

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00713

# 果蝇 DNA 甲基化研究进展

郭欣欣, 叶海燕, 张敏

陕西师范大学生命科学学院, 西安 710062

**摘要:** DNA 甲基化是表观遗传调控的重要机制, 但果蝇很久以来被认为是一种缺乏甲基化的模式生物。近年来才证实果蝇基因组中有 5'-甲基胞嘧啶残基的存在, 其 DNA 甲基化水平在胚胎发育早期达到最高, 总体水平低于脊椎动物及植物。果蝇拥有一个包含 dDNMT2 和 dMBD2/3 的简单甲基化修饰系统, 其分别与哺乳动物中的 DNMT2 家族及 MBD2/MBD3 蛋白高度同源。果蝇 DNA 甲基化模式和特点可能随果蝇种类不同而不同。文章对果蝇 DNA 甲基化特点及其功能研究进展进行了综述。

**关键词:** DNA 甲基化; 果蝇; 甲基化修饰系统; DNA 甲基转移酶

## DNA methylation in *Drosophila*, a review of recent studies

GUO Xin-Xin, YE Hai-Yan, ZHANG Min

College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

**Abstract:** DNA methylation is a key mechanism underlying epigenetic regulation. Fruit fly has been considered as a free DNA methylation organism until recently a few studies demonstrated that genomic methylated DNA is prevalent during the early embryonic development; but the overall methylation level in *Drosophila* is lower than in vertebrates and plants. The putative genomic DNA methylation system in *Drosophila* contains a methyltransferase termed dDNMT2 and a methyl-binding protein dMBD2/3. dDNMT2 shows significant homology to the mammalian methyltransferases DNMT2 family, and dMBD2/3 encodes a protein with distinct homology to mammalian methyl-binding proteins MBD2 and MBD3. Some studies also indicated that methylation pattern varies among different species of *Drosophila*. This article summarizes the recent progresses in studies of DNA methylation in *Drosophila*.

**Keywords:** DNA methylation; *Drosophila*; DNA methylation system; DNA methyltransferase

表观遗传学(Epigenetics)研究可稳定遗传的、非 DNA 序列改变的修饰, 通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑、基因组印记等方式调控基因表达, 在真核生物基因表达调控中有着举足轻重的地位和意义<sup>[1]</sup>。DNA 甲基化(Methylation)是表观遗传学中研究得最为深入的一种形式, 是表观遗传规律的重要机制, 其广泛存在于细菌、植物和高等动物

中<sup>[2]</sup>。高等真核生物中, DNA 甲基化调节一些重要的生物学功能, 包括胚胎的正常发育、染色质结构的维持、X 染色体失活、基因组印记、基因表达沉默等, 该机制的异化可导致基因表达异常及基因组稳定性降低, 继而促进肿瘤及多种疾病的发生和发展<sup>[3, 4]</sup>。近些年来, 人们在 DNA 甲基化研究方面取得了令人瞩目的成就, 但这些研究大多涉及脊椎动物和植物,

收稿日期: 2010-10-19; 修回日期: 2011-02-07

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(编号: GK201002042), 和陕西省自然科学基金项目(编号: 2007C101)资助

作者简介: 郭欣欣, 硕士研究生, 专业方向: 发育遗传学。Tel: 029-85310266; E-mail: guoxinxin@stu.snnu.edu.cn

通讯作者: 张敏, 副教授, 研究方向: 发育遗传学。E-mail: zhangmin451@snnu.edu.cn

网络出版时间: 2011-5-23 16:51:31

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110523.1651.003.html>

对无脊椎动物(如昆虫)的研究在近几年才有一些进展<sup>[5, 6]</sup>。本文综述了近年来果蝇 DNA 甲基化的研究进展, 并与脊椎动物等在 DNA 甲基化分布、甲基化修饰系统及甲基化特点与功能等方面做了比较。

## 1 DNA 甲基化

### 1.1 DNA 甲基化及其分布

在真核生物基因组中,  $m^5C$  是唯一存在的化学性修饰碱基, 其源于 DNA 链上胞嘧啶第 5 位碳原子和甲基之间的共价结合。在 DNA 甲基化修饰过程中, 胞嘧啶突出于 DNA 双螺旋并嵌入与胞嘧啶甲基转移酶结合部位的裂隙中, 该酶以辅助因子 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM)作为甲基供体, 将甲基转移到胞嘧啶 5'位上, 形成  $m^5C$ <sup>[7]</sup>。根据作用方式及参与反应的酶不同, DNA 甲基化反应分为维持甲基化和全新甲基化两种不同类型<sup>[8]</sup>。

