

Received: 2016.09.15
Accepted: 2017.04.27
Published: 2017.08.24

Rola witaminy C w regulacji epigenetycznej*

The role of vitamin C in epigenetic regulation

Jolanta Guz, Ryszard Oliński

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

Streszczenie

Witamina C (kwas L-askorbinowy) jest organicznym składnikiem odżywczym stosowanym w zapobieganiu i leczeniu szkorbutu. Jest zaangażowana w wiele procesów biologicznych uczestnicząc w licznych reakcjach enzymatycznych katalizowanych przez białka należące do dioksygenaz, które zawierają jony żelaza (II) oraz wykorzystują 2-ketoglutaran jako kosubstrat.

W artykule omówiono wyniki prac, które wskazują na udział kwasu askorbinowego w re-programowaniu i regulacji procesów epigenetycznych przez wpływ na aktywność enzymów uczestniczących w modyfikowaniu DNA i białek chromatyny. Modyfikacje chromatyny za pośrednictwem dioksygenaz zależnych od Fe(II) i 2-ketoglutaranu dotyczą reakcji demetylacji reszt lizynowych w histonach rdzeniowych. Hydroksylazy TET katalizują natomiast utlenianie grupy metylowej w pozycji 5 cytozyny powodując powstanie 5-hydroksymetylocytozyny, która może być utleniana do 5-formylocytozyny i 5-karboksycytozyny. Liczne badania prowadzone na kulturach komórkowych wykazały, że kwas askorbinowy stymuluje wytwarzanie 5-hydroksymetylocytozyny w komórkowym DNA, prawdopodobnie działając jako kofaktor białek TET. Fizjologiczne stężenia askorbinianu (10-100 µM) stwierdzone w ludzkiej surowicy krwi wydają się wystarczające do zapewnienia stałego poziomu 5-hydroksymetylocytozyny, która w komórce pełni istotną epigenetyczną funkcję. W artykule zwrócono również uwagę na wyniki badań sugerujące, że bardzo mała zawartość 5-hydroksymetylocytozyny charakterystyczna dla większości ludzkich nowotworów, może być związana z ich rozwojem i progresją. Uwzględniając to, że witamina C może wzmacniać aktywność białek TET, interesujące byłoby dokładniejsze badania pozwalające w przyszłości stwierdzić kliniczne korzyści podawania witaminy C jako uzupełnienie terapii przeciwnowotworowej.

Słowa kluczowe:

witamina C • epigenetyka • dioksygenazy zależne od jonów żelaza i 2-ketoglutaranu • demetylacja DNA • demetylacja histonów

Summary

Vitamin C (L-ascorbic acid) is a micronutrient best known for its anti-scurvy activity in humans. Vitamin C is involved in many biological processes involving enzymatic reactions that are catalyzed by members of dioxygenases which use Fe(II) and 2-oxoglutarate as a co-substrate.

The article reviews recent data that suggest the involvement of ascorbate in dioxygenases catalyzed chromatin and DNA modifications which thereby contribute to epigenetic regulation. Concerning chromatin modification, the dioxygenases are involved in distinct demethylation reactions with varying specificity for the position of the lysine on the target histone. TET hydroxylases catalyse the oxidation of methyl groups in the 5 position of cytosine in DNA yielding

*Praca współfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2012/07/B/NZ1/00008.

5-hydroxymethylcytosine, while further iterative oxidation reactions results in the formation of 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. A few previous studies demonstrated that ascorbate may enhance generation of 5-hydroxymethylcytosine in cultured cells, probably acting as a cofactor of TETs during hydroxylation of 5-methylcytosine. Physiological concentrations of ascorbate in human serum (10-100 μ M) may guarantee stable level of 5-hydroxymethylcytosine, a modification necessary for epigenetic function of the cell. 5-Hydroxymethylcytosine level is substantially decreased in almost all investigated cancers, what may be linked with cancer development. Therefore, it is possible that supplementation with ascorbate could contribute to better management of individual cancer patient. This issue is also discussed in our paper.

Keywords: vitamin C • epigenetics • iron and 2-ketoglutarate-dependent dioxygenases • DNA demethylation • histone demethylation

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1245581>
DOI: 10.5604/01.3001.0010.3853
Word count: 6599
Tables: 1
Figures: 4
References: 71

Adres autorki: dr Jolanta Guz; Katedra Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz; e-mail: jolaguz@cm.umk.pl

Wykaz skrótów: **2-KG** – kwas 2-ketoglutarowy; **5-caC** – 5-karboksycytozyna; **5-fC** – 5-formylocytozyna; **5-hmC** – 5-hydroksymetylocytozyna; **5-hmU** – 5-hydroksymetylouracyl; **5-mC** – 5-metylocytozyna; **AA** – kwas askorbinowy; **AID** – indukowana aktywacją limfocytów deaminaza cytydyny; **BER** – naprawa DNA przez wycinanie zasad; **DHA** – kwas dehydroaskorbinowy; **DNMT** – metylotransferaza DNA; **ESC** – embrionalne komórki macierzyste (embryonic stem cells); **GLUT** – transporter glukozy; **HIF-1** – białko indukowane przez hipoksję (hypoxia inducible factor); **IDH** – dehydrogenaza izocytrynianowa (isocitrate dehydrogenase); **iPSC** – indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (induced pluripotent stem cells); **JHDM** – demetylaza histonów zawierająca domenę JmjC (JmjC-domain-containing histone demethylase); **MBD4** – białko wiążące zmetylowane dinukleotydy CpG, glikozylaza DNA; **MEF** – mysie zarodkowe fibroblasty (mouse embryonic fibroblasts); **SAH** – S-adenozylhomocysteina; **SAM** – S-adenozylometionina; **SMUG1** – glikozylaza DNA; **SVCT** – transporter witaminy C zależny od jonów sodu (sodium-dependent vitamin C transporter); **TDG** – glikozylaza DNA; **TET** – białka uczestniczące w demetylacji DNA (ten-eleven translocation).

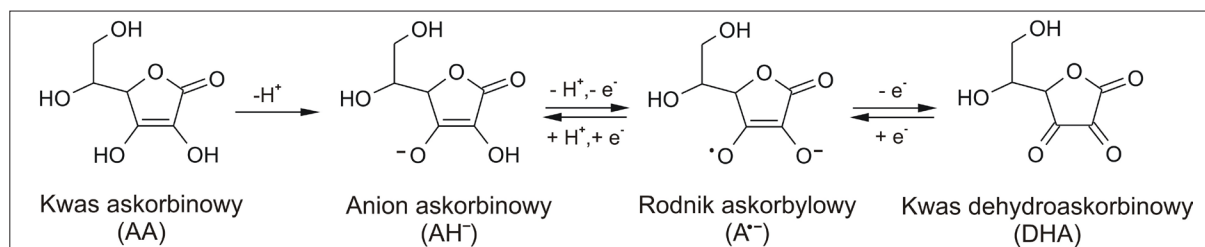
WPROWADZENIE

Witamina C występuje w dwóch formach: zredukowanej jako kwas L-askorbinowy (AA) i utlenionej jako kwas L-dehydroaskorbinowy (DHA). Większość ssaków syntetyzuje ją samodzielnie z glukozy. Człowiek, podobnie jak inne naczelnne, świnka morska oraz niektóre gatunki nietoperzy, utracił zdolność syntezy kwasu L-askorbinowego w szlaku kwasu uronowego z powodu braku oksydazy L-gulonolaktonowej utleniającej L-gulonolakton do kwasu askorbinowego. Dla tych gatunków kwas askorbinowy jest witaminą i musi być dostarczany do organizmu drogą pokarmową [36,43]. Jego niedobór lub brak w żywieniu wywołuje szkorbut, nazywany inaczej gnilcem [46].

Kwas askorbinowy jest związkem rozpuszczalnym w wodzie, wpływającym na potencjał oksydoredukcyjny

komórek. Wykazuje właściwości redukujące, ponieważ jest donorem elektronów [13,43]. Odwracalna dysocjacja kwasu askorbinowego prowadzi do powstania anionu askorbinowego (AH⁻), który w wyniku jednocielektronowego utlenienia tworzy rodnik askorbylowy (A[•]). Utrata kolejnego elektronu przez rodnik askorbylowy powoduje powstanie kwasu dehydroaskorbinowego. Utleniona forma kwasu askorbinowego ma taką samą aktywność biologiczną jak zredukowana (ryc.1). W warunkach fizjologicznego pH witamina C występuje jako anion askorbinowy [6,13].

Witamina C ma ogromne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Uczestniczy w wielu istotnych procesach, m.in. syntezie kolagenu, katecholamin, L-karnityny oraz w regulacji odpowiedzi na hipoksję [46]. Jest ważnym kofaktorem licznych enzymów, przede wszystkim hydroksylaz oraz oksygenaz, które zawierają



Ryc. 1. Utlenianie kwasu askorbinowego do kwasu dehydroaskorbinowego (na podstawie [13,33]).

jony żelaza i są powiązane z przemianą kwasu 2-ketoglutarynowego (2-KG). Przez dostarczanie elektronów, utrzymuje w formie zredukowanej jony metali znajdujące się w centrach aktywnych białek enzymatycznych, zapewniając ich pełną aktywność katalityczną [40]. Dotyczy to przede wszystkim hydroksylazy prolinowej (EC.1.14.11.2) i hydroksylazy lizynowej (EC.1.14.11.4), które katalizują odpowiednio: reakcje hydroksylacji reszt prolilowych do hydroksyprolilowych i reszt lizyloowych do hydroksylizyloowych w potranslacyjnej modyfikacji kolagenu. Podobną funkcję pełni kwas askorbinowy w syntezie karnityny [36]. Aktywności katalityczne dioksygenazy ϵ -trimetylolizyny (EC.1.14.11.8) i dioksygenazy γ -butyrylobetainy (EC.1.14.11.1) uczestniczących w tym procesie są również uzależnione od jonów żelaza na drugim stopniu utlenienia [61]. Innymi przykładami reakcji wymagających obecności askorbinianu są: przemiana dopaminy w noradrenalinę, katalizowana przez β -hydroksylazę dopaminy (EC 1.14.17.1) oraz amidacja końcowej grupy karboksylowej łańcucha peptydylo-glicyny, katalizowana przez monooksygenazę α -amidującą peptydyloglicyny (EC 1.14.17.3), w wyniku której hormony peptydowe są przekształcane do ich postaci aktywnych [46].

