

Received: 2015.03.05  
Accepted: 2015.08.25  
Published: 2015.12.16

## Białka TET a modyfikacje epigenetyczne w nowotworach

### TET proteins and epigenetic modifications in cancers

Piotr Ciesielski, Paweł Józwiak, Anna Krześlak

Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Cytobiochemii, Łódź

#### Streszczenie

Modyfikacje epigenetyczne, do których zalicza się metylację DNA oraz modyfikacje histonów są włączone w regulację ekspresji genów, a ich zaburzenia mogą się przyczynić do powstawania i progresji nowotworów. Określony wzór metylacji DNA jest wynikiem prawidłowego przebiegu zarówno procesu metylacji jak i demetylacji. Niedawne badania dowodzą, że główną rolę w demetylacji DNA odgrywają białka TET (ten-eleven translocation). Białka TET (TET1, TET2, TET3) są zależnymi od jonów żelaza(II) oraz  $\alpha$ -ketoglutaranu dioksygenazami, a ich aktywność enzymatyczna polega na hydroksylacji 5-metylocytozyny do 5-hydroksymetylocytozyny oraz dalej do 5-formylocytozyny i 5-karboksycytozyny. Zmodyfikowane cytozyny są usuwane przez enzymy zaangażowane w naprawę DNA. Wydaje się jednak, że rola TET w regulacji ekspresji genów nie ogranicza się tylko do ich katalitycznej aktywności. Białka TET mogą wchodzić w interakcje z białkami kompleksów uczestniczących w modyfikacjach histonów (np. EZH2, OGT, Sin3a lub HCF1) i wpływając na ich aktywność oraz zdolność do wiązania się z chromatyną przyczyniają się do zmiany w profilu metylacji, acetylacji, czy O-GlcNAcytacji histonów. Liczne doniesienia sugerują, że zmniejszona ekspresja genów *TET*, jak również mutacje w genach *TET* są związane z rozwojem i progresją różnych typów nowotworów.

**Słowa kluczowe:** 5-hydroksymetylocytozyna • białka TET • demetylacja DNA • modyfikacje epigenetyczne • supresory nowotworów

#### Summary

Epigenetic modifications, including DNA methylation and histone modifications, are involved in regulation of gene expression, and alterations in these modifications are implicated in cancer onset and progression. The specific pattern of DNA methylation depends on the balance between methylation and demethylation processes. Recent studies have shown that TET proteins play a key role in DNA demethylation. TET proteins (TET1, TET2, TET3) are iron(II) and  $\alpha$ -ketoglutarate dependent dioxygenases, and their enzymatic activity involves hydroxylation of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine and further to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. These modified cytosines are removed by enzymes involved in DNA repair. However, the role of TETs in gene expression regulation is not limited to their catalytic activity. TETs can interact with proteins of complexes involved in the modification of histones (i.e. EZH2, OGT, Sin3a or HCF1) and by affecting their activity and, chromatin binding ability, they can cause changes in patterns of histone methylation, acetylation and O-GlcNAcylation. There is growing evidence that decreased expression of TET proteins and mutation in *TET* genes are associated with cancer onset and progression.

**Keywords:** 5-hydroxymethylcytosine • TET proteins • DNA demethylation • epigenetic modifications • tumor suppressors

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1186346>

**Word count:** 3883  
**Tables:** –  
**Figures:** 4  
**References:** 115

**Adres autora:** mgr Piotr Ciesielski; Katedra Cytobiochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź; e-mail: piotrcie@biol.uni.lodz.pl

**Wykaz skrótów:** **5-caC** – 5-karboksycytozyna; **5-fC** – 5-formylocytozyna; **5-hmC** – 5-hydroksymetylocytozyna; **5-hmU** – 5-hydroksymetylouracyl; **5-mC** – 5-metylocytozyna; **AID/APOBEC** – deaminaza cytydynowa; **AITL** – angioimmunoblastyczny chłoniak wywodzący się z komórek T; **AML** – ostra białaczka szpikowa; **BER** – system naprawy DNA przez wycinanie zasad azotowych; **ChIP-Seq** – immunoprecypitacja chromatyny w połączeniu z jednoczesnym sekwencjonowaniem DNA; **CMML** – przewlekła białaczka monocytowa; **CXXC** – domena o strukturze palca cynkowego; **DAPK** – kinaza białkowa związana ze śmiercią komórkową; **DDK** – gen kodujący białko będące inhibitorem szlaku WNT; **DNMT** – metylotransferaza DNA; **DSBH** – domena katalityczna białek TET; **DUOX1** – dioksygenaza należąca do rodziny oksydaz NAD(P)H; **ESC** – embrionalne komórki macierzyste; **EZH2** – metylotransferaza histonowa, składnik kompleksu PRC2; **HCF1** – białko uczestniczące w regulacji transkrypcji; **HDAC** – deacetylaza histonowa; **HMG2** – czynnik remodelujący chromatynę; **IDH** – dehydrogenaza izocytrynianowa; **KRAS** – onkogen, kodujący białko o aktywności GTP-azy, należące do rodziny białek Ras; **LIG3** – ligaza DNA; **LSD1** – demetylaza lizyny; **LZTS1** – gen supresorowy; **MBD4** – białko wiążące zmetylowane dinukleotydy CpG, mające właściwości glikozylazy DNA; **MDS** – zespoły mielodysplastyczne; **MeCP2** – białko wiążące zmetylowane dinukleotydy CpG; **MGMT** – metylotransferaza metyloguaninowa; **MLL** – metylotransferaza histonowa; **MPN** – nowotwory mieloproliferacyjne; **NADP<sup>+</sup>** – dinukleotyd nikotynamidoadeninowy; **NEIL1-3** – endonukleazy biorące udział w naprawie uszkodzeń DNA; **NLS** – sekwencja lokalizacji jądrowej; **OGT** – O-GlcNAc transferaza; **PARP1** – polimeraza poli-ADP-rybozy; **PCNA** – jądrowy antygen komórek proliferujących; **PLA** – ligacja zblizeniowa; **PRC2** – kompleks represyjny Polycomb; **Sin3a** – białko regulujące transkrypcję; **SLUG1** – glikozylaza DNA; **TDG** – glikozylaza DNA; **TET** – białko katalizujące hydroksylację 5-metylocytozyny; **TIMP** – tkankowe inhibitory metaloproteinaz; **UHRF1** – białko zwiększające aktywność metylotransferazy DNA 1; **WT1** – gen supresorowy związany z guzem Wilmsa; **XRCC1** – białko zaangażowane w naprawę DNA.

## WSTĘP

Wszystkie komórki organizmu człowieka zawierają ten sam genom, ale nie wszystkie geny ulegają ekspresji w każdej z nich. W poszczególnych komórkach część genów jest aktywna, inne natomiast są czasowo lub całkowicie inaktywowane. Wzór ekspresji genów zależy od etapu rozwoju komórek, ich rodzaju oraz funkcji i jest utrzymywany dzięki określonym mechanizmom epigenetycznym [90]. Jednym z podstawowych sposobów epigenetycznej regulacji ekspresji genów jest metylacja reszt cytozyny w DNA. Podczas tego procesu swoiste metylotransferazy DNA (DNMT, DNA methyltransferase) przenoszą grupy metylowe z donora, którym jest S-adenozylometionina na piąty atom węgla pierścienia pirymidynowego cytozyny. Metylacja cytozyny w łańcuchu DNA zachodzi, gdy znajduje się w sąsiedztwie guaniny (dinukleotydy CpG). Dinukleotydy CpG mogą być rozproszone w genomie lub występować w skupiskach w postaci tzw. wysp CpG. Metylacja wysp CpG umiejscowionych w regionach promotorowych genów jest odpowie-

dzialna za wyciszenie ekspresji genów. Metylacja DNA jest podstawowym mechanizmem służącym wyciszeniu licznych sekwencji powtórzonych, piętnowaniu rodzicielskiemu oraz inaktywacji jednego z chromosomów X w komórkach osobników żeńskich [77,90].

Wyniki wielu badań wykazały, że komórki nowotworowe charakteryzują się znacznymi zmianami we wzorze metylacji DNA w porównaniu z komórkami prawidłowymi. W komórkach nowotworowych obserwuje się globalną hipometylację genomu przy jednoczesnym zwiększeniu poziomu metylacji (hipermetylacji) wysp CpG w sekwencjach promotorowych określonych genów. Globalna hipometylacja genomu może prowadzić do aktywacji protoonkogenów oraz zmniejszenia stabilności genomu przez wzrost aktywacji transpozonów, które w komórkach prawidłowych są wyciszone przez metylację. Hipermetylacja wysp CpG w regionach promotorowych genów supresorowych oraz genów naprawy DNA przyczynia się natomiast do nowotworzenia wskutek zahamowania ich ekspresji [16,91,97,113].

Określony wzór metylacji DNA zależy nie tylko od przebiegu samego procesu przyłączania grup metylowych do reszt cytozyny, ale jest również wynikiem procesu pasywnej i aktywnej demetylacji DNA. Demetylacja pasywna jest wtedy, kiedy metylotransferaza nie metyluje nowo zsyntetyzowanego łańcucha DNA podczas replikacji, czyli zatrzymana jest metylacja zachowawcza, co powoduje utratę metylacji DNA podczas kolejnych podziałów komórek. Demetylacja aktywna zachodzi enzymatycznie i przebiega niezależnie od replikacji DNA [4,31].

Najnowsze doniesienia sugerują, że bardzo istotną rolę w demetylacji DNA odgrywają białka TET, które katalizują konwersję 5-metylocytozyny (5-mC) do 5-hydroksymetylocytozyny (5-hmC). Obecność 5-hmC w DNA ssaków sugerowano po raz pierwszy już ponad 40 lat temu [82]. Ponieważ jednak w późniejszych pracach nie udało się jednoznacznie potwierdzić występowania tej zmodyfikowanej cytozyny w DNA, nie interesowano się tym zagadnieniem przez następne kilkadziesiąt lat. Sytuacja zmieniła się zdecydowanie po opublikowaniu w 2009 r. przez dwie niezależne grupy badaczy prac, wskazujących, że 5-hmC może powstawać z 5-mC i jest powszechnie obecna w DNA ssaków [51,98]. Przeprowadzono wiele badań, których wyniki potwierdzają udział białek TET w demetylacji DNA oraz ich związek ze zmianami wzoru metylacji DNA w nowotworach. Białka TET wydają się także zaangażowane w regulację innych modyfikacji epigenetycznych, tj. modyfikacji histonów przez interakcję ze swoistymi białkami odpowiedzialnymi za te modyfikacje i ich rekrutację do chromatyny. Liczne doniesienia wskazują, że zmniejszona ekspresja genów *TET*, jak również mutacje w genach *TET* są związane z rozwojem i progresją różnych typów nowotworów.

