

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00903

DNA 甲基转移酶分类、功能及其研究进展

王志刚, 吴建新

首都儿科研究所生化室, 北京 100020

摘要: DNA 甲基化是一种在原核和真核生物基因组中常见的复制后修饰, 参与体内多种重要生理过程, 主要包括: 调节基因表达, 基因印记, 维持染色体完整性以及 X-染色体灭活等。依据结构和功能的不同, 哺乳动物中 DNA 甲基转移酶(Dnmts)主要分为两大类: DNA 甲基化维持酶 Dnmt1 以及 DNA 从头甲基化酶 Dnmt3a、Dnmt3b 和 Dnmt3L 等。此外, Dnmt2 也具有弱的 DNA 甲基转移酶活性, 近年来发现它可以甲基化 tRNA^{Asp} 反密码子环处 38C。这些 Dnmts 对于哺乳动物的生长发育是十分重要的, 它们的功能异常将导致胚胎发育障碍, 癌症等多种疾病。因此, Dnmts 可能成为一个重要的分子靶标, 在疾病的治疗和预防中发挥重要作用。文章就 Dnmts 的分类、功能以及研究进展进行综述。

关键词: DNA 甲基化; DNA 甲基转移酶

DNA methyltransferases: classification, functions and research progress

WANG Zhi-Gang, WU Jian-Xin

Department of Biochemistry, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China

Abstract: DNA methylation is a postreplicative modification occurred in most prokaryotic and eukaryotic genomes, which has a variety of important biological functions including regulation of gene expression, gene imprinting, preservation of chromosomal integrity, and X-chromosome inactivation. According to their structure and functions, DNA methyltransferases (Dnmts) are divided into two major families in mammalian cells: maintenance methyltransferase (Dnmt1) and de novo methyltransferases (Dnmt3a, Dnmt3b, and Dnmt3L). In addition, Dnmt2 also displays weak DNA methyltransferase catalytic activity, but newly founded function is to methylate cytosine 38 in the anti-codon loop of tRNA^{Asp}. These Dnmts are crucial for mammalian growth and development. Dnmts deficiency will lead to embryonic development defects, cancer, and other diseases. Therefore, Dnmts could be important therapeutical targets. This article summarizes the classification, function, and recent research progress in DNA methyltransferases.

Keywords: DNA methylation; DNA methyltransferase

在相当长的一段时间内, 研究者的目光大都集中于以DNA编码为基础的经典遗传学上。基因突变和重组给我们提供了大量关于表型特征如何被一代一代传递的信息, 然而, 这种单一的信息描述并不

足以回答机体发育和生命进化中的所有现象。虽然早在 1939 年, Waddington就提出了epigenetics 这一概念, 但直到 1987 年, Holliday^[1]对此进行了更深入的阐述后, 表观遗传学才逐渐引起人们的重视。

收稿日期: 2009-01-05; 修回日期: 2009-02-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30671156)和北京市自然科学基金项目(编号: 5072014)资助

作者简介: 王志刚(1973-), 男, 在读博士研究生, 研究方向: 生化与分子生物学。Tel: 010-85695578; E-mail: wzg2700@sohu.com

通讯作者: 吴建新(1964-), 男, 研究员, 研究方向: 生化与分子生物学。Tel: 010-85695578; E-mail: wjianxin@gmail.com

1996 年 Riggs 等^[2]给出了更确切的定义, 即表观遗传是没有 DNA 序列变化的, 经减数分裂和/或有丝分裂后可遗传的基因表达改变。它主要包括如下几个方面: DNA 甲基化, 组蛋白修饰, 染色质重塑和非编码 RNA 调控^[3]。

1 DNA 甲基化

1.1 DNA 甲基化机制

DNA 甲基化是指基因组内 C_pG 二核苷酸中胞嘧啶的 5 位碳原子上加上一个甲基基团, 它是真核生物中常见的一种碱基共价修饰过程。在 DNA 结构中, 甲基基团位于 DNA 双螺旋大沟内, 它们并不干扰碱基配对的能力。1948 年 Hotchkiss^[4]在牛胸腺内观察到甲基转移酶催化的 DNA 甲基化; 1964 年, Gold 和 Hurwitz 等^[5]在 *Escherichia coli* 中鉴定出第一个 DNA 甲基转移酶。目前的 DNA 甲基化反应机制是在原核生物的 DNA-C5 甲基转移酶中首先发现的^[6]。当 DNA 甲基化酶结合 DNA 后, 目的碱基 C 从 DNA 双螺旋中翻转, 进而突出于双螺旋结构之外, 并嵌入酶的袋形催化结构域里。与此同时, 碱基对氢键断裂, 邻近碱基间堆积作用缺失。DNA-C5 甲基转移酶的活性位点(motif IV)中的保守序列 PCQ 中的半胱氨酸残基中的硫醇基对底物 C6 位碳进行亲核作用, 并形成共价键激活。由于 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)的甲基基团结合于 S 原子上, 分子极不稳定, 在酶的作用下甲基从 SAM 转移至被激活的 C5, 随着 C5 位上质子的释放与共价中间物的转变, 最终完成 DNA 甲基化修饰过程。

1.2 DNA 甲基化在基因组内的分布

真核生物中, DNA 甲基化在基因组内分布并不是完全均一的, 而是具有区域性。它们传递或保持基因组局部的特定状态, 比如基因的转录或沉默。在所有真核生物中, DNA 甲基化水平最高的是植物, 这是由于其基因组中含有大量的转座子序列以及退化基因的残迹。植物中的甲基化模式表现为嵌合型, 甲基化与非甲基化区域比例相近, 相互分隔。哺乳动物表现为全基因组甲基化, 基因、转座子、基因间区的 C_pG 二核苷酸都是 DNA 甲基化的靶标。 C_pG 二核苷酸在人类基因组中的含量很低(小于 1%, 远低于平均概率 6%), 这种现象称为 CG 抑制现象。每 150

bp 存在一个 C_pG 甲基化作用位点。其中, 绝大部分 C 都被甲基化, 只有小部分 C 是非甲基化的。通过 DNA 甲基敏感限制性内切酶分析, 发现甲基化区域与非甲基化区域间隔排列。这些非甲基化区域主要存在于启动子区、 C_pG 岛、基因的 5' 区和第一个外显子^[7]。哺乳动物的未甲基化区域通常从基因的 5' 端延伸至基因内部约数百碱基对。这个非甲基化核心区域大约 1 000 bp, 集中于转录起始点附近。目前的研究发现, 基因编码区是 DNA 甲基化主要靶标。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, 33% 的基因(其中许多为看家基因)在它们的转录区域都存在 C_pG 甲基化, 而转录单位的 5' 和 3' 区是非甲基化, 这种形式的甲基化并不关闭基因的表达。基因转录区域甲基化可能是由活性基因的反义链转录所引起, 或许可以防止一个活性转录单位内假的转录起点的干扰。启动子区甲基化引起稳定的基因沉默, 而转录区域的甲基化有助于消除转录噪音^[8]。此外, 在同一个个体的不同组织内, DNA 甲基化模式也有着一定的差异, 这也间接证实了 DNA 甲基化是调控机体组织特异性的一种重要作用机制。