Kwas askorbinowy pełni rolę kofaktora również dla hydroksylaz uczestniczących w regulacji stabilności białka indukowanego przez hipoksję (HIF-1, hypoxia inducible factor). HIF-1 to czynnik transkrypcyjny odpowiedzialny za aktywację ekspresji wielu genów umożliwiających dostosowanie komórek do zmniejszonego stężenia tlenu. Wśród nich można wyróżnić geny zaangażowane w metabolizm energetyczny komórki, m.in. biorące udział w procesie glikolizy, a także geny, których produkty białkowe odpowiadają za homeostazę tlenu np. przez regulację erytropoezy, kontrolę układu naczyniowego oraz regulację proliferacji i żywotności komórek [62]. HIF-1 jest heterodimerem złożonym z podjednostki HIF-1 α wrażliwej na stężenie tlenu oraz HIF-1 β , podlegającej konstytutywnej ekspresji. Obniżone stężenie tlenu działa stabilizująco na HIF-1 α , natomiast w warunkach normoksji, czyli dostatecznej ilości tlenu w komórce dochodzi do destabilizacji i rozpadu podjednostki α . Jednym z etapów degradacji HIF-1 α jest hydroksylacja reszt prolilowych (Pro402 i Pro564) z udziałem trzech hydroksylaz prolilowych PHD1 – PHD3 (PHD, prolyl hydroxylases) oraz hydroksylacja reszty asparaginianowej (Asn803) C-końcowej domeny transaktywacyjnej podjednostki α przez hydroksylazę asparaginianową,

zwaną czynnikiem hamującym HIF (FIH, factor inhibiting HIF) [33,62].

Badania ostatnich lat wskazują, że witamina C może również pełnić rolę kofaktora dioksygenaz zależnych od jonów żelaza (II) i 2-ketoglutaranu umiejscowionych w jądrze komórkowym, które są zaangażowane w regulację ekspresji genów (tabela 1).

Kwas askorbinowy przedostaje się do komórek w wyniku aktywnego przeźblonowego transportu, zależnego od jonów sodowych. Transport Na⁺-zależny odbywa się z udziałem transporterów swoistych dla witaminy C: SVCT1 i SVCT2 (sodium-dependent vitamin C transporter) [1,36]. Transportery SVCT1 uczestniczą przede wszystkim w absorpcji kwasu askorbinowego z przewodu pokarmowego oraz jego reabsorpcji w nerkach. Transfer AA za pośrednictwem SVCT2 dotyczy większości tkanek organizmu [33,69]. Witamina C w postaci dehydroaskorbinianu dostaje się do komórek w wyniku dyfuzji ułatwionej, w którą są zaangażowane białka z rodziny transporterów glukozy (GLUT, glucose transporter). W komórkach DHA zostaje zredukowany z powrotem do kwasu askorbinowego, co zabezpiecza go przed usunięciem na zewnątrz komórki. W osoczu krwi zdrowego człowieka dominuje forma zredukowana witaminy C osiągając średnio stężenie około 50 μ M, natomiast DHA stanowi tylko 1-2%, co może sugerować, że witamina C jest transportowana do większości komórek głównie z udziałem SVCT [6,46]. W tkankach i narządach kwas L-askorbinowy jest gromadzony w dużo większych ilościach (0,5-4,0 mM) niż w osoczu. Największą jego zawartość stwierdza się w leukocytach, soczewce oka, nadnerczach, przysadce, mózgu, wątrobie, śledzionie, trzustce [13,39,46]. Nie do końca wyjaśnionym procesem jest transport AA do jądra komórkowego. Nie można wykluczyć bezpośredniego przechodzenia witaminy C z cytosolu do jądra przez pory jądrowe. Możliwe jest też, że DHA i AA są transportowane do jądra za pośrednictwem swoistych transporterów umieszczonych w wewnętrznej błonie otoczki jądrowej [1].

WITAMINA C A AKTYWNOŚĆ DIOKSYGENAZ ZALEŻNYCH OD JONÓW ŻELAZA I 2-KETOGLUTARANU

Region odpowiedzialny za aktywność katalityczną dioksygenaz uzależnionych od jonów żelaza i 2-ketoglutaranu ma umiejscowioną na C-końcu domenę DSBH (double stranded β helix). Struktury DSBH są obecne w hydrok-

Tabela 1. Dioksygenazy zależne od jonów żelaza i 2-ketoglutaranu

Rodzina enzymów	Funkcja	Enzym	Substrat
regulacja epigenetyczna			
JMJC	demetylaza histonów	KDM2 (JHDM1)	H3K36me1/me2 (histon H3)
		KDM3 (JHDM2/JMJD1)	H3K9me1/me2 (histon H3)
		KDM4 (JHDM3/JMJD2)	H3K9me2/me3, H3K36me2/me3 (histon H3)
		KDM5 (JARID1)	H3K4me1/me2/me3 (histon H3)
		KDM6 (JMJD3, UTX)	H3K27me3/me2 (histon H3)
		KDM7 (PHF2/PHF8)	H3K9me1/me2, H3K27me2 (histon H3); H4K20me1 (histon H4)
		KDM8 (JMJD5)	H3K36me2 (histon H3)
TET	demetylaza DNA	TET1, TET2, TET3	5-mC, 5-hmC, 5-fC (DNA)
ABH	demetylaza DNA	ALKBH2	1-meA, 3-meC (dsDNA)
		ALKBH3	1-meA, 3-meC (ssDNA/RNA)
		FTO	3-meT (ssDNA)
regulacja nieepigenetyczna			
PHD	hydroksylaza prolinowe	PHD1, PHD2, PHD3	prolina (HIF-1)
FIH	hydroksylaza asparaginylowa	FIH-1	asparagina (HIF-1)
C-P3H	hydroksylaza 3-prolinowe	P3H1, P3H2, P3H3	prolina (prokolagen)
C-P4H	hydroksylaza 4-prolinowe	P4HA1, P4HA2, P4HA3	prolina (prokolagen)
PLOD	hydroksylaza lizylowa	PLOD1, PLOD2, PLOD3	lizyna (prokolagen)

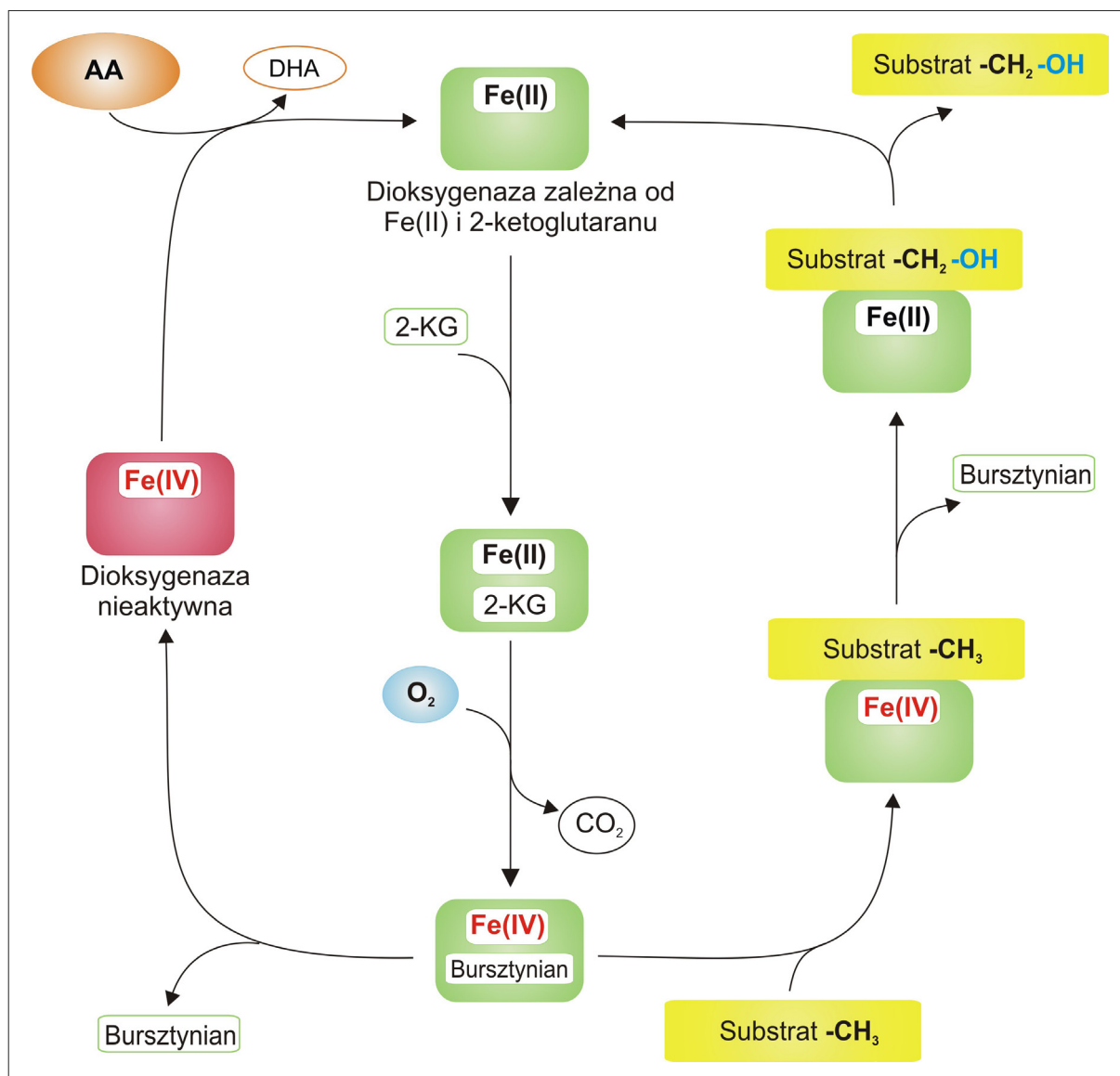
Na podstawie [28,38,43,51,52].

