

TET 蛋白的去甲基化机制及其在调控小鼠发育过程中的作用

贾振伟, 高树新, 张永春, 张显华

内蒙古民族大学动物科技学院, 黄牛遗传繁育研究所, 通辽 028043

摘要: TET(Ten-eleven translocation)蛋白家族共有 3 个成员, 分别为 TET1、TET2 和 TET3, 均属于 α -酮戊二酸(α -KG)和 Fe^{2+} 依赖的双加氧酶, 可以将 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5 mC)氧化为 5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5 hmC)、5-甲酰基胞嘧啶(5-formylcytosine, 5 fC)及 5-羧基胞嘧啶(5-carboxylcytosine, 5 caC)。研究表明, TET 蛋白通过不同机制以主动或被动的方式调控 DNA 去甲基化, 且去甲基化的活性可能受其他因子的调控。TET 蛋白广泛参与哺乳动物发育过程的调节, 其中在原始生殖细胞的形成、胚胎发育、干细胞多能性及神经和脑发育等方面发挥了重要作用。TET 蛋白生物功能的发现为表观遗传学研究开辟了全新的研究领域, 而且相关研究结果对拓展生命科学研究具有重要意义。文章综述了 TET 蛋白家族的结构、去甲基化分子机制及在小鼠发育过程中的作用, 为深入了解 TET 蛋白的功能提供理论基础。

关键词: TET 蛋白; 去甲基化; 表观遗传; 小鼠发育

Mechanisms of TET protein-mediated DNA demethylation and its role in the regulation of mouse development

Zhenwei Jia, Shuxin Gao, Yongchun Zhang, Xianhua Zhang

Institute of Yellow Cattle Genetics-Breeding and Reproduction, College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao 028000, China

Abstract: TET (ten-eleven translocation) protein family includes three members TET1, TET2 and TET3, which belong to α -ketoglutaric acid (α -KG)- and Fe^{2+} -dependent dioxygenase superfamily, and have the capacity to convert 5-methylcytosine (5 mC) to 5-hydroxymethylcytosine (5 hmC), 5-formylcytosine (5 fC) and 5-carboxylcytosine (5 caC). At present, growing lines of evidence indicate that TET proteins are involved in the control of active or passive DNA demethylation via different mechanisms; moreover, their activities may be regulated by some cellular factors. TET proteins play vital roles in modulating mammal development, including primordial germ cell formation, embryonic development, stem cells pluripotency, nerve and brain development, etc. The identification of biological roles of TET proteins will open a new field in epigenetic research, and these studies on TET proteins are of great significance to life science research. Here, we review TET proteins from their structure, molecular mechanisms of

收稿日期: 2014-04-08; 修回日期: 2014-09-20

基金项目: 内蒙古民族大学博士科研启动基金项目(编号: BS299)资助

作者简介: 贾振伟, 博士, 研究方向: 配子与胚胎生物技术研究。E-mail: zhenwei1999@sina.com

通讯作者: 张显华, 教授, 研究方向: 配子与胚胎生物技术研究。E-mail: zxh7469@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.2015.01.005

网络出版时间: 2014-12-16 13:07:36

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.3724/SP.J.1005.2014.0000.html>

DNA demethylation and function in the regulation of mouse development, which may provide the basis for understanding the functions of TET proteins.

Keywords: TET proteins; demethylation; epigenetics; mouse development

DNA 甲基化是一种重要的表观遗传修饰方式,在哺乳动物体内,DNA 甲基化修饰主要发生在胞嘧啶第 5 位碳原子上,称为 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5 mC)。DNA 甲基化参与了诸多的生物学过程,包括维持正常细胞功能、胚胎发育、遗传印记、细胞分化、X 染色体失活以及肿瘤发生等。胞嘧啶的甲基化修饰是一个动态可逆过程,即 5 mC 还存在去甲基过程,但对其机制还知之甚少。研究表明,TET(Ten-eleven translocation)蛋白通过将 5 mC 氧化参与 DNA 去甲基化的途径^[1,2],因此,TET 蛋白介导的 DNA 去甲基化机制成为近年来表观遗传研究领域的热点。目前,许多研究发现 TET 蛋白的去甲基化功能在调控哺乳动物原始生殖细胞的形成、胚胎发育、干细胞多能性及脑和神经发育等生命过程中发挥了重要作用,并且该领域取得了大量的研究进展^[3~7]。基于此,本文综述了 TET 蛋白种类结构、去甲基化分子机制及在小鼠发育过程中的作用,为深入了解 TET 蛋白的功能提供理论基础。

