

# 抗原受体基因重组的表观遗传学调控研究新进展

郑超固 阎锡蕴\*

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

**摘要** 淋巴细胞是哺乳动物唯一能发生体细胞基因组变化的一类细胞, 淋巴细胞在发育过程中通过 V(D)J 重组获得成熟的特异的抗原受体基因, 实现了免疫细胞抗原识别惊人的多样性. 关于 V(D)J 重组的调控机制一直是免疫学研究的重要问题, 然而直到将表观遗传学研究引入这一领域, 综合遗传学和表观遗传学的研究才真正揭示 V(D)J 重组精细的调控机制. 综述了新近发现的 V(D)J 重组过程中重要的表观遗传学调控机制, 如 CpG 甲基化, 组蛋白修饰, 核小体重塑及核拓扑学变化.

**关键词** V(D)J 重组, 表观遗传学, RAG 可及性, ACEs, 组蛋白修饰, 染色质重塑

**学科分类号** R392.11

哺乳动物的免疫系统能够抵御种类繁多并且不断改变的外来病原微生物, 这一惊人的能力主要是建立在 T, B 淋巴细胞多样性的基础上. 然而 T 和 B 细胞抗原受体(TCR 和 BCR)多样性是在淋巴细胞发育过程中产生的, 而且是不依赖于抗原的. 受到基因组复杂程度的限制, 淋巴细胞要产生如此巨大的抗原识别受体多样性( $> 10^8$ , 健康成人)几乎是不可能的. 在过去的 30 年间, 分子免疫学研究揭示了这种多样性的产生是源于一种只发生于淋巴细胞中位点特异性的体细胞基因组重组, 即 V(D)J 重组. TCR 和 Ig 基因在淋巴细胞发育过程中完成 V(D)J 重组, 对于形成具有完全功能的免疫细胞库至关重要. 因此, V(D)J 重组的调控直接与免疫系统的发育成熟及发挥正常功能相关. 另一方面, 基因组水平的变化容易产生异常的染色体易位并引发淋巴瘤, 所以针对 V(D)J 重组的精细调控同样十分必要. 除了基因水平与转录水平的调控以外, 越来越多的研究表明, 组蛋白修饰、CpG 甲基化以及染色质重塑等表观遗传学调控与 V(D)J 重组密切相关. 本文主要综述近几年来针对 V(D)J 重组过程中表观遗传水平调控的研究所取得的新进展.

## 1 V(D)J 重组简介

### 1.1 BCR 及 TCR 基因座的结构

BCR 在结构上是一个四聚体,

由两条完全一样的 Ig 重链(IgH)及共价结合的轻链(IgL, Ig $\kappa$  或者 Ig $\lambda$ )组成. TCR 有两种类型, 即异源二聚体 TCR $\beta$ /TCR $\alpha$  和 TCR $\gamma$ /TCR $\delta$ , 分别表达在两类 T 细胞表面. 其中 IgH, Ig $\kappa$ , Ig $\lambda$ , TCR $\beta$ , TCR $\alpha$ , TCR $\gamma$  和 TCR $\delta$  分别由 7 个不同的基因座编码, 并且在 T, B 细胞发育的过程中发生 V-J 或者 V-D-J 重组. 本文着重介绍研究较多的 IgH 和 TCR $\beta$  的重组调控.

如图 1<sup>[1]</sup>所示, 小鼠 IgH 基因座位于 12 号染色体上, 由 V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub>, J<sub>H</sub> 及恒定区组成. 恒定区的编码外显子分布在基因座 3'端的 ~200 kb 区域, 从 5' 至 3' 的顺序依次是 C $\mu$ , C $\delta$ , C $\gamma$ 3, C $\gamma$ 2b,

\* 通讯联系人.

Tel: 010-64888583, E-mail: yanxy@ibp.ac.cn

收稿日期: 2007-12-29, 接受日期: 2008-01-10

**阎锡蕴** 医学博士, 中国科学院生物物理研究所研究员. 1993 年在德国海德堡大学获医学博士, 1995 年在美国 Sloan-Kettering 癌症研究中心完成博士后工作. 1997 年入选中国科学院“百人计划”. 长期从事抗体及其靶分子作用机制的研究. 她领导的课题组在抗体研究方面发表学术论文 50 余篇, 获得发明专利 10 项, 2 项成果转化. 特别是发现肿瘤血管新靶点 CD146 的功能作为封面论文在 Blood 发表, 被国际同行评为“新发现”并收录到 Faculty of 1000 Biology. 与其相关的发明专利转让制药公司. 在肿瘤诊断方面, 结合磁性纳米颗粒建立新型免疫检测方法. 研究结果发表后, 迅速引起同期杂志 Nature Nanotechnology, Science News 和 Nanowerk 等多种权威期刊的评论文章, 对其科学意义和应用价值给予高度评价.

C $\gamma$ 2a, C $\epsilon$  以及 C $\alpha$ . 4 个 J $_H$  片段分布在编码 C $\mu$  外显子上游 7.5 kb 处, 13 个 D $_H$  片段则临近 J $_H$  区的 5' 端. 将近 150 个 V $_H$  片段分布于 D $_H$  区的上游 1 Mb 区域, 这些 V $_H$  片段被分作不同的家族, 同一家族的 V $_H$  片段具有较高的序列相似性. 接近 D $_H$  区的家族(D-proximal family)称作 7183, 最靠近 5' 的远端 V $_H$  家族 (distal V $_H$  family)是 J558. D $_H$  基因片段的两侧都有 12 bp RSS(重组识别序列), 而 V $_H$  和 J $_H$  基因片段均含有一个 23 bp RSS. 因此, 依照 12/23 规则, 避免了 V $_H$  和 J $_H$  的重组接合而保证每一个 IgH 基因中都含有一个 D $_H$  片段. 由 CLP (common lymphoid progenitor) 细胞分化而来的 Pro-B 细胞基因组在早期(early phase)先发生 D $_H$   $\rightarrow$  J $_H$  重组, 之后在晚期(late phase)发生 V $_H$   $\rightarrow$  D $_H$ J $_H$  重组. 经过克隆扩增和反馈抑制, 发育成具有

Pre-BCR 的 Pre-B 细胞.

TCR $\beta$  基因座位于小鼠 6 号染色体上, 靠近 5' 端的区域由 35 个 V $\beta$  基因片段组成, 其中 14 个是无功能的假基因. 3' 区域有两个 D $\beta$ J $\beta$  片段丛, 每一个片段丛含有 1 个 D $\beta$  片段和 6 个有功能的 J $\beta$  片段. 编码恒定区的 C $\beta$ 1 和 C $\beta$ 2 分别位于这两个 D $\beta$ J $\beta$  片段丛的下游. 另外, 一个单独的 V $\beta$  片段, V $\beta$ 14 以倒置的形式位于 C $\beta$ 2 的下游. 所有 V $\beta$  片段的 3' 侧和 J $\beta$  片段的 5' 侧均有一个 23 bp RSS, 而 D $\beta$  的两侧含有一个 12 和一个 23 bp RSS. 同样由 CLP 分化形成双阴(DN)的 Pro-T 细胞在从 DN II 期到 DN III 期的过程中先后完成 D $\beta$   $\rightarrow$  J $\beta$  和 V $\beta$   $\rightarrow$  D $\beta$ J $\beta$  重组, 经过  $\beta$  选择和反馈抑制发育成具有 Pre-TCR 的 Pre-T 细胞.