sytlazach prolinowych i lizynowych, ale zostały również zidentyfikowane w białkach enzymatycznych uczestniczących w regulacji epigenetycznej. Do białek tych należą m.in. demetylaza histonów z rodziny Jumonji, białka TET odpowiedzialne za demetylację DNA, a także białka demetylujące DNA/RNA należące do rodziny AlkB (tabela 1). DBSH zawiera osiem nici β oraz triadę wiążącą jony Fe(II), która składa się z dwóch reszt histydyliny oraz reszty asparaginianowej lub glutaminianowej [33,43,62].

W reakcji katalizowanej przez dioksygenazy zależne od Fe(II) i 2-ketoglutaranu jeden z atomów cząsteczki tlenu zużywany jest do oksydatywnej dekarboksylacji 2-ketoglutaranu, w wyniku której dochodzi do powstania cząsteczki bursztynianu i dwutlenku węgla oraz do utlenienia Fe(II) do Fe(IV). Drugi atom tlenu jest wykorzystywany do hydroksylacji grupy alkilowej substratu. Po uwolnieniu bursztynianu jon żelaza zostaje zredukowany ponownie do Fe(II). W przypadku braku substratu dochodzi do uwolnienia bursztynianu bez redukcji Fe(IV), co powoduje inaktywację enzymu. Kwas askorbinowy przez dostarczenie elektronów redukuje Fe(IV) do Fe(II), jednocześnie utleniając się do kwasu dehydroaskorbinowego. Funkcją AA jest zatem przywrócenie katalitycznej aktywności enzymu przez utrzymywanie prawidłowego stanu utlenienia jonów żelaza [43,59] (ryc. 2).

DEMETYLAZY HISTONÓW

Białka z rodziny Jumonji to demetylaza zawierająca domenę JmjC, które uczestniczą w demetylacji reszt lizynowych białek histonowych. W przeciwieństwie do demetylaz LSD (lysine-specific demethylase), które mogą usuwać grupę metylową z mono- i dimetylowanej lizyny z udziałem dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD) jako kofaktora, enzymy zawierające domenę JmjC (JHDMs, JmjC-domain-containing histone demethylase) są także zdolne do demetylowania trimetylowanych reszt lizynowych, a kofaktorami tej reakcji są jony żelaza (II) oraz 2-ketoglutaran [43,69]. Demetylaza histonów z rodziny Jumonji katalizują usuwanie grup metylowych z reszt lizynowych białek histonowych w dwóch etapach. Najpierw przebiega reakcja hydroksylacji w obecności Fe(II) i 2-KG. Za aktywność hydroksylazową odpowiada domena JmjC zawierająca resztę glutaminianu i dwie reszty histydyliny, które wiążą jon żelaza. Po związaniu kofaktora przez domenę JmjC jon żelaza ulega utlenieniu i powstaje reaktywny intermediat, który przeprowadza hydroksylację lizyny. Następnie dochodzi do spontanicznej eliminacji formaldehydu, co powoduje usunięcie grupy metylowej z ogona histonu [43,69] (ryc. 3). Zhang i wsp. wykazali, że do optymalnej aktywności katalitycznej Jhdm3a (Jmjd2a) jest wyma-

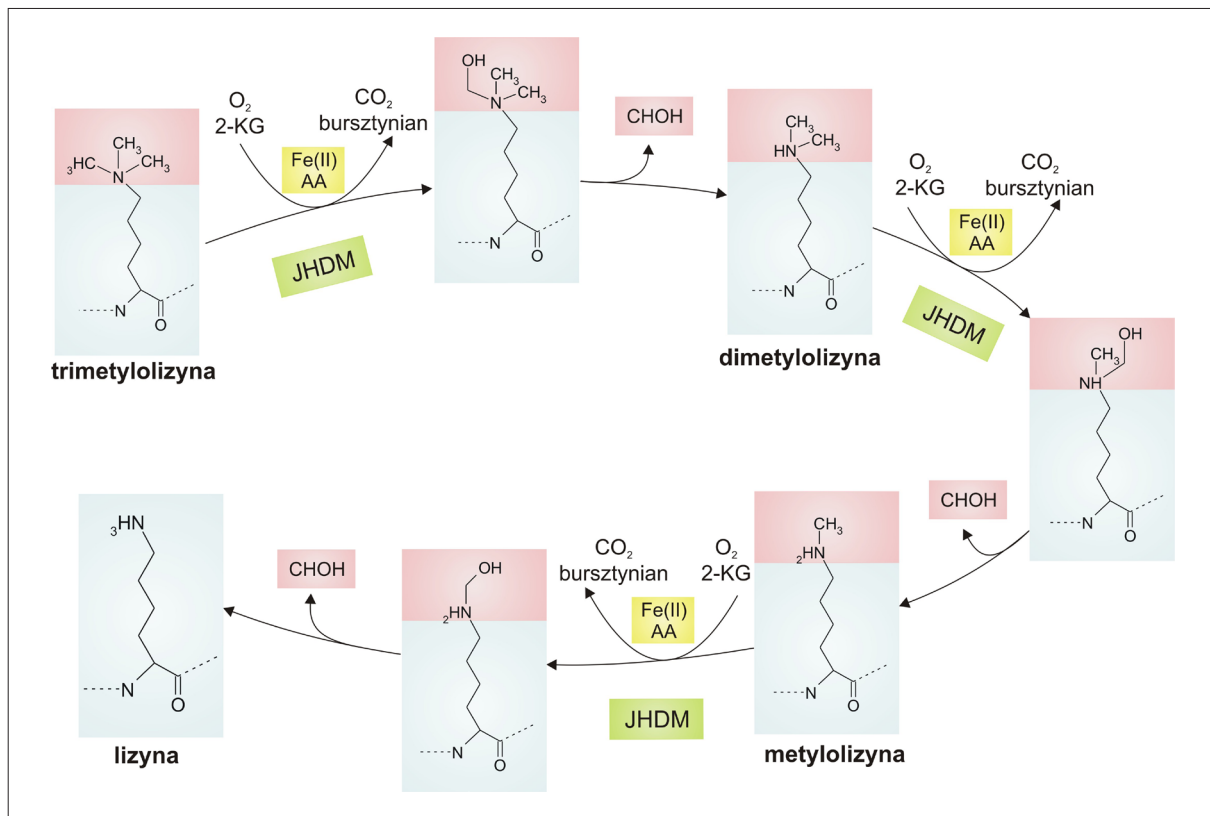


Ryc. 2. Schemat reakcji katalizowanej przez dioksygenazy zależne od Fe(II) i 2-ketoglutaranu (na podstawie [43], zmodyfikowane)

gana obecność kwasu askorbinowego, a w warunkach *in vitro* po usunięciu askorbinianu zostaje zahamowana demetylacja H3K9me3 i H3K36me3 z udziałem tej demetylasy [29]. Badania, w których analizowano modyfikacje chromatyny podczas reprogramowania wykazały, że istotną rolę w procesie demetylacji H3K36me_{2/3} odgrywają demetylasy histonów Jhdm1a i Jhdm1b zależne od witaminy C. Zaobserwowano, że dodanie witaminy C do kultur komórkowych mysich fibroblastów obniżało poziom dimetylowanej i trimetylowanej lizyny 36 histonu H3, natomiast po jej usunięciu z mediów hodowlanych stopień metylacji reszt lizynowych powracał do stanu początkowego. Sugeruje to, że witamina C moduluje metylację H3K36 w sposób odwracalny [64].

BIAŁKA RODZINY ALKB

Białka AlkB wykazują homologię do hydroksylaz zależnych od Fe(II) i 2-KG. Odgrywają rolę w mechanizmie bezpośredniej naprawy DNA bez naruszenia ciągłości nici kwasu nukleinowego. Usuwiają grupy metylowe w pozycjach N1-puryn i N3-pirymidyn w DNA i RNA w wyniku oksydacyjnej demetylacji. Dioksygenazy AlkB katalizują reakcję utleniania grupy metylowej dołączonej do zasady azotowej, a to destabilizuje wiązanie między węglem grupy metylowej a atomem azotu zasady. Powoduje odłączenie grupy metylowej w postaci formaldehydu z odtworzeniem wyjściowego, nieuszkodzonego nukleotydu. Mechanizm jest podobny do demetylowania przez JHMD, chociaż enzymy AlkB mają dodatkowe



Ryc. 3. Mechanizm demetylacji histonów (na podstawie [40,69], zmodyfikowane)

domeny wiążące się z kwasami nukleinowymi, dzięki czemu zasady azotowe zostają wyciągane na zewnątrz helisy DNA stając się dostępnymi dla przebiegu katalizy enzymatycznej [43].

