

Received: 2012.01.18  
Accepted: 2012.04.03  
Published: 2012.05.24

## Oksydacyjnie modyfikowane i deaminowane zasady DNA jako czynnik epigenetyczny

### Oxidation and deamination of nucleobases as an epigenetic tool

Jolanta Guz, Marek Jurgowiak, Ryszard Oliński

Katedra Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

#### Streszczenie

Omawiane w pracy wyniki badań wskazują, że 5-metylocytozyna (5mC) może ulegać hydroksylacji do 5-hydroksymetylocytozyny (5hmC), a jej zawartość w genomie ssaków ocenia się na około 0,02–0,7% całkowitej zawartości cytozyny. Tak zmodyfikowana zasada jest związkiem pośrednim w procesie aktywnej demetylacji DNA i obecnie nazywa się ją „szóstą zasadą DNA”.

Chociaż aktywna demetylacja DNA pozostaje nadal zjawiskiem słabo poznanym, to uważa się, że uczestniczą w tym procesie trzy grupy enzymów:

- białka Tet katalizujące przemianę 5mC do 5hmC, która następnie może być utleniana do 5-formylocytozyny (5fC) i 5-karboksylocytozyny (5caC);
- AID/APOBEC deaminujące 5mC (lub 5hmC) do tyminy lub 5-hydroksymetylouracylu (5hmU) błędnie parującego z guaniną;
- glikozylaza TDG uczestnicząca w ścieżce naprawy DNA typu BER, która usuwa 5fC, 5caC i 5hmU zastępowane następnie cytozyną, czego efektem jest demetylowany DNA.

Działanie glikozylazy TDG (i/lub innych glikozylaz DNA) prawdopodobnie poprzedzone jest deaminacją 5mC do tyminy, ponieważ substratem dla TDG są błędne pary G: T. Etap deaminacji zachodzi z udziałem białek rodziny AID/APOBEC. Możliwe jest współdziałanie TDG z wymienionymi deaminazami.

Wydaje się, że obecność 8-oksyguaniny (8-oksyoGua) w DNA ma nie tylko znaczenie mutagenne. Postulowana jest rola tej oksydacyjnie zmodyfikowanej zasady w regulacji ekspresji genów, poprzez udział w procesie relaksacji chromatyny. Możliwe jest, że 8-oksyoGua występująca w specyficznych sekwencjach DNA może uczestniczyć w regulacji transkrypcji, co sugerowałoby epigenetyczne znaczenie obecności tak zmodyfikowanej zasady w DNA.

#### Słowa kluczowe:

czynniki epigenetyczne • metylacja DNA • aktywna demetylacja DNA • oksydacyjne modyfikacje DNA • 5-hydroksymetylocytozyna • 8-oksyguanina

#### Summary

Recent discoveries have demonstrated that 5-methylcytosine (5mC) may be hydroxymethylated to 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) in mammals and that genomic DNA may contain about 0.02–0.7% of 5hmC. The aforementioned modification is the key intermediate of active DNA demethylation and has been named “the sixth base in DNA”.

Although active DNA demethylation in mammals is still controversial, the most plausible mechanism/s of active 5mC demethylation include involvement of three families of enzymes; i) Tet,

which is involved in hydroxylation of 5mC to form 5hmC, which can be further oxidized to 5-formylcytosine (5fC) and 5-carboxylcytosine (5caC); ii) deamination of 5mC (or 5hmC) by AID/APOBEC to form thymine or 5-hydroxymethyluracil (5hmU) mispaired with guanine; iii) the BER pathway induced by involvement of TDG glycosylase to replace the above described base modification (5fC, 5caC, 5hmU) with cytosine to demethylate DNA.

A plausible scenario for engagement of TDG glycosylase (or some other G-T glycosylase) is through prior deamination of 5-mC to thymine, which generates a G:T substrate for the enzyme. Here cytidine deaminase of the AID/APOBEC family was implicated in the deamination step. It is possible that TDG may act in concert with these deaminases.

It seems that mutations are not the only effect of oxidatively modified DNA bases. These, as yet, understudied aspects of the damage suggest a potential for 8-oxoguanine (8-oxoGua) to affect gene expression via chromatin relaxation. It is possible that 8-oxoGua presence in specific DNA sequences may be widely used for transcription regulation, which suggests the epigenetic nature of 8-oxoGua presence in DNA.

**Key words:** epigenetic modifications • DNA methylation • active DNA demethylation • oxidative DNA modifications • 5-hydroxymethylcytosine • 8-oxoguanine

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=997954>

**Word count:** 4965

**Tables:** –

**Figures:** 2

**References:** 61

**Adres autora:** prof. dr hab. Ryszard Oliński, Katedra Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz; e-mail: ryszardo@cm.umk.pl

**Wykaz skrótów:** **5caC** – 5-karboksylocytozyna; **5fC** – 5-formylocytozyna; **5hmC** – 5-hydroksymetylocytozyna; **5hmU** – 5-hydroksymetylouracyl; **5mC** – 5-metylocytozyna; **8-oksydG** – 8-oksy-2'-deoksyguanozyna; **8-oksyoGua** – 8-oksyoGuanina; **AID** – deaminaza cytydyny indukowana aktywacją limfocytów; **BER** – naprawa DNA przez wycinanie zasad; **DNMT** – metylotransferaza DNA; **ESC** – embrionalne komórki macierzyste; **NER** – naprawa DNA przez wycinanie nukleotydów; **NLS** – sygnał lokalizacji jądrowej; **PCNA** – jądrowy antygen komórek proliferujących; **SMUG1, TDG, UNG** – glikozylazy DNA.

## WPROWADZENIE

Postępy w poznaniu sekwencji genomowej różnych organizmów, w tym genomu człowieka, nie doprowadziły dotychczas do pełnego zrozumienia zjawisk związanych z realizacją informacji genetycznej. Ta z kolei wydaje się bezpośrednio zależna od przejścia chromatyny upakowanej w luźniejsze domeny, dostępne dla białek enzymatycznych, a więc przemiany heterochromatyny w euchromatynę. Powiązane jest to zarówno z potranslacyjną modyfikacją histonów, jak i metylacją bądź demetylacją DNA. Modyfikacje takie określane są jako zmiany epigenetyczne, regulujące organizację chromatyny i ekspresję genów, nie wpływając bezpośrednio na sekwencję nukleotydów w DNA. Interesującym przykładem wpływu metylacji DNA na funkcje komórek i dalsze tego konsekwencje dla losów organizmu jest pszczoła miodna (*Apis mellifera*). W przypadku tego owada wzór metylacji DNA komórkowego decyduje o tym czy dany osobnik przeobrazi się w robotnicę, czy też pisany mu jest los królowej [50].

Najlepiej scharakteryzowanym markerem epigenetycznym jest grupa metylowa w pozycji 5 cytozyny. Około 3–4%

genomowej cytozyny ulega metylacji, a powstająca 5-metylocytozyna (5mC) stanowi 0,75–1% ogółu zasad DNA typowej komórki ssaków [12]. Pomimo powszechnego przekonania, że wzór metylacji DNA ustalany jest we wczesnych fazach rozwoju zarodkowego i utrzymywany podczas życia osobniczego przez metylotransferazy DNA (DNMT), wyniki badań pochodzące z ostatnich dwóch lat sugerują, że w komórkach ssaków możliwa jest także aktywna demetylacja. W artykule omówiono wyniki prac, które wskazują na możliwość dynamicznej regulacji metylowania DNA, co z kolei sugeruje możliwość reprogramowania, jak się wydawało do niedawna nieodwracalnych, procesów określających charakter zróżnicowanej komórki. Zwrócono także uwagę na wyniki badań, które sugerują nową, epigenetyczną funkcję innej obecnej w DNA cząsteczki, jaką jest oksydacyjnie zmodyfikowana guanina, w postaci 8-oksyoGuaniny (8-oksyoGua).

## 5-HYDROKSYMETYLOCYTOZINA – „SZÓSTA ZASADA DNA”

Hydroksylowana pochodna 5mC, czyli 5-hydroksymetylocytozyna (5hmC), została po raz pierwszy opisana

w DNA ssaków, we wczesnych latach 70 ubiegłego wieku. Stwierdzono wówczas bardzo wysoki poziom tej zmodyfikowanej zasady, sięgający aż 15% zawartości genomowej cytozyny (C), w mózgach szczura, myszy i żaby [44]. Ponieważ późniejsze prace nie potwierdziły tej rewelacji, przez następne 30 lat analiza 5hmC, nie cieszyła się specjalnym zainteresowaniem badaczy [29]. W 2009 r. opublikowano wyniki dwóch prac, które jak się okazało przywróciły zainteresowanie tą modyfikacją DNA [30,53].

Z powodu znaczącej roli jaką odgrywa 5hmC w procesach fizjologicznych i stwierdzonego wysokiego poziomu tej zmodyfikowanej zasady w DNA, obecnie nazywa się ją często „szóstą zasadą DNA” [11].