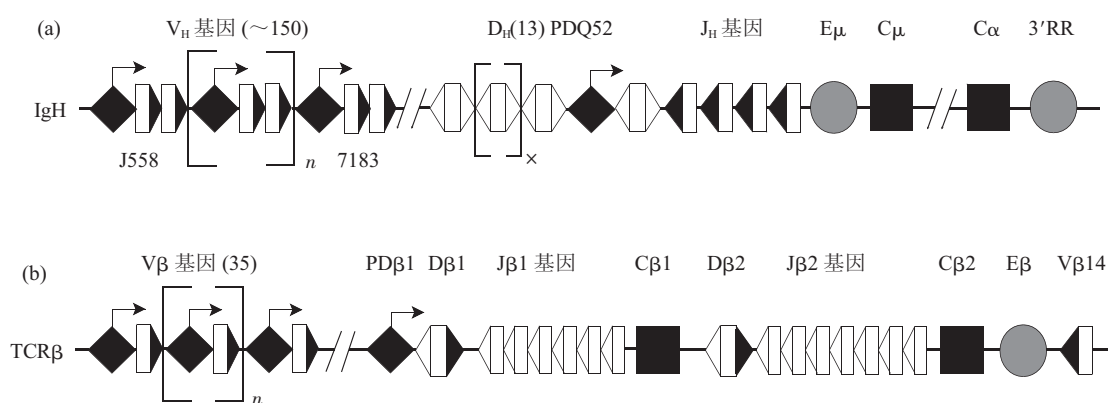


Fig. 1 Genomic architecture of mouse IgH and TCR $\beta$  loci [1]

图 1 小鼠 IgH 和 TCR $\beta$  基因座结构示意图[1]

(a) 小鼠 IgH 基因座由 V $_H$ , D $_H$ , J $_H$  及恒定区组成, 两个增强子 E $\mu$  和 3'RR, 以及一个 D $_H$  区启动子 PDQ52 发挥 ACEs 的功能. (b) TCR $\beta$  基因座由 V $\beta$ , D $\beta$ , J $\beta$  及恒定区 C $\beta$ 1, C $\beta$ 2 组成, 增强子 E $\beta$  和一个 D $\beta$  区启动子 PD $\beta$ 1(PD $\beta$ 2 未标出)发挥 ACEs 功能. 图中, 白色矩形代表 V-D-J 基因片段, 黑色正方形代表编码恒定区外显子, 黑白三角形分别代表 23 bp 和 12 bp RSS, 菱形代表启动子, 浅色圆形代表增强子.

### 1.2 RAG-1/2 及重组分子机制

重组激活基因 RAG 编码的蛋白 RAG-1/2 通过识别并切割基因片段侧翼的 RSS, 引发和介导了 V(D)J 重组. DNA 双链中被切开的一条链产生的 3'-OH, 在 RAG-1/2 催化下进攻另一条链上的磷酸酯键, 并形成双链 DNA 断裂缺口. 两个编码序列末端 (coding ends) 连接形成发卡结构, 然后经过任意的发卡切割, 由 TdT 催化添加 P 区和 N 区脱氧核苷酸, 最终相互重组形成编码接合点(coding joint) [2].

RAG-1 和 RAG-2 蛋白分别具有 1 040 和 527 个氨基酸. RAG-1 的氨基酸残基 384~1 008 组成

其核心区段, 具有 DNA 切割催化活性[3], 能够识别和结合 RSS[4], 接触编码侧翼[5]. RAG-2 的核心区则由氨基酸残基 1~387 组成, 能够稳定 RAG-1 和 RSS 的结合, 介导 DNA 剪切处附近的螺旋扭曲, 这种拓扑变构对于转酯反应是必需的[4,5]. 因此, RAG-2 核心区的突变能够严重影响重组酶介导的剪切和连接[6].

因为 RAG-1/2 在 V(D)J 重组反应中的关键作用, 淋巴细胞分化过程中的 V(D)J 重组调控在一定程度上可以通过调节 RAG-1/2 的表达来实现. RAG 基因的转录受到许多顺式作用元件(cis-acting element)的控制, 在非淋巴细胞中被抑制, 而在

Pre-B 和 Pre-T 淋巴细胞中被激活<sup>[7]</sup>. 研究表明, RAG-1/2 的表达起始于 CLP 时期, 并在 CLP 细胞中启动靶向 IgH 基因座的  $D_H \rightarrow J_H$  重组, RAG-1/2 的转录主要受到 Erag 增强子的控制, 而 Erag 增强子只是在 B 细胞谱系中特异活化<sup>[7]</sup>. 然而, V(D)J 重组的调控不可能完全由 RAG-1/2 的表达来决定, 因为 RAG 在前体淋巴细胞的所有发育时期都有不同水平的表达, 而 V(D)J 重组的高度有序以及细胞特异性均不能简单地用 RAG-1/2 蛋白表达量来解释. 因此, 很显然有其他的因素影响和调控 V(D)J 重组.

## 2 可及性调控

### 2.1 可及性假说

高度有序的抗原受体基因重组依赖于 V(D)J 重组酶在淋巴细胞发育的不同时期靶向 Ig 或者 TCR 基因座的不同区域. 而这一过程在几个不同水平受到调控: a. 组织特异性, 如只有淋巴细胞能够发生 V(D)J 重组, 虽然非淋巴细胞也有完全一样的胚系 DNA; b. 基因座重组的有序性, 如先发生  $D\beta \rightarrow J\beta$  重组, 再发生  $V\beta \rightarrow D\beta J\beta$  重组; c. 分化时期特异性, 如 TCR $\beta$  重组发生在 pro-T 细胞中, TCR $\alpha$  重组发生在 pre-T 细胞中; d. 等位排斥, 一个轻链或重链基因的功能性重排将抑制同一细胞中另一等位基因的重排.

对于发生在不同细胞和分化时期中不同的 V(D)J 重组过程, 起到核心作用的重组酶 RAG-1/2 及其底物 RSS 几乎是完全一致的. 如此普遍的酶/底物系统是如何实现特异性以及精细调控的, 一直是分子免疫学研究的重要问题. Alt 和 Perry 实验室<sup>[8,9]</sup> 20 世纪 80 年代的工作发现胚系基因片段的转录起始于这些基因片段发生重组的细胞. 例如未重排的  $V\beta$  基因片段在 pro-T 细胞中被转录激活, 而不在 pre-T 或者 B 细胞谱系中转录<sup>[10]</sup>. 自这些开创性的发现之后, 越来越多的证据证实了胚系基因片段的转录与 V(D)J 重组密切相关, 而且这种关联存在于几乎所有的 Ig 和 TCR 基因片段<sup>[11]</sup>. 转录与重组的相关引出了可及性假设 (accessibility hypothesis), 即抗原受体基因的重组整合是由染色质对于重组酶复合物的可及性控制的. 不容易发生重组的基因片段被包装进一种 RAG 不可接近的染色质构象中, RAG 不能结合和剪切这类基因片段 (图 2a); 而需要靶向重组的基因片段则被包装进一种“开放”的染色质构象, RAG-1/2 和 RNA 聚合酶都能够接近这种构象下的基因片段 (图 2b).