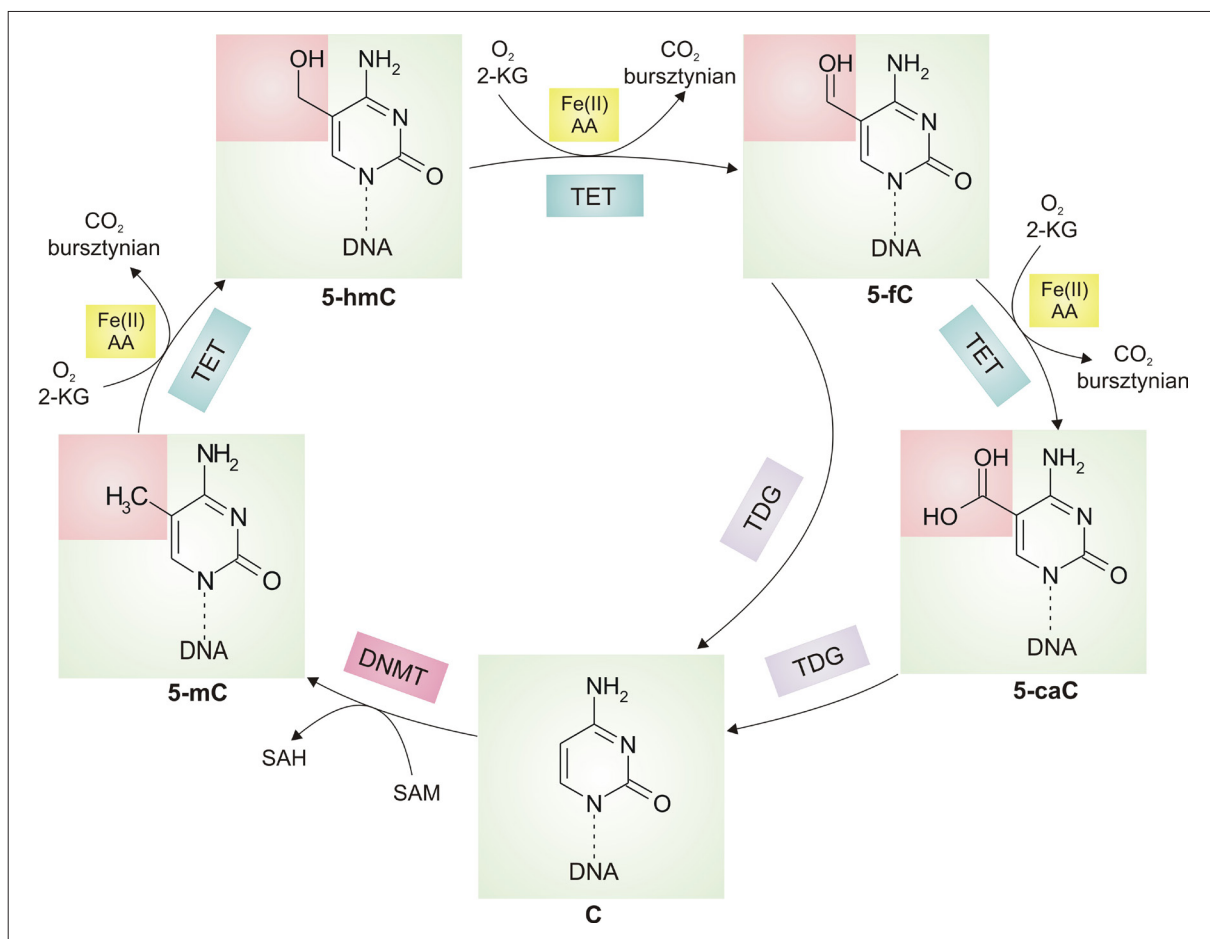
U ssaków zidentyfikowano dziewięć białek homologicznych do bakteryjnego białka AlkB: ALKBH1-8 oraz białko FTO. Najlepiej poznano: ALKBH2, ALKBH3 i FTO; dla ALKBH2, ALKBH3 potwierdzono aktywność enzymatyczną wobec alkilacyjnie modyfikowanych zasad azotowych, tj. 3-metylocytozyny i 1-metyloadeniny, a w przypadku FTO wykazano taką aktywność wobec 3-metylotyminy w DNA. ALKBH2 ujawnia silną preferencję do dwuniciowego DNA oraz niewielkie powinowactwo do RNA, natomiast ALKBH3 wykazuje preferencję w stosunku do ssDNA, a także dość efektywnie uczestniczy w demetylacji RNA [19]. Przypuszcza się, iż białka ALKBH mogą być zaangażowane w inne procesy niż naprawa DNA czy RNA. W przypadku ALKBH1 wskazuje się na znaczenie tego białka w rozwoju łożyska u myszy oraz regulacji epigenetycznej. Wykazano, że jest umiejscowione w jądrze komórkowym, we frakcji euchromatyny, gdzie oddziałuje z białkiem Mrj, które pośredniczy w represji genów przez rekrutację deacetylazy histonu (HDAC4). ALKBH1 konkuruje o wiązanie z Mrj zakłócając jego interakcję z HDAC. W przypadku braku ALKBH1 białko Mrj nasila rekrutację kompleksów deacetylaz w rejon promotora, czego skutkiem jest wyciszenie transkrypcji regulowanych genów [47]. Kolejne badania

sugerują, że dioksygenaza ALKBH1 jest zaangażowana w rozwój układu nerwowego przez modyfikowanie stanu metylacji histonu H2A [45].

BIĄŁKA TET

Białka TET 1-3 biorą udział w aktywnej demetylacji DNA przez utlenienie 5-metylocytozyny (5-mC) do 5-hydroksymetylocytozyny (5-hmC), która może być dalej utleniana do 5-formylocytozyny (5-fC) i 5-karboksycytozyny (5-caC) [10,49]. Następnie na ścieżce naprawy typu BER z udziałem glikozydazy TDG dochodzi do usunięcia 5-fC oraz 5-caC i zastąpienia cytozyną, czego skutkiem jest demetylowany DNA [5,31]. Najnowsze badania wskazują, że białka TET mogą również uczestniczyć w wytwarzaniu 5-hydroksymetylouracylu (5-hmU) z tyminy podczas różnicowania mysich embrionalnych komórek macierzystych [48]. Innym źródłem 5-hmU może być też deaminacja 5-hmC z udziałem białek AID/APOBEC, przy czym niektóre badania sugerują, że białka AID/APOBEC preferencyjnie deaminują niezmodyfikowaną cytozynę [44]. 5-HmU powstały w komórkowym DNA jest rozpoznawany i wycinany przez glikozylazę TDG, MBD4 lub SMUG1 [2,5].

Wszystkie białka TET zawierają niezbędną do aktywności katalitycznej strukturę β heliksu (DSBH) wiążącą Fe(II) i 2-ketoglutaran. TET1 i TET3 zawierają ponadto domenę o strukturze palca cynkowego ułatwiającą



Ryc. 4. Mechanizm demetylacji DNA (na podstawie [26,31,69], zmodyfikowane)

interakcje z innymi białkami i DNA [10]. Białka TET katalizują utlenienie grupy metylowej w pozycji 5 pierścienia pirymidynowego cytozyny. Przyłączenie grupy hydroksylowej do wiązania węgiel-węgiel jest stabilne, w związku z czym nie dochodzi do spontanicznej eliminacji powstałej grupy hydroksymetylowej, jak w reakcji katalizowanej przez demetylaza histonów [43] (ryc. 4).

Białka TET należą do rodziny dioksygenaz wymagających do aktywności jonów Fe(II) i 2-ketoglutaranu. Potwierdzają to badania, w których wykazano, że zmutowane warianty białek TET, z mutacją w domenie katalitycznej w obrębie miejsca wiązania Fe(II), nie przekształcają 5-mC do 5-hmC w przeciwieństwie do wariantów dzikich [27]. 2-KG jest intermedyatem cyklu Krebsa, produktem reakcji katalizowanej przez dehydrogenazy izocytrynianowe (IDHs, isocitrate dehydrogenases) [4].

Mutacje w genach *IDH1* (izoformy cytoplazmatycznej) i *IDH2* (izoformy mitochondrialnej) są związane z obniżoną zawartością 5-hmC w DNA. Zmutowane formy IDH katalizują reakcję, której produktem jest D-2-hydroksyglutaran (2-HG) zamiast 2-ketoglutaranu. 2-HG jest tzw. onkometabolitem, jego zawartość wzrasta w komórkach nowotworowych z mutacją *IDH* [11,26]. Związek

ten, ze względu na podobieństwo strukturalne, konkuruje z 2-KG o wiązanie się w centrum aktywnym, co może spowodować hamowanie aktywności dioksygenaz, w tym białek TET, a to zaburza proces aktywnej demetylacji [67,69].

W wielu niezależnych badaniach prowadzonych na kulturach komórkowych oraz modelach zwierzęcych wykazano, że niezbędnym czynnikiem dla dioksygenaz TET jest kwas askorbinowy. Obecność AA nasila aktywność enzymów TET powodując zwiększenie poziomu produktów utleniania 5-mC, co wskazuje na jego rolę w modulacji procesu aktywnej demetylacji DNA [3,7,12,41,68].