1 TET 蛋白种类及结构

哺乳动物 TET 蛋白家族共有 3 个成员,分别为 TET1、TET2 和 TET3,其中 TET1 和 TET3 蛋白在 N 端区域含有 CXXC 型锌指结构。目前研究认为,TET1 的锌指结构能够识别未甲基化的胞嘧啶、5 mC 和 5 hmC,并且更易结合在未甲基化的 CpG 含量高的区域^[8];TET3 的锌指结构能够识别 CpG 和非 CpG 未甲基化的胞嘧啶,保证了其准确的染色体定位,但具

体功能尚不确定^[9]。TET2 不含有 CXXC 结构域,可能在 CXXC4 蛋白辅助的作用下保证其准确的基因定位^[10]。

另外,TET 蛋白在靠近 C 端区域拥有一个催化结构域(Catalytic-dioxygenase domain),该结构域具有 3 个金属离子(Fe^{2+})和 1 个 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, α -KG)的结合位点,催化结构域前还有一段富含半胱氨酸区域(Cys-rich domain)。TET 蛋白催化结构域(Catalytic-domain)和半胱氨酸区组成的结构具有 α -KG 和 Fe^{2+} 依赖的双加氧酶活性(图 1),在 α -KG 和 Fe^{2+} 的辅助下,TET 蛋白通过将 5 mC 氧化为 5 hmC 参与 DNA 去甲基化的途径。

2 TET 蛋白的去甲基化机制

目前普遍认为,TET 蛋白以主动或被动的方式催化 DNA 去甲基化,且其过程存在多种途径和机制,涉及多种蛋白的参与(图 2)。在 TET 蛋白催化 DNA 主动去甲基化机制方面,Guo 等^[11]研究认为,TET 蛋白将 5 mC 氧化为 5 hmC,然后 5 hmC 在活化诱导脱氨酶(Activation-induced deaminase, AID)的作用下脱氨基,形成 5-羟甲基尿嘧啶(5-hydroxymethyluracil, 5 hmU),而且 AID 也能将 5 mC 脱氨基,5 hmC/5 mC 脱氨基产物经碱基切除修复(Base-excision repair, BER)途径实现 DNA 主动去甲基化。另外,TET 蛋白氧化 5 mC 为 5 hmC,也可以将 5 hmC 继续氧化为 5-甲酰基胞嘧啶(5-formylcytosine, 5 fC)和 5-羧基胞嘧啶(5-carboxylcytosine, 5 caC),5 fC/5 caC 在胸