2 DNA 甲基转移酶

在哺乳动物中, 目前已发现 4 种 Dnmts, 根据结构和功能的差异分为两大类: 分别以 Dnmt1 和 Dnmt3 为代表。前者主要参与甲基化状态的维持, 也是非 C_pG 位点从头甲基化所必需, 并与甲基化状态的延伸有关; 后者包括 Dnmt3a、Dnmt3b, 以及 Dnmt3L 等, 是主要的从头甲基化酶, 而 Dnmt2 的归属和功能尚不十分明确^[9]。

2.1 Dnmt1

Dnmt1 结构上包括两部分, 其 N-末端大结构域包含众多调控位点, C-末端则为催化结构域。鼠 Dnmt1 包括 1 620 个氨基酸^[10]。N-末端参与细胞内定位及催化活性的调节, 包括带电结构域(结合 DMP1 转录抑制蛋白)、核定位信号(NLS)、PCNA 结合位点、复制叉作用位点、锌离子结合域 CXXC(ZnD) 以及 polybromo 结构域, 它与 Dnmt1 被运送至复制叉有关。在 C-末端, 1 124~1 620 aa 处为催化结构域(CatD), 包含 6 个甲基转移酶高度保守位点, motif I、IV、VI、VIII、IX、X 等。motif I、X 折叠一起

形成SAM结合位点, motif IV中的PRO-CYS二肽, 提供活性位点中的甲醇基。CatD优先作用于半甲基化底物, ZnD优先识别甲基化CpG, ZnD与甲基化DNA结合可以引发Dnmt1催化中心的异构激活, 从而引起甲基化蔓延。

Dnmt1存在3个不同的剪接异构体: Dnmt1s, Dnmt1o和Dnmt1p。Dnmt1s表达于体细胞中, Dnmt1p只发现于粗线期精母细胞, Dnmt1o特异性表达于卵母细胞和着床前胚胎中。Dnmt1p不具有Dnmt1活性, 因为它的第一外显子ORF太短, 可能干扰了正常翻译。相比之下, Dnmt1o起始密码子位于外显子4, 产生一个N-末端截短的Dnmt1活性蛋白^[11]。Dnmt1o虽然N-末端缺少118个氨基酸, 但是获得了更高的稳定性, 在卵细胞胞浆能够长期存在。当胚胎发育至8细胞阶段时, Dnmt1o从胞浆转移至核内, 并在第四次S期复制中维持印记基因的甲基化^[12]。Dnmt1构象上的变化与活性状态转变有关, 这影响近端氨基酸和催化结构域的结合, 还可能引起Ser515的磷酸化^[13]。Dnmt1s是复制后维持甲基化的关键酶, 沿DNA高速进行性甲基化, CGCTC位点趋向终止此过程, 它可能是Dnmt1作用的终止子, 但同时也是阻遏蛋白CTCF结合位点, 通过募集CTCF或独立途径能够阻止DNA甲基化作用向DNA非甲基化区域蔓延扩展^[14, 15]。

2.2 Dnmt3 家族

Dnmt3与细菌5mC甲基转移酶具有高度的同源性。Dnmt3a、Dnmt3b拥有类似的结构: 高度可变的N-末端, 包括PWWP位点, Zn结合位点(含有多个Cys、6个CXXC结构), 以及具有催化功能的C末端^[16, 17]。Dnmt3L的N-末端只有类似植物同源结构域的基序PHD结构域, C-末端只延伸至保守基序VIII, 缺乏有效的催化结构域。因而, Dnmt3L本身无催化活性^[11]。Dnmt3a2是Dnmt3a的不同剪接子, Dnmt3a起自外显子1 α , Dnmt3a2起自外显子1 β , 其N-末端缺少223个氨基酸。由于Dnmt3a、Dnmt3b的DNA结合位点均较小, 大约50个残基左右, 因此, Dnmt3常以二聚体形式存在以增大和底物的接触面, 在一次作用过程中可以同时甲基化两个CpG位点^[18]。

Dnmt3在成体组织中表达很低。Dnmt3a主要位于异染色质, 而Dnmt3a2是胚胎发育中的主要酶,

定位于常染色质, 主要存在于胚胎干细胞中, 是基因组印记所必需的。RT-PCR结果表明: Dnmt3a在卵细胞内高丰度表达, 而后在8细胞阶段逐渐下降。免疫组化显示Dnmt3a蛋白早期定位于核内, 而在8细胞阶段则见于核外。Dnmt3b出现于E7.5 d的卵巢中, 免疫组化显示其主要定位于胞浆和浆膜及卵细胞1、2、4细胞阶段^[11]。

