

# ГЕНИ *TET* – НОВІ ЕПІРЕГУЛЯТОРИ У ПРОГРЕСІЇ МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНИХ І СОЛІДНИХ НОВОУТВОРЕНЬ

**Ключові слова:** *TET* (*ten-eleven translocation*) гени, 5-метилцитозин (5mC), 5-гідроксиметилцитозин (5hmC), пухлиноасоційовані стовбурові клітини, плюрипотентність.

*TET* (*ten-eleven translocation*)-білки належать до нових клітинних епірегуляторів, що асоціюються з плюрипотентністю пухлинної прогресії. Гени *TET* (*TET1*, *TET2*, *TET3*) та відповідні білки, що їх кодують, виконують потенційну роль у регуляції балансу ДНК-метилування/деметилування, основною функцією яких є оксигеназна конверсія 5-метилцитозину (5mC) в 5-гідроксиметилцитозин (5hmC). Наразі це набуває великого значення в канцерогенезі. За одним механізмом *TET*-епірегуляторні гени асоціюються з набутими мутаціями чи аберантним промоторним метилуванням та, як наслідок, інгібуванням експресії генів *TET*, провокуючи стадію пухлинної прогресії, що на прикладі низки мієлопроліферативних захворювань не завжди пов'язане з малігнізацією. Інший механізм гіперекспресії генів *TET* асоціюється з плюрипотентністю ембріональних стовбурових клітин (для *TET1*-, *TET2*-, *TET3*-генів), гемопоетичних стовбурових клітин (для *TET2*-гена) та пухлиноасоційованих стовбурових клітин, що має безпосередній зв'язок зі стадією малігнізації (для *TET1*-, *TET2*-, *TET3*-генів). Пізнання епігенетичних механізмів регуляції генів *TET*, вірогідно, відкриває шляхи до біологічного контролю пухлинної прогресії.

## ВСТУП

На сьогодні епігенетичні механізми канцерогенезу набувають важливого значення та нового змісту [1, 2]. Зокрема, відкриті генетичні мутації в таких епімутаторних генах, як *TET2*, *IDH1*, *IDH2*, *EZH2*, *DNMT3A*, які у патогенезі лейкемії безпосередньо асоціюються з регуляцією контролю геномного ДНК-метилування [3]. Ферменти, що беруть участь у процесах метилування та деметилування цитозину в ДНК, активно вивчаються. Значний інтерес зумовлений тим, що зміни в нормальному функціонуванні цих білків відзначають при злоякісних новоутвореннях — як гемобластозах, так і солідних пухлинах. Ключовими є білки родини *TET* (*ten-eleven translocation*) [4]. Головна функція *TET*-білків — їхня 5-метилцитозин-оксигеназна ферментативна активність, що сприяє конверсії 5-метилцитозину (5mC) до 5-гідроксиметилцитозину (5hmC), ключового інтермедіатора в подальшому процесі до деметильованого цитозину [5].

Особливу роль *TET*-білки, гени *TET1*, *TET2*, *TET3*, відіграють у ембріональному розвитку [6], диференціації тканин [7] і гемопоезі [8]. Висока активність генів *TET* і, відповідно, вищий відсоток 5hmC у ДНК відзначають в ембріональних стовбурових клітинах (ЕСК) і гемопоетичних стовбурових клітинах (ГСК). Рівень експресії генів родини *TET* значно знижується в процесі диференціації клітин [9]. Таким чином, білки *TET* можуть бути важливими епірегуляторами в диференціації клітин; пригнічення їхньої активності призводить до порушень диферен-

ціації та неконтрольованої проліферації клітин, що й відбувається при злоякісних новоутвореннях [10].

### 1. Активне і пасивне ДНК-деметилування

Метилування ДНК є ключовою епігенетичною модифікацією геному як на рівні хроматину, так і регуляції експресії генів. Статус метилування ДНК забезпечується балансом між метилуванням і деметилуванням у складі CpG-динуклеотидів ДНК повторів і CpG-острівців у регуляторних, зокрема промоторних, ділянках структурних генів, який порушується при канцерогенезі [11]. Процес ДНК-деметилування може бути активним і пасивним [12, 13]. Пасивне CpG-деметилування є постреплікаційним і відбувається тоді, коли 5mC втрачається в процесі послідовних раундів реплікації ДНК у результаті двох імовірних механізмів: порушення активності ДНК-метилтрансферази 1 (DNMT1) та недостатнього забезпечення універсального донора метильних груп — S-аденозилметіоніну (SAM), що підтримують статус метилування ДНК геному. 5hmC, продукт *TET* гідролазних (оксигеназних) ферментів, також не розпізнається постреплікаційною DNMT1 у пасивному ДНК-деметилуванні (рис. 1) [12].

Активне деметилування геному потребує участі ключових ферментів родини *TET* із 5mC-оксигеназною активністю для конверсії 5mC у 5-hmC та подальші проміжні форми — 5-формілцитозин і 5-карбокситозин, які за участю ферментів ДНК-глікозилаз (TDG) і ферментативного механізму ексцизійної репарації основ (BER) перетворюються на неметильований цитозин (рис. 2) [13, 14].

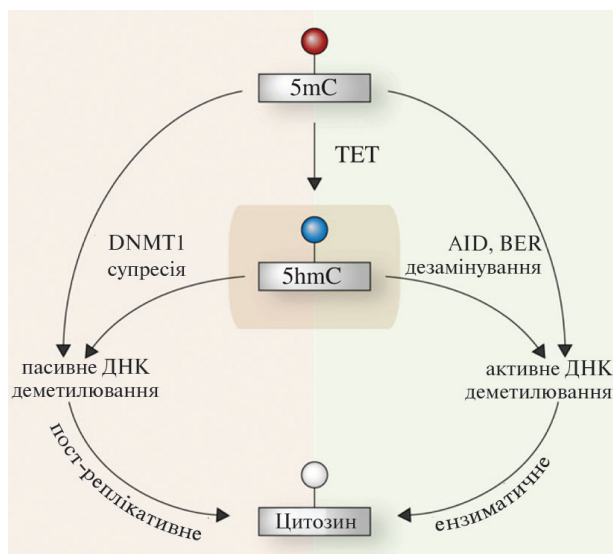


Рис. 1. ТЕТ-білки в динаміці ДНК-метилування/деметилування (адаптовано з: Hackett J.A., Surani M.A., 2013 [12])

Деметилування ДНК може мати *глобальний* характер (ранні етапи ембріогенезу, старіння, канцерогенез) [15–17] або *локусспецифічний* (геномний імпринтинг, інактивация Х-хромосоми, CpG-острівці промоторів регуляторних та онкосупресорних генів) [1, 2, 18].