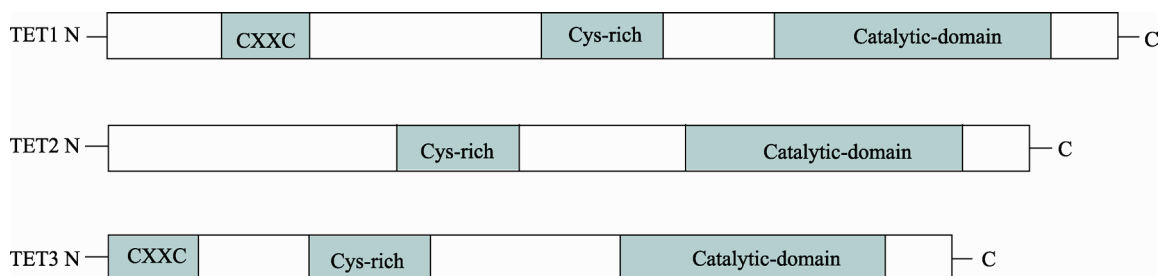


图 1 TET 家族蛋白结构

TET 蛋白家族含有富含半胱氨酸区域和催化结构域两个保守区域,同时 TET1 和 TET3 也含有一个 CXXC 型锌指结构域。

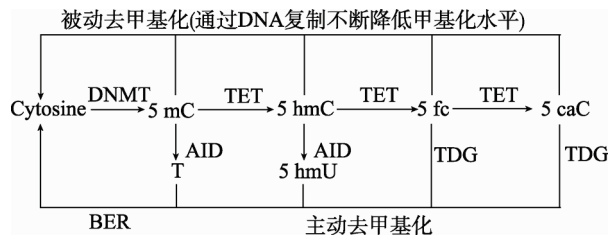


图 2 TET 蛋白调控 DNA 去甲基化途径和机制

TET 蛋白将 5 mC 氧化为 5 hmC, 然后将 5 hmC 继续氧化为 5 fC 和 5 caC, 5 fC/5 caC 被 TDG 识别和切除后形成无甲基化修饰的胞嘧啶。AID 催化 5 mC 和 5 hmC 脱氨基形成胸腺嘧啶(T)和 5-羟甲基尿嘧啶(5 hmU), 然后通过 BER 途径介导实现去甲基化。5 mC 一系列氧化衍生物通过 DNA 复制, 甲基化水平不断降低, 进而实现被动去甲基化。

腺嘧啶 DNA 糖基化酶(Thymine DNA glycosylase, TDG)以及 BER 通路的作用下被修复产生未修饰的胞嘧啶, 进而实现 DNA 主动去甲基化^[2,12,13]。在 TET 蛋白催化 DNA 被动去甲基化机制方面, Valinluck 等^[14,15]发现, 细胞分裂期间 TET 蛋白将 5 mC 氧化为 5 hmC, 5 hmC 能够阻滞 Dnmt1 的维持甲基化作用, 致使随后的 DNA 复制循环中稀释/降低基因组中甲基化胞嘧啶的密度, 进而实现 DNA 被动去甲基化。在受精卵早期发育过程中, 随着 DNA 的复制, 基因组的 5 hmC、5 fC 和 5 caC 水平逐渐减少, 这种被动的去甲基化是受精卵早期发育过程中的重要机制^[16]。

另外, TET 蛋白去甲基化的活性可能受其他因子的调控。例如, 维生素 C 是 TET 蛋白的辅助因子, 通过增强 TET1/2 氧化 5 mC 的能力促进胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ESCs)DNA 去甲基化^[17]。锌指蛋白转录抑制因子(Positive regulatory domain zinc finger protein, PRDM)家族成员 PRDM14 能够促进 TET1/2 募集到靶基因位点, 增强 TET1/2 主动去甲基化的能力, 进而诱导 ESCs 的多能性相关基因、生殖细胞特异性基因及印记基因去甲基化^[18]。糖基转移酶(O-GlcNAc transferase, OGT)能够催化 TET3 O-GlcNAc 糖基化, 同时促进 TET3 向细胞核外转运, 进而抑制其去甲基化的能力^[19]。

3 TET 蛋白在小鼠发育过程中的作用

3.1 原始生殖细胞及配子发育

一般认为, 小鼠胚胎发育至 7.25 d(Embryonic day 7.25, E7.25)外胚层原始生殖细胞(Primordial

germ cell, PGCs)开始特化, 随后逐渐向胚内迁移, 在胚胎期 E11.5 大量 PGCs 进入生殖嵴, PGCs 迁移期间经历广泛的表观重编程, 包括 DNA 去甲基化、基因组印记消除及染色体重构^[20-22]。近年研究发现, TET1 和 TET2 在小鼠 E9.25-11.5 期的 PGCs 高表达, 但 TET3 不表达, 说明 TET1/2 可能是 PGCs DNA 去甲基化的主要介导者^[7,23,24]。另外, 基于 TET1/2 在小鼠 PGCs 的表达, Yamaguchi 等^[25]分析了不同发育时期 PGCs 的 5 mC 和 5 hmC 水平, 发现 5 mC/5 hmC 水平在 E8.5 较低, 5 hmC 水平在 E9.5-10.5 期间开始增加, 发育至 E11.5 达到峰值后逐渐下降。然而, Gu 等^[26]发现, TET1/2 在 PGCs 表达较高, 但在卵母细胞内表达较少, 相反, TET3 在卵母细胞内表达较高, 说明 TET3 可能是卵母细胞 DNA 去甲基化的主要介导者^[27]。

另外, 一些学者将小鼠 *Tet1/2* 基因突变或敲除发现, 在 TET1/2 蛋白表达缺陷的条件下, 并没有影响 PGCs 基因组范围内去甲基化, 但导致特定位点基因去甲基化异常, 同时影响了一些与减数分裂和印记相关的基因表达^[7,28]。但小鼠 *Tet1/2/3* 基因被敲除后, PGCs 能够形成正常的精子或卵母细胞^[26,29,30]。综上所述, TET 蛋白参与了 PGCs 表观重编程, 但没有显著影响 PGCs 的发育及配子的形成。