Dnmt3是主要的从头甲基化酶, 对CpG位点的侧翼序列有一定的倾向性。5'-CTTACpGCAAG-3'优先被识别, 而对5'-TGTTCpGGTGG-3'几乎没有活性。Dnmt3a对富含CpG的片段甲基化效率不高, 但是其作用更准确, 资料显示其与单拷贝基因甲基化有关^[19, 20]。Dnmt3b能够甲基化着丝粒远端的重复序列, 其间具有高密度的CpG位点, 它是以进行性方式行使甲基化功能的, 这种方式有利于短时间的甲基化。Dnmt3L高度表达于睾丸和胎盘的绒毛膜, 协同Dnmt3从头甲基化。在野生型ES细胞中, Dnmt3L集中于染色质叉处; 在Dnmt3a和Dnmt3b缺乏的ES细胞中, Dnmt3L散在分布于核和胞浆内。Dnmt3a2的异位表达能够重新恢复Dnmt3L在细胞内定位。Dnmt3L可以通过与其他Dnmt3结合而转移入细胞核内, 当Dnmt3a2结合到染色质上后, Dnmt3L-Dnmt3a2复合物仍维持不变, 从而诱导局部DNA甲基化; 而Dnmt3L-Dnmt3b复合物则散开^[21]。Dnmt3L能够以一种剂量依赖的方式使Dnmt3a、Dnmt3b的甲基化活性增强1.5~3倍, 其C-末端与增强Dnmt3活性相关^[22]。在结构上, Dnmt3a与Dnmt3L形成一个四聚体, Dnmt3a二聚体位于中间位置, Dnmt3L二聚体位于外侧, 两者通过C-端相接触。通过C-端的G718-L719-Y720结构, Dnmt3L能够稳定Dnmt3a活性位点的构象, 包括亲核基团Cys706。Dnmt3a-Dnmt3L的结合提供了一个稳定而广泛的极性作用, 增强了Dnmt3a与SAM结合。完整Dnmt3L能与H3N端尾巴形成复合体, 将活性Dnmt3a2锚定于核小体上, 这有利于Dnmt3参与染色质重塑^[18]。

此外, 研究显示, Dnmt3a、Dnmt3b的缺失会导致Dnmt3L启动子区甲基化水平下调, 从而在ES细胞中引起Dnmt3L转录的不完全抑制, 而Dnmt3L本身也参与这种甲基化调节, 这充分说明, 作为DNA甲基化的重要参与者, 其本身也将受到各种表观调控的作用^[23]。

2.3 Dnmt2

相对于Dnmts其他成员,对Dnmt2的认识较少。结构研究表明,人类Dnmt2序列与原核生物DNA甲基转移酶高度同源。Dnmt2缺乏N-末端活性结构域,它包括391个氨基酸,大小约为40 kDa,含有10个高度保守的DNA甲基转移酶基序,在motif VIII-IX区有41个保守的氨基酸,其中包Cys-Phe-Thr三肽和Asp-Ile二肽,这个区域与原核生物DNA甲基转移酶的TRD结构域相一致^[24]。Dnmt2存在于胞浆和核内,细胞内定位显示大量的Dnmt2结合于核基质处,在有丝分裂前期进入细胞核内,呈现类纺锤体式定位,并在细胞分裂过程中可观察到与DNA结合。在组织内,Dnmt2表达广泛,主要存在于肌肉、发育中的胚胎内脏、卵巢囊肿以及增殖中的睾丸细胞^[25]。

人们对Dnmt2功能的认识一直存在争议。虽然结构与其他Dnmts高度相似,目前研究认为它的DNA甲基化酶活性可能非常弱,而且识别位点并非C_pG,因而在体外酶活性实验中,常常难以观测到DNA甲基化酶活性。在果蝇胚胎中的研究证实,Dnmt2的作用位点主要是C_pT和C_pA,其过表达将导致基因组显著高甲基化^[26]。Dnmt2的功能性底物为RNA分子,tRNA^{Asp}是其主要靶标,它能够特异性甲基化tRNA^{Asp}反密码子环38C^[27]。在斑马鱼胚胎中敲除Dnmt2会引起肝、脑和视网膜等发育缺陷,这些缺陷能被活性Dnmt2所逆转,而人类Dnmt2能够恢复Dnmt2缺陷的小鼠、拟南芥及黑腹果蝇中tRNA^{Asp}甲基化,表明这个功能具有高度的保守性^[28]。观察Dnmt2的C79A、E119A、R160A和R162A突变体在体外的tRNA^{Asp}甲基化酶活性发现,这些位点是Dnmt2催化活性所必需的,而它们与其他Dnmts相应位点具有高度的一致性。因而,尽管作用的底物各异,但Dnmt2和Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b的催化机制极其类似^[29]。

2.4 DNA甲基结合蛋白

DNA甲基化是基因转录抑制的重要机制,除了直接阻止转录因子结合外,通过与DNA甲基结合蛋白(MBP)结合并募集辅阻遏物也是引起基因沉默的重要途径。研究者在哺乳动物体内发现了数种甲基化结合蛋白。这些蛋白都有methy-C_pG-binding domain (MBD),能够与^mC_pG结合。在哺乳动物中,有5个重

要的DNA甲基结合蛋白,MBD1、2、3、4和MeCP2,其中,MeCP2是唯一能识别单个甲基化C_pG位点的结合蛋白。MeCP2能够通过转录抑制区(TRD)与半甲基化,全甲基化DNA形成复合物。免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)中的MeCP2复合物对于半甲基化底物DNA仍具有甲基转移酶活性,能够通过一个辅阻遏物mSin3A募集HDACs,维持靶序列甲基化^[30]。MBD1-3和MeCP2与转录抑制相关,MBD4被证实是一种错配修复蛋白^[31]。MBD2和MeCP2能够募集HDACs,而MBD3是NURD(Mi-2)和核小体重塑复合物成员之一。MBD1在S期可形成MBD1-SETDBI(H3K9甲基转移酶)复合物,再与染色质装配因子(Chromatin assembly factor 1, subunit A, CAF p150)结合到DNA复制机器上,建立沉默。在甲基化的hMLH1启动子上,可以发现MBD1、2和MeCP2,表明hMLH1沉默状态与MBP相关^[30]。最近,新发现的一个MBP,命名为kaiiso,虽然它缺乏MBD,但可通过锌指结构识别甲基化DNA^[32]。MBP的功能丧失可导致多种疾病,其中,MeCP2功能异常与多种神经系统发育疾病相关,包括Ratt综合症、孤独症以及由于其拷贝数增加而出现的MeCP2二联体或三联体综合症等。MeCP2多定位于异染色质,虽然它是一个DNA甲基结合蛋白,但是它与非甲基化DNA序列也有较弱的亲和力。染色质免疫共沉淀-芯片法(Chromatin immunoprecipitation-chip, ChIP-chip)研究表明,59%的MeCP2结合位点位于基因间区,而仅有6%位于C_pG岛^[33]。

3 Dnmts 功能

C_pG甲基化赋予机体表观遗传记忆,表观遗传记忆包括两种,外在记忆和内在记忆。前者需要起始信号的持续存在,而后者在起始信号消退后仍可继续保留。外在表观遗传记忆比较适合临时沉默基因,它可对分化过程中基因的再表达或环境信号的变化做出应答。内在表观遗传记忆对逆转录病毒和转座子在发育过程中的持续沉默有重要作用,癌基因的沉默也属此类。在机体细胞中,3种主要甲基化酶协同作用,使得其表观记忆得以稳定地遗传下去。