## 2. Процеси ДНК-деметилування за участю ТЕТ-білків у ембріогенезі

ТЕТ-залежний продукт 5hmC є важливим інтермедіантом у процесах активного ДНК-деметилування, що функціонує впродовж репродуктивних фаз ембріонального розвитку [19]. Глобальна втрата патернів геномного метилування відбувається на ранніх етапах ембріогенезу за рахунок активного деметилування [20]. Одночасно з цією подією здійснюється міграція та поширення примордіальних зародкових клітин, однак певні послідовності (імпринти, CpG-острівці на Х-хромосомі) стають деметильованими лише після входження примордіальних зародкових клітин у гонади (рис. 3). Загалом, в ембріогенезі ссавців відбуваються дві

масштабні хвилі ДНК-деметилування геному — впродовж розвитку зародкових клітин і після запліднення [21].

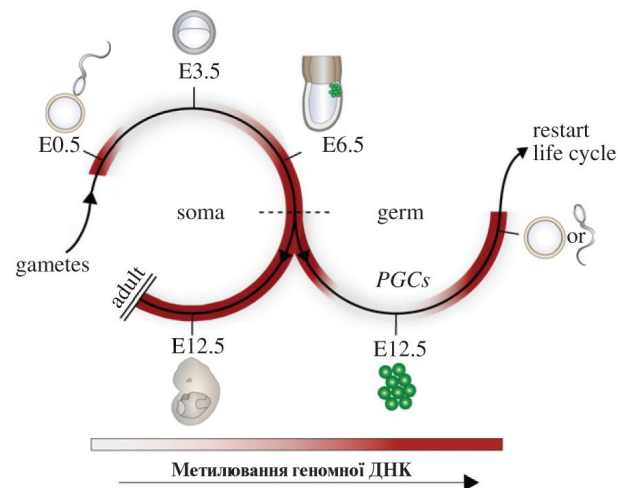


Рис. 3. Глобальна динаміка ДНК-метилування/деметилування в процесах ембріогенезу (адаптовано з: Hackett J.A., Surani M.A., 2013 [12])

Патерн метилування геному встановлюється *de novo* в онтогенезі [20]. Специфічні патерни метилування ДНК підтримуються в поколіннях клітин, забезпечуючи специфічність патерну експресії генів.

Таким чином, при ембріогенезі реалізується послідовне циклічне метилування/деметилування ДНК за безліччю позицій у геномі [22].

Механізм цього процесу такий: спочатку відбувається стирання всіх патернів ДНК-метилування, включаючи гени-імпринти; після запліднення геном зазнає складного ремоделювання, що супроводжується також швидкою втратою статусу метилування гістону H3.3 [23, 24]. Після імплантації певні клітини епібласта стають примордіальними стовбуровими клітинами, в яких проходить стирання патернів ДНК-метилування для їхньої підготовки до мейозу та подальшої диференціації [25, 26].

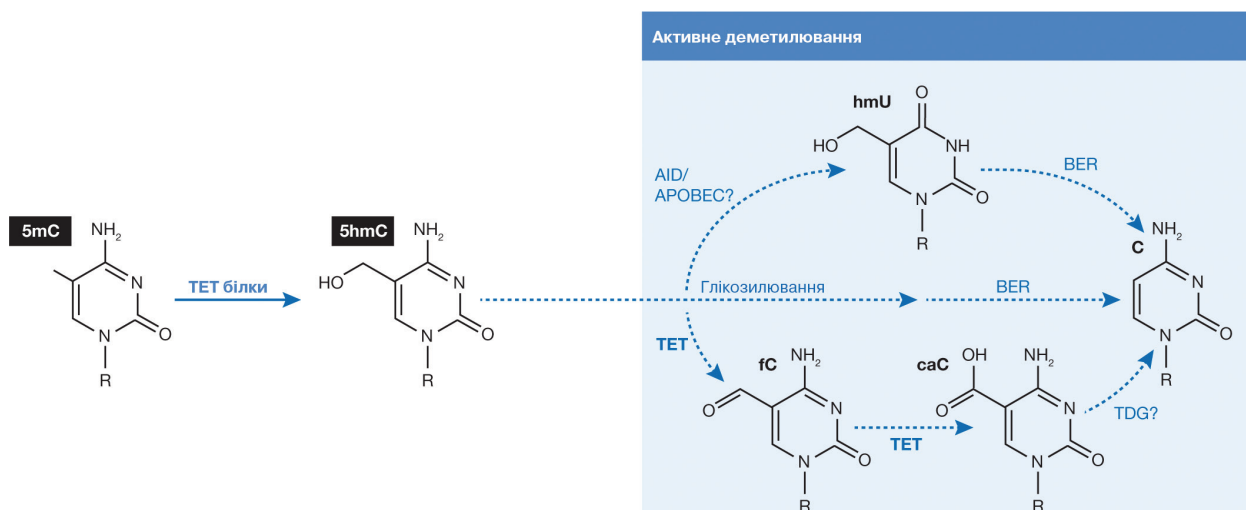


Рис. 2. Активне ферментативне ДНК-деметилування геному (адаптовано з: Williams K. et al., 2012 [43])

На молекулярному рівні описаний процес відбувається за участю ферменту TET3 5-метилцитозин-оксигенази, який окиснює 5mC до 5hmC у батьківському геномі. Продукти окиснення 5mC після реплікації зазнають поступової репарації за рахунок багатоступінчастих ферментативних реакцій (див. рис. 2). На стадії бластоцисти *de novo* метилази DNMT3a та DNMT3b відновлюють патерни метилювання ДНК як у батьківському, так і в материнському геномах. Після імплантації всі тканиноспецифічні CpG-острівці метилюються, хоча більшість CpG-острівців генів «домашнього господарства» захищені від метилювання. У подальшому відбувається локальне деметилювання CpG-острівців при диференціюванні клітин і встановлення гено- та тканиноспецифічних патернів ДНК-метилювання [27].