### CHARAKTERYSTYKA GENÓW I BIAŁEK TET

W komórkach człowieka zidentyfikowano trzy białka TET określone jako TET1, TET2 i TET3, kodowane przez trzy różne geny. Gen *TET1* jest umiejscowiony w chromosomie 10 (10q21), zawiera dwanaście eksonów i koduje białko zawierające 2136 reszt aminokwasowych [2]. Gen *TET2* znajduje się w chromosomie 4 (4q24) i składa się z 11 eksonów. W procesie alternatywnego składania mRNA powstają trzy izoformy białka TET2, zbudowane z 2002, 1164 lub 1194 reszt aminokwasowych. Tylko najdłuższa izoforma TET2 zawiera C-kończącą domenę katalityczną. Wszystkie trzy izoformy TET2 charakteryzują się swoistą tkankowo ekspresją. W większości typów tkanek najmniejszą ekspresję wykazuje izoforma 3 (1194 aminokwasów), natomiast dwie pozostałe ulegają ekspresji na podobnym poziomie. Szczególnie dużą ekspresję izoform zawierających 2002 i 1164 reszt aminokwasowych obserwuje się w komórkach hematopoetycznych [53]. Gen *TET3* umiejscowiony jest w chromosomie 2 (2p13) i podobnie jak w przypadku TET2 zidentyfikowano trzy izoformy białka TET3, zawierające 1660, 1440 lub 728 reszt aminokwasowych [69].

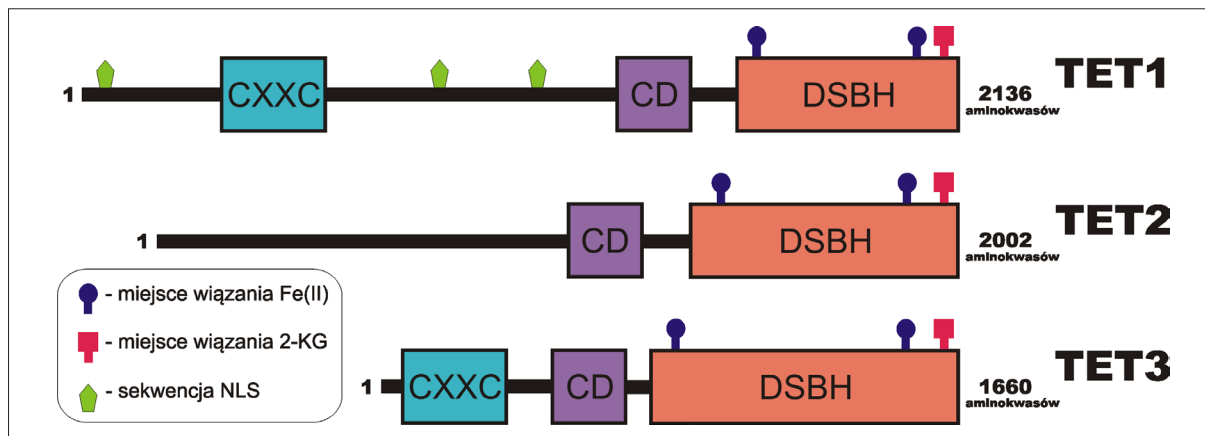
Wszystkie białka TET są dioksygenazami, a ich aktywność katalityczna jest uzależniona od obecności jonów żelaza(II) oraz 2-ketoglutaranu (2-KG). 2-KG, będący substratem białek TET, powstaje podczas cyklu kwasów trikarboksylowych, a wytwarzany jest przez zależne od NADP<sup>+</sup>, homodimeryczne enzymy zwane dehydrogenazami izocytrynianowymi (IDHs, isocitrate dehydrogenases). Zarówno izoforma cytosolowa (IDH1), jak i mitochondrialna (IDH2) biorą udział w przemianie izocytrynianu w 2-KG [13]. Uwzględniając to, że aktywność białek TET jest uzależniona od obecności 2-KG, mutacje w genach *IDH1/2* mogą zmniejszać konwersję 5-mC do 5-hmC katalizowanej przez białka TET. Zmutowane warianty IDH wytwarzają 2-hydroksyglutaran (2-HG) zamiast 2-KG. 2-HG ze względu na podobieństwo strukturalne do 2-KG powoduje zahamowanie funkcji (inhibicja kompetycyjna) wszystkich białek TET, jak również innych dioksygenaz [15,108].

Białka TET zawierają trzy miejsca wiążące jony żelaza(II) oraz jedno miejsce pozwalające na związanie 2-KG (ryc. 1). Region odpowiedzialny za aktywność katalityczną znajduje się na C-końcu białek. Składa się z dwóch domen: bogatej w reszty cysteinowe (Cys-rich domain) oraz domeny DSBH (double-stranded  $\beta$ -helix-2-KG-Fe(II)-dependent dioxygenase domain), która oprócz właściwości katalitycznych może również wiązać jony metali. W odróżnieniu od pozostałych członków rodziny TET, w strukturze białka TET1 znajdują się trzy sekwencje lokalizacji jądrowej (NLS, nuclear localization sequence) [98,108]. Na N-końcu białek TET1 i TET3 znajduje się domena CXXC, o strukturze palca cynkowego. Domena jest zdolna do wiązania zarówno niezmodyfikowanych, jak i metylowanych lub hydroksymetylowanych cytozyn, zwłaszcza znajdujących się w obrębie dinukleotydów CpG (ryc. 1) [114].

Na aktywność białek TET korzystnie wpływa kwas askorbinowy, który oddziałuje z C-kończącą domeną katalityczną białek TET, co prawdopodobnie powoduje jej zwinięcie i umożliwia wiązanie jonów żelaza(II). Nie wykazano, aby inne przeciwutleniacze wywierały podobny wpływ na aktywność białek TET, co wskazuje, że aktywacja TET przez kwas askorbinowy nie wynika tylko z jego funkcji jako czynnika redukującego [68,112]. W komórkach z wyciszoną ekspresją *TET1/2* obecność kwasu askorbinowego nie wpływa ani na zwiększenie oksydacji 5-mC, ani na ogólny poziom tej modyfikacji. Natomiast stwierdzono, że zmniejszenie stężenia kwasu askorbinowego przy prawidłowej ekspresji genów *TET* wpływa znacząco na zmniejszenie stężenia 5-hmC w płucach, wątrobie i mózgu, ale prawdopodobnie również i w innych tkankach [5,112].

### BIAŁKA TET A DEMETYLACJA DNA

Demetylacja DNA może być procesem biernym lub aktywnym. W obu przypadkach białka TET wydają się odgrywać znaczącą rolę. Demetylacja bierna jest podczas replikacji i wynika z braku metylacji przez metylotrans-



**Ryc. 1.** Struktura domenowa białek TET; CD – domena katalityczna, bogata w reszty cysteinowe (Cys-rich domain); CXXC – domena o strukturze palca cynkowego; DSHB – domena katalityczna, zdolna do wiązania jonów metali (double-stranded  $\beta$ -helix-2KG-Fe(II)-dependent dioxygenase domain)

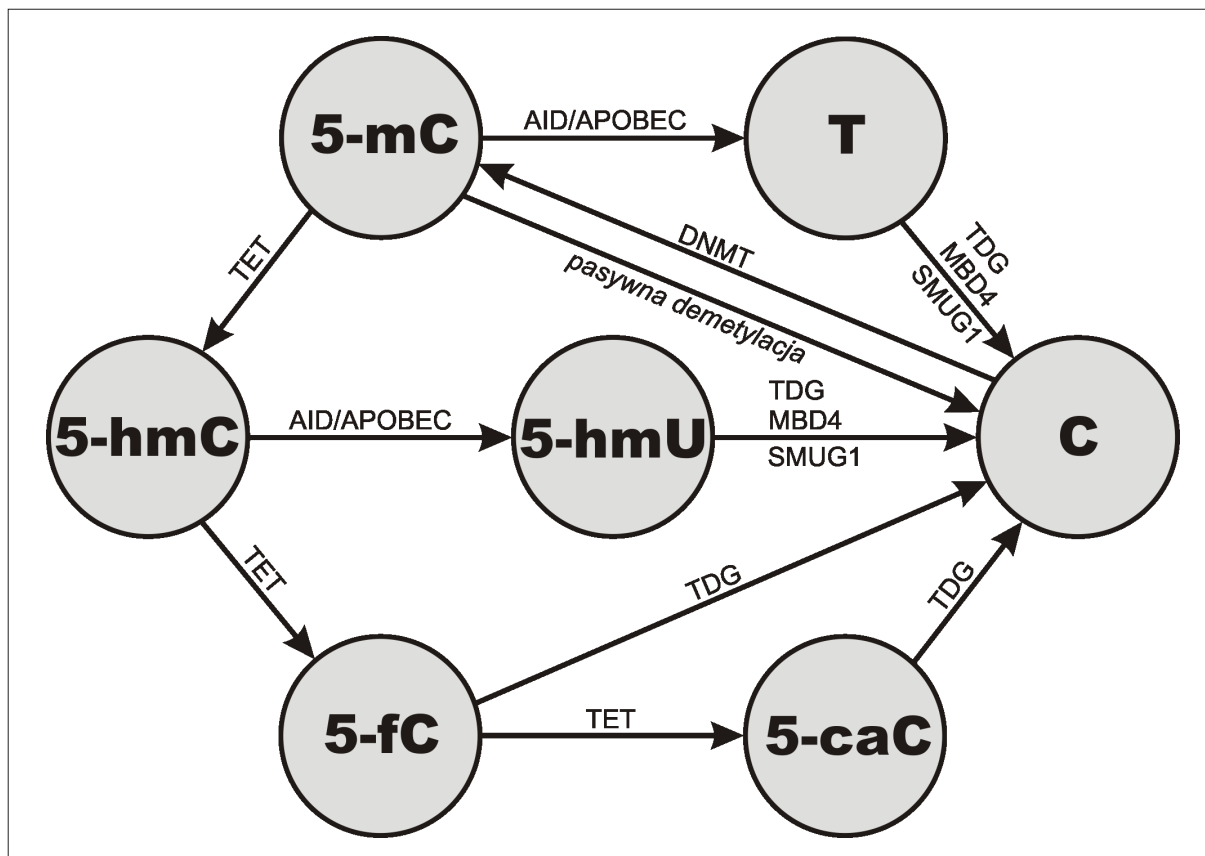
ferazę DNMT1 nowo syntetyzowanej nici. Przyczyną braku metylacji podczas syntezy DNA może być obecność w nici macierzystej 5-hmC, powstającej z udziałem białek TET. Ponieważ metylotransferaza DNMT1 wykazuje mniejsze powinowactwo do 5-hmC niż do 5-mC jej aktywność jest hamowana i w nici potomnej pojawiają się cytozyny niemodyfikowane [4,35]. Do prawidłowego funkcjonowania DNMT1 niezbędne jest także białko UHRF1 (ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1), które wspomaga wiązanie DNMT1 do hemimetylowanych widełek replikacyjnych. Białko to wykazuje ponad 10-krotnie mniejszą zdolność do wiązania hemihydroksymetylowanych nici DNA. W przypadku dużego stężenia 5-hmC w DNA ulegającym replikacji oraz braku aktywności metylotransferaz odpowiedzialnych za metylację *de novo* (DNMT3a, -3b) dochodzi do biernej demetylacji DNA [26,35].