RAG 对含有 RSS 序列基因片段的可及性在重组活化过程中会发生改变, 被重组靶向的基因片段附近的染色质由一种 RAG 不可及的构象转变成另一种 RAG 可接近的开放构象. 这种染色质构象改变依赖于染色质重塑复合体的参与, 而染色质修饰

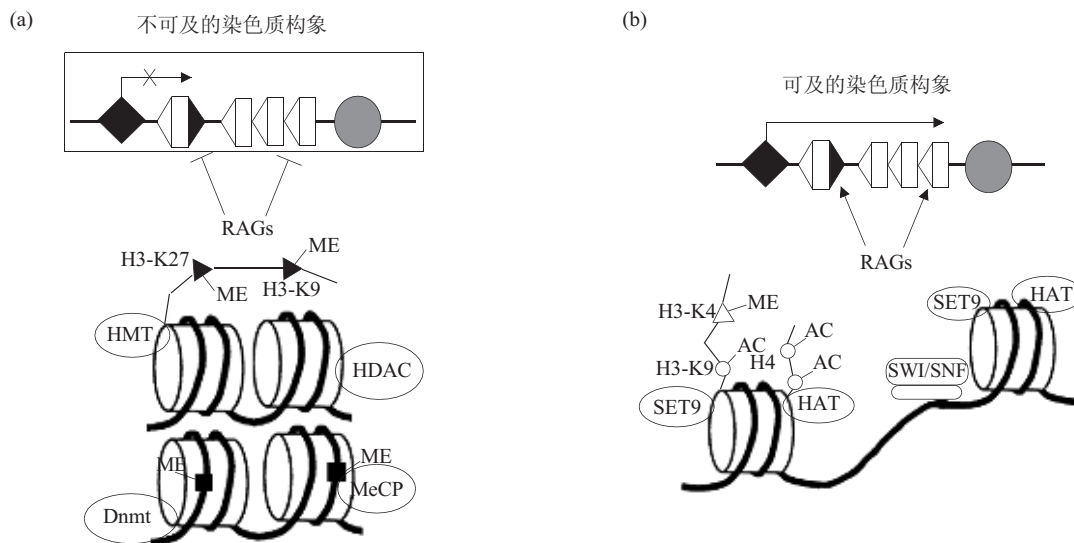


Fig. 2 Chromatin modifications for accessibility control<sup>[11]</sup>

图 2 重组酶可及性控制相关的染色质修饰<sup>[11]</sup>

(a) 处于致密聚缩状态的染色质是 RAGs 不可及的, 由一种染色质修饰模式导致, 包括 HMT 催化的 H3-K9 和 H3-K27 甲基化, HDAC 介导的去乙酰化, 以及 Dnmt 依赖的 CpG 甲基化及 MeCP 募集. (b) 染色质“开放”状态下重组酶可接近底物 RSS, 这种构象依赖于组蛋白的特定修饰模式, 如 H3-K4 甲基化, H3-K9 乙酰化, H4 乙酰化, 这些修饰由 SET9 或 HAT 催化完成, 并招募重塑复合体 SWI/SNF. 图中, 三角形和 ME 表示组蛋白特定定位点的甲基化, 圆形和 AC 表示组蛋白乙酰化, 黑色正方形和 ME 则代表 CpG 甲基化.



(包括 CpG 甲基化, 组蛋白修饰等)对于招募重塑复合体非常关键. 不同模式的染色质修饰会招募不同类型的重塑复合体, 从而增加或者降低局部染色质可及性(图 2). 同时抗原受体基因座上特定的调控区域发挥着 ACE(可及性调控元件)的功能, 控制重组酶底物可及性.

## 2.2 可及性调控元件

基因表达受到许多顺式作用元件, 如转录启动子, 增强子, 基因座控制区(LCRs)和沉默子等调控. 这些元件最主要的功能是通过结合转录因子(TFs)来调整周围染色质的可及性. 对于抗原受体基因座来说, 基因片段的胚系转录和 V(D)J 重组之间相互关联, 说明这两个过程很可能享有相同的调控元件. 启动子和增强子作为两类重要的转录调节元件分散在 Ig 和 TCR 基因座相距较远的位置, 控制不同基因片段丛的转录与重组.

早期的工作证明了转录增强子在外源 TCR $\beta$  转基因底物的有效重组过程中发挥重要作用<sup>[12]</sup>. 同样的, 内源染色体底物的重组也需要增强子和启动子的参与<sup>[13]</sup>. 从胚系抗原受体基因座中去除这些增强子和启动子会严重阻碍相关基因片段的重组<sup>[14, 15]</sup>. 因此, 启动子和增强子作为 ACEs, 严格控制着 V(D)J 重组酶发挥作用, 进而调节抗原受体基因的重组及淋巴细胞发育. 下面举例介绍 IgH 和 TCR $\beta$  基因座的可及性调控元件.

### 2.2.1 IgH 基因重组的可及性调控元件. 小鼠 IgH 基因座包含两个功能性的增强子区域, E $\mu$ 启动子和 3'RR 启动子. E $\mu$ 位于 J $_H$ 片段区和 C $\mu$ 编码外显子之间的内含子(图 1a), 核心 E $\mu$ 元件包括许多 TFs (包括 Oct, ETS 和 E2A) 结合位点<sup>[16]</sup>, 其侧翼是两个 MARs (核基质附着区). 3'RR (3'调节区域) 位于 C $\alpha$ 的下游, 包含 4 个呈现不同增强子功能的 DNase 高度敏感区域, 参与亚型转换控制并促进成熟的 B 细胞中 IgH 的表达<sup>[17]</sup>.

E $\mu$  的缺失显著抑制了 V $_H$ →D $_H$ J $_H$  重组, 但是对于 D $_H$ →J $_H$  重组的抑制并不完全<sup>[14]</sup>, 暗示可能有其他的辅助性元件存在. 另一个 DNase 超敏感区 PDQ52 位于近 J $_H$  的 DQ52 基因片段的 5'端, 这个区域具有启动子和增强子的双重活性. 然而, PDQ52 的定点缺失并不影响胚系 DQ52/J $_H$  转录和 D $_H$ →J $_H$  重组<sup>[18]</sup>. 3'RR 能够在超过 200 kb 的长距离上呈现调节功能, 可能与促进 D $_H$ →J $_H$  重组相关<sup>[17]</sup>. 尽管如此, 其他控制 D $_H$ →J $_H$  重组的调控元件仍有待发现.

### 2.2.2 TCR $\beta$ 基因重组的可及性调控元件

TCR $\beta$  的基因座因为在 D $\beta$ J $\beta$  区域只包含一个增强子 E $\beta$ , 而每一个 D $\beta$ J $\beta$  片段丛有一个胚系启动子(图 1b), 成为良好的重组可及性研究模型. E $\beta$  位于基因座 C $\beta$ 2 编码外显子的 3'下游. E $\beta$  的敲除抑制了 D $\beta$ J $\beta$  片段丛的转录及重组, 并将相关的染色质修饰转变成了抑制性的常染色质模式<sup>[15, 19]</sup>. PD $\beta$ 1 启动子位于 D $\beta$ 1 的 5'端, 包括 5'D $\beta$ -RSS 中的 TATA 序列, 能够在 pro-T 细胞中诱导胚系 D $\beta$ J $\beta$  片段丛转录<sup>[20]</sup>. PD $\beta$ 1 的缺失阻碍了 D $\beta$ 1J $\beta$  转录和重组, 但对 D $\beta$ 2J $\beta$  没有影响, 而且去除 PD $\beta$ 1 只在 D $\beta$ 1 周围小于 450 bp 的距离内抑制染色质可及性, 说明这个启动子的作用在空间上有一定局限性<sup>[21, 22]</sup>. 启动子 E $\beta$  具有 PD $\beta$  不依赖的 ACE 活性, 能够开放整个 D $\beta$ J $\beta$  片段丛的染色质, 但是却无法调控 D $\beta$ 1 基因片段. 这一特殊片段的重组酶可及性和胚系转录需要另外一些依赖于 PD $\beta$ 1 的重塑复合体在此区域聚集. 很可能, PD $\beta$ 1 与 E $\beta$  之间形成稳定的全复合体 (holocomplex) 是在这个区域发生重塑的基础.