### 3. Процеси активного ДНК-деметилювання впродовж канцерогенезу

Епігенетичні аберації, асоційовані з появою пухлин, зазвичай являють собою комплекс різноманітних змін [1]. Низький рівень геномного ДНК-метилювання в пухлинах був першим встановленим епігенетичним пухлиноасоційованим маркером злоякісних новоутворень у людини [28]. Цікаво, що пухлини, які походять із різних тканин організму, мають загальний низький рівень 5hmC. Можливо, дедиференційовані клітини втратили здатність підтримувати відповідний біологічний рівень 5hmC [23]. Вчені висунули три основні гіпотези, що пояснюють роль процесів ДНК-гіпометилювання в активації канцерогенезу. Згідно з першою гіпотезою, злоякісне переродження клітини зумовлюється активацією протоонкогенів, таких як c-Myc або Ras, внаслідок їхнього промоторного деметилювання [29, 30]. Відповідно до другої гіпотези, ДНК-гіпометилювання сприяє розвитку у клітинах хромосомної нестабільності [31]. Наслідком такої дестабілізації геному є виникнення анеуплоїдій, дуплікацій, транслокацій, активація мобільних елементів і втрата геномного імпринтингу [32]. Ключовим аспектом зазначених перетворень є пригнічення активності ДНК-метилтрансфераз DNMT1 та DNMT3B, що призводить до гіпометилювання ДНК повторів, сателітних і прицентромерних послідовностей [33]. За третьою гіпотезою, ДНК-гіпометилювання сприяє активації процесів метастазування [34]. При цьому не обов'язково пригнічується активність ДНК-метилтрансфераз; зміна статусу деметилювання може відбуватися за рахунок локальної зміни структури хроматину [35]. Упродовж розвитку пухлини втрата рівня 5mC у геномній ДНК корелює з агресивністю пухлини та її переродженням у злоякісну [36].

Аномальні патерни ДНК-метилювання відзначають як при гемопоетичних неоплазіях, так і при солідних злоякісних новоутвореннях [37]. Часто ці порушення полягають у гіперметилюванні CpG-острівців промоторних ділянок генів-онкосупресорів [38, 39]. Причиною CpG-гіперметилювання

можуть бути розлади, зокрема в роботі TET-білків та асоційованих із ними білків, таких як IDN1/2, у контролі над ДНК-деметилюванням [40]. На користь цієї гіпотези свідчить те, що серед епігенетичних маркерів солідних пухлин також відбувається зниження рівня 5hmC, пов'язане з пригніченням функцій TET2 та інших білків цієї родини, що асоціюється з прогресуванням онкологічного процесу [41].

### 4. Роль TET2 в епігенетичній регуляції шляхом ДНК-деметилювання

Порушення балансу ДНК-метилювання/деметилювання розглядають як ключову подію епігенетичної дерегуляції в канцерогенезі. При злоякісних новоутвореннях виявляють аберантне гіперметилювання промоторних ділянок генів, залучених до онкосупресії. Причиною таких відхилень може бути як посилення діяльності ДНК-метилтрансфераз, так і порушення активності чи пригнічення експресії ДНК-деметилаз, що забезпечують відновлення деметилюваного стану CpG-промоторів [42]. Наразі все більше досліджень спрямовано на виявлення порушень у функціонуванні саме ДНК-деметилюючих ферментів при онкологічному прогресуванні. Однією з основних подій стало відкриття білків родини TET і встановлення їхньої ролі у підтриманні патернів ДНК-метилювання [43].

#### 4.1. Структура та функціональна активність TET-білків

У процесі контролю метилювання та деметилювання ДНК білки родини TET каталізують окиснення 5mC до 5hmC, що є першим кроком у каскаді конверсії метильованого цитозину до деметилюваного [44]. Значний інтерес зумовлений тим, що зміни в нормальному функціонуванні TET-білків спостерігають при злоякісних новоутвореннях — і гематологічних, і солідних.

Родина TET-білків складається з трьох членів: TET1, TET2 та TET3 [45]. Першим був описаний ген *TET1*, виявлений у точці транслокації t(10;11)(q22;q23) при хронічній мієлоїдній лейкемії [46]. Згодом були вивчені гомологічні гени *TET2* та *TET3*. Білки, що є їх продуктами, відрізняються структурою доменів, а також особливостями експресії. В ембріональних і гемопоетичних стовбурових клітинах рівень експресії *TET2* значно перевищує *TET1/3*, в той час як у інших клітинах їхня експресія є однаковою [44]. Структурний аналіз виявив загальні риси доменної будови TET-білків (рис. 4).

На C-кінці знаходиться DSBH-домен (*Double Strand Beta Helix*), що має структуру подвійної β-спіралі та виявляє оксигеназну каталітичну активність відносно 5mC. У межах цього домену також містяться сайти зв'язування кофакторів, необхідних для виконання каталітичної функції, — іонів Fe<sup>2+</sup> та α-кетоглутарату (α-KG). Перед DSBH-доменом у структурі TET-білків є ділянка, багата залишками цистеїну (CD-домен), функція якого поки залишається нез'ясованою [47]. У N-кінцевій ділян-



ці білків TET1 та TET3 також наявний еволюційно консервативний CXXC-мотив, який, очевидно, слугує для зв'язування неметильованого цитозину CpG-острівців [48]. Цікаво, що в TET2 CXXC-домен відсутній, проте поряд із 5'-кінцем гена *TET2* ідентифіковано ген *IDAX*, що кодує білок із CXXC-мотивом і виступає негативним регулятором TET2 [49, 50].

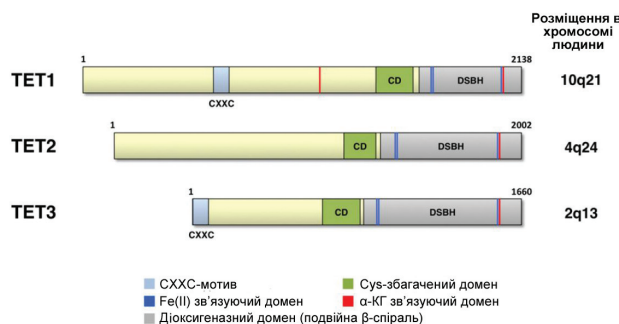


Рис. 4. Структурна організація білків родини TET (адаптовано з: Nakajima H., Kunimoto H., 2014 [49])

Головною функцією TET-білків є їхня 5mC-оксигеназна/гідролазна ферментативна активність, що сприяє конверсії 5mC до 5hmC, ключового інтермедіату в подальшому процесуванні до деметильованого цитозину [51]. Як вже зазначено вище (пункт 1), існує пасивне підтримання деметильованого стану цитозину при реплікації ДНК, коли патерн метилювання в дочірньому ланцюгу ДНК підтримується метилтрансферазою DNMT1. Дві дочірні молекули ДНК містять батьківський ланцюг ДНК із 5mC у складі CpG-динуклеотидів і синтезований ланцюг ДНК, де цитозин є неметильованим. DNMT1 розпізнає такі напівметилювані CpG динуклеотидні сайти і відновлює симетрію метилювання цитозину у постреплікативному ланцюгу ДНК. Проте DNMT1 не здатна розпізнавати 5hmC, тому після реплікації дочірні молекули ДНК не будуть містити 5mC у цих сайтах [52].