3.1 基因表达与 Dnmts

在机体的发育过程中,基因的关闭和激活是个

极其复杂的过程。Dnmts通过调节基因启动子区C_pG岛的DNA甲基化水平影响该基因的表达。在基因组内,存在着大量的C_pG位点,这些位点常成簇存在。一般认为至少 200 bp的DNA序列内GC含量超过50%,CG观测值/CG期望值超过0.6,则称之为C_pG岛,多见于基因的启动子内^[34],长度500~1 000 bp。人类56%基因启动子区有C_pG岛。不管基因表达与否,多数C_pG岛在发育过程中都保持低甲基化。然而,也有一些基因启动子区是差异甲基化的,主要是那些在发育中有重要功能的基因,例如homebox (HOX)、paired box(PAX) 以及它们的相关基因。资料显示:非甲基化和高甲基化状态比较稳定,低密度甲基化则很不稳定,发生去甲基化和从头甲基化的概率相近^[35]。通常情况下,启动子区甲基化使基因处于转录抑制状态。例如, *reelin*和*GAD67*启动子区的高甲基常常引起它们mRNA表达下降^[36]。在人类肝细胞株HepG2中,经Dnmts抑制剂(5aza-dc)处理后,许多肝功能代谢基因表现为从转录抑制到转录激活^[37]。表明Dnmts介导的DNA甲基化可能限制胎肝基因的表达并关闭其中某些基因。

3.2 基因印记与 Dnmts

基因印记是指来自父方和母方的等位基因在通过精子和卵子传递给子代时发生了某种修饰,这种作用使其后代仅表达父源或母源等位基因的一种。迄今,在哺乳动物中已经发现的印记基因大约有70多种,其表达控制着胚胎的发生、发育过程。在人类基因组范围内,由于生物信息学技术的进展,已经鉴定出156个候选印记基因^[38]。印记基因有两个特点:(1)常成簇出现;(2)共用一个主要的印记控制区(Imprinting Control Region, ICR),也称特异甲基化区域(Differentially Methylated Region, DMR)。例如在人类11p15.5区域,成簇排列有多个印记基因,包括*H19*、*IGF2*、*IGF2AS*、*INS*、*KCNQ1*、*KCNQ1DN*、*CDKN1C*、*SLC22A18*、*PHLDA2*等,DMR1和DMR2由一个非印记区隔开,分别控制*H19*、*IGF2*、*INS*以及*KCNQ1*、*CDKN1C*等基因的表达。与基因启动子区相比,印记控制区对印记基因的表达调控机制更为复杂。例如,*H19*和*IGF2*分别为母源和父源表达基因,在*H19/IGF2*区域,存在两个关键的调节元件控制着它们的单等位基因表达:*H19*下游的增强

子和*H19*上游的DMR1区。在母源染色体上,CCCTC结合因子(CTCF)结合到低甲基化的DMR1区,建立一个异染色质边界,限制*H19*下游增强子对*IGF2*的转录激活作用;在父源染色体上,高甲基化的DMR1区不能与CTCF结合,因此,*IGF2*能利用*H19*下游的增强子激活转录^[39]。

基因组印记是基因调节的一个重要机制,由于印记的作用,来自父母双方的基因将只有一方表达。基因印记的机制现在还没有完全清楚,但DNA甲基化即使不是主要的作用机制,也是其中的重要因素。在发育过程中,胚胎经历着去甲基化和再次甲基化过程。在成熟生殖细胞中,往往是高甲基状态。一旦受孕后,胚胎发生整个基因组去甲基化,至胚胎着床后,甲基化再次发生^[40]。与胚胎发育相关的Dnmts主要包括3种:Dnmt1o、Dnmt3a2、Dnmt3L,其缺失常导致胚胎死亡。在发育早期,Dnmt1o是维持印记基因甲基化形式的主要酶之一。它在卵细胞1、4细胞阶段存在于胞浆中,8细胞阶段则转移至核内。胚泡植入后,Dnmt1o则被Dnmt1s取代,Dnmt1o基因突变往往引起印记的建立和维持失败^[42]。在人类细胞中,Dnmt3L与Dnmt3a共表达产生显著的从头甲基化效果,虽然Dnmt3L缺乏酶活性,然而却是卵细胞从头甲基化所必需的,Dnmt3L缺乏引起不孕^[41]。研究表明:Dnmt3a能够甲基化*H19*和*Dlk1/Gtl2* DMR以及短串联重复序列SineB1,Dnmt3b是微卫星DNA重复序列甲基化所必需的,Dnmt3a和Dnmt3b都参与*Rasgrfl* DMR和IAP、*Line1*的甲基化,而在Dnmt3L缺陷的鼠精原细胞中,上述序列均发生中至高度的低甲基化。这一方面表明在胚胎的早期发育中,Dnmt3酶起着极其重要的作用^[42]。现在认为:生殖母细胞中的Dnmt3a主要是Dnmt3a2。生理盐浓度下,Dnmt3a2活性受抑制。然而,Dnmt3L的存在能够恢复Dnmt3a2活性。在E14~18 d时,Dnmt3a2和Dnmt3L是精母细胞中的主要酶。在精子形成过程中,Dnmt3a2和Dnmt3L对父源印记基因的区域甲基化起作用,也包括散在重复序列及转座子。在Dnmt3L^{-/-}的配子中,可看到LTR-ERV1元件的转移^[43,44]。在Dnmt3L^{-/-}的减数分裂精母细胞后期发育中,可观察到异常的染色质包装,伴有同源染色体联会失败,最终精子形成终止,精母细胞凋亡^[45]。

