



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Bydgoszcz 2021 r.



UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

mgr Maciej Gawroński

**Metody modulacji aktywności białek rodziny TET w komórkach –
badania *in vitro***

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna

Promotor:

Dr hab. n. med. Daniel Gackowski, prof. UMK

Bydgoszcz 2021 r.

*Pragnę serdecznie podziękować niżej wymienionym osobom,
bez których niniejsza praca nigdy by nie powstała.*

*dr. hab. n. med. Danielowi Gackowskiemu, prof. UMK,
którego wsparcie merytoryczne, spokój i dobre słowo
były skałą na wzburzonym morzu wątpliwości.*

*dr Marcie Starczak,
której przyjaźń zawsze była mi światłem,
nawet w najmroczniejszych godzinach.*

*Pracownikom Katedry Biochemii Klinicznej,
których cierpliwość i wyrozumiałość okazała się niezmiernie cenna.*

*Rodzicom,
którzy przez wszystkie lata wspierali mnie na każdym kroku.*

Praca powstała przy udziale środków w ramach grantu Preludium 15 pt. „Badanie udziału poszczególnych białek rodziny TET w generowaniu epigenetycznych modyfikacji w DNA.” (UMO-2018/29/N/NZ1/00497).

Spis treści

1. Wstęp.....	6
1.1. Struktura chromatyny i modyfikacje białek histonowych a dostępność do informacji genetycznej	7
1.2. Metylacja DNA	10
1.3. Demetylacja DNA	13
1.3.1 Pasywna demetylacja DNA.....	13
1.3.2 Demetylacja na drodze deaminacji	13
1.3.3 Demetylacja przy udziale białek TET	14
1.3.4 Budowa białek TET	17
1.3.4.1 Mechanizm katalityczny białek TET	19
1.3.4.2 Rola białek TET w wybranych procesach fizjologicznych i patofizjologicznych ...	21
1.4. Modulatory aktywności białek TET	25
1.4.1 α -ketoglutaran i jego onkometabolity	25
1.4.2 Jony żelaza i jego chelatory	26
1.4.3 Jony innych metali ciężkich	27
1.4.4 Witamina C i inne antyoksydanty	28
1.4.5 Hipoksja.....	30
1.4.6 Tetrahydrourydyna	32
1.4.7 5-azacytydyna	32
2. Cele pracy	34
3. Materiały i metody	35
3.1. Hodowle komórkowe.....	35
3.1.1 Użyte linie komórkowe	35
3.1.2 Przygotowanie medium do hodowli komórkowych	39
3.1.3 Zakładanie hodowli komórkowych	39
3.1.4 Liczenie komórek.....	40
3.1.5 Pasażowanie komórek.....	40
3.1.6 Krioprezerwacja komórek	41
3.1.7 Ogólne zasady wykonania eksperymentów	42
3.2. Chromatograficzna analiza poziomu epigenetycznych modyfikacji w DNA	44
3.3. Chromatograficzna analiza poziomu witaminy C w komórkach i medium hodowlanym	50
3.3.1 Oznaczenia stężenia witaminy C w badanych próbkach.....	51
3.3.2 Oznaczenia zawartości tyminy w badanych próbkach.....	52
3.4. Statystyczna analizy wyników	53
4. Wyniki	55

4.1.	Wpływ potencjalnych wzmacniaczy aktywności enzymatycznej białek rodziny TET na poziomy ich produktów w DNA	55
4.1.1	α -ketoglutaran	55
4.1.2	Jony żelaza(II)	58
4.1.3	Witamina C.....	62
4.1.3.1	Porównanie wpływu izomerów kwasu askorbinowego na aktywność białek TET62	
4.1.3.2	Wpływ jednoczesnej ekspozycji na witaminę C, jony żelaza i α -ketoglutaran na aktywność białek TET	99
4.1.3.3	Kinetyka zmian poziomów epigenetycznych modyfikacji w DNA po ekspozycji na witaminę C	102
4.1.3.4	Porównanie wpływu różnych postaci witaminy C na aktywność białek TET	109
4.2.	Wpływ potencjalnych inhibitorów aktywności enzymatycznej białek rodziny TET na poziomy ich produktów w DNA	121
4.2.1	Jony niklu(II)	121
4.2.2	Deferoksyamina	124
4.3.	Wpływ innych czynników na białka TET	129
4.3.1	Ditiotreitrol.....	129
4.3.2	Tetrahydrourydyna	132
4.3.3	5-azacytydyna	141
4.3.4	Chlorek kobaltu(II).....	150
4.3.5	Hipoksja.....	160
5.	Dyskusja	178
6.	Wnioski	197
7.	Streszczenie	199
8.	Abstract	202
9.	Spis piśmiennictwa	205
10.	Zgoda Komisji Bioetycznej	216
11.	Wykaz użytych skrótów	217

1. Wstęp

Każdy eukariotyczny organizm wielokomórkowy, począwszy od najprostszych gąbek, poprzez liczącego nieco ponad 1000 komórek somatycznych nicienia *Caenorhabditis elegans*, czy niewielką muszkę owocową, na organizmach tak złożonych jak mysz i człowiek skończywszy, potrzebuje molekularnych mechanizmów, by z informacji zawartej w genotypie, uzyskać szeroki wachlarz fenotypów, charakteryzujących poszczególne komórki budujące dany organizm. O losach tych komórek, ich rozwoju, różnicowaniu, pełnionych funkcjach, proliferacji i śmierci decyduje nie tyle informacja zakodowana w sekwencjach nukleotydowych poszczególnych genów *per se*, co raczej dostępność do niej i kontekst, w jakim jest odczytywana. Z tego powodu konieczne jest istnienie dodatkowej warstwy informacji, znajdującej się niejako ponad czy też obok tej zawartej w genach, która warunkuje i reguluje ich ekspresję w taki sposób, by w danej komórce uległa jej jedynie ta informacja genetyczna, która warunkuje potrzebną w danym momencie funkcję.

Owe epigenetyczne (epi, gr. ἐπι – ponad, na zewnątrz) mechanizmy regulacji ekspresji genów to szerokie spektrum różnorodnych procesów molekularnych, do których zaliczamy m.in.: lokalizację i sposób upakowania informacji genetycznej w jądrze komórkowym (wraz z mechanizmami odpowiedzialnymi za remodelowanie struktury chromatyny), modyfikacje białek histonowych, chemiczne modyfikacje nukleotydów m.in. wprowadzane w procesach metylacji i demetylacji DNA, aktywność niekodujących cząsteczek RNA, czy też potranslacyjną obróbkę i modyfikację białek. Wzajemne interakcje, czy wręcz swoista „gra” wspomnianych mechanizmów, jak również mnogość i różnorodność cząsteczek w nie zaangażowanych, wraz z szeroką gamą znaczników i wprowadzanych modyfikacji, odpowiadają za plastyczność genomu, dzięki której komórki mogą w dynamiczny sposób reagować i dostosowywać się do środowiska.

W niniejszej pracy skupiono się na metodach modulacji aktywności białek rodziny TET, które odgrywają kluczową rolę w procesie aktywnej demetylacji DNA. Jednakże by lepiej zrozumieć kontekst, w jakim osadzony jest ten proces i jego znaczenie dla organizmu, w dalszej części wstępu po krótko omówiono najważniejsze z epigenetycznych mechanizmów regulujących ekspresję informacji genetycznej.

1.1. Struktura chromatyny i modyfikacje białek histonowych a dostępność do informacji genetycznej

O tym, czy dany gen ulegnie ekspresji w dużej mierze decyduje dostępność jego regionów promotorowych dla czynników transkrypcyjnych i kompleksu polimerazy RNA, która jest ściśle powiązana ze sposobem upakowania DNA w jądrze komórkowym. Najczęstszym i zarazem najbardziej dostępnym motywem w „luźno upakowanej” i transkrypcyjnie aktywnej euchromatynie jest „sznur koralu” – nić DNA nanizana na oktamer białek histonowych. Jednakże zdecydowana większość materiału genetycznego w komórce występuje w postaci dalece bardziej skondensowanej, której skrajną formę wyrażają praktycznie nieaktywne transkrypcyjnie chromosomy metafazowe. Dynamiczne przejścia pomiędzy silnie skondensowanymi a rozluźnionymi formami chromatyny regulują zarówno procesy metylacji i demetylacji DNA, jak również chemiczne modyfikacje białek histonowych, do których zaliczamy acetylację, deacetylację, metylację demetylację oraz choć w nieco mniejszym stopniu, fosforylację i ubikwitynację charakterystycznych aminokwasów w N-końcowym motywie białka, zwanego ogonem histonowym (1).

Proces acetylacji reszt lizyny w ogonach histonów tworzących nukleosom przeprowadzają białka z rodziny acetylotransferaz histonowych (ang. *histone acetyltransferases*, HAT), które przenoszą grupę acetylową, pochodzącą z acetylo-CoA, na grupę ϵ -aminową lizyny, co skutkuje zwiększeniem hydrofobowości białka, osłabieniem interakcji histon-histon oraz histon-DNA, a w efekcie przyjęciem luźniejszej, bardziej przystępnej dla czynników transkrypcyjnych struktury. Warto ponadto nadmienić, iż grupa acetylowa jest rozpoznawana przez szereg białek posiadających bromodomenę (BRD) specyficznie rozpoznającą ϵ -N-acetylowaną lizynę, które zaangażowane są w proces remodelingu chromatyny (2, 3).

Odwrotnością powyższego procesu jest przeprowadzana przez deacetylazy histonów (ang. *histone deacetylases*, HDAC) deacetylacja, skutkująca zmniejszeniem hydrofobowości, a zarazem zwiększeniem oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy białkami histonowymi, co prowadzi do przyjęcia bardziej zwartych, niedostępnych struktur, charakterystycznych dla transkrypcyjnie nieaktywnej heterochromatyny.

Kolejną ważną, choć już nie tak łatwą w interpretacji modyfikacją białek histonowych, jest metylacja reszt lizyny i argininy, którą przeprowadzają białka z rodziny

metylotransferaz histonowych (ang. *histone methyltransferases*, HMT), przenoszące grupę metylową z S-adenozylometioniny (SAM) na grupę ε-aminową lizyny i guanidynową argininy. Proces demetylacji przeprowadzają natomiast białka z rodziny demetylaz histonowych (ang. *histone demethylases*, HDM) Co ciekawe, poszczególne aminokwasy w konkretnych białkach histonowych mogą ulegać monometylacji (me1), dimetylacji (me2) i trimetylacji (me3), a o tym, czy dana modyfikacja wiąże się z aktywacją, czy też represją transkrypcji decyduje konkretne *locus* w histonie (Tabela1) (4).

Warto także nadmienić, iż wszystkie wspomniane modyfikacje białek histonowych nie istnieją w oderwaniu od siebie, a raczej składają się na tzw. „kod histonowy”, czyli charakterystyczny dla danego typu komórek układ chemicznych modyfikacji konkretnych białek histonowych, w newralgicznych regionach chromatyny, warunkujący transkrypcyjną dostępność genów w nich zawartych, a tym samym niejako kodującym fenotyp danej komórki. Co więcej zaburzenia wspomnianego „kodu” mogą stanowić istotny element składowy wielu jednostek chorobowych, w tym nowotworów (5-7).

Tabela 1. Opis najczęściej występujących modyfikacji białek histonowych (opracowano na podstawie Araki Y, Mimura T. 2017 (4) .

Modyfikacja	Opis
H2BK5me1	Znajdowana w aktywnych regionach promotorowych, powiązana z aktywacją transkrypcji.
H3K4me1 H3K4me2 H3K4me3	Wszystkie występują w miejscach startu transkrypcji (ang. <i>transcription start sites</i> , TSS) i w regionach promotorowych wysoce i średnio aktywnych genów, powiązane z aktywacją transkrypcji.
H3K9me1 H3K27me1	Obie modyfikacje często występują w regionach promotorowych aktywnych genów.
H3K9me2 H3K9me3 H3K27me2 H3K27me3	Dimetylacja, jak i trimetylacja dziewiątej i dwudziestej siódmej reszty lizyny w histonie trzecim znajdujące się w „wyciszonych” genach, silnie korelują z metylacją DNA, a co za tym idzie kojarzone są z restrykcją ekspresji genów. Modyfikacja H3K27me3 jest zaangażowana w inaktywację chromosomu X.

H3K36me1 H3K36me3	Trimetylacja tej reszty lizyny znajdująca się w promotorach genów aktywnych transkrypcyjnie, podczas gdy monometylacja raczej dotyczy genów wyciszonych.
H3K79me1 H3K79me2 H3K79me3	Mono i dimetylacja tej reszty nie jest powiązana ani z aktywacją, ani z represją transkrypcji, natomiast trimetylacja znajdująca się zarówno w regionach promotorowych genów aktywnych, jak i wyciszonych.
H4K20me1	Często współwystępuje z H3K9me1, powiązana z aktywacją transkrypcji.
H4K20me3	Modyfikacja o charakterze represyjnym, charakterystyczna dla heterochromatyny.
H3R8me2 H4R3me2	Obie modyfikacje reszt argininy są ze sobą powiązane, gdyż wprowadza je ten sam enzym, powiązane z wyciszeniem ekspresji genów, co więcej modyfikacja H4R3me2 bierze udział w metylacji DNA przez DNMT3a.
H3R17me2	Modyfikacja znajdująca się w promotorach genów aktywnych transkrypcyjnie.
H2AK119ub1	Monoubikwitynacja tej reszty kojarzona jest głównie z ograniczeniem transkrypcji genów. Zaangażowana w inaktywację chromosomu X.
H2BK120ub1	Znajdująca się w aktywnych transkrypcyjnie genach, indukuje wprowadzanie aktywujących modyfikacji H3K4me2 i H3K4me3.
H3T3p; H3S10p H3S28p; H4S1p	Fosforylacja reszt treoniny i seryny w histonie trzecim i czwartym zazwyczaj kojarzona jest ze zwiększeniem transkrypcji genów.
H2AK5ac; H2AK9ac H2BK5ac; H2BK12ac H2BK20ac; H2BK120ac H3K4ac; H3K9ac H3K14ac; H3K18ac H3K23ac; H3K27ac H3K36ac; H4K5ac H4K8ac; H4K12ac H4K16ac; H4K91ac	Niezależnie od lokalizacji reszty lizyny, jej acetylacja zawsze jest powiązana ze zwiększeniem ekspresji genów.

1.2. Metylacja DNA

Do jednych z najlepiej zbadanych epigenetycznych mechanizmów regulacji ekspresji genów należy metylacja DNA polegająca na addycji grupy metylowej, przez enzymy z grupy metylotransferaz DNA (ang. *DNA methyltransferases*, DNMT), do piątego węgla cytozyny, przy jednoczesnym przekształceniu S-adenozylometioniny (SAM), będącej donorem grupy metylowej, do S-adenozylhomocysteiny (SAH). Powstała w wyniku tej reakcji 5-metylocytozyna (5-mCyt), z racji relatywnie wysokiej częstotliwości występowania, nazywana jest „piątą zasadą DNA” - szacuje się, iż około 4% wszystkich cytozyn w ludzkim genomie jest metylowanych (8), z czego zdecydowana większość ulega metylacji w specyficznych miejscach w genomie, w których cytozyna jest związana z sąsiadującą guanozyną wiązaniem fosfodiesterowym (CpG). Owe reszty CpG bardzo licznie występują w obrębie genów, a 60-80% dinukleotydów CpG w ludzkich genach jest metylowana. Co ciekawe, klastry dinukleotydów CpG, zwane wyspami CpG (ang. *CpG islands*, CGI), bardzo często występują w pobliżu lub w samych regionach promotorowych genów i zazwyczaj pozostają niemetylowane (9, 10). Takie niemetylowane wyspy CpG są rozpoznawane przez szereg czynników transkrypcyjnych i stanowią miejsce regulacji ekspresji danego genu (11).

Wprowadzenie grupy metylowej w piątej pozycji pierścienia pirymidynowego cytozyny wiąże się z szeregiem zjawisk, które sprawiają, iż metylacja DNA w głównej mierze odpowiada za wyciszenie ekspresji genów. Przede wszystkim metylowane reszty cytozyny w promotorach genów mogą niejako maskować sekwencje promotorowe, które przestają być rozpoznawane przez czynniki transkrypcyjne, w efekcie czego nie dochodzi do utworzenia kompleksu DNA-czynnik transkrypcyjny-polimeraza RNA, co skutecznie hamuje ekspresję genu. Drugi aspekt związany z supresją ekspresji związany jest z faktem, iż grupa metylowa rozpoznawana jest przez szereg białek należących do kilku grup:

- a) białek posiadających konserwatywną domenę wiążącą grupę metylową (ang. *methyl-binding domain*, MBD),
- b) białek wiążących metylowany i niemetylowany DNA, wyposażonych w domenę palca cynkowego (ang. *zinc-finger domain*),
- c) białek rozpoznających hemimetylowany DNA, wyposażonych w domenę SRA,

Do wymienionych wyżej grup należy szereg znanych białek remodelujących strukturę chromatyny, które po rozpoznaniu grupy metylowej, wprowadzają modyfikacje w białkach histonowych, skutkujące przejściem chromatyny w bardziej skondensowane, nieaktywne transkrypcyjnie formy (12-16).

Warto w tym miejscu nadmienić, iż nieprawidłowości we wzorcu metylacji, zarówno hipermetylacja promotorów i wzmacniaczy ekspresji genów supresorowych, jak i hipometylacja onkogenów leżą u podstaw wielu jednostek chorobowych, zwłaszcza tych, w których dochodzi do zaburzeń w rozwoju, różnicowaniu i proliferacji komórek, a co za tym idzie są jednymi z kluczowych składowych procesów nowotworzenia i progresji nowotworu (17-19).

Istotnym jest również fakt, iż prawidłowy wzorzec metylacji powiązany jest z wyciszeniem, a więc i dezaktywacją, ruchomych elementów genomu, transpozonów, sekwencji powtórzonych, jak również ukrytych promotorów wewnątrzgenowych, dlatego też jego utrata w znacznym stopniu przyczynia się do zwiększenia niestabilności genomu, która również jest istotną składową kancerogenezy (20-23).

Co więcej, metylacja DNA nie tylko prowadzi do wyciszenia ekspresji poszczególnych genów, ale także zaangażowana jest w tzw. imprinting genomowy, który warunkuje ekspresję genów z poszczególnych alleli w zależności od ich pochodzenia (matczyne lub ojcowskie), jak również, przy udziale specyficznych lncRNA (ang. *long non-coding RNA*) umożliwia i podtrzymuje epigenetyczną inaktywację chromosomu X w żeńskich komórkach somatycznych (24-26). W tych aspektach, zaburzenia w prawidłowym wzorcu metylacji skutkują poważnymi chorobami (epi)genetycznymi takimi jak: Zespół Pradego-Willi`ego, Zespół Angelmana, Zespół Beckwitha-Wiedemanna czy Zespół Silvera-Russella (27).

Jak już wspomniano wcześniej, metylacja DNA przeprowadzana jest przez enzymy z grupy metylotransferaz DNA, wśród których aktywne enzymatycznie są: DNMT1, DNMT3a i DNMT3B (28). DNMT1 jest metylotransferazą odpowiedzialną za podtrzymanie wzorca metylacji po podziale komórkowym na nowo syntetyzowanej nici DNA, w sposób komplementarny do wzoru metylacji na nici rodzicielskiej, co umożliwia zachowanie oryginalnego wzorca metylacji i przekazanie go w niezmienionej formie komórkom potomnym. W związku z pełnioną funkcją metylotransferaza ta wykazuje zwiększone powinowactwo względem hemimetylowanego DNA, który rozpoznaje pozostając w kompleksie z białkiem UHRF1 (ang. *ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domain*

1) (16). Natomiast za metylację *de novo*, która zazwyczaj ma miejsce podczas embriogenezy oraz w trakcie dojrzewania i różnicowania komórek i tkanek odpowiedzialne są metylotransferazy DNMT3a i DNMT3b, które posiadają wyższe powinowactwo do niemetylowanych CpG.

Zarówno w przypadku metylacji zachowawczej, jak i zachodzącej *de novo* obserwuje się zjawisko, które polega na wciągnięciu zasady azotowej, w tym przypadku cytozyny, na zewnątrz podwójnej helisy DNA, a następnie kowalencyjnym związaniu jej w miejscu aktywnym metylotransferaz DNA, w którym dochodzi do przeniesienia grupy metylowej z SAM na piąty atom węgla zasady azotowej (ang. *base-flipping*). Wszystkie metylotransferazy DNA posiadają w C-końcowej domenie katalitycznej szereg motywów, dzięki którym mogą przeprowadzać powyższą reakcję. Za związanie donora grupy metylowej odpowiedzialne są motywy: I i X, motyw IV pozwala związać kowalencyjnie cytozynę, a motywy VI i IX uczestniczą w przeniesieniu grupy metylowej (29).

O specyficzności względem konkretnego *locus* genomowego, jak i o kontekście, w jakim działają poszczególne metylotransferazy DNA w dużej mierze decyduje N-końcowa część białka, zawierająca szereg domen regulatorowych, które odpowiadają za tak szerokie spektrum działania tych enzymów (30, 31). Co ciekawe, katalizowana przez metylotransferazy reakcja enzymatyczna nie jest całkowicie specyficzna substratowo, bowiem białka te mogą rozpoznawać analogi takie jak 5-azacytydyna, które po związaniu z miejscem aktywnym enzymu, terminują katalizowaną reakcję, a mechanizm ten leży u podstaw epigenetycznych terapii antynowotworowych opartych o związki demetylujące, takie jak 5-azacytydyna (Vidaza®) czy decytabina (Dacogen®) (32-34).

Warto zauważyć, iż mutacje w obrębie genów metylotransferaz są często obserwowane w wielu nowotworach (18, 19), a w szczególności w nowotworach hematologicznych, m. in. ostrych białaczkach: szpikowej i limfoblastycznej oraz chłoniakach: Hodgina i Burkita (35). Co więcej, fenotyp CIMP (ang. *CpG island methylator phenotype*, fenotyp metylatora wysp CpG) związany z szerokim spektrum zaburzeń we wzorcu metylacji jest obecny niemal w każdym typie nowotworu (36).

1.3. Demetylacja DNA

Aby zachować plastyczność genomu i możliwość dynamicznego reagowania na bodźce płynące ze środowiska zewnętrznego koniecznym jest, aby komórka mogła w sposób precyzyjny zarówno nakładać marker represyjny w określonych regionach DNA, jak i go z nich usuwać. Wzajemne interakcje, czy wręcz swoista „gra” pomiędzy procesami metylacji i demetylacji DNA leży u podstaw regulacji ekspresji genów, umożliwiając płynne przejście pomiędzy ich aktywacją a supresją. Na przestrzeni lat zaproponowano szereg potencjalnych mechanizmów demetylacji DNA, które wpisywałyby się w przedstawiony wyżej paradygmat.

1.3.1 Pasywna demetylacja DNA

Podczas replikacji DNA dochodzi do zmniejszenia globalnego poziomu metylacji, niejako na drodze rozcieńczenia, gdyż z miejsc w pełni metylowanych w nici rodzicielskiej, powstają miejsca hemimetylowane w niciach potomnych. Jeżeli w miejscu takim nie dojdzie do zachowawczego odnowienia wzorca metylacji przy udziale DNMT1, czy to w wyniku utraty aktywności enzymatycznej, czy też nierozpoznania hemimetylowanej sekwencji, to w następnych rundach replikacyjnych w części komórek potomnych dane *locus* całkowicie utraci grupy metylowe. Co ciekawe, zastąpienie 5-metylocytozyny w miejscu hemimetylowanym inną modyfikacją cytozyny może prowadzić do nierozpoznania takiej sekwencji przez DNMT1 i utraty wzorca metylacji przy następnym podziale komórkowym (37).

1.3.2 Demetylacja na drodze deaminacji

Kolejnym zaproponowanym mechanizmem demetylacji DNA jest proces, w którym usunięcie 5-metylocytozyny i 5-hydroksymetylocytozyny (5-hmCyt) z DNA może zachodzić na drodze ich deaminacji przy udziale deaminazy AID (ang. *activation-induced cytidine deaminase*) lub deaminaz z rodziny APOBEC (ang. *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like*). Deaminacja w czwartej pozycji pierścienia pirymidynowego

skutkowałaby przekształceniem 5-mCyt do tyminy i 5-hmCyt do 5-hydroksymetylouracylu (5-hmUra), które pozostając w parze z guaniną mogłyby być usuwane z DNA przez specyficzne glikozydazy, odpowiednio TDG (ang. *G/T mismatch-specific thymine DNA glycosylase*) i SMUG1 (ang. *single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase*) czy MBD4 (ang. *methyl-CpG-binding domain protein 4*), rozpoznające tego typu mutagenne niesparowania w ramach systemu naprawy uszkodzeń DNA typu BER. Jednakże znacznie większe powinowactwo do cytozyny, a także fakt, iż enzymy te wykazują specyficzność substratów względem jednoniciowego DNA wskazuje, iż demetylacja na drodze deaminacji odgrywa marginalną rolę w regulacji ekspresji genów, choć może zachodzić lokalnie, w specyficznych miejscach genomu (38-40).

Warto także odnotować, iż zmodyfikowane zasady azotowe uwalniane są do krwiobiegu, a następnie, wraz z moczem usuwane z organizmu, a co za tym idzie oznaczenie ich poziomu w tym materiale, jak już wykazano, może mieć istotne znaczenie diagnostyczne w przebiegu chorób z udziałem zaburzeń epigenetycznych (41).

1.3.3 Demetylacja przy udziale białek TET

W 2009 roku niezależnie od siebie pojawiły się dwie prace wskazujące na możliwość enzymatycznego utleniania 5-metylocytozyny do 5-hydroksymetylocytozyny przy udziale białka należącego do rodziny TET (ang. *ten-eleven-translocation*) (42, 43), której nazwa pochodzi od aberracji chromosomowej t(10;11)(q22;q23), skutkującej utworzeniem białka fuzyjnego TET1-MLL, zaobserwowanego w przebiegu ostrej białaczki szpikowej (44). Co więcej analizy bioinformatyczne wykazały, iż u większości organizmów, u których obserwuje się występowanie 5-metylocytozyny w genomie, występują białka TET lub ich analogi (45).

Dotychczas, u człowieka zidentyfikowano trzy białka rodziny TET, mianowicie TET1, TET2 i TET3, z których każde zdolne jest przeprowadzać reakcję enzymatycznego utleniania 5-metylocytozyny do 5-hydroksymetyloctyozyny, a następnie do 5-hmCyt do 5-formylocytozyny (5-fCyt), którą ostatecznie utleniają do 5-karboksycytozyny (5-caCyt) (46).

Co więcej, białka TET wykazują również aktywność enzymatyczną względem tyminy, którą z chemicznego punktu widzenia można traktować jako metylowany przy piątym atomie węgla uracylu. W tym przypadku enzymatyczne utlenienie przez białka TET skutkuje

powstaniem 5-hydroksymetylouracylu (47) – modyfikacji, której obecność w DNA tłumaczono do niedawna wyłącznie oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA lub aktywnością deaminaz. Co ciekawe, w zależności od sposobu powstawania można rozpatrywać tę modyfikację w dwojaki sposób: jako potencjalnie mutagenną, gdy powstaje w wyniku deaminacji 5-hmCyt, tworząc parę 5-hmUra:G, lub jako potencjalny marker epigenetyczny, gdy powstaje w wyniku utlenienia tyminy, tworząc parę 5-hmUra:A (48).

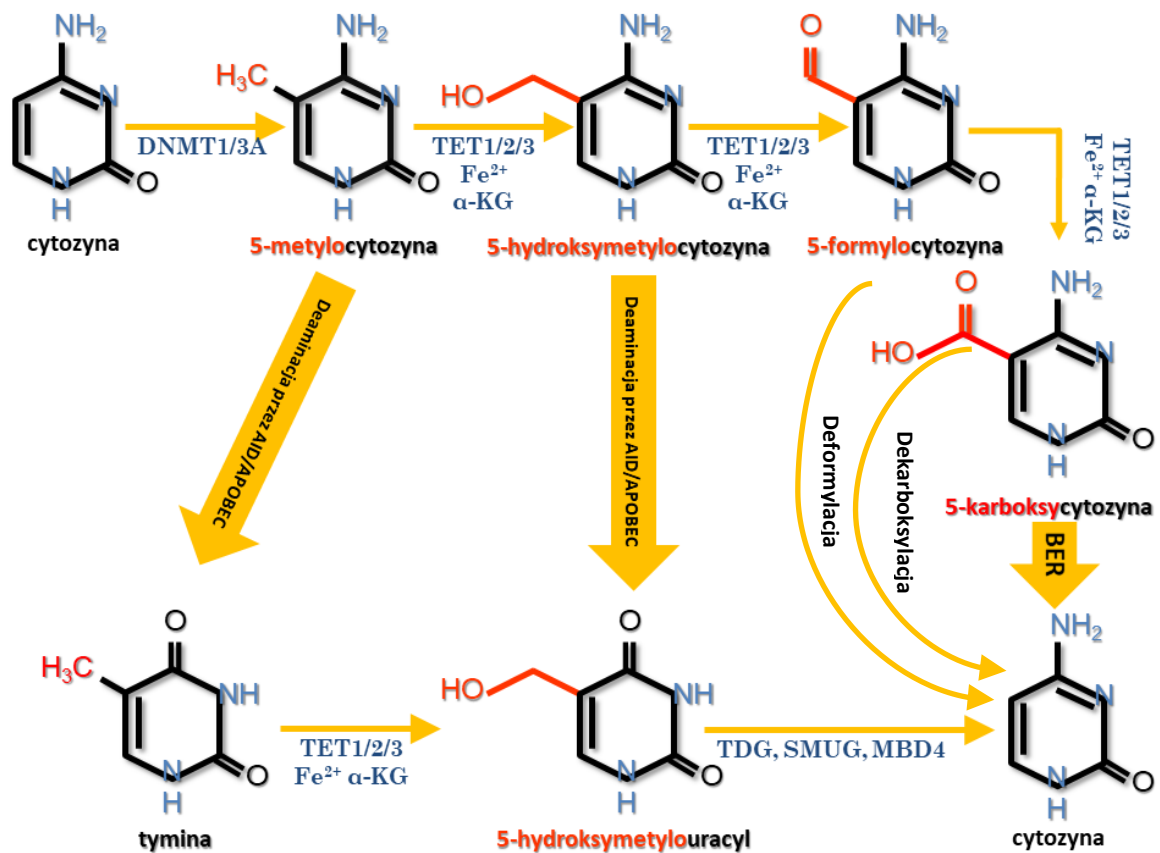
Należy być świadomym, iż enzymatyczne utlenienie 5-mCyt do jej epigenetycznych pochodnych stanowi jedynie pierwszy element procesu aktywnej demetylacji, bowiem 5-formylocytozyna, jak i 5-karboksycytozyna są modyfikacjami rozpoznawanymi przez szereg glikozylaz należących do systemu naprawy DNA typu BER (ang. *base excision repair*), w szczególności TDG (49).

Enzym ten wycina z nici DNA zmodyfikowane zasady, tworząc miejsce apurynowe/apirymidynowe (AP), które jest rozpoznawane przez białko APE1 (ang. *AP-endonuclease 1*), co skutkuje powstaniem jednoniciowego pęknięcia w nici DNA (ang. *single-strand break*, SSB), które posiada wolne grupy: OH przy końcu 3' i fosforanową przy końcu 5'. Takie „kontrolowane” uszkodzenie DNA rekrutuje szereg białek naprawczych, m.in. β -polimerazę DNA (ang. *DNA polymerase β* , POL β) i ligazę DNA 3 (ang. *DNA ligase 3*, LIG3), które wypełniają miejsce apurynowe/apirymidynowe niezmodyfikowaną cytozyną i łączą wcześniej rozciętą nić DNA (50). Warto zauważyć, iż oksydacyjna demetylacja miejsc CpG z wykorzystaniem systemu BER może potencjalnie skutkować powstaniem podwójnych pęknięć DNA (ang. *double-strand break*, DSB), jeśli zajdzie równocześnie na obu niciach DNA. Jednakże białka TET działają w kompleksie z TDG, co skutkuje tym, iż procesy utleniania, wycinania i zastępowania zmodyfikowanych zasad azotowych zachodzą najpierw na jednej z nici DNA, a dopiero po ich zakończeniu, reakcji podlega druga nić (51).