高等真核生物的绝大多数 DNA 甲基化位点分布在 CpG 二核苷酸的 C<sub>5</sub> 位置上, 基因组中 60%~90%的 GC 序列都存在甲基化现象<sup>[9]</sup>, 但甲基化的 DNA 在整个基因组中所占比例通常很少, 同时不同生物中的含量也有较大差异, 如哺乳类和鸟类中约占 5%, 鱼类和两栖类中约占 10%, 昆虫中约占 0%~3%, 而有些植物中约占 30%<sup>[10]</sup>; 对于同种生物而言, 不同组织中或同一组织处于不同发育阶段, 其 DNA 甲基化程度也可能存在差异<sup>[11]</sup>。可见, DNA 甲基化的分布存在种属特异性和组织特异性, 并且可能随生物发育阶段的不同而改变。

### 1.2 高等真核生物 DNA 甲基化修饰系统

随着许多植物、脊椎动物基因组甲基化机制日益清晰, 逐步建立了其 DNA 甲基化模式, 甲基化模式的建立和维持依靠甲基化修饰系统来完成。该系统包含两类重要蛋白质: DNA 甲基转移酶(DNA Methyltransferase, DNMTs)和甲基结合蛋白(Methyl-binding proteins, MBDs)<sup>[12]</sup>。

#### 1.2.1 DNA 甲基转移酶

哺乳动物中, DNA 甲基转移酶可根据结构和功能差异归为 3 类: DNMT1、DNMT2 和 DNMT3<sup>[12]</sup>。*Dnmt1* 基因家族最早被克隆, 其蛋白优先与半甲基化的 DNA 结合, 使 DNA 双链分子中新合成链上与

母链  $m^5C$  对应的胞嘧啶甲基化, 参与 DNA 复制双链中新合成链的甲基化以及基因组甲基化状态的稳定和维持, 与 DNA 链上甲基化的延伸有关<sup>[13]</sup>。

DNMT2 是最广泛的甲基转移酶, 从细菌到人类中都已检测出它的存在, 其蛋白结构紧凑且高度保守。DNMT2 结构与其它 DNMTs 高度相似, 但目前认为它对全新甲基化的催化作用很弱, 且识别位点并不在 CpG 序列, 因而在体外很难检测出其酶活性<sup>[14~16]</sup>; 用基因敲除方法去掉小鼠胚胎干细胞的 *Dnmt2*, 并未引起明显的表型改变, 也未检测到基因组 DNA 甲基化水平的明显降低<sup>[17]</sup>, 因此认为 *Dnmt2* 对于小鼠基因组 DNA 甲基化的维持并非必需。Rai 等<sup>[18]</sup>敲除掉斑马鱼胚胎中的 *Dnmt2*, 导致肝脏、视网膜等分化缺陷, 神经形成异常, 而将人 *Dnmt2* 导入该基因缺陷的斑马鱼可使功能缺陷得以恢复, 则又暗示 DNMT2 具有功能上的保守性。

DNMT3 家族包括 DNMT3a、DNMT3b 和 DNMT3L, 参与对未甲基化 DNA 的全新甲基化<sup>[19]</sup>。*Dnmt3b* 基因突变及酶活性丧失可导致一种罕见的常染色体隐性遗传病, 称免疫缺陷、着丝点不稳定和面部异常(Immunodeficiency, Centromeric instability and Facial anomalies, ICF)综合征<sup>[20]</sup>。哺乳动物发育过程中 DNA 甲基化的建立需要起始性 DNA 甲基转移酶 DNMT3a 及 DNMT3b 在 DNMT3L 等调节因子的精确调控和协同作用下完成。

#### 1.2.2 甲基结合蛋白

哺乳动物中重要的甲基结合蛋白包括: MBD1、MBD2、MBD3、MBD4、MeCP2, 其中 MBD1、MBD2 和 MeCP2 均包含甲基结合域(Methyl-binding domain, MBD), 通过该结构域特异性与甲基化的 DNA 分子结合, 从而改变染色质结构, 以保证基因表达的表观遗传调控<sup>[21, 22]</sup>。MeCP2 是第一个被发现的 MBDs, 该基因突变定与人 Rett 综合征有关, 此病导致女性精神运动发育迟缓, 智力低下<sup>[23]</sup>。MBD2 可招募 NuRD(Nucleosome remodeling and histone deacetylase, 核小体重塑和组蛋白去乙酰化酶)复合物和 MI-2 到甲基化的 DNA 位置, MI-2 是一种参与特殊染色质结构的发育调节因子。MBD3 与 MBD2 结构相似, 但无直接结合甲基化 DNA 的能力, 其与胚胎发育有关。此外, 新近发现的另一个甲基结合蛋白

Kaiso, 其通过锌指结构(Zinc-finger, ZF)与甲基化的 DNA 结合从而抑制基因转录, 与早期胚胎发育和肿瘤发生有关<sup>[24, 25]</sup>。