3.3 基因组不稳定性与 Dnmts

基因组不稳定包括DNA序列改变, 非整倍体性, 染色体易位, 基因拷贝数增加等。Dnmts可能从以下几个方面影响基因组稳定性: (1)影响端粒的完整性: 生理情况下, 哺乳动物端粒缺乏普通的C_pG序列, 但在其亚端粒区却高度甲基化, 其中机制并不清楚, 可能与Dnmts对非C_pG位点的甲基化有关。而在Dnmts缺陷的ES细胞中, 这种甲基化修饰明显减少, 导致端粒重组增多, 主要表现为姐妹染色体交换增多和端粒长度不一^[46, 47]; (2)影响转座元件的活性: 人类基因组中重复序列, 包括LINE、IAP (Intracisternal A-type particle)序列甲基化等都是些转座元件。在正常情况下, 它们的活性都被甲基化所抑制。Dnmt1单独维持多数C_pG位点的甲基化, Dnmt3a、Dnmt3b协同作用于特定序列, 包括大量的LINE-1 启动子序列, 能够补偿Dnmt1 对内源重复序列甲基化维持不足^[48]。当环境或其他因素导致Dnmts活性降低时, 基因组出现低甲基化状态, 甲基化不足引起众多转座元件的激活, 从而出现基因组不稳定。例如, Dnmt1^{lo}和Dnmt1^{ls}分别在着床前后维持IAP序列甲基化, 其表达缺失将引起IAP元件的大量激活^[49]。转座元件的激活能引起基因组内染色体易位, 基因拷贝数增加等种种基因组不稳定现象; (3)影响DNA错配修复系统(MMR)的效率: 免疫共沉淀实验显示, Dnmt1 与PCNA相结合, 其复合物仍然具有甲基转移酶活性。在哺乳动物中, 无论是S期或非S期细胞, 一旦DNA损伤, 不到一分钟就有Dnmt1 和PCNA积累^[50]。与野生型ES相比, Dnmt1^{-/-}ES细胞展现很高的微卫星不稳定性(MSI)频率。Dnmt1 的丧失可能阻碍DNA复制相关的MMR进程, 从而导致MMR效率的下降。ES细胞中Dnmt1 的缺失引起微卫星位点滑动率增长7倍^[51, 52], 光谱核型分析显示在 Dnmt1 和Dnmt3b敲除的HCT116 细胞内, 出现大量的染色体异常, 其特点是显著的细胞异质性, 自发和持续的染色体重排^[53]。

此外, 在哺乳动物中, Dnmt3a正调控TDG (Thymine DNA glycosylase)活性, 有助于TDG与底物结合、识别和修复G/T错配。当TDG与AP位点脱离之后, Dnmt3a通过与另一DNA修复系统成员LIG3 结合留在修复位点, 继续甲基化过程^[54]。

3.4 染色质修饰体系与 Dnmts

Dnmts除了介导DNA甲基化过程外, 也参与表观遗传染色质修饰。例如: (1)组蛋白去乙酰化酶(HDAC)是组蛋白修饰体系中的一个重要成份, 转录抑制复合物Dnmts/HDAC或MBP/HDAC参与沉默各种组织特异性基因和印记基因。Dnmt1 上有一个转录抑制区, 可以直接募集HDAC1/2。Dnmt3a可以通过ATRAX同源域与HDAC1 结合, 存在于转录沉默的异染色质中, 但它作为辅阻遏物并不具有转甲基酶活性, 其沉默基因的能力主要来自HDAC活性。(2)参与polycomb 蛋白(PcG)作用过程。PcG蛋白与可遗传的基因抑制有关, 其复合物包含两大类: PRC1 和PRC2。PRC1 的核心成分有Pc、Ph、Psc、dRing 和BMI1 等, PRC2 中包括Esc、E(2)、Su(2)12 和RbAP48/Nuvf-55。PRC2 起始基因沉默, PRC1 维持基因抑制状态。PRC2 成员EED和EZH2 募集BMI1 到PcG体, 而复合物的正确组合必需有Dnmts存在^[55]。IP实验证实, BMI1 与Dnmt相关蛋白(Dmap1)直接结合, 进而与Dnmt1 形成三聚体, 最终作用于BMI1 靶位点上, 其中包括Hox基因^[56]。(3)通过Dnmts保守的PHD结构, Dnmt3a、Dnmt1 均能与H3K9 甲基转移酶SUV39H1 以及SUV39H1 结合伴侣HP1 β 结合, 影响它们甲基化H3K9 的活性, 并对H3K4 甲基化也可能产生影响^[57]。此外, Dnmt1 能与hSNF2H染色质重塑酶结合, 高亲和力结合DNA 底物。

3.5 X-染色体灭活与 Dnmts

在哺乳动物胚胎发育中, 两条X-染色体中有一条将随机失活。在人类中, 男性体细胞内X和Y染色体均具有活性, 而在女性体细胞内, 两条X染色体必有一条被灭活, 这种剂量补偿使得两性中X-染色体连锁基因的表达水平均等。X-染色体灭活发生在胚胎发育早期。在小鼠胚胎中, X-染色体与印记有关, 经常固定地沉默父源X-染色体, 而在人类还不清楚是印记灭活还是随机灭活。X-染色体灭活起始依赖于一个主要的控制位点, X-灭活中心(Xic), 其核心是Xist基因, 它是灭活的X-染色体特异性转录产物。Xist的产物是非翻译RNA, 约17 kb。在灭活早期, 两条X-染色体均能转录产物。然而一旦决定哪条被灭活, Xist RNA将结合被选定灭活的X-染色体(Xi), 将其紧紧包被。随后, 活性X-染色体(Xa)的Xist

产物逐渐减少,只有Xi染色体上Xist产物仍旧存在^[58]。资料表明,Xist基因在Xa染色体上5'端被甲基化,而在Xi染色体上其5'端保持非甲基化状态。在鼠/人杂合子中,当用5-aza-dC抑制Dnmts活性后,Xa染色体上Xist基因甲基化明显减少,从而被激活表达^[59]。这些是Dnmt3a、Dnmt3b的从头甲基化功能所致。另外,它们还甲基化Xi染色体上其他基因的C_pG岛,抑制这些基因转录。Xi染色体被灭活后,其复制较晚,常表现高度甲基化,同时伴有组蛋白乙酰化缺失,可能染色质重塑在之后的进程中扮演了重要角色。