Zaproponowano także mechanizm bezpośredniego wycinania 5-mCyt i 5-hmCyt z nici DNA, jednakże enzymatyczną aktywność glikozylaz specyficznych względem tych modyfikacji, zdolnych do ich bezpośredniego wycinania z nici DNA, obserwuje się jedynie u organizmów niższych i roślin, natomiast nie zaobserwowano bezpośredniego przekształcania 5-mCyt do cytozyny u zwierząt (52). Ponadto kowalencyjne wiązanie C-C pomiędzy piątym węglem cytozyny a grupą metylową jest niezwykle silne, a jego rozerwanie, choć enzymatycznie możliwe, wymaga relatywnie wysokich nakładów energetycznych. Jednocześnie najnowsze doniesienia (53) sugerują, iż 5-fCyt i 5-caCyt mogą

samoistnie ulegać w komórce odpowiednio deformylacji i dekarboksylacji, skutkującej odtworzeniem cytozyny bez udziału systemu naprawy typu BER, co pozwala uniknąć powstania potencjalnie mutagennego miejsca apirymidynowego. Jednakże dokładny mechanizm tego procesu pozostaje jak dotąd nieznan.

Schematyczne przedstawienie procesu aktywnej demetylacji DNA przedstawiono na Rycinie 1.



Rycina 1 Schemat procesu aktywnej demetylacji DNA przy udziale białek TET.

1.3.4 Budowa białek TET

Jak już wspomniano wcześniej w ludzkim organizmie zidentyfikowano trzy białka rodziny TET, które różnią się lokalizacją genomową, budową, a także poziomem ekspresji w poszczególnych tkankach i komórkach, a co za tym idzie najprawdopodobniej ich funkcje, choć w pewnej części pokrywają się ze sobą, to nie są tożsame.

Gen TET1 zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 10 (10q21), obejmuje dwanaście eksonów, a produktem jego ekspresji jest białko zawierające 2136 aminokwasów.

Gen TET2 znajduje się na długim ramieniu chromosomu 4 (4q24), zawiera jedenaście eksonów, których alternatywny splicing skutkuje trzema izoformami o długości: 1164, 1194 i 2002 aminokwasów, przy czym jedynie ta ostatnia izoforma posiada domenę katalityczną.

Gen TET3 zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 2 (2p13), zawiera 17 eksonów, a jego produktem są trzy izoformy, z których dwie mogą pełnić funkcje katalityczne (54).

Wszystkie białka TET posiadają w swoim regionie C-końcowym dwie, rozdzielone krótkim łącznikiem, domeny katalityczne, które odpowiedzialne są za przeprowadzanie enzymatycznego utleniania 5-mCyt – domenę katalityczną bogatą w reszty cysteinowe (ang. *Cys-rich domain*, CD) oraz domenę katalityczną DSBH (ang. *double-stranded β -helix α -KG-Fe(II)-dependent dioxygenase domain*), która jest miejscem wiązania jonów żelaza i α -ketoglutaranu. Natomiast, w białkach TET1 i TET3, po stronie N-końca znajduje się domena palca cynkowego CXXC odpowiedzialna za wiązanie białka do DNA, zdolna rozpoznawać metylowany, hemimetylowany i hydroksymetylowany DNA, w szczególności w obrębie dinukleotydów CpG (55). Dodatkowo, w przypadku białka TET1 region N-końcowy zawiera zarówno trzy sekwencje lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization sequence*, NLS) (43, 56), jak i region obejmujący aminokwasy od 397-931, odpowiedzialny za tworzenie kompleksu z TDG (51).

Interesującym wyjątkiem jest białko TET2, które w toku ewolucji utraciło domenę CXXC, najprawdopodobniej w wyniku inwersji genu, która obecnie znajduje się na tym samym chromosomie, niedaleko genu *TET2*, i ulega ekspresji jako osobne białko

IDAX/CXXC4, warunkując i regulując aktywność białka TET2. Wykazano, iż białko to nie tylko odpowiada za rekrutację TET2 do konkretnych regionów DNA, ale również na drodze sprzężenia zwrotnego, może być zaangażowane w jego kaspazozależną degradację (57).

Białka TET ulegają intensywnym procesom regulacji ekspresji, alternatywnemu splicingowi, jak również ekspresji z wykorzystaniem alternatywnych promotorów i wzmacniaczy, co skutkuje powstawaniem szeregu tkankowo-specyficznych izoform, często o innych funkcjach, niż czysto katalityczne (58).

W przypadku białka TET1 zidentyfikowano dwie izoformy, których ekspresja jak i molekularne cele nakładają się jedynie w minimalnym stopniu. Pierwsza z nich, klasyczna (TET1FL – ang. *full-length*), posiada wszystkie omówione wcześniej domeny, a do jej ekspresji najczęściej dochodzi w komórkach wczesnych embrionów, embrionalnych komórkach macierzystych (ang. *embryonic stem cells*, ESC) i pierwotnych komórkach rozrodczych (ang. *primordial germ cells*, PGC), gdzie najprawdopodobniej odpowiada za globalną hipometylację, a także, rezydując w wyspach CpG, chroni je przed metylacją *de novo* (58).

Krótsza o 671 aminokwasów izoforma (TET1ALT – ang. *alternative*), obecna w większości komórek somatycznych, nie posiada domeny CXXC, a mimo to wciąż może wiązać się z DNA i katalizować reakcję utleniania 5-mCyt, najprawdopodobniej poprzez wykorzystanie szeregu białek rekrutujących (59, 60). Co ciekawe, krótsza izoforma wiąże się z DNA raczej w pojedynczych, ściśle określonych przez białka rekrutujące dinukleotydach CpG, a nie w kontekście wysp CpG, co może być składową mechanizmu tkankowo-specyficznej demetylacji, a zarazem regulacji ekspresji, poszczególnych genów (61).

Najnowsze doniesienia dotyczące genu *TET2* wskazują na obecność trzech alternatywnych względem siebie regionów promotorowych (Pro1, Pro2 i Pro3), których tkankowo-specyficzna aktywacja skutkuje powstaniem trzech alternatywnych form pierwszego eksonu (1a, 1b i 1c) w mRNA. Transkrypt Pro2 jest obserwowany w większości komórek i skutkuje powstaniem w pełni funkcjonalnego białka. Transkrypt Pro1 skutkuje powstaniem krótszej, lecz wciąż katalitycznie aktywnej izoformy białka, obserwowanej w komórkach śledziony. Co ciekawe transkrypt Pro3, którego niewielką ekspresję odnotowano w szeregu tkanek, z najwyższymi poziomami obserwowanymi w komórkach śledziony, szpiku kostnego i płodowej tkanki mózgowej, nie posiada domeny katalitycznej i

najprawdopodobniej pełni rolę regulatora procesu aktywnej demetylacji z udziałem białka TET2 (62).

W przypadku białka TET3 dotychczas poznano trzy izoformy, z których tylko jedna (TET3FL – ang. *full lenght*) posiada domenę CXXC. Może ona wiązać zarówno niemetylowane CpG, jak również wykazuje bardzo wysoką specyficzność względem 5-caCyt, szczególnie w miejscach startu transkrypcji, co sprawia, iż izoforma ta dużo silniej wiąże się regionami, w których 5-mCyt została już utleniona do 5-caCyt, niejako zakotwicząc się w nich. Co za tym idzie, najprawdopodobniej izoforma ta pozostaje ściśle związana z konkretnymi regionami genomu, najczęściej promotorowymi, co zapobiega ich metylacji *de novo* (63). Dodatkowo, takie zależne od sekwencji zakotwiczenie białka w DNA ogranicza jego zdolność do szeroko-genomowej oksydacji 5-mCyt. Co ciekawe, pozbawiona domeny CXXC, a więc i wspomnianego ograniczenia, specyficzna dla oocytów izoforma TET3o (ang. *TET3 oocyte*), której ekspresja wynika z aktywacji specyficznego dla tych komórek promotora, najprawdopodobniej odpowiada za całogenomową demetylację ojcowskiego DNA w męskim przedjądrzu w zygocie. Natomiast krótka izoforma TET3s (ang. *TET3 short*), choć nie posiada domeny CXXC, to może demetylować miejsca promotorowe genów, będąc do nich rekrutowana przez szereg tkankowo specyficznych białek, jak to ma na przykład miejsce w DNA komórek siatkówki, gdzie izoforma ta wchodzi w interakcje z białkiem REST, które kieruje je do genów docelowych (63, 64).

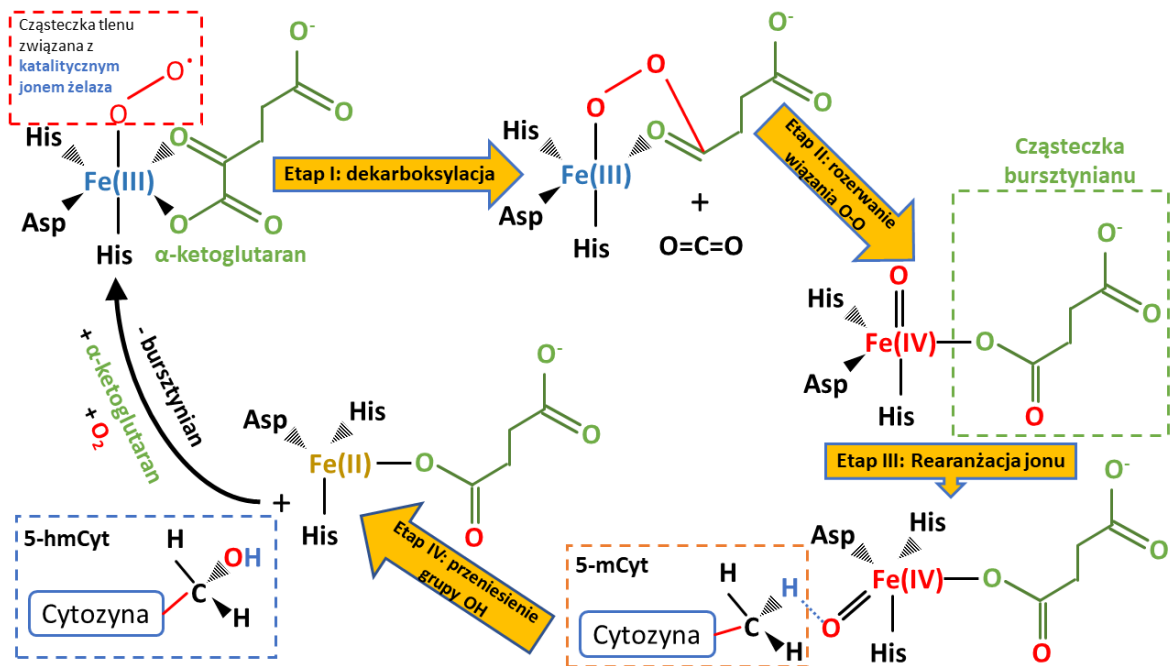
1.3.4.1 Mechanizm katalityczny białek TET

Białka TET katalizują reakcję utleniania 5-metylocytozyny w oparciu o mechanizm wolno rodnikowy, podobnie jak to ma miejsce w przypadku hydroksylaz 4-prolinowych kolagenu. Początkowo jon Fe (II) łączy się z centrum aktywnym enzymu przy udziale motywu His-x-Asp (HxD), a trzy miejsca koordynacyjne wiążą cząsteczki wody. Reakcja rozpoczyna się w momencie związania cząsteczki α -ketoglutaranu z arginina obecna w centrum aktywnym, przy jednoczesnym wyciągnięciu substratu (5-mCyt lub tyminy) z nici DNA i umieszczeniu go w hydrofobowej kieszeni katalitycznej centrum aktywnego. Obecność grupy metylowej w centrum aktywnym enzymu powoduje jego zmianę konformacyjną i zorientowanie substratu w kierunku katalitycznego atomu żelaza i cząsteczki α -ketoglutaranu (65). Do tak utworzonego kompleksu enzym-substrat-

kosubstrat przyłącza się cząsteczka tlenu, dokonując ataku nukleofilowego na nieskoordynowany atom tlenu przy drugim atomie węgla w cząsteczce α -ketoglutaranu. W ten sposób dochodzi do dekarboksylacji α -ketoglutaranu z przejściowym wytworzeniem półaldehydu bursztynowego i uwolnieniem jednej cząsteczki dwutlenku węgla. Jednocześnie cząsteczka tlenu ulega rozdzieleniu, z wytworzeniem przejściowego, wysoce reaktywnego jonu ferrylowego (Fe(IV)=O). Ów jon atakuje atom wodoru, obecny w grupie metylowej, tworzony jest przejściowo jon Fe(III)-OH i rodnik grupy metylowej, co w efekcie prowadzi do powstania grupy hydroksylowej. Następuje jej przeniesienie na atom węgla grupy funkcyjnej związanej z cytozyną, co prowadzi do powstania 5-hydroksymetylocytozyny, z następczym uwolnieniem cząsteczki bursztynianu. Obraz tej reakcji ilustruje Rycina 2.

Aby katalizować kolejne etapy reakcji utleniania niezbędne są: przyłączenie kolejnych cząsteczek: α -ketoglutaranu i tlenu, jak również utrzymanie jonu żelaza w II stopniu utlenienia, za co może być odpowiedzialna witamina C (66, 67). Jeżeli to nastąpi lub jeżeli enzym *de novo* zwiąże 5-hydroksymetylocytozynę, to dochodzi do ataku rodnika ferrylowego na wiązanie C-H w grupie hydroksymetylowej 5-hydroksymetylocytozyny, z wytworzeniem przejściowego, bliźniaczego diolu (5-dihydroksymetylocytozyny), który rozpada się na grupę formylową i cząsteczkę wody, w efekcie tworząc 5-formylocytozynę. Ostatni etap enzymatycznego utleniania polega na ataku rodnika tlenowego na wiązanie C-H grupy formylowej 5-formylocytozyny i utlenieniu jej do grupy karboksylowej, w efekcie czego powstaje 5-karboksycytozyna (67).

Warto zauważyć, iż wciąż nie udało się jednoznacznie ustalić dokładnego przebiegu katalizowanej przez białka TET reakcji. Część doniesień wskazuje, iż zachodzi ona następczo, a jeden etap utleniania płynnie przechodzi w następny, bez dysocjacji białka od nici DNA, do momentu utworzenia końcowego produktu - 5-caCyt (68). Inne badania wskazują na raczej zgoła odmienny charakter reakcji, w której po każdym etapie enzymatycznego utleniania białko odłącza się od nici DNA (69).



Rycina 2 Schemat reakcji katalitycznej zachodzącej w centrum aktywnym białek TET. Opracowano na podstawie: (66).

1.3.4.2 Rola białek TET w wybranych procesach fizjologicznych i patofizjologicznych

Mimo że białka rodziny TET wykazują podobne zdolności katalityczne, to ich funkcje w poszczególnych tkankach różnią się, choć do pewnego stopnia mogą się na siebie nakładać. Najprawdopodobniej różnice te wynikają zarówno ze specyficznej tkankowo ekspresji genów *TET*, jak i szeregu czynników regulujących aktywność poszczególnych białek, po części wynikających z ich budowy, jak i z interakcji z innymi cząsteczkami.

Wysoką ekspresję TET3 zaobserwowano w oocytach i zygotach, gdzie najprawdopodobniej uczestniczy w globalnej demetylacji ojcowskiego genomu, jak i częściowo przyczynia się do demetylacji materiału genetycznego w przedjądrzu matczym, co umożliwia swoisty „reset” wzorca modyfikacji epigenetycznych i uzyskanie totipotencjalności zygotie i wczesnym komórkom embrionalnym (70-73). Co więcej utrata aktywności Tet3, ale nie Tet1 i Tet2, skutkuje znaczącym obniżeniem płodności u samic myszy, a także szeregiem zaburzeń rozwojowych, w tym zmian letalnych, u ich potomstwa (74). Wskazuje to na unikalną rolę tego białka w embriogenezie, której nie da się zastąpić aktywnością innych członków tej rodziny.

Ponadto najnowsze doniesienia sugerują, iż białko TET3 może również pełnić szereg funkcji regulatorowych niezwiązanych z aktywnością enzymatyczną, uczestnicząc w procesach remodelowania chromatyny, jak również stanowić czynnik zwiększający globalną transkrypcję w trakcie różnicowania komórek (75).

Co ciekawe ekspresja TET1 i TET2 w oocytach i zygotach utrzymuje się na bardzo niskim poziomie, a wzrastać zaczyna w trakcie rozwoju przedimplantacyjnego, w którym obserwuje się dramatyczny spadek ekspresji TET3, i jest relatywnie wysoka na etapie blastocysty. Dlatego też uważa się, iż białka TET1 i TET2 uczestniczą w podtrzymaniu stanu pluripotencji i zdolności do odnowy embrionalnych komórek macierzystych, jak również mogą być silnie zaangażowane w ich różnicowanie (76).

Białko TET1 może regulować i podtrzymywać ekspresję koniecznych dla zachowania charakteru embrionalnego genów pluripotencji takich jak NANOG (77), a także wyciszać geny związane z różnicowaniem komórek. Owo wyciszenie wiąże się z zależną od TET1 transkrypcyjną regulacją kompleksu represyjnego *polycomb 2* (ang. *polycomb repressive complex 2*, PRC2), który przyłączając się do specyficznych regionów promotorowych genów, biorących udział w różnicowaniu komórek, rekrutuje do nich metylotransferazy DNMT3a i DNMT3b, a także pośredniczy w nakładaniu markera H3K27me3, co ostatecznie inicjuje metylację *de novo* tych regionów (78, 79). Ponadto związanie białek TET1 z wyspami CpG w regionach promotorowych genów odpowiedzialnych za pluripotencję może chronić je przed metylacją *de novo* (80). Wykazano również, iż nokaut genów *Tet1* i *Tet2* w mysich embrionalnych komórkach macierzystych prowadzi do trudności w podtrzymaniu ich pluripotencjalnego charakteru, zaburza ich funkcjonowanie i przechyla procesy ich różnicowania w stronę komórek ektodermalnych i komórek wczesnej endodermy (81-83). Co więcej dane uzyskane na podstawie analiz komórek embrionalnych z potrójnymi nokautami genów *Tet1/2/3*, wykazały, iż utrata wszystkich trzech enzymów Tet zaburza różnicowanie mysich embrionalnych komórek macierzystych, a aktywność białek Tet jest niezbędna do prawidłowego różnicowania komórek podczas rozwoju embrionalnego (83).

Białka TET są także silnie zaangażowane w procesy różnicowania komórek, co szczególnie silnie uwidacznia się w przypadku hematopoetycznych komórek macierzystych (ang. *hematopoietic stem cells*, HSC). Szereg badań nad udziałem białka TET2 w hematopoezie wskazuje na to, iż jest ono krytycznym regulatorem tego procesu, warunkującym zdolność HSC do samoodnowy i różnicowania. Utrata, czy też niedobór jego

aktywności skutkuje zaburzeniami w wielkości puli hematopoetycznych komórek macierzystych i komórek progenitorowych, opóźnia ich różnicowanie i przesuwa je w kierunku linii monocytów/makrofagów (84). U myszy z nokautami w jednym lub dwóch allelach genu *Tet2* dochodzi do niekontrolowanych rozrostów komórek hematopoetycznych, a także skutkuje pojawianiem się szeregu nowotworów złośliwych o cechach zbliżonych do ludzkich nowotworów hematopoetycznych, takich jak przewlekła białaczka mielomonocytoza, białaczka szpikowa typu MPD, jak schorzeń o cechach zespołu mielodysplastycznego (ang. *myelodysplastic syndrome*, MDS), co wskazuje na rolę *TET2* jako potencjalnego genu supresorowego, niezbędnego dla prawidłowego różnicowania HSC (85). Co więcej, nokaut *TET2* w ludzkich komórkach CD34+ krwi pępowinowej skutkuje przesunięciem procesu różnicowania w kierunku linii granulocytów/monocytów kosztem linii limfoidalnej i erytroidalnej, jak również nasileniem różnicowania w kierunku monocytów kosztem granulocytów (86).

Białko *TET1* również odgrywa istotną rolę w procesach hematopoezy, gdyż jego nokaut u myszy skutkuje zmianą profilu ekspresji genów warunkujących różnicowanie linii limfocytów B, prowadzącą do rozwoju chłoniaka limfocytów B, co może wskazywać na ważną, choć odmienną od *TET2* funkcję w podtrzymaniu prawidłowego różnicowania komórek hematopoetycznych (87).

Choć białko *TET1* zostało odkryte jako onkogenne białko fuzyjne *TET1-MLL* w przebiegu ostrej białaczki szpikowej (43) i jak wskazują doniesienia literaturowe może regulować proces hematopoezy, to w środowisku naukowym dominuje konsensus, iż to jednak mutacje w obrębie *TET2* i związane z utratą jego aktywności zaburzenia w procesie aktywnej demetylacji stanowią jeden z głównych czynników odpowiedzialnych za rozwój nowotworów hematologicznych. Szereg doniesień wskazuje na obecność mutacji w obrębie genu *TET2* w przebiegu zespołów mielodysplastycznych i mieloproliferacyjnych (ang. *myeloproliferative syndrome*, MPS)(88, 89), jak również u pacjentów cierpiących na przewlekłą białczkę mielomonocytozą (ang. *chronic myelomonocytic leukemia*, CMML) i ostrą białczkę szpikową (ang. *acute myeloid leukemia*, AML) (54, 90, 91). Warto zauważyć, iż w powyższych jednostkach chorobowych obecność mutacji genu *TET2* jest silnie powiązana z gorszym rokowaniem i zmniejszoną przeżywalnością. Co więcej w przypadku zespołów mielodysplastycznych i mieloproliferacyjnych obecność tej mutacji znacząco

podwyższa prawdopodobieństwo progresji choroby do ostrej białaczki szpikowej, jest wręcz uważana za jeden z czynników prognostycznych takiego przejścia (54).

Białko TET2 pełni również kluczową rolę w prawidłowym różnicowaniu komórek hematopoetycznych. Wyniki badań przeprowadzonych na myszach z nokautem genu *Tet2*, u których obserwowano postępujący rozwój nowotworów szpiku, wskazują nie tylko na obniżenie globalnego poziomu 5-hmCyt i nieprawidłową demetylację genomu, ale przede wszystkim jasno dowodzą, iż *TET2* pełni rolę genu supresorowego, którego utrata jest wystarczająca, by uruchomić proces nowotworzenia, a co za tym idzie jest jednym z kluczowych wydarzeń w rozwoju nowotworów hematologicznych (92). Obecność mutacji w genie *TET2* obserwuje się również w licznych rodzajach chłoniaków, m. in: w 12 % przypadków rozlanego chłoniaka z dużych komórek B (ang. *diffuse large B-cell lymphoma* - DLBCL) (93), w 47 % przypadków chłoniaków angioimmunoblastycznych z komórek T (ang. *angioimmunoblastic T-cell lymphoma*, AiTL) oraz w 38 % przypadków chłoniaków z obwodowych komórek T (ang. *peripheral T-cell lymphoma*, PTCL). Co więcej w przypadku tych ostatnich, mutacje w obrębie genu TET2 znacząco zmniejszają czas przeżycia wolny od progresji choroby (94).

Zaburzenia wzorca metylacji jak i nieprawidłowości w procesie aktywnej demetylacji DNA leżą także u podstaw wielu litych nowotworów złośliwych i często korelują z gorszymi prognozami i zmniejszona przeżywalnością. Utratę aktywności białek TET czy to wynikającej z mutacji w obrębie kodujących je genów, czy też z ich nieprawidłowej ekspresji lub regulacji, a co za tym idzie spadek globalnego poziomu 5-hmCyt, obserwuje się w wielu nowotworach złośliwych takich jak: rak jelita grubego, rak piersi, rak prostaty, rak wątroby, rak trzustki czy też rak płuca (95-98). Zaburzenia w ekspresji TET1, TET2 i TET3 i powiązany z nim spadek 5-hmCyt obserwowano również u pacjentów z rakiem żołądka (99), a także w przebiegu czerniaka złośliwego (100).

Warto także wspomnieć, iż w komórkach glejaka obserwuje się znacząco niższe poziomy 5-hmCyt i 5-caCyt, w porównaniu do prawidłowych komórek mózgu. Jednocześnie poziomy te dynamicznie zmieniają się wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania choroby, któremu towarzyszy obniżenie globalnych poziomów 5-hmCyt wraz ze wzrostem złośliwości nowotworu, co silnie koreluje ze skróceniem czasu przeżycia (97, 101, 102).

1.4. Modulatory aktywności białek TET

Poniżej postanowiono pokrótce opisać potencjalny wpływ użytych w niniejszej pracy modulatorów aktywności białek TET.

1.4.1 α -ketoglutaran i jego onkometabolity

Jak wszystkie enzymy z grupy α -ketoglutarano-zależnych dioksygenaz, białka TET muszą związać w swoim centrum aktywnym cząsteczkę α -ketoglutaranu, by móc pełnić swoją funkcję, tak więc jego niedobór, czy to w wyniku zbyt niskiej produkcji, czy też niedostępności dla enzymu może znacząco wpływać na aktywność enzymatyczną białek TET. α -ketoglutaran produkowany jest w cyklu Krebsa z izocytrynianu przy udziale dehydrogenaz izocytrynianowych 1 i 2 (ang. *isocitrate dehydrogenase 1 and 2*, IDH1/2). Co ciekawe, mutacje w obrębie domeny katalitycznej tych enzymów (R132 w IDH1 i R140 oraz R172 w IDH2) mogą skutkować powstaniem innego produktu – onkogenego 2-hydroksyglutaranu (2-HG), który może wiązać się z centrum aktywnym wszystkich dioksygenaz, w tym białek TET, skutecznie hamując ich aktywność, poprzez uniemożliwienie przeniesienia atomu tlenu i jednoczesnego utworzenia katalitycznego jonu Fe(VI) (56, 103). Co więcej mutacje w obrębie genów IDH1/2 mogą niejako naśladować efekt mutacji w obrębie genów TET, gdyż niezależnie, czy utrata aktywności białka TET wynika z jego mutacji, czy przyłączenia onkometabolitu, jej efekt w postaci spadku zawartości 5-hmCyt w DNA, czy też niemożności utlenienia 5-mCyt w kluczowych regionach, jest jednakowy. Może się zatem zdarzyć sytuacja, w której nie występuje mutacja w genach *TET*, białka TET ulegają poprawnej ekspresji, ich rekrutacja do specyficznych regionów DNA przebiega w sposób prawidłowy, a mimo to z uwagi na mutacje w genach IDH1/2 proces aktywnej demetylacji jest silnie zaburzony. Nie dziwi więc, iż somatyczne mutacje IDH1 i IDH2 (R132 w IDH1 i R140 oraz R172 w IDH2), są często obserwowane w glejakach czy w zaburzeniach hematologicznych, takich jak ostra białaczka limfoblastyczna (ang. *acute lymphoblast leukemia*, ALL), AML, MPN MDS, czy AITL (ang. *angioimmunoblastic T-cell lymphoma*), w których rozwoju jednym z decydujących czynników jest utrata aktywności białek TET i często wiążą się z gorszymi prognozami i zmniejszoną przeżywalnością pacjentów (104-110).

Warto także nadmienić, iż inne związki uczestniczące w cyklu Krebsa, z racji dużego podobieństwa do α -ketoglutaranu, mogą hamować aktywność enzymatyczną białek TET. Wykazano, iż bursztynian i fumaran są zdolne hamować aktywność TET1 i TET2, kiedy dochodzi do ich nadmiernej akumulacji w komórce (IC_{50} 400-500 $\mu\text{mol/l}$) na przykład w wyniku mutacji w genach odpowiednio dehydrogenazy bursztynianowej i fumarazy (111). W szczególności utrata aktywności dehydrogenazy bursztynianowej, wywołując zaburzenia w aktywności białek TET, może znacząco wpływać na procesy dojrzewania i różnicowania komórek, co wykazano w przypadku linii komórek erytroleukemii HEL, która po wprowadzeniu mutacji skutkujących nadmiernym gromadzeniem bursztynianu, traciła zdolność do różnicowania się w kierunku fenotypu erytroidalnego, najprawdopodobniej w wyniku zaburzeń aktywności białek TET (112).

1.4.2 Jony żelaza i jego chelatory

Związanie jonu żelaza w centrum aktywnym białek TET jest kluczowe dla ich funkcjonowania. Oznacza to, iż potencjalne zmiany w wewnątrzkomórkowej labilnej puli jonów żelaza (ang. *intracellular labile Fe(II) pool*, LIP) mogą wpływać na aktywność enzymatyczną białek TET. Warto nadmienić, iż wewnątrzkomórkowa pula labilnych jonów żelaza jest wypadkową procesów dostarczania jonów Fe(III) wraz z transferryną, poprzez receptor transferryny, do endosomów, gdzie przy udziale białka Steap3 są przekształcane do jonów Fe(II) i opuszczają je przy udziale białka DMT1 (ang. *divalent metal transporter 1*), jak i redukcji już obecnych w komórce jonów na wyższych stopniach utlenienia. Szeroko zakrojone badania nad wpływem cAMP na pulę labilnego żelaza w komórkach Schwanna wykazały, iż jego poziom silnie koreluje z zawartością 5-hmCyt w genomie, a zmniejszenie jej, czy to przez zastosowanie chelatorów jonów żelaza, takich jak deferoksyamina i 2,2,-bipirydyd, czy zahamowanie uwalniania Fe(III) z endosomów przy pomocy inhibitora (bafilomycyny A1), skutkowało znacznym spadkiem zawartości 5-hydroksymetylocytozyny w genomie badanych komórek. Samo cAMP również zwiększa dostępność Fe(II) dla Białek TET najprawdopodobniej poprzez zwiększenie labilnego Fe(II) w cytozolu i jądrze (113).

Co ciekawe, witamina C, w stężeniach fizjologicznych nie zmienia w sposób znaczący wewnątrzkomórkowej puli labilnego Fe(II), co wskazuje, iż jej działanie, które miałyby zwiększać biodostępność jonów Fe(II) dla białek TET i innych dioksygenaz, ma charakter

lokalny, obejmujący bezpośrednie otoczenie tych enzymów lub ich centra aktywne (113, 114).

Warto także nadmienić, iż w mysim modelu choroby alkoholowej, w którym obserwuje się znaczący spadek 5-hydroksymetylocytozyny w DNA komórek wątroby, suplementacja zwierząt 0,06 % roztworem żelaza karbonylowego skutkowało zablokowaniem spadków wywoływanych działaniem alkoholu (115).

Co więcej chelatacja jonów żelaza za pomocą deferoksyminy może wywoływać stan podobny do hipoksji, najprawdopodobniej poprzez hamowanie działania dioksygenaz prolinowych czynnika indukowanego hipoksją (116, 117).

1.4.3 Jony innych metali ciężkich

Jednym z kluczowych elementów reakcji enzymatycznej przeprowadzanej przez białka TET jest katalityczny jon Fe(II), który łączy się z centrum aktywnym białek TET przy udziale motywu His-x-Asp. Jednakże o miejsce to mogą konkurować inne jony metali. Wykazano, iż jony niklu(II) wiązały się z centrum aktywnym białek TET z 7,5 krotnie wyższym powinowactwem niż jony Fe(II), a tym samym wypierały je z miejsca katalitycznego, unieczynnając enzym, co przekładało się na zależny od dawki i czasu ekspozycji spadek 5-hmCyt w DNA komórek nerki (HEK293T), fibroblastów płuc (MRC-5), jak i mysich ESC. Co więcej obecność jonów niklu(II) znacząco obniżała stymulujący efekt witaminy C na aktywność enzymatyczną białek TET w mysich ESC (118, 119).

