

综述

Tet: 基于 DNA 去甲基化的全新抗肿瘤药物靶标

龚蔚, 孟周文理*, 田娜, 林冠乔, 付天然, 张良

上海交通大学基础医学院药理学教研室, 上海 200025

[摘要] Tet 蛋白属于 α -酮戊二酸 (α -KG) 和亚铁离子 (Fe^{2+}) 依赖的双加氧酶家族。Tet 特异识别基因组 DNA 上 5-甲基胞嘧啶 (5mC) 的甲基并进行催化氧化, 是哺乳动物基因组 DNA 主动去甲基化途径中唯一被发现的关键因子。通过调控基因组 5mC 的动态平衡分布, Tet 在胚胎发育早期基因调控和胚胎干细胞定向分化中至关重要, 其表达和功能异常与包括骨髓增生异常综合征、慢性骨髓单核细胞性白血病和急性白血病在内的多种血液恶性肿瘤以及实体肿瘤有密切关系。因此, Tet 及其介导的 DNA 去甲基化是全新的抗肿瘤靶向药物靶标。对于 Tet 生物功能和催化机制的研究将有助于深入了解与 DNA 去甲基化途径相关肿瘤的发生和发展机制, 同时也为研发全新的抗肿瘤靶向药物提供参考。

[关键词] DNA 去甲基化; Tet 蛋白; 5-羟甲基胞嘧啶; 胚胎干细胞; 抗肿瘤

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2017.04.026 **[中图分类号]** R979.1 **[文献标志码]** A

Tet: novel anti-tumor drug target based on DNA demethylation

GONG Wei, MENG-ZHOU Wen-li*, TIAN Na, LIN Guan-qiao, FU Tian-ran, ZHANG Liang

Department of Pharmacology, Basic Medicine Faculty of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China

[Abstract] Tet (ten-eleven translocation) proteins belong to α -ketoglutaric acid (α -KG or 2-OG) and Fe^{2+} dependent dioxygenases. Tets are found to be involved in the unique mammalian DNA active demethylation process by specifically oxidizing the methyl group of 5-methylcytosine (5mC) in mammalian genome, and play critical roles in gene regulation in early embryonic development and stem cell differentiation via regulating the dynamic balance distribution of 5mC. Abnormal expression and function of Tets are closely associated with various hematological malignancies, including myelodysplastic syndrome, chronic myelomonocytic leukemia, and acute lymphoblastic leukemia, as well as solid tumors. Hence, Tets and Tets-mediated DNA demethylation are novel anti-tumor drug targets. Investigation of biological function and catalytic mechanism of Tets is helpful for further understanding mechanisms of tumor incidence and development relevant to DNA demethylation pathway and can provide reference for developing new anti-tumor targeted drugs.

[Key words] DNA demethylation; ten eleven translocation proteins; 5-hydroxymethylcytosine; stem cells; anti-tumor

表观遗传修饰是一种不依赖于 DNA 序列信息的可遗传基因表达模式, 主要包括 DNA 特定碱基的结构修饰如胞嘧啶的甲基化和染色质重塑 2 种形式。在 DNA 特定碱基的结构修饰中, DNA 甲基化是最为重要的修饰。在 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferases, DNMTs) 的作用下, 基因组 DNA 的 CpG 双核苷酸上的胞嘧啶碱基环 5 号位碳的氢原子被甲基所取代, 形成 5-甲基胞嘧啶 (5-methylcytosine, 5mC)。5mC 通过在启动子区域阻止转录子的结合来使基因表达沉默。当受影响的基因是抑癌基因时, 则会诱发肿瘤。目前, 对于甲基化途径的各方面研究已有大幅度进展和突破, 针对 DNMTs 的 2 个抗肿瘤药物也已经上市。然而, 人类 DNA 主动去甲基化途径一直未被发现, 相关机制研究和药物开发均处于空白期。

直到 2009 年, Tet 蛋白家族在 5mC 去甲基化过程中关键作用的发现首次证实了人类 DNA 主动去甲基化途径的存在, 人类基因组 DNA 甲基化—去甲基化动态平衡图谱就此确立^[1]。