## 2 果蝇 DNA 甲基化修饰特点

果蝇中是否存在甲基化现象, 一直是研究者想要寻找的答案。20 世纪 80 年代人们用高分辨率的质谱等方法, 对黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)不同发育时期的基因组 DNA 进行了分析, 然而并未发现 DNA 甲基化现象。因此很长一段时期以来, 许多生物包括果蝇、秀丽杆线虫、酵母等, 被认为是典型的缺乏 DNA 甲基化修饰的生物, 并认为可能的原因是由于进化过程中 DNA 甲基转移酶的活性受到抑制或丧失, 亦或是 DNA 甲基化本身就是非必需的, 其可能被其他机制所替代<sup>[26, 27]</sup>。

但是, 脊椎动物 DNA 甲基化修饰系统被发现之后, 促使研究者对果蝇甲基化进行再研究, 因此很快发现了果蝇基因组中的 DNA 甲基化修饰系统, 目前只检测到两个相关基因。

### 2.1 果蝇 DNA 甲基化修饰系统

#### 2.1.1 *dDnmt2*

Hung 等<sup>[28]</sup>和 Tweedie 等<sup>[29]</sup>研究发现 *D.melanogaster* 基因组中的一个基因, 与人、鼠、昆虫等基因组中 *Dnmt2* 基因以及酵母甲基转移酶基因 *pmt* 具有很高同源性, 记作 *dDnmt2*。*D.melanogaster* 中的 *dDnmt2* 包含两个开放阅读框 *dDnmt2* 与 *ORF2*, 之间被 200 bp 的启动子区域隔开并分别反向转录, 两个阅读框的 3' 末端均有 12 bp 的反向末端重复(Inverted terminal repeats, ITRs), 两者同时表达, 转录产物出现在卵巢营养细胞和胚胎发育的早期阶段<sup>[30]</sup>。目前认为 *dDNMT2* 是果蝇中存在的唯一 DNA 甲基转移酶, 同时也有研究报道其具有 tRNA 甲基转移酶活性<sup>[31~33]</sup>。

比较果蝇与哺乳动物中的 DNMT2 蛋白结构发现, DNMT2 蛋白包含 10 个催化基团, 哺乳动物中的 DNMT2 蛋白在催化基团 VIII 和靶识别序列之间有一个额外的 60 个氨基酸的延伸序列, 该序列在果蝇 *dDNMT2* 蛋白中却不存在; 果蝇 *dDNMT2* 蛋白在靶识别序列和催化基团 IX 之间有约 10 个氨基酸的序列延伸, 而在冈比亚按蚊、小鼠及人的蛋白质序

列上却并不存在该延伸片段<sup>[6]</sup>。即使如此, 仍不可否认 DNMT2 蛋白结构的广泛保守性, 而其结构上的差异可能导致甲基化修饰作用在不同生物中有很大差别, 但具体的 DNA 甲基化功能与作用机制尚不清楚, 有待进一步研究。

#### 2.1.2 *dMBD2/3*

*dDnmt2* 被发现的同时, 在果蝇中也检测出另一个基因, 其编码的蛋白质在氨基酸序列上与脊椎动物甲基结合蛋白 MBD2 和 MBD3 高度同源(与 MBD2 有 56% 同源性, 与 MBD3 有 73% 同源性), 记作 *dMBD2/3*, 其在果蝇的胚胎发育早期阶段高度表达<sup>[29, 34]</sup>, 恰好与基因组 DNA 甲基化水平的高峰期相符合。与脊椎动物中的同源物 MBD2 和 MBD3 类似, *dMBD2/3* 与 *dMi-2/NuRD* 之间相互作用后, 与甲基化的 DNA 结合以抑制某些基因转录, 从而维持表观遗传调控<sup>[35, 36]</sup>。此外, MBD2/3 还与初级精母细胞中有活性的 Y 染色体有关<sup>[34]</sup>。与 MBD2 基因敲除小鼠类似, *MBD2/3* 基因敲除的果蝇也具生活力并可育, 但其染色体分离异常, 说明 MBD2/3 对维持着丝粒附近异染色质的稳定性起重要作用<sup>[37]</sup>。