5-Hydroksymetylocytozyna jest oksydacyjną modyfikacją 5mC, co sugeruje, że jej komórkowy poziom może zależeć od nasilenia stanu stresu oksydacyjnego. Nie uzyskano jednak dowodów eksperymentalnych, wskazujących wyraźnie na taką zależność [53].

### **MECHANIZMY ODPOWIEDZIALNE ZA AKTYWNA DEMETYLACJĘ DNA**

#### **Udział białek Tet w przekształceniu 5mC do 5hmC**

5-Metylocytozyna jest, jak wynika z wielu badań, ważnym elementem w regulacji ekspresji genów. Metylacja DNA odgrywa bowiem rolę w transkrypcyjnym wyciszaniu genów i służy w komórce m.in. do wyciszania licznych sekwencji powtórzonych, piętnowania rodzicielskiego, jak również wyłączenia drugiego chromosomu X w komórkach osobników żeńskich [24,40]. Ponadto wzór metylacji DNA to także konsekwencja demetylacji tej biomolekuły. Demetylacja DNA może być procesem pasywnym, zależnym od replikacji, kiedy DNMT nie metyluje nowo zsyntetyzowanego łańcucha DNA. W rezultacie druga runda replikacyjna, której nie towarzyszy metylacja zachowawcza, daje całkowicie niemetylowany DNA. Demetylacja DNA może przebiegać również na drodze enzymatycznej niezależnie od przebiegu cyklu podziałowego komórki [6,56].

Dotychczas zaproponowano kilka możliwych mechanizmów aktywnej demetylacji DNA u kręgowców. Należą do nich:

- bezpośrednie usuwanie grupy metylowej z 5mC, z udziałem białka MBD2b,
- wycięcie 5mC przez glikozylazę (TDG lub MBD4) i zastąpienie cytozyną w wyniku naprawy typu BER,
- przekształcenie 5mC w tyminę poprzez jej deaminację z udziałem białek AID/APOBEC, a następnie przywrócenie pary G: C w wyniku naprawy BER, w której uczestniczą glikozylazy TDG [6,48,56].

Niedawno opublikowane wyniki badań wskazują, że w aktywnej demetylacji promotorów genów ulegających ekspresji może również uczestniczyć system naprawy NER [49]. Brak jest jednak potwierdzenia tych obserwacji w późniejszych badaniach. Warto również nadmienić, że w wyniku naprawy NER usuwane są masywne addukty w DNA (bulky DNA adducts).

Według najnowszych badań istotną rolę w procesie demetylacji DNA mogą odgrywać białka Tet (Ten-eleven-translocation) katalizujące konwersję 5mC do 5hmC [26,53] (ryc. 1).

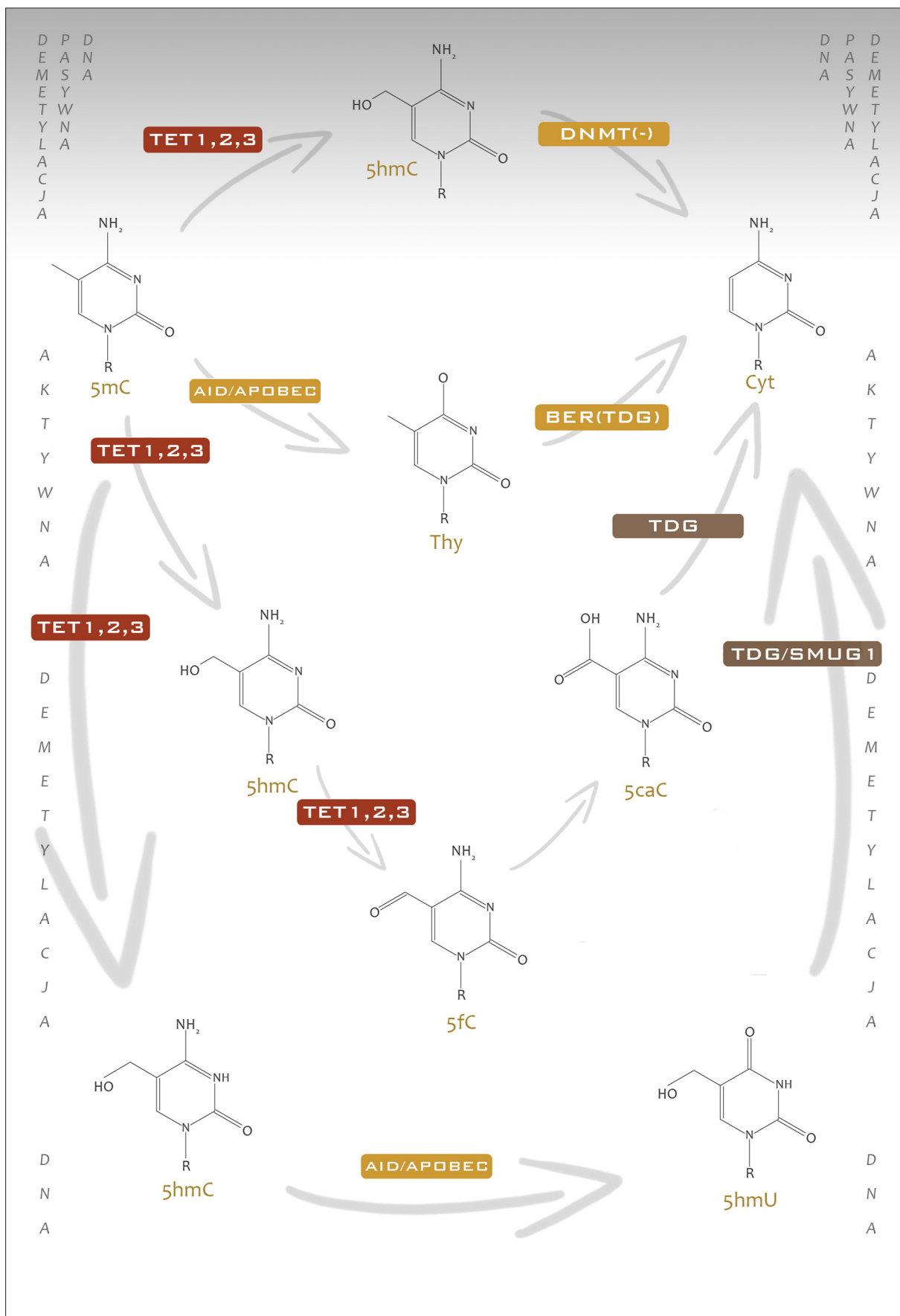
Gen *Tet1* wykryto w DNA chorych na ostrą białaczkę szpikową (acute myeloid leukemia - AML) z translokacją t(10;11)(q22;q23) [11]. W wyniku tej translokacji dochodzi do fuzji N-końcowej części białka MLL (myelo/lymphoid leukemia, mixed-lineage leukaemia), zawierającej domenę CXXC z C-końcową częścią białka Tet1, która zawiera domenę katalityczną [31].

W 2009 r. zidentyfikowano u człowieka trzy białka, określone odpowiednio jako Tet1, Tet2 i Tet3 będące homologami białek JBP1 i JBP2, występujących u *Trypanosoma* i biorących udział w utlenianiu grupy metylowej tyminy. Wykazano przy tym, że enzym Tet1 człowieka nie modyfikuje tyminy, ale może katalizować reakcję utlenienia 5mC do 5hmC w warunkach *in vitro* i w hodowlach komórkowych [53]. W kolejnych eksperymentach potwierdzono podobną aktywność enzymatyczną pozostałych białek Tet, zarówno w przypadku komórek człowieka, jak i myszy. Zaobserwowano również, że nadekspresja białek Tet skutkuje obniżeniem poziomu stężenia 5mC i wzrostem 5hmC [26,53]. Ponadto odnotowano obniżenie poziomu 5hmC w mysich komórkach embrjonalnych z obniżoną zawartością Tet1 [53]. Wszystkie enzymy należące do rodziny białek Tet są dioksygenazami zależnymi od jonów Fe(II) i  $\alpha$ -ketoglutaranu, który podczas reakcji ulega dekarboksylacji do bursztynianu [36].

#### **Udział białek Tet w demetylacji DNA oraz regulacji transkrypcji**

Obecnie rozważanych jest kilka możliwych sposobów uczestnictwa białek Tet w demetylacji DNA i późniejszej regulacji ekspresji genów. Pierwszy model zakłada, że 5hmC pojawiająca się jako produkt reakcji katalizowanej przez białka Tet, nie jest rozpoznawana przez metylotransferazę DNA. To z kolei może skutkować brakiem metylacji nowo zsyntetyzowanego łańcucha DNA podczas replikacji, prowadząc do demetylacji pasywnej (ryc. 1). Uważa się też, że 5hmC jest intermedialnym, który odgrywa istotną rolę w aktywnej demetylacji, z zaangażowaniem mechanizmu naprawy typu BER (szczegóły w dalszej części artykułu) [4,11]. Pojawienie się 5hmC zamiast 5mC w sekwencjach promotorowych może skutkować również obniżeniem powinowactwa białek wiążących metylowane CpG (MBD) do tych sekwencji, co w konsekwencji może prowadzić do aktywacji transkrypcji [11].

