is present in a cloned G/T mismatch DNA glycosylase associated with the chicken embryo DNA demethylation complex [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(10):5135-5139
- [18] Zhu B, Zheng Y, Anglikar H, et al. 5-Methylcytosine DNA glycosylase activity is also present in the human MBD4 (G/T mismatch glycosylase) and in a related avian sequence [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(21):4157-4165
- [19] Conticello SG. The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators [J]. *Genome Biol*, 2008, 9(6):229
- [20] Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, et al. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme [J]. *Cell*, 2000, 102(5): 553-563
- [21] Mé tivier R, Gallais R, Tiffocche C, et al. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter [J]. *Nature*, 2008, 452(7183): 45-50
- [22] Kazantsev A, Sancar A. Does the p53 up-regulated Gadd45 protein have a role in excision repair [J]. *Science*, 1995, 270 (5238): 1003-1004
- [23] Treweek SC, Henshaw TF, Hausinger RP, et al. Oxidative demethylation by Escherichia coli AlkB directly reverts DNA base damage [J]. *Nature*, 2002, 419(6903):174-178
- [24] Yamane K, Toumazou C, Tsukada Y, et al. JHDM2A, a JmJC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor [J]. *Cell*, 2006, 125(3):483-495
- [25] Huang C, Xiang Y, Wang Y, et al. Dual-specificity histone demethylase KIAA1718 (KDM7A) regulates neural differentiation through FGF4 [J]. *Cell Res*, 2010, 20(2):154-165
- [26] Shi Y, Lan F, Matson C, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1 [J]. *Cell*, 2004, 119(7):941-953
- [27] Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, et al. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA [J]. *Nature*, 1999, 397(6720):579-583