Na aktywność enzymatyczną szeregu różnych dioksygenaz wpływają również jony kobaltu(II), które, podobnie jak jony niklu(II), mogą wypierać katalityczny jon żelaza(II) z centrum aktywnego enzymu, tym samym obniżając lub całkowicie hamując aktywność enzymatyczną tych enzymów. Hodowla bakterii *Pseudomonas aeruginosa* w podłożu zawierającym siedmiowodny CoSO_4 skutkowała częściowym wyparciem jonów żelaza(II) z centrum aktywnego 3,4-dioksygenazy kwasu protokatechowego i zmniejszała aktywności tego enzymu, choć nie zmieniała jego właściwości katalitycznych (120). Jony kobaltu(II) wypierają również żelazo z centrum aktywnego należących do zależnych od żelaza i α -ketoglutaranu hydroksylaz 4-prolinowych, w tym czynnika hamującego HIF (ang. *factor inhibiting HIF*, FIH) czy dioksygenazy prolinowej czynnika indukowanego hipoksją (ang.

hypoxia-inducible factor-proline dioxygenase), znacząco obniżając ich aktywność, co jest wykorzystywane do indukowania stanu pseudohipoksji w komórkach (116, 117).

Co więcej ekspozycja komórek fibroblastów na chlorek kobaltu(II) skutkuje znaczącym obniżeniem globalnego poziomu 5-hmCyt w DNA tych komórek i obniżoną ekspresją TET3, a dodatek witaminy C częściowo odwraca ten efekt (121).

Ponadto ekspozycja komórek linii niedrobnokomórkowego raka płuca na jony kobaltu(II) skutkowałą zmianami w modyfikacjach białek histonowych. Obserwowano wzrost poziomu markerów represyjnych, takich jak H3K9me3, H3K27me3, H3K36me3 i uH2A, wzrost poziomu markerów związanych z aktywacją genów, takich jak H3K4me3 i uH2B oraz zmniejszony poziom AcH4. Wzrost H3K4me3 i H3K27me3 po ekspozycji na jony kobaltu(II) może wynikać z aktywacji metylotransferaz histonowych, najprawdopodobniej na drodze zależnej od HIF (ang. *hypoxia inducible factor*). Wzrost poziomu modyfikacji H3K9me3 i H3K36me3 najprawdopodobniej wynika z zahamowania przez jony kobaltu(II) aktywności demetylazy histonowej JMJD2A, która należy do zależnych od Fe(II) i α -ketoglutaranu hydroksylaz z rodziny białek zawierających domenę Jumonji, najprawdopodobniej w mechanizmie polegającym na wypieraniu katalitycznego jonu żelaza z centrum aktywnego tego enzymu (122).

Wykazano także negatywny wpływ jonów niklu(II), kobaltu(II) i arsenu(III) na aktywność enzymatyczną białek TET – jony te wypierają jony cynku z domeny palca cynkowego białek TET (domena CXXC), co w znaczący sposób wpływa na integralność strukturalną tych enzymów, jak również negatywnie wpływa na ich zdolność do interakcji z DNA (123).

1.4.4 Witamina C i inne antyoksydanty

Witamina C jest silnym antyoksydantem, zdolnym do redukcji szeregu wolnych rodników, a także jest znanym kofaktorem enzymów z grupy dioksygenaz zależnych od jonów żelaza i α -ketoglutaranu (124). Szereg badań nad rolą witaminy C w procesach epigenetycznych jasno wskazuje na jej stymulujący wpływ na aktywność enzymatyczną białek TET. Dodatek tej substancji do medium hodowlanego, w przypadku embrionalnych komórek macierzystych, skutkuje wzrostem poziomów 5-hmCyt, szczególnie w regionach

promotorowych genów, a także nasila ekspresję genów charakterystycznych dla linii komórek zarodkowych (125).

Co ciekawe, ekspozycja na witaminę C, choć zwiększa poziom 5-hmCyt to nie powoduje zmian w poziomach mRNA dla genów *TET*, a zatem obserwowane po jej podaniu zmiany poziomów modyfikacji zasad azotowych są raczej wynikiem bezpośredniego wpływu tej substancji na aktywność tych enzymów, a nie rezultatem nadekspresji białek TET (126). Początkowo podejrzewano, że obserwowany stymulujący wpływ witaminy C na aktywność enzymatyczną białek TET może wynikać ze stymulującego działania tego związku na wychwyt jonów żelaza z medium hodowlanego przez komórki, a zatem być prostym efektem akumulacji w ich wnętrzu substratu niezbędnego dla katalizowanej reakcji (127-130). Jednakże badania przeprowadzone na oczyszczonych domenach katalitycznych białek TET wykazały, iż witamina C może wchodzić z nimi w bezpośrednie interakcje, najprawdopodobniej modulując ich fałdowanie w sposób sprzyjający, czy też zwiększający katalityczną aktywność tych enzymów, a tym samym przyspieszać reakcje enzymatycznego utleniania 5-mCyt. Zaproponowano również alternatywny mechanizm działania witaminy C, oparty na jej właściwościach antyoksydacyjnych, w którym bezpośrednia interakcja tego związku z białkami TET odnawia ich właściwości katalityczne poprzez redukcję powstałych podczas katalizowanej reakcji jonów Fe(III) w centrum aktywnym enzymu do jonów Fe(II), mogących ponownie wiązać się z α -ketoglutaranem i cząsteczkowym tlenem (131). Ponadto pozytywny wpływ witaminy C na aktywność białek TET tłumaczy się również tym, że związek ten, redukując szerokie spektrum utleniaczy obecnych w komórce do mniej reaktywnych form, niejako zapobiega ich interakcjom z katalitycznym jonem żelaza w centrum aktywnym enzymu, które w innym wypadku mogłyby prowadzić do unieczynnienia enzymu (132).

Co ciekawe, nie obserwowano zmian w poziomach modyfikacji zasad azotowych w DNA po ekspozycji komórek na inne substancje o potencjale antyoksydacyjnym, takie jak spermidyna, witamina B1, witamina E, glutation, NADPH czy L-cysteina, co sugeruje, iż to właśnie witamina C jest kofaktorem niezbędnym do aktywności białek TET (125, 131).

Najnowsze doniesienia potwierdzają, iż witamina C wiąże się z miejscem aktywnym białek TET, w sposób zależny od dawki i zwiększa ich aktywność enzymatyczną poprzez redukcję jonów Fe(III) do katalitycznie aktywnych Fe(II). Co więcej w przypadku mutacji skutkujących częściową lub całkowitą utratą aktywności TET2, zarówno w modelu mysim,

jak u pacjentów z przewlekłymi białaczkami szpikowymi i zespołami mielodysplastycznymi długo terminowa ekspozycja na fizjologiczne stężenia witaminy C skutkuje zwiększeniem zawartości 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt w genomowym DNA i opóźnieniem rozwoju choroby. Oznacza to, iż w przypadku mutantów TET2^{+/-}, witamina C zwiększa aktywność enzymatyczną pozostałego w komórce białka TET2, jak również podnosi globalny poziom produktów białek TET, najprawdopodobniej poprzez zwiększenie aktywności enzymatycznej pozostałych członków tej rodziny, co tłumaczy również wzrost globalnych poziomów tych produktów w przypadku mutantów TET2^{-/-}. Wyniki te wskazują, iż suplementacja witaminą C może skutecznie opóźnić rozwój nowotworów hematologicznych wynikających z utraty aktywności enzymatycznej TET2 i potencjalnie stanowić dodatek do już istniejących strategii terapeutycznych (133).

1.4.5 Hipoksja

Białka TET utleniają enzymatycznie 5-mCyt wiążąc i wykorzystując do tego celu cząsteczkę tlenu, a co za tym idzie na ich aktywność enzymatyczną może wpływać dostępność tlenu i/lub mechanizmy oparte na reakcjach utleniania-redukcji (redoks). Wykazano, iż białka TET charakteryzują się niewielką stałą Michaelisa dla tlenu (K_M c.a. 30 $\mu\text{mol/l}$) co sugeruje, iż mogą zachowywać swoją aktywność przy relatywnie niewielkich stężeniach tlenu. Tym niemniej wyniki badań *in vitro* przeprowadzonych na oczyszczonych białkach TET, umieszczonych w atmosferze zawierającej 0,5% tlenu wskazują na około 45 % spadek aktywności białka TET1 52% spadek aktywności białka TET2, a eksperymenty z wykorzystaniem mysich ESC wykazały obniżony poziom 5-hmCyt w DNA komórek hodowanych w atmosferze zawierającej 1 % O₂, najprawdopodobniej związany z zmniejszeniem aktywności Tet1.

Warto zauważyć, iż enzymy z grupy HIF-PHD (ang. *hipoxia inducible prolyl hydroxylase domain (PHD) proteins*), wymagają wyższych stężeń tlenu niż białka TET (K_M w przybliżeniu równe 230 $\mu\text{mol/l}$), a co za tym idzie przestają być aktywne wraz ze spadkiem zawartości tlenu w komórce, podczas gdy białka TET wciąż mogą pełnić swoją funkcję (134). W takich warunkach czynnik transkrypcyjny HIF1 α (ang. *hipoxia inducible factor 1 alpha*, czynnik 1 alfa indukowany hipoksją) nie ulega hydroksylacji, a więc pozostaje aktywny i może uruchamiać ekspresję szeregu genów zaangażowanych w odpowiedź komórkową na

obniżony poziom tlenu. Wykazano, iż stan hipoksji zwiększał ekspresję wszystkich białek TET w komórkach HepG2 i silnie podnosił poziom 5-hmCyt w komórce (135).

Wykazano także istotny wpływ hipoksji (hodowli w atmosferze zawierającej 1% O₂) na ekspresję TET3 w komórkach K562 i CD34+ hematopoetycznych komórkach macierzystych i progenitorowych (ang. *hematopoietic stem and progenitor cells*, HSPC), w których HIF1α łącząc się z specyficznymi regionami enhancerowymi w intronie 2 genu TET3, warunkował jego zależną od hipoksji ekspresję (136). Co więcej narażenie szeregu nowotworowych linii komórkowych na 1% O₂ skutkowało globalnym wzrostem poziomu 5-hmCyt w ich DNA, w szczególności w regionach DNA przylegających do miejsc wiązania HIF1α lub bezpośrednio w tych miejscach, w miejscach hiperczułych na działanie DNAzy (ang. *DNase-hypersensitive sites*, DHS) oraz w brzegowych CpG. Co więcej, owo zwiększenie 5-hmCyt dotyczyło wyżej wymienionych miejsc regulujących ekspresję kanonicznych genów zaangażowanych w odpowiedź komórki na niedotlenienie. Ponadto obserwowano wzrost ekspresji TET1 po ekspozycji na atmosferę zawierającą 1 % O₂, a eksperymenty obejmujące nokaut tego genu za pomocą shRNA wykazały, iż jego ekspresja jest konieczna do uruchomienia indukowanej hipoksją ekspresji genów (137).

1.4.6 Tetrahydrourydyna

Tetrahydrourydyna (THU) należy do jednych z najlepiej poznanych inhibitorów komórkowych deaminaz (138). Jako analog stanu pośredniego w reakcjach deaminacji, bardzo silnie łączy się z centrum aktywnym deaminaz, takich jak AID czy APOBEC, terminując reakcję i dezaktywując enzym (139). Znalazła zastosowanie w szeregu badań klinicznych nad przeciwnowotworowym zastosowaniem różnych analogów cytozyny, w tym 5-azacytydyny, w leczeniu nowotworów złośliwych człowieka, gdzie jej dodatek ma zapobiegać deaminacji tych związków do form terapeutycznie nieaktywnych (140-142).

Teoretycznie, po dodaniu do hodowli komórkowej tetrahydrourydyny, powinno nastąpić zahamowanie aktywności komórkowych deaminaz, w tym tych, które mogą być potencjalnie zaangażowane w powstawanie uracylu z cytozyny i 5-hydroksymetylouracylu, a zawartość tego ostatniego powinna wynikać jedynie z reakcji utleniania, zarówno enzymatycznego, jak i niespecyficznego, obejmującego aktywność reaktywnych form tlenu. Dlatego też w niniejszej pracy analizowano poziom uracylu w DNA jako markera procesów deaminacji, jak i 8-oxoguaniny – znanego markera uszkodzeń oksydacyjnych DNA. Takie podejście powinno pomóc ustalić pochodzenie 5-hmUra w komórkach jednocześnie eksponowanych na THU i witaminę C.

1.4.7 5-azacytydyna

5-azacytydyna jest dobrze zbadanym czynnikiem demetylującym, który od lat jest używany jako epigenetyczny chemioterapeutyk w leczeniu zaburzeń hematologicznych, m. in. szerokiego spektrum białaczek czy MDS (143, 144). Mechanizm działania tego związku polega na tym, iż 5-azacytydyna, podczas podziałów komórkowych jest wbudowywana w nić DNA zamiast cytozyny i może być rozpoznawana przez DNMT1. Jeśli ma to miejsce w metylowanym dinukleotydzie CpG, to powstała po replikacji cząsteczka DNA na jednej nici posiada metylowaną cytozynę, a na nici komplementarnej 5-azaCyt, co jest rozpoznawane przez DNMT1 jako miejsce hemimetylowane, które należy zmetylować, by zachować wzór metylacji w kolejnej generacji komórek. Jednakże 5-azacytydyna w odróżnieniu od cytozyny, w piątej pozycji pierścienia pirymidynowego posiada atom azotu, co skutecznie blokuje reakcję enzymatyczną, a związane z nią białko jest degradowane. W efekcie

metylacja zachowawcza nie zachodzi, spada zatem globalny poziom 5-mCyt, a miejsce takie pozostaje hemimetylowane i może stanowić atrakcyjny substrat dla białek TET (32).

Co ciekawe ekspozycja na 5-azacytydynę powodowała wzrost ekspresji TET2 i TET3, lecz nie TET1 w komórkach raka wątrobowokomórkowego, której towarzyszył wzrost globalnego poziomu 5-hmCyt w DNA tych komórek. Natomiast w komórkach, w których wyciszono ekspresję TET2 i/lub TET 3 przy pomocy cząsteczek siRNA, ekspozycja na 5-azacytydynę nie powodowała wzrostu zawartości 5-hmCyt w DNA w przypadku komórek pozbawionych aktywności TET2. Sugeruje to, iż związek ten uczestniczy w demetylacji DNA zarówno na drodze pasywnej, jak i stymuluje proces aktywnej demetylacji najprawdopodobniej wpływając na ekspresję TET2 (145).

2. Cele pracy

Niniejszej pracy przyświecało kilka celów badawczych, mianowicie:

1. Ustalenie podstawowych poziomów modyfikowanych zasad azotowych będących produktami białek TET i określenie wpływu wybranych aktywatorów, inhibitorów i modulatorów aktywności enzymatycznej białek rodziny TET na poziom tych produktów w genomowym DNA, w wybranych liniach komórkowych nowotworów złośliwych człowieka.
2. Określenie zależności globalnej zawartości produktów aktywności białek TET w genomowym DNA od dawki, formulacji i czasu ekspozycji komórek wybranych linii komórkowych na witaminę C.
3. Oszacowanie udziału aktywności enzymatycznej poszczególnych członków rodziny białek TET w generowaniu 5-hydroksymetylocytozyny, 5-formylocytozyny, 5-karboksycytozyny i 5-hydroksymetylouracylu w DNA oraz określenie ich wrażliwości na zastosowane modulatory aktywności enzymatycznej białek TET, przy wykorzystaniu modeli komórkowych, w których jedno lub dwa białka TET pozostają aktywne.

3. Materiały i metody

Aby zrealizować założone cele badawcze postanowiono posłużyć się modelem hodowli komórkowej ustalonych linii komórkowych nowotworów złośliwych człowieka, w obecności wybranych, potencjalnych aktywatorów, inhibitorów i modulatorów aktywności białek rodziny TET. Następnie, wcześniej opracowaną i zoptymalizowaną metodą, przeprowadzono procedurę izolacji DNA z komórek, celem otrzymania czystego, wysoce spolimeryzowanego DNA. Pozyskany materiał genetyczny poddano enzymatycznej hydrolizie, a otrzymany hydrolizat, zawierający pojedyncze deoksynukleozydy, analizowano ilościowo pod kątem obecności epigenetycznych modyfikacji DNA, w tym pochodnych 5-metylocytozyny, powstałych w wyniku aktywności białek TET, przy pomocy dwuwymiarowej, ultrasprawniej chromatografii cieczowej z tandemową detekcją mas (2D-UPLC-MS/MS), z wykorzystaniem znakowanych stabilnymi izotopami standardów wewnętrznych. Dodatkowo, w części eksperymentów analizowano stężenie kwasu L-askorbinowego, zarówno w medium hodowlanym, jak i w pozyskanych komórkach, przy użyciu ultrasprawniej chromatografii cieczowej z detekcją UV-VIS. Następnie przeprowadzono analizy statystyczne uzyskanych wyników. Poniżej pokrótce omówiono szczegóły użytych metod.

3.1. Hodowle komórkowe

Wszystkie eksperymenty obejmujące wykorzystanie hodowli komórkowych zostały wykonane w warunkach sterylnych, z zachowaniem zasad aseptyki, w zgodzie z Dobrymi Praktykami Laboratoryjnymi (GLP), w laboratorium spełniającym wymogi II klasy bezpieczeństwa biologicznego (BSL-2). Opisanie niżej procedury, za wyjątkiem drobnych detali, opisanych w tekście, były wspólne dla wszystkich badanych linii komórkowych.

3.1.1 Użyte linie komórkowe

W niniejszej pracy wykorzystano szereg ustalonych linii komórkowych nowotworów złośliwych człowieka. Poniżej, w porządku alfabetycznym przedstawiono ich krótką charakterystykę.

Linia A549 – adherentna, epitelialna, rosnąca w monowarstwie, hypotriploidalna linia komórek niedrobnokomórkowego raka płuca, założona w 1972 roku z tkanki nowotworowej od 58-letniego, białego mężczyzny, stanowiąca komórkowy model tego nowotworu. Posiada mutacje aktywująca w genie KRAS (146). Komórki uzyskano dzięki uprzejmości Zakładu Genoterapii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołajka Kopernika w Toruniu. Hodowlę komórkową linii A549 prowadzono w oparciu o wytyczne ATCC (ang. American Type Culture Collection) (147).

Linia CA46 – rosnąca w zawieszynie, prawie diploidalna, linia komórek chłoniaka Burkitta, nie zawierająca w swoim genomie sekwencji wirusa EBV (148). Komórki uzyskano dzięki uprzejmości pracowników Katedry Inżynierii i Biologii Systemów, Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki, Politechniki Śląskiej. Hodowlę komórkową linii CA46 prowadzono w oparciu o wytyczne ATCC (149)

Linia HAP1 – adherentna, haploidalna linia komórek wywodząca się z linii komórek przewlekłej białaczki szpikowej KBM-7, założonej z komórek 40 letniego mężczyzny, która na drodze modyfikacji genetycznych utraciła drugą kopię chromosomu 8 macierzystej linii komórkowej, a także zachowała fragment chromosomu 15 długości 30 Mbp, połączony z chromosomem 19. Posiada chromosom Philadelphia. Co ciekawe, pomimo iż komórki te pochodzą od mężczyzny, to nie posiadają chromosomu Y (150).

Na potrzeby przeprowadzonych badań zakupiono od firmy Horizon Discovery macierzystą linię HAP1 (Horizon Discovery, nr kat. c631), jak również komercyjnie dostępne warianty tej linii, w których za pomocą techniki CRISPR/Cas9 wprowadzono funkcjonalne nokauty w genach:

TET1 (delecja 20 pb w eksonie 2, Horizon Discovery, nr kat.: HZGHC001121c002);

TET2 (delecja 8 pb w eksonie 3, Horizon Discovery, nr kat.: HZGHC003562c011);

TET3 (delecja 14 pb w eksonie 4, Horizon Discovery, nr kat. HZGHC001112c004);

Linie te stanowią model nowotworu hematologicznego z mutacją dezaktywującą w obrębie jednego z białek rodziny białek TET.

Zlecono także firmie Horizon Discovery stworzenie techniką CRISPR/Cas9 trzech unikalnych wariantów linii, posiadających funkcjonalne nokauty par:

TET1/TET2 (delecja 20 pz w eksonie 2 genu *TET1*/delecja 26 pz w eksonie 3 genu *TET2*; Horizon Discovery, nr kat.: HZGHC007806c011);

TET1/TET3 (insercja 1 pz w eksonie 2 genu *TET1*/ delecja 1 pz w eksonie 4 genu *TET3*; Horizon Discovery, nr kat. HZGHC007804c010);

TET2/TET3 (delecja 14 pz w eksonie 3 genu *TET2*/delecja 14 pz w eksonie 4 genu *TET3*; Horizon discovery, nr kat. HZGHC007813c001);

Komórki tych linii stanowią model, w którym tylko jedno z białek rodziny TET pozostaje aktywny, co umożliwia badanie aktywności enzymatycznej poszczególnych białek TET i potencjalnego wpływu badanych modulatorów na konkretny enzym.

Hodowle komórkowe wszystkich wariantów linii HAP1 prowadzono w oparciu o wytyczne firmy Horizon Discovery (151).

Linia HCT116 – adherentna, epitelialna, prawie diploidalna linia komórkowa raka jelita grubego, stanowi model tej jednostki chorobowej (152). Posiada mutację aktywującą w onkogenie KRAS i jest zdolna do tworzenia przerzutów w modelach zwierzęcych (153). Komórki HCT116 zakupiono z Europejskiej Kolekcji Uwierzytlnionych Kultur Komórkowych (The European Collection of Authenticated Cell Cultures, ECACC, nr kat.: 91091005). Hodowlę komórkową linii HCT116 prowadzono w oparciu o wytyczne dostawcy (154).

Linia K562 - rosnąca w zawieszynie linia komórek przewlekłej białaczki szpikowej, o wysoce niezróżnicowanej morfologii. Komórki K562 są multipotencjalne, zdolne do spontanicznego różnicowania się w kierunku progenitorów erytrocytów, granulocytów i monocytów, posiadają chromosom Philadelphia oraz nie zawierają w swoim genomie sekwencji wirusa EBV (155).

Komórki K562 zakupiono z Europejskiej Kolekcji Uwierzytlnionych Kultur Komórkowych (The European Collection of Authenticated Cell Cultures, ECACC, nr kat.: 89121407). Hodowlę komórkową linii K562 prowadzono w oparciu o wytyczne dostawcy (156).

Linia MDA-MB-231 – adherentna, epitelialna, prawie triploidalna linia komórkowa, wyprowadzona w 1973 roku z komórek obecnych w wysięku opłucnowym 51-letniej, białej kobiety z gruczolakorakiem piersi. Komórki tej linii są wysoce niezróżnicowane, charakteryzują się ekspresją czynników wzrostowych: EGF (ang. *epidermal growth factor*, epidermalny czynnik wzrostu) i TGF- α (ang. *transforming growth factor alpha*, transformujący czynnik wzrostu alfa), a także nie ekspresyjną receptorów dla estrogeny, progesteronu oraz receptora HER2 - są modelem potrójnie negatywnego raka piersi, opornego na leczenie (157).

Komórki zakupiono z Niemieckiej Kolekcji Mikroorganizmów i Kultur Komórkowych (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, nr kat. ACC732). Hodowlę komórkową linii MDA-MB-231 prowadzono w oparciu o wytyczne dostawcy (158).

Linia PC-3 - adherentna, epitelialna, prawie triploidalna linia komórek raka prostaty, wyprowadzona z materiału pobranego od 62-letniego, białego mężczyzny, a dokładniej z komórek pochodzących z przerzutu tego nowotworu do kości. Stanowi model drobnokomórkowego raka gruczołu krokowego. Komórki PC-3 są wysoce agresywne, zdolne do tworzenia nowotworów i przerzutów w modelach zwierzęcych, charakteryzują się brakiem ekspresji PSA (ang. *prostate-specific antigen*, swoisty antygen sterczowy) i receptora androgenów (ang. androgen receptor, AR) (159).

Komórki uzyskane dzięki uprzejmości Zakładu Genoterapii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołajka Kopernika w Toruniu. Hodowlę komórkową linii PC-3 prowadzono w oparciu o wytyczne ATCC (160).

Linia RAJI - rosnąca w zawieszynie, diploidalna linia limfocytów B chłoniaka Burkitta, założona w 1963 r. z komórek pochodzących od 11 letniego, czarnoskórego mężczyzny. Linia posiada w swoim genomie sekwencje wirusa EBV, lecz nie produkuje cząsteczek wirusa. Komórki RAJI posiadają także w swoim genomie gen fuzyjny MYC-IGH (161) .

Komórki uzyskane dzięki uprzejmości pracowników Katedry Inżynierii i Biologii Systemów, Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki, Politechniki Śląskiej. Hodowlę komórkową linii RAJI prowadzono w oparciu o wytyczne ATCC (162).

3.1.2 Przygotowanie medium do hodowli komórkowych

Dla każdej z hodowanych linii przygotowano kompletne medium hodowlane, składające się z: 10 % FBS (FBS Good Forte Filtrated Bovine serum EU approved w: additive fortifier, PAN Biotech, nr kat.: P40-47500), 1% roztworu antybiotyków (Antibiotic Antimycotic Solution, 100X, Corning, nr kat.: 30-004-CI) oraz medium podstawowego, wybranego na podstawie zaleceń producenta danej linii komórkowej, zapewniającego optymalny wzrost komórek. W przypadku mediów nie zawierających L-glutaminy, dodawano roztwór tej substancji do końcowego stężenia 2 mmol/l (Gibco, nr kat.: 25030-081).

3.1.3 Zakładanie hodowli komórkowych

Zakupione linie komórkowe, do czasu założenia hodowli, były przechowywane w ciekłym azocie, w temperaturze $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bezpośrednio przed założeniem hodowli, krioprobówki zawierające zamrożoną zawiesinę komórek przenoszono do pojemnika z lodem, a następnie ogrzewano w łaźni wodnej o temperaturze $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Krioprobówki niezwłocznie umieszczano w komorze laminarnej, przemyto 70 % roztworem etanolu, a ich zawartość przenoszono do probówek wirowniczych typu Falcon (15 ml), zawierających ogrzane do temperatury $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, kompletne medium hodowlane, właściwe dla danej linii komórek.

Następnie, by pozbyć się medium zawierającego krioprotektant (zazwyczaj 10 % DMSO, dimetylosulfotlenek), probówki wirowano przez 5 minut, w temperaturze $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, z przyspieszeniem $200 \times g$. Supernatant odlano, a pozyskany osad delikatnie zawieszano w 1 ml ciepłego, kompletnego medium hodowlanego. Następnie policzono komórki w uzyskanej zawiesinie i wysiano je do butelek hodowlanych o powierzchni 25 cm^2 , (Nunc™ EasYFlask™ 25cm^2 Cell Culture Flasks, Thermo-Fisher nr kat.: 156367), zawierających 5 ml ogrzanego, kompletnego medium hodowlanego, w gęstości zalecanej przez producenta linii. Hodowle prowadzono w sterylnym inkubatorze, w temperaturze $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i w atmosferze zawierającej 5 % CO_2 .

Aby zapewnić jak najlepsze parametry wzrostu komórek, hodowle wszystkich badanych linii prowadzono do momentu osiągnięcia 80-90% konfluencji w ocenie

mikroskopowej, a w przypadku hodowli zawiesinowych, do momentu osiągnięcia zalecanej przez dostawcę gęstości wyrażonej w liczbie komórek na 1 ml zawiesiny, po czym pasażowano na nowe naczynia hodowlane.

3.1.4 Liczenie komórek

Każdorazowo, przed wysiewaniem komórek na nowe naczynia hodowlane, przeprowadzono procedurę ich liczenia, przy pomocy zautomatyzowanego licznika komórek Luna II™ firmy Logos Biosystems. W tym celu pobierano niewielką porcję (zazwyczaj 10 µl) badanej zawiesiny komórek do probówki typu Eppendorf 0,5 ml. Następnie, do próbki dodawano 0,4 % roztwór błękitu trypanu (Gibco, nr kat.: 15250-061) w stosunku 1:1, dokładnie mieszano, inkubowano przez 1 min w temperaturze pokojowej, po czym pobierano 10 µl zawiesiny i наносzono na dedykowane, jednorazowe komory zliczeniowe, które umieszczano w czytniku. Ocena ilości komórek w badanej zawieszynie opierała się na analizie obrazu przez algorytm urządzenia, który rozróżnia żywe, jasno świecące komórki, od wybarwionych na niebiesko, komórek martwych, zlicza je i wydaje wynik w przeliczeniu na 1 ml wyjściowej próbki. Algorytm wylicza także żywotność badanych komórek [%]. We wszystkich procedurach używano jedynie tych komórek, które wykazywały żywotność z przedziału 90 - 99,9 %.

3.1.5 Pasażowanie komórek

Z naczyń hodowlanych z komórkami w stanie konfluencji usuwano stare medium hodowlane, a następnie dwukrotnie przepłukiwano naczynie odpowiednią ilością ciepłego roztworu DPBS (Dulbecco`s Phosphate – Buffered Saline, Corning, nr kat.: 21-031-CV), bez dodatku jonów wapnia(II) i magnezu(II). Po wypłukaniu martwych komórek i *debris* komórkowego, do naczyń hodowlanych dodawano roztwór trypsyny (Corning, nr kat.: 25-054-CI) w roztworze DPBS o stężeniu z przedziału 0,05 – 0,25 % i inkubowano w temperaturze 37 °C do momentu odklejenia się komórek od powierzchni naczynia hodowlanego, co monitorowano przy użyciu mikroskopu świetlnego o odwróconej optyce. Zarówno stężenie roztworu trypsyny, jak i czas inkubacji dobrano w sposób eksperymentalny, biorąc pod uwagę indywidualną wrażliwość danej linii na ten związek.

Następnie dezaktywowano trypsynę poprzez dodanie równej objętości ciepłego, medium hodowlanego zawierającego 10 % FBS, a całą objętość zawiesiny odklejonych komórek przenoszono do probówek wirowniczych typu Falcon i wirowano przez 5 minut w temperaturze 25 °C, z przyspieszeniem 200 x g, po czym zlewano supernatant, a pozostały osad komórkowy zawieszono w 1 ml świeżego medium hodowlanego, liczonego ilość komórek w 1 ml zawiesiny, po czym jej odpowiednią objętość przenoszono do nowych naczyń hodowlanych.

W przypadku linii komórek rosnących w zawiesinie, stare medium hodowlane oddzielano poprzez wirowanie (5 minut, 25 °C, 200 x g), a osad komórkowy ponownie zawieszano w świeżym medium hodowlanym w taki sposób, by uzyskać gęstość zalecaną przez producenta.

3.1.6 Krioprezerwacja komórek

Aby móc wykorzystać zakupione komórki w dowolnym momencie, bez konieczności prowadzenia kosztownej hodowli ciągłej, postanowiono zamrozić część hodowanych linii komórkowych. W tym celu, uzyskane osady komórkowe były zawieszane w medium do mrożenia, które składało się w 70 % z medium hodowlanego, właściwego dla danej linii komórkowej, 20 % płodowej surowicy bydlęcej (FBS) i 10 % DMSO (Sigma-Aldrich, nr kat.: 276855-1L). Następnie zawiesinę o gęstości 1-2 x 10⁶ kom/ml przenoszono do sterylnych krioprobówek, które umieszczano w kriopojemniku (Mr. Frosty™ Freezing Container, Thermo Scientific™, nr kat.: 5100-0001), który zapewnia stały spadek temperatury o 1 °C/min. Pojemnik umieszczono w zamrażarce niskotemperaturowej, w temperaturze -80 °C, na 24 godziny, po czym wyjęto z niego krioprobówki, które przeniesiono do naczynia z ciekłym azotem.