Badania prowadzone na mysich zarodkowych fibroblastach (MEF, mouse embryonic fibroblasts) z wykorzystaniem techniki dot-blot wykazały, że brak kwasu askorbinowego w podłożach hodowlanych wiązał się z bardzo małą zawartością 5-hmC, a jego obecność w stężeniach 1-1000 μ M powodował ponad 4-krotny wzrost poziomu 5-hmC, przy czym nie odnotowano istotnych zmian w ekspresji genów *Tet*. Po dodaniu kwasu askorbinowego do MEF z wyciszoną ekspresją genów *Tet* za pomocą siRNA, obserwowano niższy poziom 5-hmC w porównaniu do komórek kontrolnych [41]. Podobnie

suplementacja witaminą C hodowli mysich embrionalnych komórek macierzystych (ESC, embryonic stem cells) powodowała wzrost aktywności białek Tet i jednoczesny wzrost poziomu 5-hmC, a w następstwie demetylację promotorów wielu genów i wzrost ich ekspresji. W ESC ze znokautowanymi genami *Tet1* i *Tet2* (*Tet1*^{-/-}/*Tet2*^{-/-}) odnotowano obniżoną zawartość 5-hmC w sekwencjach promotorowych w porównaniu do typu dzikiego, a poddanie ich działaniu witaminy C nie wywoływało istotnych zmian w poziomie 5-hmC, jak również nie wpłynęło na ekspresję genów [3]. W innym eksperymencie do ilościowych oznaczeń produktów enzymatycznego utleniania 5-mC zastosowano technikę chromatografii cieczowej z tandemową detekcją mas (UPLC-MS/MS). Wykazano, że dodanie do hodowli ESC kwasu askorbinowego do stężenia 100 μM skutkuje, podobnie jak w poprzednich badaniach, prawie 4-krotnym wzrostem zawartości 5-hmC, ale także wpływa na wzrost poziomu dalszych produktów aktywnej demetylacji DNA: 5-fC około 10-krotnie i 5-caC około 20-krotnie, przy czym efektu tego nie zaobserwowano w komórkach *Tet1*^{-/-}/*Tet2*^{-/-} [68]. Podobne wyniki z zastosowaniem techniki 2D-UPLC-MS/MS i użyciem standardów wewnętrznych znakowanych stabilnymi izotopami, uzyskał zespół Katedry Biochemii Klinicznej CM UMK na linii komórek raka jelita grubego (HCT 116). Wykazano, że wzbogacenie podłoża hodowlanych kwasem askorbinowym do stężenia 100 μM wiązało się z około 10-krotnym wzrostem poziomu 5-fC i 3,2-krotnym wzrostem poziomu 5-hmU, a do stężenia 1 mM około 25-krotnym wzrostem poziomu 5-fC i 18,5-krotnym wzrostem poziomu 5-hmU w komórkowym DNA. Po 48 godzinach od usunięcia AA z mediów zawartość tych modyfikacji spadała do obserwowanej w komórkach kontrolnych. W przypadku 5-hmC odnotowano ponad 3-krotny wzrost jej zawartości, zarówno w komórkach hodowanych w obecności AA o stężeniu 100 μM jak i 1 mM, ale również już 10 μM. Stabilny, około 2-2,5 razy wyższy poziom 5-hmC w DNA komórek utrzymywał się nawet po dwóch dobach od usunięcia AA z pożywek. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że fizjologiczne stężenie askorbinianu w surowicy krwi (10-100 μM) jest wystarczające do utrzymania stabilnego poziomu 5-hmC w DNA, która odgrywa istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórki. W przypadku 5-fC i 5-caC potrzebne są wyższe stężenia kwasu askorbinowego (około 100 μM w środowisku komórkowym lub około 1 mM wewnątrz komórki), aby osiągnąć trwałe zwiększenie zawartości tych modyfikacji, być może potrzebne do zainicjowania procesu aktywnej demetylacji DNA [42]. Niezrozumiałe jest dlaczego obecność AA sprzyja znacznemu wzrostowi poziomów 5-fC i 5-caC, a 5-hmC tylko w stopniu umiarkowanym oraz w jaki sposób regulowane jest działanie enzymów TET, to znaczy dlaczego czasami produktem końcowym reakcji katalizowanych przez TET jest 5-hmC, a innym razem, w wyniku iteraktywnych *Tet2*^{-/-} procesów utleniania powstają jej pochodne 5-fC lub 5-caC. Prawdopodobnym wyjaśnieniem może być odmienne powinowactwo dioksygenaz TET do 5-mC, 5-hmC i 5-fC [66] oraz rozpoznawanie powstałych modyfikacji cytozyny przez różne białka i czynniki regulujące transkrypcję [56]. Nie wiadomo także, co decyduje o przy-

łączeniu się białek TET do tyminy i formowaniu 5-hmU. Możliwe, że duże wewnątrzkomórkowe stężenie askorbinianu jest wymagane do utrzymania aktywności białek TET, sprzyjającej generowaniu 5-fC, 5-caC i 5-hmU.

Badania prowadzone na hodowlach MEF, oprócz wzrostu poziomu 5-hmC w obecności AA, wykazały, że uzupełnienie podłoża hodowlanego jeszcze o jony żelaza lub glukozę, stanowiącą prekursor do wytwarzania 2-KG, nie wpływa na zmianę ilości powstającej 5-hmC. Dowiedziono też, że suplementacja mediów hodowlanych kwasem askorbinowym nie zmienia poziomu ekspresji genów *Tet1*, *Tet2*, *Tet3* oraz *IDH1* i *IDH2*. Zaobserwowano natomiast, że w hodowlach wzbogaconych o AA zablokowanie transporterów SVCT przez sulfinyprazon wiązało się z obniżonym poziomem 5-hmC, przy czym nie odnotowano tego w przypadku zablokowania transporterów GLUT. Wyniki tych badań wskazują, że powstawanie 5-hmC wymaga wewnątrzkomórkowej obecności kwasu askorbinowego, natomiast jest niezależne od komórkowego wychwytu żelaza, zwiększonej ekspresji *Tet* lub *IDH*, czy wytwarzania 2-KG [12].

Wyniki kilku niezależnych eksperymentów *in vitro* [3,12,41] wykazały, że kwas askorbinowy nie zmienia ekspresji *Tet*, sugerując, że jest raczej niezbędny do prawidłowej aktywności enzymatycznej dioksygenaz *Tet*. Zaobserwowano, że inne związki mające właściwości redukujące, takie jak: glutation, DTT, spermidyna, NADPH, L-cysteina, witaminy B1, E, nie mają wpływu na aktywność białek *Tet*, a przez to na poziom produktów oksydacji 5-mC [3,41,68]. Wskazuje to, że kwas askorbinowy pełni rolę swojego kofaktora dioksygenaz *Tet*, który nie może być zastąpiony innym czynnikiem redukującym, ale sugeruje również, że pozytywny wpływ na aktywność *Tet* nie wynika tylko z jego właściwości przeciwutleniających. Oprócz roli kwasu askorbinowego w utrzymaniu jonów żelaza na drugim stopniu utlenienia wykazano też, że może bezpośrednio oddziaływać z C-końcową domeną katalityczną białek *Tet*. Oddziaływanie to prawdopodobnie zmienia konformację domeny, stymulując aktywność katalityczną enzymów *Tet* i powodując wzrost poziomu produktów utleniania 5-metylocytozyny [68]. Interakcja kwasu askorbinowego z białkami *Tet* być może wpływa również na ich funkcje. Sugerują to wyniki badań, wskazujące, że witamina C moduluje funkcje TET1 na poziomie komórkowym [7].

Korzystny wpływ witaminy C na aktywność białek *Tet* wykazano również *in vivo*. Suplementacja kwasem askorbinowym homozygotycznych myszy pozbawionych genu *Gulo*, kodującego oksydazę L-gulonolaktonową, powodowała istotne obniżenie zawartości 5-mC i jednoczesny wzrost 5-hmC w wątrobie, płucach i mózgu [68].

ROLA WITAMINY C W REPROGRAMOWANIU EPIGENETYCNYM

Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPSCs, induced pluripotent stem cells), to komórki uzyskane przez przeprogramowanie zróżnicowanych

komórek somatycznych. Za utrzymanie stanu pluripotencji jest odpowiedzialnych wiele czynników m.in. Oct-4, Sox2, Nanog. Proces reprogramowania jest inicjowany przejściem mezenchymalno-nabłonkowym (MET, mesenchymal-to-epithelial transition), w czasie którego komórki pochodzenia mezenchymalnego nabierają fenotypu komórek nabłonkowych, tracą ruchliwość aktywując syntezę białek adhezji międzykomórkowej, a jednocześnie dochodzi do wyciszenia w nich ekspresji genów markerów mezenchymalnych [34].

Wyniki kilku badań wskazują, że istotną rolę w procesie reprogramowania może odgrywać witamina C [17]. Wykazano, że obecność witaminy C poprawia szybkość i wydajność generowania iPSCs zarówno z mysich jak i ludzkich komórek somatycznych. Jej dodatek do pożywki hodowlanej ułatwia przekształcenie komórek pre-iPS w ostatecznie reprogramowane komórki iPSC [18]. Etap ten wydaje się kluczowy w reprogramowaniu, gdyż podczas niego w komórce dochodzi do wyciszenia ekspresji genów charakterystycznych dla komórek zróżnicowanych oraz indukcji ekspresji genów warunkujących pluripotencję. Odpowiadają za to dokładnie kontrolowane mechanizmy epigenetyczne regulujące stan metylacji DNA oraz modyfikacji histonów. Komórki, w których procesy te przebiegają nieprawidłowo zostają zablokowane w stadium pre-iPS. Zaobserwowano, że barierą podczas reprogramowania komórek somatycznych w iPSC jest metylacja H3K9 [8]. Występowanie tej modyfikacji powoduje formowanie chromatyny nieaktywnej i jest charakterystyczne dla komórek zróżnicowanych, w których indukuje wyciszenie genów pluripotencji [22]. Wykazano, że kwas askorbinowy znacząco zwiększa tempo i jakość reprogramowania komórek wpływając na stan metylacji H3K9 w *loci* pluripotencji. Obecność witaminy C powoduje obniżenie stopnia tri – i dimetylowania H3K9 przez oddziaływanie na demetylasy Jmjd1 i Jmjd2, ułatwiając przejście pre-iPSC w iPSC [8]. Wyniki wcześniejszych badań wykazały, że witamina C sprzyja reprogramowaniu wpływając również na obniżenie poziomu metylacji lizyny 36 histonów H3 (H3K36), najprawdopodobniej regulując aktywność demetylaz histonowych Jhdm1a i Jhdm1b, działając jako ich kofaktor [64]. Niedawne badania wskazują, że witamina C przyczynia się do zmniejszenia częstości spontanicznego różnicowania się iPSC oraz wspomaga utrzymanie ich pluripotencji m.in. przez wpływ na poziom ekspresji demetylasy JARID1A, która uczestniczy w demetylacji H3K4me2/3 [14].