DNA 甲基化分布在细胞内至关重要。研究^[2]发现, Tet 蛋白在原始生殖细胞发育、受精卵成熟以及脑和神经系统的发育中起到了关键的调控作用。不仅如此, 大量实验和临床证据^[3]证实, Tet 蛋白的表达和功能异常与多种血液肿瘤 (如白血病) 和实体瘤 (如结直肠癌) 的发生和发展密切相关。因此, 围绕 Tet 的生物学功能所展开的研究将成为深入探讨肿瘤发生和发展机制的全新切入点。同时, Tet 也成为了全新抗肿瘤靶向药物筛选的潜在靶标。本文基于近年相关研究成果对 Tet 蛋白的结构、去甲基化

[基金项目] 国家自然科学基金 (21572133); 上海交通大学医学院“大学生创新训练项目”第十期 (2016008) (National Natural Science Foundation of China, 21572133; The 10th Undergraduate Training Programs for Innovation of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 2016008)。

[作者简介] 龚蔚 (1996—), 女, 本科生; 电子信箱: gwsjtu2014@163.com。孟周文理 (1995—), 男, 本科生; 电子信箱: yzmzw1@yeah.net。* 为共同第一作者。

[通信作者] 张良, 电子信箱: liangzhang2014@sjtu.edu.cn。



机制、生物学功能、与肿瘤的关联和高通量药物筛选进行综述。

1 Tet 蛋白家族和 DNA 去甲基化过程

1.1 Tet 蛋白家族

Tet 蛋白属于 α -酮戊二酸 (α -ketoglutaric acid, α -KG) 和亚铁离子 (Fe^{2+}) 依赖的双加氧酶家族, 主要包括 Tet1、Tet2 和 Tet3 这 3 种亚型。Tet1 蛋白最早在患有染色体 t (10; 11) (q22; q23) 易位的急性髓细胞性白血病患者体内被发现, 且 Tet1 与混合性白血病 (mixed-lineage leukemia, MLL) 基因有融合现象, 因此, 该蛋白最早被命名为含 CXXC 结构域的白血病相关蛋白 (leukemia-associated protein with a CXXC domain, LCX)^[4]。

长期以来, Tet 蛋白并没有被发现和胞嘧啶去甲基化有直接关系。2009 年, 美国 Anjana Rao 研究小组根据锥虫属 JBP1 (base J binding proteins 1) 和 JBP2 能催化胸腺嘧啶碱基环 5 号位的甲基氧化成羟甲基的生化反应现象, 推测脊椎动物体内存在其同工酶, 且具有类似的针对碱基环 5 号位甲基的催化氧化活性。随后, 通过计算机高通量序列比对, Iyer 等^[5]发现人体蛋白 Tet1/Tet2/Tet3 中具有 JBP1/JBP2 的催化结构域的同源区域, 并通过一系列生物实验证实了 Tet 蛋白可以催化 5mC 的 5 号位甲基氧化形成 5-羟甲基胞嘧啶 (5-hydroxymethylcytosine, 5hmC)。随后的研究^[6]证实, Tet 蛋白是生物体内存在的一种 α -KG 和 Fe^{2+} 依赖的双加氧酶。

对 Tet 蛋白家族的序列分析^[7]证实, 它们的结构具有较多共性, 都具有核定位序列, 都具有由靠近 C 末端的双链 β 螺旋 (double-stranded- β -helix, DS β H) 折叠区域构成的催化结构域以及一段先导的富含半胱氨酸区。DS β H 催化结构域含有特异性的 HXDXnH 模体, 可结合辅因子 Fe^{2+} 、 α -KG。 α -KG 和 H_2O 与 Fe^{2+} 结合形成八面体配体, 其中 Fe^{2+} 与其邻近的 C-H 键之间可以容纳羟基和甲酰基, 这为胞嘧啶衍生物的氧化提供了条件。而 Tet 蛋白的结构差异性主要表现在, Tet2 在富含半胱氨酸区结合有 3 个 Zn^{2+} , 其中有 2 个 Zn^{2+} 同时与 DS β H 结构域结合, 这使 Tet 的结构更加稳定; 而 Tet1 和 Tet3 还包含与 DNA 结合的区域 CXXC^[6]。