3.1.7 Ogólne zasady wykonania eksperymentów

Wszystkie wykonane w niniejszej pracy eksperymenty (por. Tabela 2) wpisywały się w ogólny schemat, opisany poniżej, a drobne szczegóły, takie jak czasy inkubacji czy stężenia konkretnych związków podano przy opisie wyników z każdego eksperymentu.

Komórki każdej z badanych linii wysiewano do butelek hodowlanych o powierzchni 75 cm² (Nunc™ EasYFlask™ 75cm² Cell Culture Flasks, Thermo-Fisher nr kat.: 156499), zawierających 10 ml kompletnego medium hodowlanego, właściwego dla danej linii komórkowej. Wszystkie kompletne media hodowlane zawierały tę samą surowicę (FBS GOOD FORTE, PAN Biotech, nr kat.: P40-47500) i ten sam zestaw antybiotyków (Antibiotic Antimycotic Solution, 100X, Corning, nr kat.: 30-004-CI)

Po 24 godzinach odlewano medium hodowlane, dwukrotnie płukano naczynia ciepłym roztworem DPBS, usuwając tym samym komórki martwe i te, które nie przykleiły się do dna naczynia hodowlanego, po czym dodawano 10 ml świeżego medium, zawierającego substancje badane, a do komórek kontrolnych dodawano medium z równym objętościowo dodatkiem rozpuszczalnika, użytego do sporządzenia roztworów badanych substancji. Hodowle prowadzono w sterylnym inkubatorze, w temperaturze 37 °C i w atmosferze zawierającej 5 % CO₂. Po upływie założonego w poszczególnym eksperymencie czasu hodowli, z naczyń hodowlanych usuwano medium hodowlane, a komórki dwukrotnie płukano ciepłym roztworem DPBS, po czym zbierano je poprzez trypsynizację, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.1.5. Uzyskany osad komórek przenoszono do zamrażarki niskotemperaturowej, gdzie przechowywano go w temperaturze -80 °C do momentu wykonania procedury izolacji materiału genetycznego.

Tabela 2 Skrócony opis wykonanych eksperymentów.

Lp.	Linia	Opis eksperymentu	Kontrola	N
1	HAP1	24-godzinna hodowla komórek linii HAP1 ^{WT} w obecności 100 μM, 1 mM i 5 mM α-ketoglutaranu (Sigma-Aldrich, nr kat.: 75890-500G).	DPBS	3
2	HAP1	24-godzinna hodowla komórek linii HAP1 ^{WT} w obecności 1 μM, 10 μM, 100 μM i 1 mM FeSO ₄ (Sigma-Aldrich, nr kat.: 215422-250G).	DPBS	3
3	HCT116	24-godzinna hodowla komórek linii HCT116 w obecności 1 μM, 10 μM i 100 μM FeSO ₄ .	DPBS	3
4	HAP1	24-godzinna hodowla komórek linii HAP1 ^{WT} , HAP1 ^{TE1KO} , HAP1 ^{TE2KO} i HAP1 ^{TE3KO} w obecności 10 μM, 100 μM i 1 mM kwasu L-(+)-askorbinowego (Sigma-Aldrich, nr kat.: A4544-100G) lub kwasu D-(-)-izoskorbinowego (Sigma-Aldrich, nr kat.: 856061-100G).	DPBS	2
5	HAP1	24-godzinna hodowla komórek linii HAP1 ^{WT} , HAP1 ^{TE1KO/TE2KO} , HAP1 ^{TE1KO/TE3KO} i HAP1 ^{TE2KO/TE3KO} w obecności 10 μM, 100 μM i 1 mM kwasu L-(+)-askorbinowego lub kwasu D-(-)-izoskorbinowego.	DPBS	3
6	K562	24-godzinna hodowla komórek linii K562 w obecności 10 μM, 100 μM i 1 mM kwasu L-(+)-askorbinowego lub kwasu D-(-)-izoskorbinowego.	DPBS	3
7	CA46	24-godzinna hodowla komórek linii CA46 w obecności 10 μM, 100 μM i 1 mM kwasu L-(+)-askorbinowego lub kwasu D-(-)-izoskorbinowego.	DPBS	3
8	RA11	24-godzinna hodowla komórek linii RA11 w obecności 10 μM, 100 μM i 1 mM kwasu L-(+)-askorbinowego.	DPBS	3
9	HCT116	24-godzinna hodowla komórek linii HCT116 w obecności 10 μM, 100 μM i 1 mM kwasu L-(+)-askorbinowego lub kwasu D-(-)-izoskorbinowego.	DPBS	3
10	PC-3	24-godzinna hodowla komórek linii PC-3 w obecności 10 μM, 100 μM i 1 mM kwasu L-(+)-askorbinowego lub kwasu D-(-)-izoskorbinowego.	DPBS	3
11	T24	24-godzinna hodowla komórek linii T24 w obecności 10 μM, 100 μM i 1 mM kwasu L-(+)-askorbinowego.	DPBS	3
12	A549	24-godzinna hodowla komórek linii A549 w obecności 10 μM, 100 μM i 1 mM kwasu L-(+)-askorbinowego.	DPBS	3
13	MDA-MB-231	24-godzinna hodowla komórek linii MDA-MB-231 w obecności 10 μM, 100 μM i 1 mM kwasu L-(+)-askorbinowego.	DPBS	3
14	HAP1	24-godzinna hodowla komórek linii HAP1 ^{WT} w obecności 100 μM kwasu L-askorbinowego, 100 μM α-ketoglutaranu, 10 μM FeSO ₄ lub połączeń tych związków (w wybranych sężeniach) tj. kwas L-askorbinowy + α-ketoglutaran; kwas L-askorbinowy + FeSO ₄ ; α-ketoglutaran + FeSO ₄ oraz kwas L-askorbinowy + α-ketoglutaran + FeSO ₄ .	DPBS	3
15	HAP1	48-godzinna hodowla komórek linii HAP1 ^{WT} , HAP1 ^{TE1KO} , HAP1 ^{TE2KO} i HAP1 ^{TE3KO} w obecności 100 μM L-askorbinianu sodu (Sigma-Aldrich, nr kat.: A4034-100G). Komórki zbierano w punktach czasowych: t= 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 i 48 godzin od dodania witaminy C do medium hodowlanego. Z każdego naczynia hodowlanego, w danym punkcie czasowym, odłano porcję medium i oznaczono w nim stężenie witaminy C. Zabrane komórki podzielono w stosunku 3:1, w większej porcji oznaczono poziomy epigenetycznych modyfikacji w DNA komórek, a mniejszą część przeznaczono na analizę wewnątrzkomórkowego stężenia witaminy C, kontrolę stanowią 48-godzinna hodowla z dodatkiem DPBSu.	Równoległa hodowla z DPBS, poziom w t=0	3
16	HAP1	24-godzinna hodowla komórek linii HAP1 ^{WT} , HAP1 ^{TE1KO/TE2KO} , HAP1 ^{TE1KO/TE3KO} i HAP1 ^{TE2KO/TE3KO} w obecności 100 μM różnych postaci witaminy C tj. L-askorbinian sodu, kwas 6-O-palmitoil-1-askorbinowy (Sigma-Aldrich, nr kat.: 76183-25G), L-askorbinian sodu zamknięty w liposomach "PC90G", suplemencie diety ASCOLIP® oraz "puste" liposomy "PC90G". Trzy ostatnie związki zostały pozyskane w ramach współpracy z firmą Lipid Systems Sp. z o. o.	DPBS, "puste" liposomy	2
17	MDA-MB-231	24-godzinna hodowla komórek linii MDA-MB-231 w obecności 100 μM różnych postaci witaminy C tj. kwas L-(+)-askorbinowy, kwas D-(-)-izoskorbinowy, L-askorbinian sodu, L-askorbinian sodu zamknięty w liposomach "PC90G" oraz "puste" liposomy "PC90G".	DPBS, "puste" liposomy	3
18	K562	24-godzinna hodowla komórek linii K562 w obecności 1 μM, 10 μM, 100 μM chlorku niklu (Sigma-Aldrich, nr kat.: N6136-100G), 100 μM kwasu L-askorbinowego oraz połączeń poszczególnych sężeni NiCl ₂ z witaminą C.	DPBS	3
19	HAP1	24-godzinna hodowla komórek linii HAP1 ^{WT} , HAP1 ^{TE1KO} , HAP1 ^{TE2KO} i HAP1 ^{TE3KO} w obecności 10 μM, 25 μM, 50 μM i 100 μM mieszanu deferoksyminy (Sigma-Aldrich, nr kat.: D9533-1G), 10 μM, 25 μM, 50 μM i 100 μM chlorku żelaza (II) (Sigma-Aldrich, nr kat.: 157740-100G), 100 μM witaminy oraz szerokiego spektrum połączeń wymienionych substancji.	DPBS	1
20	HAP1	24-godzinna hodowla komórek linii HAP1 ^{WT} w obecności 0,5 mM i 1 mM ditiotretiolu (Sigma-Aldrich, nr kat.: D5545-5G).	DPBS	3
21	HAP1	24-godzinna hodowla komórek linii HAP1 ^{WT} , HAP1 ^{TE1KO/TE2KO} , HAP1 ^{TE1KO/TE3KO} i HAP1 ^{TE2KO/TE3KO} w obecności 0,1 μM, 1 μM, 10 μM i 100 μM tetrahydrouridyliny (BioVision, nr kat.: 1671-25) oraz połączenia poszczególnych sężeni tego związku z 100 μM witaminy C.	DPBS	3
22	HAP1	24-godzinna hodowla komórek linii HAP1 ^{WT} , HAP1 ^{TE1KO/TE2KO} , HAP1 ^{TE1KO/TE3KO} i HAP1 ^{TE2KO/TE3KO} w obecności 0,1 μM, 1 μM, 2,5 μM i 5 μM 5-azacytydyny (Sigma-Aldrich, nr kat.: A2385-100MG).	DPBS	3
23	HAP1	24 i 48-godzinna hodowla komórek linii HAP1 ^{WT} , HAP1 ^{TE1KO/TE2KO} , HAP1 ^{TE1KO/TE3KO} i HAP1 ^{TE2KO/TE3KO} w obecności 50 μM, 100 μM i 200 μM chlorku kobaltu (II) (Sigma-Aldrich, nr kat.: C8661-25G).	DPBS	3
24	HAP1	24 i 72-godzinna hodowla komórek linii HAP1 ^{WT} , HAP1 ^{TE1KO} , HAP1 ^{TE2KO} i HAP1 ^{TE3KO} w warunkach hipoksji (atmosfera w inkubatorze: 0,5 % O ₂ , 5 % CO ₂ , 37 °C), komórki kontrolne hodowano równoległe do badanych w inkubatorze normoksyjnym (atmosfera w inkubatorze: 21 % O ₂ , 5 % CO ₂ , 37 °C).	normoksja w t=24 i 72 h	3
25	HAP1	24 i 48-godzinna hodowla komórek linii HAP1 ^{WT} , HAP1 ^{TE1KO/TE2KO} , HAP1 ^{TE1KO/TE3KO} i HAP1 ^{TE2KO/TE3KO} w warunkach hipoksji (atmosfera w inkubatorze: 0,5 % O ₂ , 5 % CO ₂ , 37 °C), komórki kontrolne hodowano równoległe do badanych w inkubatorze normoksyjnym (atmosfera w inkubatorze: 21 % O ₂ , 5 % CO ₂ , 37 °C).	normoksja w t=24 i 48h	3

3.2. Chromatograficzna analiza poziomu epigenetycznych modyfikacji w DNA

W niniejszej pracy posłużono się opracowaną i zoptymalizowaną w Katedrze Biochemii Klinicznej Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy metodą oznaczania epigenetycznych modyfikacji w DNA przy użyciu dwuwymiarowej, ultrasprawnej chromatografii cieczowej z tandemową detekcją mas, bazującej na wcześniej opublikowanej metodzie (163), którą poddano istotnym modyfikacjom i w szczegółowy sposób opisano w monografii pt. „DNA Modifications Methods and Protocols” (164). Poniżej, w sposób skrótowy przedstawiono założenia tej metody.

Izolacja DNA z komórek hodowlanych

Zamrożone osady komórek doprowadzono do temperatury pokojowej, a po ich rozmrożeniu odpipetowano pozostałości medium hodowlanego, po czym zawieszono w buforze „B” (5 mmol/l Na₂EDTA, 0,15 mmol/l deferoksyaminy, 10 mmol/l Tris-HCL, pH=8,0) w objętości z zakresu 0,5 - 3 ml. Objętość buforu była dobierana eksperymentalnie i zależała zarówno od rodzaju komórek, jak i ich liczby. Do zawiesiny komórek dodawano odpowiednią objętość roztworu RNAzy A z trzustki bydlęcej (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, nr kat.: R6513-1G), tak by końcowe stężenie w próbce wyniosło 30 µg/ml i roztwór RNAzy T₁ z *Aspergillus oryzae* (1 U/µl; Sigma-Aldrich, nr kat.: R1003-500KU), do końcowego stężenia w próbce 10 U/ml, by ograniczyć ewentualną kontaminację izolowanego DNA cząsteczkami RNA.

Następnie przeprowadzano lizę komórek poprzez dodanie odpowiedniej objętości 10 % (m/v) roztworu SDS, tak by końcowe stężenie tego związku w próbce wyniosło 0,5 %. Tak przygotowany lizat komórkowy inkubowano przez 30 minut w łaźni wodnej ogrzanej do temperatury 37 °C.

W celu enzymatycznego strawienia białek obecnych w komórce, w szczególności zaś białek związanych z DNA, do lizatu komórkowego dodano odpowiednią objętość roztworu Proteiny K z *Tritirachium album* (20 mg/ml, Sigma-Aldrich, nr kat.: SRE0005), tak by końcowe stężenie tego związku w lizacie wyniosło 4 mg/ml, po czym inkubowano przez 90 minut w łaźni wodnej ogrzanej do temperatury 37 °C.

By usunąć białka komórkowe, jak i inne substancje nierozpuszczalne w wodzie, do schłodzonych próbek dodano równą objętość mieszaniny fenol-chloroform-alkohol izoamyłowy (przygotowaną w stosunku objętościowym 25:24:1), wstrząsano energicznie przez kilka minut, po czym wirowano przez 15 minut, w temperaturze 4 °C, z przyspieszeniem 2800 x g. Po wirowaniu, zebrano fazę wodną, którą przeniesiono do nowych probówek wirowniczych.

Następnie, do zebranej wcześniej fazy wodnej dodano równą objętość mieszaniny chloroform-alkohol izoamyłowy (przygotowaną w stosunku objętościowym 24:1), energicznie wytrząsano przez kilka minut, po czym wirowano przez 15 minut, w temperaturze 4 °C, z przyspieszeniem 2800 x g i ponownie zbierano fazę wodną do nowych probówek wirowniczych.

W celu wytrącenia wysoce spolimeryzowanego DNA, do otrzymanej fazy wodnej dodawano trzy objętości zimnego, 96 % etanolu. Próbki mieszano poprzez delikatne ruchy probówką, do momentu pojawienia się długich, białych nici DNA, które wyciągano przy pomocy plastikowej ezy. Tak pozyskany DNA przeniesiono do 0,5 ml probówki typu Eppendorf, po czym uwodniono poprzez dodanie 50 µl czystej, sterylnej wody, wolnej od RNAz i DNAz. Uwodniony DNA był następnie poddawany enzymatycznej hydrolizie do pojedynczych nukleozydów.

Enzymatyczne trawienie DNA

W celu uzyskania pojedynczych deoksynukleotydów, do każdej próbki uwodnionego DNA, a także próby „ślepej” zawierającej 50 µl wody, dodawano: 50 µl buforu NP1 (200 mmol/L octanu amonu, 0,2 mmol/l ZnCl₂, pH=4,6), 1 µl roztworu Nukleazy P1 (1 U/µl, New England BioLabs® Inc.; nr kat.: M0660S) i 1 µl roztworu tetrahydrourydyny – inhibitora deaminaz cytydyny (10 mg/ml, Sigma-Aldrich, nr kat.: 584223-25MG), dokładnie mieszano, a następnie inkubowano przez trzy godziny w łaźni wodnej ogrzanej do temperatury 37 °C.

Następnie, by usunąć hydrofilowe grupy fosforanowe z deoksynukleotydów i uzyskać deoksynukleozydy, które można rozdzielać za pomocą chromatografii w układzie odwróconych faz, do hydrolizatu dodawano 13 µl 10 % NH₄OH i 6 µl fosfatazy alkalicznej (Termolabile Recombinant Shrimp Alkaline Phosphatase (1 000 U/ml), New England BioLabs® Inc.; nr kat.: M0371S).

Za pomocą wskaźnika uniwersalnego sprawdzano pH hydrolizatu, które powinno wynosić co najmniej 8,0. W razie potrzeby próbki alkalizowano niewielką, dodatkową porcją wodorotlenku amonu. Hydrolizaty inkubowano przez 90 minut w łaźni wodnej ogrzanej do temperatury 37 °C, po czym przenoszono na płytki filtracyjne (AcroPrep Advance 96-Well Filter Plates 10 K) i wirowano przez 90 minut w temperaturze 4 °C, z przyspieszeniem 1800 x g, dzięki czemu pozbywano się z mieszaniny białek i potencjalnych zanieczyszczeń większych od wielkości porów membrany.

Otrzymane filtry (100 – 120 µl) przeniesiono do 1,5 ml probówek typu Eppendorf i zagęszczono w koncentratorze próżniowym do objętości 20 µl, pozbywając się jonów octanowych i amonowych, które odparowują w warunkach obniżonego ciśnienia.

Następnie, do zagęszczonych hydrolizatów dodano 5 µl mieszaniny znakowanych stabilnymi izotopami standardów wewnętrznych, zawierającej:

- [¹³C₅,¹⁵N₂]-8-oksy-7,8-dihydro-2`-deoksyguanozynę (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.; nr kat.: NLM-6715-1MG);
- [D₃]-5-hydroksymetylo-2`-deoksycytydynę (Toronto Research Chemicals, Inc.; nr kat.: H946632);
- [¹³C,¹⁵N₂]-2`-deoksyurydynę (Medical Isotopes, Inc.; nr kat.: CN2305)
- [¹³C₁₀,¹⁵N₂]-5-metylo-2`-deoksycytydynę (synteza w Katedrze Biochemii Klinicznej);
- [¹³C₁₀,¹⁵N₂]-5-formylo-2`-deoksycytydynę (synteza w Katedrze Biochemii Klinicznej);
- [¹³C₁₀,¹⁵N₂]-5-karboksy-2`-deoksycytydynę (synteza w Katedrze Biochemii Klinicznej);
- [¹³C₁₀,¹⁵N₂]-5-hydroksymetylo-2`-deoksyurydynę (synteza w Katedrze Biochemii Klinicznej);

Stężenie każdego z powyższych standardów wewnętrznych w mieszaninie wzorców wynosiło 250 fmol/µL, a proces przygotowania komercyjnie niedostępnych standardów wewnętrznych ze szczegółami opisano w 10 rozdziale monografii „DNA Modifications Methods and Protocols” (165).

Chromatograficzna analiza deoksynukleozydów

Oznaczenia chromatograficzne wykonano przy użyciu systemu złożonego z chromatografu ACQUITY UPLC PLUS I-Class, Waters®: dwóch pomp gradientowych operujących w zakresie ciśnień do 15000 psi, pompy izokratycznej, operującej w zakresie do 5000 psi, dwóch automatycznych, programowalnych, dwu pozycyjnych, sześcioportowych zaworów, trójnika wysokociśnieniowego, detektora z matrycą fotodiodową (Photodiode-Array Detector, PDA detector), ultraczułego, tandemowego, kwadropolowego spektrometru mas (Xevo TQ-XS) oraz zestawu kolumn chromatograficznych, który obejmował:

- przed-kolumnę: CORTECS T3 VanGuard (Waters®), 5 mm x 2,1mm, 1,6 µm.
- kolumnę pierwszego wymiaru: CORTECS T3 (Waters®), 150 mm x 3 mm, 1.6 µm.
- kolumnę trapującą: XSelect CSH C18 (Waters®), 20mm x 3 mm, 3,5 µm.
- kolumnę drugiego wymiaru: ACQUITY UPLC CSH C18 (Waters®), 100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm.

Na potrzeby omawianych analiz sporządzono szereg eluentów na bazie odczynników klasy LC/MS i ultraczystej wody, które stanowiły fazy ruchome w użytym układzie chromatograficznym i obejmowały:

- fazę ruchomą A1: CH₃COOH 0,05% (v/v),
- fazę ruchomą A2: CH₃COOH 0,01% (v/v),
- fazę ruchomą B1: acetonitryl;
- fazę ruchomą B2: metanol;
- fazę ruchomą C1: ultraczysta woda;

System chromatograficzny został skonfigurowany w taki sposób, by mieszanina związków najpierw trafiała na przed-kolumnę, której celem było usunięcie wszystkich zanieczyszczeń mechanicznych oraz uwięzienie substancji, które mogłyby się nieodwracalnie związać ze złożem chromatograficznym dalszych kolumn. Następnie mieszanina deoksynukleozydów była rozdzielana na kolumnie pierwszego wymiaru

(przepływ 0,5 ml/min, gradient: od startu do 1 min 99,3 % fazy A1 i 0,7 fazy B1, krzywa 6; do 7 min 50 % fazy A1, 50 % fazy B1, krzywa 8; do 7,2 min 50 % fazy A1, 50 % fazy B1, krzywa 6; od 7,21 min do 9 min 99,3 % fazy A1 i 0,7 % fazy B1, krzywa 6), z której poszczególne anality, w określonych oknach czasowych trafiały do detektora MS/MS (5-hydroksymetylo-2'-deoksycytidyna, 5-formylo-2'-deoksycytidyna i 8-okso-7,8-dihydro-2'-deoksyguanozyna) albo, po rozcieńczeniu fazą C1 w stosunku 1:1, na kolumnę trapującą, (5-karboksy-2'-deoksycytidyna, 5-hydroksymetylo-2'-deoksyurydyna, 2'-deoksyurydyna,), albo były kierowane do detektora PDA (2'-deoksyguanozyna, 2'-deoksycytidyna, 2'-deoksytymidyna, 2'-deoksyadenozyna, 5-metylo-2'-deoksycytidyna), gdzie następowała ich detekcja w świetle UV z zakresu 260-280 nm. Takie podejście umożliwiło nie tylko ocenę stężenia dT, dA i 5-mCyt w badanej próbce, ale także monitorowanie jakości procesu enzymatycznej hydrolizy DNA (na podstawie obecności nukleotydów i oligonukleotydów), jak również określenie stopnia zanieczyszczenia próbki RNA (na podstawie obecności rybonukleozydów).

Fracje zatrzymane na kolumnie trapującej, były przekierowywane na kolumnę drugiego wymiaru (przepływ 0,35 ml/min, gradient: od startu do 1,8 min 99 % fazy A2 i 1 % fazy B2, krzywa 6; do 3 min 91 % fazy A2 i 9 % fazy B2, krzywa 6; do 4,2 min 50 % fazy A2 i 50 %, krzywa 7; do 6 min 50 % fazy A2 i 50 % fazy B2, krzywa 6; od 6,01 do 9 min 99 % fazy A2 i 1 % fazy B2, krzywa 6), gdzie ulegały rozdzielaniu. Rozdzielone, modyfikowane nukleozydy trafiały do źródła jonów, gdzie ulegały jonizacji dodatniej lub ujemnej w trybie elektrorozpylania (ES) tworząc jony potomne, które trafiały do detektora. Szczegółowa charakterystyka jonów potomnych i ich detekcji została przedstawiona w Tabeli 3.

Warto w tym miejscu odnotować, iż znakowane stabilnymi izotopami standardy wewnętrzne, od strony chromatograficznej, zachowują się dokładnie tak samo, jak ich nieznakowane odpowiedniki i opuszczają kolumnę chromatograficzną w tym samym czasie, natomiast ich zjonizowane formy posiadają odmienny stosunek masy do ładunku, co stanowi podstawę ilościowej analizy badanych modyfikacji.

Tabela 3 Charakterystyka jonów potomnych i ich detekcji.

Związek	Względny współczynnik odpowiedzi	Tryb jonizacji	Nominalna masa cząsteczkowa (Da)	Wzór jonu pseudomolekularnego	Nominalny jon macierzysty (Da)	Nominalny jon potomny (Da)	ESI napięcie kapilary (kV)	ESI napięcie stożka (V)	US napięcie (kV)	US napięcie stożka (V)	Energia kolizji (eV)
5-hydroksymetylo-2'-deoksyrydyna	Kwantyfikator 0,033	pozytywna	257	[M+H] ⁺	258	124	1,2	15	1,3	15	10
2'-deoksyrydyna	Kwalifikator	pozytywna	257	[M+H] ⁺	258	142	1,2	15	1,3	15	10
[D ₃]-5-hydroksymetylo-2'-deoksyrydyna	Kwantyfikator 0,031	pozytywna	260	[M+3]+H ⁺	261	127	1,2	15	1,3	15	10
2'-deoksyrydyna	Kwalifikator	pozytywna	260	[M+3]+H ⁺	261	145	1,2	15	1,3	15	10
5-formylo-2'-deoksyrydyna	Kwantyfikator 0,182	negatywna	255	[M-H] ⁻	254	121	3,5	28	1,0	40	18
deoksyrydyna	Kwalifikator	negatywna	255	[M-H] ⁻	254	138	3,5	28	1,0	40	18
[¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₂]-5-formylo-2'-deoksyrydyna	Kwantyfikator 0,178	negatywna	267	[M+12]-H ⁻	266	128	3,5	28	1,0	40	18
deoksyrydyna	Kwalifikator	negatywna	267	[M+12]-H ⁻	266	145	3,5	28	1,0	40	18
5-karboksyr-2'-deoksyrydyna	Kwantyfikator 0,318	negatywna	271	[M-H] ⁻	270	110	3,5	20	1,0	50	20
deoksyrydyna	Kwalifikator	negatywna	271	[M-H] ⁻	270	93	3,5	20	1,0	50	20
[¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₂]-5-karboksyr-2'-deoksyrydyna	Kwantyfikator 0,300	negatywna	283	[M+12]-H ⁻	282	116	3,5	20	1,0	50	20
deoksyrydyna	Kwalifikator	negatywna	283	[M+12]-H ⁻	282	99	3,5	20	1,0	50	20
5-hydroksymetylo-2'-deoksyrydyna	Kwantyfikator 1,092	negatywna	258	[M-H] ⁻	257	124	3,5	20	1,0	45	15
2'-deoksyrydyna	Kwalifikator	negatywna	258	[M-H] ⁻	257	214	3,5	20	1,0	45	10
[¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₂]-5-hydroksymetylo-2'-deoksyrydyna	Kwantyfikator 1,233	negatywna	270	[M+12]-H ⁻	269	131	3,5	20	1,0	45	15
deoksyrydyna	Kwalifikator	negatywna	270	[M+12]-H ⁻	269	224	3,5	20	1,0	45	10
2'-deoksyrydyna	Kwantyfikator 0,102	negatywna	228	[M-H] ⁻	227	184	3,5	20	1,0	20	12
deoksyrydyna	Kwalifikator	negatywna	228	[M-H] ⁻	227	136	3,5	20	1,0	20	10
[¹³ C ₇ , ¹⁵ N ₂]-2'-deoksyrydyna	Kwantyfikator 0,100	negatywna	231	[M+3]-H ⁻	230	185	3,5	20	1,0	20	12
deoksyrydyna	Kwalifikator	negatywna	231	[M+3]-H ⁻	230	137	3,5	20	1,0	20	10
8-oksyr-7,8-dihydro-2'-deoksyguanozyna	Kwantyfikator 0,280	negatywna	283	[M+H] ⁺	284	168	1,2	20	1,3	70	15
2'-deoksyguanozyna	Kwalifikator	negatywna	283	[M+H] ⁺	284	140	1,2	20	1,3	70	30
[¹⁵ N ₅]-8-oksyr-7,8-dihydro-2'-deoksyguanozyna	Kwantyfikator 0,292	negatywna	288	[M+5]+H ⁺	289	173	1,2	20	1,3	70	15
2'-deoksyguanozyna	Kwalifikator	negatywna	288	[M+5]+H ⁺	289	145	1,2	20	1,3	70	30

Względny współczynnik odpowiedzi = powierzchnia pod pikiem kwalifikatora/powierzchnia pod pikiem kwantyfikatora.

Przed wykonaniem oznaczeń chromatograficznych, układ chromatograficzny został skonfigurowany pod względem siły sygnału i skalibrowany:

dla analiz w świetle UV – poprzez kalibrację zewnętrzną, polegającą na utworzeniu krzywych kalibracyjnych na podstawie analizy roztworów kalibracyjnych (5 nastrzyknięć, po 2µl) dla każdego z analizowanych tą metodą związków, w zakresach 0,00781 do 1 mmol/l (dla dA, dT, dC i dG) i w zakresie 0,39 - 50 µmol/l dla 5-mCyt;

dla analiz MS/MS - poprzez kalibrację wewnętrzną, na podstawie stosunku pól powierzchni analitu do znakowanych standardów wewnętrznych.

Analizy wszystkich próbek zawsze wykonywano w trzech do pięciu powtórzeniach technicznych (nastrzykach), a otrzymane chromatogramy analizowano ilościowo za pomocą oprogramowania TargetLynx™ (Waters).

Następnie ze wszystkich powtórzeń technicznych dla danej próbki wyliczono średnią, odchylenie standardowe (SD) i relatywne odchylenie standardowe (RSD), zarówno dla natywnych, jak i modyfikowanych deoksynukleozydów. Odrzucano wyniki z RSD > 2,5% dla natywnych deoksynukleozydów i z RSD > 15% dla zmodyfikowanych deoksynukleozydów. Całkowite stężenie nukleozydów w próbce (dN), pochodzących z dwuniciowego DNA, wyliczano na podstawie dwukrotności sumy stężeń dT i dA, co można zapisać wzorem: $dN = 2 \times (dT + dA)$.

Relatywną ilość modyfikowanych nukleozydów w badanym materiale obliczano dzieląc ich stężenia przez całkowite stężenie deoksynukleozydów w próbce.

3.3. Chromatograficzna analiza poziomu witaminy C w komórkach i medium hodowlanym

Na potrzeby wykonania analizy stężenia witaminy C, zarówno w medium hodowlanym, jak i we wnętrzu komórek posłużono się wcześniej opisaną metodyką oznaczania stężenia tego związku za pomocą techniki UPLC-UV (166). Ponadto, aby jak najdokładniej oszacować wewnątrzkomórkowe stężenie tego związku, posłużono się opracowaną w Katedrze Biochemii Klinicznej metodą normalizacji wyników, która opiera się na przeliczeniu stężenia badanych metabolitów na liczbę komórek, określoną na podstawie zawartości tyminy oznaczanej chromatograficznie w tej samej próbce (167).

3.3.1 Oznaczenia stężenia witaminy C w badanych próbkach

Próbki medium hodowlanego i osady komórek wyjęto z zamrażarki niskotemperaturowej, rozmrożono i umieszczono w lodzie. Do 2 ml probówek typu Eppendorf pobrano 120 μ l medium komórkowego, a osady komórkowe zawieszono w 100 μ l zimnego roztworu DPBS oraz 100 μ l 30 % roztworu kwasu metafosforowego (Sigma-Aldrich, nr kat.: 79615-100G) z dodatkiem 0,1 mmol/l allopurynolu (Sigma-Aldrich, nr kat.: A8003-5G), jako standardu wewnętrznego. Następnie probówki umieszczono w lodzie, by zapobiec rozpadowi witaminy C.

W przypadku zawiesiny komórek, zawartość probówek sonikowano przez 5 minut. Na tym etapie pobrano także 20 μ l zawiesiny komórkowej na potrzeby chromatograficznych oznaczeń zawartości tyminy.