3.2 受精卵发育

雌雄配子受精后形成受精卵的过程也存在基因组 DNA 去甲基化现象, 在受精后启动 DNA 复制前, 父源基因组 DNA 迅速的发生主动去甲基化, 而母源基因组仍然保持甲基化状态, 随着卵裂的进行, 母源基因组发生被动的脱甲基化^[31]。目前研究认为, 5 mC 氧化似乎是父源基因组 DNA 去甲基化的关键步骤, TET3 可能是受精卵 DNA 去甲基化的主要介导者。例如, 受精卵雄原核 5 mC 水平减少的同时, 5 hmC、5 fC 和 5 caC 水平迅速增加^[32,33]。TET1/2 在受精卵表达较低, 但 TET3 表达较高^[33], 并且 *Tet3* 基因被敲除后阻碍了受精卵雄原核 5 mC 转化为 5 hmC^[26]。另外, 尽管 BER 途径参与了附植前胚胎主动去甲基化, 但 5 hmC、5 fC 和 5 caC 似乎没有迅速地被未甲基化的碱基 C 代替^[34,35], 相反它们持久存在父源基因组中, 并且随着卵裂含量逐渐下降^[26,32], 揭示附植前胚胎发育期间, 这些修饰碱基可能通过 DNA

复制的机制被稀释消除。但 TET3 氧化 5 mC 达到多程度后进行 DNA 复制,导致受精卵父源基因组被动去甲基化尚不确定。

3.3 胚胎附植及胚胎干细胞发育

随着受精卵发育至囊胚阶段, TET1/2/3 呈现差异表达模式,其中 TET1/2 在内细胞团和 ESCs 上高表达,但 TET3 表达较少^[3,32,33],说明 TET1/2 可能与维持 ESCs 多能性有关。Ficz 等^[4]采用基因敲降的方法研究 TET1/2 在维持 ESCs 多能性的作用,发现 *Tet1/2* 同时敲降的条件下一些与 ESCs 多能性相关的基因表达下调,进而导致 ESCs 分化。另外,由于 TET1 能够将 5 mC 氧化为 5 hmC, Ito 等^[3]研究发现,小鼠 TET 家族蛋白都能将 5 mC 催化为 5 hmC,其中 TET1 蛋白在小鼠 ESCs 上特异表达, *Tet1* 基因敲降后导致 5 hmC 水平下降、*Nanog* 基因近端启动子区域甲基化水平增加,进而使 *Nanog* 基因表达量下降,最终导致囊胚内细胞团细胞分化为滋养层细胞,揭示 TET 蛋白的氧化产物 5 hmC 可能参与了小鼠 ESCs 的 DNA 去甲基化,进而影响了基因的表达调控。随后, Wu 和 Zhang^[36]发现, TET1 和 5 hmC 在小鼠 ESCs 一些多能性基因启动子区域富集丰富。

为了深入了解 5 hmC 的功能,许多学者对其在小鼠 ESCs 基因组中的分布进行了研究。最近研究发现, 5 hmC 在基因组不同区域的分布水平受 TET1/TET2 调控,即 TET1 主要调控基因启动子区的 5 hmC 水平, TET2 主要调控基因内(Gene body)的 5 hmC 水平^[37]。在启动子区域, 5 hmC 主要富集于 CpG 含量为低中度水平的启动子区域,而且这些基因表达水平较低。另外, 5 hmC 在组蛋白二价标记(H3K4me3+/ H3K27me3+)的启动子区也大量富集。H3K4me3+是激活基因表达的一种组蛋白修饰; H3K27me3+由 PRC2(Polycomb repressive complex 2)蛋白复合体催化形成,是抑制基因表达的一种组蛋白修饰。5 hmC 存在于组蛋白二价标记的基因启动子区域,说明 TET1 和 5 hmC 可能具有转录沉默的作用。Wu 和 Zhang^[36]发现, TET1 不仅与转录活性高的基因启动子结合,而且也与 PRC2 抑制基因的启动子结合。Wu 等^[38]认为, 5 hmC 在小鼠 ESCs 的 TET1/ PRC2 结合的基因启动子区含量丰富, *Tet1* 基因敲除后导致基因

