

© О.А. Ефимова^{1,2},
А.А. Пендина^{1,2,3},
А.В. Тихонов^{1,2,3},
В.С. Баранов^{1,2}

¹ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург;

²ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург;

³Диагностический центр (медико-генетический), Санкт-Петербург

В обзоре суммированы данные исследований 5-гидроксицитозина, 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина — модификаций цитозина, образующихся в результате последовательного ферментативного окисления 5-метилцитозина в ДНК. Рассмотрены механизмы биохимических превращений модифицированных форм цитозина и приведены способы анализа их качественного и количественного содержания в ДНК. Выделены основные этапы в развитии представлений о биологическом значении 5-гидроксицитозина, 5-формилцитозина, 5-карбоксилцитозина в геноме млекопитающих с момента идентификации путей их образования в 2009 г. до настоящего времени.

✿ **Ключевые слова:** 5-гидроксицитозин; 5-формилцитозин; 5-карбоксилцитозин; 5-метилцитозин; кислородсодержащие производные 5-метилцитозина; продукты окисления 5-метилцитозина; методы анализа; активное деметилирование ДНК; эпигенетическая регуляция работы генома.

Поступила в редакцию 27.10.2016
Принята к публикации 29.11.2016

ЭВОЛЮЦИЯ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О БИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ КИСЛОРОДСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ 5-МЕТИЛЦИТОЗИНА В ГЕНОМЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

ВВЕДЕНИЕ

В постгеномную эру стало очевидным, что функционирование генома человека определяется не только нуклеотидным составом ДНК, но и различными эпигенетическими модификациями как самих нуклеотидов, так и белков хроматина, в результате которых к ним присоединяются/удаляются химические группы. Последние, в зависимости от типа и локализации, могут индуцировать или блокировать связывание с ДНК транскрипционных факторов, маркируя, таким образом, функционально активные и инертные участки хроматина. Эпигенетические механизмы играют важную роль в определении судьбы клеток в онтогенезе. За счет специфического набора эпигенетических модификаций (эпигенетического паттерна), уникального для каждой клеточной линии, формируется эпигенетическая память, то есть устанавливаются профили экспрессии, которые наследуются в ряду делений клетки.

Ключевым эпигенетическим событием в регуляции активности генов в геноме млекопитающих является метилирование ДНК — присоединение метильной группы в пятом положении цитозина в составе динуклеотида CpG. Образующийся в результате метилирования 5-метилцитозин играет регуляторную роль во многих биологических процессах: транскрипции, репрессии повторяющихся последовательностей генома, геномном импринтинге, инактивации хромосомы X, клеточной дифференцировке и др.

В 2009 г. было установлено, что белки семейства TET могут деметилировать ДНК, последовательно окисляя 5-метилцитозин до 5-гидроксицитозина, 5-формилцитозина, 5-карбоксилцитозина [1, 2]. Системы репарации распознают 5-формилцитозин и 5-карбоксилцитозин и заменяют их на цитозин [3, 4], завершая, таким образом, деметилирование сайта. Исследования последних лет свидетельствуют о том, что биологическая роль продуктов окисления 5-метилцитозина (или его *кислородсодержащих производных*) не ограничивается только деметилированием ДНК. Закономерный интерес к изучению гидроксильной, карбонильной и карбоксильной форм 5-метилцитозина в геноме млекопитающих привел к появлению в последние годы большого числа новых методов анализа модифицированного цитозина. Однако многие аспекты, связанные с биологическими функциями кислородсодержащих производных 5-метилцитозина, до сих пор остаются малопонятными. По мере появления новых данных представления об их роли в геноме млекопитающих несколько раз подвергались пересмотру.

В настоящем обзоре рассмотрены методы выявления 5-метилцитозина и продуктов его окисления и суммированы данные, составляющие основу современных представлений о биологическом значении 5-гидроксицитозина, 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина в геноме млекопитающих.

ЦИКЛ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРЕОБРАЗОВАНИЙ ЦИТОЗИНА

Цитозин в составе ДНК млекопитающих может подвергаться биохимическим воздействиям, приводящим к образованию модифицированного цитозина (рис. 1). Наиболее изученной модификацией цитозина является 5-метилцитозин, образующийся в результате переноса метильной группы

с S-аденозилметионина в пятое положение цитозина в составе динуклеотида CpG [5]. ДНК-метилтрансферазы (или ДНК-метилазы) — ферменты, осуществляющие эту реакцию, — представлены тремя семействами. ДНК-метилтрансферазы первого типа (DNMT1) специфичны к гемиметилированной ДНК, образующейся в результате репликации и состоящей из «старой» метилированной и «новой» неметилированной нитей. DNMT1 связывается с ДНК во время репликации и метилирует новосинтезированную нить ДНК, копируя рисунок метилирования старой цепи. Экспрессия генов *Dnmt1* зависит от клеточного цикла и происходит наиболее интенсивно в активно делящихся клетках [6]. Работа DNMT1 позволяет дочерним клеткам наследовать специфичный для каждой клеточной линии рисунок метилирования ДНК. ДНК-метилтрансферазы первого типа представлены тремя изоформами: DNMT1p — метилаза сперматоцитов на стадии пахитены, DNMT1o — метилаза ооцитов и DNMT1s — метилаза соматических клеток [7]. При изучении продуктов гена *Dnmt1p* была выделена мРНК, но не был обнаружен белок [8, 9].

ДНК-метилтрансферазы третьего типа — DNMT3A и DNMT3B, напротив, специфичны к неметилированной ДНК и могут осуществлять метилирование *de novo*. DNMT3A и DNMT3B устанавливают новые паттерны метилирования в гаметогенезе и раннем эмбриогенезе, а также могут изменять рисунок метилирования ДНК в соматических клетках [10]. DNMT3A специфична к динуклеотидам CpG, а также может метилировать цитозин в других динуклеотидах: CpT, CpA, CpC [11–13]. Наибольшее содержание продукта гена *Dnmt3a* зарегистрировано в ооцитах и в бластомерах доимплантационных эмбрионов до активации генома зародыша [14]. DNMT3B метилирует только динуклеотиды CpG в повторяющихся последовательностях ДНК в составе сателлитов околоцентромерных районов хромосом [15, 16]. У DNMT3L нет метилазной активности; она является кофактором DNMT3A и DNMT3B и важна для установления импринтов в геноме дифференцирующихся половых клеток [17, 18].

Вследствие отсутствия N-терминального регуляторного домена, позволяющего связываться с ДНК и регуляторными белками, ДНК-метилтрансфераза второго типа DNMT2 не способна метилировать цитозин ДНК [19], но имеет сродство к аспарагиновой тРНК и может метилировать цитозин в 38-м положении антикодонной петли [20].