1.2 DNA 去甲基化过程

DNA 甲基化是一种在高等真核生物中重要的表观遗传修饰, 能导致基因沉默、X 染色体失活、转位因子抑制, 并稳定细胞类型的建立和维持。DNA 去甲基化广泛

发生在受精卵和原始生殖细胞中, 这一过程不影响基因的碱基排列顺序, 而是在时空上调节基因的表达。

研究^[6]证实, DNA 去甲基化存在 2 种主要途径: ①被动的 DNA 去甲基化。DNA 甲基转移酶 3A (DNMT3A) 和 3B (DNMT3B) 可以实现 DNA 从头甲基化, 而甲基化模式一旦确立, 便由 DNA 甲基转移酶 1 (DNMT1) 维持稳定。因此, DNMTs 含量下降或活性降低会导致哺乳动物细胞甲基化的 DNA 发生被动的去甲基化过程。②主动的 DNA 去甲基化。这一途径的起始步骤由 Tet 介导。Tet 在 Fe^{2+} 、 α -KG 和 O_2 的参与下将 5mC 的甲基逐步催化氧化为 5hmC、5-醛基胞嘧啶 (5-formylcytosine, 5fC) 以及 5-羧基胞嘧啶 (5-carboxylcytosine, 5caC), 最终通过转化这些核酸氧化产物完成 DNA 胞嘧啶的去甲基化。

Tet 催化产生 5hmC 的途径为: 活泼的 Fe^{2+} 与 Tet 蛋白 C 端催化域高度保守的 His-His-Asp 残基区域结合, 并同时与 H_2O 和 α -KG 形成配位键; O_2 进入反应体系, 使 α -KG 的双电子氧化, 生成 CO_2 、与酶结合的琥珀酸盐以及中间产物含氧四价铁; 含氧四价铁则进一步与 5mC 发生反应, 将其中一个氧原子转移给底物从而生成 5hmC, 此时, 含氧四价铁重新转化为 Fe^{2+} ^[7]。Tet 蛋白催化 5mC 所产生的第一个核酸氧化产物 5hmC 是 Tet 介导的去甲基化过程重要的中间产物, 可以通过 2 条反应通路继续反应。

第一条通路是在 Tet 酶作用下, 5hmC 进一步逐级氧化成 5fC 和 5caC, 随后 5fC 和 5caC 通过由胸腺嘧啶-DNA 糖基化酶 (thymine-DNA glycosylase, TDG) 介导的碱基切除修复机制 (base excision repair, BER) 切除碱基, 产生无碱基位点, 最终修复成正常胞嘧啶^[8-9]; 第二条通路则借助活化诱导脱氨酶 (activation-induced deaminase, AID) 将 5hmC 去氨基化, 生成 5-羟甲基尿嘧啶 (5-hydroxymethyluracil, 5hmU), 最后 5hmU 经过 BER 机制复原为未修饰胞嘧啶。值得注意的是, Tet 蛋白并非主动去甲基化所必须。5mC 也可以直接由 TDG/SMUG1-AID 通路实现去甲基化。然而由于 AID 脱氨功能较弱, 由 AID 介导的 DNA 主动去甲基化途径在体内尚未被完全证实。因此, 目前由 Tet 介导的 DNA 主动去甲基化途径是唯一明确的 DNA 主动去甲基化途径。

在 DNA 主动去甲基化的过程中, Tet 具有不同的分子水平亲和力。Tet 对单链 DNA 的亲和力强于双链 DNA^[10]。研究^[11]表明, Tet 的表观遗传调控功能不仅仅局限于 DNA, 在 RNA 中也有类似的催化功能, 但是 RNA 中 5mC 的含量要小于 DNA。Tet 对 5mC 的亲和力显著强于 5hmC 和

