

生殖细胞及早期胚胎基因组印记的表观调控

朱屹然, 张美玲, 翟志超, 赵云蛟, 马馨

吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118

摘要: 基因组印记是一种区别父母等位基因的表观遗传过程, 可导致父源和母源基因特异性表达。印记是在配子发生过程中全基因组表观重编程时获得的, 且在早期胚胎发育过程中得以维持。因此, 在全基因组重编程过程中, 对印记的识别和维持十分重要。本文概述了原始生殖细胞的印记清除、双亲原始生殖细胞的印记获得以及早期胚胎发育过程中印记维持的相关过程, 并对在印记区域内保护印记基因免受全基因组 DNA 去甲基化的表观遗传因子的相关作用机制进行了讨论。

关键词: 基因组印记; DNA 甲基化; 早期胚胎发育

Epigenetic regulation of genomic imprinting in germline cells and preimplantation embryos

Yiran Zhu, Meiling Zhang, Zhichao Zhai, Yunjiao Zhao, Xin Ma

College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Genomic imprinting is an epigenetic process that distinguishes parental alleles and results in specific expression of paternal and maternal genes. Imprints are acquired in the process of gametogenesis when genome-wide epigenetic reprogramming occurs and are maintained during early embryonic development. Therefore, the recognition and maintenance of imprints are very important in genome-wide reprogramming. In this review, we summarize the progresses of imprints removal in primordial germ cells (PGCs), imprints acquisition in parental PGCs, and imprints maintenance during early embryonic development. We also discuss the functional mechanisms of epigenetic factors which protect imprinted genes from whole genome DNA methylation.

Keywords: genomic imprinting; DNA methylation; preimplantation embryos

基因组印记源于双亲基因组差异表观修饰, 通过这种差异表观修饰机制, 使父源或母源等位基因出现特异的单等位基因表达^[1]。迄今为止, 在小鼠和人类基因组中, 已发现超过 100 个印记基因, 其中很多对胚胎发生、胎盘形成和大脑发育有重要作

用。在哺乳动物发育过程中, 有两个重要的全基因组表观遗传重编程时期, 分别是生殖细胞发育时期和受精后到早期胚胎发育时期。在此期间有很多表观遗传事件发生, 包括生殖细胞印记的去除和获得, 以及早期胚胎发育过程中印记的维持, 从而实现双

收稿日期: 2015-05-06; 修回日期: 2015-07-24

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(编号: 31302047)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31302047)]

作者简介: 朱屹然, 硕士研究生, 专业方向: 动物克隆与转基因动物。E-mail: zyr901027@163.com

通讯作者: 马馨, 博士, 副教授, 研究方向: 动物克隆与转基因动物。E-mail: maxin3202@163.com

DOI: 10.16288/j.yczs.15-194

网络出版时间: 2015/11/5 11:28:05

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20151105.1128.002.html>

亲基因特异性表达。因此,协调稳定的表观遗传机制对于印记基因的定位和确保双亲基因特异性表达来说十分必要。本文对印记的去除、重建及维持进行了综述,并对影响基因组印记表观调控的相关机制进行了讨论。

1 原始生殖细胞差异甲基化区域特点

利用全基因组亚硫酸盐测序技术(Bisulfite sequencing, BS-seq)检测小鼠卵母细胞、精子和囊胚中甲基化状态,结果表明精子全基因组 DNA 甲基化水平较高,且分布范围较广,生殖细胞差异甲基化区域(Germ cell differentially methylated regions, gDMRs)主要位于基因间区域,少数位于 CpG 岛。相比之下,卵母细胞全基因组 DNA 甲基化水平较低,且分布范围较窄,gDMRs 横跨基因间 CpG 岛^[2-4]。母系印记基因 gDMRs 位于启动子或内含子启动子中,在卵母细胞中是甲基化的,但在精子中是非甲基化的^[2,5]。父系印记基因 gDMRs 位于基因间,在精子中是甲基化的,但在卵母细胞中是广泛去甲基化的。由于卵母细胞和精子 5-甲基胞嘧啶形式不同,gDMRs 贯穿于整个基因组。这些 gDMRs 多数是稳定的,然而在囊胚期出现了整体甲基化水平过高或者过低的现象^[2-4,6]。这说明在生殖细胞中,印记 gDMRs 与非印记 gDMRs 相比可能不具特异性,但在受精作用后,gDMRs 被特异地识别和维持^[7]。