В 2009 г. было установлено, что 5-метилцитозин может подвергаться окислению, в результате которого образуется его кислородсодержащая производная — 5-гидроксиметилцитозин, или гидроксильная форма 5-метилцитозина [2] (см. рис. 1). Дальнейшее окисление приводит к образованию карбонильной формы — 5-формилцитозина, а затем карбоксильной формы — 5-карбоксилцитозина. Система эксцизионной

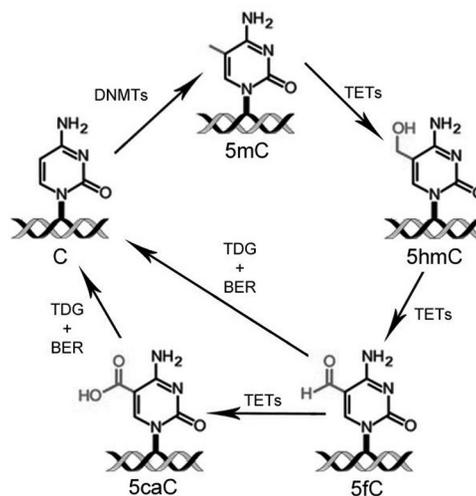


Рис. 1. Цикл биохимических превращений цитозина в ДНК клеток млекопитающих. C — цитозин, 5mC — 5-метилцитозин, 5hmC — 5-гидроксиметилцитозин, 5fC — 5-формилцитозин, 5caC — 5-карбоксилцитозин

Fig. 1. Cycle of cytosine modifications in mammalian cell DNA. C — cytosine, 5mC — 5-methylcytosine, 5hmC — 5-hydroxymethylcytosine, 5fC — 5-formylcytosine, 5caC — 5-carboxycytosine. Explanations are given in the text

репарации клетки BER с участием тиминовой ДНК гликозилазы TDG распознает 5-формилцитозин и 5-карбоксилцитозин и заменяет их на цитозин, завершая полный цикл преобразований [3] (см. рис. 1).

Все этапы окисления 5-метилцитозина осуществляются за счет энзиматической активности белков семейства TET (Ten-Eleven-Translocation) [2]. Семейство TET состоит из трех белков — TET1, TET2 и TET3 — и входит в состав суперсемейства 2-оксоглутарат- и Fe(II)-зависимых диоксигеназ. Все три белка обладают схожей окислительной активностью в отношении 5-метилцитозина, 5-гидроксиметилцитозина и 5-формилцитозина, но характеризуются тканевой и стадийспецифичностью. На мышах показано, что белки TET участвуют в репрограммировании генома: TET1 и TET2 деметилируют отдельные локусы, в том числе импринтированные в первичных половых клетках, а TET3 гидроксилирует 5-метилцитозин в мужском пронуклеусе зигот [21]. Гены *TET* экспрессируются и в соматических тканях, причем интенсивность экспрессии неодинакова в разных типах клеток [21]. Самый высокий уровень экспрессии *TET* характерен для нейронов и клеток гемопоэтического ряда [21].

Таким образом, в результате строго запрограммированной работы ДНК-метилтрансфераз и диоксигеназ TET в геноме млекопитающих устанавливаются, поддерживаются и изменяются и специфичные для разных тканей и стадий онтогенеза паттерны 5-метилцитозина, 5-гидроксиметилцитозина, 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина. Однако важно отметить, что

биохимические преобразования цитозина подвержены влиянию внешних факторов, что может приводить к образованию aberrантных эпигенетических паттернов. Так, при воздействии большими дозами кадмия уровень метилирования ДНК снижается за счет ингибирования активности ДНК-метилтрансфераз. Неорганический мышьяк подвергается в клетке энзиматическому метилированию системами детоксикации, что приводит к дефициту S-аденозилметионина — донора метильной группы — и снижению уровня метилирования ДНК. Многочисленные исследования демонстрируют взаимосвязь нарушений метилирования ДНК с воздействием никеля, хрома, ртути, трихлорэтилена, дихлоруксусной и трихлоруксусной кислоты, бисфенола и многих других веществ [22]. Недавно было установлено, что L-аскорбиновая кислота (витамин С) способствует повышению в геноме уровня 5-гидроксиметилцитозина. Механизм действия аскорбата на процесс образования 5-гидроксиметилцитозина остается неясным, но, вероятнее всего, витамин С является кофактором диоксигеназ ТЕТ и принимает непосредственное участие в гидроксилировании 5-метилцитозина [23]. Учитывая, что большинство, если не все, злокачественные опухоли характеризуются сниженным уровнем 5-гидроксиметилцитозина [24], можно говорить о потенциальном терапевтическом эффекте аскорбата в отношении онкологических заболеваний. К настоящему моменту уже получены перспективные данные о повышении уровня 5-гидроксиметилцитозина в клетках меланомы, снижении их способности к инвазии и замедлении опухолевого роста при воздействии витамином С [25]. Очевидно, что для разработки эпигенетических лекарств необходимы высокоточные методы анализа модифицированных форм цитозина и понимание их биологической роли в геноме человека.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 5-МЕТИЛЦИТОЗИНА И ЕГО КИСЛОРОДСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Методы исследования 5-метилцитозина и его кислородсодержащих производных подразделяют на две группы: 1) позволяющие оценить общее содержание модифицированного цитозина разных типов и 2) позволяющие анализировать распределение модифицированного цитозина в геноме [26].

К первой группе относят капиллярный электрофорез, хроматографию как жидкостную, так и в сочетании с масс-спектрометрией, газовую с масс-спектрометрией и тонкослойную, флуоресцентное мечение и иммунологические методы. Определение общего уровня 5-метилцитозина и его кислородсодержащих производных требует высвобождения компонентов ДНК: 2'-дезоксинуклеотидов, 2'-дезоксинуклеозидов или нуклеотидов, что достигается за счет химических или энзиматических обработок [26].

Капиллярный электрофорез, суть которого заключается в разделении молекул по заряду и размеру под действием электрического поля, был адаптирован для изучения метилирования ДНК несколькими исследовательскими группами [27–30]. После разделения детекцию молекул можно проводить с помощью ультрафиолета [31], индуцированной лазером флуоресценции [32] или флуоресценции, совмещенной с иммуоферментным анализом [33]. Капиллярный электрофорез является сравнительно простым и малозатратным методом, обладает высоким разрешением и требует небольшого количества (0,1–10 мкг) геномной ДНК. Его очевидными недостатками, однако, являются ограничения по предельно допустимому объему анализируемого образца и высокая чувствительность к условиям эксперимента, что нередко приводит к плохой воспроизводимости результатов.

Жидкостная хроматография основана на разделении 2'-дезоксинуклеотидов/2'-дезоксинуклеозидов между неподвижной (твердой) и подвижной (жидкой) фазами. При высвобождении нуклеотидных оснований за счет воздействия муравьиной кислотой, вызывающей гидролиз ДНК, важно достичь полного удаления из образца РНК, чтобы избежать контаминации 5-метилцитозинном РНК [34]. Следует также учитывать, что вследствие сравнительно низкой чувствительности жидкостная хроматография требует довольно большого количества ДНК (1–50 мкг).

Перспективным для анализа 5-метилцитозина и его кислородсодержащих производных является метод жидкостной хроматографии, дополненный масс-спектрометрическим анализом. Примечательно, что наличие 5-гидроксиметилцитозина в клетках мозга мыши было установлено именно с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения и масс-спектрометрии [1]. В настоящее время предложен ряд модификаций этого метода, позволяющих сократить время анализа [35–37], а также усилить взаимодействие анализируемых веществ с твердой фазой [38].

Газовая хроматография с масс-спектрометрией позволяет достичь лучшего хроматографического разделения, но требует перевода аналитов в летучие вещества. Чаще всего для анализа 5-метилцитозина методом газовой хроматографии гидролиз ДНК осуществляют муравьиной кислотой с последующим получением производных азотистых оснований [39, 40]. Использование для этой цели N,O-бис-(триметилсилил)-трифторацетида с 1 % хлоротриметилсиланом позволяет выявлять 5-метилцитозин в 10 нг ДНК, даже если его уровень не превышает 0,1 % [41]. Методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией было доказано существование метилирования ДНК у 19 штаммов дрожжей [41].

Для тонкослойной хроматографии обычно используют ферментативный гидролиз ДНК и мечение нуклеозидов [$E^{32}P$] АТФ [42, 43]. Метод позволяет измерять и сравнивать относительную интенсивность хромато-

графических пятен. Помимо 5-метилцитозина, тонко-слойная хроматография была успешно применена для детекции 5-гидроксиметилцитозина [1, 2] и 5-карбоксилцитозина [3, 44].