W komórkach embrjonalnych myszy wykazano podwójną rolę białka Tet1 w procesie regulacji transkrypcji i to zarówno aktywacyjną, jak i represyjną. W przypadku genów aktywnych transkrypcyjnie, Tet1 uczestniczy w hipometylacji obszarów promotorowych, co z kolei skutkuje wzrostem poziomu ekspresji tych genów. Wykazano, że Tet1 wiąże się preferencyjnie z regionami charakteryzującymi się dużą zawartością dinukleotydów CpG. Zaobserwowano również, że wyspy CpG niezwiązane z białkiem Tet1 cechuje wyższa zawartość 5mC w porównaniu z wyspami CpG promotorów genów, do których przyłącza się Tet1. Przyłączanie Tet1 do promotorów genów jest więc odwrotnie skorelowane ze stopniem ich zmetylowania. W mysich komórkach macierzystych o obniżonej ekspresji genu *Tet1* odnotowano znacząco wyższy poziom 5mC w promotorach genów bogatych w dinukleotydy CpG, zwłaszcza w miejscach wiązania białek Tet1, w porównaniu do



Ryc. 1. Mechanizmy demetylacji DNA ssaków (na podstawie [4], zmodyfikowane)

komórek kontrolnych. Obserwacje te mogą sugerować, że białka Tet1 są niezbędne do utrzymania stanu hipometylacji promotorów genów aktywnych transkrypcyjnie [55]. Białko Tet1 uczestniczy również w hamowaniu transkrypcji przez bezpośrednie wiązanie korepresora Sin3a, tworzącego kompleks z deacetylazami histonów (HDAC) [54]. Na rolę Tet1 w represji transkrypcji wskazują obserwacje wspólnego wiązania się Tet1 i kompleksu białek Polycomb 2 (polycomb represor complex – PRC2) do tych samych genów. Kompleks PRC2 jest odpowiedzialny za metylację lizyny w pozycji 27 histonu H3 (H3K27me3), rozpoznawaną następnie przez swoiste białka efektorowe, co w efekcie prowadzi do hamowania procesu transkrypcji [4,8].

Sugeruje się, że białka Tet1 i Tet2 odgrywają rolę w utrzymaniu pluripotencji komórek macierzystych, natomiast obecność Tet3 związana jest z procesem różnicowania komórkowego [36]. Niedobór Tet1 w embrionalnych komórkach macierzystych myszy (embryonic stem cells – ESC) skutkuje nasileniem metylacji w obrębie promotora NANOG i zahamowaniem ekspresji, a to z kolei może prowadzić do utraty pluripotencji komórek [26]. Białko NANOG uznawane jest za główny czynnik utrzymujący w stanie pluripotencji embrionalne komórki macierzyste. Nadekspresja tego białka w komórkach ESC zwiększa ich aktywność proliferacyjną, powodując jednocześnie utrzymanie pluripotencjalnego charakteru komórek [41]. Supresja genu NANOG promuje natomiast różnicowanie komórek macierzystych.

Gen *Tet3* wykazuje wysoką ekspresję w oocytach oraz powstających po zapłodnieniu zygotach. Ostatnie badania wskazują, że tuż po zapłodnieniu komórki jajowej, 5mC jest hydroksylowana do 5hmC tylko w męskim przedjądrzu. Może to sugerować, że obserwowana globalna demetylacja genomu ojcowskiego przed fuzją przedjądrzy jest faktycznie globalną hydroksylacją 5mC z udziałem Tet3 [20,25,36]. Po zmianie wzoru metylacji genomu ojcowskiego poziom Tet3 ulega znacznemu obniżeniu. Aktywność Tet3 wzrasta ponownie kiedy komórki zaczynają różnicowanie. Trwającemu różnicowaniu towarzyszy jednocześnie obniżenie zawartości Tet1 i Tet2 w komórkach [36].

## GENOMOWA ZAWARTOŚĆ 5HM C

O ile poziom 5mC jest dosyć stały w wielu typach tkanek i można go określić na około 4,5% całkowitej zawartości C, o tyle zawartość 5hmC waha się w szerokich granicach, w zależności od typu komórek, czy tkanek [11]. W wątrobie i jądrach poziom 5hmC jest niski, podobnie jak w kulturach tkankowych [52]. W mięśniu sercowym i nerkach poziom 5hmC jest średni, a najwyższy stwierdzono w embrionalnych komórkach macierzystych i ośrodkowym układzie nerwowym [19]. Szczegółowa analiza wykazała, że w siatkówce i mózdzku myszy poziom 5hmC wynosi około 0,3% zawartości cytozyny, natomiast w obszarach mózgu związanych z funkcją poznawczą, korze mózgowej i hipokampie, w granicach 0,7% [35]. Ponieważ ostatnie badania wskazują, że procesy metylacji i demetylacji DNA związane są z kształtowaniem pamięci uważa się, że wzajemne przejście 5mC–5hmC może odgrywać rolę w kształtowaniu pamięci i rozwoju mózgu. Potwierdzają to obserwacje wskazujące, że poziom 5hmC w hipokampie 90-dniowej myszy wzrasta dwukrotnie, w porównaniu do zwierząt w pierwszym dniu życia [35].

Bardzo małą zawartość 5hmC stwierdzono w komórkach nowotworowych [32]. W tkance nowotworowej jelita grubego poziom tej modyfikacji wynosił 0,02–0,06%, podczas gdy w „zdrowej” tkance obrzeża nowotworu, mieścił się w granicach 0,46–0,57%, całkowitej zawartości nukleotydów.

Początkowo dominowało twierdzenie, że formowanie 5hmC jest prostym sposobem na reaktywację genów wyciszonych poprzez metylację cytozyny, ale ostatnie badania wykluczają raczej taką możliwość, ponieważ wysoki poziom 5hmC nie zawsze koreluje ze wzmoczoną aktywnością transkrypcji [14,42,54,55,57].

W genomie embrionalnych komórek macierzystych najwyższą zawartość 5hmC stwierdzono w miejscach startu transkrypcji i wzdłuż sekwencji obszarów kodujących genu, z wyraźną przewagą występowania tej zmodyfikowanej zasady w eksonach, w porównaniu z sekwencjami intronowymi [14,54,55,57]. W mózgu dorosłego człowieka zdecydowanie wyższy poziom 5hmC stwierdzono w regionach promotorowych niż w sekwencjach obszarów kodujących genów. Stwierdzono także różnice w dystrybucji 5hmC w genach myszy między komórkami zróżnicowanymi, takimi jak neurony i embrionalnymi komórkami macierzystymi, co wskazuje, że taka modyfikacja zasad może odgrywać odmienną rolę w regulacji transkrypcji w obu wspomnianych typach komórek [8].

Większość uzyskanych wyników badań dotyczących embrionalnych komórek macierzystych zgodnie wskazuje, że 5hmC jest umiejscowiona zarówno wzdłuż aktywnych, jak i nieaktywnych genów, których promotory zawierają średnią zawartość sekwencji CpG [8].

Wiązanie białka Tet1, zarówno z metylowanymi sekwencjami CpG, jak i zawierającymi 5hmC, potwierdza rolę tego enzymu w konwersji 5mC do 5hmC [59] i być może dalszej konwersji do 5fC i 5caC.

Potwierdzeniem wyników badań dotyczących dystrybucji 5hmC w embrionalnych komórkach macierzystych myszy są rezultaty prac dotyczących preferencyjnego wiązania białka Tet do DNA. Takie wiązanie zlokalizowano w miejscach startu transkrypcji. Interesujące są wyniki badań, które wykazują, że brak Tet1 powoduje wzrost zawartości 5mC w miejscach startu transkrypcji [8].

## CHARAKTERYSTYKA GENÓW I BIAŁEK TET

Poznane u ssaków enzymy Tet1, Tet2 i Tet3 kodowane są przez trzy odrębne geny. Gen *Tet1* zlokalizowany na chromosomie 10q21, zawiera 12 eksonów obejmujących 134 kpz i koduje białko składające się z 2136 aminokwasów. *Tet2* umiejscowiony na chromosomie 4q24 zawiera 11 eksonów i obejmuje obszar 96 kpz. W wyniku alternatywnego splicingu powstają trzy izoformy białka Tet2, zbudowane odpowiednio z 2002, 1164 i 1194 aminokwasów. Gen *Tet3* znajduje się na chromosomie 2p13, ma długość 61,8 kpz i zawiera 9 eksonów. Zidentyfikowano 3 izoformy białka Tet3 składające się odpowiednio z 1660, 1440 i 728 aminokwasów [34]. Wszystkie białka Tet zawierają po trzy miejsca wiązania jonów Fe(II), oraz jedno miejsce wiązania  $\alpha$ -ketoglutaranu. Dodatkowo białko Tet1 zawiera

3 motywy NLS (sygnał lokalizacji jądrowej, nuclear localization signal) oraz domenę CXXC wiążącą cynk, która jest obecna we wszystkich metylotransferazach DNA i białkach MBD wiążących metylowane DNA [34]. W przypadku Tet1 region bogaty w reszty cysteinowe (cysteine-rich domain – CD) oraz motyw DBSH (double-stranded  $\beta$ -helix) tworzą domenę katalityczną enzymu.