### 2.2 果蝇 DNA 甲基化的特点

*dDnmt2* 和 *dMBD2/3* 的发现说明果蝇基因组中包含一个积极的 DNA 甲基化修饰系统。Lyko 等<sup>[29]</sup>运用高效液相色谱法(High-performance liquid chromatography, HPLC)和薄层层析等技术对不同发育时期的 *D.melanogaster* 基因组进行再分析, 检测出其基因组中含有少量的  $m^5C$ , 且仅存在于胚胎发育早期。研究发现, *D.melanogaster* 基因组 DNA 甲基化修饰存在以下特点: (1) 基因组中甲基化的胞嘧啶总体含量不到 1%(0.1%~0.6%)<sup>[38]</sup>, 比哺乳动物甲基化的最高水平低 40~50 倍<sup>[39]</sup>。显然该特点使得果蝇的 DNA 甲基化研究更为困难; (2) 甲基化水平在相同组织的不同发育阶段有明显差别, 胚胎发育的早期阶段达到最高, 之后甲基化水平明显降低<sup>[38]</sup>。而脊椎动物则在发育晚期也显示大量的甲基化 DNA, 这是由于脊椎动物的 DNA 甲基化更加依赖于即使在发育晚期也具有很高活性的 DNMT1 和 DNMT3; (3) 甲基化序列极不寻常, 大多数甲基化位点发生在不对称的 CpT 和 CpA 二核苷酸序列上, CpG 上的胞嘧啶很少被甲基化修饰。这一点不同于脊椎动物及植物中

DNA 甲基化集中在对称的 CpG 二核苷酸, 其恰好证实果蝇中 dDNMT2 的作用位点主要集中在 CpT 和 CpA, 而脊椎动物及植物中的高水平 CpG 甲基化又很可能由于 CpG 特异的 DNA 甲基转移酶(如 DNMT1)占优势<sup>[12, 38]</sup>。这一特点也使得传统的 CpG 序列特异分析方法在果蝇中难以应用; (4) DNA 甲基化的完成只需要 dDNMT2 一种甲基转移酶的存在, 而脊椎动物则需要多种独立的 DNA 甲基转移酶<sup>[31]</sup>。总之, 以上特点显示 *D.melanogaster* 与脊椎动物在 DNA 甲基化模式上具有很大差异, 并使其成为一种具有特殊 DNA 甲基化特点的动物模型, 进一步了解其甲基化模式及甲基化的功能显得更为有意义。

*D.melanogaster* 基因组甲基化被检测出来之后, 在其它果蝇种类如 *D.simulans*、*D.pseudoobscura*、*D.hydei* 和 *D.virilis* 中也同样检测出 m<sup>5</sup>C 的存在, 这些果蝇基因组中 m<sup>5</sup>C 所占比例与 *D.melanogaster* 处于同一水平, 甲基化修饰的特点基本一致, 不同种的 dDNMT2 蛋白序列具有高度相似性<sup>[6]</sup>, 这一结果从很大程度上阐明了 DNA 甲基化模式及甲基化转移酶 dDNMT2 在不同果蝇种之间的保守性。

最近 Garcia 等<sup>[40, 41]</sup>用对 DNA 甲基化敏感的限制性内切酶(Methylation-Sensitive Restriction Endonuclease, MSRE)及 Southern blotting 技术对 *D.willistoni*、*D.paulistorum* 和 *D.equinoxialis* 的基因组进行检测时发现, 其甲基化模式存在孟德尔遗传不能解释的性别差异, 成年雌果蝇基因组中检测到甲基化, 而在性腺、胚胎、幼虫及成年雄果蝇中却未检测到, 他们用同样的方法却无法在 *D.melanogaster* 中检测出甲基化的性别特异性现象。但在此之前, Lyko 等<sup>[30]</sup>利用 Northern blotting 技术对 *D.melanogaster* 的 *dDnmt2* 进行检测, 就已经发现其两个开放阅读框 *dDnmt2* 和 *ORF2* 均在胚胎期和成年雌果蝇中有强表达, 原位杂交显示雌蝇中杂交信号主要集中在卵巢的营养细胞, 并且去除了卵巢的雌蝇无表达信号。这些结果使得果蝇 DNA 甲基化及其甲基转移酶的研究显得有些扑朔迷离。对 *D.willistoni* 和 *D.melanogaster* 基因组中的 *dDnmt2* 同源序列进行比较, 发现其核苷酸序列有 33% 的差异。 *D.willistoni* 中两个 ORFs 被一个 252 bp 的启动子区域隔开, 该启动子区域与 *D.melanogaster* 中的同源区为 54.5%; 而后者两个 ORFs 的 3'末端有 12 bp 的 ITRs, 但其在 *D.willistoni*

中却并不存在<sup>[40]</sup>。导致甲基化模式有差别的原因可能与不同种群进化历史有关, 亲缘关系较近的种的甲基化模式类似, 亲缘关系较远的种的甲基化模式则可能存在较大差异; 同时也可能与雌性果蝇基因组中的基因剂量补偿作用有关<sup>[30, 40]</sup>。无论怎样, 现有结果都说明果蝇 DNA 甲基化模式及甲基转移酶的功能远比目前所了解的要复杂得多。