Białka TET biorą również udział w aktywnej demetylacji DNA, która przebiega niezależnie od replikacji (ryc. 2). 5-mC i 5-hmC ulegają deaminacji przez białka z rodziny AID/APOBEC (activation induced deaminase and apolipoprotein B RNA-editing catalytic component) odpowiednio do tyminy i 5-hydroksymetylowaniny (5-hmU). Zwiększone wytwarzanie białka AID/APOBEC nasila proces demetylacji 5-hmC, a to zwiększa poziom 5-hmU. Nie odnotowano wpływu zwiększonej ekspresji tej deaminazy na zmianę poziomu 5-mC. Dopiero po zwiększeniu ekspresji zarówno AID/APOBEC, jak i TET1 odnotowano zauważalne zwiększenie demetylacji 5-mC, co było spowodowane nasiloną przemianą 5-mC do 5-hmC ze względu na nadekspresję TET1. Wskazuje to, że AID/APOBEC swoiście oddziałuje na 5-hmC, a nie na 5-mC [30]. Następnie za sprawą glikozylaz TDG (mismatch specific thymine DNA glycosylase) i SLUG1 (single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase) dochodzi do usunięcia tyminy i 5-hmU z DNA i zastąpienia ich cytozyną. Jest to tzw. system naprawy DNA przez wycinanie zasad (BER, base excision repair) [36,75]. Istotną rolę w demetylacji odgrywa również białko MBD4 (methyl-CpG binding domain protein 4), które oprócz

domeny wiążącej zmetylowane dinukleotydy CpG, ma także zakonserwowaną ewolucyjnie domenę o aktywności glikozylazy. MBD4 dzięki interakcjom z białkami z rodziny AID/APOBEC usuwa błędnie sparowane pary T:G oraz 5-hmU:G, co prowadzi do powstania w DNA niemetylowanych cytozyn [36,86]. Wszystkie opisane glikozylazy wykazują większą efektywność w przypadku wycinania 5-hmU, niż tyminy. Istotny jest tu udział białek TET oraz przeprowadzanej przez nie reakcji hydroksylacji reszt 5-mC w procesie demetylacji DNA [14].

Białka TET mogą się przekształcać do 5-hmC, dalej do 5-formylocytozyny (5-fC) i 5-karboksycytozyny (5-caC), aczkolwiek ilość w genomie tak zmodyfikowanych cytozyn jest około 100-krotnie mniejsza niż 5-hmC. Niemniej jednak, zarówno 5-fC, jak i 5-caC, odgrywają ważną rolę w demetylacji DNA będąc swoistymi substratami glikozylazy TDG. Inne glikozylazy nie wykazują zdolności do wycinania tych pochodnych cytozyny [44,64]. Mimo że glikozylaza TDG może wycinać z DNA pochodne 5-hmC (5-hmU, 5-fC i 5-caC), to nie wykazuje aktywności względem par 5-hmC:G. Wskazuje to na istotny udział procesu deaminacji, który poprzedza wycinanie błędnie sparowanych zasad, w systemie naprawy DNA typu BER [37,64].

Niedawne badania wykazały interakcje białek TET z wieloma czynnikami uczestniczącymi w kilku etapach procesu naprawy DNA przez wycięcie zasad. Stwierdzono bezpośrednie interakcje białek TET z glikozylazami DNA, które wycinają uszkodzone lub utlenione zasady, tj. TDG, MBD4, jak również NEIL1, NEIL2, NEIL3 (nei endonuclease VIII-like). Wszystkie trzy białka TET oddziałują również z polimerazą poli-ADP-rybozy (PARP1, poly (ADP-ribose) polymerase 1), która rozpoznaje pęknięcia jednoniciowe i modyfikuje czynniki uczestniczące w naprawie przez polyADP-rybozylację oraz LIG3 (DNA ligase 3) i XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1), biorące udział w ligacji DNA po insercji cytozyny [71]. Wyniki sugerują, że utlenianie przez TET 5-mC do 5-hmC oraz wycinanie utle-



**Ryc. 2.** Aktywna demetylacja DNA za udziałem białek TET; 5-metylocytozyna (5-mC) utworzona z cytozyny (C) za pośrednictwem metylotransferazy DNA (DNMT) jest przekształcana w 5-hydroksymetylocytozynę (5-hmC), a dalej do 5-formylocytozyny (5-fC) i 5-karboksycytozyny (5-caC) z udziałem białek TET. 5-fC i 5-caC mogą być usuwane przez glikozylazę TDG, 5-mC i 5-hmC ulegają deaminacji z udziałem białek AID/APOBEC, tworząc odpowiednio tyminę (T) oraz 5-hydroksymetylouracyl (5-hmU). T i 5-hmU są wycinane przez takie glikozylazy, jak TDG, MBD4, czy SLUG1

nionych pochodnych cytozyny przez system naprawy BER są procesami przeprowadzanymi w sposób skoordynowany w czasie i przestrzeni przez jeden duży kompleks białkowy [71].

### ZAWARTOŚĆ 5-HmC

Podczas gdy ilość 5-mC jest bardzo podobna w różnych tkankach i dotyczy około 5% wszystkich cytozyn, to zawartość 5-hmC jest zasadniczo różna w zależności od rodzaju tkanki oraz etapu rozwoju organizmu. Największa ilość 5-hmC występuje w embrionalnych komórkach macierzystych (ESCs, embryonic stem cells) oraz w ośrodkowym układzie nerwowym [29,43]. Mniejszą, lecz nadal w miarę dużą zawartość 5-hmC obserwuje się w wątrobie, nerkach, jelicie grubym i otylnicy. Najmniej 5-hmC znajduje się w płucach, sercu, piersiach i łożysku [54]. Badania z wykorzystaniem embrjonalnych komórek macierzystych wykazały, że duża zawartość 5-hmC dotyczy przede wszystkim eksonów oraz wysp CpG znajdujących się wewnątrz genów. Natomiast regiony intronowe oraz wyspy CpG występujące w promotorach genów cechują się niskim poziomem 5-hmC. Co więcej, 5-hmC jest umiejscowiona głównie

w luźno upakowanej, aktywnej chromatinie. Sugeruje się, że 5-hmC odgrywa istotną rolę w regulacji ekspresji i aktywności genów związanych z pluripotencją komórek ESC oraz w zmianach epigenetycznych w nich zachodzących [6,23,109]. W komórkach dojrzałych tkanek tendencja jest odwrotna, niż w przypadku ESC. 5-Hydroksymetylocytozyny są przeważnie umiejscowione w obrębie regionów promotorowych, aniżeli w samych genach [46]. Po zapłodnieniu zygoty, poziom ekspresji *TET1* i *TET2* systematycznie wzrasta wraz z kolejnymi etapami rozwoju embrionalnego, podczas gdy poziom ekspresji *TET3*, który w komórkach płciowych był stosunkowo wysoki, ulega gwałtownemu spadkowi. Wywołuje to wahania w poziomie 5-hmC, co najprawdopodobniej przyczynia się do regulacji ekspresji określonych genów na danych etapach rozwoju embrionalnego [41,105].