Іншим шляхом є активне оксигеназне деметильовання 5mC до 5hmC з подальшою модифікацією 5hmC до 5-формілцитозину (5fC) та 5-карбоксититозину (5caC) TET-білками або ж дезамінування 5mC-тимін до 5-гідроксиметилурацилу (5hmU) дезаміназою AID (*Activation Induced cytosine Desaminase*). 5fC, 5caC та 5hmU розпізнаються тимідин-ДНК-

глікозилазою (TDG) та у процесі ексцизійної репарації азотистих основ (BER — *Base Excision Repair*) замінюються на цитозин (рис. 5) [49].

Таким чином, активне деметильовання ДНК є динамічним процесом, в якому ключову роль відіграють білки родини TET, особливо TET2. Велике значення ці процеси мають в ембріональному розвитку, диференціації тканин і надзвичайно важливе — у гемопоезі. Розповсюдженість 5hmC, основного продукту TET2, варіює в різних тканинах і залежно від ступеня диференціації клітин [53]. Так, високий рівень 5hmC характерний для плюрипотентних і мультипотентних клітин. Висока активність генів *TET* та, відповідно, вищий відсоток 5hmC відзначають у плюрипотентних ЕСК і мультипотентних ГСК [43]. Рівень експресії генів родини *TET* значно знижується в процесі диференціації клітин. Так, експресія генів *TET1* і *TET2* під час диференціації ЕСК значно знижується [54]. Однак серед диференційованих тканин високий рівень 5hmC і рівень експресії *TET3* зберігаються в нервових клітинах [55]. Таким чином, гени *TET* можуть бути важливими епірегуляторами в диференціації клітин, а пригнічення їхньої активності може призводити до порушень диференціації та неконтрольованої проліферації клітин, що й відбувається при злоякісних новоутвореннях.

#### 4.2. Порушення функції гена *TET2* при гематологічних новоутвореннях

Мутації в гені *TET2* виявляють у клітинах широкого спектра онкогематологічних захворювань, включаючи гостру мієлоїдну лейкемію (ГМЛ), мієлодиспластичний синдром (МДС), мієлопроліферативні новоутворення [56, 57], а також лімфоми [46], що свідчить про критичну роль гена *TET2* у диференціації та гомеостазі ГСК. Уперше порушення гена *TET2* виявлено у пацієнтів із МДС, що мали аномалії в локусі q24 4-ї хромосоми — місці локалізації цього гена [58]. Встановлено, що у близько 26% хворих на МДС наявні мікрodelеція 4q24 або міссенс-/нонсенс-мутації кодуючої ділянки гена *TET2* [49]. Подальші дослідження показали, що мутації гена *TET2* характерні для більшості гематологічних новоутворень. Високу частоту цих мутацій

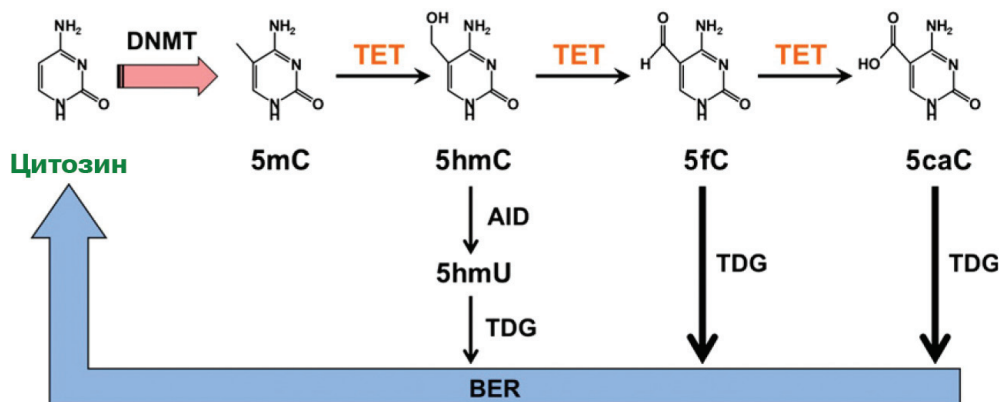


Рис. 5. Деметильовання 5-метилцитозину TET-білками (адаптовано з: Nakajima H., Kunimoto H., 2014 [49])

фіксують при хронічній мієломоноцитарній лейкемії (50% випадків), ГМЛ (20%), Т-клітинних лімфомах, таких як периферична Т-клітинна лімфома (50%) та ангіоімунобластна лімфома (80%) [59]. Частото делеція *TET2* у 4q24 асоціюється з мутацією *TET2* в іншому алелі [60].

При мієлоїдних новоутвореннях мутації в гені *TET2* завжди асоціюються зі зниженим рівнем 5hmC і підвищеним рівнем 5mC у геномній ДНК лейкоцитів порівняно з диким типом *TET2* [61, 62]. Вважається, що мутації знешкоджують каталітичну активність *TET2*. Такі мутації є або міссенс-мутаціями в С-кінцевому каталітичному домені, або нонсенс-мутаціями, чи мутаціями, що призводять до зсуву рамки зчитування в N-кінцевій ділянці. Ці дані свідчать про те, що порушення *TET2*-опосередкованого деметилювання ДНК є однією з ключових причин порушення гемопоезу та розвитку онкогематологічних захворювань [63].

Наразі описано більше 700 можливих мутацій гена *TET2*. Міссенс-мутації, як правило, зосереджені в двох висококонсервативних ділянках білка *TET2* (амінокислоти 1104–1478 і 1845–2002), що майже точно відповідають β-спіральному структурі каталітичного домену *TET2*. Ці мутації впливають на амінокислотні залишки, що забезпечують білок-білкові взаємодії та/або є мішенями посттрансляційних модифікацій.

Значення мутацій *TET2* як прогностичних факторів при мієлопроліферативних та інших онкогематологічних захворюваннях активно вивчають [60]. Продемонстровано кореляцію між мутацією в гені *TET2* та негативним прогнозом у хворих на ГМЛ [58]. Проте є й певні суперечливі дані. Так, у деяких дослідженнях показано, що при МДС мутація *TET2* асоціюється з меншим часом до трансформації МДС у вторинну ГМЛ та нижчою виживаністю, в той час як в інших роботах встановлено, що така мутація може бути позитивним прогностичним маркером при МДС і негативним — при хронічній мієломоноцитарній лейкемії [46]. Разом із тим існують праці, в яких не виявлено жодного впливу мутації *TET2* на клінічний перебіг захворювання [64]. Можливо, така суперечливість пов'язана з невеликою вибіркою пацієнтів і малою базою даних, оскільки дослідження ролі *TET*-білків в онкогенезі почалося відносно недавно. З іншого боку, мутація *TET2* може бути не єдиним порушенням епігенетичної регуляції та здатна пов'язуватися з іншими мутаціями, перш за все мутаціями гена *IDH1/2*, продукт якого — 2-оксоглутарат (альфа-кетоглутарат) — є кофактором каталітичної активності *TET2* [65]. Тому порушення функції *TET2*-білка може бути зумовлено не лише мутацією його гена, адже в деяких випадках при дикому типі *TET2* відзначають низький рівень 5hmC [66]. Так чи інакше мутації в гені *TET2*, які призводять до утворення нефункціонального ферменту та, як наслідок, до зниження рівня 5hmC, є загальним і частим яви-

щем при гематологічних злоякісних новоутвореннях. Мутації *TET2*, що відбуваються на ранніх етапах лейкемогенезу в гемопоетичних клітинах-попередниках, пов'язані з клональною експансією, однак самі по собі вони не спричиняють злоякісної трансформації [59, 60, 64].