2 原始生殖细胞的印记清除

原始生殖细胞的发生需要进行全基因组表观重编程。小鼠的原始生殖细胞前体在胚胎发育第 6.0 d (E6.0)时消失,并在 E7.5 后发生特异的表观遗传修饰,同时向生殖嵴迁移^[8]。整体 5-甲基胞嘧啶水平在 E8.0 和 E9.0 期间开始下降,多数 5-甲基胞嘧啶的去甲基化在 E11.5 前全部完成^[9]。小鼠原始生殖细胞去甲基化过程涉及主动和被动去甲基化两种形式。第一次主动去甲基化作用发生在 E8.0~E9.0 之间,第二次发生在 E10.5~E13.5 之间。原始生殖细胞 5-甲基胞嘧啶水平在 E11.5 达到峰值,到 E13.5 降至较低水平^[9-11]。

印记 gDMRs 进行去甲基化的方式有所不同。利

用 BS-seq 对父源原始生殖细胞进行分析,可知其印记 gDMRs 发生被动去甲基化作用^[12]。TET(Ten-eleven translocation)途径主要通过 TET1(Ten-eleven translocation 1)和 TET2(Ten-eleven translocation 2)对启动子和转录区 5-甲基胞嘧啶进行羟基化作用^[13,14],特异地参与原始生殖细胞去甲基化的后期阶段^[10,11,15]。对原始生殖细胞全基因组进行 BS-seq 分析,发现在 E10.5 时大多数父源及母源原始生殖细胞印记 gDMRs 的 5-甲基胞嘧啶水平均高于 20%~40%^[16],在 E10.5~E13.5 期间印记 gDMRs 出现 5-甲基胞嘧啶去甲基化的延迟现象,与此同时伴有 5-羟甲基胞嘧啶富集现象^[15]。印记 gDMRs 去甲基化的延迟表明存在其他与印记 gDMRs 有关的表观遗传学机制。甲基化状态可能是通过 ZFP57/TRIM28 维持,印记 gDMRs 的去甲基化可能也需要其他因子的参与。

3 父源原始生殖细胞印记获得

配子发生结束后,获得的卵母细胞和精子是不同类型的细胞。雄性和雌性原始生殖细胞通过不同的路径发育为成熟配子,最终产生不同的表观修饰。在小鼠 E13.5 时,父源原始生殖细胞仍然保持有丝分裂状态,并进入 G₀/G₁ 阻滞期,直到个体出生后,有丝分裂重新开始,形成精原细胞,性成熟后,进入减数分裂。采用全基因组 BS-seq 分析 DNA 的去甲基化状态,在 E16.5 时有丝分裂已经停止,父源原始生殖细胞全基因组 5-甲基胞嘧啶水平为 30%,表明从头甲基化已经开始。在这个阶段,父源和母源生殖细胞 5-甲基胞嘧啶获得的状态不同,在 E16.0 时,母源原始生殖细胞仍基本保持未甲基化状态^[16]。

全基因组 5-甲基胞嘧啶水平的提高是雄性配子的特性,成熟精子 5-甲基胞嘧啶水平的平均值可达到 80%,而成熟的卵母细胞仅有 40%^[2-4],如 3 个已知的父源印记基因 *H19*、*Gtl2* 和 *Rasgrf1*,在有丝分裂停止时获得父源 5-甲基胞嘧啶,到 E18.5 为止,基本达到了完全甲基化的状态。另外,父系遗传的等位基因印记 gDMRs 先于母系遗传的等位基因印记 gDMRs 获得 5-甲基胞嘧啶,有研究提出相关表观遗传元件有可能与这种差异有关,如边界元件转录阻抑物 CTCF(CCCTC-binding factor)在从头甲基化启动后,仍被绑定在非甲基化的母源 *H19* 的 gDMR,