5fC^[6], 并且 5fC 和 5caC 在体内的浓度远低于 5hmC^[12]。在小鼠胚胎干细胞内, Tet 的底物还包括与鸟嘌呤形成错配的胸腺嘧啶。Tet 可以将胸腺嘧啶碱基 5 号位的甲基氧化形成 5hmU, 这是 DNA 中 5hmU 的大部分来源^[13], 而经由 AID 介导的 5hmC 脱氨反应生成的 5hmU 则占极小部分。

2 Tet 蛋白在 DNA 去甲基化中的生物学功能

2.1 受精卵发育

受精后, 父系基因组在第一次 DNA 复制之前经历了快速的去甲基化, 然而母系基因组的去甲基化则发生于随后的卵裂期^[14]。研究表明, 产生这种父系基因组与母系基因组去甲基化时间不一致的可能机制为: 父系 DNA 直接招募 Tet3 并介导其 5mC 的氧化^[15], 而母系基因组则通过其特有的组蛋白双甲基化 H3K9me2 招募 Stella。Stella 是一种母源功能的蛋白质, 能阻止 Tet3 的结合和催化, 进而保护母系基因组不被去甲基化^[16]。当雌雄原核融合之后, 母系染色体中的 5mC 和父系染色体中 Tet3 催化产生的 5hmC/5fC/5caC 均以一种依赖复制的方式减少^[17]。总之, 早期胚胎发育过程中的 DNA 去甲基化是一个精密调控的过程, Tet 在其中起到了重要的作用。

2.2 胚胎干细胞分化和细胞重编程

胚胎干细胞最初来源于囊胚的内胚层, 具有独特的自我更新能力和保持分化潜能的特性。研究^[18]发现, *Tet1* 基因敲除 (*Tet1*^{-/-}) 或者 *Tet1* 和 *Tet2* 双敲除 (*Tet1/2*^{-/-}) 会导致胚胎干细胞难以维持, 滋养外胚层和原始内胚层会异常分化, *Tet1*^{-/-} 或 *Tet1/2*^{-/-} 胚胎干细胞导致畸胎瘤的概率也大大增多。然而, *Tet1* 敲除的胚胎干细胞亦能产生 *Tet1*^{-/-} 小鼠, 其功能正常。*Tet2* 和 *Tet3* 基因敲除也并不能导致相同的表型。因而上述研究尚不足以确定 Tet 在维持胚胎干细胞中的作用^[19]。

Tet 和干细胞的联系也十分紧密。研究^[20]结果表明, Tet 在体细胞重编程中有助于产生诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cell, iPSC)。目前多能干细胞的诱导需要向细胞转染并表达关键的干性转录因子 Oct4、Klf4、Sox2 和 c-Myc (简称为 OKSM)。Tet1 的过表达不仅能通过促进 Oct4 去甲基化和活化, 增强重编程的效率, 还能在 iPSC 重编程过程中代替 Oct4 发挥作用^[21]。在 OKSM 转导早期阶段, Tet2 被招募到干细胞全能性因子 Nanog 和 Esrrb 的启动子区域, 活化了这些转录因子的

表达^[22]。另外, Tet1/2 还能与 Nanog 相互作用, 以一种依赖酶活性的方式促进 iPSC 的产生。因此, 除了 OKSM 介导的重编程, Tet1/2 也在融合介导体细胞重编程中发挥了关键作用。

2.3 原始生殖细胞 (primordial germ cell, PGC) 全基因组去甲基化

PGC 是产生雄性和雌性生殖细胞的干细胞, 和胚胎干细胞的分化过程相似, 其形成后也经历了复杂的表观遗传重编程过程, 包括全基因组 DNA 去甲基化。研究^[23]表明, PGC 中全基因组的去甲基化发生在 2 个不同的阶段。第一阶段的去甲基化发生于 PGC 迁移到生殖腺嵴之前或在此过程中, 表现为被动 DNA 去甲基化的方式, 而且实验也证明 Tet 蛋白在最初的广泛去甲基化的过程中并不是必需的。然而, 在第二阶段的去甲基化过程中, 基因组特定区域 (如 ICRs 等) 甲基化分布模式被大部分保留下来。这些序列的去甲基化仅在第二阶段完成, 即 PGC 到达性腺之后, 由 Tet1/2 介导主动去甲基化, 同时辅以 5mC 和 5hmC 依赖复制的方式稀释而去甲基化^[14]。