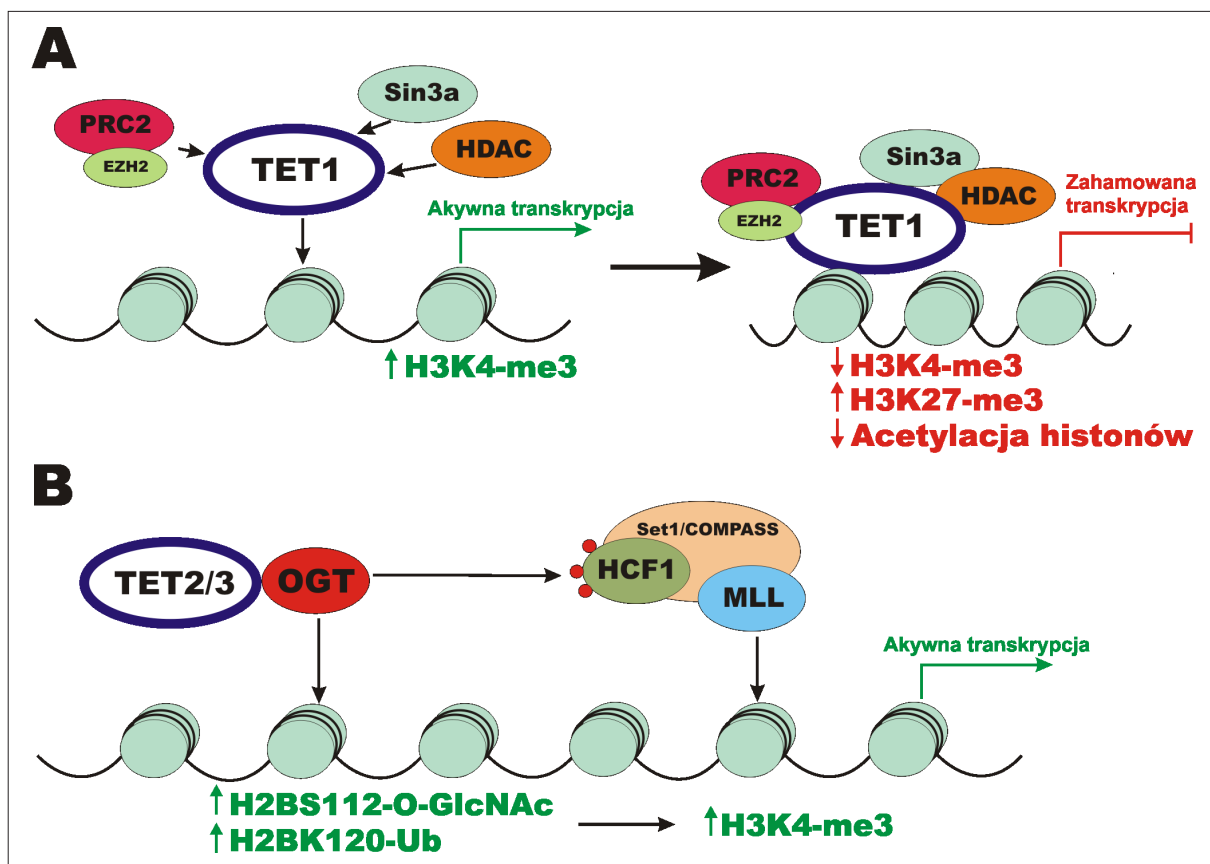
### INTERAKCJE TET Z INNYMI BIAŁKAMI

Oprócz udziału w demetylacji DNA, białka TET mogą wpływać na modyfikacje epigenetyczne niezależnie od swojej aktywności enzymatycznej przez interakcje z innymi białkami. Badania Wu i wsp. wykazały, że

w mysich komórkach embrjonalnych mESC Tet1 uczestniczy w wyciszaniu ekspresji niektórych genów przez ułatwianie rekrutacji kompleksu represyjnego Polycomb 2 (PRC2, Polycomb repressive complex 2) do bogatych w pary CpG promotorów tych genów [107]. Chociaż nie wykazali oni bezpośredniej interakcji między Tet1 i głównym składnikiem kompleksu, metylotransferazą histonową EZH2 (enhancer of zeste homolog 2), która odpowiada za trimetylację reszty lizyny 27 histonu H3 (H3K27), to wyciszenie ekspresji *Tet1* zakłócało wiązanie EZH2 do miejsc docelowych PRC2 [107]. Stwierdzono również, że Tet1 wiąże się z kompleksem korepresora Sin3A (Sin3 transcription regulator family member A), który odpowiada za represję transkrypcji przez deacetylację histonów [104]. Analiza miejsc wiązania kompleksów Sin3A i Tet1 do DNA wykazała, że ulegają one w znacznym stopniu kolokalizacji, co może sugerować udział Tet1 w bezpośredniej rekrutacji Sin3A do miejsc docelowych podlegających represji. Badania z wykorzystaniem metody ligacji zbliżeniowej *in situ* (PLA, proximity ligation assay) potwierdziły interakcje TET1 z EZH2 i Sin3A,

jak również pozwoliły na zidentyfikowanie kilku innych białek oddziałujących z TET1, tj. białka wiążącego zmetylowane dinukleotydy CpG (MeCP2, methyl CpG binding protein 2), deacetylaz histonowych 1, 6 i 7 (HDAC, histone deacetylase), jądrowego antygenu komórek proliferujących (PCNA, proliferating cell nuclear antigen) i LSD1 (lysine-specific demethylase 1A) (ryc. 3A) [9].

Wyniki wielu badań wskazują na interakcje między białkami TET a O-GlcNAc transferazą (OGT, O-GlcNAc transferase) [11,20,42,92,100,115]. Oddziaływania między tymi białkami są szczególnie interesujące ponieważ mogą wskazywać na udział białek TET w regulacji ekspresji genów w odpowiedzi na zmiany metabolizmu komórek nowotworowych [40]. Zwiększone wychwytywanie i zużycie glukozy przez komórki nowotworowe zwiększa ilość powstającej w szlaku biosyntezy heksozamin UDP-N-acetyloglukozoaminy, która jest substratem dla O-GlcNAc transferazy [7,33,88]. OGT jest enzymem odpowiadającym za modyfikacje białek komórkowych przez przyłączenie pojedynczych reszt N-acetylogluko-



**Ryc. 3.** Interakcje między białkami TET a białkami kompleksów zaangażowanych w modyfikację histonów; A – TET1 ułatwiając rekrutację kompleksów PRC2 i Sin3a przyczynia się do kondensacji chromatyny, a tym samym do wyciszenia ekspresji genów. Metylotransferaza histonowa EZH2, będąca głównym składnikiem kompleksu PRC2 jest odpowiedzialna za trimetylację lizyny 27 histonu H3 (H3K27-me3). Natomiast Sin3a oddziałuje z deacetylazami histonowymi (HDAC) prowadząc do spadku acetylacji histonów. B – TET2/3 wchodzi w interakcję z O-GlcNAc transferazą (OGT), ułatwiając jej rekrutację do chromatyny. OGT modyfikuje serynę 112 na histonie H2B (H2BS112-O-GlcNAc) umożliwiając ubikwitynylację lizyny 120 na histonie H2B (H2BK120-Ub). H2BK120-Ub jest rozpoznawana przez metylotransferazę histonową MLL, odpowiedzialną za trimetylację lizyny 4 na histonie H3 (H3K4-me3). Następstwem tych modyfikacji jest rozluźnienie chromatyny. OGT modyfikuje również czynnik HCF1 (czerwone kółka – O-GlcNAcyllacja) stabilizując kompleks Set1/COMPASS, w którego skład wchodzi MLL; wzrost H3K4 jest charakterystyczny dla promotorów aktywnych transkrypcyjnie genów

zaminy wiązaniem O-glikozydowym do reszt seryny lub treoniny białka. Ta dynamiczna modyfikacja wpływa na aktywność, stabilizację i umiejscowienie wielu białek m.in. enzymów metabolicznych, kinaz, fosfataz, czynników transkrypcyjnych [34,79]. Zwiększona ekspresja OGT i hiper-O-GlcNAcyllacja są cechami charakterystycznymi większości nowotworów [17,22,63]. Badania wskazują, że O-GlcNAcyllacja może stanowić element kodu histonowego. OGT modyfikuje histony H2A, H2B, H3 i H4 [89] przez co wpływa na transkrypcję genów [28] i progresję cyklu komórkowego [25].

Badania z zastosowaniem metody immunoprecypitacji chromatyny w połączeniu z jednoczesnym sekwencjonowaniem DNA (ChIP-Seq, chromatin immunoprecipitation-sequencing) wykazały kolokalizację TET2, TET3 i OGT w miejscach bogatych w histon 3 trimetylowany na lizynie 4. (H3K4me3) i odpowiadających występowaniu promotorów genów aktywnych transkrypcyjnie [11,20,100]. Choć białka TET mogą być O-GlcNAcyllowane, modyfikacja nie wpływa na ich aktywność katalityczną [11,20,42]. Interakcje z OGT mogą jednak stabilizować białko Tet1 [92] oraz wpływać na jądrowe umiejscowienie Tet3 [115]. Białka TET odgrywają podstawową rolę w rekrutacji OGT do chromatyny dzięki czemu może ona modyfikować histony (ryc. 3B). Chen i wsp. wykazali, że w mysich komórkach embrjonalnych mESC białko Tet2 jest konieczne, aby OGT mogła modyfikować histon H2B na serynie 112 [11]. Modyfikacja na reszcie seryny 112 ułatwia kolejną modyfikację H2B, tj. ubikwitynylację reszty lizyny 120. OGT w kompleksie z białkami TET O-GlcNAcylluje także czynnik transkrypcyjny HCF1 (host cell factor 1) i przyczynia się do stabilizacji kompleksu Set1/COMPASS zawierającego metylotransferazę MLL (mixed-lineage leukemia), który łączy się z H2BK120 i odpowiada za trimetylację H3K4 [18,20,28].

Wydaje się więc, że udział białek TET w regulacji aktywności genów wykracza poza ich rolę w demetylacji. Mogą one wpływać na modyfikacje histonów przez rekrutowanie swoistych białek do chromatyny. Istnieją również doniesienia sugerujące, że 5-hmC jest modyfikacją epigenetyczną *per se*, pełniącą odrębną rolę od 5-mC, która może być rozpoznawana przez swoiste białka wpływające na strukturę i funkcję genomu. Jednym z białek, które mogą rozpoznawać 5-hmC jest białko MeCP2 [26,67,95].

## EKSPRESJA TET I POZIOM 5-HmC W NOWOTWORACH

### Nowotwory układu krwiotwórczego

Pierwsze sugestie dotyczące możliwości udziału białek TET w procesie karcynogenezy pojawiły się po odkryciu białka TET1, jako fuzyjnego partnera białka MLL u pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML, acute myeloid leukemia) będących nosicielami translokacji t(10;11)(q22;q23) [62]. Późniejsze badania wykazały jednak, że to nie TET1, ale TET2 jest genem najczęściej ulegającym mutacjom w białaczkach [72]. Wiele mutacji

tego genu stwierdzono w nowotworach mieloproliferacyjnych (MPN, myeloproliferative neoplasms), zespołach mielodysplastycznych (MDS, myelodysplastic syndrome) oraz przewlekłej białaczce monocytowej (CMML, chronic myelomonocytic leukemia) i przewlekłej białaczce szpikowej (CML, chronic myeloid leukemia) [2,3,19,45,72,85]. Występowanie mutacji jest szczególnie częste w przypadku CMML (30-50%) oraz w angioimmunoblastycznym chłoniaku z komórek T (50-80%) (AITL, angioimmunoblastic T-cell lymphoma) [72]. Somatyczne delecje i mutacje inaktywujące TET2 zostały również stwierdzone w 4-13% MPN, 20-25 % MDS i 7-23% AML [18].