### 3 果蝇 DNA 甲基化修饰的功能

在脊椎动物和植物中, DNA 甲基化对基因转录起到开关的作用, 若甲基化位点处于启动子区域, 则通常抑制基因的表达, 因此 DNA 甲基化一般与基因的沉默相关, 而去甲基化则与基因的活化相关。此外, DNA 甲基化在维持正常细胞功能、遗传印记、胚胎发育过程中也起着极其重要的作用。近年来, 不断有研究显示人类肿瘤的发生、发展与抑癌基因启动子区的 CpG 岛甲基化造成抑癌基因关闭有关, 即与 DNA 甲基化的异常有关, 而且早在肿瘤临床确诊之前就可检测出特异基因的甲基化异常现象<sup>[42, 43]</sup>。

果蝇基因组中甲基化的胞嘧啶残基主要分布在基因的编码区域<sup>[44]</sup>, 甲基化修饰又有何作用? 果蝇 DNA 甲基化主要集中在 CpA 和 CpT 双核苷酸位置, 使得其表现遗传信息并非像脊椎动物中那样通过 DNA 复制过程维持, 而更像是由其它机制来调控。虽然目前普遍认为 *Dnmt2* 基因在进化中十分保守, 但果蝇 DNA 甲基化的功能研究才刚开始。

#### 3.1 与胚胎发育的关系

研究发现, DNA 甲基化是小鼠和非洲爪蟾胚胎发育所必需的, DNA 甲基化丢失所导致的相似的胚胎发育缺陷, 可以解释为 DNA 甲基化对于胚胎发育的功能保守<sup>[45, 46]</sup>。但是果蝇中的情况却并非如此。Kunert 等<sup>[31]</sup>用 RNA 干扰方法敲除果蝇胚胎中的 *dDnmt2*, 胚胎基因组 DNA 的甲基化完全消失, 但对胚胎发育并没有产生重大影响, 而超表达 *dDnmt2* 则导致基因组 DNA 在 CpT 和 CpA 处的甲基化水平异常升高, 这表明 *dDnmt2* 对于果蝇 DNA 甲基化是必需的, 但是基因组缺乏甲基化似乎对胚胎发育影响不大, 其可以容忍 DNA 甲基化的完全丧失, 这显然与小鼠或非洲爪蟾中的结果不同。对于果蝇的两个插入突变 *dDnmt2*<sup>149</sup> 和 *dDnmt2*<sup>105</sup> 分析显示, 虽然

未检测到 *dDnmt2* 特异的转录和翻译产物,但其突变纯合体仍然是可存活且可育的<sup>[47]</sup>。而存在于胚胎发育早期的一些微妙的表型变化,则暗示果蝇 DNA 甲基化对于某种未知的细胞功能仍是必需的<sup>[48]</sup>。之后,Salzberg 等<sup>[44]</sup>鉴定出果蝇基因组中存在一些具有严格的发育调控模式的基因,其序列中包含  $m^5C$ ,也说明 DNA 甲基化可能参与发育调控。

### 3.2 与反转录转座子沉默和抗氧胁迫有关

Salzberg 等<sup>[44]</sup>利用  $m^5C$  特异的抗体和亚硫酸氢盐修饰方法还发现, *D.melanogaster* 基因组中 dDNMT2 的甲基化位点是包括反转录转座子及卫星 DNA 在内的重复 DNA 序列,由于其基因组 DNA 甲基化的缺失可导致由转座子引起的基因组高突变率,认为果蝇中的转座子和重复序列由 dDNMT2 及相关蛋白的功能控制。同时,存在于编码可移动因子的 DNA 编码区的  $m^5C$ ,说明果蝇 DNA 甲基化本身可能被作为调控可移动的转座子表达的一种机制<sup>[44]</sup>。但之后 Mandrioli 等<sup>[49]</sup>又对 Salzberg 的结论提出质疑,他们认为果蝇 DNA 甲基化的主要功能若是沉默这些可移动元件,那么鉴定到的属于可移动因子的序列应该比单一序列要多;而事实上在 Salzberg 等鉴定出的包含  $m^5C$  的 27 条基因序列中,仅有 4 个与转座子有关,5 个与重复序列有关。因此 Mandrioli 认为 DNA 甲基化在果蝇基因组中广泛存在,而并不具有转座子和反转录转座子这样的靶序列特异性。