## 3 染色质修饰与 V(D)J 重组可及性调控

V(D)J 重组酶作用于抗原受体基因座上的过程是被 ACEs 严格控制的, 这些 ACEs 使基因座保持开放的构象, 用以形成重组必需的核蛋白复合体. 作为重要的两类 ACEs, 增强子能够在很大的范围内(整个片段丛)调节染色质可及性<sup>[22]</sup>, 而启动子的功能在空间上更加局限<sup>[23]</sup>. 在抗原受体基因座上, 这两类 ACEs 分布在距离很远的不同位置, 通过形成稳定的启动子 / 增强子全复合体 (promoter/enhancer holocomplex) 跨越空间阻隔相互联系<sup>[22, 24]</sup>. 这种 ACE 全复合体能够在被靶向的基因片段区聚集染色质调节因子和重塑复合物, 进而改变重组酶可及性, 引发 V(D)J 重组.

V(D)J 重组酶对于底物 RSS 的可及性改变(由不可及变成可及)依赖于染色质重塑, 控制这一过程的许多表观遗传和生化的机制近年不断被揭示出来. 非常多的研究证实, 和转录调控一样, 染色质修饰、核酸酶敏感性与 V(D)J 重组之间相互联系, 关联紧密. 提高局部 RAGs 可及性的染色质重塑依赖于特定模式的染色质修饰, 同样维持重组抑制保持染色质不可及则依赖于另一种模式的染色质修饰(图 2). 本文着重介绍 CpG 甲基化和组蛋白修饰在影响染色质可及性方面的作用.

### 3.1 CpG 甲基化

CpG 双核苷酸的甲基化是导致遗传性基因沉默的一种重要机制。在基因组中, 高度甲基化的区域大多形成了不可及的染色质构象。这种抑制性 DNA 修饰能够招募甲基 -CpG 结合蛋白, 如 MeCP2, 进而聚集 HDAC 以及抑制型的核小体重塑复合物, 从而建立局部抑制性的染色质环境<sup>[25]</sup>。同样, 在 V(D)J 重组中高度 CpG 甲基化的基因片段也是沉默的, 因此, 去除 CpG 的甲基化修饰是形成重组酶可及基因座的先决条件。

ACE 的一个主要功能就是靶向去甲基化而且保护基因片段不被重新甲基化<sup>[26]</sup>。从内源的 TCR $\beta$  基因座上去除 PD $\beta$ 1 或者 E $\beta$  都会导致 CpG 甲基化的显著增加, 以及相应的 D $\beta$ J $\beta$  片段从 RE 敏感性下降<sup>[25]</sup>。许多研究表明, CpG 甲基化能够直接抑制 V(D)J 重组。3'D $\beta$ 1-RSS 包含一个 CpG 双核苷酸, 研究缺乏 PD $\beta$ 1 的 TCR $\beta$  基因座发现, 这个位于 RSS 之内的 CpG 双核苷酸甲基化之后就无法被 RAG 所剪切<sup>[21]</sup>。之后体外实验也证实了 RSS 的 DNA 甲基化能够抑制 RAG 介导的 DNA 剪切<sup>[27]</sup>。然而大部分 RSS 都缺乏一个 CpG 双核苷酸, 因此, 抗原受体基因座上 CpG 甲基化的主要效应还是抑制基因片段对重组酶的染色质可及性。

### 3.2 组蛋白修饰

大体上说, 重组活化的基因座呈现出与转录激活的表达基因类似的组蛋白修饰模式。比如, pro-T 细胞中发生重组的 D $\beta$ J $\beta$  片段丛有较高的 H3-K9 和 H4 乙酰化水平, 高的 H3-K4 甲基化水平, 以及较低的 H3-K9 甲基化水平<sup>[28]</sup>, 而相反的组蛋白修饰模式在 pro-B 细胞的 D $\beta$ J $\beta$  被观察到。这些证据表明, 组蛋白编码(histone code)很可能是控制染色质可及性发生组织、时期以及等位特异改变的决定因素。

**3.2.1 组蛋白乙酰化。**组蛋白乙酰化是一种重要的基因表达表观遗传调控手段。对于组蛋白乙酰化, 较多的研究集中在 H3-K9, 这个氨基酸是众多组蛋白乙酰转移酶(HATs)及去乙酰化酶(HDACs)的靶点, HATs 直接乙酰化组蛋白, 改变局部的转录活性, 而 HDACs 虽然不直接结合 DNA 但是能够招募一些抑制性的 TFs 或者转录抑制因子复合物<sup>[29, 30]</sup>。乙酰化的 H3-K9 与其他的 HATs 以及核小体重塑复合物的 bromodomain 有很高的亲和力, 而由乙酰化招募的蛋白质能够进一步增强染色质可及性<sup>[31]</sup>。因此, 表达的基因座常常与核小体 H3-K9

乙酰化有关, 而沉默的基因座 H3-K9 往往是低乙酰化<sup>[32]</sup>。

许多研究表明, 组蛋白 H3/H4 的乙酰化与基因片段发生重组的潜能相关<sup>[33, 34]</sup>。体外实验发现, 核小体乙酰化能够促进 RAG 介导的 RSS 剪切<sup>[35]</sup>。很多工作都证实, 活跃地发生重排的抗原受体基因座与组蛋白高度乙酰化相关, 相反, H3/H4 的乙酰化不足是重组不活跃基因片段的显著特征<sup>[28, 33]</sup>。但是重组与乙酰化之间准确的因果关系并不清楚。有证据显示, 组蛋白乙酰化程度的改变是重组酶可及性调节中必要的环节, 然而高度乙酰化并不足以引发靶向重排。去除胚系启动子 PD $\beta$ 1 能够在几乎所有的 D $\beta$ 1J $\beta$  片段丛上保持高度组蛋白乙酰化, 但是这些基因片段却无法有效发生重排<sup>[21, 22]</sup>。另一个报道指出, PAX-5 缺陷的 pro-B 细胞中远端 V $\mu$  片段的高度乙酰化也与重组无关<sup>[36]</sup>。

H3-K9 乙酰化水平的转变(从高度乙酰化到低乙酰化)是发生等位排斥的重要表征。在从 pro-B 到 pre-B 转变的过程中, 失去 IL-7R 信号会导致 V $\mu$  基因片段乙酰化水平与染色质可及性的降低<sup>[33]</sup>。同样, 在 T 细胞从 DN 向 DP 转变时, V $\beta$  片段上也能观察到乙酰化减少<sup>[37]</sup>。然而, 并不清楚哪些 HATs 和 HDAC 介导了抗原受体基因座上乙酰化状态的改变。去除 E $\beta$  会影响胚系启动子区域 HAT 复合物的组成, 增加 P300 与 PD $\beta$ 1 的结合而减少 CBP 及 PCAF 的结合<sup>[38]</sup>。改变 HAT 复合物的组分平衡会导致 H3 及 H4 中需要被乙酰化赖氨酸残基的准确排列位置发生变化, 因此不能形成一个合适的锚定平台来招募必要的染色质重塑复合物<sup>[38]</sup>。因此, 组蛋白的乙酰化很可能是招募重塑复合物, 完成染色质重塑, 改善重组可及性的重要前提。