3.6 Dnmts 与疾病

Dnmts异常可能通过3种方式改变DNA甲基化模式而导致疾病:(1)正常情况下高甲基化的C_pG岛出现低甲基化或未甲基化的C_pG岛出现高甲基化,从而引起某些基因不正确地激活或沉默。例如,外源性Dnmt1在鼠和人的成纤维细胞内表达后能够促进细胞转化,包括接触抑制减少、甲基化水平上升、瘤源性增高以及纺锤体异常^[60]。在遗传性非息肉性大肠癌(Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, HNPCC)中,15%~20% MSI直肠肿瘤出现hMLH1启动子的高甲基化^[61];(2)印记基因失调影响机体生长发育,与一些先天性疾病有关。Dnmt3a和Dnmt3b在着床前去甲基化后的再次甲基化中起重要作用,Dnmt3a、Dnmt3b的基因失活在ES细胞中引起重复序列和单拷贝基因甲基化进行性丧失,Dnmt3a^{-/-}和Dnmt3b^{-/-}的ES细胞部分或完全丧失分化的能力^[62]。而在一类BWS病人中,ICR的甲基化发生在父母双等位基因上,H19表达缺失,IGF2出现双等位表达,ICR印记失调被认为与Dnmt1缺陷相关;(3)Dnmts功能缺陷引起基因组不稳定。在鼠胚成纤维细胞和人类HCT116细胞中,Dnmt3b的灭活引起全基因组低甲基化,同时出现染色体不稳定现象,主要表现为染色体易位和非整倍性^[53,63]。而鼠源Dnmt1^{-/-}ES细胞中,除出现全基因组低甲基化外,并观察到显著增高的基因突变率^[64]。一种罕见的遗传疾病ICF(Immunodeficiency)综合征就是由于Dnmt3b催化区突变所引起,其表型包括1、9、16号染色体不稳定,其中臂间卫星DNA II、III,序列低甲基化^[65]。另外,衰老的细胞中基因组总体甲基化水平降低,而部分

基因出现高甲基化。与此相应的是Dnmt1活性下降,Dnmt3a、Dnmt3b活性却显著增长^[66]。提示表观信息的紊乱可能也是衰老的原因之一。

此外,研究表明,食物中叶酸、胆碱以及甲硫氨酸等甲基供体的缺乏往往引起基因组甲基化水平紊乱,其中,严重的甲基供体缺乏可引起Dnmt1活性下降,导致全基因组低甲基化^[67-69]。在叶酸强化前后的美国妇女中,叶酸强化后的妇女宫颈组织中Dnmt1表达明显强于叶酸强化前妇女^[70]。由此看来,甲基供体与Dnmts、基因组甲基化以及疾病之间的关系应该得到进一步的关注。由于表观信息的调节具有可逆性,例如使用5-aza-dC及TSA处理人的直肠癌和白血病细胞可再次激活已被甲基化抑制的基因如hMLH1、TIMP3、CDK2B、CDK2A等,这种动态特点使表观遗传在疾病治疗中具有重要作用。因此,Dnmts可能是治疗肿瘤的重要靶标之一^[71]。

4 展望

随着基因组测序的完成,表观基因组学就成为了下一个全球性研究热点。DNA甲基化是一种在真核生物基因组中常见的复制后表观遗传修饰,它参与体内多种重要生物学过程,包括基因表达,基因印记,维持染色体完整性以及X-染色体灭活等。虽然细胞内的DNA甲基化模式能够一代代遗传下去,但这并不代表DNA甲基化模式是一成不变的。环境因素可引起机体细胞内DNA甲基化模式的改变,Dnmts在其中扮演着关键角色,它们的功能变化在机体发育和疾病发生发展中起着重要作用。然而,目前,有关DNA甲基化的作用机理与功能还有待深入研究,特别是探讨环境与DNA甲基化的关系,将进一步提高化学物质暴露引起的基因表达和蛋白质水平变异的辨析率,加速认识表观遗传学改变在人类生长与发育、疾病发展过程中的作用机制。

参考文献(References):

- [1] Holliday R. DNA methylation and epigenetic defects in carcinogenesis. *Mutat Res*, 1987, 181(2): 215-217.
- [2] 艾丽丝 CD, 詹内怀恩 T, 赖因伯格 D, 卡珀若斯 ML. Epigenetics. 北京: 科学出版社, 2007, 15-22.
- [3] Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Na-*

- ture, 2004, 429(6990): 457–463. [\[DOI\]](#)
- [4] Hotchkiss RD. The quantitative separation of purines, pyrimidines and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem*, 1948, 175(1): 315–332.
- [5] Gold M, Hurwitz J. The enzymatic methylation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid. VI. Further studies on the properties of the deoxyribonucleic acid methylation reaction. *J Biol Chem*, 1964, 239(11): 3866–3874.
- [6] Wu JC, Santi DV. Kinetic and catalytic mechanism of *Hha* I methyltransferase. *J Biol Chem*, 1987, 262(10): 4778–4786.
- [7] Rollins RA, Haghighi F, Edwards JR, Das R, Zhang MQ, Ju J, Bestor TH. Large-scale structure of genomic methylation patterns. *Genome Res*, 2006, 16(2): 157–163. [\[DOI\]](#)
- [8] Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(6): 465–476. [\[DOI\]](#)
- [9] Margot JB, Cardoso MC, Leonhardt H. Mammalian DNA methyltransferases show different subnuclear distributions. *J Cell Biochem*, 2001, 83(3): 373–379. [\[DOI\]](#)
- [10] Fatemi M, Hermann A, Pradhan S, Jeltsch A. The activity of the murine DNA methyltransferase *Dnmt1* is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *J Mol Biol*, 2001, 309(5): 1189–1199. [\[DOI\]](#)
- [11] Ko YG, Nishino K, Hattori N, Arai Y, Tanaka S, Shiota K. Stage-by-stage Change in DNA methylation status of *Dnmt1* locus during mouse early development. *J Biol Chem*, 2005, 280(10): 9627–9634. [\[DOI\]](#)
- [12] Ding F, Chaillet JR. *In vivo* stabilization of the *Dnmt1* (cytosine-5)-methyltransferase protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(23): 14861–14866. [\[DOI\]](#)
- [13] Glickman JF, Pavlovich JG, Reich NO. Peptide mapping of the murine DNA methyltransferase reveals a major phosphorylation site and the start of translation. *J Biol Chem*, 1997, 272(28): 17851–17857.
- [14] Goyal R, Reinhardt R, Jeltsch A. Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the *Dnmt1* methyltransferase. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(4): 1182–1188. [\[DOI\]](#)
- [15] Hsieh CL. The *de novo* methylation activity of *Dnmt3a* is distinctly different than that of *Dnmt1*. *BMC Biochem*, 2005, 6: 6. [\[DOI\]](#)
- [16] Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, Li E. Cloning, expression and chromosome locations of the human *Dnmt3* gene family. *Gene*, 1999, 236(1): 87–95. [\[DOI\]](#)
- [17] Chen T, Tsujimoto N, Li E. The PWWP domain of *Dnmt3a* and *Dnmt3b* is required for directing DNA methylation to the major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(20): 9048–9058. [\[DOI\]](#)
- [18] Cheng X, Blumenthal RM. Mammalian DNA methyltransferases: A structural perspective. *Structure*, 2008, 16(3): 341–350. [\[DOI\]](#)
- [19] Aapola U, Mäenpää K, Kaipia A, Peterson P. Epigenetic modifications affect *Dnmt3L* expression. *Biochem J*, 2004, 380(pt 3): 705–713. [\[DOI\]](#)
- [20] Weisenberger DJ, Velicescu M, Cheng JC, Gonzales FA, Liang G, Jones PA. Role of the DNA methyltransferase variant *Dnmt3b3* in DNA methylation. *Mol Cancer Res*, 2004, 2(1): 62–72.
- [21] Nimura K, Ishida C, Koriyama H, Hata K, Yamanaka S, Li E, Ura K, Kaneda Y. *Dnmt3a2* targets endogenous *Dnmt3L* to ES cell chromatin and induces regional DNA methylation. *Genes Cells*, 2006, 11(10): 1225–1237. [\[DOI\]](#)
- [22] Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H, Tajima S. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of *Dnmt3a* and *Dnmt3b* through a direct interaction. *J Biol Chem*, 2004, 279(26): 27816–27823. [\[DOI\]](#)
- [23] Hu YG, Hirasawa R, Hu JL, Hata K, Li CL, Jin Y, Chen T, Li E, Rigolet M, Viegas-Péquignot E, Sasaki H, Xu GL. Regulation of DNA methylation activity through *Dnmt3L* promoter methylation by *Dnmt3* enzymes in embryonic development. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(17): 2654–2664. [\[DOI\]](#)
- [24] Dong A, Yoder JA, Zhang X, Zhou L, Bestor TH, Cheng X. Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(2): 439–448. [\[DOI\]](#)
- [25] Schaefer M, Steringer JP, Lyko F. The *Drosophila* cytosine-5 methyltransferase *Dnmt2* is associated with the nuclear matrix and can access DNA during mitosis. *PLoS ONE*, 2008, 3(1): e1414. [\[DOI\]](#)
- [26] Kunert N, Marhold J, Stanke J, Stach D, Lyko F. A *Dnmt2*-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development*, 2003, 130(21): 5083–5090. [\[DOI\]](#)
- [27] Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE, Bestor TH. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog *Dnmt2*. *Science*, 2006, 311(5759): 395–398. [\[DOI\]](#)
- [28] Rai K, Chidester S, Zavala CV, Manos EJ, James SR, Karpf AR, Jones DA, Cairns BR. *Dnmt2* functions in the cytoplasm to promote liver, brain, and retina development in zebrafish. *Genes Dev*, 2007, 21(3): 261–266. [\[DOI\]](#)