当然,果蝇 DNA 甲基化与转座子沉默之间的调控关系并不能被完全否认。最近的研究表明,依赖于 DNMT2 的 DNA 甲基化在果蝇胚胎发育早期可以调控体细胞中的反转录转座子的沉默,这一过程的维持依赖于由 SUV4-20 组蛋白甲基转移酶催化的组蛋白 H4K20 三甲基化<sup>[47, 50]</sup>。此外, *dDnmt2* 突变会导致亚端粒 *Invader4* 重复序列的稳定丢失,说明 *dDnmt2* 对于果蝇早期生殖细胞中染色体 2R 和 3R 端粒重复序列的维持和基因组稳定具有重要作用<sup>[47]</sup>;但这一结果新近又受到 Schaefer 和 Lyko<sup>[51]</sup>的质疑,他们通过实验证明 dDNMT2 并没有使果蝇基因组 DNA 中的 *Invader4* 序列发生甲基化。可见果蝇 DNA 甲基化研究一直以来都是颇具争议,而 dDNMT2 是否参与果蝇基因组中重复序列的表达调控尚待进一步研究。

Lin 等<sup>[52]</sup>的研究支持了 *dDnmt2* 过度表达会导致 CpT 和 CpA 二核苷酸上的胞嘧啶过度甲基化,同时可提高果蝇的抗饥饿和抗氧化能力,并可能通过调节某些小热激蛋白(Hsp22、Hsp23、Hsp26)基因的表达延长果蝇寿命,说明基因组甲基化可能与抗氧胁迫有关,并且果蝇基因组中的甲基化有可能促进基因表达。而最近 Schaefer 等<sup>[33]</sup>应用果蝇 *dDnmt2*<sup>99</sup> 突变进行研究,也支持 dDNMT2 与热激和抗氧胁迫等应激反应途径有关。

### 3.3 与组蛋白甲基化有关

组蛋白甲基化是由组蛋白甲基转移酶完成的,通过赖氨酸或精氨酸残基上的甲基化调节基因表达。在粗糙脉胞菌中, dim-2 调节的 DNA 甲基化显示出依赖于组蛋白 H3 甲基转移酶 dim-5 的活性<sup>[53]</sup>;而拟南芥中 CHROMOMETHYLASE-3 调节的 DNA 甲基化也明显依赖于组蛋白 H3 甲基转移酶 KRYPTONITE 的活性<sup>[54]</sup>。与这些结果类似,果蝇基因组 DNA 甲基化和组蛋白甲基化之间也显示相互作用和相互依赖的关系。果蝇 *Su(Var)3-9* 组蛋白甲基转移酶可特异性使着丝粒异染色质区的组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸(H3K9)加上甲基, *Su(Var)3-9* 基因缺失突变的果蝇胚胎是可存活并且成蝇可育的,但对该基因缺失突变的果蝇胚胎进行免疫荧光染色显示  $m^5C$  信号显著降低,表明 DNA 甲基化可能在某种程度上依赖于组蛋白 H3K9 甲基化转移酶 *Su(Var)3-9* 的活性<sup>[31, 55]</sup>。这些结果不仅说明二者的相互作用可以加强或者抑制表观遗传改变,而且表明 DNA 甲基化和组蛋白甲基化相互作用具有功能保守性。

## 4 展望

总之,现在认为果蝇基因组中包含了一个积极的 DNA 甲基化系统,其通过 DNA 甲基化和染色体重塑相关机制建立和维持其发育过程中的表观遗传信息。与脊椎动物不同,果蝇大多数  $m^5C$  是发生在基因组 CpT 或 CpA 双核苷酸上,仅在胚胎发育早期可检测到相对脊椎动物较低但却显著的甲基化水平;构成果蝇 DNA 甲基化系统的 dDNMT2 和 dMBD2/3 均显示了在结构上的广泛保守性,二者表达的时期恰好与检测到 DNA 甲基化的时期高度一致,但果蝇 DNA 甲基化的生物学功能目前仍不很清楚。此外,

目前关于果蝇甲基化研究尚缺乏有关 dDNMT2 的体内实验证据, 尚未在体内检测到 MBD2/3 与果蝇 DNA 的结合, 建立和分析果蝇的各种 *dDnmt2* 及 *dMBD2/3* 的基因突变系对其功能研究也显得尤为重要。比起脊椎动物中存在的多种甲基转移酶和甲基结合蛋白, 果蝇的 DNA 甲基化系统显得特殊而简单, 这使其成为一种甲基化研究的较好模型, 可能会揭示一些新的 DNA 甲基化的生物学功能。

另外, 同经典遗传规律一样, DNA 甲基化修饰也受到环境的影响。研究表明瞬间化学物质暴露会影响基因的表达以及甲基化的修饰模式, 从而改变生物体的甲基化水平, 通过遗传将影响传递给子代<sup>[56]</sup>。而对果蝇的研究还未涉及这些, 因此探讨果蝇基因组中甲基化修饰与环境的关系, 研究瞬间化学物质暴露对亲本及子代中 DNA 甲基化模式的影响等, 必将成为新的研究方向, 为人类生长及发育等方面的研究开辟新的途径。