**3.2.2 H3-K9 甲基化。**H3-K9 的甲基化会导致相关的转录单元表达抑制, 而甲基化的程度与基因表达的抑制程度和不同的染色体构象有关<sup>[39]</sup>。H3-K9 的双甲基化修饰由两类 HMTs(组蛋白甲基转移酶) G9a 和 GLP 催化完成, 主要分布在常染色质和兼性异染色质中被抑制的基因上<sup>[40]</sup>。而 H3-K9 的三甲甲基化由 Suv39h1 和 Suv39h2 催化, 主要分布在成型异染色质<sup>[40]</sup>。甲基化的 H3-K9 招募一套完全不同于乙酰化修饰所招募的重塑复合物。这类复合物主要含有 chromodomain, 能够抑制局部的染色质可及性<sup>[39, 41]</sup>。

重组不活跃的基因座不仅常常发生 H3-K9 的乙酰化不足, 也在这同一个氨基酸上积累高度的甲基



化修饰<sup>[28, 42]</sup>。例如,  $V_H$  片段呈现出组织特异性的 H3-K9 双甲基化修饰, 在胸腺细胞和非淋巴细胞中, H3-K9 高度甲基化, 而在 pro-B 细胞中这一区域的 H3-K9 低甲基化并且高度乙酰化<sup>[42]</sup>。在 pro-B 细胞中, 组织特异的  $V_H$  片段区 H3-K9 去甲基化依赖于 PAX5 的表达。因此, PAX5 不仅通过 IgH 基因座长距离压塑(contraction)来调节 V(D)J 重组<sup>[43]</sup>, 还能够通过改变染色质修饰而影响重组可及性。然而,  $V_H \rightarrow D_H J_H$  重组的时期特异性并不与 H3-K9 甲基化修饰有关, 因为  $V_H$  片段丛在完成了等位排斥及重组抑制的 pre-B 细胞中仍旧保持低甲基化<sup>[42]</sup>。

和其他的组蛋白修饰不同, H3-K9 的甲基化与重组酶可及性之间的因果关系已经在 TCR $\beta$  基因座上被阐明。Osipovich 等<sup>[44]</sup>的研究发现, 即使存在功能性的 ACE, 将 G9a 组蛋白甲基转移酶(HMT)招募到重组活跃的染色体上仍旧可以阻碍胚系 DNA 转录以及  $D\beta \rightarrow J\beta$  重排。G9a 招募引起的组蛋白修饰及底物可及性抑制是高度集中而且可逆的, 这些特征与 DP 期 pre-T 细胞中 TdT 和 RAG 基因座的瞬时沉默非常类似。这 2 个基因座也是在接近启动子很集中的区域上发生可逆的 H3-K9 甲基化修饰<sup>[7]</sup>。然而 DP $\rightarrow$ SP 转变重排全部完成时, 持续而广泛的 H3-K9 甲基化出现在这些基因座上, 并导致了可遗传的基因沉默。很可能 pro-B 细胞也采用类似的机制在发生等位排斥时在  $V_H$  片段区快速形成不可及的染色质。这一过程需要招募 HMT, 并在  $V_H$  片段丛非常集中的一段区域上形成 H3-K9 双甲基化修饰来迅速抑制重组酶的可及性。而 pro-B 向 pre-B 细胞的分化则需要更稳定的重组抑制形式, 即贯穿整个  $V_H$  片段丛广泛的 H3-K9 三甲基化及 CpG 甲基化修饰。

**3.2.3 H3-K27 甲基化。** H3-K27 的甲基化一般与稳定的转录抑制相关<sup>[40]</sup>。作为 PRC2 抑制因子复合体的重要成分, Polycomb 家族蛋白, 如 Ezh2 甲基转移酶, 能够引发 H3-K27 的甲基化<sup>[45]</sup>。至今没有直接报道显示 H3-K27 甲基化抑制抗原受体基因座的重组酶可及性。令人吃惊的是, 敲除 Ezh2 可以抑制远端  $V_H$  基因片段的重排, 却不影响胚系 DNA 转录和组蛋白乙酰化<sup>[46]</sup>。Ezh2 的缺失降低了整个远端  $V_H$  片段的组蛋白乙酰化水平, 但是这种乙酰化程度降低是否直接和 H3-K27 的乙酰化相关并不清楚。因为 Ezh2 和 H3-K27 乙酰化一般认为是抑制性的, 而 Ezh2 敲除的 B 细胞中获得的意外结果暗示, 可能在远端  $V_H$  片段丛上存在一种间接的

HMT 参与的重塑调控机制。

## 4 核小体重塑及细胞核拓扑学变化与 V(D)J 重组可及性调控

### 4.1 核小体重塑调控 V(D)J 重组

染色质重塑在很大程度上依靠核小体的重塑来完成。核小体是 DNA 盘绕在组蛋白核上的产物, 因为高度包装聚缩而抑制了重组可及性。Kwon 等<sup>[47]</sup>发现, V(D)J 重组能够通过控制底物可及性与切割效率在单个核小体水平被调控。核小体相对于 RSS 的准确相位与 RAG 切割底物的效率密切相关。深入的研究发现, SWI/SNF 重塑复合体中 ATPase 亚基——Brg1, 能够有效地抑制 RAG 引起的 DNA 剪切<sup>[35]</sup>。令人惊奇的是, RSS 本身就具有定向配置核小体(nucleosome positioning)的功能, 通过将其自身包装进核小体来抑制重组可及性<sup>[48]</sup>。RSS 介导的核小体定向配置不仅是一种遗传保护用以避免不恰当的重组, 也提供了一种新的核小体水平的重组调控方式。总的来说, 重组酶靶向底物 RSS 的可及性依赖于核小体的重新组织, 而这种核小体重塑需要 ACE 的参与。

一些组蛋白的修饰, 如乙酰化, 和基础的转录复合体能够在转录活化位点招募 SWI/SNF 复合物<sup>[49]</sup>。染色体免疫共沉淀实验发现重塑复合物中有催化活性的成分 Brg1 广泛地结合在即将发生重组的基因片段丛上<sup>[28]</sup>。而且 pro-T 细胞中的研究表明, 重塑复合物与  $D\beta J\beta$  片段丛的结合是依赖于增强子  $E\beta$  的, 去除  $E\beta$  导致重组酶不可及的  $D\beta$  片段区核小体密度的增加<sup>[49]</sup>。RE(限制性内切酶)敏感性可以用于表征核小体结构及可及性改变。应用 RE 敏感性检测发现, 在缺乏  $PD\beta 1$  时,  $E\beta$  发挥着重要 ACE 的功能, 影响着整个  $D\beta J\beta$  的染色质可及性, 但是  $D\beta 1$  却是一个例外, 不被  $E\beta$  激活仍旧保持不可及状态<sup>[22]</sup>。很可能  $D\beta 1$  区相关的一两个核小体的重塑非常特殊地依赖于  $PD\beta 1$ 。