## BIĄŁKA TET A NOWOTWORY

Pierwsze przesłanki sugerujące, że białka Tet mogą być zaangażowane w proces kancerogenezy i powstawania niektórych postaci białaczek pojawiły się wraz z identyfikacją Tet1 u pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML), będących nosicielami translokacji t(10;11) (q22;q23). Kolejne badania wykazały jednak, że w licznych przypadkach białaczek mutacje najczęściej występują w genie *Tet2* [11,34]. Somaticzne mutacje *Tet2* obserwowano w ostrych białaczkach szpikowych (AML), przewlekłych rozrostach mieloproliferacyjnych (MPN – chronic myeloproliferative neoplasms), zespołach mielodysplastycznych (MDS), przewlekłych białaczkach mielomonocytowych (CMML – chronic myelomonocytic leukemia). Mutacje punktowe dotyczą głównie domeny katalitycznej białka Tet2, skutkując zakłóceniem przekształcania 5mC do 5hmC. Potwierdzają to badania, w których komórki szpiku kostnego pacjentów z ostrą białaczką szpikową, z mutacją *Tet2*, wykazywały znacząco niższy poziom 5hmC w porównaniu do osób zdrowych [11,28].

## UDZIAŁ BIAŁEK TET W PRZEKSZTAŁCANIU 5HM C DO 5-FORMYLOCYTOZYNY (5fC) I 5-KARBOKSYLOCYTOZYNY (5caC)

Jak już wspomniano 5hmC powstaje z 5mC, jako produkt reakcji katalizowanej przez rodzinę enzymów Tet. Okazało się jednak, że 5hmC nie jest końcowym produktem reakcji enzymatycznej katalizowanej przez Tet. W warunkach *in vitro* oczyszczone białko enzymatyczne przekształca 5hmC do 5fC i dalej do postaci 5caC (ryc. 1). W macierzystych komórkach embrionalnych myszy wykrywa się niewielkie ilości obu pochodnych powstających z przemian 5hmC. Są to wartości 10–100 razy niższe, niż poziom 5hmC [11,23,46]. Wskazuje to, że dynamiczne możliwości przekształcania genomu były dotąd przez badaczy nie w pełni doceniane. Zarówno 5fC jak i 5caC są substratami dla glikozylazy TDG [23].

Przypuszcza się, że 5caC może być bezpośrednio przekształcana w C z udziałem niezidentyfikowanej do tej pory dekarboksylazy [26]. Jednak bardziej prawdopodobna w tych przemianach wydaje się ścieżka metaboliczna, która wymaga udziału mechanizmu naprawy typu BER, a dokładniej glikozylazy TDG, w usuwaniu 5caC/5fC i zastąpieniu tych pochodnych cytozyną [9,10,23]. Usunięcie genu TDG u myszy (nokaut genetyczny) jest w skutkach letalne już w fazie rozwoju embrionalnego i związane z zakłóceniami wzoru metylacji DNA [10]. Niezbędność białka TDG w przebiegu rozwoju embrionalnego pozwoliła na wysunięcie wniosku, że demetylacja jest związana z wcześniejszą deaminacją 5mC i przekształceniem w tyminę z udziałem AID (ryc. 1), ponieważ kanonicznym substratem dla TDG są błędne pary G: T. Letalność embrionalna myszy z brakiem białka TDG prawdopodobnie wynika nie tylko z faktu zaburzenia demetylacji DNA, ale także być

może z braku bezpośredniej aktywacji transkrypcji wielu genów. Białko TDG oddziałuje bowiem z wieloma czynnikami transkrypcyjnymi, w tym z receptorami retinoidowym, estrogenowym, tyroidowym [10].

Substratem dla TDG są także błędne pary zasad 5fC: G i 5caC: G. Co ciekawe, w lisatach embrionalnych komórek macierzystych wykazano aktywność glikozylazy wycinającej 5caC z oligonukleotydów, natomiast w komórkach pozbawionych TDG, takiej aktywności nie wykazano [23]. Wiadomo także, że nadekspresja TDG prowadzi do obniżenia poziomu 5caC, natomiast obniżenie aktywności enzymu związane jest z akumulacją tak zmodyfikowanej zasady [23].

## DEAMINACJA 5mC DO TYMINY KATALIZOWANA PRZEZ AID/APOBEC I AKTYWNA DEMETYLACJA Z UDZIAŁEM GLIKOZYLAZY TDG

Ponad dekadę temu odkryto w DNA limfocytów B gen, którego produkt pełni funkcję deaminazy cytozyny, przekształcającej cytozynę w uracyl (activation – induced cytidine deaminase – AID, deaminaza cytydyny indukowana aktywacją limfocytów B) [38]. Obecność uracylu w genach kodujących immunoglobuliny (Ig) jest jednym z czynników prowadzących do powstania różnorodności przeciwciał i pełni ważną rolę zarówno w procesie somatycznych hipermutacji, jak i somatycznej rekombinacji prowadzącej do przełączania izotypów przeciwciał [39].

W ostatnich latach wykazano, że AID zaangażowana jest także w proces aktywnej demetylacji DNA [3,10].

Pierwsze eksperymentalne dowody wskazujące na udział AID w procesie aktywnej demetylacji 5mC opierają się na wynikach pracy opublikowanej w 2008 roku [48]. W badaniach prowadzonych na zarodkach danio przegowanego (zebrafish) udowodniono, że aktywne usuwanie grupy metylowej z 5mC wymaga obecności białek AID i MBD4. W wyniku deaminacji 5mC powstaje tymina (w parze z guaniną), która następnie jest usuwana i zastąpiona przez cytozynę po rozpoznaniu uszkodzenia przez MBD4. Wyniki Rai i wsp. [48] sugerują również, że do aktywnej demetylacji wymagane jest także nieenzymatyczne białko Gadd45, niezbędne do promowania interakcji między AID i MBD4. Wyniki pracy Popp i wsp. [47] sugerują podobną rolę białka AID w globalnej demetylacji DNA, jaka zachodzi podczas późnych stadiów embriogenezy u myszy. Potwierdziły to badania dotyczące myszy pozbawionych AID (AID<sup>-/-</sup>), których pierwotne komórki zarodkowe wykazywały wzrost hipometylacji w obrębie całego genomu [37]. Obecnie sugerowany jest także udział innej niż AID deaminazy cytozyny z rodziny APOBEC, w procesie aktywnej demetylacji podczas rozwoju embrionalnego myszy ponieważ zwierzęta pozbawione AID nie wykazują znaczących defektów w rozwoju osobniczym [47].

Badania dotyczące reprogramowania jądrowego (nuclear reprogramming) dostarczyły pierwszych znaczących dowodów na udział AID w aktywnej demetylacji DNA komórek ssaków [3]. W niedzielających się heterokarionach, powstałych w wyniku fuzji embrionalnych komórek macierzystych myszy z ludzkimi fibroblastami, obserwowano szybką demetylację regionów promotorowych genów

OCT4 i NANOG, które są odpowiedzialne za utrzymanie pluripotencji komórkowej. Opisane wyżej zjawiska były zależne od białka AID ponieważ spadek poziomu tego enzymu związany był z zablokowaniem demetylacji promotorów genów i ograniczeniem ich ekspresji.

Zaangażowanie białka AID w proces deaminacji 5mC i związane z tym utworzenie błędnych par zasad G: T sugeruje udział ścieżki naprawy BER w procesie aktywnej demetylacji. Obniżenie poziomu 5hmC i 5mC możliwe jest w sposób pasywny jako wynik replikacji i podziału komórki. Nie ulega jednak wątpliwości, że spadek poziomu metylacji możliwy jest także w wyniku aktywnej demetylacji w komórkach niereplikujących. U roślin proces zależny od ścieżki naprawczej BER jest znany od dawna i został dobrze scharakteryzowany [4]. Wymaga on zaangażowania swoistej glikozylazy bezpośrednio usuwającej 5mC [16]. W komórkach ssaków nie znaleziono enzymu/ów o podobnej aktywności. Wyniki badań przeprowadzonych w ostatnich latach sugerują inny mechanizm aktywnej demetylacji w komórkach ssaków, który jednak wymaga zaangażowania enzymów biorących udział w naprawie typu BER [10,21]. Dwie glikozylazy, które występują w komórkach ssaków mogą brać udział w procesie aktywnej demetylacji. Są to białka TDG i/lub SMUG [10,21]. Obie glikozylazy mogą być zaangażowane w proces wycinania T i/lub produktów oksydacji 5-hydroksymetylouracylu (5hmU) par zasad z G, co sugeruje, że działają one w kompleksie z białkami Tet i AID/APOBEC [10,21]. Myszy pozbawione TDG (TDG<sup>-/-</sup>) giną w 9–10 dniu rozwoju embrionalnego, co wskazuje, że obecność tej glikozylazy jest niezbędna w procesie demetylacji i w prawidłowej ontogenezie. W badaniach immunocytochemicznych wykazano bezpośrednią interakcję pomiędzy białkami TDG i AID [10].