组范围内 TET1 结合基因的启动子区 5 hmC 水平的减少。Wu 等^[6]发现,小鼠 ESCs 的 *Tet1* 基因敲除后,干扰了 TET1 募集 PRC2 核心亚基(Ezh2)至组蛋白二价标记基因的启动子区域。以上研究揭示, TET1 和 5 hmC 可能通过 PRC2 的介导抑制 ESCs 分化基因的表达。5 hmC 除了在基因的启动子区域富集外,其在基因内部特别是外显子区域也高度富集^[4],而且在转录起始位点、5' 非翻译区及活跃的增强子和绝缘子等顺式调控元件位点富集程度也较高^[4, 38, 39]。5 hmC 在基因内部和顺式调控元件位点富集与转录激活有关^[4,38,39]。另外,许多学者在研究 TET1 和 5 hmC 调控 ESCs 基因表达的功能时发现,小鼠 ESCs 的 *Tet1* 基因被敲除后导致与细胞分化相关的基因(*Cdx2*、*Sox17* 及 *Krt8*)表达上调,同时使多能性相关的转录因子(*Nanog*、*Tcl1* 及 *Esrrb*)表达下调^[4,6,38],进一步说明 TET1 和 5 hmC 作用于靶基因,通过促进或抑制的双重机制调控 ESCs 基因表达,进而有效维持干细胞的多能性状态。

此外, Dawlaty 等^[29]对 *Tet1* 基因敲除小鼠繁殖力的研究发现, *Tet1* 基因敲除的雌、雄小鼠交配后产生的后代数量显著减少,一些 *Tet1* 基因敲除小鼠胚胎发育致死或生殖细胞发育受损。然而,另有学者认为, *Tet1/Tet2* 基因敲降后,并没有影响小鼠多能性因子的表达及 ESCs 分化^[40,41],而且 *Tet1/Tet2* 基因被敲除后,小鼠发育正常,并且具有繁殖能力^[5,29]。原因可能归咎于 *Tet1/Tet2* 基因被敲除后,仅导致部分 5 hmC 水平下降,而 TET3 蛋白起到了补偿作用^[3,8,29]。另外, Gu 等^[26]对 *Tet3* 基因敲除小鼠的发育进行了研究,发现 *Tet3* 基因敲除后导致小鼠出生后致死, TET3 参与了胚胎形成期间多个组织的发育。综上所述, TET 蛋白家族在精确调控小鼠胚胎发育方面发挥了重要的作用,但可能在功能上具有冗余性。

3.4 出生后发育

目前,一些研究证明小鼠不同组织、器官能够检测到 5 hmC,而且在不同发育时期 5 hmC 水平存在差异^[3,42];另外, Ito 等^[3]发现, TET2/3 在成年小鼠不同组织广泛表达,且表达水平亦存在差异,揭示 TET2/3 和 5 hmC 也可能通过调控靶基因表达影响了小鼠出生后发育。鉴于此,为了研究 TET 蛋白

在调控小鼠出生后神经和脑的发育方面的作用, Song 等^[43]分析了 5 hmC 在小鼠脑上的水平分布情况, 发现小鼠出生后发育至成年阶段, 小脑 5 hmC 水平逐渐增加。Hahn 等^[44]采用基因敲除的方法, 发现 *Tet2/3* 基因敲除后阻碍了小鼠神经祖细胞分化为神经元细胞。另外, 许多研究发现, *Tet2* 基因敲除后导致小鼠骨髓和脾脏 5 hmC 水平下降, 同时影响了造血细胞的分化和成熟, 导致髓系恶性血液病^[5,45,46], 揭示 TET2 也可能通过调控 DNA 的去甲基化影响与造血功能相关的基因表达, 但具体的分子机制尚不明确。由于 *Tet3* 基因敲除后导致小鼠出生后死亡, 因此, 关于 TET3 蛋白在调控小鼠出生后发育方面的具体作用机制尚不确定。随着基因打靶等条件性敲除技术的成熟, 对 *Tet3* 基因在小鼠不同组织器官进行敲除, 将可能识别 TET3 蛋白调控小鼠出生后发育的功能。