В основе флуоресцентного мечения 5-метилцитозина лежит реакция с хлорацетальдегидом [45]. На первом этапе ДНК депуринизируют, обрабатывая серной кислотой. Депуринизированная ДНК способна реагировать с бисульфитом натрия, который вызывает превращение дезоксицитидина в дезоксиуридин, но не влияет на 5-метилцитидин [46]. В результате инкубации образца с хлорацетальдегидом образуется интенсивно флуоресцирующее производное 5-метилцитозина, количественный анализ которого возможен с помощью флуориметра. Недавно были синтезированы два компонента, способных избирательно реагировать и образовывать флуоресцирующие производные 5-формилцитозина [47].

Широко используемым методом оценки содержания 5-метилцитозина и продуктов его окисления является иммуноокрашивание, основанное на специфичном связывании антител с модифицированными формами цитозина. Наибольшее распространение этот метод получил в медицинских и биологических исследованиях. Он не является высокоточным, однако обладает рядом преимуществ, наиболее важное из которых — возможность визуализации 5-метилцитозина и его кислородсодержащих производных в отдельных клетках с помощью микроскопического анализа. Применение иммуноокрашивания позволило локализовать 5-метилцитозин на дифференциально окрашенных метафазных хромосомах в разные периоды онтогенеза человека: в лимфоцитах взрослых и плодов 20–24 недель развития [48, 49], в клетках хориона [50], в бластомерах доимплантационных эмбрионов [51–53].

Ко второй группе методов исследования 5-метилцитозина и его кислородсодержащих производных относят подходы, позволяющие анализировать локализацию модифицированного цитозина в геноме: обработку метилчувствительными и метилспецифичными эндонуклеазами рестрикции, бисульфитную конверсию, обогащение ДНК метилированными фракциями, химическое мечение и одномолекулярное секвенирование.

Для анализа метилированного цитозина с помощью эндонуклеаз рестрикции применяют метилчувствительные и метилспецифичные рестриктазы. Первые способны распознавать и гидролизовать только неметилированные последовательности, в то время как вторые, наоборот, осуществляют рестрикцию только метилированных сайтов. Продукты рестрикции могут быть проанализированы с помощью электрофореза, гибридизации на микроматрицах, секвенирования. Очевидным ограничением метилчувствительных и метилспецифичных эндонуклеаз является возможность анализа метилирования только тех последовательностей, в которых есть сайты рестрикции. С началом активного исследо-

вания 5-гидроксиметилцитозина оказалось, что использование эндонуклеаз рестрикции не позволяет отличить его от 5-метилцитозина, что может значительно искажать полученные результаты [54]. Дополнение стандартного протокола этапом гликозилирования, предшествующим обработке рестриктазами, позволяет решить эту проблему [55]. Эндонуклеаза *MspI*, осуществляющая рестрикцию метилированных и гидроксиметилированных последовательностей, не способна к рестрикции сайтов, содержащих гликозилированный 5-гидроксиметилцитозин, что позволяет их точно идентифицировать в геномной ДНК.

В 1990-х гг. было обнаружено, что обработка ДНК бисульфитом натрия вызывает превращение неметилированного цитозина в урацил, в то время как метилированный цитозин изменениям не подвергается [46, 56]. Бисульфитная конверсия стала «золотым стандартом» исследований метилирования ДНК. Для анализа обработанной бисульфитом ДНК применяют множество подходов, в том числе полимеразную цепную реакцию (ПЦР), микроматричный анализ, секвенирование, масс-спектрометрию. Основными техническими трудностями бисульфитной конверсии являются деградация ДНК, препятствующая точному микроматричному анализу и секвенированию, а также неполная конверсия цитозина в урацил, приводящая к ошибочной интерпретации результатов. Кроме того, критическим этапом бисульфитной конверсии является денатурация ДНК, так как превращение цитозина в урацил возможно только в одноцепочечной ДНК.

Интересно, что при воздействии бисульфитом происходит дезаминирование не только цитозина, но и 5-формилцитозина [57] и 5-карбоксилцитозина [58], в то время как 5-гидроксиметилцитозин обладает такой же устойчивостью к бисульфиту, как и 5-метилцитозин [59]. Иными словами, при бисульфитной конверсии цитозин, 5-формилцитозин и 5-карбоксилцитозин интерпретируются как немодифицированный цитозин, а 5-метилцитозин и 5-гидроксиметилцитозин — как метилированный цитозин. Разработанная недавно методика окислительного бисульфитного секвенирования (oxBS-seq), сочетающая обработку ДНК перрутатом калия ($KRuO_4$) и бисульфитом натрия, позволяет анализировать локализацию 5-гидроксиметилцитозина в геноме с разрешением до одного нуклеотида [57]. ТЕТ-опосредованное бисульфитное секвенирование (TAB-seq), основанное на окислении белками ТЕТ 5-метилцитозина, 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина, но не 5-гидроксиметилцитозина, защищенного от действия диоксигеназ гликозилированием [58], также позволяет проводить высокоточный анализ гидроксиметилирования ДНК. Метод селективного восстановления и бисульфитного секвенирования (redBS-seq), комбинирующий подходы redBS-seq и oxBS-seq, впервые позволил составить общую карту распределения в геноме эмбриональных ство-

ловых клеток мыши 5-метилцитозина, 5-гидроксиметилцитозина и 5-формилцитозина [59].

Обогащение ДНК метилированными фракциями с помощью антител или взаимодействия с ДНК специфических белков, обладающих сродством к метилированным последовательностям, также является высокоинформативным подходом к анализу 5-метилцитозина и его кислородсодержащих производных [60]. С его помощью можно проводить быструю оценку среднего уровня метилирования больших последовательностей ДНК, однако анализ с разрешением до одного нуклеотида невозможен. Обогащенную метилированными фракциями ДНК секвенируют или анализируют на микроматрицах.

Химическое мечение позволяет достигать селективного обогащения ДНК кислородсодержащими производными 5-метилцитозина. Так, гликозилирование приводит к образованию β -гликозил-5-гидроксиметилцитозина, с которым специфично взаимодействует J-связывающий белок 1 (JBP1), нанесенный на магнитные бусины. Дальнейший анализ гидроксиметилирования ДНК возможен с помощью количественной ПЦР, микроматриц или секвенирования [61]. Для анализа локализации 5-формилцитозина используют селективное мечение коммерческой реактивной пробой альдегида, приводящее к образованию биотинилированного 5-формилцитозина, и дальнейшее обогащение на магнитных бусинах со стрептавидином [62]. Метод, сочетающий химическое мечение и бисульфитное секвенирование (CAB-seq), позволяет селективно метить карбоксильные группы и анализировать распределение 5-карбоксилцитозина с точностью до одного нуклеотида [63].

Одномолекулярное секвенирование основано на прямом анализе 5-метилцитозина и продуктов его окисления благодаря различию их физических свойств [64]. Важно учитывать, что такой анализ возможен только в отсутствие этапа амплификации ДНК, в результате которой происходит потеря модификаций цитозина. Впервые одномолекулярное секвенирование в реальном времени (SMRT) без бисульфитной конверсии, основанное на включении в комплементарные нити ДНК флуоресцентно меченных нуклеотидов, было применено для анализа метилирования ДНК в 2010 г. [65]. Дополнение метода SMRT-технологией химического мечения позволяет также анализировать 5-гидроксиметилцитозин [66].

ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О БИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ КИСЛОРОДСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ 5-МЕТИЛЦИТОЗИНА

Изучение кислородсодержащих производных 5-метилцитозина активно проводится уже в течение нескольких лет. Изначально всем трем формам модифицированного цитозина приписывали роль промежуточных продуктов в процессе ферментативного деметилирования ДНК [1, 2]. Однако оказалось, что кислородсодер-

жащие производные 5-метилцитозина постоянно присутствуют в ДНК стволовых и дифференцированных клеток. При этом наиболее высокий уровень характерен для 5-гидроксиметилцитозина — 0,1–1 % [1, 67], тогда как содержание 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина не превышает 0,002 % от всего цитозина в ДНК [3, 44, 68]. Стабильно высокое содержание 5-гидроксиметилцитозина в геноме дифференцированных клеток свидетельствует о существовании механизма, препятствующего его превращению в 5-формилцитозин и 5-карбоксилцитозин [69]. На основании этих данных, а также неслучайной локализации в геноме возникло предположение о роли кислородсодержащих производных 5-метилцитозина в регуляции работы генов.

Действительно, для каждого из трех продуктов окисления 5-метилцитозина характерна специфичная локализация в геноме. Так, 5-гидроксиметилцитозин локализуется преимущественно в энхансерах — участках, фланкирующих промоторы или CpG-островки, а также собственно в генах. Локализация 5-гидроксиметилцитозина в энхансерах чаще всего указывает на активность последних [70–72]. Энхансеры меньше обогащены CpG-динуклеотидами, чем промоторы, большинство из которых соответствует районам CpG-островков. Тем не менее метилирование CpG-динуклеотидов в энхансерах может приводить к их инактивации. Предполагают, что гидроксильное окисление 5-метилцитозина в энхансерах необходимо для коррекции возможных эффектов аберрантного метилирования, поскольку 5-гидроксиметилцитозин предотвращает связывание белков-репрессоров с метилированной ДНК. Возможно также, что 5-гидроксиметилцитозин выполняет функцию уникального сайта связывания с белками-активаторами, участвующими в регуляции активности энхансеров. Наконец, не исключено, что 5-гидроксиметилцитозин в энхансерах существует транзиторно и подвергается окислению до 5-формилцитозина или 5-карбоксилцитозина. В пользу этого предположения свидетельствует специфичная локализация 5-формилцитозина в неактивных энхансерах [73, 74].

Наличие 5-гидроксиметилцитозина в участках, фланкирующих промоторы, вероятнее всего, является следствием повышенной активности белков TET, стабилизирующей неметилированное состояние CpG-островков. Ошибки метилирования ДНК могут приводить к аномальному подавлению генетической активности [75]. При этом границы CpG-островков больше доступны для метилаз и поэтому чаще подвергаются аберрантному метилированию. Таким образом, TET-опосредованное окисление аномально метилированного цитозина в участках, фланкирующих промоторы, необходимо для устранения ошибок и сохранения активности генов.

Причины специфичного гидроксиметилирования интрагенных последовательностей, так же как и функциональное значение этого феномена, неизвестны. Установ-

лено, что интрагенное содержание как 5-метилцитозина, так и 5-гидроксиметилцитозина положительно коррелирует с уровнем экспрессии [76, 77]. Предполагают, что повышенное содержание модифицированного цитозина может быть механизмом предотвращения инициации антисмысловой транскрипции. При этом 5-гидроксиметилцитозин может выступать в качестве маркера, не позволяющего комплексу инициации транскрипции связаться с ДНК [69, 76].

В пользу функциональной роли 5-гидроксиметилцитозина в регуляции генетической активности свидетельствует также специфичное связывание с ним некоторых белков. С помощью масс-спектрометрии показано, что белки RPL26, PRP8, MHS6, MeCP2, UHRF, Thy28 способны специфично узнавать 5-гидроксиметилцитозин [78, 79]. Однако на сегодняшний день взаимодействие с 5-гидроксиметилцитозином доказано только для домена SRA белка UHRF2 [80]. В отличие от аналогичного домена белка UHRF1, специфично связывающегося с полуметилированной ДНК, UHRF2 взаимодействует с полностью гидроксиметилированной или полугидроксиметилированной ДНК. Взаимодействие происходит за счет формирования водородной связи между гидроксильной группой 5-гидроксиметилцитозина и карбонильной группой T508 или G509 белка UHRF2 [80].

Анализ функционального значения 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина представляет трудности в связи с их низким содержанием в геноме млекопитающих. Число белков-кандидатов, которые обладают потенциальной специфичностью к 5-формилцитозину и 5-карбоксилцитозину, намного превышает таковое для 5-гидроксиметилцитозина [78, 79]. Профили 5-формилцитозина в эмбриональных стволовых клетках мышей отличаются от таковых 5-гидроксиметилцитозина и 5-метилцитозина [59, 73, 74, 81]. 5-формилцитозин преимущественно локализован в районах энхансеров и в экзонах; при этом его локализация в активных энхансерах характеризуется тканевой специфичностью [81]. В пользу специфичной функции 5-формилцитозина также свидетельствуют данные о его стабильности в геноме [82] и участии в конформационном переходе ДНК из В-формы в так называемую F-форму, свойственную раскручивающейся спирали [83]. Эти факты указывают на возможную роль 5-формилцитозина в ремоделировании хроматина: влиянии на ДНК-белковые взаимодействия за счет конформационных изменений ДНК.

Работы по изучению 5-карбоксилцитозина убедительно доказывают, что, несмотря на его низкое содержание в клетках, он может играть важную роль в обеспечении стабильности генома и в регуляции генетической активности [74, 84–86]. Так, среди белков, которые специфично узнают 5-карбоксилцитозин, преобладают ядерные белки, участвующие в регуляции транскрипции и поддержании структуры хроматина [78, 84–88]. Тиминовая ДНК гликозилазы человека может связываться

с 5-карбоксилцитозином и удалять его из ДНК [3, 4, 88]. Реакция происходит за счет выпетливания карбоксильного основания и взаимодействия с аминокислотами A145, H150, H151, Y152 и N157 тиминовой ДНК гликозилазы, образующих «карман» [86, 87]. Между карбоксильной группой и аминокислотами H150 и N157/N157 формируются водородные связи [87, 88] и инициируется взаимодействие с A145 за счет ван-дер-ваальсовых сил [88]. Конфигурация 5-карбоксилцитозина в «кармане» тиминовой ДНК гликозилазы дополнительно стабилизируется гидрофобным взаимодействием карбоксильной группы с Y152. Именно за счет формирования стабильной структуры с 5-карбоксилцитозином сродство к нему тиминовой ДНК гликозилазы в 2 раза больше, чем к 5-формилцитозину, 5-метилцитозину и 5-гидроксиметилцитозину [88].

Домен СХХС диоксигеназы TET3 специфично взаимодействует с 5-карбоксилцитозином в последовательности CcaCG и имеет к нему в 3 раза большее сродство, чем к 5-формилцитозину, 5-метилцитозину и 5-гидроксиметилцитозину [85]. Взаимодействие происходит путем формирования водородных связей между карбоксильной группой и аминокислотами домена СХХС. При этом 5-карбоксилцитозин одной нити ДНК взаимодействует с аминокислотами K88 и I83, а 5-карбоксилцитозин из комплементарной цепи — с T80, S74 и Q82 [85]. Интересно, что эти взаимодействия высококонсервативны и характерны только для доменов СХХС диоксигеназ TET3, но не для аналогичных доменов ДНК-метилтрансфераз DNMT1 [85, 89], которые узнают только неметилированные динуклеотиды CpG [89–93].