#### **AKTYWNA DEMETYLACJA W KOMÓRKACH SSÁKÓW JAKO ODPOWIEDZ NA BODZIEC ZEWNĘTRZNY**

Zdecydowana większość prac opisujących aktywną demetylację dotyczyła macierzystych komórek embrionalnych. Demetylacja DNA jest procesem zachodzącym w trakcie regulacji aktywności genomu komórek „dojrzałych”, w odpowiedzi na bodziec zewnętrzny bądź czynnik sygnalizacyjny. Obserwowana jest we wczesnych etapach rozwoju osobniczego (komórki zarodkowe) i w wysoce wyspecjalizowanych komórkach postmitotycznych (neurony) [4].

Jednym z najbardziej interesujących zjawisk jest proces aktywnej demetylacji regionów promotorowych genu mózgowego czynnika neurotrofowego (brain – derived neurotrophic factor – BDNF) i czynnika wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor 1 – FGF1) w neuronach postmitotycznych [4].

Z pracy Guo i wsp. [21] wynika, że za demetylację DNA komórek HEK 293 odpowiedzialne jest wzajemne oddziaływanie między białkami Tet, AID/APOBEC i glikozylazami uczestniczącymi w ścieżce naprawy typu BER. Proces rozpoczyna konwersja 5mC do 5hmC, po której następuje indukowana enzymatycznie (AID/APOBEC) deaminacja 5hmC do 5hmU, który jest wycinany i następnie zamieniany na cytozynę w procesie BER. Wykazano, że rzeczywistość glikozylazy TDG i SMUG są zaangażowane w ten typ naprawy [10,21,23].

Inne przykłady aktywnej demetylacji w odpowiedzi na docierający do komórki sygnał obserwowano w trakcie stymulacji limfocytów T przez interleukinę 2, podczas odpowiedzi immunologicznej oraz stymulowanej estrogenami odpowiedzi transformowanych komórek raka piersi [4].

#### **CZY 8-OKSYGUA JEST CZYNNIKIEM EPIGENETYCZNYM?**

Najlepiej poznaną i wszechstronnie badaną, oksydacyjną modyfikacją DNA o właściwościach mutagennych, jest 8-oksy-2'-deoksyguanozyna (8-oksydG), opisywana też jako postać tautomeryczna 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyna (8-OHdG) [58].

Oksydowana guanina jest jednym z najczęściej powstających produktów modyfikacji zasad DNA przez reaktywne formy tlenu. Tak zmodyfikowana guanina może tworzyć stabilne pary zasad, zarówno z cytozyną jak i adeniną. W tym ostatnim przypadku może to prowadzić do transwersji GC→TA. W badaniach *in vivo* wykazano, że obecność 8-oksyGua w DNA jest odpowiedzialna za zamianę guaniny w tyminę, podczas procesu replikacji (z częstością 0,7%) [7]. Biorąc pod uwagę funkcjonujące w komórkach mechanizmy naprawy, które efektywnie usuwają taką zmodyfikowaną zasadę można założyć, że 8-oksyGua ma słabe właściwości mutagenne [58].

Wydaje się, że indukowane zmiany mutacyjne nie są jedynym skutkiem obecności zmodyfikowanej guaniny w DNA. Rozważany jest też możliwy wpływ 8-oksyGua na ekspresję genów, poprzez udział w relaksacji konkretnych domen chromatyny.

Dane, które sugerują możliwość regulacji transkrypcji z udziałem 8-oksyGua pochodzą z prac dotyczących genów, których aktywność regulowana jest przez estrogeny [45], genów regulowanych stanem hipoksji [18,43] i pozostających pod wpływem czynnika transkrypcyjnego Myc [2].

W 2008 roku wykazano, że ekspozycja komórek na estrogen związana jest z wyraźnym wzrostem poziomu 8-oksyGua w regionach promotorowych dla 17β estradiolu [45]. Jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za remodelowanie chromatyny, poprzez jej relaksację, może być wycinanie 8-oksyGua z udziałem glikozylazy OGG1 w regionach promotorowych niektórych genów. Ekspozycja komórek na estrogen związana jest ze wzrostem poziomu 8-oksyGua w DNA i rekrutacją OGG1 oraz topoizomerazy IIβ (TopoIIβ) w miejscu występowania elementów odpowiedzi na estrogen (ERE), regionów promotorowych genów odpowiedzi na 17β estradiol (E2). Umiejscowienie kompleksu receptora E2 w określonych obszarach chromatyny jest powiązane z demetylacją lizyny 4 w histonie H3 (H3K4). Taka demetylacja, za którą odpowiedzialna jest swoista demetylaza LSD1, powoduje wzmożone generowanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, co z kolei indukuje formowanie 8-oksyGua w ściśle określonych miejscach genomu. Reakcja jest wydajnie hamowana przez N-acetylo-L-cysteinę, która jest zmiataczem wolnych rodników tlenowych [45]. Dokładna analiza miejsc promotorowych wykazała, że zarówno OGG1, jak i TopoIIβ są kumulowane preferencyjnie w regionach ERE. Model jaki zaproponowali Perillo i wsp. [45] zakłada, że miejsca pęknięć nici DNA utworzone przez OGG1 funkcjonują jako punkty przyłączania TopoIIβ. Przerwa w nici

DNA umożliwia topoisomerazie relaksację chromatyny i tworzenie kompleksu inicjującego proces transkrypcji.

Podobny mechanizm regulacji transkrypcji zaobserwowano w przypadku genów aktywowanych czynnikiem transkrypcyjnym Myc [1,2] (ryc. 2). Sekwencja odcinka DNA, do którego wiąże się białko Myc została zdefiniowana jako CACGTG (E-box, kasetka-E). Po przyłączeniu się czynnika Myc do określonych regionów chromatyny demetylaza LSD1 zaczyna przejściową demetylację lizyny 4 histonu H3. Wykazano, że przyłączenie Myc jest powiązane z rekrutacją LSD1 do promotorowych regionów zawierających sekwencje CACGTG. Podobnie jak w przypadku regionów promotorowych dla genów odpowiedzi na  $17\beta$  estradiol, także i w tym przypadku LSD1 generuje  $H_2O_2$  i indukuje formowanie 8-oksyoGua w obrębie opisanych sekwencji. Do miejsc zawierających 8-oksyoGua rekrutowana jest glikozylaza OGG1 i endonukleaza Ape1 (ryc. 2).

Inhibicja procesów oksydacyjnych w obecności N-acetylo-L-cysteiny lub redukcja poziomu LSD1, OGG1 i endonukleazy Ape1 skutkuje drastycznym obniżeniem poziomu transkrypcji genów aktywowanych czynnikiem transkrypcyjnym Myc. Warto podkreślić, że około 15% genów w genomie człowieka może zawierać w regionach promotorowych sekwencje wiążące czynnik transkrypcyjny Myc [1,2]. Obecnie przyjmuje się, że sekwencje/regiony regulatorowe genów wchodzi w wzajemną interakcję za pomocą wcześniej formowanych pętli [2]. Wyniki badań opisanych wyżej pozwoliły na zaproponowanie modelu zakładającego postępującą relaksację DNA, w wyniku przyłączenia białka Myc i formowania pętli, które umożliwiają bezpośrednią interakcję polimerazy RNA II i czynnika transkrypcyjnego. Demetylacja histonu H3, późniejsze reakcje oksydacyjne i indukowana naprawa 8-oksyoGua są niezbędne do efektywnego formowania kompleksu inicjującego proces transkrypcji. Wyniki przeprowadzonych ostatnio badań wykazały, że obecność czynnika Myc jest także niezbędna w procesie elongacji transkrypcji ponieważ przeciwdziała przerywaniu transkrypcji i zatrzymaniu kompleksu transkrypcyjnego [2].