Przeprowadzono wiele badań dotyczących zależności między poziomem 5-hmC a mutacjami i ekspresją TET w nowotworach układu krwiotwórczego. Figueora i wsp. stwierdzili, że u pacjentów z AML, u których występują mutacje TET2 stężenie 5-hmC w DNA jest obniżone, a 5-mC podwyższone [24]. Podobnie mutacje TET2 obniżają stężenie 5-hmC i podwyższają 5-mC w CMML [83] oraz u pacjentów z MDS [59]. To może wskazywać na decydującą rolę TET2 w utrzymaniu modyfikacji DNA. Ko i wsp. również sugerują udział TET2 w tumorogenezie związanej z układem krwiotwórczym, jednak ich badania wskazują, że małe stężenie 5-hmC nie zawsze jest związane z mutacjami TET2 i występuje również u pacjentów bez mutacji w genie TET2 [49]. Badania wskazują, że niski poziom 5-hmC może wynikać również z innych przyczyn, np. mutacji w genie IDH1, który koduje dehydrogenazę izocytrynianową, enzym przekształcający izocytrynian do  $\alpha$ -ketoglutaranu. Mutacje w genach IDH1 i IDH2 są dość często obserwowane w białaczkach [1,15,24,65,66,81]. Pollyea i wsp. wykazali, że mutacje IDH u pacjentów z AML wiążą się ze wzrostem stężenia 2-hydroksyglutaranu, który hamuje aktywność TET2 i obniża poziom 5-hmC [84]. Również inne czynniki mogą wpływać na poziom 5-hmC. Najnowsze badania wskazują, że WT1, produkt białkowy genu supresorowego WT1 (Wilms tumor suppressor gene 1), wchodzi w interakcje z TET2 i TET3 i bierze udział w regulacji poziomu 5-hmC. Stwierdzono, że nadekspresja WT1 prowadzi do wzrostu poziomu 5-hmC, a wyciszenie ekspresji do spadku [87].

W celu dokładnego określenia roli TET2 w powstawaniu nowotworów układu krwiotwórczego przeprowadzono badania z wykorzystaniem mutantów mysich z wyłączoną ekspresją genu Tet2 [39,49,55]. Zaobserwowano, że u myszy z defektem genu Tet2 wzrasta proliferacja hematopoetycznych komórek progenitorowych w szpiku kostnym oraz dochodzi do przesunięcia ich różnicowania w kierunku powstawania linii mielomonocytowej. Jednak delecja samego Tet2 okazała się niewystarczająca do rozwoju nowotworów, co wskazuje, że potrzebne są dodatkowe mutacje w innym genie lub kilku genach [39,49,55].

### Guzy lite

Pośród wszystkich tkanek i narządów najwyższe stężenie hydroksymetylocytozyny stwierdza się w mózgu

[102]. Stwierdzono znaczne obniżenie stężenia 5-hmC w guzach mózgu w porównaniu z tkanką prawidłową [50]. Obniżenie stężenia 5-hmC jest szczególnie wyraźne w glejakiach bardziej zaawansowanych o wysokim stopniu złośliwości [78]. U pacjentów ze złośliwymi glejakami stwierdzono zależność między spadkiem stężenia 5-hmC a skróconym czasem przeżycia [78]. Ponieważ mutacje w genie *IDH1* są dosyć częste w glejakiach [80,110], sprawdzono czy istnieje zależność między tymi mutacjami a poziomem 5-hmC. Wyniki okazały się jednak niejednoznaczne. W wielu pracach stwierdzono, że nie ma różnic w poziomie 5-hmC w glejakiach charakteryzujących się mutacją *IDH1* w porównaniu z glejakami bez mutacji w tym genie [46,70,78]. Również w glejaku wielopostaciowym nie potwierdzono takiej zależności. Stwierdzono natomiast, że taka zależność istnieje w przypadku gwiaździka rozlanego i anaplastycznego [60]. Badania glejaków sugerują korelację między poziomem 5-hmC a TET1 i jego jądrowym umiejscowieniem. Zaobserwowano, że 70% glejaków niewykazujących obecności 5-hmC charakteryzuje się brakiem wykrywalnego poziomu TET1 lub tylko jego cytoplazmatyczną ekspresją [70].

Obniżenie stężenia 5-hmC jest również charakterystyczne dla wielu innych nowotworów, np. piersi, jelita grubego, wątroby, płuc, stercza, trzustki [21,32,46,58,103,111]. Wyniki wielu badań sugerują, iż spadek ten jest skorelowany ze zmniejszonym poziomem ekspresji genów *TET*, szczególnie *TET1* [21,52,58,103]. W raku żołądka oprócz obniżenia ekspresji *TET1*, stwierdzono również obniżenie ekspresji *TET2*, *TET3*, *TDG* i *IDH2*, ale tylko w przypadku *TET1*, obserwowano pozytywną korelację z poziomem 5-hmC [21]. Obniżona ekspresja genów *TET* (szczególnie *TET2*) oraz *IDH2* wydaje się głównym mechanizmem odpowiedzialnym za spadek poziomu 5-hmC w czerniaku [56]. Zupełnie odmienne rezultaty uzyskano jednak w przypadku nowotworu łagodnego macicy – mięśniaka gładkokomórkowego. Ekspresja *TET1* i *TET3* zarówno na poziomie mRNA, jak i białka była wyższa w tkance zmienionej nowotworowo w porównaniu z tkanką prawidłową. Z podwyższonym poziomem *TET* korelował wzrost poziomu 5-hmC [73].

## BIĄŁKA TET JAKO SUPRESORY NOWOTWORÓW

To, że w wielu nowotworach geny *TET* ulegają mutacjom lub ich ekspresja jest obniżona wskazuje, że mogą one pełnić rolę genów supresorowych (ryc. 4). Wyniki kilku badań wydają się potwierdzać tę hipotezę [56,94,96]. Hsu i wsp. wykorzystując przeszczepy ludzkich komórek raka piersi lub stercza implantowane myszom pozbawionym grasicy stwierdzili, że obniżona ekspresja *TET1* wiąże się ze wzrostem guza oraz zdolnością komórek do inwazji i przerzutowania [38]. Analiza materiału klinicznego pacjentów z nowotworem piersi wykazała, że obniżony poziom mRNA *TET1* koreluje ze wzrostem zaawansowania nowotworu i niekorzystnym rokowaniem dla pacjenta [38]. Autorzy wykazali także, że *TET1* hamuje inwazyjność komórek nowotworowych wpływając na zwiększenie ekspresji genów kodujących tkankowe inhi-

bitory metaloproteinaz (*TIMP*, tissue inhibitors of metalloproteinase) przez zmniejszenie metylacji DNA. Białka *TIMP* zmniejszają aktywność metaloproteinaz, które degradując macierz zewnątrzkomórkową przyczyniają się do inwazji komórek nowotworowych [38].

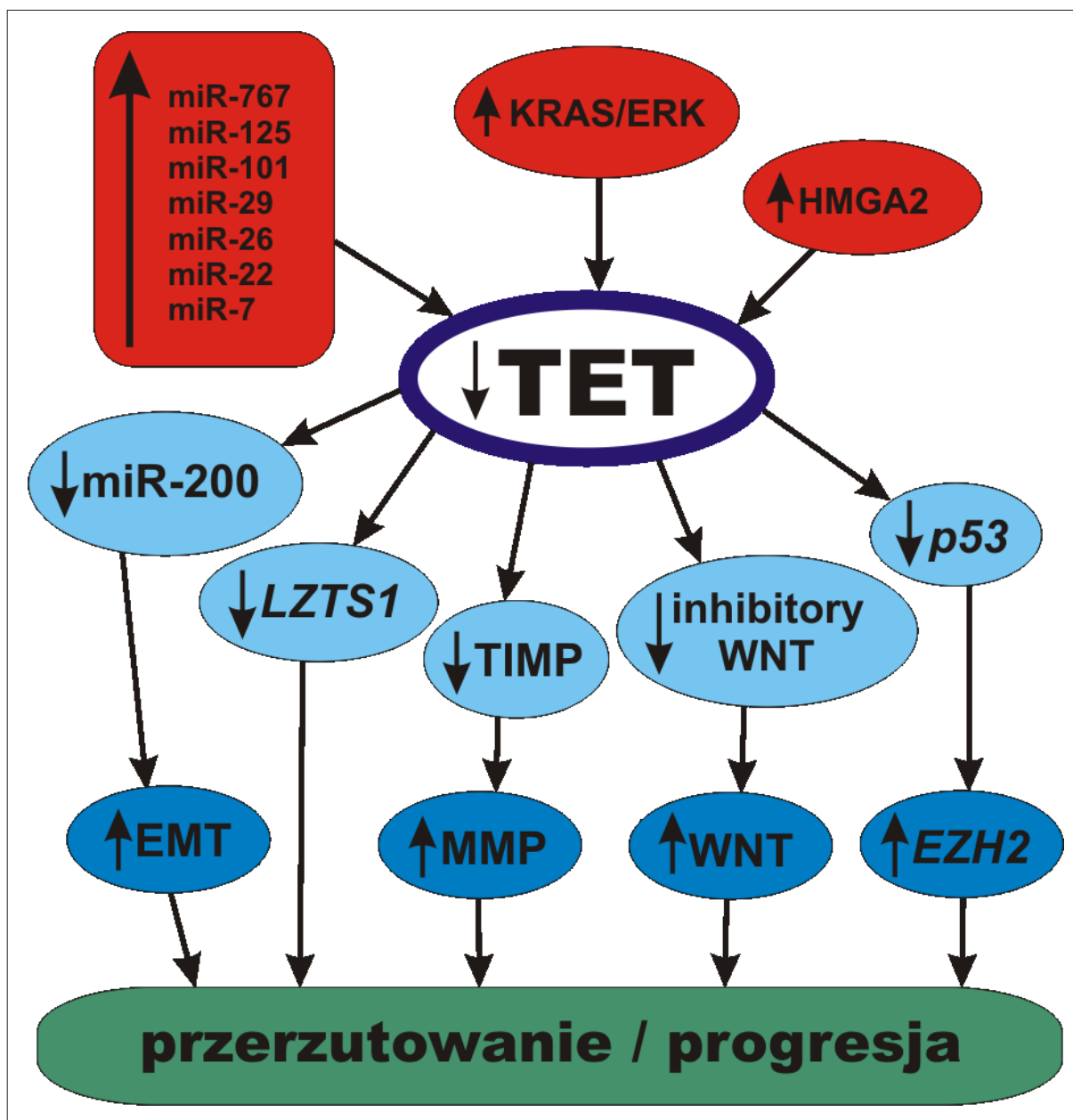
Neri i wsp. sugerują, że *TET1* hamuje rozwój raka jelita grubego przez derepresję inhibitorów szlaku *WNT* [74]. *TET1* wiąże się z promotorem genów *DDK* (Dickkopf *WNT* signaling pathway inhibitor), które kodują inhibitory szlaku *WNT* i powoduje ich hipometylację. Spadek ekspresji *TET1*, który występuje podczas inicjacji karcynogenezy jelita grubego powoduje represję tych genów przez ich metylację, co prowadzi do konstytutywnej aktywacji szlaku *WNT* [74].