2.4 神经元发育

哺乳动物脑的发育过程在时空上是精密策划的, 需要准确地控制基因调控程序来产生功能各异的神经元和胶质细胞^[14]。DNA 甲基化模式的精确控制能促使大脑正常地发育和成熟。大脑中, 前额皮质、海马和小脑等组织中都存在 5hmC, 且成年小鼠中枢神经系统成熟神经元的基因组中有体内最高浓度的 5hmC^[24]。这表明 5mC 的氧化, 甚至是 DNA 去甲基化, 对神经元的分化和成熟有重要的作用。在小鼠发育中的脑组织中, Tet1、Tet2、Tet3 均能被检测到。在胚胎期的脑皮质中清除 Tet2/3 能造成神经元分化缺陷, 而 Tet2/3 的过度表达则能促进胚胎期皮质的神经发育^[25]。并且, 非洲爪蟾胚胎 Tet3 的缺失, 能导致眼和神经的发育缺陷^[26]。除此之外, 另有研究^[27]表明, Tet 蛋白也能调控成年小鼠大脑的功能。Tet1 缺陷会造成小鼠海马长期抑制, 进而损伤记忆。

成年小鼠大脑高浓度的 5hmC 提示 5hmC 也可能作为表观遗传标志物。现有数据^[28]表明, 5hmC 能招募甲基 CpG 结合蛋白 2 (methyl CpG binding protein 2, MeCP2) 等结合蛋白来促进产后小鼠大脑中基因的转录。MeCP2 是一个甲基 CpG 结合蛋白, 其含量异常会引起神经发育紊乱。5hmC 含量降低或功能缺失, 会影响 MeCP2 的募集, 进而影响神经系统发育和大脑功能。



3 Tet 蛋白突变与恶性肿瘤

3.1 Tet 蛋白突变与血液系统恶性肿瘤

Tet1 蛋白最先被发现与血液系统恶性肿瘤相关。在急性髓细胞性白血病患者中, 观察到 Tet1 蛋白靠近 C 末端的活性中心和 MLL 家族蛋白的 N 末端有融合现象^[3,29]。研究^[30]证实, MLL 与 Tet1 的结合会导致 Tet1 表达上调, 随后激活 Hoxa9、Meis1、Pbx3 等信号通路, 最终促进白血病的发生和发展。与 Tet1 不同, Tet2 被发现在肿瘤中表达下调。Delhommeau 等^[31]发现, 在 1 例骨髓增生异常综合征患者的体细胞中, 4 号染色体 4q24 区域 (编码 Tet2 蛋白) 有 325 000 bp 的基因微缺失现象。随后多个研究小组针对 Tet2 开展了基因测序和蛋白质测序, 揭示了一系列 Tet2 蛋白突变与髓系恶性肿瘤的关联现象^[3]。但是, Tet 蛋白突变导致的功能缺失和肿瘤的关联不是单纯的因果联系。在血液系统恶性肿瘤中, Tet2 蛋白的功能丢失并不能直接导致恶性肿瘤形成。研究证据^[3]表明, Tet 突变和其他表观遗传修饰相关基因的突变协同作用, 最终导致了肿瘤发生。然而, Tet2 变异与何种临床症状相关, 它与肿瘤生存率以及预后的确切联系如何, 仍有待进一步研究。

3.2 Tet 蛋白突变与实体瘤

临床证据^[32]表明, 相较于血液系统恶性肿瘤 Tet2 突变的案例数, 实体瘤 Tet 变异的案例数较少, 但是 Tet 蛋白家族 3 种亚型都有可能发生基因突变, 如结直肠癌中 Tet 家族都有发生基因突变的情况。同时, 也有可能只有 1 种蛋白发生突变, 如肾透明细胞癌和转移性前列腺癌中只观察到 Tet2 突变^[33]。事实上, Tet 蛋白与实体瘤的关系还牵涉到上游或者下游的相关信号因子。研究^[34]表明, 金属蛋白酶组织抑制因子 -1 (tissue inhibitors of metalloproteinase 2, TIMP2) 是 Tet 蛋白的下游信号分子之一。Tet 蛋白和 TIMP2 的表达下调, 与癌症恶化、淋巴结转移、乳腺癌生存率降低有密切关系。