Zakłada się, że podstawowy poziom 8-oksyoGua w jądrowym DNA komórek ssaków jest zbliżony do poziomu jednej cząsteczki na  $10^6$  zasad azotowych [15]. W badaniach zespołu kierowanego przez Gillespie [18], dotyczących genów indukowanych hipoksją wykazano, że stan ten jest odpowiedzialny za wyraźny wzrost poziomu 8-oksyoGua (do wartości dwóch zmodyfikowanych cząsteczek na  $10^3$  zasad), ale jest on obserwowany wyłącznie w elementach odpowiedzialnych na hipoksję (HRE). Co więcej, obecność 8-oksyoGua wykryto wyłącznie we frakcji chromatyny wrażliwej na nukleazę mikrokokalną, a więc wzbogaconą w sekwencje aktywne transkrypcyjnie [43]. Ta sama grupa badaczy stwierdziła, że obecność w sekwencjach HRE miejsc AP (po usunięciu zasad), które są intermediatem w procesie usuwania 8-oksyoGua, jest odpowiedzialne za wiązanie czynnika transkrypcyjnego indukowanego hipoksją (HIF) i za wydajną ekspresję genu reporterowego [61]. Bazując na wynikach tych doświadczeń autorzy wysunęli hipotezę, że intencjonalne wprowadzanie 8-oksyoGua i jej późniejsza naprawa wpływa na relaksację DNA, co z kolei jest odpowiedzialne za rekrutację czynników transkrypcyjnych i aktywację procesu transkrypcji.

Na bezpośredni udział 8-oksyoGua w regulacji transkrypcji wskazują wyniki badań, w których do sekwencji docelowych wiążących czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B wprowadzono 8-oksyoGua. Oksydacja w sekwencji konsensusowej jednej z czterech cząsteczek guaniny powodowała kilkakrotny wzrost powinowactwa podjednostki p50 czynnika NF- $\kappa$ B [22]. Ponieważ wiele sekwencji promotorowych jest wzbogaconych w guaninę, autorzy wskazują możliwość, że oksydacyjna modyfikacja tej zasady może być jednym z czynników regulacyjnych procesu transkrypcji. W tym kontekście ciekawe wydają się rezultaty innych prac, z których wynika, że istnieje możliwość przemieszczenia potencjału oksydacyjnego i jego preferencyjna akumulacja w sekwencji bogatej w guaninę [17].

Wyniki uzyskane przez zespół Katedry Biochemii Klinicznej CM UMK wskazują, że frakcje chromatyny jądrowej aktywne transkrypcyjnie (euchromatyna, frakcja związana z matryks jądrową) charakteryzują się pięciokrotnie wyższym poziomem 8-oksyoG w DNA od frakcji transkrypcyjnie nieaktywnej (heterochromatyna). Teoretycznie można założyć, że ta wysoce znamienna statystycznie różnica mogłaby być wynikiem większej dostępności DNA dla RFT w euchromatynie, który jest w mniejszym stopniu chroniony w tej frakcji przez białka histonowe, niż DNA heterochromatyny. Taka teoria nie tłumaczy jednak podobnie wysokiego, jak w euchromatynowym DNA, poziomu 8-oksyoG w DNA frakcji związanej z matrycą jądrową, ponieważ ta frakcja stanowi ściśle upakowaną strukturę.

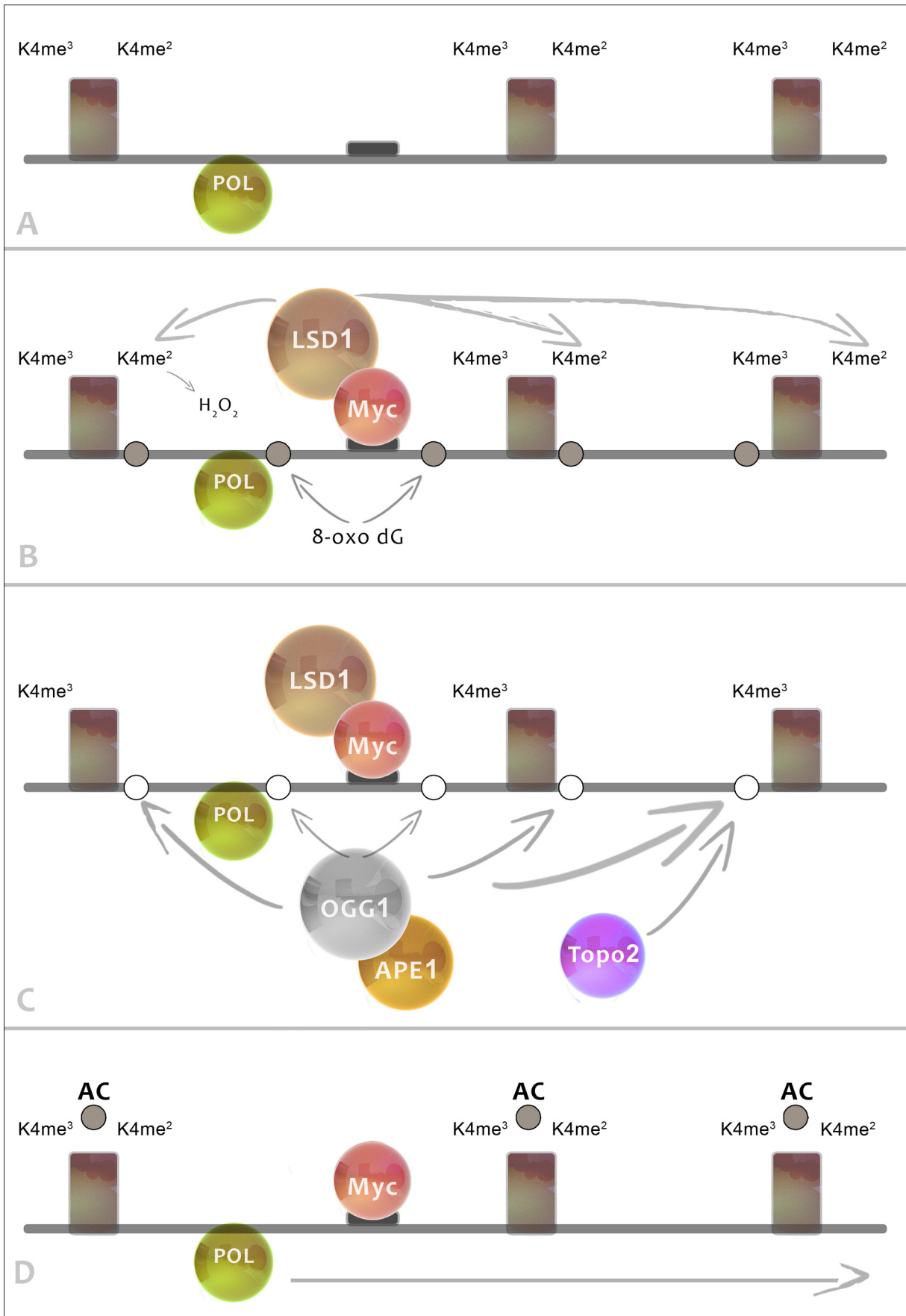
Aby ostatecznie zweryfikować możliwość preferencyjnej indukcji 8-oksyoG, w naszych badaniach, podjęliśmy się analizy poziomu 8,5'-cyklo-2'-deoksyadenozyny (cdA), w wymienionych frakcjach chromatyny. CdA jest podobnie jak 8-oksyoG produktem oddziaływania rodnika  $\cdot$ OH z DNA. W przeciwieństwie jednak do 8-oksyoG, obecność cdA w DNA powoduje zaburzenia w strukturze helisy [27] i jest silnym inhibitorem procesu transkrypcji. Nie stwierdzono różnic w poziomie cdA między eu- i heterochromatyną oraz frakcją związaną z matrycą jądrową, co wyklucza prawdziwość argumentu „dostępności”. Przedstawione wyżej wyniki pozwoliły nam na sformułowanie hipotezy zakładającej uniwersalne (nie ograniczone tylko do grupy genów przedstawianych wyżej) znaczenie obecności 8-oksyoG w DNA, jako czynnika związanego z regulacją transkrypcji (dane nieopublikowane).

## PODSUMOWANIE

Jednym z podstawowych warunków przeżycia komórki jest utrzymanie integralności i stabilności genomu. Skumulowanie zmian sekwencji DNA wywołanych przez uszkodzenia zasad azotowych, może prowadzić do mutacji, a tym samym efektów patologicznych, czy przyspieszonego starzenia, a nawet wprost do śmierci komórki.

Komórki zawierają enzymy naprawcze, minimalizujące częstość pojawiania się mutacji, a tym samym następstwa uszkodzeń DNA. Jeżeli jednak ilość zmian w DNA przekracza możliwości naprawy ostateczną linią obrony komórki może być jej śmierć w procesie apoptozy, dla dobra całego organizmu wielokomórkowego. W ten sposób komórka, z dużą liczbą zmian w strukturze DNA jest eliminowana zanim stanie się zagrożeniem dla przeżycia organizmu.





Ryc. 2. Schemat zakładanego mechanizmu regulacji transkrypcji z udziałem 8-oksydG (na podstawie [2], zmodyfikowane)

Taka naturalna „logika”, zakładająca obronę integralności materiału genetycznego za wszelką cenę, wydaje się mieć głęboki sens biologiczny zapewniający trwanie życia w przeciągu miliardów lat ewolucji.