- [29] Jurkowski TP, Meusburger M, Phalke S, Helm M, Nellen W, Reuter G, Jeltsch A. Human DNMT2 methylates tRNA(Asp) molecules using a DNA methyltransferase-like catalytic mechanism. *RNA*, 2008, 14(8): 1663–1670. [\[DOI\]](#)
- [30] Bellacosa A, Cicchillitti L, Schepis F, Riccio A, Yeung AT, Matsumoto Y, Golemis EA, Genuardi M, Neri G. MED1, a novel human methyl-CpG-binding endonuclease, interacts with DNA mismatch repair protein MLH1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(7): 3969–3974. [\[DOI\]](#)
- [31] Yoon JH, Iwai S, O'Connor TR, Pfeifer GP. Human thymine DNA glycosylase (TDG) and methyl-CpG-binding protein 4 (MBD4) excise thymine glycol (Tg) from a Tg: G mispair. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(18): 5399–5404. [\[DOI\]](#)
- [32] Fillion GJ, Zhenilo S, Salozhin S, Yamada D, Prokhortchouk E, Defossez PA. A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(1): 169–181. [\[DOI\]](#)
- [33] Yasui DH, Peddada S, Bieda MC, Vallero RO, Hogart A, Nagarajan RP, Thatcher KN, Farnham PJ, Lasalle JM. Integrated epigenomic analyses of neuronal MeCP2 reveal a role for long-range interaction with active genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(49): 19416–19421. [\[DOI\]](#)
- [34] Li LC, Dahiya R. Methprimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, 2002, 18(11): 1427–1431. [\[DOI\]](#)
- [35] Lorincz MC, Schübeler D, Hutchinson SR, Dickerson DR, Groudine M. DNA methylation density influences the stability of an epigenetic imprint and *Dnmt3a/b*-independent *de novo* methylation. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(21): 7572–7580. [\[DOI\]](#)
- [36] Noh JS, Sharma RP, Veldic M, Salvacion AA, Jia X, Chen Y, Costa E, Guidotti A, Grayson DR. DNA methyltransferase 1 regulates reelin mRNA expression in mouse primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(5): 1749–1754. [\[DOI\]](#)
- [37] Dannenberg LO, Edenberg HJ. Epigenetics of gene expression in human hepatoma cells: expression profiling the response to inhibition of DNA methylation and histone deacetylation. *BMC Genomics*, 2006, 7: 181–192. [\[DOI\]](#)
- [38] Luedi PP, Dietrich FS, Weidman JR, Bosko JM, Jirtle RL, Hartemink AJ. Computational of novel human imprinted genes and experimental identification. *Genome Res*, 2007, 17(12): 1723–1730. [\[DOI\]](#)
- [39] Srivastava M, Hsieh S, Grinberg A, Williams-Simons L, Huang SP, Pfeifer K. H19 and Igf2 monoallelic expression is regulated in two distinct ways by a shared cis acting regulatory region upstream of H19. *Genes Dev*, 2000, 14(10): 1186–1195. [\[DOI\]](#)
- [40] Trasler JM. Gamete imprinting: setting epigenetic patterns for the next generation. *Reprod Fertil Dev*, 2006, 18(1-2): 63–69.
- [41] Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, Sasaki H. Essential role for *de novo* DNA methyltransferase *Dnmt3a* in paternal and maternal imprinting. *Nature*, 2004, 429(6994): 900–903. [\[DOI\]](#)
- [42] Kato Y, Kaneda M, Hata K, Kumaki K, Hisano M, Kohara Y, Okano M, Li E, Nozaki M, Sasaki H. Role of the *Dnmt3* family in *de novo* methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(19): 2272–2280. [\[DOI\]](#)
- [43] Yokomine T, Hata K, Tsudzuki M, Sasaki H. Evolution of the vertebrate *Dnmt3* gene family: a possible link between existence of *Dnmt3L* and genomic imprinting. *Cytogenet Genome Res*, 2006, 113(1–4): 75–80. [\[DOI\]](#)
- [44] Suetake I, Morimoto Y, Fuchikami T, Abe K, Tajima S. Stimulation effect of *Dnmt3L* on the DNA methylation activity of *Dnmt3a2*. *J Biochem*, 2006, 140(4): 553–559. [\[DOI\]](#)
- [45] Webster KE, O'Bryan MK, Fletcher S, Crewther PE, Aapola U, Craig J, Harrison DK, Aung H, Phutikanit N, Lyle R, Meachem SJ, Antonarakis SE, de Kretser DM, Hedger MP, Peterson P, Carroll BJ, Scott HS. Meiotic and epigenetic defects in *Dnmt3L*-knockout mouse spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(11): 4068–4073. [\[DOI\]](#)
- [46] Gonzalo S, Jaco I, Fraga MF, Chen T, Li E, Esteller M, Blasco MA. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(4): 416–424. [\[DOI\]](#)
- [47] Brown KD, Robertson KD. DNMT1 knockout delivers a strong blow to genome stability and cell viability. *Nat Genet*, 2007, 39(3): 289–290. [\[DOI\]](#)
- [48] Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, Laird PW, Jones PA. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(2): 480–491. [\[DOI\]](#)
- [49] Gaudet F, Rideout WM 3rd, Meissner A, Dausman J, Leonhardt H, Jaenisch R. *Dnmt1* Expression in pre- and postimplantation embryogenesis and the maintenance of IAP silencing. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(4): 1640–1648. [\[DOI\]](#)
- [50] Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso MC, Leonhardt H. Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(25): 14640–14645. [\[DOI\]](#)