Kwas askorbinowy może polepszać wydajność i dokładność procesu reprogramowania również przez utrzymanie prawidłowego wzoru piętna genomowego w klastrze genów Dlk1-Dio3 [57]. Obecność kwasu askorbinowego w medium hodowlanym podczas reprogramowania MEF hamuje wyciszenie genów z allele matczynego, które w ESC nie są metylowane i ulegają ekspresji. Wykazano, że AA zapobiega utracie acetylacji histonu H3 oraz stymuluje trimetylację H3K4 zapewniając otwartą konformację chromatyny, co wstrzymuje

rekrutację metylotransferazy Dnmt3a, dając prawidłowo utrzymywany imprinting Dlk1-Dio3, charakterystyczny dla ESC [57].

Kwas askorbinowy może również odgrywać rolę w różnicowaniu komórek. Wykazano jego udział w procesie dojrzewania limfocytów T, co sugeruje jego epigenetyczną rolę w regulowaniu funkcji immunologicznych [37]. Najnowsze doniesienia wskazują, że witamina C przez wzmacnianie działania białek TET uczestniczy w regulowaniu ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxp3, zaangażowanego w rozwój i funkcjonowanie regulatorowych limfocytów T (Treg), które odpowiadają za utrzymanie homeostazy układu odpornościowego [53,70].

EPIGENETYCZNA ROLA WITAMINY C W ROZWOJU EMBRYONALNYM

Mimo że wszystkie białka TET wykazują zdolność utleniania 5-mC, poziomy ich ekspresji są bardzo różne w różnych rodzajach komórek i tkanek. TET1 i TET2 ulegają silnej ekspresji w embrionalnych komórkach macierzystych, natomiast poziom ekspresji TET3 jest stosunkowo wysoki w oocytach oraz zygotach tuż po zapłodnieniu i ulega spadkowi na kolejnych etapach rozwoju embrionalnego [58,71]. U ssaków podczas wczesnych etapów rozwoju zarodkowego następuje epigenetyczne przeprogramowanie, które obejmuje demetylację i remetylację DNA matczynego oraz ojcowskiego, z wyjątkiem sekwencji podlegających piętnowaniu. Bezpośrednio po zapłodnieniu przedjądrzy genom ojcowski przechodzi natychmiastową demetylację, niezależną od podziałów zygoty. 5-Metylocytozyna zostaje szybko zastąpiona 5-hmC w wyniku utleniania przez TET3. Natomiast genom matczyny ulega demetylacji pasywnej, stopniowo podczas pierwszych podziałów komórkowych przez zahamowanie Dnmt1[71]. Późniejsze doniesienia wskazują jednak, że chromatyna matczyna, podobnie jak ojcowska, może ulegać aktywnej demetylacji od zygoty do 4-komórkowego zarodka [63]. Nowy wzór metylacji jest nanoszony z udziałem Dnmt3a/3b w stadium blastocysty tuż po implantacji zarodka [71].

Druga runda epigenetycznego przeprogramowania zachodzi w pierwotnych komórkach rozrodczych (PGC, primordial germ cells), w której również uczestniczą białka TET. DNA PGC ulega globalnej demetylacji, łącznie z wymazaniem wzoru genomowego piętna rodzicielskiego. Na tym etapie TET1 i TET2 ulegają ekspresji na dość wysokim poziomie [31,71]. Biorąc pod uwagę, że prawidłowe funkcjonowanie białek TET wymaga obecności witaminy C, jej dostępność może warunkować poprawny przebieg demetylacji DNA w rozwoju embrionalnym, wpływać zarówno na epigenetyczne przeprogramowanie komórek rozrodczych, jak i rozwijającego się zarodka. Wykazano, że witamina C indukuje globalną demetylację CpG w ludzkich komórkach embrionalnych [9]. Badania *in vitro* wskazują, że jej obecność jest niezbędna w procesie demetylowania DNA embrionalnych komórek macierzystych przez indukcję TET1 i TET2 [3,9].

Ponadto wykazano, że kwas askorbinowy odgrywa rolę w utrzymaniu prawidłowego wzoru metylacji i ekspresji genów imprintowanych w regionie Dlk1-Dio3 [21,57]. Możliwe jest zatem, że niedostateczna podaż witaminy C w czasie ciąży może zaburzać piętnowanie genomowe, co może rzutować na prawidłowy rozwój postnatalny [17]. Dane dotyczące wpływu kwasu askorbinowego na dynamikę procesów metylacji i demetylacji podczas rozwoju embrionalnego są wciąż dość skąpe. Niektóre doniesienia sugerują jednak, że niedobór AA u kobiet podczas ciąży prowadzi do jego niedoboru u płodu, który może spowodować nieprawidłowy rozwój embrionalny [54]. Wykazano, że zmiany w genach kodujących SVCT1 i SVCT2, które mogą wpływać na wewnątrzkomórkowy poziom askorbinianu, są związane z ryzykiem przedwczesnego porodu [15].

EPIGENETYCZNA ROLA WITAMINY C W NOWOTWORACH

W przeciwieństwie do stosunkowo wysokiego poziomu 5-hmC wykrywanego w zarodkach, zwłaszcza w stadium przedimplantacyjnym oraz w pierwotnych komórkach rozrodczych (PGC), komórki nowotworowe charakteryzują się bardzo niskim lub niewykrywalnym poziomem 5-hmC. Utrata 5-hmC jest nową epigenetyczną cechą większości typów ludzkich nowotworów [10,32,35]. Możliwymi mechanizmami zmniejszającymi zawartość 5-hmC w DNA komórek nowotworowych są:

- mutacje w genach *TET*; np. mutacje *TET2*, upośledzają aktywność katalityczną białek enzymatycznych, a w konsekwencji obniżają zawartość 5-hmC w DNA genomowym nowotworów mieloidalnych, m.in. ostrej białaczki szpikowej [30];
- mutacje w genach *IDH*, które prowadzą do wytwarzania 2-HG zamiast 2-KG, będącego inhibitorem kompetycyjnym białek TET [60,67];
- obniżona ekspresja *TET* lub *IDH* [35].

Niedobór AA może również wpływać na aktywność enzymatyczną białek TET, powodując zmniejszenie ilości 5-hmC.

Wykazano, że zmienność genu *SLC23A1* kodującego SVCT1 oraz *SLC23A2* kodującego SVCT2 jest związana z ryzykiem rozwoju niektórych typów nowotworów, m.in. gruczolaka jelita grubego [16], raka pęcherza [23], raka żołądka [65], chłoniaka nieziarniczego [55]. Mutacje SF3B1, czynnika odpowiedzialnego za splicing RNA, zidentyfikowano w przewlekłej białaczce limfocytowej i czerniaku tęczówki, jak również innych nowotworach. Mutant SF3B1 uczestniczy w alternatywnym splicingu *SLC23A2* dając skróconą izoformę transportera SVCT2, która może prowadzić do niedoboru askorbinianu wewnątrz komórek nowotworowych [20,50]. Od dawna w wielu doniesieniach wskazuje się na istotną rolę kwasu askorbinowego w prewencji i leczeniu raka. Idea zastosowania AA w terapii przeciwnowotworowej zakłada, że w wysokich stężeniach, w obecności jonów metali przejściowych może wykazywać aktywność prooksydacyjną.

Uważa się, że farmakologiczne stężenia askorbinianu mogą działać cytotoksycznie na komórki nowotworowe, co wiąże się z wytwarzaniem nadtlenu wodoru podczas jego autooksydacji. Zastosowanie farmakologicznych dawek witaminy C w terapii przeciwnowotworowej pozostaje jednak kontrowersyjne z powodu odmiennych wyników kilku badań klinicznych. Niemniej eksperymenty na modelach zwierzęcych wykazały hamujący wpływ askorbinianu na wzrost guzów nowotworowych [13]. Będąc przedmiotem ostatnich badań rola witaminy C w epigenetycznej modulacji aktywności genów może dostarczyć nowych informacji na ten temat. Wykazano, że w komórkach raka piersi i raka stercza obniżona ekspresja TET1 jest związana ze wzrostem inwazyjności, rozrostem guza oraz szybszym przerzutowaniem [25]. Zaobserwowano, że nadekspresja TET2 w komórkach czerniaka powoduje wzrost poziomu 5-hmC, częściowo odtwarzając profil 5-hmC charakterystyczny dla prawidłowych melanocytów, a to jest związane ze zmniejszeniem inwazyjności raka [35]. Wyniki te sugerują, że czynnik pozwalający na przywrócenie prawidłowego poziomu 5-hmC w komórkach nowotworowych może odgrywać potencjalną rolę w zwalczaniu tych nowotworów. Ponieważ niemożliwe jest kliniczne wywołanie nadekspresji TET lub IDH u pacjentów, alternatywną terapeutyczną maksymalizującą działanie białek TET wydaje się zastosowanie witaminy C, która jako kofaktor dioksygenaz może wzmacniać aktywność katalityczną białek TET występujących w komórkach nowotworowych. Wyniki niedawno opublikowanych badań wskazują, że kwas askorbinowy obecny w hodowlach komórek czerniaka w fizjologicznym stężeniu (0,1 mM) indukuje wzrost zawartości 5-hmC do poziomu obserwowanego w zdrowych melanocytach, który jest porównywalny z efektem wywołanym nadekspresją TET2. Zaobserwowano ponadto, że AA wpływa na zmniejszenie złośliwości komórek czerniaka w stadium przerzutowym przez hamowanie ich migracji i wzrostu [24]. Niezbędne są jednak dalsze badania, które pozwolą ocenić udział kwasu askorbinowego w przeprogramowaniu komórek nowotworowych przez wpływ na aktywność białek TET oraz demetylaz histonów zawierających domenę JmjC.