W świetle wyników badań uzyskanych w przeciągu ostatnich kilku lat, wydaje się, że ta oczywista reguła ma swoje wyjątki. Modyfikacje zasad azotowych, o znaczeniu mutagenym mogą bowiem pełnić istotną rolę w przekazywaniu sygnałów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórki, realizowanego w przebiegu metabolizmu komórkowego. O ile rola takich modyfikacji w aktywnej demetylacji DNA jest dobrze eksperymentalnie udokumentowana, o tyle epigenetyczna rola obecności 8-oksyoGua w DNA nie ma jednoznacznego oparcia doświadczalnego. Należy jednak pamiętać, że do niedawna rola RFT i następstwa ich działania w układach biologicznych były kojarzone raczej jednoznacznie z działaniem patogennym. Obecnie wiadomo, że niektóre z tych reaktywnych cząsteczek (NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>), pełnią ważną rolę w przekazywaniu sygnałów komórkowych, specjalizacji komórek i w wielu innych procesach biologicznych. Wydaje się, że jeden z najczęściej formowanych produktów oddziaływania RFT z DNA, 8-oksyoGua może pełnić także funkcje związane z regulacją transkrypcji. Często sekwencje promotorowe genów są bardzo ściśle owinięte wokół rdzenia histonowego nukleosomu, co utrudnia wiązanie białek regulacyjnych [13]. W procesie aktywacji transkrypcji takie sekwencje muszą być udostępnione dla czynników transkrypcyjnych. Zakłada się, że czynniki remodelujące chromatynę mogą jednocześnie pełnić rolę relaksacyjną [13]. Warto zatem postawić pytanie, w jaki sposób czynniki remodelujące mogą się wiązać z DNA i doprowadzić do relaksacji tej molekuly skoro sekwencje promotorowe pozostają w ścisłym kompleksie z białkami? Dodatkowo, krótkie sekwencje promotorowe mają dosyć sztywną strukturę [51,60].

Pewnym rozwiązaniem omawianych zjawisk może być intencjonalne wprowadzenie pęknięcia nici DNA w wyniku wycinania wprowadzonej uprzednio 8-oksyoGua, jak zaproponowano w badanych modelach eksperymentalnych, opisywanych w tym opracowaniu.

Podstawowym nadal wydaje się pytanie, czy wielokomórkowy organizm „stać” jest na celowe wprowadzanie w miejsca promotorowe genów uszkodzenia, aby umożliwić tym samym regulację fundamentalnych procesów komórkowych. W przypadku procesów regulujących aktywną demetylację DNA odpowiedź brzmi tak, jest to nie tylko możliwe, ale i konieczne zważywszy na letalny fenotyp myszy pozbawionych białka TDG. Jednak i w tym przypadku pozostaje kilka nie do końca zrozumiałych kwestii. Dlaczego białko Tet czasami przekształca 5mC do 5hmC, a innym razem do 5fC lub 5caC? Dlaczego istnieją dwa niezależne szlaki demetylacji, opierające się na

deaminacji i oksydacji? Czy różny ich przebieg jest przypisany odmiennym procesom fizjologicznym np. deaminacja preferowana jest podczas embriogenezy? Jeśli chodzi o regulatorową rolę 8-oksyoGua, to mimo kilku eksperymentalnych dowodów, które sugerują udział tej molekuly w regulacji transkrypcji, nadal potrzeba bardziej przekonujących dowodów na poparcie tej tezy.

Warto podkreślić, że również innego typu zmiany, uczestniczące, jak się przypuszcza, w regulacji stopnia upakowania chromatyny, związane z modyfikacją histonów, a dokładnie z demetylacją reszt lizynowych, są także związane z oksydacją podobną do opisywanej wcześniej, biorącej udział w aktywnej demetylacji DNA [5,33].

Enzymy uczestniczące w tym procesie są, podobnie jak białka Tet, dioksygenazami zależnymi od żelaza i  $\alpha$ -ketoglutaranu. Należy także pamiętać, że wspomniane wyżej białko LSD1, które jest bezpośrednio zaangażowane w demetylację lizyny 4 histonu H3 i generowaniu 8-oksyoGua, jest monoooksygenazą. Opisane w pracy zjawiska wskazują, że tlen dla organizmów aerobowych, jest nie tylko niezbędny do efektywnego pozyskiwania energii, ale także może pełnić podstawową rolę w regulacji sygnalizacji epigenetycznej.

Tlen umożliwił rozwój i ekspansję na Ziemi organizmów wielokomórkowych wykorzystujących go w swoim metabolizmie. Za wygodę pozyskiwania w ten sposób energii tlenowce płacą jednak wysoką cenę. Są nią wolne rodniki, generowane z tlenu w przebiegu przemian metabolicznych. Ich nadmiar może być niebezpieczny, bowiem stres oksydacyjny wiązany jest z licznymi patologiami komórkowymi i uważany za czynnik w procesach starzenia. Jednak w trwającej miliony lat ewolucji biochemicznej komórki aerobowe nauczyły się korzystać z powstających w nich wolnych rodników i włączać je w procesy wręcz warunkujące trwanie życia biologicznego. Do takich fundamentalnych procesów z pewnością należą te, które związane są z regulacją funkcjonowania materiału genetycznego. Być może zatem paradoksalnie te same czynniki, które uczestniczą w przebiegu procesów warunkujących przebieg zjawisk życiowych, są jednocześnie czynnikiem ograniczającym i limitującym czas życia i czynnikiem sprawczym licznych patologii komórkowych. Udział tlenu i jego metabolitów w funkcjonowaniu genomu wydaje się zatem być jednym z ciekawszych zagadnień współczesnej biologii i medycyny, a jego zrozumienie to zarówno satysfakcja z odkrycia piękna zjawisk biologicznych, jak i wymiar praktyczny np. związany z zastosowaniami medycyny molekularnej.

## PODZIĘKOWANIE

W przygotowaniu rycin autorom pomoc okazał Kamil Jurgowiak.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Amente S., Bertoni A., Morano A., Lania L., Avvedimento E.V., Majello B.: LSD1-mediated demethylation of histone H3 lysine 4 triggers Myc-induced transcription. *Oncogene*, 2010; 29: 3691–3702
- [2] Amente S., Lania L., Avvedimento E.V., Majello B.: DNA oxidation drives Myc mediated transcription. *Cell Cycle*, 2010; 9: 3002–3004

- [3] Bhutani N., Brady J.J., Damian M., Sacco A., Corbel S.Y., Blau H.M.: Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature*, 2010; 463: 1042–1047
- [4] Bhutani N., Burns D.M., Blau H.M.: DNA demethylation dynamics. *Cell*, 2011; 146: 866–872