4 结 语

TET 蛋白催化 DNA 去甲基化在调控小鼠发育过程中发挥了重要作用, 其催化 DNA 去甲基化存在多种机制, 但每种机制对 DNA 去甲基化的贡献及各种机制如何协同完成靶基因的去甲基化尚不确定。TET 依次氧化 5 mC 为 5 hmC、5 fC 和 5 caC, 这些修饰碱基除了作为 DNA 去甲基化的中间产物外, 也可能作为组蛋白的表观遗传标志调控染色体的结构和功能。近年研究表明, TET 蛋白与 O-GlcNAc 糖基化转移酶互作促进了组蛋白 O-GlcNAc 糖基化修饰^[47], 说明 TET 蛋白除了具有去甲基化的作用, 可能存在其他的生物学功能, 但具体的生物学功能还需要深入研究。

另外, TET 蛋白催化 DNA 去甲基化的活性受到其他蛋白复合体的影响, 但 TET 蛋白如何与其他蛋白复合体互作调控 DNA 的去甲基化尚不明确。而且, 在哺乳动物发育期间, 环境刺激、细胞代谢状态及发育信号是否能够影响 TET 蛋白催化 5 mC 的能力亦不确定, 也需要进行深入研究。此外, 除了通过生物化学和基因组学等手段研究 TET 蛋白生物学功能, 还需要进一步建立 *Tet1/2/3* 基因条件性敲除小鼠模型, 深入了解 TET 蛋白在小鼠不同发育阶段和组织中的功能作用。

总之, 随着分子生物学、基因组学、表观遗传

学的发展及 Tet 家族基因条件性敲除小鼠模型的建立, 人们对 TET 蛋白的功能和作用机制的认识将会更全面、更深入。

参考文献

- [1] Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 2009, 324(5929): 930–935. [\[DOI\]](#)
- [2] Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*, 2011, 333(6047): 1300–1303. [\[DOI\]](#)
- [3] Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5 mC to 5 hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 2010, 466(7310): 1129–1133. [\[DOI\]](#)
- [4] Ficiz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, Marques CJ, Andrews S, Reik W. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature*, 2011, 473(7347): 398–402. [\[DOI\]](#)
- [5] Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, Abdel-Wahab O, Ndiaye-Lobry D, Lobry C, Figueroa ME, Vasanthakumar A, Patel J, Zhao XY, Perna F, Pandey S, Madzo J, Song CX, Dai Q, He C, Ibrahim S, Beran M, Zavadil J, Nimer SD, Melnick A, Godley LA, Aifantis I, Levine RL. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell*, 2011, 20(1): 11–24. [\[DOI\]](#)
- [6] Wu H, D'Alessio AC, Ito S, Xia K, Wang ZB, Cui KR, Zhao KJ, Sun YE, Zhang Y. Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 2011, 473(7347): 389–393. [\[DOI\]](#)
- [7] Yamaguchi S, Hong K, Liu R, Shen L, Inoue A, Diep D, Zhang K, Zhang Y. Tet1 controls meiosis by regulating meiotic gene expression. *Nature*, 2012, 492(7429): 443–447. [\[DOI\]](#)
- [8] Xu YF, Wu FZ, Tan L, Kong LC, Xiong LJ, Deng J, Barbera AJ, Zheng LJ, Zhang HK, Huang S, Min JR, Nicholson T, Chen TP, Xu GL, Shi Y, Zhang K, Shi YG. Genome-wide regulation of 5 hmC, 5 mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell*, 2011, 42(4): 451–464. [\[DOI\]](#)
- [9] Xu YF, Xu C, Kato A, Tempel W, Abreu JG, Bian CB, Hu YG, Hu D, Zhao B, Ceroquina T, Diao JB, Wu FZ, He HH,