Накопичені дані клінічних і молекулярних досліджень вказують на можливість того, що втрата функціональної активності *TET2* у синергізмі з іншими мутаціями (у генах білків епігенетичних регуляторів, молекулярного сплайсингу пре-мРНК або генах внутрішньоклітинних сигнальних каскадів) забезпечує ініціацію та прогресування неоплазій при гематологічних новоутвореннях.

#### 4.3. Порушення функцій *TET2* при солідних новоутвореннях

Слід зазначити, що мутації генів родини *TET* у солідних злоякісних новоутвореннях виникають значно рідше, ніж при онкогематологічних захворюваннях.

Так, наприклад, мутації всіх трьох генів *TET* виявляють у клітинах при раку прямої кишки. Мутації та/або делеція гена *TET2* встановлені у багатьох випадках (близько 16%) світлоклітинного раку нирки, а також при метастатичному гормонрезистентному раку передміхурової залози [41].

Роль мутантних *TET*-білків у прогресії солідних пухлин все ще досконало не вивчена. Однак для гематологічних новоутворень визначено роль *TET2* у злоякісній трансформації та подальшій проліферації пухлинних клітин [63]. Не виключено, що такий самий механізм можливий при розвитку солідних пухлин. Водночас солідні пухлини є гетерогенними та несуть значний пул набутих мутацій у злоякісній трансформації. Наразі активно досліджуються пухлинні моделі з використанням тваринних ліній, нокаутних за генами *TET*, що дозволить встановити ймовірну роль *TET*-генів у подальшому прогресуванні онкологічного захворювання [41].

Окрім соматичних мутацій генів *TET*, у багатьох типах пухлин виявляють пригнічення експресії *TET*-білків і, як наслідок, їхнього основного продукту — 5hmC. Зниження активності *TET* і загального рівня 5hmC у ДНК реєструють при меланомі, раку передміхурової залози, легені, молочній залозі, печінці та органів шлунково-кишкового тракту, при гліобlastомах [41]. Як вже зазначено, зниження вмісту 5hmC у ДНК відповідає за рівень проліферації як у нормальних, так і у трансформованих пухлинних клітинах. У багатьох дослідженнях продемонстровано кореляцію між зниженим рівнем 5hmC та/або зниженою активністю *TET*-білків і посиленою проліферацією пухлинних клітин і метастазуванням. Наприклад, зниження експресії *TET1* та/або його мішені *TIMP2* корелює з пізніми стадіями процесу, метастазами в лімфатичних вузлах і низькою виживаністю при раку молочної залози [67].

Зниження рівня експресії TET-білків може бути зумовлене різноманітними шляхами негативної регуляції — від окремих регуляторних молекул до регуляції на рівні трансляції через мікроРНК.

Так, показано, що негативну регуляцію гена *TET1* може здійснювати білок HMGA2 (*High Mobility Group AT-hook*), який експресується в ЕСК та у клітинах при деяких типах раку, але не експресується в більшості соматичних клітин. При раку молочної залози посилена експресія *HMGA2* корелює зі зниженою експресією *TET1* та нижчою виживаністю хворих. На культурах пухлинних клітин продемонстровано, що інгібування *HMGA2* призводить до зниження рівня метилювання промотора *TET1* та зростання рівня 5hmC [68]. Експресія *TET2* також може регулюватися на транскрипційному рівні в деяких типах пухлин. Так, метилювання промотора *TET2* відбувається при гліомах, що спричиняє зниження рівня 5hmC [69].

Рівень TET-білків може контролюватися за допомогою більш ніж 30 мікроРНК через зв'язування останніх із мРНК з подальшим блокуванням трансляції. Так, мікроРНК-25b, -29b, -29c, -101 та -7 здатні блокувати трансляцію TET2 і порушувати гомеостаз, що може призвести до злоякісної трансформації кровотворних клітин. Подібні дані одержані для мікроРНК-22, яку вважають прометаастатичною. На пухлинних моделях продемонстровано, що мікроРНК-22 пригнічує експресію TET2 у мишей [70]. При раку молочної залози у людей рівень цієї мікроРНК корелює з агресивністю пухлини та розвитком метастазів [70]. Припускають, що мікроРНК-22 зв'язується з 3'-некодуючою ділянкою (3'UTR) *TET* мРНК, блокуючи синтез білка. Зниження рівня TET-білків веде до гіперметилювання промотора гена антиметаастатичної мікроРНК-200, зниження вмісту якої, в свою чергу, призводить до змін в експресії генів, що відповідають за метастазування та епітеліально-мезенхімальну трансдукцію [71]. Подібні механізми регуляції експресії *TET2* та, як наслідок, зниження рівня 5hmC були описані при меланомі [72].

Ще одним регулятором рівня TET2 є білок CXXC4, відомий також як IDAX (Inhibition of Dvl and Axin function), — негативний регулятор сигнального білка Wnt, що часто мутує при пухлинах [50]. Ген *IDAX*, як описано раніше, міститься поряд з 5'-кінцем гена *TET2* та кодує білок з мотивом CXXC. Цей мотив притаманний білкам TET1 та TET3, але відсутній у TET2 (див. рис. 4). Вважається, що *IDAX* у процесі еволюції відокремився від *TET2* у результаті хромосомної інверсії. CXXC-мотив трапляється в багатьох білках, що беруть участь у процесах метилювання/деметилювання ДНК, та відповідає за розпізнавання неметилюваного цитозину в CpG-динуклеотидах. *IDAX* зв'язується через CXXC-домен із CpG-острівцями промоторів і взаємодіє безпосередньо з каталітичним доменом TET2, спричиняючи його руйнуван-

ня каспазозалежним шляхом. Посилення експресії *IDAX* у клітинах при раку прямої кишки може бути однією з причин зниження TET2 та 5hmC [73]. На протипагу цьому при метастатичному раку нирки фіксують випадки, коли знижений рівень *IDAX* сприяв переміщенню в ядро β-катеніну, що активував запуск експресії генів Wnt-бета-катенін сигналіну, відповідальних за проліферацію та метастазування. Схожий вплив у регуляції TET-білків може мати білок RINF/CXXC5, що виконує подібні до *IDAX* функції [50].