这可能延缓 5-甲基胞嘧啶的获得^[17]。此外,母源原始生殖细胞的 gDMR 中 H3K4me2 较为丰富,也可能导致 5-甲基胞嘧啶获得的延迟。

雄性和雌性配子的另一个表观遗传差异是染色质的成分和结构不同。在精子中,组蛋白最终被鱼精蛋白取代,以形成高度浓缩的染色质,包括印记位点在内,小鼠精子中仅保留 1%的组蛋白^[18,19]。在小鼠中,*H19* 和 *Rasgrfl* 中甲基化的 gDMRs 保留组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸残基二甲甲基化(Dimethylated histone H3 lysine 9, H3K9me2)形式,而 *Igf2r*、*Kcnqlot1*、*Peg1*、*Peg3* 和 *Peg5* 中未甲基化的 gDMRs 保留组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸残基二甲甲基化(Dimethylated histone H3 lysine 4, H3K4me2)形式,*Kcnqlot1* 和 *Snrpn* 中未甲基化的 gDMRs 保留组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸残基三甲甲基化(Dimethylated histone H3 lysine 4, H3K4me3)形式^[20, 21]。未甲基化的 gDMRs 中的组蛋白在受精后可能有助于父源等位基因 5-甲基胞嘧啶的重新获得,但其保留的机制仍不清楚。

gDMRs 印记甲基化的建立需要进行从头甲基化,这一过程需要甲基转移酶 3A(DNMT3A)和甲基转移酶 3L(DNMT3L)的参与。与其他已知的印记 gDMRs 不同,父源 *Rasgrfl* 基因 gDMR 5-甲基胞嘧啶的获得需要依赖甲基转移酶 3B(DNMT3B)参与。DNMT3B 还参与生殖细胞反转录转座元件的从头甲基化,*Rasgrfl* 的 gDMR 包含许多重复元件,包括长末端重复。雄性生殖细胞反转录转座元件的从头甲基化需要 Piwi 相互作用 RNA(piRNA)途径,这使一些学者开始研究 piRNA 途径是否涉及 *Rasgrfl* 中 gDMR 5-甲基胞嘧啶的获得。中断 piRNA 途径,尤其是使 Piwi 蛋白的 *Mili*、*Miwi* 和 *Miwi2* 基因发生突变,导致 *Rasgrfl* 的 gDMR 中 5-甲基胞嘧啶的减少,但对 *H19* 和 *Gtl2* 的 gDMRs 无影响^[22]。*Rasgrfl* 结构域对 piRNA 途径的独特需求表明,等位基因表观遗传途径可能导致雄性生殖细胞中印记 gDMR 的建立。

4 母源原始生殖细胞印记获得

在胚胎时期,小鼠卵原细胞进入减数分裂第一期并停留在第一次减数分裂前期,成为初级卵母细胞,直到出生前一直保持静止状态,性成熟后,在促性腺激素作用下,卵母细胞在排卵前完成第一次

减数分裂。与父源原始生殖细胞不同,母源原始生殖细胞在减数分裂停滞期保持低水平甲基化。在 E16.5 的母源原始生殖细胞中,所有 gDMRs 的 5-甲基胞嘧啶水平低于 15%^[16]。雌性配子印记 5-甲基胞嘧啶获得过程的一个显著特征是在不同的 gDMRs 中甲基化的启动是不同步的。*Snrpn* 的 gDMR 首先获得 5-甲基胞嘧啶,随后是 *Igf2r*、*Peg3* 和 *Peg1* 的 gDMR,最后是 *Impact* 的 gDMR^[23]。甲基化获得的不同步意味着每个印记 gDMR 可以进行特异性调节。进一步研究 *Snrpn* 的 gDMR,发现双亲遗传的等位基因 5-甲基胞嘧啶的获得也不同步。双亲等位基因 *Peg1* 和 *Peg3* 的 gDMRs 5-甲基胞嘧啶的获得也具有不同步性。KRAB 结构域锌指蛋白 ZFP57(Zinc finger protein 57),参与卵母细胞 *Snrpn* 的 gDMR 特异性 5-甲基胞嘧啶的获得。ZFP57 是否也参与早期母系遗传 *Snrpn* 的 gDMR 内 5-甲基胞嘧啶的获得目前尚不清楚。但事实证明,转录调控因子与 ZFP57 的结合需要 5-甲基胞嘧啶的参与^[24],这表明 ZFP57 是在 5-甲基胞嘧啶从头合成开始后被招募到 *Snrpn* 的差异甲基化区域。