- Cui QC, Clark E, Ma C, Barbara A, Veenstra GJC, Xu GL, Kaiser UB, Liu XS, Sugrue SP, He X, Min JR, Kato Y, Shi YG. Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for *Xenopus* eye and neural development. *Cell*, 2012, 151(6): 1200–1213. [\[DOI\]](#)
- [10] Ko M, An J, Bandukwala HS, Chavez L, Åijö T, Pastor WA, Segal MF, Li HM, Koh KP, Lähdesmäki H, Hogan PG, Aravind L, Rao A. Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. *Nature*, 2013, 497(7447): 122–126. [\[DOI\]](#)
- [11] Guo JU, Su YJ, Zhong C, Ming GL, Song HJ. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, 2011, 145(3): 423–434. [\[DOI\]](#)
- [12] He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang QY, Ding JP, Jia YY, Chen ZC, Li L, Sun Y, Li XX, Dai Q, Song CX, Zhang KL, He C, Xu GL. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*, 2011, 333(6047): 1303–1307. [\[DOI\]](#)
- [13] Zhang L, Lu XY, Lu JY, Liang HH, Dai Q, Xu GL, Luo C, Jiang HL, He C. Thymine DNA glycosylase specifically recognizes 5-carboxylcytosine-modified DNA. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(4): 328–330. [\[DOI\]](#)
- [14] Valinluck V, Tsai HH, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(14): 4100–4108. [\[DOI\]](#)
- [15] Valinluck V, Sowers LC. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res*, 2007, 67(3): 946–950. [\[DOI\]](#)
- [16] Inoue A, Zhang Y. Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. *Science*, 2011, 334(6053): 194. [\[DOI\]](#)
- [17] Blaschke K, Ebata KT, Karimi MM, Zepeda-Martínez JA, Goyal P, Mahapatra S, Tam A, Laird DJ, Hirst M, Rao A, Lorincz MC, Ramalho-Santos M. Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature*, 2013, 500(7461): 222–226. [\[DOI\]](#)
- [18] Okashita N, Kumaki Y, Ebi K, Nishi M, Okamoto Y, Nakayama M, Hashimoto S, Nakamura T, Sugawara K, Kojima N, Takada T, Okano M, Seki Y. PRDM14 promotes active DNA demethylation through the ten-eleven translocation (TET)-mediated base excision repair pathway in embryonic stem cells. *Development*, 2014, 141(2): 269–280. [\[DOI\]](#)
- [19] Zhang Q, Liu XG, Gao WQ, Li PS, Hou JL, Li JW, Wong JM. Differential regulation of the ten-eleven translocation (TET) family of dioxygenases by O-linked β -N-acetylglucosamine transferase (OGT). *J Biol Chem*, 2014, 289(9): 5986–5996. [\[DOI\]](#)
- [20] Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, Walter J, Surani MA. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev*, 2002, 117(1–2): 15–23. [\[DOI\]](#)
- [21] Hajkova P, Ancelin K, Waldmann T, Lacoste N, Lange UC, Cesari F, Lee C, Almouzni G, Schneider R, Surani MA. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature*, 2008, 452(7189): 877–881. [\[DOI\]](#)
- [22] Kota SK, Feil R. Epigenetic transitions in germ cell development and meiosis. *Dev Cell*, 2011, 19(5): 675–686. [\[DOI\]](#)
- [23] Hackett JA, Sengupta R, Zyllicz JJ, Murakami K, Lee C, Down TA, Surani MA. Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science*, 2013, 339(6118): 448–452. [\[DOI\]](#)
- [24] Vincent JJ, Huang Y, Chen PY, Feng SH, Calvopiña JH, Nee K, Lee SA, Le T, Yoon AJ, Faull K, Fan GP, Rao A, Jacobsen SE, Pellegrini M, Clark AT. Stage-specific roles for tet1 and tet2 in DNA demethylation in primordial germ cells. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(4): 470–478. [\[DOI\]](#)
- [25] Yamaguchi S, Hong K, Liu R, Inoue A, Shen L, Zhang K, Zhang Y. Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine during germ cell reprogramming. *Cell Res*, 2013, 23(3): 329–339. [\[DOI\]](#)
- [26] Gu TP, Guo F, Yang H, Wu HP, Xu GF, Liu W, Xie ZG, Shi LY, He XY, Jin SG, Iqbal K, Shi YG, Deng ZX, Szabó PE, Pfeifer GP, Li JS, Xu GL. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, 2011, 477(7366): 606–610. [\[DOI\]](#)
- [27] Yu C, Zhang YL, Pan WW, Li XM, Wang ZW, Ge ZJ, Zhou JJ, Cang Y, Tong C, Sun QY, Fan HY. CRL4 complex regulates mammalian oocyte survival and reprogramming by activation of TET proteins. *Science*, 2013, 342(6165): 1518–1521. [\[DOI\]](#)
- [28] Dawlaty MM, Breiling A, Le T, Raddatz G, Barrasa MI, Cheng AW, Gao Q, Powell BE, Li Z, Xu M, Faull KF, Lyko F, Jaenisch R. Combined deficiency of Tet1 and Tet2 causes epigenetic abnormalities but is compatible with postnatal development. *Dev Cell*, 2013, 24(3): 310–323. [\[DOI\]](#)
- [29] Dawlaty MM, Ganz K, Powell BE, Hu YC, Markoulaki S, Cheng AW, Gao Q, Kim J, Choi SW, Page DC, Jaenisch R. Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal develop-