#### 5. IDH1/2 як метаболічний кофакторний регулятор активності TET-білків

Посттрансляційна регуляція TET-білків може здійснюватися не лише шляхом протеолізу (як описано у випадку білків *IDAX*), а й через модуляцію їхньої каталітичної активності. Реалізація таких механізмів, у першу чергу, пов'язана з метаболізмом ключового кофактора TET-білків — α-кетоглутарату, який є продуктом активності ізоцитратдегідрогенази (*Isocitrate Dehydrogenase*, IDH1 та IDH2), критичним для реалізації 5mC-оксигеназної активності TET-білка. Тому ферменти, а саме IDH1/2, що впливають на метаболізм α-кетоглутарату, можуть бути регуляторами активності TET-білків (рис. 6) [65].

IDH бере участь у циклі трикарбонових кислот, каталізуючи перетворення ізоцитрату у 2-оксиглутарат (2-OG, відомий також як α-кетоглутарат) з використанням NADP<sup>+</sup> та NADPH як кофакторів. 2-OG, у свою чергу, слугує кофактором для ферментів діоксигеназ, таких як TET-білки, пролін-деметилази EGLN і лізин-деметилази родини JmjC [74].

Існує кілька ізоформ ізоцитратдегідрогеназ, що кодуються відповідними генами. Особливе місце займають IDH1 та IDH2, які є цитозольною та мітохондріальною формами ферменту. Мутації в генах *IDH1* та *IDH2* часто виявляють при гліобластомах та онкогематологічних захворюваннях. Найбільш частими є точкові соматичні мутації R132 для *IDH1* та R140 або R172 для *IDH2*, які відзначають у 70% випадків гліом низького ступеня злоякісності та вторинних гліобластом, в 10% випадків ГМЛ. Такі мутації особливі тим, що призводять до утворення білка зі зміненою функціональною активністю. Мутантні форми IDH1 та IDH2 характеризуються посиленою активністю та здатні каталізувати перетворення 2-OG у 2-гідроксиглутарат (2-HG), у результаті чого порушується активність 2-OG-залежних діоксигеназ, у тому числі й TET-білків [69]. Причиною мутацій *IDH1* та *IDH2* є зменшення кількості власне α-кетоглутарату внаслідок його конверсії у 2-HG, а також за рахунок впливу 2-HG як конкурентного інгібітора функції TET-білків. 2-HG вважають онкометаболітом, концентрація якого в нормі не має перевищувати 0,1 мМ, проте в клітинах із мутацією генів рівень *IDH* може досягати 1–30 мМ. Таким чином, мутації генів *IDH* можуть бути однією з причин порушення функціонування TET-білків, та, як наслідок, змін патер-



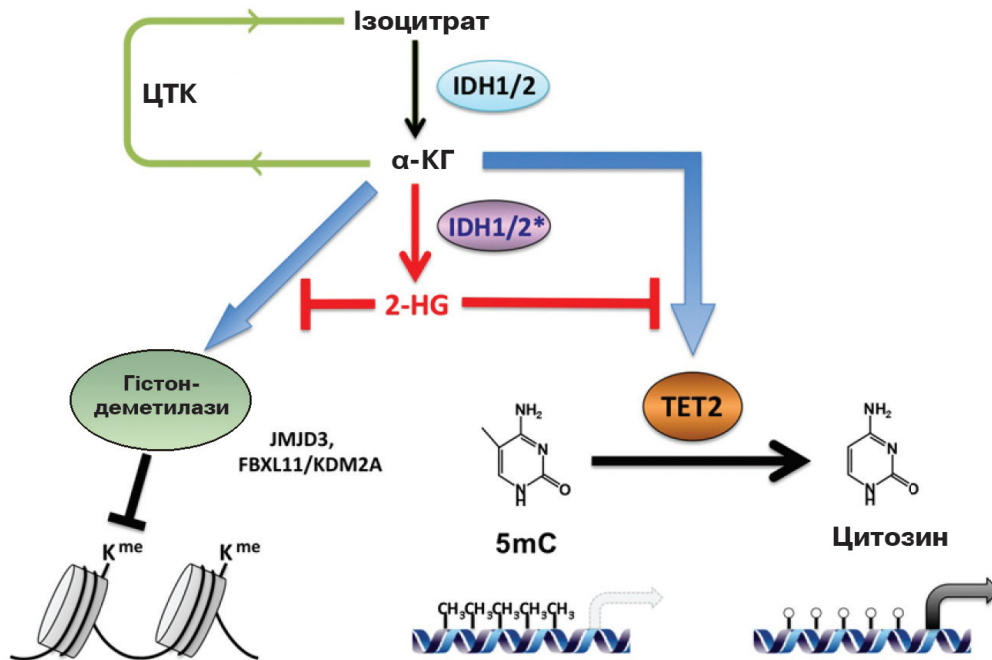


Рис. 6. IDH — метаболічний регулятор каталітичної активності TET-білка (адаптовано з: Nakajima H., Kunimoto H., 2014 [49])

ну метилювання ДНК при різних формах пухлин. Дійсно, такі мутації виявляють як при солідних новоутвореннях, так і при гемобластозах [40].

## ВИСНОВКИ

Системною парадигмою в канцерогенезі лишається зв'язок епігенетичних і генетичних механізмів у прогресуванні пухлин.

Саме лейкемія як модель може причинно поєднувати епігенетичні та генетичні механізми через низку встановлених мутацій у генах-епірегуляторах, таких як *TET2*, *IDH1/2*, *EZH2*, *DNMT3a*, що роблять вірогідний вклад у прогресування пухлин гемопоетичної тканини.

Гени *TET* є найбільш критичними епірегуляторами, що асоціюються з плюрипотентністю пухлинної прогресії через механізми ДНК-метилювання/деметилювання. Гени *TET* кодуєть сімейство гідроксиметилазних ферментів (α-кетоглутарат, Fe(II)-залежні 5-метилицитозин-оксигенази), що конвертують 5mC у 5hmC, контролюючи альтернативні процеси клітинної диференціації та плюрипотентності.

За фізіологічним механізмом гени-епірегулятори *TET* пов'язуються з контролем деметилювання CpG-острівців промоторів регуляторних та онкосупресорних генів у диференційованих клітинах і down-регулюються PRC2 репресивним комплексом. Мутації в гені *TET2* асоціюються з аберантним CpG-промоторним гіперметилюванням і прогресією мієлопроліферативних новоутворень.