Następnie wszystkie próbki inkubowano przez 30 minut w kąpeli lodowej, po czym wirowano przez 15 minut, w temperaturze 4 °C, z przyspieszeniem 21 155 x g, a otrzymane supernatanty przeniesiono na płytki filtracyjne (AcroPrep Advance 96-Well Filter Plates 10 K), które wirowano przez 60 minut, w temperaturze 4 °C, z przyspieszeniem 650 x g. Otrzymane filtry były wykorzystywane w dalszych analizach chromatograficznych.

Rozdział chromatograficzny kwasu askorbinowego przeprowadzono przy użyciu kolumny Waters Acquity UPLC HSS T3 (150 mm \times 2,1 mm, 1,8 μ m) z przedkolumną Van Guard HSS T3 1,8 μ m (kolumny ogrzane do 40 °C). Zastosowano dwa eluenty, które stanowiły fazy ruchome:

- faza A – 0,1% kwas mrówkowy

- faza B – metanol

Rozdział chromatograficzny prowadzono przy przepływie 0,25 ml/min i 2 μ l objętości nastrzyku, w następującym gradiencie: od 0-0,2 min 99,9 % fazy A i 0,1 % fazy B; od 0,2-2,0 min 85 % fazy A i 15 % fazy B; od 2,0-2,9 min 30 % fazy A i 70 % fazy B; od 2,9-3,5 min 30 % fazy A i 70 % fazy B, od 3,5-3,9 min 99,9 % fazy A i 0,1 % fazy B. Detekcja badanych związków odbywała się przy pomocy detektora z matrycą fotodiodową, przy długości fali równej 260 nm, a otrzymane wyniki analizowano za pomocą oprogramowania Empower. Analizy przeprowadzono co najmniej w dwóch powtórzeniach technicznych, a

stężenie witaminy C określano przy użyciu wcześniej sporządzonej krzywej kalibracyjnej, stanowiącej wykres funkcji zależności powierzchni piku kwasu askorbinowego od stężenia kwasu askorbinowego w próbkach kalibracyjnych, o współczynniku R^2 powyżej 0,99.

3.3.2 Oznaczenia zawartości tyminy w badanych próbkach

20 μ l zawiesiny komórek przeniesiono do szklanych fiolek o pojemności 2 ml, po czym dodano do nich jako standardu wewnętrznego, 200 μ l roztworu kofeiny o stężeniu 515 μ mol/l w 2 mol/l HCl, szczelnie zamknięto i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 130 °C, celem przeprowadzenia kwaśnej hydrolizy.

Następnie próbki ostudzono i suszono w strumieniu azotu przy użyciu systemu XcelVap® firmy Biotage, po czym uwodniono przez noc w 50 μ l ultraczystej wody. Następnego dnia przeniesiono próbki na płytki filtracyjne (AcroPrep Advance 96-Well Filter Plates 10 K), które wirowano przez 60 minut, w temperaturze 4 °C, z przyspieszeniem 650 x g. Otrzymane filtraty były wykorzystywane w dalszych analizach chromatograficznych.

Rozdział chromatograficzny próbek (z 2 μ l nastrzyku) przeprowadzono przy użyciu kolumny Kinetex 1,7 μ m F5 LC (150 mm \times 2,1 mm), w temperaturze 30 °C i przepływie 0,2 ml/min.

Zastosowano dwa eluenty, które stanowiły fazy ruchome:

- faza A – 10 mmol/l mrówczan amonu
- faza B – metanol

Rozdział chromatograficzny tyminy prowadzono w następującym gradiencie: od 0 do 0,1 min, izokratycznie, 99 % fazy A i 1 % fazy B; od 0,1 do 1,9 min, gradient liniowy do 55 % fazy A i 45 % fazy B; od 1,9 do 2,1 min, gradient liniowy do 40 % fazy A i 60 % fazy B; od 2,1 do 4,1 min, izokratycznie, 40 % fazy A i 60 % fazy B; od 4,1 do 6,0 min, gradient liniowy do 99% fazy A i 1% fazy B. Detekcja badanych związków odbywała się przy pomocy detektora z matrycą fotodiodową, przy długości fali równej 265 nm, a otrzymane wyniki analizowano za pomocą oprogramowania Empower. Analizy przeprowadzono co najmniej w dwóch powtórzeniach technicznych, a stężenie molowe tyminy w próbce obliczono na podstawie średniego stosunku powierzchni piku tyminy do kofeiny.

Zawartość tyminy w DNA komórki jest stała, a jej ilość, uwolniona podczas kwaśnej hydrolizy materiału biologicznego w liniowy sposób koreluje z liczbą komórek w preparacie (168). Na potrzeby niniejszej pracy przyjęto, iż w stanie spoczynkowym, w komórce diploidalnej znajduje się średnio 6,270 fmol/l tyminy, a w komórce haploidalnej 3,135 fmol/l. Dzieląc zmierzone stężenie witaminy C w homogenacie komórkowym przez określoną za pomocą stężenia tyminy liczbę komórek w tej samej próbce, a następnie przeliczając uzyskany wynik na objętość komórki (przyjęto, iż komórka jest kulą, której promieniem jest połowa średnicy średniej, określonej podczas liczenia komórek przy pomocy urządzenia LUNA II), uzyskano stężenie witaminy C w pojedynczej komórce.

3.4. Statystyczna analiza wyników

Wyniki wszystkich eksperymentów zostały opracowane, zarówno w formie graficznej, jak i tabelarycznej w arkuszu programu Microsoft Excel 2019. Zaprezentowano je na wykresach słupkowych jako średnią ze wszystkich powtórzeń biologicznych \pm odchylenie standardowe, których wartości liczbowe zestawiono w etykietach u dołu indywidualnych słupków. Na wykresach czarnymi krzyżykami zaznaczono również dane surowe - średnie wartości dla poszczególnych powtórzeń biologicznych.

Dla eksperymentów kinetycznych, dokonano normalizacji wyników poziomów poszczególnych modyfikacji epigenetycznych DNA, tworząc nową zmienną, powstałą po podzieleniu wszystkich wyników przez uśredniony wynik dla próbek kontrolnych.

Plik programu Excel posłużył jako plik wsadowy do programu Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc. (2017). Statistica (data analysis software system), version 13. <http://statistica.io>), w którym:

- określono rodzaj poszczególnych zmiennych, nadano im kody i etykiety tekstowe,
- wyrysowano histogramy dla zmiennych liczbowych, dla każdej linii komórkowej i każdego eksperymentu,
- na podstawie analizy wygenerowanych histogramów usunięto wyniki odstające,
- dokonano analizy istotności wyników poszczególnych eksperymentów stosując jednoczynnikowy, dwustronny test ANOVA z testami post-hoc: HSD Tukeya i NIR Fishera – rodzaj testu dobrano na podstawie analizy wariancji. Za wartość graniczną, świadczącą o istotności statystycznej, przyjęto $p < 0,05$.

- w przypadku eksperymentów badających wpływ 24-godzinnej hodowli komórek HAP1 w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego na poziom modyfikacji zasad azotowych w DNA dokonano analizy istotności wyników obrębie poszczególnych dawek badanych substancji przy pomocy wieloczynnikowego testu ANOVA z testem post-hoc NIR Fishera. Za wartość graniczną, świadczącą o istotności statystycznej, przyjęto $p < 0,05$.

4. Wyniki

Na potrzeby niniejszej pracy przeprowadzono szereg eksperymentów obejmujących zarówno szerokie spektrum linii komórkowych, jak i liczne substancje o potencjalnej zdolności do modulowania aktywności białek rodziny TET. Dzięki zastosowaniu dwuwymiarowej ultrasprawnej chromatografii cieczowej z tandemową detekcją mas, wraz ze znakowanymi izotopowo, stabilnymi standardami wewnętrznymi, zostały w sposób ilościowy określone poziomy poszczególnych modyfikacji epigenetycznych w DNA badanych komórek. Wyniki poszczególnych eksperymentów zebrano i przedstawiono poniżej, jednakże dla zapewnienia większej przejrzystości analizowanych danych i zachowania pewnego ciągu logicznego, postanowiono ująć je w zbiorczych rozdziałach, a niżeli przedstawiać wyniki względem rzeczywistej chronologii wykonanych prac.

4.1. Wpływ potencjalnych wzmacniaczy aktywności enzymatycznej białek rodziny TET na poziomy ich produktów w DNA

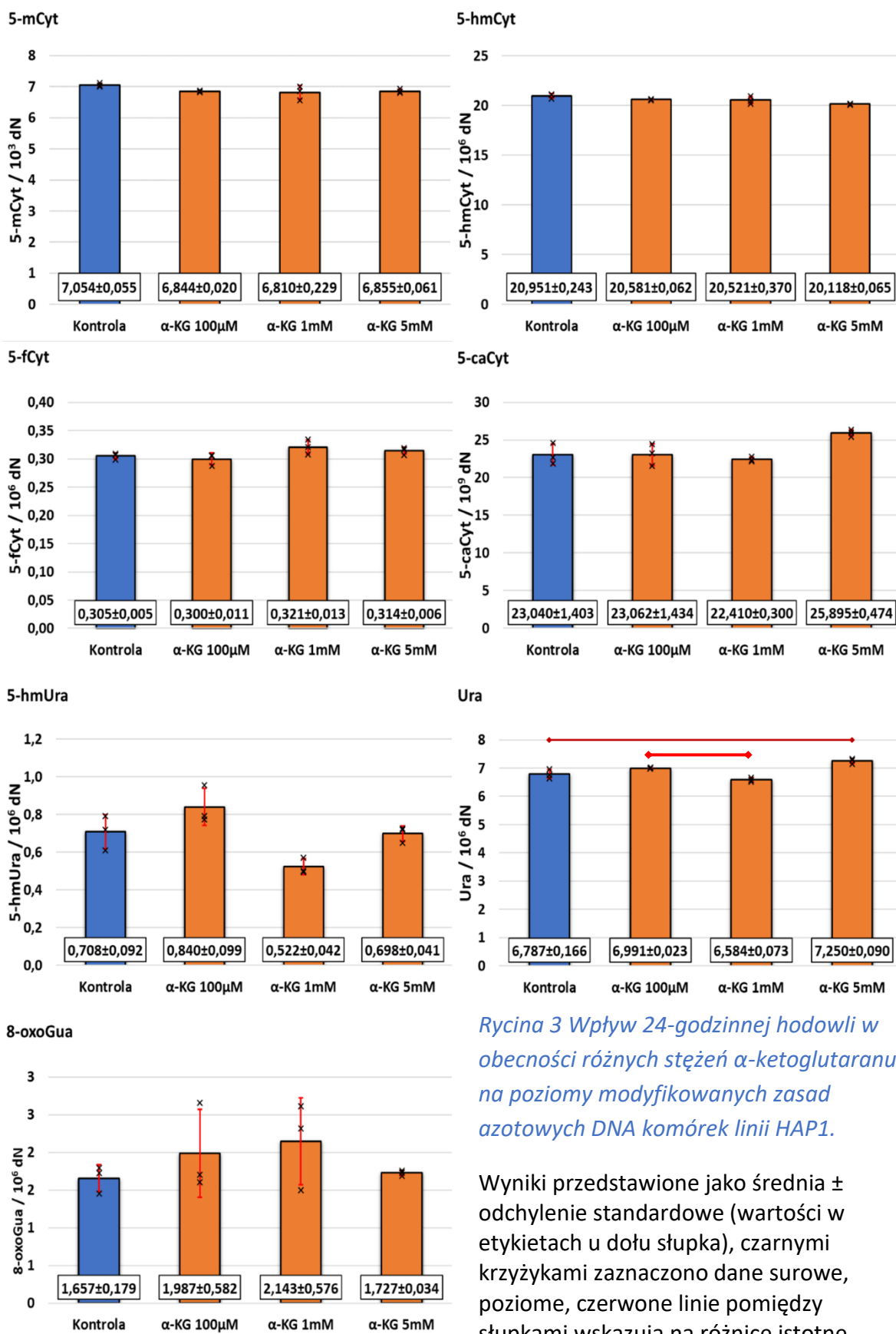
4.1.1 α -ketoglutaran

Białka rodziny TET są enzymami należącymi do klasy dioksygenaz zależnych od α -ketoglutaranu, a co za tym idzie poziom i dostępność tego substratu wydaje się być jednym z kluczowych elementów wpływających na ich aktywność. Dlatego też przeprowadzono eksperyment polegający na 24-godzinnej inkubacji komórek linii HAP1 z trzema stężeniami α -ketoglutaranu: 100 $\mu\text{mol/l}$, 1 mmol/l i 5 mmol/l , wybranymi na podstawie analizy danych literaturowych. Do komórek kontrolnych dodano ekwiwalentną objętość rozpuszczalnika. Warto nadmienić, iż w odróżnieniu od wielu innych mediów hodowlanych, medium użyte do hodowli komórek HAP1 (Iscove`s DMEM) nie posiada w swoim składzie α -ketoglutaranu, ani jego soli. Wyniki eksperymentu zamieszczono na Rycinie 3 (zmierzone wartości) i w Tabeli 4 (analizy statystyczne). Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych.

Uwagę zwraca brak różnic w poziomach epigenetycznych modyfikacji w DNA po ekspozycji na którekolwiek z zastosowanych stężeń α -ketoglutaranu.

Tabela 4 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1 po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń α -ketoglutaranu.

5-mCyt	α -KG 5mM	α -KG 1mM	α -KG 100 μ M	5-hmCyt	α -KG 5mM	α -KG 1mM	α -KG 100 μ M
Kontrola	0,489	0,259	0,429	Kontrola	0,980	1,000	1,000
α -KG 100 μ M	1,000	1,000		α -KG 100 μ M	1,000	1,000	
α -KG 1mM	1,000			α -KG 1mM	1,000		
5-fCyt	α -KG 5mM	α -KG 1mM	α -KG 100 μ M	5-caCyt	α -KG 5mM	α -KG 1mM	α -KG 100 μ M
Kontrola	1,000	1,000	1,000	Kontrola	1,000	1,000	1,000
α -KG 100 μ M	1,000	1,000		α -KG 100 μ M	1,000	1,000	
α -KG 1mM	1,000			α -KG 1mM	1,000		
5-hmUra	α -KG 5mM	α -KG 1mM	α -KG 100 μ M	Ura	α -KG 5mM	α -KG 1mM	α -KG 100 μ M
Kontrola	1,000	0,693	0,927	Kontrola	0,006	0,432	0,428
α -KG 100 μ M	0,896	0,125		α -KG 100 μ M	0,203	0,016	
α -KG 1mM	0,746			α -KG 1mM	0,000		
8-oxoGua	α -KG 5mM	α -KG 1mM	α -KG 100 μ M				
Kontrola	1,000	0,817	0,973				
α -KG 100 μ M	0,994	1,000					
α -KG 1mM	0,910						



Rycina 3 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń α -ketoglutaranu na poziomy modyfikowanych zasad azotowych DNA komórek linii HAP1.

Wyniki przedstawione jako średnia \pm odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

α -KG – α -ketoglutaran.

4.1.2 Jony żelaza(II)

By pełnić swoją biologiczną funkcję, białka z rodziny TET wykorzystują jony żelaza, wiążąc je w swoim centrum aktywnym, same zaś jony, podczas katalizowanej reakcji przechodzą z drugiego stopnia utlenienia (Fe(II)) na trzeci (Fe(III)). Dlatego też postanowiono wykonać eksperymenty polegające na 24-godzinnej suplementacji komórek linii HAP1 jonami dwuwartościowego żelaza, jako potencjalnego wzmacniacza aktywności białek TET. Posłużono się roztworem siedmiowodnego siarczanu żelaza(II) w sterylnej, odgazowanej, czystej chemicznie wodzie, by w naczyniach hodowlanych uzyskać końcowe stężenia 1 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$ i 1 mmol/l . Do komórek kontrolnych dodano ekwiwalentną objętość czystego rozpuszczalnika. Wartym odnotowania jest fakt, iż w formulacji medium hodowlanego użytego do hodowli komórek HAP1 nie ma jakichkolwiek związków żelaza. Wyniki eksperymentu zamieszczono na Rycinie 4 (zmierzone wartości) i w Tabeli 5 (analizy statystyczne). Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych.

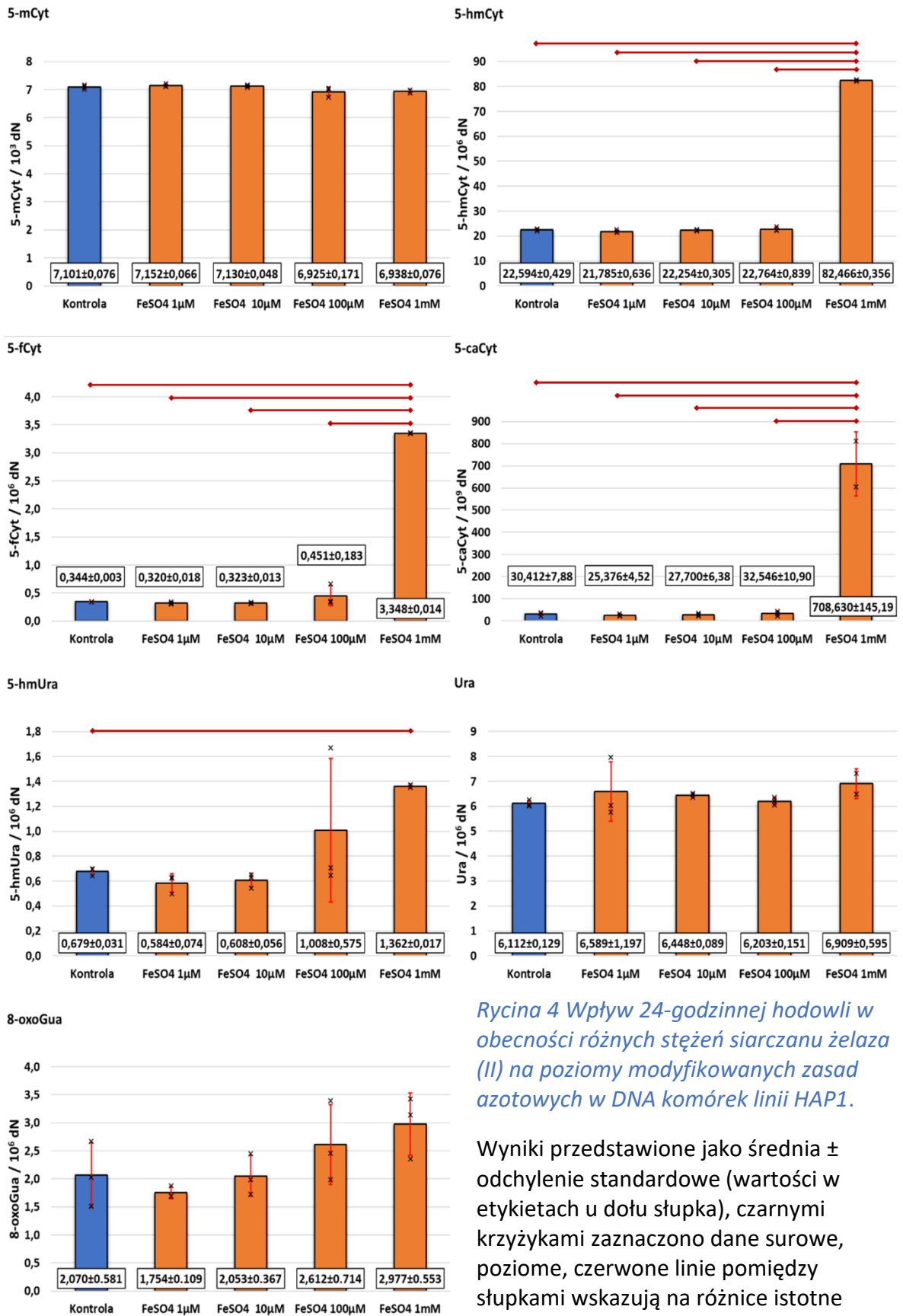
Szczególną uwagę zwraca fakt, iż dopiero zastosowanie bardzo wysokiego stężenia 1mM FeSO_4 w sposób istotny wpłynęło na poziom 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt, w niższych stężeniach nie obserwowano różnic istotnych statystycznie. W podobny sposób (24 godziny hodowli, stężenia FeSO_4 : 1 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$) wykonano eksperyment na linii komórek HCT116, które w tym przypadku hodowano w medium McCoy's 5A. W medium tym, podobnie jak w Iscove's DMEM nie występują związki żelaza. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych, a jego wyniki przedstawiono na Rycinie 5 (zmierzone wartości) i Tabeli 6 (istotności statystyczne wyników). Warto zauważyć, iż na Rycinie 5 nie zamieszczono wyników dla 5-caCyt, gdyż ta pochodna, w tym eksperymencie, była poniżej limitu detekcji zastosowanej metody oznaczeń. Interesujący wydaje się także jednoczesny spadek poziomu 8-oxoGua i wzrost 5-hmCyt i 5-hmUra po ekspozycji komórek na stężenie 100 $\mu\text{mol/l}$ FeSO_4 .

Tabela 5 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1 po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń siarczanu żelaza(II).

5-mCyt	FeSO ₄ 1mM	FeSO ₄ 100µM	FeSO ₄ 10µM	FeSO ₄ 1µM	5-hmCyt	FeSO ₄ 1mM	FeSO ₄ 100µM	FeSO ₄ 10µM	FeSO ₄ 1µM
Kontrola	0,582	0,371	1,000	0,997	Kontrola	< 0,001	1,000	1,000	1,000
FeSO ₄ 1µM	0,288	0,144	1,000		FeSO ₄ 1µM	< 0,001	1,000	1,000	
FeSO ₄ 10µM	0,398	0,220			FeSO ₄ 10µM	< 0,001	1,000		
FeSO ₄ 100µM	1,000				FeSO ₄ 100µM	< 0,001			
5-fCyt	FeSO ₄ 1mM	FeSO ₄ 100µM	FeSO ₄ 10µM	FeSO ₄ 1µM	5-caCyt	FeSO ₄ 1mM	FeSO ₄ 100µM	FeSO ₄ 10µM	FeSO ₄ 1µM
Kontrola	< 0,001	0,979	1,000	1,000	Kontrola	< 0,001	1,000	1,000	1,000
FeSO ₄ 1µM	< 0,001	0,942	1,000		FeSO ₄ 1µM	< 0,001	1,000	1,000	
FeSO ₄ 10µM	< 0,001	0,948			FeSO ₄ 10µM	< 0,001	1,000		
FeSO ₄ 100µM	< 0,001				FeSO ₄ 100µM	< 0,001			
5-hmUra	FeSO ₄ 1mM	FeSO ₄ 100µM	FeSO ₄ 10µM	FeSO ₄ 1µM	Ura	FeSO ₄ 1mM	FeSO ₄ 100µM	FeSO ₄ 10µM	FeSO ₄ 1µM
Kontrola	0,158	0,773	1,000	1,000	Kontrola	0,841	1,000	0,997	0,976
FeSO ₄ 1µM	0,083	0,524	1,000		FeSO ₄ 1µM	0,999	0,993	1,000	
FeSO ₄ 10µM	0,098	0,586			FeSO ₄ 10µM	0,989	1,000		
FeSO ₄ 100µM	0,800				FeSO ₄ 100µM	0,904			
8-oxoGua	FeSO ₄ 1mM	FeSO ₄ 100µM	FeSO ₄ 10µM	FeSO ₄ 1µM					
Kontrola	0,998	0,980	1,000	0,999					
FeSO ₄ 1µM	0,944	0,828	0,999						
FeSO ₄ 10µM	0,997	0,977							
FeSO ₄ 100µM	1,000								

Tabela 6 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HCT116 po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń siarczanu żelaza(II).

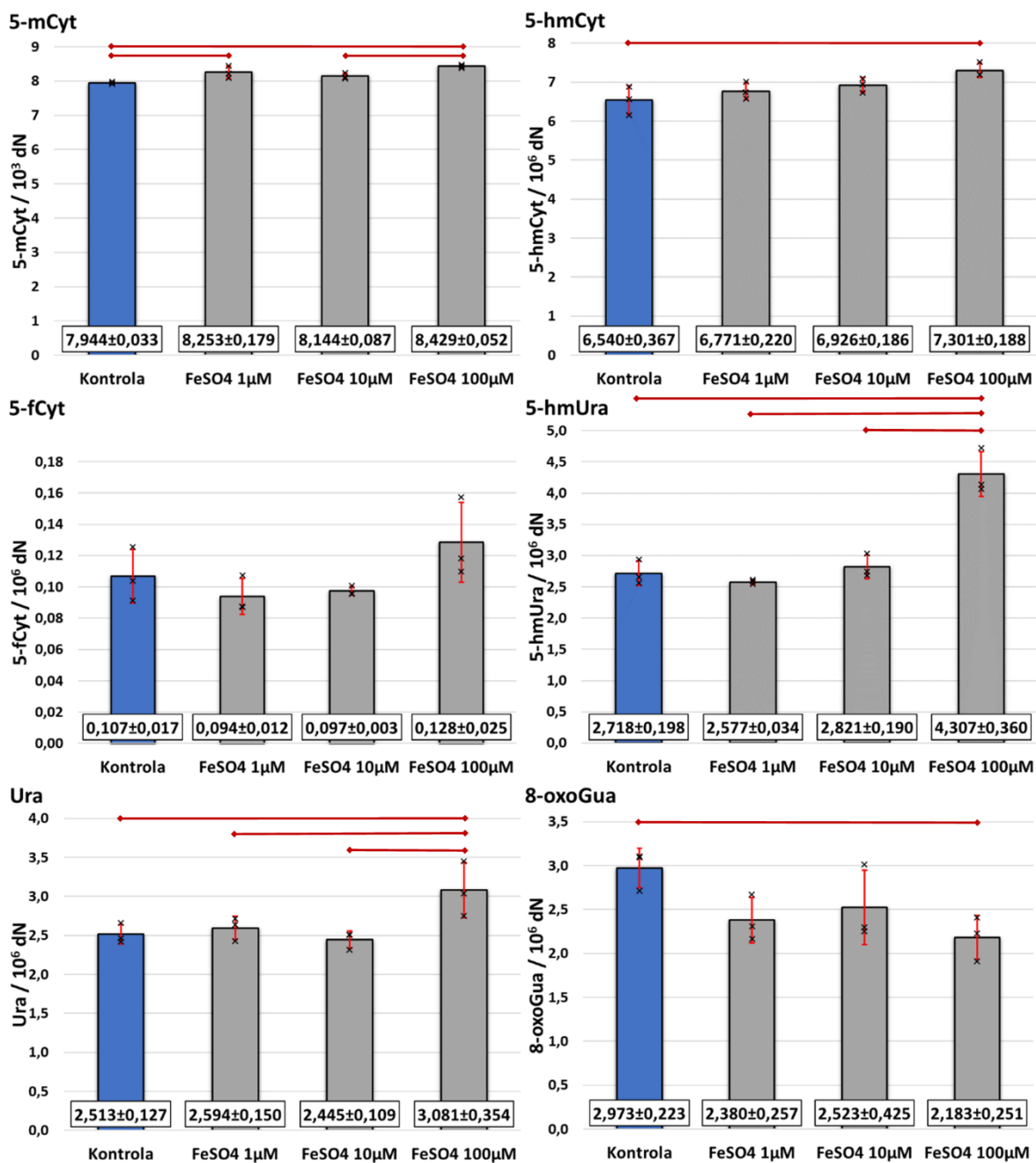
5-mCyt	FeSO ₄ 100µM	FeSO ₄ 10µM	FeSO ₄ 1µM	5-hmCyt	FeSO ₄ 100µM	FeSO ₄ 10µM	FeSO ₄ 1µM
Kontrola	0,002	0,166	0,027	Kontrola	0,025	0,308	0,683
FeSO ₄ 1µM	0,242	0,594		FeSO ₄ 1µM	0,121	0,874	
FeSO ₄ 10µM	0,040			FeSO ₄ 10µM	0,328		
5-fCyt	FeSO ₄ 100µM	FeSO ₄ 10µM	FeSO ₄ 1µM	5-hmUra	FeSO ₄ 100µM	FeSO ₄ 10µM	FeSO ₄ 1µM
Kontrola	0,429	0,893	0,771	Kontrola	< 0,001	0,942	0,869
FeSO ₄ 1µM	0,122	0,993		FeSO ₄ 1µM	< 0,001	0,578	
FeSO ₄ 10µM	0,176			FeSO ₄ 10µM	< 0,001		
Ura	FeSO ₄ 100µM	FeSO ₄ 10µM	FeSO ₄ 1µM	8-oxoGua	FeSO ₄ 100µM	FeSO ₄ 10µM	FeSO ₄ 1µM
Kontrola	0,011	0,702	0,649	Kontrola	0,048	0,325	0,150
FeSO ₄ 1µM	0,022	0,410		FeSO ₄ 1µM	0,850	0,934	
FeSO ₄ 10µM	0,006			FeSO ₄ 10µM	0,538		



Rycina 4 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń siarczanu żelaza (II) na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżkami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

FeSO4 – siarczan żelaza(II)



Rycina 5 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń siarczanu żelaza(II) na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HCT116.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie. 5-caCyt poza limitem detekcji.

FeSO4 – siarczan żelaza(II)

4.1.3 Witamina C

Wiadomo, iż obecność i poziom witaminy C w komórkach może modulować komórkową aktywność wielu dioksygenaz, w tym białek rodziny TET. I choć dokładne mechanizmy stojące za jej stymulującym działaniem nie są do końca poznane, to dane literaturowe wskazują na niejako dwoisty charakter tego związku, który z jednej strony może działać jako silny antyutleniacz, zdolny redukować jony żelaza i tym samym odnawiać pulę jonów Fe(II) niezbędnych dla podtrzymania aktywności enzymatycznej białek TET, jak również pełnić rolę kofaktora, który po przyłączeniu się do białka zwiększa jego aktywność. Dlatego też postanowiono przeprowadzić szereg eksperymentów na wielu liniach komórkowych, w tym na linii HAP1 z funkcjonalnymi nokautami poszczególnych białek rodziny TET, polegających na hodowli w obecności różnych stężeń i postaci witaminy C, których wyniki przedstawiono poniżej. Dla zachowania ciągu logicznego wyводу, wyniki zgrupowano w zbiorcze kategorie, dotyczące poszczególnych aspektów potencjalnego wpływu witaminy C na aktywność enzymatyczną białek rodziny TET.