PODSUMOWANIE

Badania ostatnich lat prowadzone w zakresie epigenetyki wskazują na istotną rolę witaminy C w demetylacji DNA i histonów. Kwas askorbinowy działa prawdopodobnie jako kofaktor TET i niektórych demetylaz histonów redukując utlenioną formę żelaza do Fe(II) niezbędnego do katalitycznej aktywności tych enzymów. Nie wyklucza się jednak bezpośredniego oddziaływania AA z tymi białkami enzymatycznymi. Przez regulację epigenomu, AA może być zaangażowany w rozwój embrionalny, postnatalny, starzenie się, jak również rozwój niektórych chorób, przede wszystkim nowotworów złośliwych. Niedobór witaminy C, może zatem zaburzyć dynamikę procesów metylacji i demetylacji DNA oraz histonów, co może się przyczynić do zmian fenotypowych. Zawartość askorbinianu wewnątrz komórki, a dokładniej wewnątrz

jądra komórkowego stanowi pulę witaminy C dostępnej m.in. dla dioksygenaz zależnych od Fe(II) i 2-KG. Jednak poziom askorbinianu w jądrze pozostaje nieznan. W większości opublikowanych dotychczas badaniach oceniano głównie stężenie AA w surowicy lub osoczu krwi. Nie wiadomo również, czy obecne zalecenia dotyczące suplementacji witaminą C są odpowiednie do

zapewnienia prawidłowej aktywności białek TET oraz demetylaz histonów w różnych tkankach i na różnych etapach rozwoju organizmu człowieka. Zasadne wydaje się zatem podjęcie badań dotyczących roli witaminy C w aspekcie epigenetycznym wykraczających poza modele komórkowe i zwierzęce.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Bánhegyi G., Benedetti A., Margittai E., Marcolongo P., Fulceri R., Nemeth C.E., Szarka A.: Subcellular compartmentation of ascorbate and its variation in disease states. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014; 1843: 1909-1916
- [2] Bian E.B., Zong G., Xie Y.S., Meng X.M., Huang C., Li J., Zhao B.: TET family proteins: new players in gliomas. *J. Neurooncol.*, 2014; 116: 429-435
- [3] Blaschke K., Ebata K.T., Karimi M.M., Zepeda-Martinez J.A., Goyal P., Mahapatra S., Tam A., Laird D.J., Hirst M., Rao A., Lorincz M.C., Ramalho-Santos M.: Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature*, 2013; 500: 222-226
- [4] Branco M.R., Ficz G., Reik W.: Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nat. Rev. Genet.*, 2011; 13: 7-13
- [5] Cadet J., Wagner J.R.: TET enzymatic oxidation of 5-methylcytosine, 5-hydroxymethylcytosine and 5-formylcytosine. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 2014; 764-765: 18-35
- [6] Camarena V., Wang G.: The epigenetic role of vitamin C in health and disease. *Cell Mol. Life Sci.* 2016; 73: 1645-1658
- [7] Chen J., Guo L., Zhang L., Wu H., Yang J., Liu H., Wang X., Hu X., Gu T., Zhou Z., Liu J., Liu J., Wu H., Mao S.Q., Mo K. i wsp.: Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming. *Nat. Genet.*, 2013; 45, 1504-1509
- [8] Chen J., Liu H., Liu J., Qi J., Wei B., Yang J., Liang H., Chen Y., Chen J., Wu Y., Guo L., Zhu J., Zhao X., Peng T., Zhang Y. i wsp.: H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Nat. Genet.*, 2013; 45: 34-42
- [9] Chung T.L., Brena R.M., Kollé G., Grimmond S.M., Berman B.P., Laird P.W., Pera M.F., Wolvetang E.J.: Vitamin C promotes widespread yet specific DNA demethylation of the epigenome in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2010; 28: 1848-1855
- [10] Ciesielski P., Józwiak P., Krześlak A.: Białka TET a modyfikacje epigenetyczne w nowotworach. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015; 69: 1371-1383
- [11] Dang L., White D.W., Gross S., Bennett B.D., Bittinger M.A., Driggers E.M., Fantin V.R., Jang H.G., Jin S., Keenan M.C., Marks K.M., Prins R.M., Ward P.S., Yen K.E., Liaw L.M. i wsp.: Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 2009; 462: 739-744
- [12] Dickson K.M., Gustafson C.B., Young J.L., Züchner S., Wang G.: Ascorbate-induced generation of 5-hydroxymethylcytosine is unaffected by varying levels of iron and 2-oxoglutarate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013; 439: 522-527
- [13] Du J., Cullen J.J., Buettner G.R.: Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1826: 443-457
- [14] Eid W., Abdel-Rehim W.: Vitamin C promotes pluripotency of human induced pluripotent stem cells via the histone demethylase JARID1A. *Biol. Chem.*, 2016; 397: 1205-1213
- [15] Erichsen H.C., Engel S.A., Eck P.K., Welch R., Yeager M., Levine M., Siega-Riz A.M., Olshan A.F., Chanock S.J.: Genetic variation in the sodium-dependent vitamin C transporters, SLC23A1, and SLC23A2 and risk for preterm delivery. *Am. J. Epidemiol.*, 2006; 163: 245-254
- [16] Erichsen H.C., Peters U., Eck P., Welch R., Schoen R.E., Yeager M., Levine M., Hayes R.B., Chanock S.: Genetic variation in sodium-dependent vitamin C transporters SLC23A1 and SLC23A2 and risk of advanced colorectal adenoma. *Nutr. Cancer*, 2008; 60: 652-659
- [17] Esteban M.A., Pei D.: Vitamin C improves the quality of somatic cell reprogramming. *Nat. Genet.*, 2012; 44: 366-367
- [18] Esteban M.A., Wang T., Qin B., Yang J., Qin D., Cai J., Li W., Weng Z., Chen J., Ni S., Chen K., Li Y., Liu X., Xu J., Zhang S. i wsp.: Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010; 6: 71-79
- [19] Fedeles B.I., Singh V., Delaney J.C., Li D., Essigmann J.M.: The AlkB family of Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenases: repairing nucleic acid alkylation damage and beyond. *J. Biol. Chem.*, 2015; 290: 20734-20742
- [20] Furney S.J., Pedersen M., Gentien D., Dumont A.G., Rapinat A., Desjardins L., Turajlic S., Piperno-Neumann S., de la Grange P., Roman-Roman S., Stern M.H., Marais R.: SF3B1 mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma. *Cancer Discov.*, 2013; 3: 1122-1129
- [21] Gao Y., Han Z., Li Q., Wu Y., Shi X., Ai Z., Du J., Li W., Guo Z., Zhang Y.: Vitamin C induces a pluripotent state in mouse embryonic stem cells by modulating microRNA expression. *FEBS J.*, 2015; 282: 685-699
- [22] Gaspar-Maia A., Alajem A., Meshorer E., Ramalho-Santos M.: Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2011; 12: 36-47
- [23] Guey L.T., Garcia-Closas M., Murta-Nascimento C., Lloreta J., Palencia L., Kogevinas M., Rothman N., Vellalta G., Calle M.L., Marenne G., Tardón A., Carrato A., Garcia-Closas R., Serra C., Silverman D.T. i wsp.: Genetic susceptibility to distinct bladder cancer subphenotypes. *Eur. Urol.*, 2010; 57: 283-292
- [24] Gustafson C.B., Yang C., Dickson K.M., Shao H., Van Booven D., Harbour J.W., Liu Z.J., Wang G.: Epigenetic reprogramming of melanoma cells by vitamin C treatment. *Clin. Epigenetics.*, 2015; 7: 51
- [25] Hsu C.H., Peng K.L., Kang M.L., Chen Y.R., Yang Y.C., Tsai C.H., Chu C.S., Jeng Y.M., Chen Y.T., Lin F.M., Huang H.D., Lu Y.Y., Teng Y.C., Lin S.T., Lin R.K. i wsp.: TET1 suppresses cancer invasion by activating the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Cell Rep.*, 2012; 2: 568-579
- [26] Huang Y., Rao A.: Connections between TET proteins and aberrant DNA modification in cancer. *Trends Genet.*, 2014; 30: 464-474
- [27] 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
- [28] Johansson C., Tumber A., Che K., Cain P., Nowak R., Gileadi C., Oppermann U.: The roles of Jumonji-type oxygenases in human disease. *Epigenomics*, 2014; 6: 89-120
- [29] Klose R.J., Yamane K., Bae Y., Zhang D., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Wong J., Zhang Y.: The transcriptional repressor JHDM3A

demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature*, 2006; 442: 312-316

[30] 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

[31] Kohli R.M., Zhang Y.: TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 2013; 502: 472-479