#### 参考文献(References):

- [1] Wu CT, Morris JR. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science*, 2001, 293(5532): 1103–1105.
- [2] Weinhold B. Epigenetics: the science of change. *Environ Health Perspect*, 2006, 114(3): A160–A167.
- [3] Lloyd V. Parental imprinting in *Drosophila*. *Genetica*, 2000, 109(1–2): 35–44.
- [4] Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(6): 415–428.
- [5] Field LM, Lyko F, Mandrioli M, Prantera G. DNA methylation in insects. *Insect Mol Biol*, 2004, 13(2): 109–115.
- [6] Marhold J, Rothe N, Pauli A, Mund C, Kuehle K, Brueckner B, Lyko F. Conservation of DNA methylation in dipteran insects. *Insect Mol Biol*, 2004, 13(2): 117–123.
- [7] Vanyushin BF. DNA methylation and epigenetics. *Russ J Genet*, 2006, 42(9): 985–997.
- [8] Margot JB, Cardoso MC, Leonhardt H. Mammalian DNA methyltransferases show different subnuclear distributions. *J Cell Biochem*, 2001, 83(3): 373–379.
- [9] Gruenbaum Y, Stein R, Cedar H, Razin A. Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. *FEBS Lett*, 1981, 124(1): 67–71.
- [10] Adams RLP. Chapter 3 DNA methylation. *Principles of Medical Biology*, 1996, 5: 33–66.
- [11] Vogt G, Huber M, Thiemann M, van den Boogaart G, Schmitz OJ, Schubart CD. Production of different phenotypes from the same genotype in the same environment by developmental variation. *J Exp Biol*, 2008, 211(4): 510–523.
- [12] Lyko F. DNA methylation learns to fly. *Trends Genet*, 2001, 17(4): 169–172.
- [13] Bestor TH. Cloning of a mammalian DNA methyltransferase. *Gene*, 1988, 74(1): 9–12.
- [14] Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang XY, Golik KG, Jacobsen SE, Bestor TH. Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 2006, 311(5759): 395–398.
- [15] Dong AP, Yoder JA, Zhang X, Zhou L, Bestor TH, Cheng XD. Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA. *Nucl Acids Res*, 2001, 29(2): 439–448.
- [16] Ponger L, Li WH. Evolutionary diversification of DNA methyltransferases in eukaryotic genomes. *Mol Biol Evol*, 2005, 22(4): 1119–1128.
- [17] Okano M, Xie SP, Li E. Dnmt2 is not required for *de novo* and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucl Acids Res*, 1998, 26(11): 2536–2540.
- [18] 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.
- [19] Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell*, 1999, 99(3): 247–257.
- [20] Ehrlich M, Jackson K, Weemaes C. Immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome (ICF). *Orphanet J Rare Dis*, 2006, 1(1): 2–10.
- [21] Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression—belts, braces, and chromatin. *Cell*, 1999, 99(5): 451–454.
- [22] Ng HH, Adrian B. DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev*, 1999, 9(2): 158–163.
- [23] Amir RE, van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet*, 1999, 23(2): 185–188.
- [24] Ruzov A, Dunican DS, Prokhortchouk A, Pennings S, Stancheva I, Prokhortchouk E, Meehan RR. Kaiso is a genome-wide repressor of transcription that is essential for amphibian development. *Development*, 2004, 131(24): 6185–6194.
- [25] Prokhortchouk A, Hendrich B, Jørgensen H, Ruzov A, Wilm M, Georgiev G, Bird A, Prokhortchouk E. The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev*, 2001, 15(13): 1613–1618.
- [26] Urieli-Shoval S, Gruenbaum Y, Sedat J, Razin A. The absence of detectable methylated bases in *Drosophila melanogaster* DNA. *FEBS Lett*, 1982, 146(1): 148–152.
- [27] Patel CV, Gopinathan KP. Determination of trace amounts of