Альтернативний механізм дії *TET* генів-епірегуляторів асоціюється з репрограмуванням диференційованих клітин у плюрипотентні стовбурові клітини. При цьому фактори плюрипотентності Oct3/4, Sox2, Nanog та c-Myc виявляються up-регуляторами експресії *TET*-генів.

Таким чином, *TET*-гени інтегруються в систему індукції плюрипотентності як на рівні ембріональних і гемопоетичних, так і на рівні індукції пухлиноасоційованих стовбурових клітин. Отже, гени-епірегулятори *TET*, імовірно, відкривають нові шляхи до біологічного контролю метастазуючого фенотипу прогресії.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; **358**: 1148–59.
2. Meissner A, Mikkelsen T, Gu H, et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* 2008; **454** (7205): 766–70.
3. Chan SM, Majeti R. Role of DNMT3A, TET2, and IDH1/2 mutations in pre-leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *I. J Hematol* 2013; **98** (6): 648–57.
4. Mahfoudhi E, Secardin L, Scourzic L. Properties and biological roles of TET proteins during embryogenesis and in hematopoiesis. *Med Sci* 2015; **31**(3): 268–74.
5. Lu X, Zhao BS, He C. TET family proteins: oxidation activity, interacting molecules, and functions in diseases. *Chem Rev* 2015; **115** (6): 2225–39.
6. Zhenwei J, Shuxin G, Yongchun Z, et al. Mechanisms of TET protein-mediated DNA demethylation and its role in the regulation of mouse development. *Yi Chuan* 2015; **37** (1): 34–40.
7. Tsagaratou A, Rao A. TET proteins and 5-methylcytosine oxidation in the immune system. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2013; **78**: 1–10.
8. Langemeijer SM, Aslanyan MG, Jansen JH. TET proteins in malignant hematopoiesis. *Cell Cycle* 2009; **8** (24): 4044–8.
9. Dawlaty MM, Breiling A, Le T, et al. Loss of Tet enzymes compromises proper differentiation of embryonic stem cells. *Dev Cell* 2014; **29** (1): 102–11.
10. Kinney SR, Pradhan S. Ten eleven translocation enzymes and 5-hydroxymethylation in mammalian development and cancer. *Adv Exp Med Biol* 2013; **754**: 57–79.
11. Song CX, He C. Balance of DNA methylation and demethylation in cancer development. *Genome Biol* 2012; **13** (10): 173–6.

12. Hachett JA, Surani MA. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci* 2013; **368** (1609): 20110328.
13. Zhu JK. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu Rev Genet* 2009; **43** (1): 143–66.
14. Nabel CS, Kohli RM. Demystifying DNA demethylation. *Science* 2011; **333** (6047): 1229–30.
15. Sanz LA, Kota SK, Feil R. Genome-wide DNA demethylation in mammals. *Genome Biol* 2010; **11** (3): 110–16.
16. Issa JP. Age-related epigenetic changes and the immune system. *Clin Immunol* 2003; **109** (1): 103–8.
17. Kisseljova NP, Kisseljov FL. DNA demethylation and carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 2005; **70** (7): 743–52.
18. Wood AJ, Bourchis D, Bestor TH, *et al.* Allele-specific demethylation at an imprinted mammalian promoter. *Nucleic Acids Res* 2007; **35** (20): 7031–9.
19. Pfeifer GP, Kadam S, Jin SG. 5-hydroxymethylcytosine and its potential roles in development and cancer. *Epigenetics Chromatin* 2013; **6** (1): 10–16.
20. Ng RK, Gurdon JB. Epigenetic inheritance of cell differentiation status. *Cell Cycle* 2008; **7** (9): 1173–7.
21. Iqbal K, Jin SG, Pfeifer GP, *et al.* Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108** (9): 3642–7.
22. Santiago M, Antunes C, Guedes M, *et al.* TET enzymes and DNA hydroxymethylation in neural development and function — how critical are they? *Genomics* 2014; **104** (5): 334–40.
23. Jenkins TG, Carrell DT. Dynamic alterations in the paternal epigenetic landscape following fertilization. *Front Genet* 2012; **3** (143): 67–74.
24. Etchegaray JP, Chavez L, Huang Y. The histone deacetylase SIRT6 controls embryonic stem cell fate via TET-mediated production of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Cell Biol* 2015; **17** (5): 545–57.
25. Randy LJ, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* 2007; **8** (1): 253–62.
26. Hackett JA, Zyllicz JJ, Surani MA. Parallel mechanisms of epigenetic reprogramming in the germline. *Trends Genet* 2012; **28**: 164–74.
27. Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 2013; **502** (7472): 472–9.
28. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 2003; **301**: 89–92.
29. Bhave MR, Wilson MJ, Poirier LA. c-H-ras and c-K-ras gene hypomethylation in the livers and hepatomas of rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis* 2008; **9**: 343–8.
30. Kaneko Y, Shibuya M, Nakayama T, *et al.* Hypomethylation of c-myc and epidermal growth factor receptor genes in human hepatocellular carcinoma and fetal liver. *J Cancer Res* 2005; **76**: 1136–40.
31. Chen RZ, Pettersson U, Beard C, *et al.* DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 1998; **395**: 89–93.
32. El Kharroubi A, Piras G, Stewart CL. DNA demethylation reactivates a subset of imprinted genes in uniparental mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* 2001; **276** (12): 8674–80.
33. Lu F, Liu Y, Jiang L, *et al.* Role of Tet proteins in enhancer activity and telomere elongation. *Genes Dev* 2014; **28** (19): 2103–19.
34. Guo Y, Pakneshan P, Gladu J, *et al.* Regulation of DNA methylation in human breast cancer. Effect on the urokinase-type plasminogen activator gene production and tumor invasion. *J Biol Chem* 2002; **277**: 41571–9.
35. Tagoh H, Melnik S, Lefevre P, *et al.* Dynamic reorganization of chromatin structure and selective DNA demethylation prior to stable enhancer complex formation during differentiation of primary hematopoietic cells *in vitro*. *Blood* 2004; **103** (8): 2950–5.
36. Weber M, Davies JJ, Wittig D, *et al.* Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* 2005; **37**: 853–62.
37. Fraga MF, Herranz M, Espada J, *et al.* A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer Res* 2004; **64**: 5527–34.
38. Putiri EL, Tiedemann RL, Thompson JJ, *et al.* Distinct and overlapping control of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine by the TET proteins in human cancer cells. *Genome Biol* 2014; **15** (6): R81.
39. Liyanage VR, Jarmasz JS, Murugesan N, *et al.* DNA modifications: function and applications in normal and disease Biology (Basel) 2014; **3** (4): 670–723.
40. Ye D, Ma S, Xiong Y, Guan KL. R-2-hydroxyglutarate as the key effector of IDH mutations promoting oncogenesis. *Cancer Cell* 2013; **23**: 274–6.
41. Huang Y, Rao A. Connections between TET proteins and aberrant DNA modification in cancer. *Trends Genet* 2014; **1136**: 1–11.
42. Kroeze LI, van der Reijden BA, Jansen JH. 5-Hydroxymethylcytosine: An epigenetic mark frequently deregulated in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2015; **1855** (2): 144–54.
43. Williams K, Christensen J, Helin K. DNA methylation: TET proteins—guardians of CpG islands? *EMBO* 2012; **13**: 28–35.
44. Scourzic L, Mouly E, Bernard OA. TET proteins and the control of cytosine demethylation in cancer. *Genome Med* 2015; **7**: 1–16.
45. Meng H, Cao Y, Qin J, *et al.* DNA methylation, its mediators and genome integrity. *Int J Biol Sci* 2015; **11** (5): 604–17.
46. Abdel-Wahab O, Levine RL. Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia. *Blood* 2013; **121**: 3563–72.
47. Tan L, Shi YG. Tet family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in development and disease. *Development* 2012; **139** (11): 1895–902.
48. Long HK, Blackledge NP, Klose RJ. ZF-CxxC domain-containing proteins, CpG islands and the chromatin connection. *Biochem Soc Trans* 2013; **41** (3): 727–40.
49. Nakajima H, Kunimoto H. TET2 as an epigenetic master regulator for normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Science* 2014; **102**: 1093–9.
50. Ko M, An J, Bandukwala HS. Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. *Nature* 2013; **497**: 122–6.
51. Wang J, Tang J, Lai M, Zhang H. 5-Hydroxymethylcytosine and disease. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2014; **762**: 167–75.
52. Li E, Zhang Y. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; **6** (5): 1–21.
53. Kriukienė E, Liutkevičiūtė Z, Klimašauskas S. 5-Hydroxymethylcytosine — the elusive epigenetic mark in mammalian DNA. *Chem Soc Rev* 2012; **41** (21): 6916–30.
54. Wang Y, Zhang Y. Regulation of TET protein stability by calpains. *Cell Rep* 2014; **6**: 278–84.
55. Shin J, Ming GL, Song H. DNA modifications in the mammalian brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014; **369** (1652): 1–11.
56. Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, *et al.* Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood* 2009; **113** (6): 1315–25.
57. Taskesen E, Havermans M, van Lom K, *et al.* Two splice-factor mutant leukemia subgroups uncovered at the boundaries of MDS and AML using combined gene expression and DNA-methylation profiling. *Blood* 2014; **123** (21): 3327e35.
58. Lorsbach RB, Moore J, Mathew S, *et al.* 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**: 637–41.
59. Jhanwar SC. Genetic and epigenetic pathways in myelodysplastic syndromes: A brief overview. *Adv Biol Regul* 2015; **58**: 28–37.
60. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, *et al.* Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 2009; **41** (7): 838–42.