卵母细胞母源 gDMRs 5-甲基胞嘧啶的获得可能受到转录的调控。E15.5 和 E17.5 的原始生殖细胞 gDMRs 在获得 5-甲基胞嘧啶时,*H19* 和 *Gtl2* 的 gDMRs 转录水平升高^[20]。卵母细胞不能通过父系印记 gDMRs 进行转录,与其不同,E15.5-E17.5 的雄性原始生殖细胞通过母系印记 gDMRs 也可直接转录^[20]。雄性原始生殖细胞的这种差异可能是由于保留在母源 gDMRs 内 H3K4me3 的转录协助,从而阻碍了从头甲基化^[20]。在卵母细胞中,转录机制可能有助于 KDM1B(Lysine (K)-specific demethylase 1B)被招募到印记 gDMRs。缺少 KDM1B,卵母细胞中 *Impact*、*Grb10*、*Peg1* 和 *Plagl1* 的 gDMRs 不能获得 5-甲基胞嘧啶^[25]。KDM1B 还可能导致不同印记 gDMRs 5-甲基胞嘧啶获得的不同步。*Impact* 和 *Peg1* 的 gDMRs 获得 5-甲基胞嘧啶需要 KDM1B 的参与,在卵母细胞发育的后期也需要 KDM1B。但 *Igf2r* 和 *Snrpn* 的 gDMRs 在卵母细胞发育早期获得 5-甲基胞嘧啶时不需要 KDM1B。为什么在一些印记 gDMRs 中需要 KDM1B,而在另一些 gDMRs 中不需要 KDM1B,以及在卵母细胞早期 5-甲基胞嘧啶的获得是否还需要其他的组蛋白去甲基化酶参与还有待进一步研究。

5 早期胚胎发育过程中的印记维持

受精后, 结构和表观修饰不同的配子必须经过复杂的表观重编程以形成受精卵。其中最常见的事件是父系遗传的基因组在第一次卵裂之前发生主动去甲基化。原始生殖细胞基因组发生由 TET 羟化酶介导的主动去甲基化, 父源原始生殖细胞发生由 TET3 介导的去甲基化, 并在受精卵中完成^[26]。卵母细胞和受精卵中 TET3 出现高水平表达, 但在细胞第一次分裂后表达量下降。这与在 DNA 复制之前, 大多数 5-甲基胞嘧啶在 TET3 作用下羟基化为 5-羟甲基胞嘧啶的情况相符^[27]。在原始生殖细胞中发生两次 DNA 去甲基化, 分别是起初的被动去甲基化和随后的由 TET1 介导的主动去甲基化。母源和父源印记 gDMRs 在受精后受到保护, 以免受到由 TET3 介导的主动去甲基化的影响, 这种保护在一定程度上是母源因子 PGC7(DPPA3)在发挥作用。DPPA3 保护母系遗传的基因组免受 TET 介导的去甲基化, 其对印记 gDMRs 也有相同的功能。在母源 *Peg1*、*Peg3* 和 *Peg5* 的 gDMRs 以及父系 *H19* 和 *Rasgrfl* 的 gDMRs 中, 发现 DPPA3 与 H3K9me2 结合。*Snrpn* 和 *Gtl2* 的 gDMRs 不依赖于 DPPA3 维持 5-甲基胞嘧啶水平, 这与 *Gtl2* gDMR 缺少 H3K9me2 有关^[21]。DPPA3 是否在其他印记 gDMRs 中也保护 DNA 免受去甲基化作用, 是否还有其他作用维持印记 gDMRs 区的 5-甲基胞嘧啶状态, 仍有待进一步研究。与 TET3 不同, TET1 存在于早期胚胎发育过程中, 可能起到决定细胞命运的调控作用^[28,29]。TET1 可能也参与印记 gDMRs 的维持作用, TET1 可能与 DNMTs 进行动态的竞争, 导致生殖细胞和植入后胚胎印记 gDMR 范围不同^[5]。5-羟甲基胞嘧啶可能也招募其他的染色质重组者, 实验证明 5-羟甲基胞嘧啶不仅是去甲基化的中间状态, 它本身还是一种主动的表观遗传修饰^[30,31]。甲基 CpG 结合蛋白 2(MeCP2)可以与大脑中 5-羟甲基胞嘧啶结合, 形成一个新的表观遗传途径。甲基 CpG 结合蛋白 3(MBD3)也与胚胎干细胞中的 5-羟甲基胞嘧啶有微弱的结合力^[32]。