4.1.3.1 Porównanie wpływu izomerów kwasu askorbinowego na aktywność białek TET

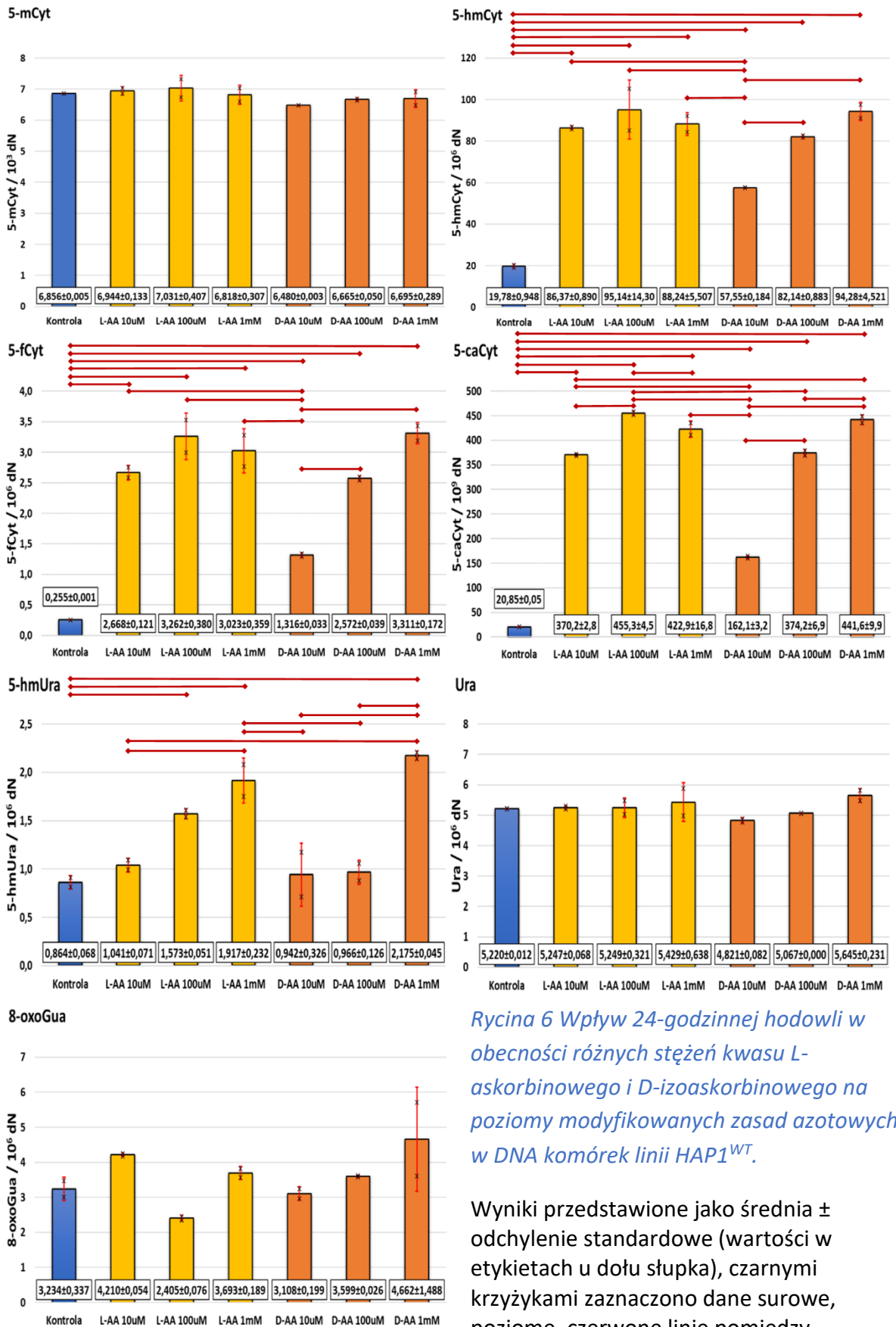
Kwas askorbinowy (witamina C) naturalnie występuje w postaci dwóch izomerów: kwasu L-askorbinowego i D-askorbinowego. Oba związki posiadają podobny potencjał antyoksydacyjny, jednakże teoretycznie jedynie izomer L, z racji swojej konformacji, może łączyć się ze specyficznymi rejonami białek i modulować ich aktywność. Ekspozycja na oba izomery i porównanie ich wpływu na poziom epigenetycznych modyfikacji w DNA potencjalnie, choć jedynie pośrednio, umożliwiłoby określenie dominującego mechanizmu działania witaminy C w danym typie komórek. Dlatego też postanowiono przeprowadzić tego typu eksperymenty, rozszerzając je o komórki z ograniczoną aktywnością białek TET. W tym celu przez 24 godziny hodowano komórki haploidalnej linii HAP1, zarówno typu dzikiego, jak i z pojedynczymi (SKO), funkcjonalnymi nokautami w genach: *TET1*, *TET2*, *TET3*, w obecności 10 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$ i 1 mmol/l kwasu L-askorbinowego lub D-izoaskorbinowego. Do komórek w naczyniach kontrolnych dodano ekwiwalentną objętość czystego rozpuszczalnika. Eksperyment wykonano w dwóch powtórzeniach biologicznych. Wyniki eksperymentu zamieszczono na Rycinie 6 (dla linii HAP1^{WT}), Rycinie 7 (dla linii

HAP1^{TET1KO}), Rycinie 8 (dla linii HAP1^{TET2KO}) i Rycinie 9 (dla linii HAP1^{TET3KO}). Analizy statystyczne wyników zamieszczono w Tabeli 7 (dla linii HAP1^{WT}), Tabeli 8 (dla linii HAP1^{TET1KO}), Tabeli 9 (dla linii HAP1^{TET2KO}) i Tabeli 10 (dla linii HAP1^{TET3KO}).

Warto zwrócić uwagę na fakt, iż w przypadku obu izomerów, niezależnie od statusu mutacji, zaobserwowano znaczący wzrost 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt i 5-hmUra w porównaniu do grupy kontrolnej, mimo charakterystycznych różnic w ich poziomach pomiędzy komórkami z poszczególnymi nokautami. Warto także odnotować słabszy wpływ na aktywność białek TET izomeru D, w porównaniu z izomerem L, w najniższym z zastosowanych stężeń. Szczególnie interesujący wydaje się fakt, iż najniższe poziomy 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt, w porównaniu do komórek HAP1^{WT}, obserwowano w przypadku funkcjonalnego nokautu *TET2*. Nokaut *TET1* miał największy wpływ na obniżenie poziomu 5-hmUra, zaś nokaut *TET3* wywierał najmniejszy wpływ na poziomy 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt, choć i te były nieco niższe niż obserwowane w komórkach *WT*. Co więcej, stymulacja za pomocą witaminy C, jakkolwiek do pewnego stopnia zwiększała mierzone poziomy poszczególnych pochodnych epigenetycznych w badanych liniach, to nie zmieniała ich proporcji względem komórek kontrolnych i nie prowadziła do zmiany pewnego, ustalonego i wynikającego z wprowadzonych nokautów profilu aktywności białek TET. Dodatkowo, dla łatwiejszej interpretacji wyników, postanowiono przedstawić wartości zmierzonych poziomów epigenetycznych modyfikacji w DNA w poszczególnych nokautach na jednej, zbiorczej rycinie (Rycina 10), na której zaznaczono również istotne statystycznie różnice (wieloczynnikowa ANOVA, test post-hoc NIR Fishera) pomiędzy poszczególnymi nokautami, w obrębie danej dawki każdego z użytych związków.

Tabela 7 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{WT} po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego.

5-mCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-hmCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,988	0,972	0,663	1,000	0,981	1,000	Kontrola	<0,001	<0,001	0,005	<0,001	<0,001	<0,001
L-AA 10µM	0,912	0,865	0,468	0,997	1,000		L-AA 10µM	0,832	0,988	0,021	1,000	0,767	
L-AA 100µM	0,752	0,686	0,312	0,954			L-AA 100µM	1,000	0,421	0,005	0,898		
L-AA 1mM	0,997	0,991	0,747				L-AA 1mM	0,940	0,937	0,015			
D-AA 10µM	0,952	0,976					D-AA 10µM	0,006	0,045				
D-AA 100µM	1,000						D-AA 100µM	0,485					
5-fCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-caCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	<0,001	<0,001	0,016	<0,001	<0,001	<0,001	Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
L-AA 10µM	0,156	0,999	0,004	0,656	0,205		L-AA 10µM	0,001	0,998	<0,001	0,004	<0,001	
L-AA 100µM	1,000	0,120	0,001	0,904			L-AA 100µM	0,650	<0,001	<0,001	0,050		
L-AA 1mM	0,812	0,434	0,001				L-AA 1mM	0,357	0,006	<0,001			
D-AA 10µM	0,001	0,007					D-AA 10µM	<0,001	<0,001				
D-AA 100µM	0,091						D-AA 100µM	0,001					
5-hmUra	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	Ura	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,001	0,994	0,999	0,004	0,034	0,918	Kontrola	0,748	0,997	0,792	0,986	1,000	1,000
L-AA 10µM	0,003	0,999	0,995	0,011	0,121		L-AA 10µM	0,794	0,993	0,746	0,993	1,000	
L-AA 100µM	0,072	0,070	0,059	0,446			L-AA 100µM	0,797	0,993	0,742	0,993		
L-AA 1mM	0,705	0,007	0,006				L-AA 1mM	0,983	0,849	0,429			
D-AA 10µM	0,002	1,000					D-AA 10µM	0,184	0,969				
D-AA 100µM	0,002						D-AA 100µM	0,478					
8-oxoGua	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM							
Kontrola	0,307	0,994	1,000	0,980	0,782	0,656							
L-AA 10µM	0,981	0,927	0,545	0,965	0,144								
L-AA 100µM	0,058	0,469	0,875	0,398									
L-AA 1mM	0,662	1,000	0,940										
D-AA 10µM	0,240	0,972											
D-AA 100µM	0,579												



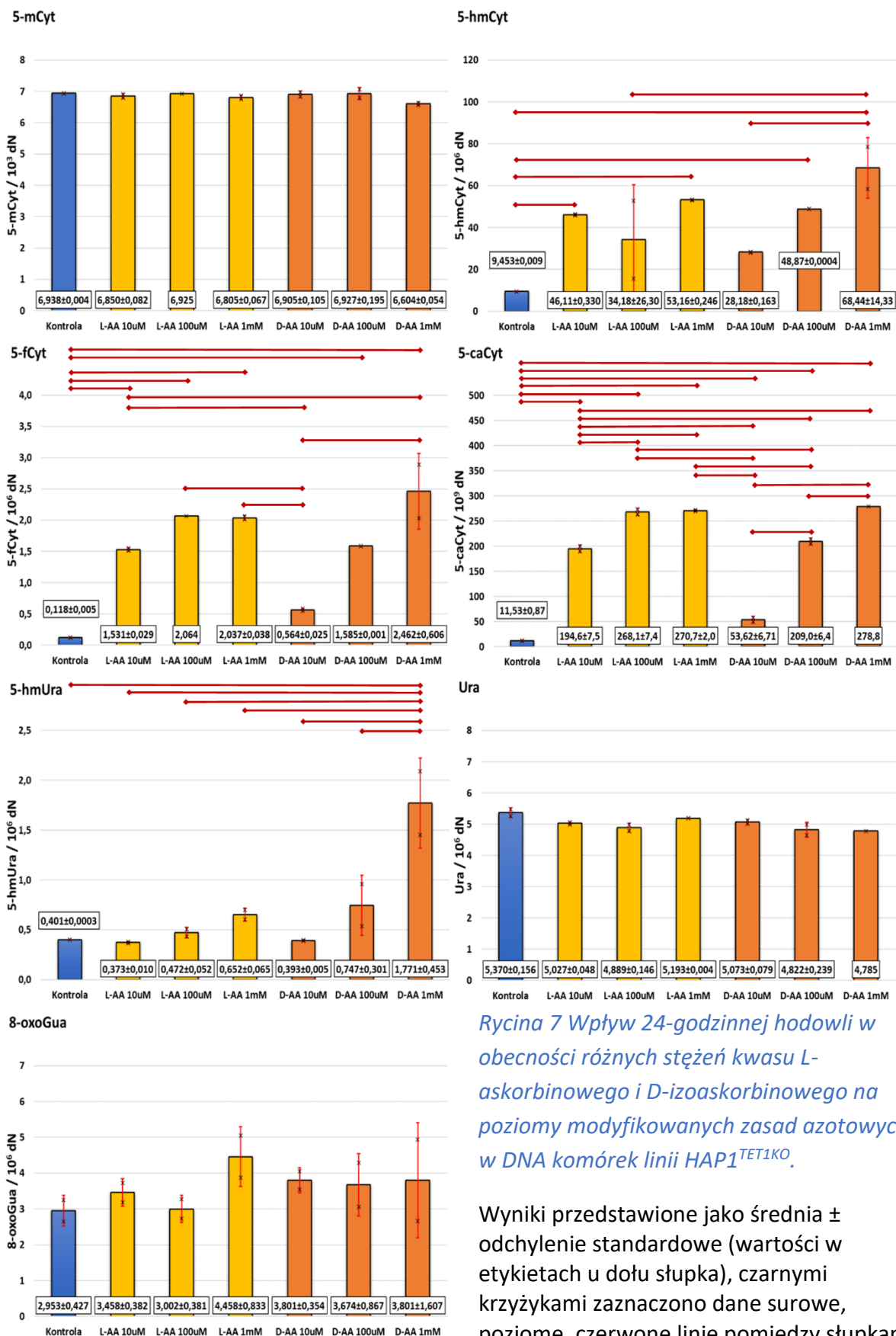
Rycina 6 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{WT}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

L-AA – kwas L-askorbinowy;
D-AA – kwas D-izoaskorbinowy;

Tabela 8 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET1KO} po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego.

5-mCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-hmCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,132	1,000	1,000	0,833	1,000	0,969	Kontrola	0,001	0,010	0,142	0,006	0,065	0,014
L-AA 10µM	0,331	0,983	0,997	0,999	0,995		L-AA 10µM	0,089	0,814	0,157	0,553	0,327	
L-AA 100µM	0,283	1,000	1,000	0,948			L-AA 100µM	0,019	0,236	0,613	0,138		
L-AA 1mM	0,513	0,874	0,943				L-AA 1mM	0,219	0,716	0,063			
D-AA 10µM	0,188	1,000					D-AA 10µM	0,009	0,110				
D-AA 100µM	0,148						D-AA 100µM	0,127					
5-fCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-caCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,001	0,010	0,592	0,003	0,007	0,012	Kontrola	<0,001	<0,001	0,003	<0,001	<0,001	<0,001
L-AA 10µM	0,078	1,000	0,067	0,477	0,613		L-AA 10µM	<0,001	0,304	<0,001	<0,001	<0,001	
L-AA 100µM	0,829	0,702	0,024	1,000			L-AA 100µM	0,736	0,001	<0,001	0,999		
L-AA 1mM	0,635	0,579	0,010				L-AA 1mM	0,893	0,001	<0,001			
D-AA 10µM	0,003	0,053					D-AA 10µM	<0,001	<0,001				
D-AA 100µM	0,098						D-AA 100µM	0,001					
5-hmUra	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	Ura	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,003	0,656	1,000	0,872	1,000	1,000	Kontrola	0,101	0,058	0,415	0,834	0,098	0,295
L-AA 10µM	0,003	0,587	1,000	0,816	0,998		L-AA 10µM	0,762	0,737	1,000	0,864	0,932	
L-AA 100µM	0,005	0,824	1,000	0,967			L-AA 100µM	0,993	0,998	0,810	0,393		
L-AA 1mM	0,011	0,999	0,856				L-AA 1mM	0,316	0,235	0,962			
D-AA 10µM	0,003	0,635					D-AA 10µM	0,627	0,571				
D-AA 100µM	0,017						D-AA 100µM	1,000					
8-oxoGua	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM							
Kontrola	0,927	0,964	0,927	0,558	1,000	0,994							
L-AA 10µM	0,999	1,000	0,999	0,863	0,996								
L-AA 100µM	0,943	0,974	0,943	0,589									
L-AA 1mM	0,976	0,948	0,976										
D-AA 10µM	1,000	1,000											
D-AA 100µM	1,000												

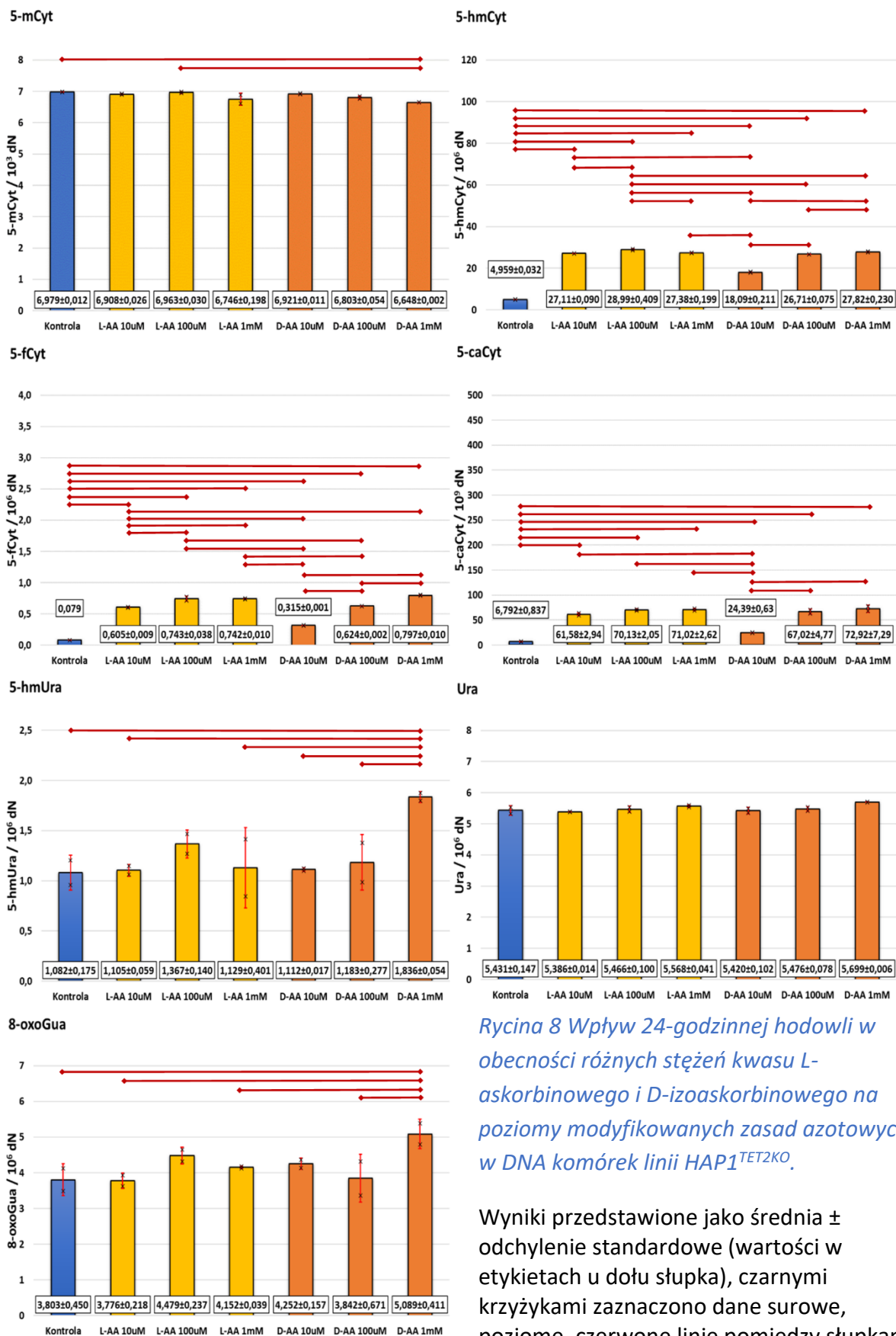


Rycina 7 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET1KO}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.
L-AA – kwas L-askorbinowy;
D-AA – kwas D-izoaskorbinowy;

Tabela 9 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET2KO} po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego.

5-mCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-hmCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,039	0,389	0,986	0,169	1,000	0,963	Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
L-AA 10µM	0,111	0,822	1,000	0,461	0,989		L-AA 10µM	0,107	0,564	<0,001	0,832	0,001	
L-AA 100µM	0,049	0,477	0,997	0,214			L-AA 100µM	0,009	0,000	<0,001	0,002		
L-AA 1mM	0,858	0,986	0,390				L-AA 1mM	0,475	0,133	<0,001			
D-AA 10µM	0,092	0,746					D-AA 10µM	<0,001	<0,001				
D-AA 100µM	0,501						D-AA 100µM	0,013					
5-fCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-caCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	Kontrola	<0,001	<0,001	0,021	<0,001	<0,001	<0,001
L-AA 10µM	<0,001	0,866	<0,001	0,001	0,001		L-AA 10µM	0,149	0,758	<0,001	0,272	0,356	
L-AA 100µM	0,085	0,001	<0,001	1,000			L-AA 100µM	0,983	0,972	<0,001	1,000		
L-AA 1mM	0,079	0,001	<0,001				L-AA 1mM	0,998	0,917	<0,001			
D-AA 10µM	0,000	<0,001					D-AA 10µM	<0,001	<0,001				
D-AA 100µM	<0,001						D-AA 100µM	0,695					
5-hmUra	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	Ura	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,008	0,636	0,888	0,824	0,207	0,914	Kontrola	0,129	0,997	1,000	0,677	0,999	0,997
L-AA 10µM	0,009	0,713	0,974	0,908	0,242		L-AA 10µM	0,069	0,921	0,999	0,418	0,954	
L-AA 100µM	0,056	0,400	0,253	0,284			L-AA 100µM	0,210	1,000	0,997	0,870		
L-AA 1mM	0,011	0,800	0,934				L-AA 1mM	0,715	0,914	0,611			
D-AA 10µM	0,010	0,737					D-AA 10µM	0,111	0,991				
D-AA 100µM	0,015						D-AA 100µM	0,244					
8-oxoGua	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM							
Kontrola	0,088	1,000	0,868	0,952	0,568	1,000							
L-AA 10µM	0,081	1,000	0,838	0,933	0,530								
L-AA 100µM	0,660	0,621	0,994	0,964									
L-AA 1mM	0,271	0,971	1,000										
D-AA 10µM	0,366	0,906											
D-AA 100µM	0,100												



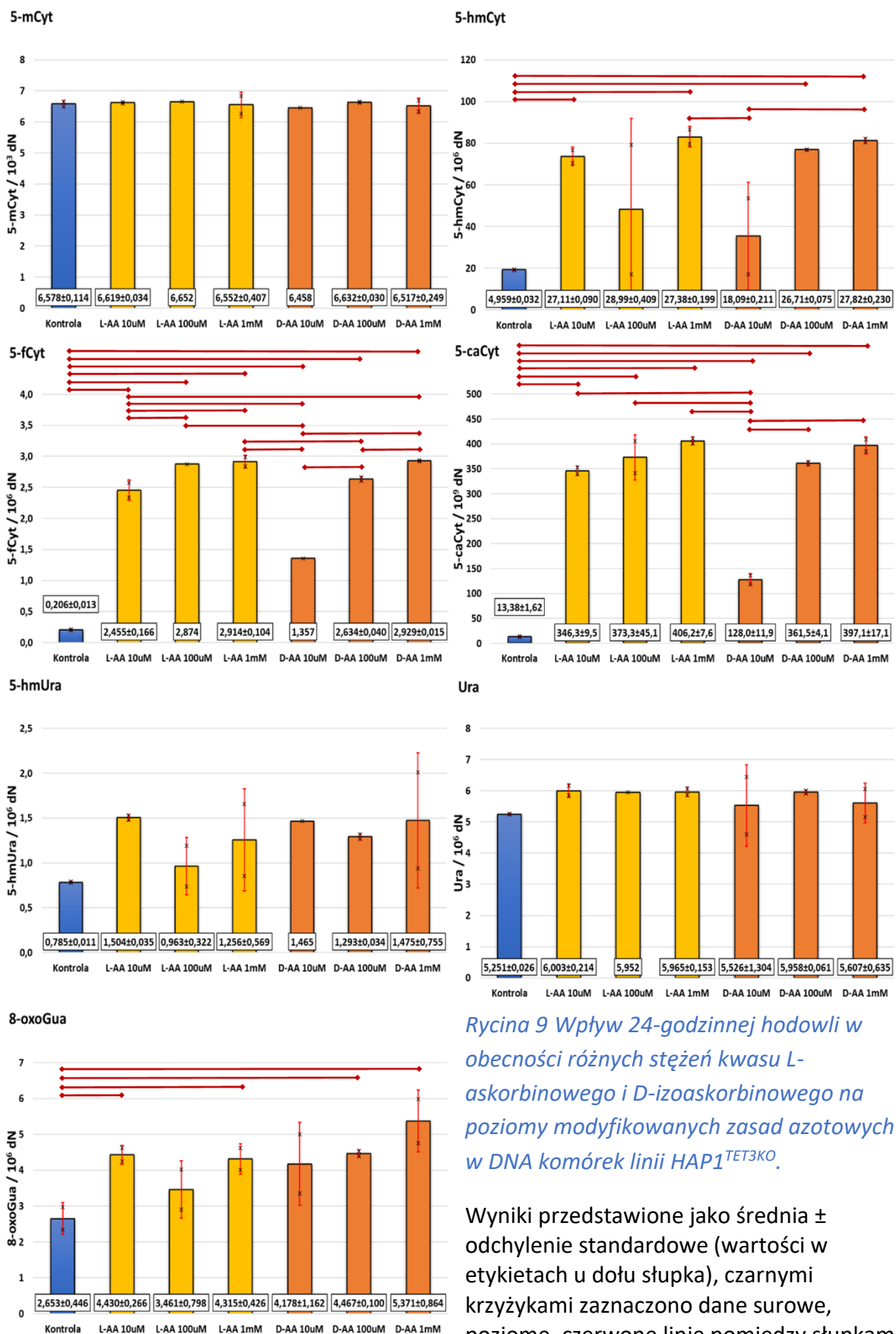
Rycina 8 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET2KO}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżkami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

L-AA – kwas L-askorbinowy;
D-AA – kwas D-izoaskorbinowy;

Tabela 10 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET3KO} po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego.

5-mCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-hmCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	1,000	1,000	0,999	1,000	1,000	1,000	Kontrola	0,015	0,021	0,435	0,013	0,180	0,027
L-AA 10µM	0,998	1,000	0,994	1,000	1,000		L-AA 10µM	0,704	0,869	0,090	0,640	0,232	
L-AA 100µM	0,998	1,000	0,992	1,000			L-AA 100µM	0,132	0,182	0,530	0,115		
L-AA 1mM	1,000	1,000	1,000				L-AA 1mM	0,928	0,760	0,044			
D-AA 10µM	1,000	0,991					D-AA 10µM	0,050	0,070				
D-AA 100µM	0,997						D-AA 100µM	0,829					
5-fCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-caCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	Kontrola	<0,001	<0,001	0,006	<0,001	<0,001	<0,001
L-AA 10µM	0,026	0,511	0,002	0,030	0,091		L-AA 10µM	0,249	0,979	<0,001	0,143	0,792	
L-AA 100µM	0,998	0,429	0,001	1,000			L-AA 100µM	0,865	0,994	<0,001	0,640		
L-AA 1mM	1,000	0,175	<0,001				L-AA 1mM	0,999	0,356	<0,001			
D-AA 10µM	0,000	0,001					D-AA 10µM	<0,001	<0,001				
D-AA 100µM	0,149						D-AA 100µM	0,569					
5-hmUra	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	Ura	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,645	0,855	0,805	0,889	0,999	0,609	Kontrola	0,995	0,882	0,999	0,878	0,949	0,853
L-AA 10µM	1,000	0,997	1,000	0,994	0,821		L-AA 10µM	0,991	1,000	0,977	1,000	1,000	
L-AA 100µM	0,852	0,975	0,936	0,986			L-AA 100µM	0,999	1,000	0,995	1,000		
L-AA 1mM	0,997	1,000	0,999				L-AA 1mM	0,995	1,000	0,985			
D-AA 10µM	1,000	1,000					D-AA 10µM	1,000	0,986				
D-AA 100µM	0,999						D-AA 100µM	0,995					
8-oxoGua	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM							
Kontrola	0,005	0,031	0,059	0,043	0,270	0,034							
L-AA 10µM	0,207	0,958	0,719	0,869	0,195								
L-AA 100µM	0,026	0,180	0,324	0,247									
L-AA 1mM	0,162	0,828	0,845										
D-AA 10µM	0,121	0,681											
D-AA 100µM	0,223												

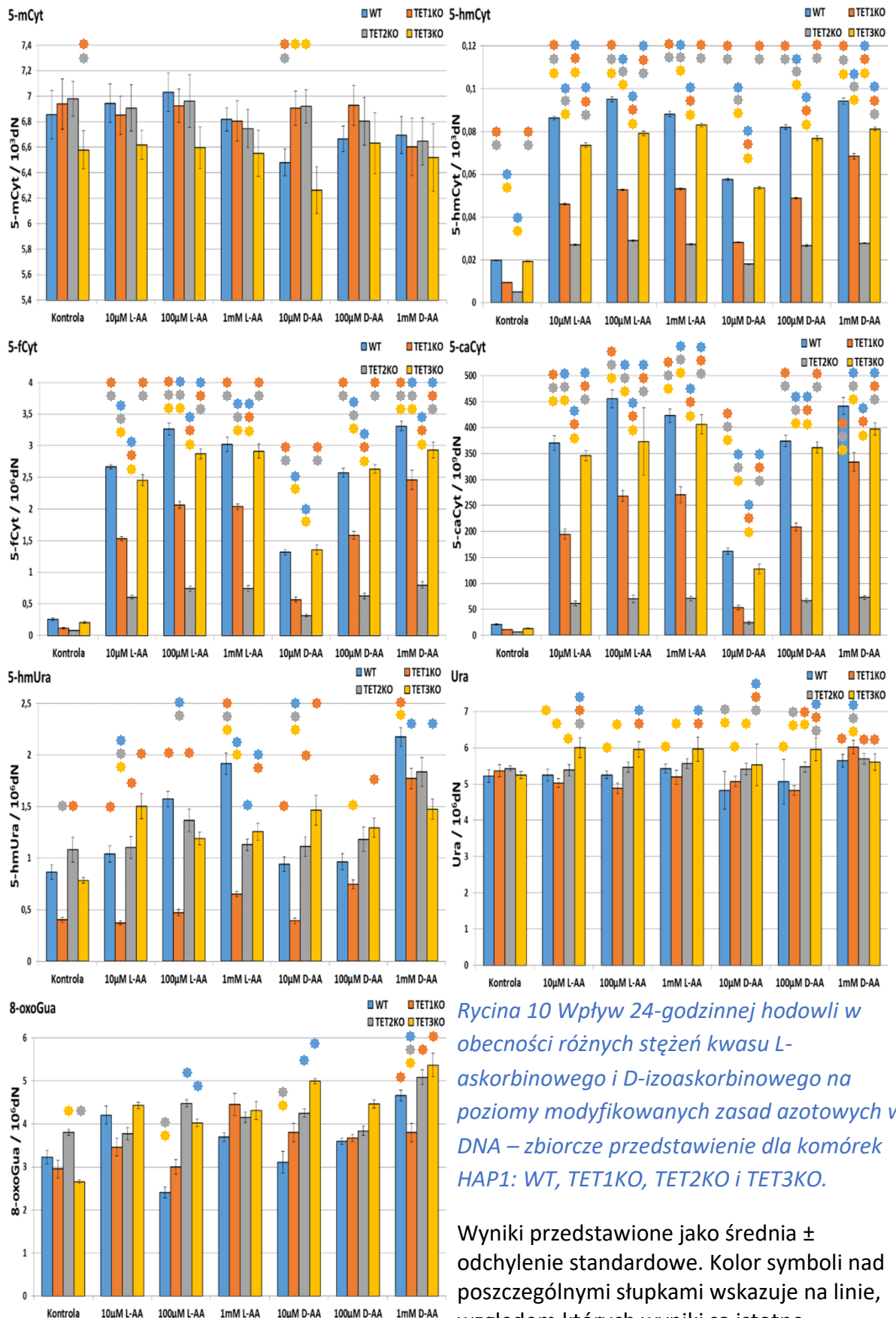


Rycina 9 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET3KO}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

L-AA – kwas L-askorbinowy

D-AA – kwas D-izoaskorbinowy;



Rycina 10 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA – zbiorcze przedstawienie dla komórek HAP1: WT, TET1KO, TET2KO i TET3KO.