61. Meldi KM, Figueroa ME. Cytosine modifications in myeloid malignancies. *Pharmacol Ther* 2015; **15**: 93–5.
62. Solary E, Bernard OA, Tefferi A, *et al.* The ten-eleven translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. *Leukemia* 2014; **28** (3): 485–96.
63. Ko M, An J, Pastor WA, *et al.* TET proteins and 5-methylcytosine oxidation in hematological cancers. *Immunol Rev* 2015; **263**: 6–21.
64. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, *et al.* Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2011; **364**: 2496–506.
65. Dang L, White DW, Gross S. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009; **462**: 739–57.
66. Liu WJ, Tan XH, Luo XP, *et al.* Prognostic significance of Tet methylcytosine dioxygenase 2 (TET2) gene mutations in adult patients with acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Informa Healthcare* 2014; **55** (12): 2691–8.
67. Hsu CH, Peng KL, Kang ML, *et al.* TET1 suppresses cancer invasion by activating the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Cell Rep* 2012; **2**: 568–79.
68. Sun M, Song C-X, Huang H, *et al.* HMGA2/TET1/HOXA9 signaling pathway regulates breast cancer growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: 9920–5.
69. Dang L, Jin S, Su SM. IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends Mol Med* 2010; **16**: 387–97.
70. Song SJ, Poliseno L, Song MS, *et al.* MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET-family-dependent chromatin remodeling. *Cell* 2013; **154**: 311–24.
71. Adam L, Zhong M, Choi W, *et al.* miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 5060–72.
72. Loriot A, Van Tongelen A, Blanco J, *et al.* A novel cancer-germline transcript carrying pro-metastatic miR-105 and TET-targeting miR-767 induced by DNA hypomethylation in tumors. *Epigenetics* 2014; **9** (8): 1163–71.
73. Nguyen AV, Albers CG, Holcombe RF. Differentiation of tubular and villous adenomas based on Wnt pathway-related gene expression profiles. *Int J Mol Med* 2010; **26**: 121–5.
74. Loenarz C, Schofield CJ. Physiological and biochemical aspects of hydroxylations and demethylations catalyzed by human 2-oxoglutarate oxygenases. *Trends Biochem Sci* 2011; **36**: 7–18.

## TET GENES AS NEW EPIREGULATORS IN THE MYELOPROLIFERATIVE AND SOLID NEOPLASMS PROGRESSION

L.P. Shvachko, I.S. Shumeiko

**Summary.** *TET (ten-eleven translocation) proteins are the new epiregulators which associated with the cancer stem cell pluripotency. TET genes (TET1, TET2, TET3) provide the potential epiregulation control of DNA methylation/demethylation balance because the TET-hydroxymethylase conversion 5-methylcytosine (5mC) to 5-hydroxymethylcytosine (5hmC). The first mechanism of TET-dependent epigenetic control associated with TET gene expression inhibition by the mutation and aberrant CpG-island-promoter hypermethylation mechanisms resulting in the proliferation progression often without malignisation for a number myeloproliferative neoplasms. The second mechanism of TET-dependent gene epiregulation associated with TET gene over-expression resulting in the stem cell pluripotency in the embryonic stem cells for TET1, TET2, TET3, the hemopoietic stem cells for TET2 gene and cancer stem cells for TET1, TET2 over-expression. Thus, TET epiregulator genes can provide the potential biological control in the metastatic cancer progression.*

**Key Words:** *TET (ten-eleven translocation) genes, 5-methylcytosine (5mC), 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), cancer stem cell, pluripotency.*

### Адреса для листування:

Швачко Л.П.

03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

Інститут молекулярної біології і генетики

НАН України

E-mail: l.shvachko@ukr.net

Одержано: 08.06.2015