虽然发生在重组靶向基因片段上 ACE 依赖的核小体组织及重塑对于 V(D)J 重组调控十分重要, 但是抗原受体基因座如何招募重塑复合物这一问题仍旧缺乏遗传及表观遗传学上的证据。

### 4.2 核拓扑学变化调控 V(D)J 重组

虽然染色质可及性变化主要通过组蛋白和基因组 DNA 的共价修饰, 然而细胞核动态变化的复杂性提供了另一个水平的调节机制。这种动态变化依赖于指定基因座与染色体或细胞核不同区域的相互

作用<sup>[50]</sup>. 应用荧光原位杂交(FISH)技术能够观察到亚核水平的位移, 以及大的基因座拓扑学形态的变化. 利用这一手段, 很多研究发现, 沉默的基因大多停留在核的外周, 而表达的基因更多地位于核的中心<sup>[51,52]</sup>. 可能的原因是处于外周的基因转录调控元件不能与相应转录因子结合或者被核纤层蛋白占据<sup>[51]</sup>, 而核中心区域提供了一个更容易引发转录的环境. 另外, 一些基因的转录状态也与其定位在染色体上的特定区域有关.

针对于前体 B 细胞的 FISH 研究揭示了亚核定位与 IgH 基因调节之间惊人的联系. 早期的研究发现, 在成熟的 B 细胞中一个 IgH 等位基因滞留在核外周, 而另一个等位基因位于细胞核更靠近中心的地方<sup>[53]</sup>, 这与 IgH 基因座单等位表达的现象一致. 在活化的 B 细胞中, 指导沉默的 IgH 基因座停留在核外周的序列位于 VH 片段丛靠近 5' 的区域<sup>[54]</sup>. 同时, 亚核定位也与 IgH 基因座活化的组织特异性有关, 在非 B 细胞中, 两个 IgH 等位基因都位于核外周, 而在发生 IgH 重组的 pro-B 细胞中它们迁移至更靠近中心的位置<sup>[51]</sup>.

除了亚核定位以外, 两个相隔很远的 RSS 发生联会 (synapsis) 需要形成巨大的拓扑弯曲和约束, 对 pro-B 细胞的 FISH 分析发现 IgH 基因座的这种长距离压塑是通过一个成环 (looping) 机制来完成的<sup>[55]</sup>. 这种长距离的成环压塑将 VH 区带到靠近靶 JH 片段丛的地方, 有助于 RSS 联会和 VH → DHJH 重组. 一个有功能的等位基因重组完毕之后, pre-BCR 的信号会引发 pre-B 细胞中 IgH 基因座去压塑 (decontraction), 并将无功能的另一个 IgH 等位基因重新定位到着色粒周边的异染色质<sup>[56]</sup>. 这一发现为解释等位排斥提供了新的模型.

## 5 RAG-1/2 与 V(D)J 重组调控

虽然 V(D)J 重组的调控机制大部分应该归因于染色质可及性的变化, 但是 RAG 复合体及其底物 RSS 也能够影响重组效率.

RSS 的准确序列帮助 TCR $\beta$  基因座在重组时限制基因片的类型及重组顺序. 虽然 12/23 规则允许 V $\beta$  和 J $\beta$  之间直接的接合, 但是 V $\beta$  和 J $\beta$  直接重组的产物在体内从来没有被观察到<sup>[57]</sup>. 尽管这种 12/23 规则之上的机制还未被阐明, 有证据表明, 是 J $\beta$ -RSS 的内在特征限制了其与 V $\beta$ -RSS 的重组效率, 而使得 J $\beta$ -RSS 更倾向于与 D $\beta$ -RSS 发生重组接合<sup>[57,58]</sup>.

基因敲除小鼠及细胞模型研究发现, 缺乏 C 端的 RAG-2 截短体(核心区)仍然具有 DNA 剪切酶活性, 能够催化 D→J 重组但不能介导 V→DJ 重组<sup>[59]</sup>. RAG-2 的 C 端能够结合所有的 4 个核心组蛋白<sup>[60]</sup>, 而特异性的突变 C 端不仅破坏了 RAG-2 与组蛋白的结合, 也能够影响 pro-B 细胞中 VH→DHJH 的重组. 这一现象暗示了 RAG-2 蛋白的 C 端很可能充当连接染色质与重组酶的桥梁, 协助长距离 RSS 之间的联会.

RAG-2 的 C 端非核心区(氨基酸残基 387~527)对于 DNA 剪切不是必需的, 但是去除这一区域却严重影响了正常的功能性 V(D)J 重组, 这其中的机制并不清楚. RAG-2 的非核心区包括了多个功能性结构域. Thr490 是 cyclin A-Cdk2 磷酸化位点, 残基 499~508 区域的多个氨基酸, 能够介导 Skp1-Cul1-Skp2(Skp2-SCF)依赖的多聚泛素化以及 G1 期向 S 期转变时 RAG-2 的降解<sup>[61,62]</sup>. 此结构域的功能在于将 V(D)J 重组与细胞周期联系起来且具有重要意义, 因为 RAG-2 的周期性降解能够避免在 DNA 复制期发生异常的 DNA 剪切和接合.

RAG-2 非核心区氨基酸残基 419~481 被鉴定为一个非经典的 PHD 指结构域(noncanonical plant homeodomain finger)<sup>[63,64]</sup>. 许多参与基因表达的表现遗传调控蛋白质都有经典的 PHD 指结构域<sup>[65]</sup>, 而且这一结构域被报道能够特异性结合 H3K4me2 和 H3K4me3.

另一方面, SET1 或 SET9 对于 H3-K4 的甲基化修饰被普遍认为是表达基因转录活化的表现遗传标志, 而且与增强染色质可及性相关<sup>[66]</sup>. 但是 H3-K4 甲基化影响 V(D)J 重组的机制直到最近才被阐明. 2007 年 10 月发表在 Immunity 上的文章证实了 RAG-2 能够通过此非经典 PHD 指结构域结合组蛋白 H3, 而这种结合完全依赖于 H3 在 lysine 4 上的双或三甲基化修饰, 即 H3K4me2 或 H3K4me3<sup>[67]</sup>. IgH DH-JH-CH 基因座上 RAG-2 的 PHD 指结构域的结合与三甲基化 H3K4 的分布高度相关. 而突变 PHD 指结构域上保守的色氨酸 451 会使得 RAG-2 失去与 H3K4me3 的结合能力, 并严重影响内源的 Ig 基因片的重排. 这一发现的重要意义在于阐明了 RAG-2 与组蛋白结合的调控机制, 证实了组蛋白特殊位点上的甲基化修饰对于 RAG-1/2 介导的 V(D)J 重组是必需的. 染色质的这种修饰可以通过改变重组酶的可及性, 即 RAG 复合体与组蛋白之间的锚定结合能力, 来改

变局部重组酶浓度, 进而实现对于 V(D)J 重组的调控.

## 6 结 语

淋巴细胞是哺乳动物唯一能发生体细胞基因组变化的一类细胞, 在分化发育的过程中通过 V(D)J 重组从胚系基因组整合出具有功能的抗原受体基因. V(D)J 重组极强的随机性克服了对于基因组复杂程度的限制, 实现了免疫细胞抗原识别惊人的多样性. 正因为 V(D)J 重组是淋巴细胞发育的关键步骤, 是整个免疫系统的基础, 这一过程的调控机制一直是免疫学研究的重要问题.