在早期胚胎发育过程中, 印记 gDMRs 是动态变化的^[5]。TET 羟化酶可能参与 gDMRs 的动态调节, 在胚胎干细胞中印记 gDMRs 或其周围有 TET1 或 5-甲基胞嘧啶富集, 当没有 TET 时, *Peg1* 的 gDMR

具有高水平的 5-甲基胞嘧啶^[33], 但其发生机制尚不清楚。综上所述, TET 羟化酶和 5-羟甲基胞嘧啶对印记 gDMRs 的作用十分重要。

除了在每个复制周期中维持甲基化状态, TET 羟化酶和甲基转移酶之间可能存在某种其他联系。近年来, 已确定多种因素参与保护印记 gDMR 免受 DNA 去甲基化影响。维持印记 gDMRs 内 5-甲基胞嘧啶, 需要甲基转移酶 DNMT1 的参与, 如卵母细胞的特定同种亚型 DNMT1o 在 8 细胞时起作用。ZFP57 及其辅助因子 TRIM28(KRAB 相关蛋白 1, 也称 KAP1 或 TIF1 β)也是印记基因 gDMRs 内参与维持 5-甲基胞嘧啶的关键因子^[24]。除了小鼠, 多数动物印记 gDMRs 包含 ZFP57 共有结合序列(TGCCGC), 并且在胚胎干细胞期富集 ZFP57 和 TRIM28。当识别基序内的 CpG 二核苷酸被甲基化时, ZFP57 特异性结合 DNA。TRIM28 也同样与印记 gDMRs 的 DNA 甲基化相关, 它依赖 ZFP57 被招募到甲基化位点^[34]。ZFP57 和 TRIM28 一起招募与 DNA 甲基化和组蛋白修饰相关的因子, 形成一个调控网络, 包括 UHRF1 (Ubiquitin-like with PHD and RING finger domains 1)、DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 和组蛋白甲基转移酶 SETDB1 等^[35](图 1)。

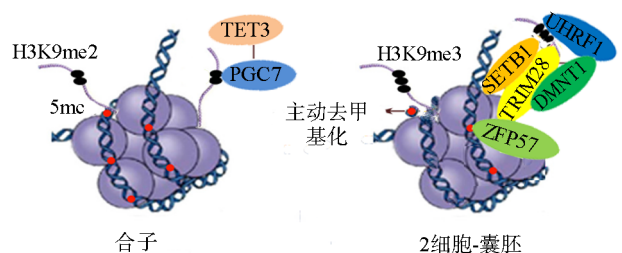


图 1 多种表观遗传因子参与早期胚胎发育过程中的印记维持

Fig. 1 A variety of epigenetic factors involved in imprints maintenance during early embryonic development

6 结 语

近年来, 人们对原始生殖细胞和早期胚胎发育过程中全基因组重编程过程及这些动态发育阶段印记 gDMR 的调节作用有了更深入的了解。基因组印记是表观遗传不对称的过程, 这不仅体现在父源特异性表观遗传标记的获得, 也体现在获得这些标记

的时间上。

在早期胚胎发育过程中, 由表观遗传相关因子形成的较大网络参与印记 gDMRs 的识别和维持, 因为不是所有胚胎的印记 gDMRs 都富含 ZFP57 和 TRIM28, 所以除了 DPPA3、ZFP57 和 TRIM28 外, 一些关键表观遗传因素也参与其中。对卵母细胞、精子、早期胚胎中非印记 gDMRs 的识别加强了人们对等位基因如何维持其双亲特异性的认知^[2~4]。早期胚胎发育过程中基因组印记的研究对阐明印记疾病, 如 Beckwith-Wiedemann 综合征、Prader-Willi 综合征和 Angelmansyndromes 综合征的表观遗传学病因有重要意义。研究表观遗传学机制对胚胎印记 gDMRs 的识别和维持作用, 对于减少因繁殖生物学技术的实施对表观遗传过程所产生的负面影响十分必要。