- 5-methylcytosine in DNA by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 1987, 164(1): 164–169.
- [28] Hung MS, Karthikeyan N, Huang B, Koo HC, Kiger J, Shen CK. *Drosophila* proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(21): 11940–11945.
- [29] Tweedie S, Ng HH, Barlow AL, Turner BM, Hendrich B, Bird A. Vestiges of a DNA methylation system in *Drosophila melanogaster*? *Nat Genet*, 1999, 23(4): 389–390.
- [30] Lyko F, Whittaker AJ, Orr-Weaver TL, Jaenisch R. The putative *Drosophila* methyltransferase gene *dDnmt2* is contained in a transposon-like element and is expressed specifically in ovaries. *Mech Dev*, 2000, 95(1–2): 215–217.
- [31] 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.
- [32] Schaefer M, Lyko F. Solving the Dnmt2 enigma. *Chromosoma*, 2010, 119(1): 35–40.
- [33] Schaefer M, Pollex T, Hanna K, Tuorto F, Meusburger M, Helm M, Lyko F. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes Dev*, 2010, 24(15): 1590–1595.
- [34] Marhold J, Zbylut M, Lankenau DH, Li MF, Gerlich D, Ballestar E, Mechler BM, Lyko F. Stage-specific chromosomal association of *Drosophila* dMBD2/3 during genome activation. *Chromosoma*, 2002, 111(1): 13–21.
- [35] Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet*, 1999, 23(1): 58–61.
- [36] Vermaak D, Ahmad K, Henikoff S. Maintenance of chromatin states: an open-and-shut case. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15(3): 266–274.
- [37] Marhold J, Kramer K, Kremmer E, Lyko F. The *Drosophila* MBD2/3 protein mediated interactions between the MI-2 chromatin complex and CpT/A-methylated DNA. *Development*, 2004, 131(24): 6033–6039.
- [38] Lyko F, Ramsahoye BH, Jaenisch R. DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 2000, 408(30): 538–540.
- [39] Gama-Sosa MA, Midgett RM, Slagel VA, Githens S, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M. Tissue-specific differences in DNA methylation in various mammals. *Biochim Biophys Acta*, 1983, 740(2): 212–219.
- [40] Garcia RN, D'Ávila MF, Robe LJ, da Silva Loreto EL, Panzera Y, de Heredia FO, da Silva Valente VL. First evidence of methylation in the genome of *Drosophila willistoni*. *Genetica*, 2007, 131(1): 91–105.
- [41] D'Ávila MF, Garcia RN, Panzera Y, da Silva Valente VL. Sex-specific methylation in *Drosophila*: an investigation of the *Sophophora* subgenus. *Genetica*, 2010, 138(8): 907–913.
- [42] Paz MF, Fraga MF, Avila S, Guo M, Pollan M, Herman JG, Esteller M. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res*, 2003, 63(5): 1114–1121.
- [43] 任晨春, 苗绪红, 杨斌, 赵磊, 孙蕊, 宋文芹. 宫颈癌患者血浆和组织中 FHIT 基因 5'端 CpG 岛甲基化状态的研究. *遗传*, 2006, 28(9): 1061–1066.
- [44] Salzberg A, Fisher O, Siman-Tov R, Ankri S. Identification of methylated sequences in genomic DNA of adult *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 322(2): 465–469.
- [45] Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 1992, 69(6): 915–926.
- [46] Stancheva I, Meehan RR. Transient depletion of xDnmt1 leads to premature gene activation in *Xenopus* embryos. *Genes Dev*, 2000, 14(3): 313–327.
- [47] Phalke S, Nickel O, Walluscheck D, Hortic F, Onorati MC, Reuter G. Retrotransposon silencing and telomere integrity in somatic cells of *Drosophila* depends on the cytosine-5 methyltransferase DNMT2. *Nat Genet*, 2009, 41(6): 696–702.
- [48] Lyko F, Beisel C, Marhold J, Paro R. Epigenetic regulation in *Drosophila*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, 310: 23–44.
- [49] Mandrioli M, Borsatti F. DNA methylation of fly genes and transposons. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(17): 1933–1936.
- [50] Sakaguchi A, Karachentsev D, Seth-Pasricha M, Druzhinina M, Steward R. Functional characterization of the *Drosophila* Hmt4-20/Suv4-20 histone methyltransferase. *Genetics*, 2008, 179(1): 317–322.
- [51] Schaefer M, Lyko F. Lack of evidence for DNA methylation of *Invader4* retroelements in *Drosophila* and implications for Dnmt2-mediated epigenetic regulation. *Nat Genet*, 2010, 42(11): 920–921.
- [52] Lin MJ, Tang LY, Reddy MN, Shen CK. DNA methyltransferase gene *dDnmt2* and longevity of *Drosophila*. *Biol Chem*, 2005, 280(2): 861–864.
- [53] Tamaru H, Selker EU. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature*, 2001, 414(6861): 277–283.
- [54] Jackson JP, Lindroth AM, Cao XF, Jacobsen SE. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, 2002, 416(6880): 556–560.
- [55] Weissmann F, Muirers-Chen I, Musch T, Stach D, Wiessler M, Paro R, Lyko F. DNA hypermethylation in *Drosophila melanogaster* causes irregular chromosome condensation and dysregulation of epigenetic histone modifications. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(7): 2577–2586.
- [56] Vandegehuchte MB, Lemièrre F, Janssen CR. Quantitative DNA-methylation in *Daphnia magna* and effects of multi-generation Zn exposure. *Comp Biochem Physiol Part C*, 2009, 150(3): 343–348.