- [5] Bonasio R., Tu S., Reinberg D.: Molecular signals of epigenetic states. *Science*, 2010; 330: 612–616
- [6] Chen Z.X., Riggs A.D.: DNA methylation and demethylation in mammals. *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 18347–18353
- [7] Cheng K.C., Cahill D.S., Kasai H., Nishimura S., Loeb L.A.: 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G→T and A→C substitutions. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 166–172
- [8] Cimmino L., Abdel-Wahab O., Levine R.L., Aifantis I.: TET family proteins and their role in stem cell differentiation and transformation. *Cell Stem Cell*, 2011; 9: 193–204
- [9] Cortázar D., Kunz C., Selfridge J., Lettieri T., Saito Y., MacDougall E., Wirz A., Schuermann D., Jacobs A.L., Siegrist F., Steinacher R., Jiricny J., Bird A., Schär P.: Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability. *Nature*, 2011; 470: 419–423
- [10] Cortellino S., Xu J., Sannai M., Moore R., Caretti E., Cigliano A., Le Coz M., Devarajan K., Wessels A., Soprano D., Abramowitz L.K., Bartolomei M.S., Rambow F., Bassi M.R., Bruno T., Fanciulli M., Renner C., Klein-Szanto A.J., Matsumoto Y., Kobi D., Davidson I., Alberti C., Larue L., Bellacosa A.: Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell*, 2011; 146: 67–79
- [11] Dahl C., Gronbaek K., Guldberg P.: Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. *Clin. Chim. Acta*, 2011; 412: 831–836
- [12] Esteller M.: Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol.*, 2003; 4: 351–358
- [13] Felsenfeld G., Groudine M.: Controlling the double helix. *Nature*, 2003; 421: 448–453
- [14] Ficiz G., Branco M.R., Seisenberger S., Santos F., Krueger F., Hore T.A., Marques C.J., Andrews S., Reik W.: Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature*, 2011; 473: 398–402
- [15] Gedik C.M., Collins A., ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage): Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *FASEB J.*, 2005; 19: 82–84
- [16] Gehring M., Reik W., Henikoff S.: DNA demethylation by DNA repair. *Trends Genet.*, 2009; 25: 82–90
- [17] Genereux J.C., Boal A.K., Barton J.K.: DNA-mediated charge transport in redox sensing and signaling. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010; 132: 891–905
- [18] Gillespie M.N., Pastukh V., Ruchko M.V.: Oxidative DNA modifications in hypoxic signaling. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2009; 1177: 140–150
- [19] Globisch D., Münzel M., Müller M., Michalak 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: e15367
- [20] Gu T.P., Guo F., Yang H., Wu H.P., Xu G.F., Liu W., Xie Z.G., Shi L., He X., Jin S.G., Iqbal K., Shi Y.G., Deng Z., Szabó P.E., Pfeifer G.P., Li J., Xu G.L.: The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, 2011; 477: 606–610
- [21] Guo J.U., Su Y., Zhong C., Ming G.L., Song H.: Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, 2011; 145: 423–434
- [22] Hailer-Morrison M.K., Kotler J.M., Martin B.D., Sugden K.D.: Oxidized guanine lesions as modulators of gene transcription. Altered p50 binding affinity and repair shielding by 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine lesions in the NF- $\kappa$ B promoter element. *Biochemistry*, 2003; 42: 9761–9770
- [23] He Y.F., Li B.Z., Li Z., Liu P., Wang Y., Tang Q., Ding J., Jia Y., Chen Z., Li L., Sun Y., Li X., Dai Q., Song C.X., Zhang K., He C., Xu G.L.: Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*, 2011; 333: 1303–1307
- [24] Hermann A., Gowher H., Jeltsch A.: Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2004; 61: 2571–2587
- [25] Iqbal K., Jin S.G., Pfeifer G.P., Szabó P.E.: Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 3642–3647
- [26] Ito S., D'Alessio A.C., Taranova O.V., Hong K., Sowers L.C., Zhang Y.: Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 2010; 466: 1129–1133
- [27] Jaruga P., Dizdaroglu M.: 8,5'-Cyclopurine-2'-deoxynucleosides in DNA: mechanisms of formation, measurement, repair and biological effects. *DNA Repair*, 2008; 7: 1413–1425
- [28] Ko M., Huang Y., Jankowska A.M., Pape U.J., Tahiliani M., Bandukwala H.S., An J., Lamperti E.D., Koh K.P., Ganetzky R., Liu X.S., Aravind L., Agarwal S., Maciejewski J.P., Rao A.: Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*, 2010; 468: 839–843
- [29] Kothari R.M., Shankar V.: 5-Methylcytosine content in the vertebrate deoxyribonucleic acids: species specificity. *J. Mol. Evol.*, 1976; 7: 325–329
- [30] Kriaucionis S., Heintz N.: The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*, 2009; 324: 929–930
- [31] Langemeijer S.M., Aslanyan M.G., Jansen J.H.: TET proteins in malignant hematopoiesis. *Cell Cycle*, 2009; 8: 4044–4048
- [32] Li W., Liu M.: Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues. *J. Nucleic Acids*, 2011; 870726
- [33] Margueron R., Reinberg D.: Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat. Rev. Genet.*, 2010; 11: 285–296
- [34] Mohr F., Döhner K., Buske C., Rawat V.P.: TET genes: new players in DNA demethylation and important determinants for stemness. *Exp. Hematol.*, 2011; 39: 272–281
- [35] Münzel M., Globisch D., Brückl T., Wagner M., Welzmilller V., Michalak S., Müller M., Biel M., Carell T.: Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2010; 49: 5375–5377
- [36] Münzel M., Globisch D., Carell T.: 5-Hydroxymethylcytosine, the sixth base of the genome. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2011; 50: 6460–6468
- [37] Muramatsu M., Kinoshita K., Fagarasan S., Yamada S., Shinkai Y., Honjo T.: Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, 2000; 102: 553–563
- [38] Muramatsu M., Sankaranand V.S., Anant S., Sugai M., Kinoshita K., Davidson N.O., Honjo T.: Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 18470–18476
- [39] Oliński R., Jurgowiak M.: Uracyl w DNA – przyjaciel czy wróg? *Postępy Biochem.*, 2009; 55: 25–35
- [40] Paluszczak J., Baer-Dubowska W.: Zjawiska epigenetyczne w patogenezie nowotworów. Nowe możliwości profilaktyki i terapii? *Postępy Biochem.*, 2005; 51: 244–250
- [41] Pan G., Thomson J.A.: Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.*, 2007; 17: 42–49
- [42] Pastor W.A., Pape U.J., Huang Y., Henderson H.R., Lister R., Ko M., McLoughlin E.M., Brudno Y., Mahapatra S., Kapranov P., Tahiliani M., Daley G.Q., Liu X.S., Ecker J.R., Milos P.M., Agarwal S., Rao A.: Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature*, 2011; 473: 394–397
- [43] Pastukh V., Ruchko M., Gorodnya O., Wilson G.L., Gillespie M.N.: Sequence-specific oxidative base modifications in hypoxia-inducible genes. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007; 43: 1616–1626
- [44] Penn N.W., Suwalski R., O'Riley C., Bojanowski K., Yura R.: The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, 1972; 126: 781–790
- [45] Perillo B., Ombra M.N., Bertoni A., Cuozzo C., Sacchetti S., Sasso A., Chiariotti L., Malorni A., Abbondanza C., Avvedimento E.V.: DNA oxidation as triggered by H3K9me2 demethylation drives estrogen-induced gene expression. *Science*, 2008; 319: 202–206
- [46] Pfaffeneder T., Hackner B., Truss M., Munzel M., Muller M., Deiml C.A., Hagemeyer C., Carell T.: The discovery of 5-formylcytosine in embryonic stem cell DNA. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2011; 50: 7008–7012
- [47] Popp C., Dean W., Feng S., Cokus S.J., Andrews S., Pellegrini M., Jacobsen S.E., Reik W.: Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature*, 2010; 463: 1101–1105
- [48] Rai K., Huggins I.J., James S.R., Karpf A.R., Jones D.A., Cairns B.R.: DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. *Cell*, 2008; 135: 1201–1212

- [49] Schmitz K.M., Schmitt N., Hoffmann-Rohrer U., Schafer A., Grummt I., Mayer C.: TAF12 recruits Gadd45a and the nucleotide excision repair complex to the promoter of rRNA genes leading to active DNA demethylation. *Mol. Cell*, 2009; 33: 344–353
- [50] Shi Y.Y., Huang Z.Y., Zeng Z.J., Wang Z.L., Wu X.B., Yan W.Y.: Diet and cell size both affect queen-worker differentiation through DNA methylation in honey bees (*Apis mellifera*, Apidae). *PLoS One*, 2011; 6, e18808
- [51] Shimada J., Yamakawa H.: DNA-topoisomer analysis on the basis of the helical wormlike chain. *Biopolymers*, 1984; 23: 853–857
- [52] Song C.X., Szulwach K.E., Fu Y., Dai Q., Yi C., Li X., Li Y., Chen C.H., Zhang W., Jian X., Wang J., Zhang L., Looney T.J., Zhang B., Godley L.A., Hicks L.M., Lahn B.T., Jin P., He C.: Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat. Biotechnol.*, 2011; 29: 68–72
- [53] Tahiliani M., Koh K.P., Shen Y., Pastor W.A., Bandukwala H., Brudno Y., Agarwal S., Iyer L.M., Liu D.R., Aravind L., Rao A.: Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 2009; 324: 930–935
- [54] Williams K., Christensen J., Pedersen M.T., Johansen J.V., Cloos P.A., Rappalber J., Helin K.: TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature*, 2011; 473: 343–348
- [55] Wu H., D'Alessio A.C., Ito S., Xia K., Wang Z., Cui K., Zhao K., Sun Y.E., Zhang Y.: Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 2011; 473: 389–393
- [56] Wu S.C., Zhang Y.: Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010; 11: 607–620
- [57] Xu Y., Wu F., Tan L., Kong L., Xiong L., Deng J., Barbera A.J., Zheng L., Zhang H., Huang S., Min J., Nicholson T., Chen T., Xu G., Shi Y., Zhang K., Shi Y.G.: Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell*, 2011; 42: 451–464
- [58] Zaremba T., Oliński R.: Oksydacyjne uszkodzenia DNA – ich analiza oraz znaczenie kliniczne. *Postępy Biochem.*, 2010; 56: 124–138
- [59] Zhang H., Zhang X., Clark E., Mulcahey M., Huang S., Shi Y.G.: TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. *Cell Res.*, 2010; 20: 1390–1393
- [60] Zhang Y., Crothers D.M.: Statistical mechanics of sequence-dependent circular DNA and its application for DNA cyclization. *Biophys. J.*, 2003; 84: 136–153
- [61] Ziel K.A., Grishko V., Campbell C.C., Breit J.F., Wilson G.L., Gillespie M.N.: Oxidants in signal transduction: impact on DNA integrity and gene expression. *FASEB J.*, 2005; 19: 387–394

---

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.