参考文献(References):

- [1] Ma X, Zhang S, Yang SB, Wang XC, Zhu YR, Li ZY, Luan WM. The roles of maternal-effect proteins in the maintenance of genomic imprints. *Hereditas (Beijing)*, 2014, 36(10): 959–964.
马馨, 张胜, 杨树宝, 王晓晨, 朱屹然, 李子义, 栾维民. 母源效应蛋白在基因组印记维持中的作用. *遗传*, 2014, 36(10): 959–964. [DOI]
- [2] Kobayashi H, Sakurai T, Imai M, Takahashi N, Fukuda A, Yayoi O, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Sotomaru Y, Suzuki Y, Kono T. Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks. *PLoS Genet*, 2012, 8(1): e1002440. [DOI]
- [3] Smallwood SA, Tomizawa S, Krueger F, Ruf N, Carli N, Segonds-Pichon A, Sato S, Hata K, Andrews SR, Kelsey G. Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nat Genet*, 2011, 43(8): 811–814. [DOI]
- [4] Smith ZD, Chan MM, Mikkelsen TS, Gu HC, Gnirke A, Regev A, Meissner A. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature*, 2012, 484(7394): 339–344. [DOI]
- [5] Tomizawa SI, Kobayashi H, Watanabe T, Andrews S, Hata K, Kelsey G, Sasaki H. Dynamic stage-specific changes in imprinted differentially methylated regions during early mammalian development and prevalence of non-CpG methylation in oocytes. *Development*, 2011, 138(5): 811–820. [DOI]
- [6] Proudhon C, Duffié R, Ajjan S, Cowley M, Iranzo J, Carbajosa G, Saadeh H, Holland ML, Oakley RG, Rakyan VK, Schulz R, Bourc'his D. Protection against de novo methylation is instrumental in maintaining parent-of-origin methylation inherited from the gametes. *Mol Cell*, 2012, 47(6): 909–920. [DOI]
- [7] Kelsey G, Feil R. New insights into establishment and maintenance of DNA methylation imprints in mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013, 368(1609): 20110336. [DOI]
- [8] Saitou M, Kagiwada S, Kurimoto K. Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development*, 2012, 139(1): 15–31. [DOI]
- [9] Guibert S, Forné T, Weber M. Global profiling of DNA methylation erasure in mouse primordial germ cells. *Genome Res*, 2012, 22(4): 633–641. [DOI]
- [10] Seisenberger S, Andrews S, Krueger F, Arand J, Walter J, Santos F, Popp C, Thienpont B, Dean W, Reik W. The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol Cell*, 2012, 48(6): 849–862. [DOI]
- [11] 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]
- [12] Kagiwada S, Kurimoto K, Hirota T, Yamaji M, Saitou M. Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *EMBO J*, 2013, 32(3): 340–353. [DOI]
- [13] Piccolo FM, Bagci H, Brown KE, Landeira D, Soza-Ried J, Feytout A, Mooijman D, Hajkova P, Leitch HG, Tada T, Kriaucionis S, Dawlaty MM, Jaenisch R, Merkenschlager M, Fisher AG. Different roles for Tet1 and Tet2 proteins in reprogramming-mediated erasure of imprints induced by EGC fusion. *Mol Cell*, 2013, 49(6): 1023–1033. [DOI]
- [14] 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]
- [15] 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]
- [16] Kobayashi H, Sakurai T, Miura F, Imai M, Mochiduki K, Yanagisawa E, Sakashita A, Wakai T, Suzuki Y, Ito T, Matsui Y, Kono T. High-resolution DNA methylome analysis of primordial germ cells identifies gender-specific reprogramming in mice. *Genome Res*, 2013, 23(4): 616–627. [DOI]