3.3 肿瘤中 Tet 蛋白所受的多重影响

在肿瘤组织中 Tet 受到的影响是多重的, 如 miRNAs 对 Tet 的转录后调控、参与葡萄糖氧化过程的 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 (O-linked β -N-acetylglucosamine transferase, OGT) 对 Tet 分布的影响以及其他因子对 Tet 进行的翻译后调控等。miRNAs 对 Tet 的转录后调控主要体现为对 Tet 蛋白家族的抑制作用。miR-494 能直接以 Tet1 蛋白为作用靶点, 下调其表达, 促进肿瘤微血管生成^[35]。OGT 对 Tet 在基因组中的分布有重要影响。研究^[3]证实, OGT 能利用

O-乙酰葡萄糖胺基团 (O-GlcNAc) 修饰 Tet 蛋白, 增强其稳定性及核定位能力。另外, Tet 蛋白受到多种因子的翻译后修饰如单泛素化修饰调节。CRL4^{VprBP} 是一种泛素连接酶, 能直接修饰 Tet 蛋白活性中心, 其表达异常会损伤 Tet 蛋白的功能^[36-37]。然而, Tet 蛋白在肿瘤中并非一定表现为表达下调, 也有可能上调。依赖低氧诱导因子 -1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 的转录因子活性, 肿瘤低氧环境能诱导 Tet1 表达上调。因此, Tet 蛋白在肿瘤进程中受到的影响是多重的, 角色也是多变的。

4 Tet 酶活性检测和高通量靶向药物筛选

多种肿瘤中 Tet 蛋白都有不同程度的表达异常, 提示通过药物靶向调节 Tet 蛋白活性, 可能有利于治疗肿瘤。目前, 已经有靶向 Tet 蛋白的抗肿瘤药物进入临床, 如 DNMTs 抑制剂^[38]、IDH 突变型选择性抑制剂^[39]、Egln 脯氨酰羟化酶抑制剂^[40]和维生素 C^[41]等。但是, 这些药物临床应用范围狭窄, 其影响 Tet 蛋白活性的具体机制也有待研究。因此, 针对 Tet 蛋白的酶活性检测和高通量靶向药物筛选将有助于新药开发。Tet 蛋白酶活性检测是高通量靶向药物筛选的重要组成部分。研究^[42]表明, 现在针对 Tet 蛋白的酶活性检测方法主要包括斑点印迹法和液相色谱—质谱联用技术。斑点印迹法通过 4 种被修饰胞嘧啶的抗体探测吸水膜上的 gDNA 样本, 能够对 Tet 酶的产物进行半定量检测; 相比较而言, 液相色谱—质谱联用技术能够更精确地同时定量检测基因水平的多种胞嘧啶修饰。然而, 上述方法能否适用于高通量靶向药物筛选, 尚有待研究。另外, Luo 等^[43]发现, 琥珀酰辅酶 A 合成酶 (SCS)、丙酮酸激酶 (PK) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 能偶联琥珀酸生成反应和 NADH 氧化反应; NADH 有典型吸收波长, 易于观测, 因此该偶联技术可以测定类似 Tet 等一类依赖 Fe²⁺ 和 α -KG 且反应产生琥珀酸的双加氧酶的活性。使用这种方法进行高通量酶活性检测的可行性已经通过测定 TauD 和 TfdA 2 种代表性加氧酶的活性而得以证实。

5 结语

Tet 蛋白介导的去甲基化机制及其多样的生物学功能极大地拓展了对表观遗传修饰复杂性的认识。针对 Tet2 蛋白的高分辨率共晶结构分析, 深化了对催化 5mC 羟甲基化修饰分子机制的理解^[44]。Tet 蛋白和 5hmC 的表达水平在血液系统与实体肿瘤发生和发展过程中发生了改变, 从而为肿瘤疾病的诊断、预防和治疗提供了新靶点。