传统的观点认为, 胚系基因片段的转录与重组联系密切, 共用调控元件, 而染色质可及性决定了重组效率. 然而直到将表观遗传学研究引入这一领域, 可及性调控的详细机制才得到了深入研究. 染色质构象的改变依赖于重塑复合物, 而染色质的表观遗传修饰对于招募能够改变染色质可及性的重塑复合物至关重要. 重组酶 RAG-1/2 的底物可及性与功能发挥不仅间接依赖于局部染色质构象变化, 同时也直接需要如 H3-K4 甲基化等组蛋白修饰. 毫无疑问, 除了抗原受体基因座上固有的 ACEs, 染色质的修饰在重组调节中也起着很重要的作用. 总之, 只有综合遗传学和表观遗传学的深入研究才可能真正揭示 V(D)J 重组精细的调控机制.

## 参 考 文 献

- Cobb R M, Oestreich K J, Osipovich O A, *et al.* Accessibility control of V(D)J recombination. *Adv Immunol*, 2006, **91**: 45~109
- Gellert M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem*, 2002, **71**: 101~132
- Fugmann S D, Villey I J, Ptaszek L M, *et al.* Identification of two catalytic residues in RAG1 that define a single active site within the RAG1/RAG2 protein complex. *Mol Cell*, 2000, **5**(1): 97~107
- Akamatsu Y, Oettinger M A. Distinct roles of RAG1 and RAG2 in binding the V(D)J recombination signal sequences. *Mol Cell Biol*, 1998, **18**(8): 4670~4678
- Difilippantonio M J, McMahan C J, Eastman Q M, *et al.* RAG1 mediates signal sequence recognition and recruitment of RAG2 in V(D)J recombination. *Cell*, 1996, **87**(2): 253~262
- Qiu J X, Kale S B, Yarnell Schultz H, *et al.* Separation-of-function mutants reveal critical roles for RAG2 in both the cleavage and joining steps of V(D)J recombination. *Mol Cell*, 2001, **7**(1): 77~87
- Borghesi L, Hsu L Y, Miller J P, *et al.* B lineage-specific regulation of V(D)J recombinase activity is established in common lymphoid progenitors. *J Exp Med*, 2004, **199**(4): 491~502
- Van Ness B G, Weigert M, Coleclough C, *et al.* Transcription of the unrearranged mouse C kappa locus: sequence of the initiation region and comparison of activity with a rearranged V kappa-C kappa gene. *Cell*, 1981, **7**(3 Pt 2): 593~602.
- Yancopoulos G D, Alt F W. Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged VH gene segments. *Cell*, 1985, **40**(2):271~281
- Senoo M, Shinkai Y. Regulation of Vbeta germline transcription in RAG-deficient mice by the CD3 epsilon-mediated signals: implication of Vbeta transcriptional regulation in TCR beta allelic exclusion. *Int Immunol*, 1998, **10**(5): 553~560
- Oltz E M. Regulation of antigen receptor gene assembly in lymphocytes. *Immunol Res*, 2001, **23**(2~3): 121~133
- Laurizurica P, Krangel M S. Enhancer-dependent and -independent steps in the rearrangement of a human T cell receptor delta transgene. *J Exp Med*, 1994, **179**(1): 43~55
- Oltz E M, Alt F W, Lin W C, *et al.* A V(D)J recombinase-inducible B-cell line: role of transcriptional enhancer elements in directing V(D)J recombination. *Mol Cell Biol*, 1993, **13**(10): 6223~6230
- Perlot T, Alt F W, Bassing C H, *et al.* Elucidation of IgH intronic enhancer functions *via* germ-line deletion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(40): 14362~14367
- Mathieu N, Hempel W M, Spicuglia S, *et al.* Chromatin remodeling by the T cell receptor (TCR)-beta gene enhancer during early T cell development: Implications for the control of TCR-beta locus recombination. *J Exp Med*, 2000, **192**(5): 625~636
- Hesslein D G, Schatz D G. Factors and forces controlling V(D)J recombination. *Adv Immunol*, 2001, **78**: 169~232
- Dudley D D, Chaudhuri J, Bassing C H, *et al.* Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv Immunol*, 2005, **86**: 43~112
- Afshar R, Pierce S, Bolland D J, *et al.* Regulation of IgH gene assembly: role of the intronic enhancer and 5' DQ52 region in targeting DHJH recombination. *J Immunol*, 2006, **176**(4): 2439~2447
- Spicuglia S, Kumar S, Yeh J H, *et al.* Promoter activation by enhancer-dependent and -independent loading of activator and coactivator complexes. *Mol Cell*, 2002, **10**(6): 1479~1487
- Doty R T, Xia D, Nguyen S P, *et al.* Promoter element for transcription of unrearranged T-cell receptor beta-chain gene in pro-T cells. *Blood*, 1999, **93**(9): 3017~3025
- Whitehurst C E, Schlissel M S, Chen J. Deletion of germline promoter PD beta 1 from the TCR beta locus causes hypermethylation that impairs D beta 1 recombination by multiple mechanisms. *Immunity*, 2000, **13**(5): 703~714
- Oestreich K J, Cobb R M, Pierce S, *et al.* Regulation of TCRbeta gene assembly by a promoter/enhancer holocomplex. *Immunity*, 2006, **24**(4): 381~391
- Hawwari A, Bock C, Krangel M S. Regulation of T cell receptor alpha gene assembly by a complex hierarchy of germline Jalpha promoters. *Nat Immunol*, 2005, **6**(5): 481~489
- Liu Z, Garrard W T. Long-range interactions between three transcriptional enhancers, active V kappa gene promoters, and a 3'