Картирование сайтов связывания TET3 в нервных клетках мозга эмбрионов мыши показало специфичную локализацию TET3 в сайтах начала транскрипции ограниченного числа генов, продукты которых преимущественно задействованы в лизосомной активности, сплайсинге РНК и эксцизионной репарации ДНК [85]. На основании этих данных высказано предположение, что специфичное связывание домена СХХС с 5-карбоксилцитозином играет важную роль в поддержании неметилированного состояния CpG-островков в промоторах этих генов [85]. При этом взаимодействие TET3 с 5-карбоксилцитозином становится наиболее вероятным при локальном TET3-опосредованном окислении 5-метилцитозина до 5-карбоксилцитозина. Иными словами, наличие С-терминального каталитического домена и N-терминального домена СХХС позволяет оксигеназе TET3 осуществлять локальное окисление 5-метилцитозина, а затем связываться с продуктом окисления — 5-карбоксилцитозином, препятствуя таким образом появлению в сайте связывания метильных групп. Альтернативным объяснением является экранирование 5-карбоксилцитозина с помощью домена СХХС от эксцизии тиминовой ДНК гликозилазой TDG, что, в свою очередь, может быть связано с необходимостью присут-

ствия 5-карбоксилцитозина в определенных последовательностях ДНК для выполнения ряда еще неизвестных функций [69].

5-карбоксилцитозин может участвовать в регуляции транскрипции, влияя на связывание с ДНК-мишенью белков-регуляторов транскрипции [84, 86]. Так, транскрипционный фактор WT1, специфично узнающий последовательность 5'-GCG(T/G)GGCG-3', связывается с ней только в случае наличия цитозина, 5-метилцитозина или 5-карбоксилцитозина, но не 5-гидроксиметилцитозина или 5-формилцитозина [84]. Избирательность связывания обеспечивается за счет формирования водородной связи между аминокислотой Q369 белка WT1 и карбоксильной группой 5-карбоксилцитозина [84]. Также недавно было показано, что интрагенная локализация 5-карбоксилцитозина приводит к замедлению транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой II вследствие образования водородной связи между карбоксильной группой 5-карбоксилцитозина и аминокислотой Q531 в РНК-полимеразе II [86]. Эти факты указывают на то, что эпигенетический эффект 5-карбоксилцитозина может варьировать в зависимости от его локализации — в промоторах или собственно в генах.

Специфичная локализация в геноме и высокоспецифичное взаимодействие с белками клетки, в том числе с регуляторами транскрипции, свидетельствуют о двойной биологической роли кислородсодержащих производных 5-метилцитозина — как промежуточных продуктов в процессе активного деметилирования ДНК и как эпигенетических регуляторов работы генома [94, 95].

Поскольку пики образования продуктов окисления 5-метилцитозина приходятся на периоды глобального деметилирования генома в первичных половых клетках и в доимплантационных эмбрионах млекопитающих, считалось, что их роль в глобальном эпигенетическом репрограммировании генома сводится, главным образом, к промежуточным звеньям активного деметилирования ДНК [96]. Однако недавно методами иммунофлюоресценции и жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией было показано, что снижение уровня метилирования ДНК в мужском геноме зигот мыши происходит не за счет гидроксилирования 5-метилцитозина [97]. Ингибирование активности ТЕТ3 дефероксамином, так же как и делеции *Tet3*, препятствовало появлению 5-гидроксиметилцитозина, но не оказывало влияния на снижение уровня 5-метилцитозина. Учитывая общую тенденцию к снижению уровня метилирования ДНК в доимплантационном развитии, парадоксальным кажется наличие в зиготах мышей метилазной активности как *de novo*, так и поддерживающей метилированное состояние ДНК после репликации. Еще более удивительным оказалось, что появление в зиготе 5-гидроксиметилцитозина зависит именно от этой метилазной активности [97]. Иными словами, окислению до 5-гидроксиметилцитозина под-

вергается 5-метилцитозин, не привнесенный с геномом сперматозоида, как полагали раньше, а возникший после оплодотворения в геноме самой зиготы. Остается непонятным, за счет чего в зиготах происходит снижение метилирования ДНК, унаследованного из сперматозоида. Таким образом, оказалось, что в зиготах мышей Tet3-опосредованное гидроксилирование 5-метилцитозина выполняет функцию поддержания гипометилированного состояния, предотвращая накопление метильных групп, переносимых на цитозин метилтрансферазами Dnmt3a и Dnmt1. Эти данные свидетельствуют о том, что эпигенетическое репрограммирование на начальных этапах развития млекопитающих является не линейным процессом последовательного деметилирования и реметилирования генома, а сложно организованной системой эпигенетических взаимодействий, включающих активное деметилирование, метилирование *de novo* и Tet3-опосредованное гидроксилирование 5-метилцитозина. Значение 5-гидроксиметилцитозина на этом этапе остается неясным, но совершенно очевидно, что оно не ограничено только ролью промежуточного продукта в процессе деметилирования ДНК.

Таким образом, за короткое время, прошедшее с момента открытия ТЕТ-опосредованного образования 5-гидроксиметилцитозина, 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина, представления об их биологической роли претерпели значительные изменения. Несмотря на активное изучение, значение продуктов окисления 5-метилцитозина в геноме млекопитающих остается малопонятным и требует дальнейших углубленных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Продукты окисления 5-метилцитозина — 5-гидроксиметилцитозин, 5-формилцитозин и 5-карбоксилцитозин — являются объектом пристального изучения уже более пяти лет. Обратимость биохимических превращений цитозина лежит в основе свойства пластичности эпигенома — способности претерпевать изменения в ответ на действие экзогенных и эндогенных факторов. Привлекательным направлением является разработка способов целенаправленного воздействия на паттерны модифицированного цитозина с целью их коррекции и терапии связанных с эпигенетическими аномалиями патологий. Перспектива создания эффективных эпигенетических лекарств служит стимулом для изучения роли кислородсодержащих производных 5-метилцитозина в геноме млекопитающих.

По мере разработки и совершенствования методов исследования и появления новых экспериментальных данных представления о биологическом значении кислородсодержащих производных 5-метилцитозина претерпевали большие изменения. На смену представлениям о 5-гидроксиметилцитозине, 5-формилцитозине

и 5-карбокситимозине как промежуточных соединениях в процессе активного деметилирования ДНК [1, 2] пришла концепция их двойной биологической функции — как звеньев цепи ТЕТ-опосредованного деметилирования и как стабильных эпигенетических модификаций, регулирующих работу генома [94, 95]. Неожиданными и удивительными стали данные о том, что в зиготах мыши 5-гидроксиметилцитозин образуется из 5-метилцитозина, возникшего уже после оплодотворения в геноме самой зиготы, а не из 5-метилцитозина генома сперматозоида, как полагали ранее [97]. Это открытие, с одной стороны, свидетельствует в пользу собственных биологических функций 5-гидроксиметилцитозина в геноме зиготы, с другой — доказывает, что репрограммирование генома ранних зародышей представляет собой сложный процесс и что появление продуктов окисления 5-метилцитозина не всегда отражает процесс активного деметилирования, направленный на стирание привнесенного из гамет рисунка метилирования ДНК.

Таким образом, не вызывает сомнения, что кислородсодержащие производные 5-метилцитозина являются важным компонентом эпигенетической сети. Всестороннее освещение связанных с ними биологических феноменов потребует многих лет дальнейших исследований, а представления о структурно-функциональном значении в геноме млекопитающих еще не раз подвергнутся пересмотру. Однако уже сегодня очевидно, что ТЕТ-опосредованное окисление 5-метилцитозина, которое на протяжении нескольких лет считалось основным механизмом активного деметилирования ДНК, необходимо не столько для удаления метильных групп, сколько для создания на определенных этапах развития и в определенных локусах генома новых вариантов модифицированного цитозина — 5-гидроксиметилцитозина, 5-формилцитозина и 5-карбокситимозина.