- ment. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(2): 166–175. [DOI]
- [30] Ko M, Bandukwala HS, An J, Lamperti ED, Thompson EC, Hastie R, Tsangaratou A, Rajewsky K, Koralov SB, Rao A. Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(35): 14566–14571. [DOI]
- [31] Oswald JI, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol*, 2000, 10(18): 475–478. [DOI]
- [32] Iqbal K, Jin SG, Pfeifer GP, Szabó PE. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(9): 3642–3647. [DOI]
- [33] Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, Marques CJ, Zakhartchenko V, Boiani M, Arand J, Nakano T, Reik W, Walter J. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat Commun*, 2011, 2(3): 241. [DOI]
- [34] Gehring M, Reik W, Henikoff S. DNA demethylation by DNA repair. *Trends Genet*, 2009, 25(2): 82–90. [DOI]
- [35] Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(9): 607–620. [DOI]
- [36] Wu H, Zhang Y. Tet1 and 5-hydroxymethylation: A genome-wide view in mouse embryonic stem cells. *Cell Cycle*, 2011, 10(15): 2428–2436. [DOI]
- [37] Huang Y, Chavez L, Chang X, Wang X, Pastor WA, Kang J, Zepeda-Martínez JA, Pape UJ, Jacobsen SE, Peters B, Rao A. Distinct roles of the methylcytosine oxidases Tet1 and Tet2 in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(4): 1361–1366. [DOI]
- [38] Wu H, D'Alessio AC, Ito S, Wang Z, Cui K, Zhao K, Sun YE, Zhang Y. 2011. 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. [DOI]
- [39] Pastor WA, Pape UJ, Huang Y, Henderson HR, Lister R, Ko M, McLoughlin EM, Brudno Y, Mahapatra S, Kapranov P, Tahiliani M, Daley GQ, Liu XS, Ecker JR, Milos PM, Agarwal S, Rao A. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature*, 2011, 473(7347): 394–397. [DOI]
- [40] Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, Huang Y, Cunliffe K, Nardone J, Laiho A, Tahiliani M, Sommer CA, Mostoslavsky G, Lahesmaa R, Orkin SH, Rodig SJ, Daley GQ, Rao A. Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(2): 200–213. [DOI]
- [41] Williams K, Christensen J, Pedersen MT, Johansen JV, Cloos PA, Rappsilber J, Helin K. TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature*, 2011, 473(7347): 343–348. [DOI]
- [42] Globisch D, Münzel M, Müller M, Michalakakis S, Wagner M, Koch S, Brückl T, Biel M, Carell T. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15367. [DOI]
- [43] Song CX, Szulwach KE, Fu Y, Dai Q, Yi CQ, Li XK, Li YJ, Chen CH, Zhang W, Jian X, Wang J, Zhang L, Looney TJ, Zhang BC, Godley LA, Hicks LM, Lahn BT, Jin P, He C. Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(1): 68–72. [DOI]
- [44] Hahn MA, Qiu RX, Wu WX, Li AX, Zhang HY, Wang J, Jui J, Jin SG, Jiang Y, Pfeifer GP, Lu Q. Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine and chromatin marks in mammalian neurogenesis. *Cell Rep*, 2013, 3(2): 291–300. [DOI]
- [45] Li Z, Cai XQ, Cai CL, Wang JP, Zhang WY, Petersen BE, Yang FC, Xu MJ. Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood*, 2011, 118(17): 4509–4518. [DOI]
- [46] Quivoron C, Couronné L, Della Valle V, Lopez CK, Plo I, Wagner-Ballon O, Do Cruzeiro M, Delhommeau F, Arnulf B, Stern MH, Godley L, Opolon P, Tilly H, Solary E, Duffourd Y, Dessen P, Merle-Beral H, Nguyen-Khac F, Fontenay M, Vainchenker W, Bastard C, Mercher T, Bernard OA. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell*, 2011, 20(1): 25–38. [DOI]
- [47] Chen Q, Chen YB, Bian CJ, Fujiki R, Yu XC. TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature*, 2013, 493(7433): 561–564. [DOI]