然而,研究的深入也带来了一系列有待进一步探讨的关键问题。如在 Tet 蛋白结构研究和催化氧化反应机制的探讨方面, Tet 蛋白介导的主动去甲基化作用的分子机制仍然存在争议^[6]。在 Tet 蛋白和人类疾病的关联方面, Tet 蛋白表达异常影响肿瘤发生、转化和恶化的具体机制仍然有待研究。在围绕甲基化调控的临床治疗方面,使用去甲基化

诱导剂如氮杂胞苷等治疗血液系统恶性肿瘤的效果参差不齐^[44]。综上所述,在分子水平上深入研究 Tet 蛋白催化氧化反应的结构基础和影响肿瘤发生、发展的具体机制,是当前的研究热点。此外, Tet 蛋白是新型抗肿瘤药物的作用靶点,针对其潜在活性调节剂开展高通量筛选将进一步拓宽 Tet 蛋白临床价值研究的总体思路。

参·考·文·献

- [1] Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1[J]. Science, 2009, 324(5929): 930-935.
- [2] Zhenwei J, Shuxin G, Yongchun Z, et al. Mechanisms of TET protein-mediated DNA demethylation and its role in the regulation of mouse development[J]. Hereditas, 2015, 37(1): 34-40.
- [3] Huang Y, Rao A. Connections between TET proteins and aberrant DNA modification in cancer[J]. Trends Genet, 2014, 30(10): 464-474.
- [4] Ono R, Taki T, Taketani T, et al. LCX, leukemia-associated protein with a CXXC domain, is fused to MLL in acute myeloid leukemia with trilineage dysplasia having t(10;11) (q22;q23)[J]. Cancer Res, 2002, 62(14): 4075-4080.
- [5] Iyer LM, Tahiliani M, Rao A, et al. Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids[J]. Cell Cycle, 2009, 8(11): 1698-1710.
- [6] Lu X, Zhao BS, He C. TET family proteins: oxidation activity, interacting molecules, and functions in diseases[J]. Chem Rev, 2015, 115(6): 2225-3229.
- [7] Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation[J]. Nature, 2013, 502(7472): 472-479.
- [8] Nabel CS, Kohli RM. Molecular biology. Demystifying DNA demethylation[J]. Science, 2011, 333(6047): 1229-1230.
- [9] Young RA. Control of the embryonic stem cell state[J]. Cell, 2011, 144(6): 940-954.
- [10] Kizaki S, Sugiyama H. CGmCGCG is a versatile substrate with which to evaluate Tet protein activity[J]. Org Biomol Soc, 2014, 12(1): 104-107.
- [11] Fu L, Guerrero CR, Zhong N, et al. Tet-mediated formation of 5-hydroxymethylcytosine in RNA[J]. J Am Chem Soc, 2014, 136(33): 11582-11585.
- [12] Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine[J]. Science, 2011, 333(6047): 1300-1303.
- [13] Pfaffeneder T, Spada F, Wagner M, et al. Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA[J]. Nat Chem Biol, 2014, 10(7): 574-581.
- [14] Wu H, Zhang Y. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions[J]. Cell, 2014, 156(1-2): 45-68.
- [15] Inoue A, Zhang Y. Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos[J]. Science, 2011, 334(6053): 194.
- [16] Nakamura T, Liu YJ, Nakashima H, et al. PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos[J]. Nature, 2012, 486(7403): 415-419.
- [17] Inoue A, Shen L, Dai Q, et al. Generation and replication-dependent dilution of 5fC and 5caC during mouse preimplantation development[J]. Cell Res, 2011, 21(12): 1670-1676.
- [18] Dawlaty MM, Ganz K, Powell BE, et al. Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development[J]. Cell Stem Cell, 2011, 9(2): 166-175.
- [19] Williams K, Christensen J, Pedersen MT, et al. TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity[J]. Nature, 2011, 473(7347): 343-348.
- [20] Apostolou E, Hochedlinger K. Chromatin dynamics during cellular reprogramming[J]. Nature, 2013, 502(7472): 462-471.
- [21] Gao Y, Chen J, Li K, et al. Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC induction reveals an important role of DNA methylation and hydroxymethylation in reprogramming[J]. Cell Stem Cell, 2013, 12(4): 453-469.
- [22] Doege CA, Inoue K, Yamashita T, et al. Early-stage epigenetic modification during somatic cell reprogramming by Parp1 and Tet2[J]. Nature, 2012, 488(7413): 652-655.