Wyniki przedstawione jako średnia \pm odchylenie standardowe. Kolor symboli nad poszczególnymi słupkami wskazuje na linie, względem których wyniki są istotne statystycznie w obrębie poszczególnych dawek badanych substancji (wieloczynnikowa ANOVA, test post-hoc NIR Fishera)

L-AA – kwas L-askorbinowy;

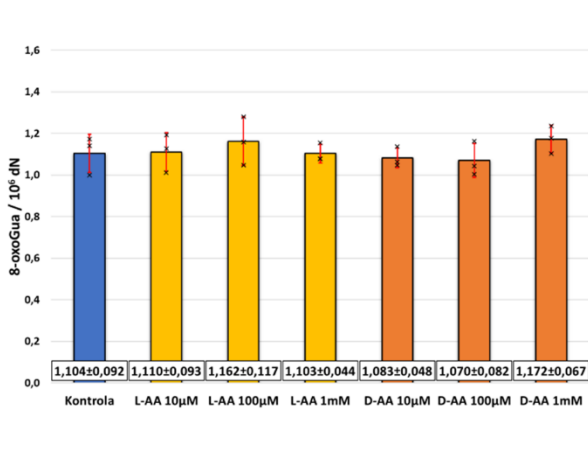
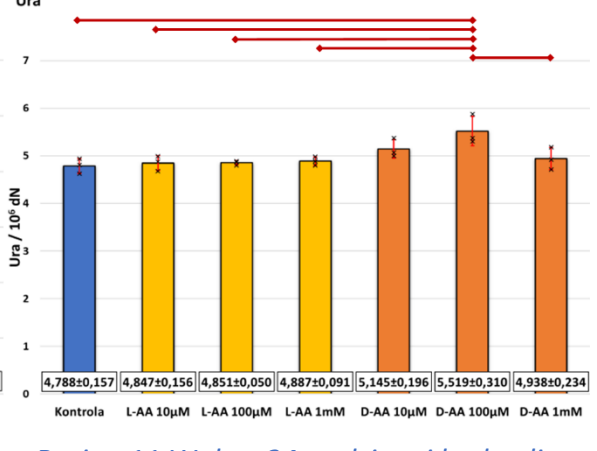
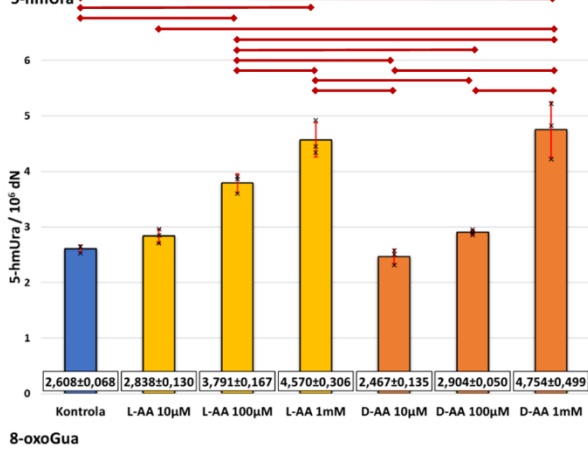
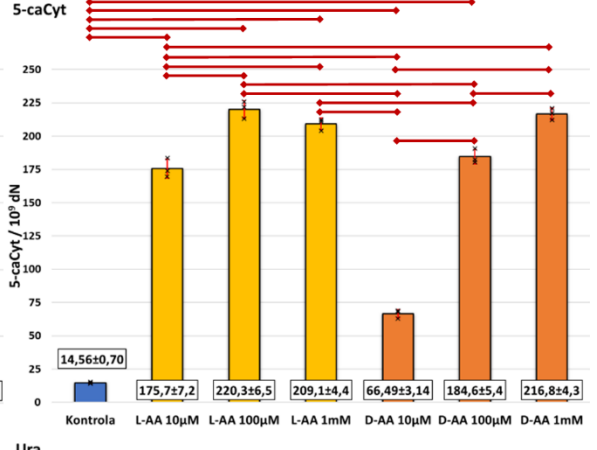
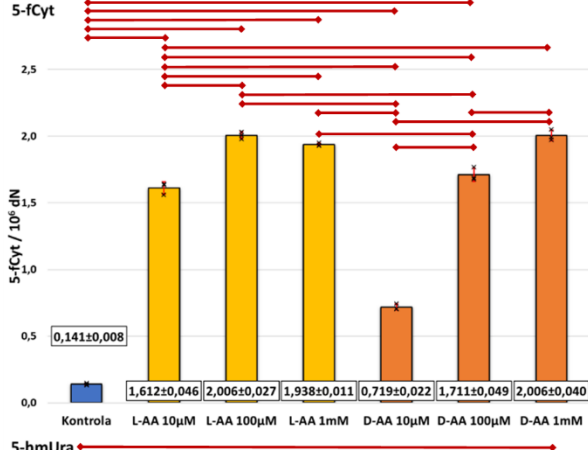
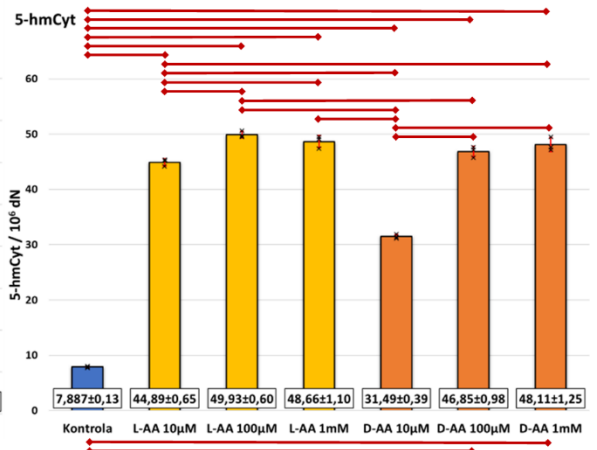
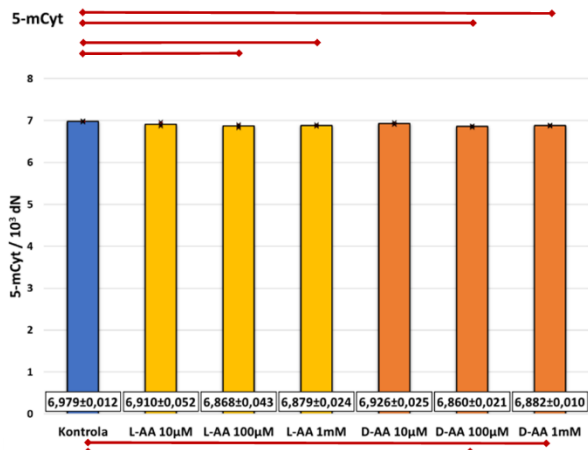
D-AA – kwas D-izoaskorbinowy;

Tożsamy eksperyment wykonano również na komórkach linii HAP1 z podwójnymi (DKO), funkcjonalnymi nokautami: *TET1KO/TET2KO*, *TET1KO/TET3KO* i *TET2KO/TET3KO* – jest to model komórkowy, w którym tylko jedno białko z rodziny TET pozostaje aktywne w komórce, co pozwala na oszacowanie wpływu poszczególnych izomerów kwasu askorbinowego na aktywność enzymatyczną każdego z jej członków. Eksperyment powtórzono również na parentalnej linii HAP1^{WT}. Wyniki eksperymentu przedstawiono na Rycinie 11 (dla linii HAP1^{WT}), Rycinie 12 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET2KO}), Rycinie 13 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET3KO}) i Rycinie 14 (dla linii HAP1^{TET2KO/TET3KO}), natomiast wyniki analiz statystycznych uzyskanych wyników przedstawiono w Tabeli 11 (dla linii HAP1^{WT}), Tabeli 12 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET2KO}), Tabeli 13 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET3KO}) i Tabeli 14 (dla linii HAP1^{TET2KO/TET3KO}).

Warto zauważyć, iż podobnie jak to miało miejsce w przypadku pojedynczych nokautów, suplementacja komórek witaminą C, niezależnie od rodzaju izomeru, powodowała wzrost poziomów 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt i 5-hmUra, a jednocześnie nie zmieniała proporcji tych modyfikacji względem poziomów obserwowanych w komórkach HAP1^{WT}, a co za tym idzie nie wpływała na pewien profil aktywności białek TET wynikający z wprowadzonych nokautów. Jednocześnie izomer D wydaje się znacząco słabiej wpływać na aktywność białek TET w najniższym z zastosowanych stężeń. Ponadto, na zbadany poziom 5-hmCyt największy wpływ miała łączna utrata aktywności zarówno TET1, jak i TET2, zaś na poziomy 5-fCyt i 5-caCyt najbardziej wpłynęła łączna utrata aktywności TET2 i TET3. Co ciekawe w przypadku 5-hmUra, w odróżnieniu od eksperymentów na pojedynczych nokautach, nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy badanymi, podwójnymi nokautami. Zbiorcze wyniki zmierzonych poziomów epigenetycznych modyfikacji dla wszystkich podwójnych nokautów zestawiono na Rycinie 15, na której zaznaczono również istotne statystycznie różnice (wieloczynnikowa ANOVA, test post-hoc NIR Fishera) pomiędzy poszczególnymi nokautami, w obrębie danej dawki każdego z użytych związków.

Tabela 11 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{WT} po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego - eksperyment powtórzony.

5-mCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-hmCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,020	0,004	0,378	0,017	0,007	0,149	Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
L-AA 10µM	0,904	0,437	0,994	0,863	0,617		L-AA 10µM	0,004	0,114	<0,001	0,001	<0,001	
L-AA 100µM	0,997	1,000	0,289	0,999			L-AA 100µM	0,164	0,006	<0,001	0,516		
L-AA 1mM	1,000	0,983	0,523				L-AA 1mM	0,978	0,166	<0,001			
D-AA 10µM	0,585	0,179					D-AA 10µM	<0,001	0,000				
D-AA 100µM	0,968						D-AA 100µM	0,520					
5-fCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-caCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
L-AA 10µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		L-AA 10µM	<0,001	0,358	<0,001	<0,001	<0,001	
L-AA 100µM	1,000	<0,001	<0,001	0,205			L-AA 100µM	0,974	<0,001	<0,001	0,156		
L-AA 1mM	0,208	<0,001	<0,001				L-AA 1mM	0,511	0,001	<0,001			
D-AA 10µM	<0,001	<0,001					D-AA 10µM	<0,001	<0,001				
D-AA 100µM	<0,001						D-AA 100µM	<0,001					
5-hmUra	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	Ura	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	<0,001	0,746	0,989	<0,001	0,001	0,899	Kontrola	0,951	0,005	0,301	0,994	1,000	1,000
L-AA 10µM	<0,001	1,000	0,527	<0,001	0,004		L-AA 10µM	0,996	0,009	0,492	1,000	1,000	
L-AA 100µM	0,004	0,007	<0,001	0,020			L-AA 100µM	0,997	0,009	0,507	1,000		
L-AA 1mM	0,961	<0,001	<0,001				L-AA 1mM	1,000	0,014	0,640			
D-AA 10µM	<0,001	0,352					D-AA 10µM	0,822	0,256				
D-AA 100µM	<0,001						D-AA 100µM	0,026					
8-oxoGua	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM							
Kontrola	0,941	0,998	1,000	1,000	0,972	1,000							
L-AA 10µM	0,961	0,996	0,999	1,000	0,984								
L-AA 100µM	1,000	0,802	0,885	0,969									
L-AA 1mM	0,936	0,998	1,000										
D-AA 10µM	0,818	1,000											
D-AA 100µM	0,721												



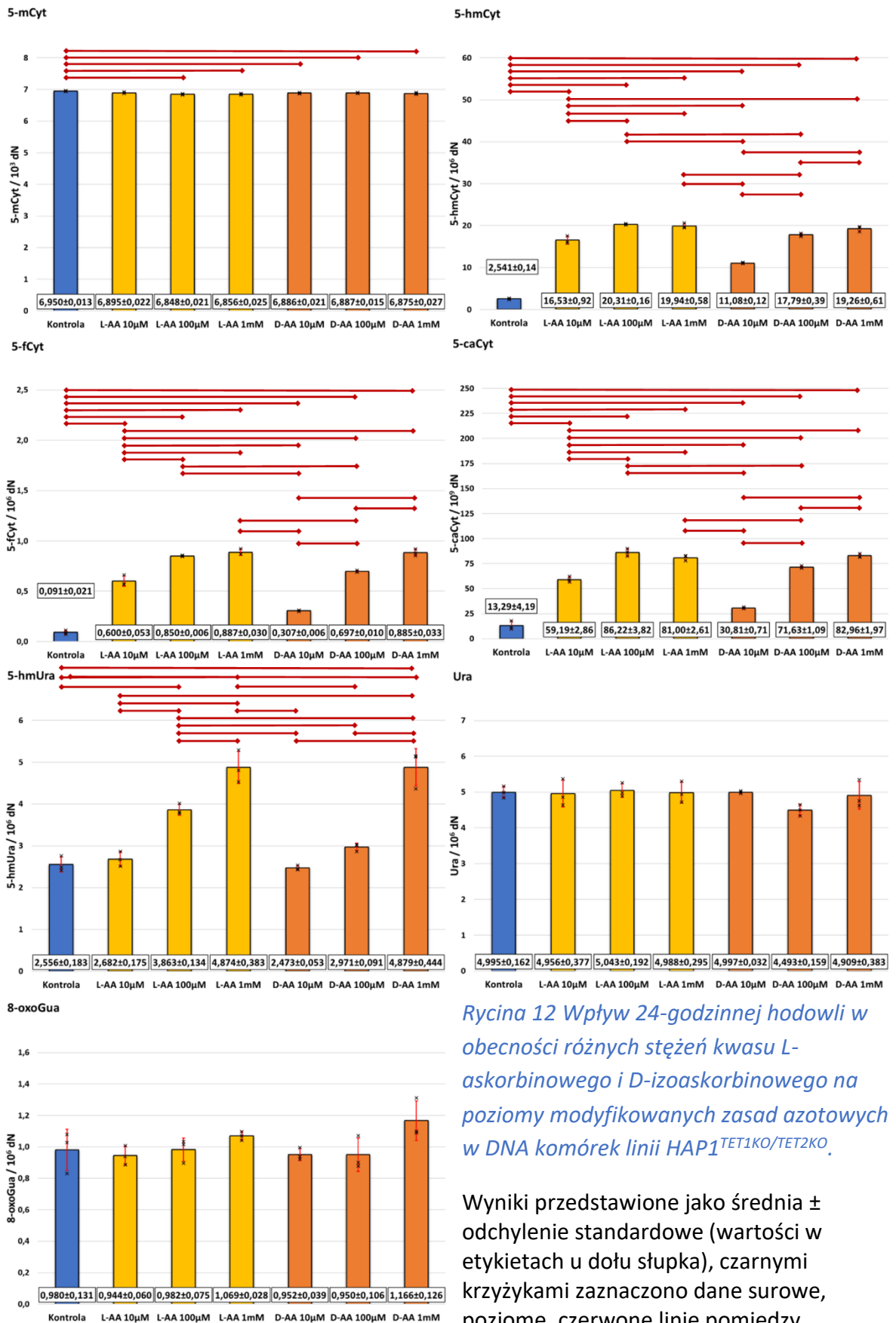
Rycina 11 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{WT} – eksperyment powtórzony.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

L-AA – kwas L-askorbinowy;
D-AA – kwas D-izoaskorbinowy;

Tabela 12 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET1KO/TET2KO} po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego.

5-mCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-hmCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,010	0,036	0,033	0,002	0,001	0,083	Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
L-AA 10µM	0,882	0,999	0,998	0,325	0,150		L-AA 10µM	<0,001	0,089	<0,001	<0,001	<0,001	
L-AA 100µM	0,700	0,305	0,330	0,998			L-AA 100µM	0,208	0,001	<0,001	0,962		
L-AA 1mM	0,930	0,571	0,604				L-AA 1mM	0,660	0,002	<0,001			
D-AA 10µM	0,992	1,000					D-AA 10µM	<0,001	<0,001				
D-AA 100µM	0,988						D-AA 100µM	0,036					
5-fCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-caCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
L-AA 10µM	<0,001	0,011	<0,001	<0,001	<0,001		L-AA 10µM	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
L-AA 100µM	0,724	<0,001	<0,001	0,668			L-AA 100µM	0,765	<0,001	<0,001	0,295		
L-AA 1mM	1,000	<0,001	<0,001				L-AA 1mM	0,970	0,013	<0,001			
D-AA 10µM	<0,001	<0,001					D-AA 10µM	<0,001	<0,001				
D-AA 100µM	<0,001						D-AA 100µM	0,003					
5-hmUra	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	Ura	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	<0,001	0,437	1,000	<0,001	<0,001	0,995	Kontrola	1,000	0,273	1,000	1,000	1,000	1,000
L-AA 10µM	<0,001	0,786	0,939	<0,001	0,001		L-AA 10µM	1,000	0,354	1,000	1,000	0,999	
L-AA 100µM	0,003	0,009	<0,001	0,003			L-AA 100µM	0,994	0,194	1,000	1,000		
L-AA 1mM	1,000	<0,001	<0,001				L-AA 1mM	1,000	0,287	1,000			
D-AA 10µM	<0,001	0,252					D-AA 10µM	0,999	0,269				
D-AA 100µM	<0,001						D-AA 100µM	0,468					
8-oxoGua	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM							
Kontrola	0,210	1,000	1,000	0,870	1,000	0,999							
L-AA 10µM	0,095	1,000	1,000	0,615	0,998								
L-AA 100µM	0,220	0,999	0,999	0,883									
L-AA 1mM	0,827	0,661	0,675										
D-AA 10µM	0,113	1,000											
D-AA 100µM	0,108												



Rycina 12 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET1KO/TET2KO}.

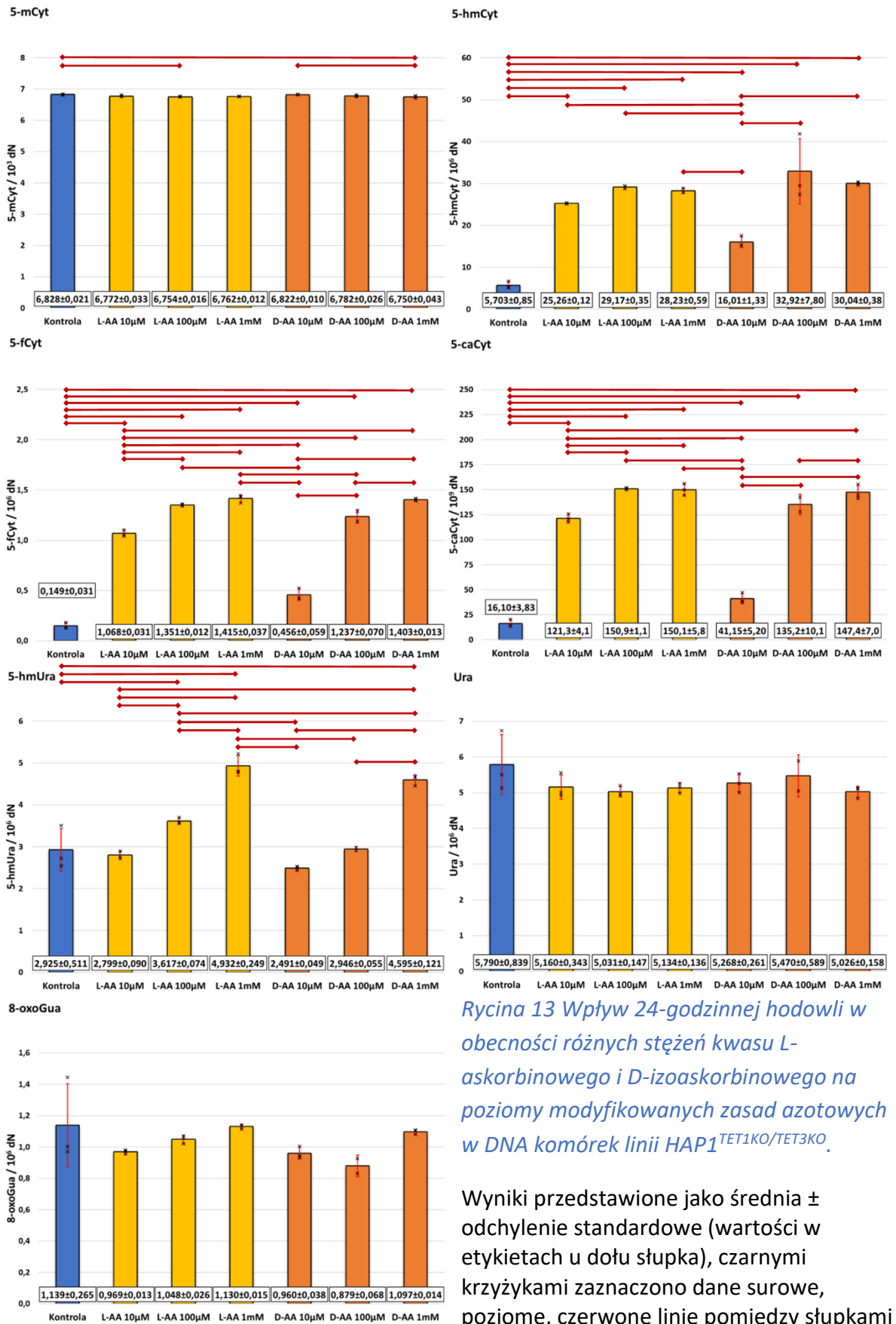
Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

L-AA – kwas L-askorbinowy;

D-AA – Kwas D-izoaskorbinowy;

Tabela 13 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET1KO/TET3KO} po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego.

5-mCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-hmCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,029	0,359	1,000	0,084	0,042	0,184	Kontrola	<0,001	<0,001	0,013	<0,001	<0,001	<0,001
L-AA 10µM	0,927	0,999	0,282	0,999	0,972		L-AA 10µM	0,492	0,087	0,027	0,883	0,696	
L-AA 100µM	1,000	0,830	0,069	1,000			L-AA 100µM	1,000	0,730	0,002	1,000		
L-AA 1mM	0,996	0,961	0,135				L-AA 1mM	0,988	0,510	0,003			
D-AA 10µM	0,048	0,508					D-AA 10µM	0,001	<0,001				
D-AA 100µM	0,725						D-AA 100µM	0,895					
5-fCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-caCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	Kontrola	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001
L-AA 10µM	<0,001	0,005	<0,001	<0,001	<0,001		L-AA 10µM	0,001	0,151	<0,001	<0,001	<0,001	
L-AA 100µM	0,658	0,068	<0,001	0,433			L-AA 100µM	0,981	0,082	<0,001	1,000		
L-AA 1mM	1,000	0,003	<0,001				L-AA 1mM	0,995	0,109	<0,001			
D-AA 10µM	<0,001	<0,001					D-AA 10µM	<0,001	<0,001				
D-AA 100µM	0,005						D-AA 100µM	0,254					
5-hmUra	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	Ura	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	<0,001	1,000	0,322	<0,001	0,037	0,993	Kontrola	0,337	0,975	0,722	0,498	0,343	0,541
L-AA 10µM	<0,001	0,991	0,677	<0,001	0,012		L-AA 10µM	1,000	0,979	1,000	1,000	1,000	
L-AA 100µM	0,003	0,085	0,001	<0,001			L-AA 100µM	1,000	0,900	0,990	1,000		
L-AA 1mM	0,590	<0,001	<0,001				L-AA 1mM	1,000	0,969	1,000			
D-AA 10µM	<0,001	0,389					D-AA 10µM	0,990	0,998				
D-AA 100µM	<0,001						D-AA 100µM	0,895					
8-oxoGua	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM							
Kontrola	0,999	0,189	0,441	1,000	0,937	0,494							
L-AA 10µM	0,763	0,964	1,000	0,551	0,965								
L-AA 100µM	0,997	0,615	0,945	0,961									
L-AA 1mM	1,000	0,217	0,496										
D-AA 10µM	0,710	0,977											
D-AA 100µM	0,349												



Rycina 13 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET1KO/TET3KO}.

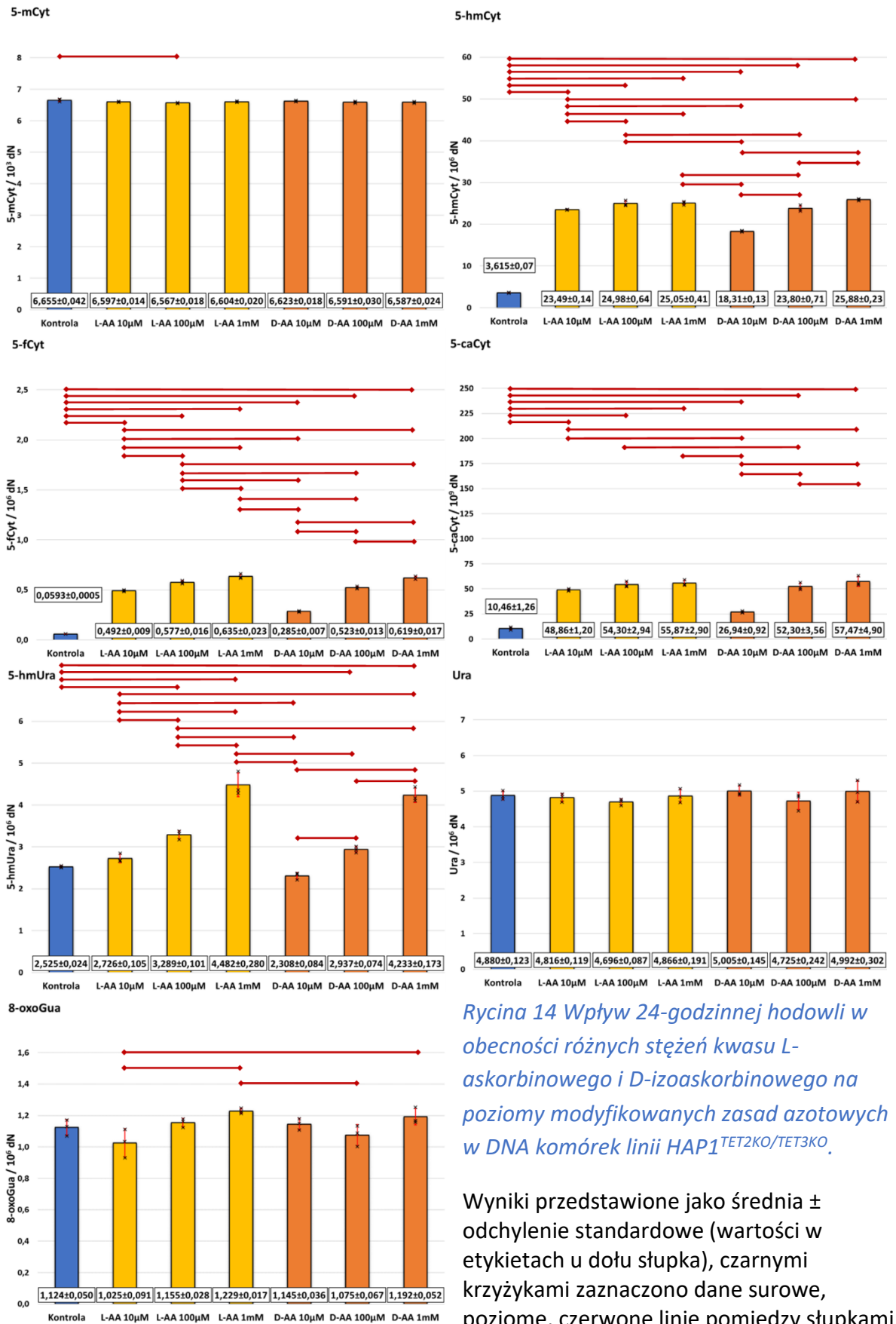
Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżkami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

L-AA – kwas L-askorbinowy;

D-AA – kwas D-izoaskorbinowy;

Tabela 14 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET2KO/TET3KO} po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego.

5-mCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-hmCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,065	0,091	0,732	0,259	0,011	0,154	Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
L-AA 10µM	0,998	1,000	0,866	1,000	0,751		L-AA 10µM	<0,001	0,963	<0,001	0,005	0,008	
L-AA 100µM	0,952	0,896	0,162	0,557			L-AA 100µM	0,165	0,041	<0,001	1,000		
L-AA 1mM	0,975	0,993	0,966				L-AA 1mM	0,233	0,027	<0,001			
D-AA 10µM	0,597	0,708					D-AA 10µM	<0,001	<0,001				
D-AA 100µM	1,000						D-AA 100µM	<0,001					
5-fCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-caCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
L-AA 10µM	<0,001	0,151	<0,001	<0,001	<0,001		L-AA 10µM	0,031	0,756	<0,001	0,104	0,299	
L-AA 100µM	0,031	0,005	<0,001	0,002			L-AA 100µM	0,817	0,974	<0,001	0,992		
L-AA 1mM	0,769	<0,001	<0,001				L-AA 1mM	0,992	0,730	<0,001			
D-AA 10µM	<0,001	<0,001					D-AA 10µM	<0,001	<0,001				
D-AA 100µM	<0,001						D-AA 100µM	0,352					
5-hmUra	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	Ura	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	<0,001	0,041	0,533	<0,001	<0,001	0,617	Kontrola	0,988	0,942	0,979	1,000	0,880	0,999
L-AA 10µM	<0,001	0,560	0,037	<0,001	0,004		L-AA 10µM	0,900	0,996	0,867	1,000	0,983	
L-AA 100µM	<0,001	0,100	<0,001	<0,001			L-AA 100µM	0,488	1,000	0,440	0,913		
L-AA 1mM	0,385	<0,001	<0,001				L-AA 1mM	0,978	0,962	0,964			
D-AA 10µM	<0,001	0,002					D-AA 10µM	1,000	0,547				
D-AA 100µM	<0,001						D-AA 100µM	0,598					
8-oxoGua	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM							
Kontrola	0,713	0,913	0,999	0,276	0,991	0,333							
L-AA 10µM	0,025	0,908	0,164	0,006	0,115								
L-AA 100µM	0,974	0,564	1,000	0,636									
L-AA 1mM	0,978	0,044	0,510										
D-AA 10µM	0,926	0,690											
D-AA 100µM	0,179												

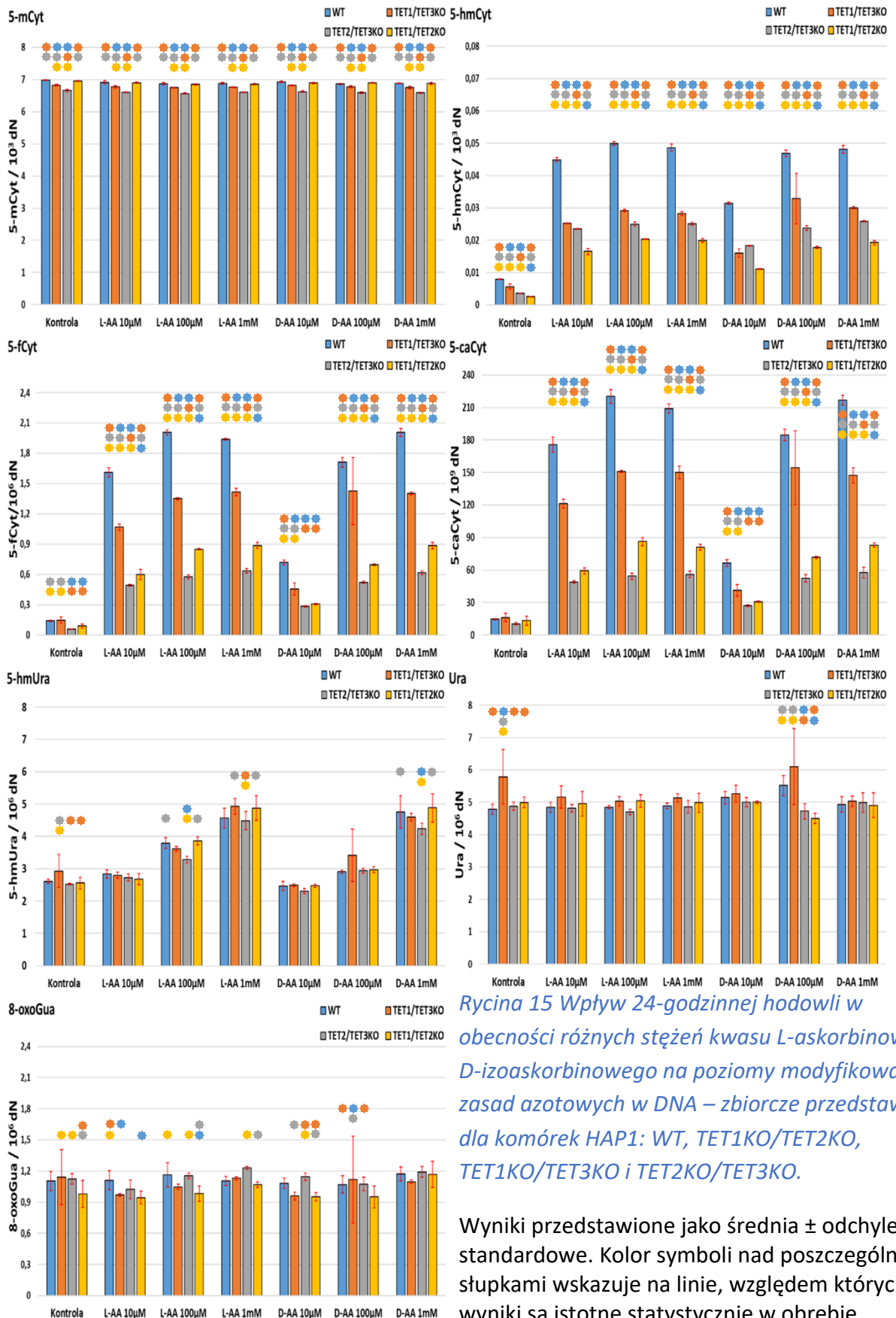


Rycina 14 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET2KO/TET3KO}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

L-AA – kwas L-askorbinowy;

D-AA – kwas D-izoaskorbinowy;



Rycina 15 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA – zbiorcze przedstawienie dla komórek HAP1: WT, TET1KO/TET2KO, TET1KO/TET3KO i TET2KO/TET3KO.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe. Kolor symboli nad poszczególnymi słupkami wskazuje na linie, względem których wyniki są istotne statystycznie w obrębie poszczególnych dawek badanych substancji (wieloczynnikowa ANOVA, test post-hoc NIR Fishera)

L-AA – kwas L-askorbinowy;

D-AA – kwas D-izoaskorbinowy;

Aby ustalić, czy obserwowane w linii HAP1 efekty stymulacji aktywności białek rodziny TET za pomocą izomerów kwasu askorbinowego są charakterystyczne jedynie dla tej linii komórkowej, czy też mamy do czynienia z bardziej uniwersalnym mechanizmem właściwym dla szerszego spektrum komórek, pochodzących z nowotworów hematologicznych, postanowiono wykonać taki sam eksperyment na linii komórek K562 i CA46, a także w nieco zmienionym układzie (tylko trzy stężenia kwasu L-askorbinowego) na komórkach RAJI. Zarówno komórki HAP1, jak i K562 wywodzą się z komórek przewlekłej białaczki szpikowej, z tą różnicą, iż linia HAP1 jest haploidalna, a K562 prawie triploidalna. Natomiast linie: CA46 i RAJI są liniami diploidalnymi, obie wywodzą się z komórek chłoniaka Burkitta, przy czym komórki RAJI mają w swoim genomie sekwencje wirusa EBV, natomiast komórki CA46 są ich pozbawione. Wszystkie eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych, a ich wyniki przedstawiono na Rycinie 16 (dla linii K562), Rycinie 17 (dla linii CA46) i Rycinie 18 (dla linii RAJI). Wyniki analiz statystycznych przedstawiono w Tabeli 15 (dla linii K562), Tabeli 16 (dla linii CA46) i Tabeli 17 (dla linii RAJI).