Zahamowanie demetylacji DNA na skutek utraty ekspresji *TET1* to główny element zależnej od onkogenu *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene) transformacji komórek nienowotworowych linii *NIH3T3* [106]. Ekspresja *TET1* jest hamowana przez szlak sygnałowy *KRAS/ERK*, dochodzi do obniżenia poziomu 5-hmC oraz wzrostu 5-mC w obrębie niektórych genów, np. genu kodującego kinazę białkową *DAPK* (death-associated protein kinase), genu kodującego metylotransferazę metyloguaninową *MGMT* (O6-methylguanine DNA methyltransferase), genu kodującego dioksygenazę *DUOX1* (dual oxidase 1) [106]. Fu i wsp. stwierdzili, że nadekspresja *TET1* w komórkach raka żołądka linii *MGC-803* powoduje spadek ekspresji *EZH2*, onkogenu odpowiedzialnego za progresję procesu nowotworzenia oraz zwiększa wytwarzanie białka p53, pełniącego funkcję supresora nowotworów [27]. Innym genem, na którego ekspresję mają wpływ białka *TET* jest *LZTS1* (leucine zipper, putative tumor suppressor 1) – supresor nowotworzenia, którego represję obserwuje się w wielu typach komórek zmienionych nowotworowo [8,10,47,76,99,103]. Jego brak jest powiązany z przerzutowaniem do węzłów chłonnych oraz skróconym czasem przeżycia chorych na raka piersi [101]. Odnotowano spadek ekspresji *LZTS1* u pacjentek z rakiem piersi w porównaniu z osobami zdrowymi, czemu towarzyszyło zmniejszenie ekspresji *TET1* oraz niższy poziom 5-hmC w *locus* genu *LZTS1* [103].

Ekspresja genów *TET* może być regulowana przez działanie mikroRNA (*miRNA*; *miR*), które swoiście inaktywują mRNA i tym samym przyczyniają się do zmniejszenia ilości kodowanego przez nie białka. U pacjentów z ostrą białaczką szpikową (*AML*) i bez mutacji w genie *TET2*, odnotowano wzrost ekspresji *miR-125*, *miR-101*, *miR-29*, *miR-26* i *miR-7* czemu towarzyszył spadek poziomu 5-hmC oraz ekspresji wszystkich genów *TET*, a zwłaszcza *TET2* [12]. Podobną zależność między ekspresją określonych *miRNA* a ekspresją *TET* zauważono w innych typach nowotworów. W komórkach czerniaka *miR-767* obniża ekspresję *TET1* i *TET3* [61], a w raku wątrobowokomórkowym *miR-29* wpływa negatywnie na ekspresję *TET1* [57].

Istnieją również doniesienia, że białka *TET* mogą regulować ekspresję niektórych *miRNA*. Do takich *miRNA* należy *miR-200*, którego funkcją jest hamowanie ekspre-





**Ryc. 4.** Białka TET a progresja nowotworów; zmniejszona ekspresja genów *TET*, którą stwierdza się w wielu typach nowotworów, może być spowodowana m.in. przez oddziaływanie określonych microRNA lub czynników, takich jak *KRAS/ERK* czy *HMGA2*. Obniżone stężenie białek TET może spowodować wzrost progresji i przerzutowanie nowotworów przez zmniejszenie ekspresji genów supresorowych (*p53*, *LZTS1*), obniżone wytwarzanie tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (*TIMP*), inhibitorów szlaku WNT i supresorowego microRNA (*miR-200*) oraz przez zwiększenie ekspresji *EZH2* i wytwarzanie metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (*MMP*), a także przez nasiloną ekspresję genów kodujących czynniki biorące udział w przejściu epithelialno-mezenchymalnym (*EMT*)

sji głównych czynników biorących udział w przejściu epithelialno-mezenchymalnym. MiR-200 jest antagonistą proonkogenego miR-22, którego zwiększoną ekspresję obserwuje się w komórkach białaczkowych [93] i komórkach raka piersi [94]. Wzrost stężenia miR-22 w komórkach raka piersi powoduje spadek ekspresji *TET*, co prowadzi do wzrostu metylacji regionu promotorowego i obniża ekspresję miR-200. Skutkiem obniżenia ekspresji miR-200 jest zwiększenie zdolności komórek nowotworowych do przerzutowania [93,94].

Na aktywność *TET1* w komórkach ma wpływ czynnik remodelujący chromatinę *HMGA2* (high mobility group AT-hook2). Czynnikiem ten cechuje się niewielką ekspresją w komórkach somatycznych, natomiast wysoką w przypadku komórek ESC oraz komórek nowotworowych. *HMG2* zmniejsza ekspresję *TET1* oraz niektórych genów homeotycznych (*HOXA7* i *HOXA9*), co prowadzi do zwiększenia ekspresji genów zaangażowanych w proces nowotworzenia. Wyciszenie *HMGA2* w komórkach raka piersi powoduje wzrost ekspresji *TET1* i *HOXA7/9*, zmniejszając

zdolność komórek nowotworowych do wzrostu i przetrwania [96].

## UWAGI KOŃCOWE

Badanie mechanizmów związanych z utrzymaniem prawidłowego wzoru modyfikacji epigenetycznych ma ogromne znaczenie dla pełnego zrozumienia mechanizmu procesu transformacji nowotworowej. Wyniki wielu badań potwierdziły znaczącą rolę białek TET w demetylacji DNA i ich związek ze zmianami wzoru metylacji

DNA w nowotworach. Jednak udział TET w regulacji ekspresji genów nie ogranicza się tylko do ich katalitycznej aktywności. Represja lub aktywacja wielu genów może zależeć od interakcji TET z białkami wchodzącymi w skład różnych kompleksów odpowiedzialnych za modyfikacje histonów oraz remodelowanie chromatyny. Biorąc pod uwagę liczne doniesienia sugerujące rolę TET w procesie powstawania i progresji nowotworów poznanie tych interakcji jest bardzo ważne ze względu na możliwość stworzenia nowych celów dla epigenetycznych terapii przeciwnowotworowych.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Abbas S., Lugthart S., Kavelaars F.G., Schelen A., Koenders J.E., Zeilemaker A., van Putten W.J., Rijneveld A.W., Löwenberg B., Valk P.J.: Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Blood*, 2010; 116: 2122-2126
- [2] Abdel-Wahab O., Mullally A., Hedvat C., Garcia-Manero G., Patel J., Wadleigh M., Malinger S., Yao J., Kilpivaara O., Bhat R., Huberman K., Thomas S., Dolgalev I., Heguy A., Paietta E. i wsp.: Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*, 2009; 114: 144-147
- [3] Bacher U., Haferlach C., Schnittger S., Kohlmann A., Kern W., Haferlach T.: Mutations of the *TET2* and *CBL* genes: novel molecular markers in myeloid malignancies. *Ann. Hematol.*, 2010; 89: 643-652
- [4] Bhutani N., Burns D.M., Blau H.M.: DNA demethylation dynamics. *Cell*, 2011; 146: 866-872
- [5] Blaschke K., Ebata K.T., Karimi M.M., Zepeda-Martínez 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
- [6] Booth M.J., Branco M.R., Ficiz G., Oxley D., Krueger F., Reik W., Balasubramanian S.: Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution. *Science*, 2012; 336: 934-937
- [7] Butkinaree C., Park K., Hart G.W.: O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010; 1800: 96-106
- [8] Califano D., Pignata S., Pisano C., Gregg S., Laurelli G., Losito N.S., Ottaiano A., Gallipoli A., Pasquinelli R., De Simone V., Cirombella R., Fusco A., Chiappetta G.: FEZ1/LZTS1 protein expression in ovarian cancer. *J. Cell. Physiol.*, 2010; 222: 382-386
- [9] Cartron P.F., Nadaradjane A., Lepape F., Lalier L., Gardie B., Vallette F.M.: Identification of TET1 partners that control its DNA-demethylating function. *Genes Cancer*, 2013; 4: 235-241
- [10] Chen L., Zhu Z., Sun X., Dong X.Y., Wei J., Gu F., Sun Y.L., Zhou J., Dong J.T., Fu L.: Down-regulation of tumor suppressor gene FEZ1/LZTS1 in breast carcinoma involves promoter methylation and associates with metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2009; 116: 471-478
- [11] Chen Q., Chen Y., Bian C., Fujiki R., Yu X.: TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature*, 2013; 493: 561-564
- [12] Cheng J., Guo S., Chen S., Mastriano S.J., Liu C., D'Alessio A.C., Hysolli E., Guo Y., Yao H., Megyola C.M., Li D., Liu J., Pan W., Roden C.A., Zhou X.L. i wsp.: An extensive network of TET2-targeting microRNAs regulates malignant hematopoiesis. *Cell Rep.*, 2013; 5: 471-481
- [13] Chotirat S., Thongnoppakhun W., Wanachiwanawin W., Auewarakul C.U.: Acquired somatic mutations of isocitrate dehydrogenases 1 and 2 (*IDH1* and *IDH2*) in preleukemic disorders. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2015; 54: 286-291
- [14] 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. i wsp.: Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell*, 2011; 146: 67-79
- [15] Dang L., Jin S., Su S.M.: *IDH* mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends Mol. Med.*, 2010; 16: 387-397
- [16] Dawson M.A., Kouzarides T.: Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*, 2012; 150: 12-27
- [17] de Queiroz R.M., Carvalho E., Dias W.B.: O-GlcNAcylation: the sweet side of the cancer. *Front. Oncol.*, 2014; 4: 132
- [18] Delatte B., Fuks F.: TET proteins: on the frenetic hunt for new cytosine modifications. *Brief. Funct. Genomics*, 2013; 12: 191-204
- [19] Delhommeau F., Dupont S., Della Valle V., James C., Trannoy S., Massé A., Kosmider O., Le Couedic J.P., Robert F., Alberdi A., Lécluse Y., Plo I., Dreyfus F.J., Marzac C., Casadevall N. i wsp.: Mutation in *TET2* in myeloid cancers. *N. Engl. J. Med.*, 2009; 360: 2289-2301
- [20] Deplus R., Delatte B., Schwinn M.K., Defrance M., Méndez J., Murphy N., Dawson M.A., Volkmar M., Putmans P., Calonne E., Shih A.H., Levine R.L., Bernard O., Mercher T., Solary E. i wsp.: TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS. *EMBO J.*, 2013; 32: 645-655
- [21] Du C., Kurabe N., Matsushima Y., Suzuki M., Kahyo T., Ohnishi I., Tanioka F., Tajima S., Goto M., Yamada H., Tao H., Shinmura K., Konno H., Sugimura H.: Robust quantitative assessments of cytosine modifications and changes in the expressions of related enzymes in gastric cancer. *Gastric Cancer*, 2015; 18: 516-525
- [22] Fardini Y., Dehennaut V., Lefebvre T., Issad T.: O-GlcNAcylation: a new cancer hallmark? *Front. Endocrinol.*, 2013; 4: 99
- [23] 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
- [24] Figueroa M.E., Abdel-Wahab O., Lu C., Ward P.S., Patel J., Shih A., Li Y., Bhagwat N., Vasanthakumar A., Fernandez H.F., Tallman M.S., Sun Z., Wolniak K., Peeters J.K., Liu W. i wsp.: Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*, 2010; 18: 553-567
- [25] Fong J.J., Nguyen B.L., Bridger R., Medrano E.E., Wells L., Pan S., Sifers R.N.:  $\beta$ -N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) is a novel regulator of mitosis-specific phosphorylations on histone H3. *J. Biol. Chem.*, 2012; 287: 12195-12203
- [26] Frauer C., Hoffmann T., Bultmann S., Casa V., Cardoso M.C., An-