Благодарности

О.А. Ефимова благодарит Российский фонд фундаментальных исследований (РФФИ) за финансовую поддержку (грант № 16-34-60107-мол_а_дк).

О.А. Ефимова и А.В. Тихонов являются получателями стипендии Президента РФ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Krüger A, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*. 2009;324:929-930. doi: 10.1126/science.1169786.
2. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009;324:930-935. doi: 10.1126/science.1170116.
3. He YF, Li BZ, Li Z, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*. 2011;333:1303-1307. doi: 10.1126/science.1210944.
4. Maiti A, Drohat AC. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J Biol Chem*. 2011;286(41):35334-35338. doi: 10.1074/jbc.C111.284620.
5. Ефимова О.А., Пендина А.А., Тихонов А.В., и др. Метилирование ДНК — основной механизм репрограммирования и регуляции генома человека // Медицинская генетика. — 2012. — Т. 11. — № 4. — С. 10–18. [Efimova OA, Pendina AA, Tikhonov AV, et al. DNA methylation — a major mechanism of human genome reprogramming and regulation. *Meditinskaya genetika*. 2012;11(4):10-18. (In Russ.)]
6. Kishikawa S, Murata T, Ugai H, et al. Control elements of Dnmt1 gene are regulated in cell-cycle dependent manner. *Nucleic Acids Res Suppl*. 2003;3:307-309. doi: 10.1093/nass/3.1.307.
7. Ko YG, Nishino K, Hattori N, et al. Stage-by-stage change in DNA methylation status of Dnmt1 locus during mouse early development. *J Biol Chem*. 2005;280(10):9627-9634. doi: 10.1074/jbc.M41382200.
8. Trasler JM, Alcivar AA, Hake LE, et al. DNA methyltransferase is developmentally expressed in replicating and non-replicating male germ cells. *Nucleic Acids Res*. 1992;20(10):2541-2545.
9. Mertineit C, Yoder JA, Taketo T, et al. Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development*. 1998;125:889-897.
10. Chen T, Li E. Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;301:179-201.
11. Arand J, Spieler D, Karius T, et al. *In vivo* control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. *PLoS Genet*. 2012;8(6):e1002750. doi: 10.1371/journal.pgen.1002750.
12. Ramsahoye BH, Biniszkiwicz D, Lyko F, et al. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(10):5237-5242.
13. Shirane K, Toh H, Kobayashi H, et al. Mouse oocyte methylomes at base resolution reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases. *PLoS Genet*. 2013;9:e1003439. doi: 10.1371/journal.pgen.1003439.
14. Watanabe D, Suetake I, Tada T, et al. Stage- and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis. *Mech Dev*. 2002;118(1-2):187-190.
15. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99:247-257.

16. Kato Y, Kaneda M, Hata K, et al. Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum Mol Genet.* 2007;16:2272-2280. doi: 10.1093/hmg/ddm179.
17. Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, et al. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science.* 2001;294(5551):2536-2539. doi: 10.1126/science.1065848.
18. Hata K, Okano M, Lei H, Li E. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development.* 2002;129(8):1983-1993.
19. Turek-Plewa J, Jagodzinski PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett.* 2005;10:631-647.
20. Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, et al. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science.* 2006;311:395-398. doi: 10.1126/science.1120976.
21. Zhao H, Chen T. Tet family of 5-methylcytosine dioxygenases in mammalian development. *J Hum Genet.* 2013;58(7):421-427. doi: 10.1038/jhg.2013.63.
22. Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr.* 2009;21(2):243-251.
23. Dickson KM, Gustafson CB, Young JI, et al. Ascorbate-induced generation of 5-hydroxymethylcytosine is unaffected by varying levels of iron and 2-oxoglutarate. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;439:522-527. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.010.
24. Li W, Liu M. Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues. *J Nucleic Acids.* 2011;2011:870726. doi: 10.4061/2011/870726.
25. Gustafson CB, Yang C, Dickson KM, et al. Epigenetic reprogramming of melanoma cells by vitamin C treatment. *Clin Epigenetics.* 2015;7:51. doi: 10.1186/s13148-015-0087-z.
26. Yuan BF. 5-methylcytosine and its derivatives. *Adv Clin Chem.* 2014;67:151-87. doi: 10.1016/bs.acc.2014.09.003.
27. Li M, Hu SL, Shen ZJ, et al. High-performance capillary electrophoretic method for the quantification of global DNA methylation: application to methotrexate-resistant cells. *Anal Biochem.* 2009;387:71-75. doi: 10.1016/j.ab.2008.12.033.
28. Fraga MF, Uriol E, Borja Diego L, et al. High-performance capillary electrophoretic method for the quantification of 5-methyl 2'-deoxycytidine in genomic DNA: application to plant, animal and human cancer tissues. *Electrophoresis.* 2002;23:1677-1681. doi: 10.1002/1522-2683(200206)23:11<1677::AID-ELPS1677>3.0.CO;2-Z.
29. Stach D, Schmitz OJ, Stilgenbauer S, et al. Capillary electrophoretic analysis of genomic DNA methylation levels. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:E2.
30. Fraga MF, Rodriguez R, Canal MJ. Rapid quantification of DNA methylation by high performance capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 2000;21:2990-2994. doi: 10.1002/1522-2683(20000801)21:14<2990::AID-ELPS2990>3.0.CO;2-I.
31. Zinellu A, Sotgia S, De Murtas V, et al. Evaluation of methylation degree from formalin-fixed paraffin-embedded DNA extract by field-amplified sample injection capillary electrophoresis with UV detection. *Anal Bioanal Chem.* 2011;399:1181-1186. doi: 10.1007/s00216-010-4417-x.
32. Wirtz M, Stach D, Kliem HC, et al. Determination of the DNA methylation level in tumor cells by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis.* 2004;25:839-845. doi: 10.1002/elps.200305761.
33. Wang X, Song Y, Song M, et al. Fluorescence polarization combined capillary electrophoresis immunoassay for the sensitive detection of genomic DNA methylation. *Anal Chem.* 2009;81:7885-7891.
34. Motorin Y, Lyko F, Helm M. 5-methylcytosine in RNA: detection, enzymatic formation and biological functions. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:1415-1430. doi: 10.1093/nar/gkp1117.
35. Yin R, Mao SQ, Zhao B, et al. Ascorbic Acid enhances tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. *J Am Chem Soc.* 2013;135:10396-10403. doi: 10.1021/ja4028346.
36. Yang I, Fortin MC, Richardson JR, Buckley B. Fused-core silica column ultra-performance liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry for determination of global DNA methylation status. *Anal Biochem.* 2011;409:138-143. doi: 10.1016/j.ab.2010.10.012.
37. Wang X, Suo Y, Yin R, et al. Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for accurate quantification of global DNA methylation in human sperms. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011;879:1647-1652. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.04.002.
38. Kok RM, Smith DE, Barto R, et al. Global DNA methylation measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: analytical technique, reference values and determinants in healthy subjects. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45:903-911. doi: 10.1515/CCLM.2007.137.
39. Romerio AS, Fiorillo G, Terruzzi I, et al. Measurement of DNA methylation using stable isotope dilution and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2005;336:158-163. doi: 10.1016/j.ab.2004.09.034.
40. Rossella F, Polledri E, Bollati V, et al. Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the assessment. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2009;23(17):2637-2646. doi: 10.1002/rcm.4166.
41. Tang Y, Gao XD, Wang Y, et al. Widespread existence of cytosine methylation in yeast DNA measured by

- gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem.* 2012;84:7249-7255. doi: 10.1021/ac301727c.
42. Leonard SA, Wong SC, Nyce JW. Quantitation of 5-methylcytosine by onedimensional high-performance thin-layer chromatography. *J Chromatogr.* 1993;645:189-192.
43. Barciszewska MZ, Barciszewska AM, Rattan SI. TLC-based detection of methylated cytosine: application to aging epigenetics. *Biogerontology.* 2007;8:673-678. doi: 10.1007/s10522-007-9109-3.
44. Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science.* 2011;333:1300-1303. doi: 10.1126/science.1210597.
45. Oakeley EJ, Schmitt F, Jost JP. Quantification of 5-methylcytosine in DNA by the chloroacetaldehyde reaction. *Biotechniques.* 1999;27:744-746,748-750,752.
46. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:1827-1831.
47. Hu J, Xing X, Xu X, et al. Selective chemical labelling of 5-formylcytosine in DNA by fluorescent dyes. *Chemistry.* 2013;19:5836-5840. doi: 10.1002/chem.201300082.
48. Пендина А.А., Ефимова О.А., Каминская А.Н., и др. Иммуноцитохимический анализ статуса метилирования метафазных хромосом человека // Цитология. — 2005. — Т. 47. — № 8. — С. 731–737. [Pendina AA, Efimova OA, Kaminskaya AN, et al. Immunocytochemical analysis of human metaphase chromosome methylation status. *Tsitologiya.* 2005;47(8):731-737. (In Russ.)]
49. Ефимова О.А., Пендина А.А., Тихонов А.В., и др. Сравнительный иммуноцитохимический анализ профилей метилирования ДНК метафазных хромосом из лимфоцитов взрослых индивидов и плодов человека // Молекулярная медицина. — 2015. — № 3. — С. 17–21. [Efimova OA, Pendina AA, Tikhonov AV, et al. A comparative immunocytochemical analysis of DNA methylation patterns in human metaphase chromosomes of adults and fetuses. *Molekulyarnaya meditsina.* 2015;(3):17-21. (In Russ.)]
50. Kokalj-Vokac N, Zagorac A, Pristovnik M, et al. DNA methylation of the extraembryonic tissues: an in situ study on human metaphase chromosomes. *Chromosome Res.* 1998;6(3):161-166.
51. Баранов В.С., Пендина А.А., Кузнецова Т.В., и др. Некоторые особенности статуса метилирования метафазных хромосом у зародышей человека доимплантационных стадий развития // Цитология. — 2005. — Т. 47. — № 8. — С. 723–730. [Baranov VS, Pendina AA, Kuznetsova TV, et al. Peculiarities of metaphase chromosome methylation pattern in preimplantation human embryos. *Tsitologiya.* 2005;47(8):723-730. (In Russ.)]
52. Pendina AA, Efimova OA, Fedorova ID, et al. DNA methylation patterns of metaphase chromosomes in human preimplantation embryos. *Cytogenet Genome Res.* 2011;132(1-2):1-7. doi: 10.1159/000318673.
53. Efimova OA, Pendina AA, Tikhonov AV, et al. Chromosome hydroxymethylation patterns in human zygotes and cleavage-stage embryos. *Reproduction.* 2015;149(3):223-233. doi: 10.1530/REP-14-0343.
54. Nestor C, Ruzov A, Meehan R, Dunican D. Enzymatic approaches and bisulfite sequencing cannot distinguish between 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in DNA. *Biotechniques.* 2010;48(4):317-319. doi: 10.2144/000113403.
55. Kinney SM, Chin HG, Vaisvila R, et al. Tissue-specific distribution and dynamic changes of 5-hydroxymethylcytosine in mammalian genomes. *J Biol Chem.* 2011;286:24685-24693. doi: 10.1074/jbc.M110.217083.
56. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:2990-2997.
57. Booth MJ, Branco MR, Ficz G, et al. Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution. *Science.* 2012;336:934-937. doi: 10.1126/science.1220671.
58. Yu M, Hon GC, Szulwach KE, et al. Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. *Cell.* 2012;149:1368-1380. doi: 10.1016/j.cell.2012.04.027.
59. Booth MJ, Marsico G, Bachman M, et al. Quantitative sequencing of 5-formylcytosine in DNA at single-base resolution. *Nat Chem.* 2014;6(5):435-440. doi: 10.1038/nchem.1893.
60. Thu KL, Pikor LA, Kennett JY, et al. Methylation analysis by DNA immunoprecipitation. *J Cell Physiol.* 2010;222:522-531. doi: 10.1002/jcp.22009.
61. Robertson AB, Dahl JA, Vagbo CB, et al. A novel method for the efficient and selective identification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 2011;39: e55. doi: 10.1093/nar/gkr051.
62. Raiber EA, Beraldi D, Ficz G, et al. Genome-wide distribution of 5-formylcytosine in embryonic stem cells is associated with transcription and depends on thymine DNA glycosylase. *Genome Biol.* 2012;13:R69. doi: 10.1186/gb-2012-13-8-r69.
63. Lu X, Song CX, Szulwach K, et al. Chemical modification-assisted bisulfite sequencing (CAB-Seq) for 5-carboxylcytosine detection in DNA. *J Am Chem Soc.* 2013;135:9315-9317. doi: 10.1021/ja4044856.
64. Korlach J, Turner SW. Going beyond five bases in DNA sequencing. *Curr Opin Struct Biol.* 2012;22:251-261. doi: 10.1016/j.sbi.2012.04.002.
65. Flusberg BA, Webster DR, Lee JH, et al. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nat Methods.* 2010;7:461-465. doi: 10.1038/nmeth.1459.