- [23] Seisenberger S, Andrews S, Krueger F, et al. The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells[J]. Mol Cell, 2012, 48(6): 849-862.
- [24] Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain[J]. Science, 2009, 324(5929): 929-930.
- [25] Hahn MA, Qiu R, Wu X, et al. Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine and chromatin marks in mammalian neurogenesis[J]. Cell Rep, 2013, 3(2): 291-300.
- [26] Xu Y, Xu C, Kato A, et al. Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for *Xenopus* eye and neural development[J]. Cell, 2012, 151(6): 1200-1213.
- [27] Rudenko A, Dawlaty MM, Seo J, et al. Tet1 is critical for neuronal activity-regulated gene expression and memory extinction[J]. Neuron, 2013, 79(6): 1109-1122.
- [28] Mellen M, Ayata P, Dewell S, et al. MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system[J]. Cell, 2012, 151(7): 1417-1430.
- [29] Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, et al. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias[J]. Leukemia, 2009, 23(8): 1490-1499.
- [30] Huang H, Jiang X, Li Z, et al. *TET1* plays an essential oncogenic role in MLL-rearranged leukemia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(29): 11994-11999.
- [31] Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in *TET2* in myeloid cancers[J]. N Engl J Med, 2009, 360(22): 2289-2301.
- [32] Seshagiri S, Stawiski EW, Durinck S, et al. Recurrent R-spondin fusions in colon cancer[J]. Nature, 2012, 488(7413): 660-664.
- [33] Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, et al. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma[J]. Nat Genet, 2013, 45(8): 860-867.
- [34] Hsu CH, Peng KL, Kang ML, et al. TET1 suppresses cancer invasion by activating the tissue inhibitors of metalloproteinases[J]. Cell Rep, 2012, 2(3): 568-579.
- [35] Chuang KH, Whitney-Miller CL, Chu CY, et al. MicroRNA-494 is a master epigenetic regulator of multiple invasion-suppressor microRNAs by targeting ten eleven translocation 1 in invasive human hepatocellular carcinoma tumors[J]. Hepatology, 2015, 62(2): 466-480.
- [36] Rawluszko-Wieczorek AA, Siera A, Jagodzinski PP. TET proteins in cancer: current 'state of the art'[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2015, 96(3): 425-436.
- [37] Nakagawa T, Lv L, Nakagawa M, et al. CRL4^{TRIP} E3 ligase promotes monoubiquitylation and chromatin binding of TET dioxygenases[J]. Mol Cell, 2015, 57(2): 247-260.
- [38] Yang X, Lay F, Han H, et al. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy[J]. Trends Pharmacol Sci, 2010, 31(11): 536-546.
- [39] Wang F, Travins J, Delabarre B, et al. Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation[J]. Science, 2013, 340(6132): 622-626.
- [40] Kaelin WG Jr. Cancer and altered metabolism: potential importance of hypoxia-inducible factor and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2011, 76: 335-345.
- [41] Blaschke K, Ebata KT, Karimi MM, et al. Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells[J]. Nature, 2013, 500(7461): 222-226.
- [42] Liu M Y, Denizio JE, Kohli RM. Quantification of oxidized 5-methylcytosine bases and TET enzyme activity[J]. Methods Enzymol, 2016, 573: 365-385.
- [43] Luo L, Pappalardi MB, Tummino PJ, et al. An assay for Fe(II)/2-oxoglutarate-dependent dioxygenases by enzyme-coupled detection of succinate formation[J]. Anal Chem, 2006, 353(1): 69-74.
- [44] Rasmussen KD, Helin K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer[J]. Genes Dev, 2016, 30(7): 733-750.

[收稿日期] 2016-10-19

[本文编辑] 朱宝渊