- boundary sequence spanning 46 kilobases. *Mol Cell Biol*, 2005, **25** (8): 3220~3231
- 25 Fuks F, Hurd P J, Wolf D, *et al.* The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem*, 2003, **278**(6): 4035~4040
- 26 Demengeot J, Oltz E M, Alt F W. Promotion of V (D)J recombinational accessibility by the intronic E kappa element: role of the kappa B motif. *Int Immunol*, 1995, **7**(12): 1995~2003
- 27 Nakase H, Takahama Y, Akamatsu Y. Effect of CpG methylation on RAG1/RAG2 reactivity: implications of direct and indirect mechanisms for controlling V(D)J cleavage. *EMBO Rep*, 2003, **4** (8): 774~780
- 28 Morshead K B, Ciccone D N, Taverna S D, *et al.* Antigen receptor loci poised for V(D)J rearrangement are broadly associated with BRG1 and flanked by peaks of histone H3 dimethylated at lysine 4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(20): 11577~11582
- 29 Emerson B M. Specificity of gene regulation. *Cell*, 2002, **109**(3): 267~270
- 30 Nakayama J, Rice J C, Strahl B D, *et al.* Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*, 2001, **292**(5514): 110~113
- 31 Peterson C L, Workman J L. Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr Opin Genet Dev*, 2000, **10**(2): 187~192
- 32 Litt M D, Simpson M, Gaszner M, *et al.* Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science*, 2001, **293**(5539): 2453~2455
- 33 Chowdhury D, Sen R. Transient IL-7/IL-7R signaling provides a mechanism for feedback inhibition of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements. *Immunity*, 2003, **18**(2): 229~241
- 34 Espinoza C R, Feeney A J. The extent of histone acetylation correlates with the differential rearrangement frequency of individual VH genes in pro-B cells. *J Immunol*, 2005, **175** (10): 6668~6675
- 35 Kwon J, Morshead K B, Guyon J R, *et al.* Histone acetylation and hSWI/SNF remodeling act in concert to stimulate V(D)J cleavage of nucleosomal DNA. *Mol Cell*, 2000, **6**(5): 1037~1048
- 36 Hesslein D G, Pflugh D L, Chowdhury D, *et al.* Pax5 is required for recombination of transcribed, acetylated, 5' IgH V gene segments. *Genes Dev*, 2003, **17**(1): 37~42
- 37 Tripathi R, Jackson A, Krangel M S. A change in the structure of Vbeta chromatin associated with TCR beta allelic exclusion. *J Immunol*, 2002, **168**(5): 2316~2324
- 38 Agalioti T, Chen G, Thanos D. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell*, 2002, **111** (3): 381~392
- 39 Lachner M, O'Carroll D, Rea S, *et al.* Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, 2001, **410** (6824): 116~120
- 40 Peters A H, Kubicek S, Mechtler K, *et al.* Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell*, 2003, **12**(6): 1577~1589
- 41 Bannister A J, Zegerman P, Partridge J F, *et al.* Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, 2001, **410**(6824): 120~124
- 42 Johnson K, Pflugh D L, Yu D, *et al.* B cell-specific loss of histone 3 lysine 9 methylation in the V (H) locus depends on Pax5. *Nat Immunol*, 2004, **5**(8): 853~861
- 43 Fuxa M, Skok J, Souabni A, *et al.* Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes Dev*, 2004, **18**(4): 411~422
- 44 Osipovich O, Milley R, Meade A, *et al.* Targeted inhibition of V(D)J recombination by a histone methyltransferase. *Nat Immunol*, 2004, **5**(3): 309~316
- 45 Cao R, Wang L, Wang H, *et al.* Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*, 2002, **298** (5595): 1039~1043
- 46 Su I H, Basavaraj A, Krutchinsky A N, *et al.* Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat Immunol*, 2003, **4**(2): 124~131
- 47 Kwon J, Imbalzano A N, Matthews A, *et al.* Accessibility of nucleosomal DNA to V (D)J cleavage is modulated by RSS positioning and HMG1. *Mol Cell*, 1998, **2**(6): 829~839
- 48 Baumann M, Mamais A, McBlane F, *et al.* Regulation of V(D)J recombination by nucleosome positioning at recombination signal sequences. *Embo J*, 2003, **22**(19): 5197~5207
- 49 Hassan A H, Neely K E, Vignali M, *et al.* Promoter targeting of chromatin-modifying complexes. *Front Biosci*, 2001, **6**: D1054~D1064
- 50 Smale S T, Fisher A G. Chromatin structure and gene regulation in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 2002, **20**: 427~462
- 51 Kosak S T, Skok J A, Medina K L, *et al.* Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science*, 2002, **296**(5565): 158~162
- 52 Goldmit M, Ji Y, Skok J, *et al.* Epigenetic ontogeny of the Igk locus during B cell development. *Nat Immunol*, 2005, **6**(2): 198~203
- 53 Brown K E, Guest S S, Smale S T, *et al.* Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell*, 1997, **91**(6): 845~854
- 54 Yang Q, Riblet R, Schildkraut C L. Sites that direct nuclear compartmentalization are near the 5' end of the mouse immunoglobulin heavy-chain locus. *Mol Cell Biol*, 2005, **25**(14): 6021~6030
- 55 Sayegh C, Jhunjhunwala S, Riblet R, *et al.* Visualization of looping involving the immunoglobulin heavy-chain locus in developing B cells. *Genes Dev*, 2005, **19**(3): 322~327
- 56 Roldan E, Fuxa M, Chong W, *et al.* Locus 'decontraction' and centromeric recruitment contribute to allelic exclusion of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Nat Immunol*, 2005, **6**(1): 31~41
- 57 Bassing C H, Alt F W, Hughes M M, *et al.* Recombination signal sequences restrict chromosomal V(D)J recombination beyond the 12/23 rule. *Nature*, 2000, **405**(6786): 583~586
- 58 Sleckman B P, Bassing C H, Hughes M M, *et al.* Mechanisms that

- direct ordered assembly of T cell receptor beta locus V, D, and J gene segments. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, **97**(14): 7975~7980
- 59 Akamatsu Y, Monroe R, Dudley D D, *et al.* Deletion of the RAG2 C terminus leads to impaired lymphoid development in mice. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, **100**(3): 1209~1214
- 60 West K L, Singha N C, De Ioannes P, *et al.* A direct interaction between the RAG2 C terminus and the core histones is required for efficient V(D)J recombination. Immunity, 2005, **23**(2): 203~212
- 61 Jiang H, Chang F C, Ross A E, *et al.* Ubiquitylation of RAG-2 by Skp2-SCF links destruction of the V(D)J recombinase to the cell cycle. Mol Cell, 2005, **18**(6): 699~709
- 62 Lee J, Desiderio S. Cyclin A/CDK2 regulates V(D)J recombination by coordinating RAG-2 accumulation and DNA repair. Immunity, 1999, **11**(6): 771~781
- 63 Callebaut I, Mornon J P. The V(D)J recombination activating protein RAG2 consists of a six-bladed propeller and a PHD fingerlike domain, as revealed by sequence analysis. Cell Mol Life Sci, 1998, **54**(8): 880~891
- 64 Elkin S K, Ivanov D, Ewalt M, *et al.* A PHD finger motif in the C terminus of RAG2 modulates recombination activity. J Biol Chem, 2005, **280**(31): 28701~28710
- 65 Bienz M. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. Trends Biochem Sci, 2006, **31**(1): 35~40
- 66 Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister A J, *et al.* Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. Nature, 2002, **419**(6905): 407~411
- 67 Liu Y, Subrahmanyam R, Chakraborty T, *et al.* A plant homeodomain in RAG-2 that binds Hypermethylated lysine 4 of histone H3 is necessary for efficient antigen-receptor-gene rearrangement. Immunity, 2007, **27**(4): 561~571

## Progress in Epigenetic Regulation of V(D)J Recombination

ZHENG Chao-Gu, YAN Xi-Yun\*

(Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** During lymphocyte development antigen receptor genes undergo V(D)J recombination to obtain antigen binding specificity and diversity. This process is not only controlled by genetic factors, such as tissue- and stage- specificity of RAG-1/2 protein, germline transcriptional activity and ACEs, but also regulated at epigenetic level. The chromatin accessibility of recombinase is associated with the chromatin configuration around the targeted gene segments. Thus, activation of V(D)J recombination requires the recruitment of remodeling complexes for changing the accessibility in the localized chromatin. Moreover, docking of remodeling complexes, which serve for creating active chromatin environment, relies on certain patterns of chromatin modification. Some recent findings regarding epigenetic regulation mechanisms in V(D)J recombination, such as CpG methylation, histone modification, nucleosome remodeling and nuclear topology were reviewed.

**Key words** V(D)J recombination, epigenetics, RAG accessibility, ACEs, histone modification, chromatin remodeling

\*Corresponding author.

Tel: 86-10-64888583, E-mail: yanxy@ibp.ac.cn

Received: December 29, 2007 Accepted: January 10, 2008