[32] Kroeze L.I., van der Reijden B.A., Jansen J.H.: 5-Hydroxymethylcytosine: an epigenetic mark frequently deregulated in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 2015; 1855: 144-154

[33] Kuiper C., Vissers M.C.: Ascorbate as a co-factor for Fe - and 2-oxoglutarate dependent dioxygenases: physiological activity in tumor growth and progression. *Front Oncol.*, 2014; 4: 359

[34] Li R., Liang J., Ni S., Zhou T., Qing X., Li H., He W., Chen J., Li F., Zhuang Q., Qin B., Xu J., Li W., Yang J., Gan Y. i wsp.: A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2010; 7: 51-63

[35] Lian C.G., Xu Y., Ceol C., Wu F., Larson A., Dresser K., Xu W., Tan L., Hu Y., Zhan Q., Lee C.W., Hu D., Lian B.Q., Kleffel S., Yang Y. i wsp.: Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell*, 2012; 150: 1135-1146

[36] Linster C.L., Van Schaftingen E.: Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS J.*, 2007; 274: 1-22

[37] Manning J., Mitchell B., Appadurai D.A., Shakya A., Pierce L.J., Wang H., Nganga V., Swanson P.C., May J.M., Tantin D., Spangrude G.J.: Vitamin C promotes maturation of T-cells. *Antioxid. Redox. Signal.*, 2013; 19: 2054-2067

[38] Markolovic S., Wilkins S.E., Schofield C.J.: Protein hydroxylation catalyzed by 2-oxoglutarate-dependent oxygenases. *J. Biol. Chem.*, 2015; 290: 20712-20722

[39] May J.M.: The SLC23 family of ascorbate transporters: ensuring that you get and keep your daily dose of vitamin C. *Br. J. Pharmacol.*, 2011; 164: 1793-1801

[40] McDonough M.A., Loenarz C., Chowdhury R., Clifton I.J., Schofield C.J.: Structural studies on human 2-oxoglutarate dependent oxygenases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2010; 20: 659-672

[41] Minor E.A., Court B.L., Young J.I., Wang G.: Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. *J. Biol. Chem.*, 2013; 288: 13669-13674

[42] Modrzejewska M., Gawronski M., Skonieczna M., Zarakowska E., Starczak M., Foksinski M., Rzeszowska-Wolny J., Gackowski D., Olinski R.: Vitamin C enhances substantially formation of 5-hydroxymethyluracil in cellular DNA. *Free Radic. Biol. Med.*, 2016; 101: 378-383

[43] Monfort A., Wutz A.: Breathing-in epigenetic change with vitamin C. *EMBO Rep.*, 2013; 14: 337-346

[44] Nabel C.S., Jia H., Ye Y., Shen L., Goldschmidt H.L., Stivers J.T., Zhang Y., Kohli R.M.: AID/APOBEC deaminases disfavor modified cytosines implicated in DNA demethylation. *Nat. Chem. Biol.*, 2012; 8: 751-758

[45] Ougland R., Lando D., Jonson I., Dahl J.A., Moen M.N., Nordstrand L.M., Rognes T., Lee J.T., Klungland A., Kouzarides T., Larsen E.: ALKBH1 is a histone H2A dioxygenase involved in neural differentiation. *Stem Cells*, 2012; 30: 2672-2682

[46] Padayatty S.J., Levine M.: Vitamin C: the known, the unknown, and Goldilocks. *Oral Dis.* 2016; 22: 463-93

[47] Pan Z., Sikandar S., Witherspoon M., Dizon D., Nguyen T., Benirschke K., Wiley C., Vrana P., Lipkin S.M.: Impaired placental trophoblast lineage differentiation in *Alkbh1*^{-/-} mice. *Dev. Dyn.*, 2008; 237: 316-327

[48] Pfaffeneder T., Spada F., Wagner M., Brandmayr C., Laube S.K., Eisen D., Truss M., Steinbacher J., Hackner B., Kotljarova O., Schuermann D., Michalakis S., Kosmathev O., Schiesser S., Steigenberger B. i wsp.: Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA. *Nat. Chem. Biol.*, 2014; 10: 574-581

[49] Ponnaluri V.K., Maciejewski J.P., Mukherji M.: A mechanistic overview of TET-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013; 436: 115-120

[50] Quesada V., Conde L., Villamor N., Ordóñez G.R., Jares P., Bassaganyas L., Ramsay A.J., Beá S., Pinyol M., Martínez-Trillos A., López-Guerra M., Colomer D., Navarro A., Baumann T., Aymerich M. i wsp.: Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor *SF3B1* gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.*, 2012; 44: 47-52

[51] Rose N.R., McDonough M.A., King O.N., Kawamura A., Schofield C.J.: Inhibition of 2-oxoglutarate dependent oxygenases. *Chem. Soc. Rev.*, 2011; 40: 4364-4397

[52] Salminen A., Kauppinen A., Hiltunen M., Kaarniranta K.: Krebs cycle intermediates regulate DNA and histone methylation: epigenetic impact on the aging process. *Ageing Res. Rev.*, 2014; 16: 45-65

[53] Sasidharan Nair V., Song M.H., Oh K.I.: Vitamin C facilitates demethylation of the Foxp3 enhancer in a Tet-dependent manner. *J. Immunol.*, 2016; 196: 2119-2131

[54] Schjoldager J.G., Tveden-Nyborg P., Lykkesfeldt J.: Prolonged maternal vitamin C deficiency overrides preferential fetal ascorbate transport but does not influence perinatal survival in guinea pigs. *Br. J. Nutr.*, 2013; 110: 1573-1579

[55] Skibola C.F., Bracci P.M., Halperin E., Nieters A., Hubbard A., Paynter R.A., Skibola D.R., Agana L., Becker N., Tressler P., Forrest M.S., Sankararaman S., Conde L., Holly E.A., Smith M.T.: Polymorphisms in the estrogen receptor 1 and vitamin C and matrix metalloproteinase gene families are associated with susceptibility to lymphoma. *PLoS One*, 2008; 3: e2816

[56] Spruijt C.G., Gnerlich F., Smits A.H., Pfaffeneder T., Jansen P.W., Bauer C., Münzel M., Wagner M., Müller M., Khan F., Eberl H.C., Mensinga A., Brinkman A.B., Lephikov K., Müller U. i wsp.: Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell*, 2013; 152: 1146-1159

[57] Stadtfeld M., Apostolou E., Ferrari F., Choi J., Walsh R.M., Chen T., Ooi S.S., Kim S.Y., Bestor T.H., Shioda T., Park P.J., Hochedlinger K.: Ascorbic acid prevents loss of Dlk1-Dio3 imprinting and facilitates generation of all-iPS cell mice from terminally differentiated B cells. *Nat. Genet.*, 2012; 44: 398-405

[58] Tan L., Shi Y.G.: Tet family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in development and disease. *Development*, 2012; 139: 1895-1902

[59] Traber M.G., Stevens J.F.: Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic. Biol. Med.*, 2011; 51: 1000-1013

[60] Turcan S., Rohle D., Goenka A., Walsh L.A., Fang F., Yilmaz E., Campos C., Fabius A.W., Lu C., Ward P.S., Thompson C.B., Kaufman A., Guryanova O., Levine R., Heguy A. i wsp.: IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*, 2012; 483: 479-483

[61] Vaz F.M., Wanders R.J.: Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem. J.*, 2002; 361: 417-429

[62] Vissers M.C., Kuiper C., Dachs G.U.: Regulation of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases and implications for cancer. *Biochem. Soc. Trans.*, 2014; 42: 945-951

[63] Wang L., Zhang J., Duan J., Gao X., Zhu W., Lu X., Yang L., Zhang J., Li G., Ci W., Li W., Zhou Q., Aluru N., Tang F., He C., Huang X., Liu J.: Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals. *Cell*, 2014; 157: 979-991

[64] Wang T., Chen K., Zeng X., Yang J., Wu Y., Shi X., Qin B., Zeng L.,

- Esteban M.A., Pan G., Pei D.: The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell*, 2011; 9: 575-587
- [65] Wright M.E., Andreotti G., Lissowska J., Yeager M., Zatonski W., Chanock S.J., Chow W.H., Hou L.: Genetic variation in sodium-dependent ascorbic acid transporters and risk of gastric cancer in Poland. *Eur. J. Cancer*, 2009; 45: 1824-1830
- [66] Wu H., Zhang Y.: Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell*, 2014; 156: 45-68
- [67] Xu W., Yang H., Liu Y., Yang Y., Wang P., Kim S.H., Ito S., Yang C., Wang P., Xiao M.T., Liu L.X., Jiang W.Q., Liu J., Zhang J.Y., Wang B. i wsp.: Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*, 2011; 19: 17-30
- [68] Yin R., Mao S.Q., Zhao B., Chong Z., Yang Y., Zhao C., Zhang D., Huang H., Gao J., Li Z., Jiao Y., Li C., Liu S., Wu D., Gu W. i wsp.: Ascorbic acid enhances Tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013; 135: 10396-10403
- [69] Young J.L., Züchner S., Wang G.: Regulation of the epigenome by vitamin C. *Annu. Rev. Nutr.*, 2015; 35: 545-564
- [70] Yue X., Trifari S., Äijö T., Tsagaratou A., Pastor W.A., Zepeda-Martinez J.A., Lio C.W., Li X., Huang Y., Vijayanand P., Lähdesmäki H., Rao A.: Control of Foxp3 stability through modulation of TET activity. *J. Exp. Med.*, 2016; 213: 377-397
- [71] Zhao H., Chen T.: Tet family of 5-methylcytosine dioxygenases in mammalian development. *J. Hum. Genet.*, 2013; 58: 421-427

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktów interesów.