66. Song CX, Clark TA, Lu XY, et al. Sensitive and specific single-molecule sequencing of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Methods*. 2012;9:75-77. doi: 10.1038/ncomms1237.
67. Globisch D, Munzel M, Muller M, et al. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One*. 2010;5(12): e15367. doi: 10.1371/journal.pone.0015367.
68. Pfaffeneder T, Spada F, Wagner M, et al. Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA. *Nat Chem Biol*. 2014;10:574-581. doi: 10.1038/nchembio.1532.
69. Song J, Pfeifer GP. Are there specific readers of oxidized 5-methylcytosine bases? *Bioessays*. 2016;38:1038-1047. doi: 10.1002/bies.201600126.
70. Stroud H, Feng S, Morey Kinney S, et al. 5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells. *Genome Biol*. 2011;12: R54. doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r54.
71. Hon GC, Song CX, Du T, et al. 5mC oxidation by Tet2 modulates enhancer activity and timing of transcriptome reprogramming during differentiation. *Mol Cell*. 2014;56:286-297. doi: 10.1016/j.molcel.2014.08.026.
72. Lu F, Liu Y, Jiang L, et al. Role of Tet proteins in enhancer activity and telomere elongation. *Genes Dev*. 2014;28:2103-2119. doi: 10.1101/gad.248005.114.
73. Song CX, Szulwach KE, Dai Q, et al. Genome-wide profiling of 5-formylcytosine reveals its roles in epigenetic priming. *Cell*. 2013;153:678-691. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.001.
74. Shen L, Wu H, Diep D, et al. Genome-wide analysis reveals TET- and TDG-dependent 5-methylcytosine oxidation dynamics. *Cell*. 2013;153:692-706. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.002.
75. Williams K, Christensen J, Helin K. DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Rep*. 2012;13:28-35. doi: 10.1038/embor.2011.233.
76. Rauch TA, Wu X, Zhong X, et al. A human B cell methylome at 100-base pair resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(3):671-678. doi: 10.1073/pnas.0812399106.
77. Song CX, Szulwach KE, Fu Y, et al. Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Biotechnol*. 2011;29:68-72. doi: 10.1038/nbt.1732.
78. Spruijt CG, Gnerlich F, Smits AH, et al. Dynamic readers for 5-(hydroxy) methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell*. 2013;152:1146-1159. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.004.
79. Iurlaro M, Ficiz G, Oxley D, et al. A screen for hydroxymethylcytosine and formylcytosine binding proteins suggests functions in transcription and chromatin regulation. *Genome Biol*. 2013;14:R119. doi: 10.1186/gb-2013-14-10-r119.
80. Zhou T, Xiong J, Wang M, et al. Structural basis for hydroxymethylcytosine recognition by the SRA domain of UHRF2. *Mol Cell*. 2014;54:879-886. doi: 10.1016/j.molcel.2014.04.003.
81. Iurlaro M, McInroy GR, Burgess HE, et al. *In vivo* genome-wide profiling reveals a tissue-specific role for 5-formylcytosine. *Genome Biol*. 2016;17(1):141. doi: 10.1186/s13059-016-1001-5.
82. Bachman M, Uribe-Lewis S, Yang X, et al. 5-Formylcytosine can be a stable DNA modification in mammals. *Nat Chem Biol*. 2015;11:555-557. doi: 10.1038/nchembio.1848.
83. Raiber EA, Murat P, Chirgadzhe DY, et al. 5-Formylcytosine alters the structure of the DNA double helix. *Nat Struct Mol Biol*. 2015;22:44-49. doi: 10.1038/nsmb.2936.
84. Hashimoto H, Olanrewaju YO, Zheng Y, et al. Wilms tumor protein recognizes 5-carboxylcytosine within a specific DNA sequence. *Genes Dev*. 2014;28:2304-2313. doi: 10.1101/gad.250746.114.
85. Jin SG, Zhang ZM, Dunwell TL, et al. Tet3 reads 5-carboxylcytosine through its CXXC domain and is a potential guardian against neurodegeneration. *Cell Rep*. 2016;14:493-505. doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.044.
86. Wang L, Zhou Y, Xu L, et al. Molecular basis for 5-carboxylcytosine recognition by RNA polymerase II elongation complex. *Nature*. 2015;523:621-625. doi: 10.1038/nature14482.
87. Hashimoto H, Zhang X, Cheng X. Activity and crystal structure of human thymine DNA glycosylase mutant N140A with 5-carboxylcytosine DNA at low pH. *DNA Repair (Amst)*. 2013;12:535-540. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.04.003.
88. Zhang L, Lu X, Lu J, et al. Thymine DNA glycosylase specifically recognizes 5-carboxylcytosine-modified DNA. *Nat Chem Biol*. 2012;8:328-330. doi: 10.1038/nchembio.914.
89. Xu Y, Xu C, Kato A, et al. Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for *Xenopus* eye and neural development. *Cell*. 2012;151:1200-1213. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.014.
90. Allen MD, Grummitt CG, Hilcenko C, et al. Solution structure of the nonmethyl-CpG-binding CXXC domain of the leukaemia-associated MLL histone methyltransferase. *EMBO J*. 2006;25:4503-4512. doi: 10.1038/sj.emboj.7601340.
91. Cierpicki T, Risner LE, Grembecka J, et al. Structure of the MLL CXXC domain-DNA complex and its functional role in MLL-AF9 leukemia. *Nat Struct Mol Biol*. 2010;17:62-68. doi: 10.1038/nsmb.1714.
92. Song J, Rechkoblit O, Bestor TH, Patel DJ. Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation. *Science*. 2011;331:1036-1040. doi: 10.1126/science.1195380.

93. Xu C, Bian C, Lam R, et al. The structural basis for selective binding of non-methylated CpG islands by the CFP1 CXXC domain. *Nat Commun.* 2011;2:227. doi: 10.1038/ncomms1237.
94. Branco MR, Ficz G, Reik W. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nat Rev Genet.* 2011;13:7-13. doi: 10.1038/nrg3080.
95. Efimova OA, Pendina AA, Tikhonov AV, et al. Oxidized form of 5-methylcytosine — 5-hydroxymethylcytosine: a new insight into the biological significance in the mammalian genome. *Russian Journal of Genetics: Applied Research.* 2015;5:75-81.
96. Dean W. DNA methylation and demethylation: a pathway to gametogenesis and development. *Mol Reprod Dev.* 2014;81(2):113-125. doi: 10.1002/mrd.22280.
97. Amouroux R, Nashun B, Shirane K, et al. De novo DNA methylation drives 5hmC accumulation in mouse zygotes. *Nat Cell Biol.* 2016;18(2):225-233. doi: 10.1038/ncb3296.

THE EVOLUTION OF IDEAS ON THE BIOLOGICAL ROLE OF 5-METHYLCYTOSINE OXIDATIVE DERIVATIVES IN THE MAMMALIAN GENOME

O.A. Efimova, A.A. Pendina, A.V. Tikhonov, V.S. Baranov

For citation: *Ecological genetics.* 2016;14(4):14-25

✪ **SUMMARY:** In this review, we summarize data on 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine — cytosine modifications which are produced by TET-mediated oxidation of 5-methylcytosine in DNA. We show the biochemistry of modified cytosine as well as methods for its global and location analysis. We also highlight the milestones in the evolution of ideas on the biological role of 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine in the mammalian genome since their discovery in 2009 till present.

✪ **KEYWORDS:** 5-hydroxymethylcytosine; 5-formylcytosine; 5-carboxylcytosine; 5-methylcytosine; 5-methylcytosine oxidative derivatives; methods of analysis; active DNA demethylation; epigenetic genome regulation.

✪ Информация об авторах

Ольга Алексеевна Ефимова — канд. биол. наук, научный сотрудник, лаборатория пренатальной диагностики наследственных и врожденных болезней человека. ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта». E-mail: efimova_o82@mail.ru.

Анна Андреевна Пендина — канд. биол. наук, научный сотрудник, лаборатория пренатальной диагностики наследственных и врожденных болезней человека. ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта». E-mail: pendina@mail.ru.

Андрей Владимирович Тихонов — лаборант-исследователь, лаборатория пренатальной диагностики наследственных и врожденных болезней человека. ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта». E-mail: tixonov5790@gmail.com.

Владислав Сергеевич Баранов — д-р. мед. наук, профессор, заведующий лабораторией, член-корр. РАН, заслуженный деятель науки, лаборатория пренатальной диагностики наследственных и врожденных болезней человека. ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта». E-mail: baranov@vb2475.spb.edu.

✪ Information about the authors

Olga A. Efimova — Researcher, PhD, Laboratory for Prenatal Diagnosis of human inherited and inborn disorders. D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia. E-mail: efimova_o82@mail.ru.

Anna A. Pendina — Researcher, PhD, Laboratory for Prenatal Diagnosis of human inherited and inborn disorders. D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia. E-mail: pendina@mail.ru.

Andrei V. Tikhonov — assistant researcher, Laboratory for Prenatal Diagnosis of human inherited and inborn disorders. D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia. E-mail: tixonov5790@gmail.com.

Vladislav S. Baranov — Head of the laboratory, prof, Laboratory for Prenatal Diagnosis of human inherited and inborn disorders. D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia. E-mail: baranov@vb2475.spb.edu.