- tes I., Leonhardt H.: Recognition of 5-hydroxymethylcytosine by the Uhrf1 SRA domain. *PLoS One*, 2011; 6: e21306
- [27] Fu H.L., Ma Y., Lu L.G., Hou P., Li B.J., Jin W.L., Cui D.X.: TET1 exerts its tumor suppressor function by interacting with p53-EZH2 pathway in gastric cancer. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2014; 10: 1217-1230
- [28] Fujiki R., Hashiba W., Sekine H., Yokoyama A., Chikanishi T., Ito S., Imai Y., Kim J., He H.H., Igarashi K., Kanno J., Ohtake F., Kitagawa H., Roeder R.G., Brown M. i wsp.: GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature*, 2011; 480: 557-560
- [29] Globisch D., Münzel M., Müller M., Michalakis 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
- [30] 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
- [31] Gutierrez-Arcelus M., Lappalainen T., Montgomery S.B., Buil A., Ongen H., Yurovsky A., Bryois J., Giger T., Romano L., Planchon A., Falconnet E., Bielser D., Gagnebin M., Padioleau I., Borel C. i wsp.: Passive and active DNA methylation and the interplay with genetic variation in gene regulation. *Elife*, 2013; 2: e00523
- [32] Haffner M.C., Chauv A., Meeker A.K., Esopi D.M., Gerber J., Pella-kuru L.G., Toubaji A., Argani P., Iacobuzio-Donahue C., Nelson W.G., Netto G.J., De Marzo A.M., Yegnasubramanian S.: Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. *Oncotarget*, 2011; 2: 627-637
- [33] Hanover J.A., Krause M.W., Love D.C.: The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010; 1800: 80-95
- [34] Hart G.W., Slawson C., Ramirez-Correa G., Lagerlof O.: Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 2011; 80: 825-858
- [35] Hashimoto H., Liu Y., Upadhyay A.K., Chang Y., Howerton S.B., Vertino P.M., Zhang X., Cheng X.: Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res.*, 2012; 40: 4841-4849
- [36] Hashimoto H., Zhang X., Cheng X.: Excision of thymine and 5-hydroxymethyluracil by the MBD4 DNA glycosylase domain: structural basis and implications for active DNA demethylation. *Nucleic Acids Res.*, 2012; 40: 8276-8284
- [37] 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. i wsp.: Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*, 2011; 333: 1303-1307
- [38] 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
- [39] Huang Y., Chavez L., Chang X., Wang X., Pastor W.A., Kang J., Zepeda-Martínez J.A., Pape U.J., Jacobsen S.E., Peters B., Rao A.: Distinct roles of the methylcytosine oxidases Tet1 and Tet2 in mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014; 111: 1361-1366
- [40] Huang Y., Rao A.: Connections between TET proteins and aberrant DNA modification in cancer. *Trends Genet.*, 2014; 30: 464-474
- [41] 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
- [42] Ito R., Katsura S., Shimada H., Tsuchiya H., Hada M., Okumura T., Sugawara A., Yokoyama A.: TET3-OGT interaction increases the stability and the presence of OGT in chromatin. *Genes Cells*, 2014; 19: 52-65
- [43] 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
- [44] Ito S., Shen L., Dai Q., Wu S.C., Collins L.B., Swenberg J.A., He C., Zhang Y.: Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*, 2011; 333: 1300-1303
- [45] Jankowska A.M., Szpurka H., Tiu R.V., Makishima H., Afable M., Huh J., O'Keefe C.L., Ganetzky R., McDevitt M.A., Maciejewski J.P.: Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2009; 113: 6403-6410
- [46] Jin S.G., Jiang Y., Qiu R., Rauch T.A., Wang Y., Schackert G., Krex D., Lu Q., Pfeifer G.P.: 5-Hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with IDH1 mutations. *Cancer Res.*, 2011; 71: 7360-7365
- [47] Knowles M.A., Aveyard J.S., Taylor C.F., Harnden P., Bass S.: Mutation analysis of the 8p candidate tumour suppressor genes DBC2 (RHOBTB2) and LZTS1 in bladder cancer. *Cancer Lett.*, 2005; 225: 121-130
- [48] Ko M., Bandukwala H.S., An J., Lamperti E.D., Thompson E.C., Hastie R., Tsangaratou A., Rajewsky K., Koralov S.B., Rao A.: Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 14566-14571
- [49] 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
- [50] Kraus T.F., Globisch D., Wagner M., Eigenbrod S., Widmann D., Münzel M., Müller M., Pfaffeneder T., Hackner B., Feiden W., Schüller U., Carell T., Kretzschmar H.A.: Low values of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), the "sixth base," are associated with anaplasia in human brain tumors. *Int. J. Cancer*, 2012; 131: 1577-1590
- [51] Kriaucionis S., Heintz N.: The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*, 2009; 324: 929-930
- [52] Kudo Y., Tateishi K., Yamamoto K., Yamamoto S., Asaoka Y., Ijichi H., Nagae G., Yoshida H., Aburatani H., Koike K.: Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Sci.*, 2012; 103: 670-676
- [53] Langemeijer S.M., Aslanyan M.G., Jansen J.H.: TET proteins in malignant hematopoiesis. *Cell Cycle*, 2009; 8: 4044-4048
- [54] Li W., Liu M.: Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues. *J. Nucleic Acids*, 2011; 2011: 870726
- [55] Li Z., Cai X., Cai C.L., Wang J., Zhang W., Petersen B.E., Yang F.C., Xu M.: Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood*, 2011; 118: 4509-4518
- [56] 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
- [57] Lin L.L., Wang W., Hu Z., Wang L.W., Chang J., Qian H.: Negative feedback of miR-29 family TET1 involves in hepatocellular cancer. *Med. Oncol.*, 2014; 31: 291
- [58] Liu C., Liu L., Chen X., Shen J., Shan J., Xu Y., Yang Z., Wu L., Xia F., Bie P., Cui Y., Bian X.W., Qian C.: Decrease of 5-hydroxymethylcytosine is associated with progression of hepatocellular carcinoma through downregulation of TET1. *PLoS One*, 2013; 8: e62828
- [59] Liu X., Zhang G., Yi Y., Xiao L., Pei M., Liu S., Luo Y., Zhong H., Xu Y., Zheng W., Shen J.: Decreased 5-hydroxymethylcytosine levels are associated with TET2 mutation and unfavorable overall survival in myelodysplastic syndromes. *Leuk. Lymphoma*, 2013; 54: 2466-2473