- 8905–8909. [\[DOI\]](#)
- [51] Wang KY, James Shen CK. DNA methyltransferase *Dnmt1* and mismatch repair. *Oncogene*, 2004, 23(47): 7898–7902. [\[DOI\]](#)
- [52] Kim M, Trinh BN, Long TI, Oghamian S, Laird PW. *Dnmt1* deficiency leads to enhanced microsatellite instability in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(19): 5742–5749. [\[DOI\]](#)
- [53] Karpf AR and Matsui S. Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. *Cancer Res*, 2005, 65(19): 8635–8639. [\[DOI\]](#)
- [54] Li YQ, Zhou PZ, Zheng XD, Walsh CP, Xu GL. Association of *Dnmt3a* and thymine DNA glycosylase links DNA methylation with base-excision repair. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(2): 390–400. [\[DOI\]](#)
- [55] Lund AH, van Lohuizen M. Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(3): 239–246. [\[DOI\]](#)
- [56] Hernandez-Munoz I, Taghavi P, Kuijl C, Neeffed J, van Lohuizen M. Association of BMI1 with polycomb bodies is dynamic and requires PRC2/EZH2 and the maintenance DNA methyltransferase DNMT1. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(24): 11047–11058. [\[DOI\]](#)
- [57] Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(9): 2305–2312. [\[DOI\]](#)
- [58] Minks J, Robinson WP and Brown CJ. A skewed view of X chromosome inactivation. *J Clin Invest*, 2008, 118(1): 20–23. [\[DOI\]](#)
- [59] Tinker AV, Brown CJ. Induction of XIST expression from the human active X chromosome in mouse/human somatic cell hybrids by DNA demethylation. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(12): 2935–2940. [\[DOI\]](#)
- [60] McCabe MT, Low JA, Daignault S, Imperiale MJ, Wojno KJ, Day ML. Inhibition of DNA methyltransferase activity prevents tumorigenesis in a mouse model of prostate cancer. *Cancer Res*, 2006, 66(1): 385–392. [\[DOI\]](#)
- [61] Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(12): 6870–6875. [\[DOI\]](#)
- [62] Jackson M, Krassowska A, Gilbert N, Chevassut T, Forrester L, Ansell J, Ramsahoye B. Severe global DNA hypomethylation blocks differentiation and induces histone hyperacetylation in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(20): 8862–8871. [\[DOI\]](#)
- [63] Dodge JE, Okano M, Dick F, Tsujimoto N, Chen T, Wang S, Ueda Y, Dyson N, Li E. Inactivation of *Dnmt3b* in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization. *J Biol Chem*, 2005, 280(18): 17986–17991. [\[DOI\]](#)
- [64] Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*, 1998, 395(6697): 89–93. [\[DOI\]](#)
- [65] Geiman TM, Sankpal UT, Robertson AK, Chen Y, Mazumdar M, Heale JT, Schmiesing JA, Kim W, Yokomori K, Zhao Y, Robertson KD. Isolation and characterization of a novel DNA methyltransferase complex linking *Dnmt3B* with components of the mitotic chromosome condensation machinery. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(9): 2716–2729. [\[DOI\]](#)
- [66] Casillas MA Jr, Lopatina N, Andrews LG, Tollefsbol TO. Transcriptional control of the DNA methyltransferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(1–2): 33–43.
- [67] Batra V, Mishra KP. Modulation of DNA methyltransferase profile by methyl donor starvation followed by gamma irradiation. *Mol Cell Biochem*, 2007, 294(1–2): 181–187. [\[DOI\]](#)
- [68] Kotsopoulos J, Sohn KJ, Kim YI. Postweaning dietary folate deficiency provided through childhood to puberty permanently increases genomic DNA methylation in adult rat liver. *J Nutr*, 2008, 138(4): 703–709.
- [69] Linhart HG, Troen A, Bell GW, Cantu E, Chao WH, Moran E, Steine E, He T, Jaenisch R. Folate deficiency induces genomic uracil misincorporation and hypomethylation but does not increase DNA point mutations. *Gastroenterology*, 2009, 136(1): 227–235.e3. [\[DOI\]](#)
- [70] Piyathilake CJ, Celedonio JE, Macaluso M, Bell WC, Azrad M, Grizzle WE. Mandatory fortification with folic acid in the United States is associated with increased expression of DNA methyltransferase-1 in the cervix. *Nutrition*, 2008, 24(1): 94–99. [\[DOI\]](#)
- [71] Schmutte C, Jones PA. Involvement of DNA methylation in human carcinogenesis. *Biol Chem*, 1998, 379(4–5): 377–388.