- [17] Lee DH, Singh P, Tsai SY, Oates N, Spalla A, Spalla C, Brown L, Rivas G, Larson G, Rauch TA, Pfeifer GP, Szabó PE. CTCF-dependent chromatin bias constitutes transient epigenetic memory of the mother at the H19-Igf2 imprinting control region in prospermatogonia. *PLoS Genet*, 2010, 6(11): e1001224. [DOI]
- [18] Hammoud SS, Nix DA, Zhang HY, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature*, 2009, 460(7254): 473–478. [DOI]
- [19] Brykczynska U, Hisano M, Erkek S, Ramos L, Oakeley EJ, Roloff TC, Beisel C, Schübeler D, Stadler MB, Peters AH. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17(6): 679–687. [DOI]
- [20] Henckel A, Chebli K, Kota SK, Arnaud P, Feil R. Transcription and histone methylation changes correlate with imprint acquisition in male germ cells. *EMBO J*, 2012, 31(3): 606–615. [DOI]
- [21] Nakamura T, Liu YJ, Nakashima H, Umehara H, Inoue K, Matoba S, Tachibana M, Ogura A, Shinkai Y, Nakano T. PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature*, 2012, 486(7403): 415–419. [DOI]
- [22] Watanabe T, Tomizawa SI, Mitsuya K, Totoki Y, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Iida N, Hoki Y, Murphy PJ, Toyoda A, Gotoh K, Hiura H, Arima T, Fujiyama A, Sado T, Shibata T, Nakano T, Lin HF, Ichihanagi K, Soloway PD, Sasaki H. Role for piRNAs and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrfl* locus. *Science*, 2011, 332(6031): 848–852. [DOI]
- [23] Denomme MM, White CR, Gillio-Meina C, Macdonald WA, Deroo BJ, Kidder GM, Mann MR. Compromised fertility disrupts *Peg1* but not *Snrpn* and *Peg3* imprinted methylation acquisition in mouse oocytes. *Front Genet*, 2012, 3: 219. [DOI]
- [24] Quenneville S, Verde G, Corsinotti A, Kapopoulou A, Jakobsson J, Offner S, Baglivo I, Pedone PV, Grimaldi G, Riccio A, Trono D. In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions. *Mol Cell*, 2011, 44(3): 361–372. [DOI]
- [25] Ciccone DN, Su H, Hevi S, Gay F, Lei H, Bajko J, Xu GL, Li E, Chen TP. KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. *Nature*, 2009, 461(7262): 415–418. [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] Inoue A, Zhang Y. Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. *Science*, 2011, 334(6053): 194. [DOI]
- [28] Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 2010, 466(7310): 1129–1133. [DOI]
- [29] 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]
- [30] Szulwach KE, Li XK, Li YJ, Song CX, Wu H, Dai Q, Irier H, Upadhyay AK, Gearing M, Levey AI, Vasanthakumar A, Godley LA, Chang Q, Cheng XD, He C, Jin P. 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat Neurosci*, 2011, 14(12): 1607–1616. [DOI]
- [31] Mellén M, Ayata P, Dewell S, Kriaucionis S, Heintz N. MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell*, 2012, 151(7): 1417–1430. [DOI]
- [32] Yildirim O, Li RW, Hung JH, Chen PB, Dong XJ, Ee LS, Weng ZP, Rando OJ, Fazzio TG. Mbd3/NURD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells. *Cell*, 2011, 147(7): 1498–1510. [DOI]
- [33] Williams K, Christensen J, Pedersen MT, Johansen JV, Cloos PAC, Rappsilber J, Helin K. TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature*, 2011, 473(7347): 343–348. [DOI]
- [34] Messerschmidt DM, de Vries W, Ito M, Solter D, Ferguson-Smith A, Knowles BB. *Trim28* is required for epigenetic stability during mouse oocyte to embryo transition. *Science*, 2012, 335(6075): 1499–1502. [DOI]
- [35] Zuo XP, Sheng JP, Lau HT, McDonald CM, Andrade M, Cullen DE, Bell FT, Iacovino M, Kyba M, Xu GL, Li XJ. Zinc finger protein ZFP57 requires its co-factor to recruit DNA methyltransferases and maintains DNA methylation imprint in embryonic stem cells via its transcriptional repression domain. *J Biol Chem*, 2012, 287(3): 2107–2118. [DOI]