- [60] Liu Y., Jiang W., Liu J., Zhao S., Xiong J., Mao Y., Wang Y.: *IDH1* mutations inhibit multiple  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenase activities in astrogloma. *J. Neurooncol.*, 2012; 109: 253-260
- [61] Lorient A., Van Tongelen A., Blanco J., Klaessens S., Cannuyer J., van Baren N., Decottignies A., De Smet C.: A novel cancer-germline transcript carrying pro-metastatic miR-105 and *TET*-targeting miR-767 induced by DNA hypomethylation in tumors. *Epigenetics*, 2014; 9: 1163-1171
- [62] Lorsbach R.B., Moore J., Mathew S., Raimondi S.C., Mukatira S.T., Downing J.R.: *TET1*, a member of a novel protein family, is fused to *MLL* in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). *Leukemia*, 2003; 17: 637-641
- [63] Ma Z., Vosseller K.: *O*-GlcNAc in cancer biology. *Amino Acids*, 2013; 45: 719-733
- [64] Maiti A., Drohat A.C.: Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 35334-35338
- [65] Marcucci G., Maharry K., Wu Y.Z., Radmacher M.D., Mrózek K., Margeson D., Holland K.B., Whitman S.P., Becker H., Schwind S., Metzeler K.H., Powell B.L., Carter T.H., Kollitz J.E., Wetzler M. i wsp.: *IDH1* and *IDH2* gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J. Clin. Oncol.*, 2010; 28: 2348-2355
- [66] McKenney A.S., Levine R.L.: Isocitrate dehydrogenase mutations in leukemia. *J. Clin. Invest.*, 2013; 123: 3672-3677
- [67] Mellén M., Ayata P., Dewell S., Kriaucionis S., Heintz N.: MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell*, 2012; 151: 1417-1430
- [68] 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
- [69] 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
- [70] Müller T., Gessi M., Waha A., Isselstein L.J., Luxen D., Freihoff D., Freihoff J., Becker A., Simon M., Hammes J., Denkhauß D., zur Mühlen A., Pietsch T., Waha A.: Nuclear exclusion of *TET1* is associated with loss of 5-hydroxymethylcytosine in *IDH1* wild-type gliomas. *Am. J. Pathol.*, 2012; 181: 675-683
- [71] Müller U., Bauer C., Siegl M., Rottach A., Leonhardt H.: *TET*-mediated oxidation of methylcytosine causes TDG or NEIL glycosylase dependent gene reactivation. *Nucleic Acids Res.*, 2014; 42: 8592-8604
- [72] Nakajima H., Kunimoto H.: *TET2* as an epigenetic master regulator for normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Sci.*, 2014; 105: 1093-1099
- [73] Navarro A., Yin P., Ono M., Monsivais D., Moravek M.B., Coon J.S.5th, Dyson M.T., Wei J.J., Bulun S.E.: 5-Hydroxymethylcytosine promotes proliferation of human uterine leiomyoma: a biological link to a new epigenetic modification in benign tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2014; 99: E2437-E2445
- [74] Neri F., Dettori D., Incarnato D., Krepelova A., Rapelli S., Maldotti M., Parlato C., Paliogiannis P., Oliviero S.: *TET1* is a tumour suppressor that inhibits colon cancer growth by derepressing inhibitors of the *WNT* pathway. *Oncogene*, 2015; 34: 4168-4176
- [75] Niehrs C., Schäfer A.: Active DNA demethylation by Gadd45 and DNA repair. *Trends Cell Biol.*, 2012; 22: 220-227
- [76] Nonaka D., Fabbri A., Roz L., Mariani L., Vecchione A., Moore G.W., Tavecchio L., Croce C.M., Sozzi G.: Reduced FEZ1/LZTS1 expression and outcome prediction in lung cancer. *Cancer Res.*, 2005; 65: 1207-1212
- [77] Ooi S.K., O'Donnell A.H., Bestor T.H.: Mammalian cytosine methylation at a glance. *J. Cell Sci.*, 2009; 122: 2787-2791
- [78] Orr B.A., Haffner M.C., Nelson W.G., Yegnasubramanian S., Ebnerhart C.G.: Decreased 5-hydroxymethylcytosine is associated with neural progenitor phenotype in normal brain and shorter survival in malignant glioma. *PLoS One*, 2012; 7: e41036
- [79] Ozcan S., Andrali S.S., Cantrell J.E.: Modulation of transcription factor function by *O*-GlcNAc modification. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010; 1799: 353-364
- [80] Parsons D.W., Jones S., Zhang X., Lin J.C., Leary R.J., Angenendt P., Mankoo P., Carter H., Siu I.M., Gallia G.L., Olivi A., McLendon R., Rasheed B.A., Keir S., Nikolskaya T. i wsp.: An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 2008; 321: 1807-1812
- [81] Paschka P., Schlenk R.F., Gaidzik V.I., Habdank M., Krönke J., Bullinger L., Späth D., Kayser S., Zucknick M., Götze K., Horst H.A., Germing U., Döhner H., Döhner K.: *IDH1* and *IDH2* mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with *NPM1* mutation without *FLT3* internal tandem duplication. *J. Clin. Oncol.*, 2010; 28: 3636-3643
- [82] 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
- [83] Pérez C., Martínez-Calle N., Martín-Subero J.I., Segura V., Delabesse E., Fernandez-Mercado M., Garate L., Alvarez S., Rifon J., Varea S., Boulwood J., Wainscoat J.S., Cruz Cigudosa J., Calasanz M.J., Cross N.C. i wsp.: *TET2* mutations are associated with specific 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine profiles in patients with chronic myelomonocytic leukemia. *PLoS One*, 2012; 7: e31605
- [84] Pollyea D.A., Kohrt H.E., Zhang B., Zehnder J., Schenkein D., Fantin V., Straley K., Vasanthakumar A., Abdel-Wahab O., Levine R., Godley L.A., Medeiros B.C.: 2-Hydroxyglutarate in *IDH* mutant acute myeloid leukemia: predicting patient responses, minimal residual disease and correlations with methylcytosine and hydroxymethylcytosine levels. *Leuk. Lymphoma*, 2013; 54: 408-410
- [85] Quivoron C., Couronné L., Della Valle V., Lopez C.K., Plo I., Wagner-Ballon O., Do Cruzeiro M., Delhommeau F., Arnulf B., Stern M.H., Godley L., Opolon P., Tilly H., Solary E., Duffourd Y. i wsp.: *TET2* inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell*, 2011; 20: 25-38
- [86] 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
- [87] Rampal R., Alkalin A., Madzo J., Vasanthakumar A., Pronier E., Patel J., Li Y., Ahn J., Abdel-Wahab O., Shih A., Lu C., Ward P.S., Tsai J.J., Hricik T., Tosello V. i wsp.: DNA hydroxymethylation profiling reveals that *WT1* mutations result in loss of *TET2* function in acute myeloid leukemia. *Cell Rep.*, 2014; 9: 1841-1855
- [88] Ruan H.B., Singh J.P., Li M.D., Wu J., Yang X.: Cracking the *O*-GlcNAc code in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2013; 24: 301-309
- [89] Sakabe K., Wang Z., Hart G.W.:  $\beta$ -*N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) is part of the histone code. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 19915-19920
- [90] Sarkies P., Sale J.E.: Cellular epigenetic stability and cancer. *Trends Genet.*, 2012; 28: 118-127
- [91] Sharma S., Kelly T.K., Jones P.A.: Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 2010; 31: 27-36
- [92] Shi F.T., Kim H., Lu W., He Q., Liu D., Goodell M.A., Wan M., Songyang Z.: Ten-eleven translocation 1 (*Tet1*) is regulated by *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase (*Ogt*) for target gene repression in mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.*, 2013; 288: 20776-20784
- [93] Song S.J., Ito K., Ala U., Kats L., Webster K., Sun S.M., Jongen-

- Lawrencic M., Manova-Todorova K., Teruya-Feldstein J., Avigan D.E., Delwel R., Pandolfi P.P.: The oncogenic microRNA miR-22 targets the TET2 tumor suppressor to promote hematopoietic stem cell self-renewal and transformation. *Cell Stem Cell*, 2013; 13: 87-101
- [94] Song S.J., Poliseno L., Song M.S., Ala U., Webster K., Ng C., Beringer G., Brikbak N.J., Yuan X., Cantley L.C., Richardson A.L., Pandolfi P.P.: MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET family dependent chromatin remodeling. *Cell*, 2013; 154: 311-324
- [95] 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
- [96] Sun M., Song C.X., Huang H., Frankenberger C.A., Sankarasharma D., Gomes S., Chen P., Chen J., Chada K.K., He C., Rosner M.R.: HMG2/TET1/HOXA9 signaling pathway regulates breast cancer growth and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013; 110: 9920-9925
- [97] Suvà M.L., Riggi N., Bernstein B.E.: Epigenetic reprogramming in cancer. *Science*, 2013; 339: 1567-1570
- [98] 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
- [99] Vecchione A., Croce C.M., Baldassarre G.: *Fez1/Lzts1* a new mitotic regulator implicated in cancer development. *Cell Div.*, 2007; 2: 24
- [100] Vella P., Scelfo A., Jammula S., Chiacchiera F., Williams K., Cuomo A., Roberto A., Christensen J., Bonaldi T., Helin K., Pasini D.: Tet proteins connect the O-linked N-acetylglucosamine transferase Ogt to chromatin in embryonic stem cells. *Mol. Cell*, 2013; 49: 645-656
- [101] Wang X.X., Zhu Z., Su D., Lei T., Wu X., Fan Y., Li X., Zhao J., Fu L., Dong J.T., Fu L.: Down-regulation of leucine zipper putative tumor suppressor 1 is associated with poor prognosis, increased cell motility and invasion, and epithelial-to-mesenchymal transition characteristics in human breast carcinoma. *Hum. Pathol.*, 2011; 42: 1410-1419
- [102] Wen L., Tang F.: Genomic distribution and possible functions of DNA hydroxymethylation in the brain. *Genomics*, 2014; 104: 341-346
- [103] Wielscher M., Liou W., Pulverer W., Singer C.F., Rappaport-Fuerhauser C., Kandioler D., Egger G., Weinhäusel A.: Cytosine 5-hydroxymethylation of the *LZTS1* gene is reduced in breast cancer. *Transl. Oncol.*, 2013; 6: 715-721
- [104] Williams K., Christensen J., Pedersen M.T., Johansen J.V., Cloos P.A., Rappasilber J., Helin K.: TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature*, 2011; 473: 343-348
- [105] Wossidlo M., Nakamura T., Lepikhov K., Marques C.J., Zakhartchenko V., Boiani M., Arand J., Nakano T., Reik W., Walter J.: 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat. Commun.*, 2011; 2: 241
- [106] Wu B.K., Brenner C.: Suppression of TET1-dependent DNA demethylation is essential for KRAS-mediated transformation. *Cell Rep.*, 2014; 9: 1827-1840
- [107] 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
- [108] 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  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*, 2011; 19: 17-30
- [109] 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. i wsp.: Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell*, 2011; 42: 451-464
- [110] Yan H., Parsons D.W., Jin G., McLendon R., Rasheed B.A., Yuan W., Kos I., Batinic-Haberle I., Jones S., Riggins G.J., Friedman H., Friedman A., Reardon D., Herndon J., Kinzler K.W. i wsp.: *IDH1* and *IDH2* mutations in gliomas. *N. Engl. J. Med.*, 2009; 360: 765-773
- [111] Yang H., Liu Y., Bai F., Zhang J.Y., Ma S.H., Liu J., Xu Z.D., Zhu H.G., Ling Z.Q., Ye D., Guan K.L., Xiong Y.: Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. *Oncogene*, 2013; 32: 663-669
- [112] 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
- [113] You J.S., Jones P.A.: Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell*, 2012; 22: 9-20
- [114] 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
- [115] Zhang Q., Liu X., Gao W., Li P., Hou J., Li J., Wong J.: Differential regulation of the ten-eleven translocation (TET) family of dioxygenases by O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine transferase (OGT). *J. Biol. Chem.*, 2014; 289: 5986-5996

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.