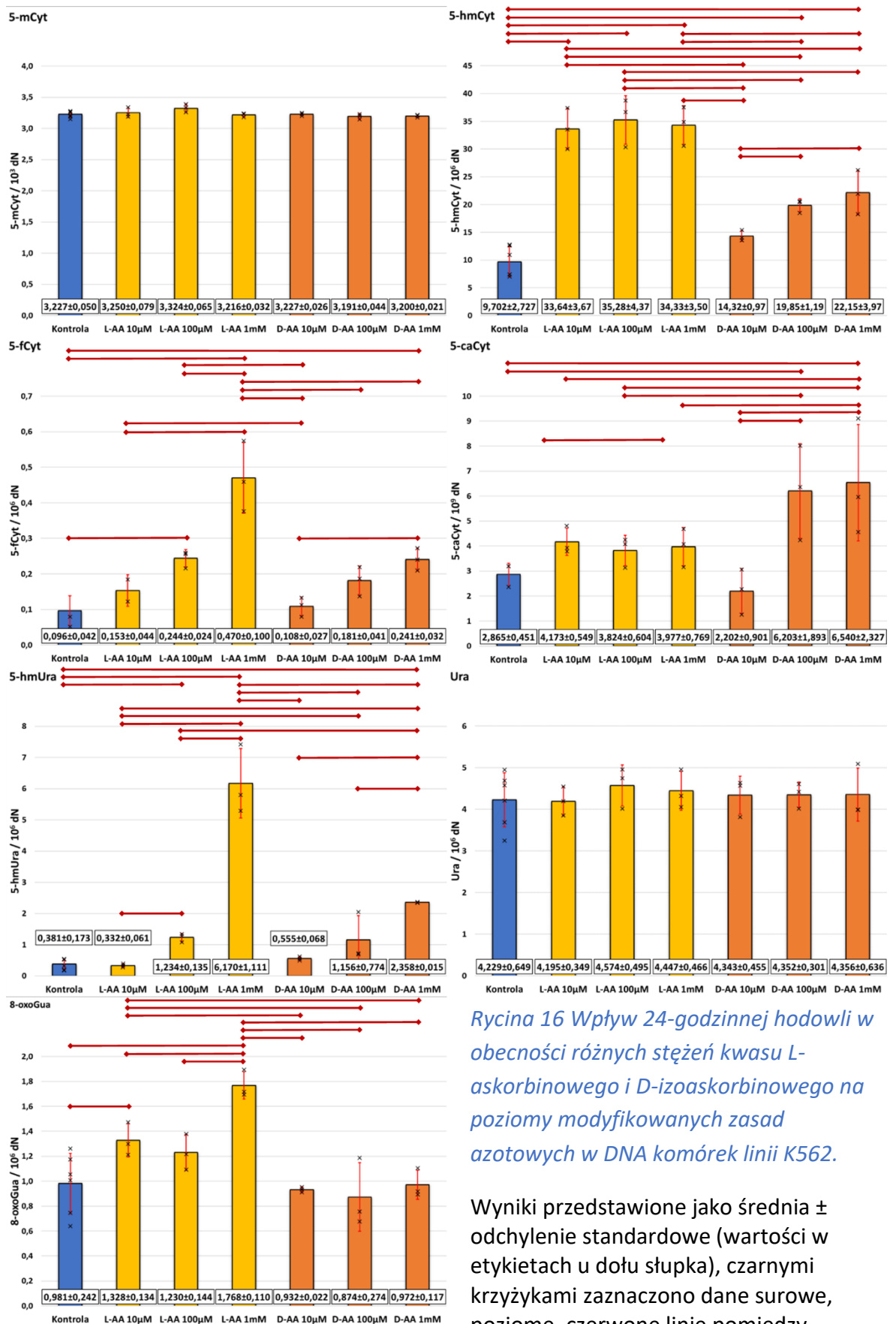
Warto zauważyć, iż niezależnie od zastosowanego izomeru, ekspozycja na witaminę C skutkowała podniesieniem poziomu 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt i 5-hmUra we wszystkich liniach nowotworów hematologicznych. W przypadku linii K562 izomer L we wszystkich zastosowanych stężeniach silniej indukował powstawanie 5-hmCyt i 5-fCyt, a w szczególności 5-hmUra w porównaniu do izomeru D, który silniej indukował jedynie powstawanie 5-caCyt (w stężeniach 100 $\mu\text{mol/l}$ i 1 mmol/l).

W komórkach CA46, po zastosowaniu stężeń 10 $\mu\text{mol/l}$ i 100 $\mu\text{mol/l}$ obu izomerów, nie zauważono istotnych różnic w poziomach 5-fCyt, 5-caCyt, 5-hmUra, a w przypadku 5-hmCyt, jedynie izomer L w stężeniu 10 $\mu\text{mol/l}$ wykazywał istotnie silniejsze działanie. Warty odnotowania jest także podwyższony poziom 8-oxoGua w tych komórkach po ekspozycji na 1 mmol/l każdego z izomerów.

W przypadku komórek RAJI zaobserwowano istotny statystycznie wzrost 5-hmCyt (dla wszystkich stężeń L-AA), 5-fCyt (dla stężenia 1 mmol/l), a także zależny od dawki wzrost poziomu 5-hmUra.

Tabela 15 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek K562 po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego.

5-mCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-hmCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,985	0,940	1,000	1,000	0,135	0,993	Kontrola	<0,001	<0,001	0,050	<0,001	<0,001	<0,001
L-AA 10µM	0,869	0,763	0,997	0,976	0,539		L-AA 10µM	<0,001	<0,001	<0,001	0,788	0,525	
L-AA 100µM	0,079	0,052	0,253	0,161			L-AA 100µM	<0,001	<0,001	<0,001	0,712		
L-AA 1mM	1,000	0,995	1,000				L-AA 1mM	<0,001	<0,001	<0,001			
D-AA 10µM	0,993	0,969					D-AA 10µM	0,007	0,043				
D-AA 100µM	1,000						D-AA 100µM	0,377					
5-fCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-caCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,002	0,044	0,755	<0,001	0,002	0,210	Kontrola	0,008	0,014	0,637	0,338	0,401	0,267
L-AA 10µM	0,076	0,555	0,343	<0,001	0,067		L-AA 10µM	0,046	0,081	0,089	0,857	0,750	
L-AA 100µM	0,941	0,146	0,005	<0,001			L-AA 100µM	0,025	0,045	0,155	0,889		
L-AA 1mM	<0,001	<0,001	0,000				L-AA 1mM	0,033	0,059	0,122			
D-AA 10µM	0,006	0,098					D-AA 10µM	0,001	0,003				
D-AA 100µM	0,165						D-AA 100µM	0,758					
5-hmUra	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	Ura	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	<0,001	0,035	0,613	<0,001	0,022	0,887	Kontrola	0,736	0,745	0,763	0,564	0,365	0,929
L-AA 10µM	<0,001	0,050	0,575	<0,001	0,033		L-AA 10µM	0,712	0,720	0,735	0,565	0,389	
L-AA 100µM	0,010	0,843	0,100	<0,001			L-AA 100µM	0,617	0,610	0,596	0,770		
L-AA 1mM	<0,001	<0,001	<0,001				L-AA 1mM	0,834	0,826	0,811			
D-AA 10µM	<0,001	0,142					D-AA 10µM	0,976	0,984				
D-AA 100µM	0,007						D-AA 100µM	0,992					
8-oxoGua	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM							
Kontrola	0,945	0,419	0,712	<0,001	0,073	0,016							
L-AA 10µM	0,030	0,008	0,017	0,009	0,519								
L-AA 100µM	0,104	0,030	0,064	0,002									
L-AA 1mM	<0,001	<0,001	<0,001										
D-AA 10µM	0,795	0,700											
D-AA 100µM	0,521												



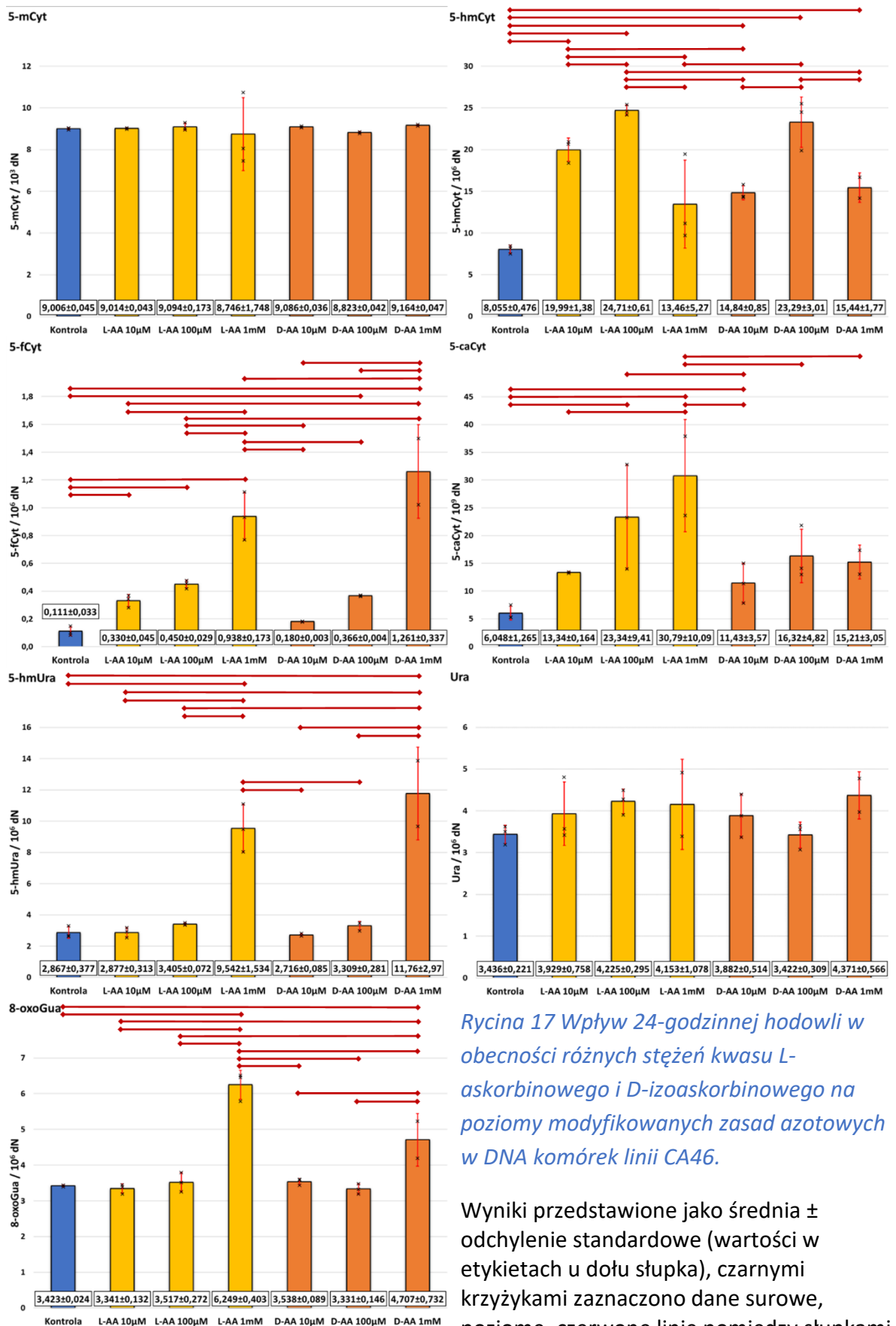
Rycina 16 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii K562.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

L-AA – kwas L-askorbinowy;
D-AA – kwas D-izoaskorbinowy;

Tabela 16 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek CA46 po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego.

5-mCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-hmCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,800	0,741	0,886	0,641	0,875	0,990	Kontrola	0,004	<0,001	0,003	0,014	<0,001	<0,001
L-AA 10µM	0,825	0,758	0,908	0,667	0,898		L-AA 10µM	0,053	0,109	0,018	0,004	0,028	
L-AA 100µM	0,910	0,627	0,989	0,534			L-AA 100µM	0,001	0,474	<0,001	<0,001		
L-AA 1mM	0,504	0,890	0,543				L-AA 1mM	0,375	<0,001	0,487			
D-AA 10µM	0,900	0,637					D-AA 10µM	0,786	0,001				
D-AA 100µM	0,584						D-AA 100µM	0,002					
5-fCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-caCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	<0,001	0,012	0,453	<0,001	0,002	0,028	Kontrola	0,081	0,034	0,236	<0,001	0,002	0,156
L-AA 10µM	<0,001	0,695	0,116	<0,001	0,206		L-AA 10µM	0,729	0,549	0,699	0,006	0,059	
L-AA 100µM	<0,001	0,371	0,009	<0,001			L-AA 100µM	0,117	0,129	0,016	0,147		
L-AA 1mM	0,006	<0,001	<0,001				L-AA 1mM	0,012	0,010	0,002			
D-AA 10µM	<0,001	0,056					D-AA 10µM	0,448	0,279				
D-AA 100µM	<0,001						D-AA 100µM	0,823					
5-hmUra	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	Ura	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	<0,001	0,587	0,853	<0,001	0,509	0,990	Kontrola	0,071	0,974	0,316	0,157	0,087	0,269
L-AA 10µM	<0,001	0,596	0,843	<0,001	0,517		L-AA 10µM	0,372	0,256	0,913	0,648	0,502	
L-AA 100µM	<0,001	0,906	0,401	<0,001			L-AA 100µM	0,764	0,082	0,436	0,883		
L-AA 1mM	0,025	<0,001	<0,001				L-AA 1mM	0,684	0,150	0,580			
D-AA 10µM	<0,001	0,468					D-AA 10µM	0,324	0,302				
D-AA 100µM	<0,001						D-AA 100µM	0,068					
8-oxoGua	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM							
Kontrola	0,009	1,000	1,000	<0,001	1,000	1,000							
L-AA 10µM	0,005	1,000	0,996	<0,001	0,998								
L-AA 100µM	0,016	0,997	1,000	<0,001									
L-AA 1mM	0,002	<0,001	<0,001										
D-AA 10µM	0,018	0,994											
D-AA 100µM	0,005												



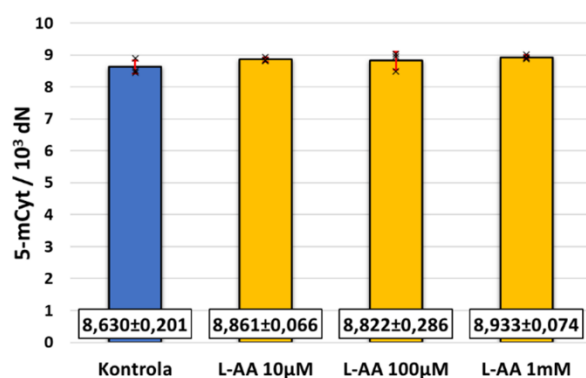
Rycina 17 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii CA46.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.
L-AA – kwas L-askorbinowy;
D-AA – kwas D-izoaskorbinowy;

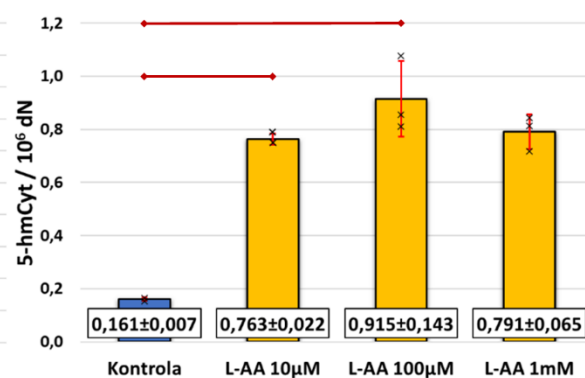
Tabela 17 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek RAJI po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego.

5-mCyt	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-hmCyt	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,398	0,804	0,662	Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001
L-AA 10µM	0,999	1,000		L-AA 10µM	0,999	0,325	
L-AA 100µM	0,986			L-AA 100µM	0,525		
5-fCyt	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-caCyt	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	<0,001	0,941	1,000	Kontrola	0,068	0,847	0,298
L-AA 10µM	<0,001	0,985		L-AA 10µM	0,351	0,387	
L-AA 100µM	0,001			L-AA 100µM	0,093		
5-hmUra	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	Ura	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	<0,001	0,008	0,962	Kontrola	0,815	0,722	0,079
L-AA 10µM	<0,001	0,036		L-AA 10µM	0,067	0,056	
L-AA 100µM	0,001			L-AA 100µM	0,909		
8-oxoGua	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM				
Kontrola	0,113	0,993	0,842				
L-AA 10µM	0,099	0,859					
L-AA 100µM	0,133						

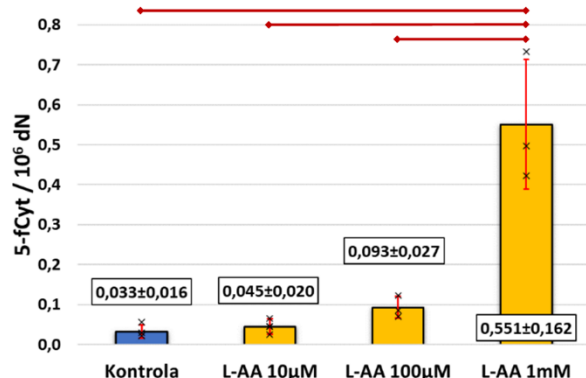
5-mCyt



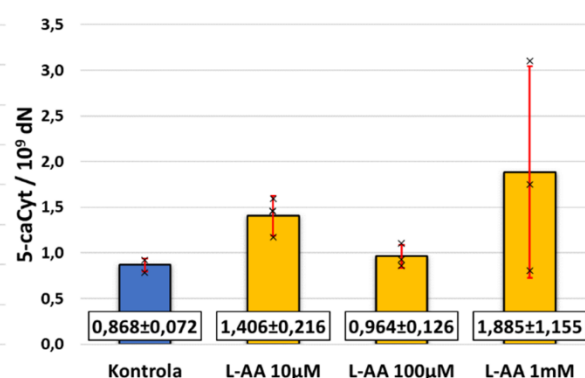
5-hmCyt



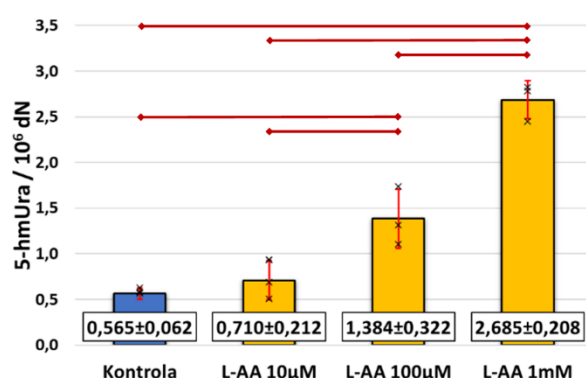
5-fCyt



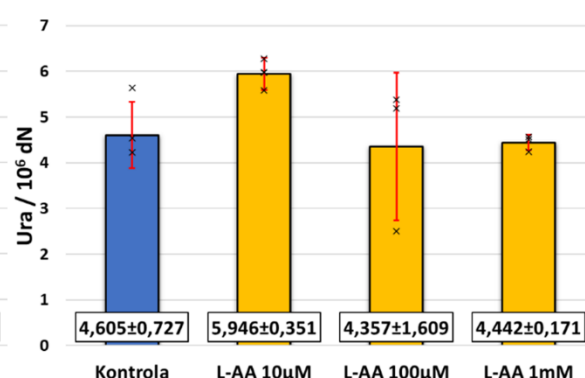
5-caCyt



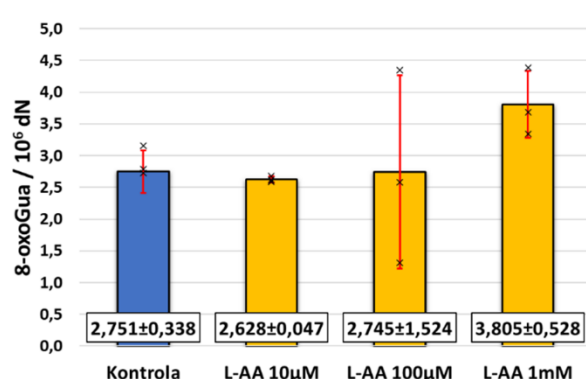
5-hmUra



Ura



8-oxoGua



Rycina 18 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii RAJ.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżkami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

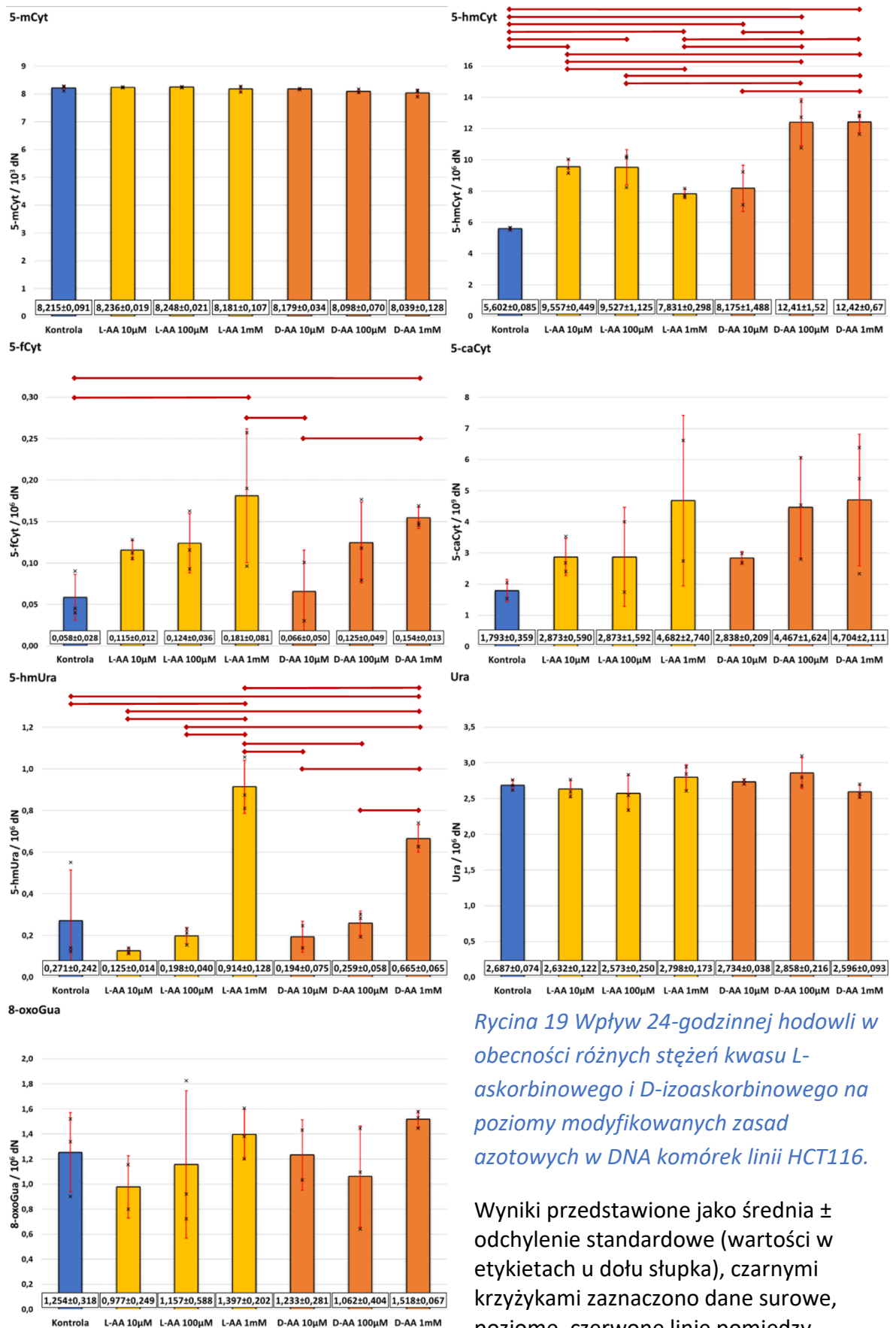
L-AA – kwas L-askorbinowy;
D-AA – kwas D-izoaskorbinowy;

Wykonano także szereg eksperymentów, tożsamyh w swoich założeniach z przedstawionymi powyżej, na szerokim spektrum ustalonych linii komórkowych nowotworów człowieka, takich jak: HCT116 (rak jelita grubego), PC-3 (gruczolakorak prostaty), A549 (niedrobnokomórkowy rak płuca), czy też MDA-MB-231 (gruczolakorak piersi). W eksperymentach na liniach HCT116 i PC-3 komórki eksponowano przez 24 godziny na kwas L-askorbinowy lub D-izoaskorbinowy w stężeniach 10 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$ i 1 mmol/l , natomiast komórki linii A549 i MDA-MB-231 hodowano przez 24 godziny w obecności 10 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$ i 1 mmol/l kwasu L-askorbinowego. Wszystkie eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych, a ich wyniki, wyrażone jako zmierzone poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA, przedstawiono na Rycinie 19 (dla linii HCT116), Rycinie 20 (dla linii PC-3), Rycinie 21 (dla linii A549) i Rycinie 22 (dla linii MDA-MB-231). Wyniki analiz statystycznych zestawiono w Tabeli 18 (dla linii HCT116), Tabeli 19 (dla linii PC-3), Tabeli 20 (dla linii A549), Tabeli 21 (dla linii MDA-MB-231).

Uwagę zwraca znamieny statystycznie wzrost poziomu 5-hmCyt, zarówno w linii HCT116, jak i PC-3 po zastosowaniu obu izomerów kwasu askorbinowego, a także 5-fCyt i 5-hmUra, choć miał on miejsce jedynie w przypadku hodowli z oboma izomerami w stężeniu 1mM. Ponadto zaobserwowano istotny statystycznie, zależny od dawki wzrost poziomu 5-hmCyt w linii A549 po ekspozycji na kwas L-askorbinowy, jak również istotny wzrost poziomu 5-hmUra po zastosowaniu 1 mmol/l tego związku. W przypadku linii MDA-MB-231 uwagę zwraca wzrost 5-hmCyt i 5-fCyt po 24-godzinnej hodowli z 100 $\mu\text{mol/l}$ kwasu askorbinowego.

Tabela 18 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HCT116 po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego.

5-mCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-hmCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,183	0,579	0,999	0,998	0,999	1,000	Kontrola	<0,001	<0,001	0,009	0,011	<0,001	<0,001
L-AA 10µM	0,110	0,405	0,984	0,976	1,000		L-AA 10µM	0,002	0,002	0,121	0,038	0,969	
L-AA 100µM	0,082	0,322	0,961	0,941			L-AA 100µM	0,002	0,002	0,129	0,041		
L-AA 1mM	0,383	0,857	1,000				L-AA 1mM	<0,001	<0,001	0,687			
D-AA 10µM	0,512	0,914					D-AA 10µM	<0,001	<0,001				
D-AA 100µM	0,969						D-AA 100µM	0,985					
5-fCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-caCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,019	0,088	0,863	0,004	0,091	0,136	Kontrola	0,072	0,094	0,524	0,098	0,511	0,472
L-AA 10µM	0,295	0,801	0,235	0,089	0,819		L-AA 10µM	0,187	0,246	0,981	0,240	1,000	
L-AA 100µM	0,407	0,982	0,169	0,132			L-AA 100µM	0,234	0,296	0,983	0,280		
L-AA 1mM	0,468	0,138	0,013				L-AA 1mM	0,988	0,885	0,272			
D-AA 10µM	0,045	0,164					D-AA 10µM	0,226	0,286				
D-AA 100µM	0,419						D-AA 100µM	0,858					
5-hmUra	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	Ura	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,001	0,898	0,474	<0,001	0,453	0,147	Kontrola	0,501	0,217	0,754	0,414	0,403	0,681
L-AA 10µM	<0,001	0,181	0,530	<0,001	0,455		L-AA 10µM	0,790	0,110	0,499	0,229	0,664	
L-AA 100µM	<0,001	0,532	0,965	<0,001			L-AA 100µM	0,866	0,050	0,294	0,111		
L-AA 1mM	0,021	<0,001	<0,001				L-AA 1mM	0,149	0,658	0,671			
D-AA 10µM	0,001	0,546					D-AA 10µM	0,365	0,416				
D-AA 100µM	0,001						D-AA 100µM	0,068					
8-oxoGua	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM							
Kontrola	0,371	0,511	0,947	0,624	0,739	0,400							
L-AA 10µM	0,114	0,795	0,477	0,211	0,581								
L-AA 100µM	0,228	0,742	0,816	0,415									
L-AA 1mM	0,679	0,260	0,614										
D-AA 10µM	0,387	0,600											
D-AA 100µM	0,134												



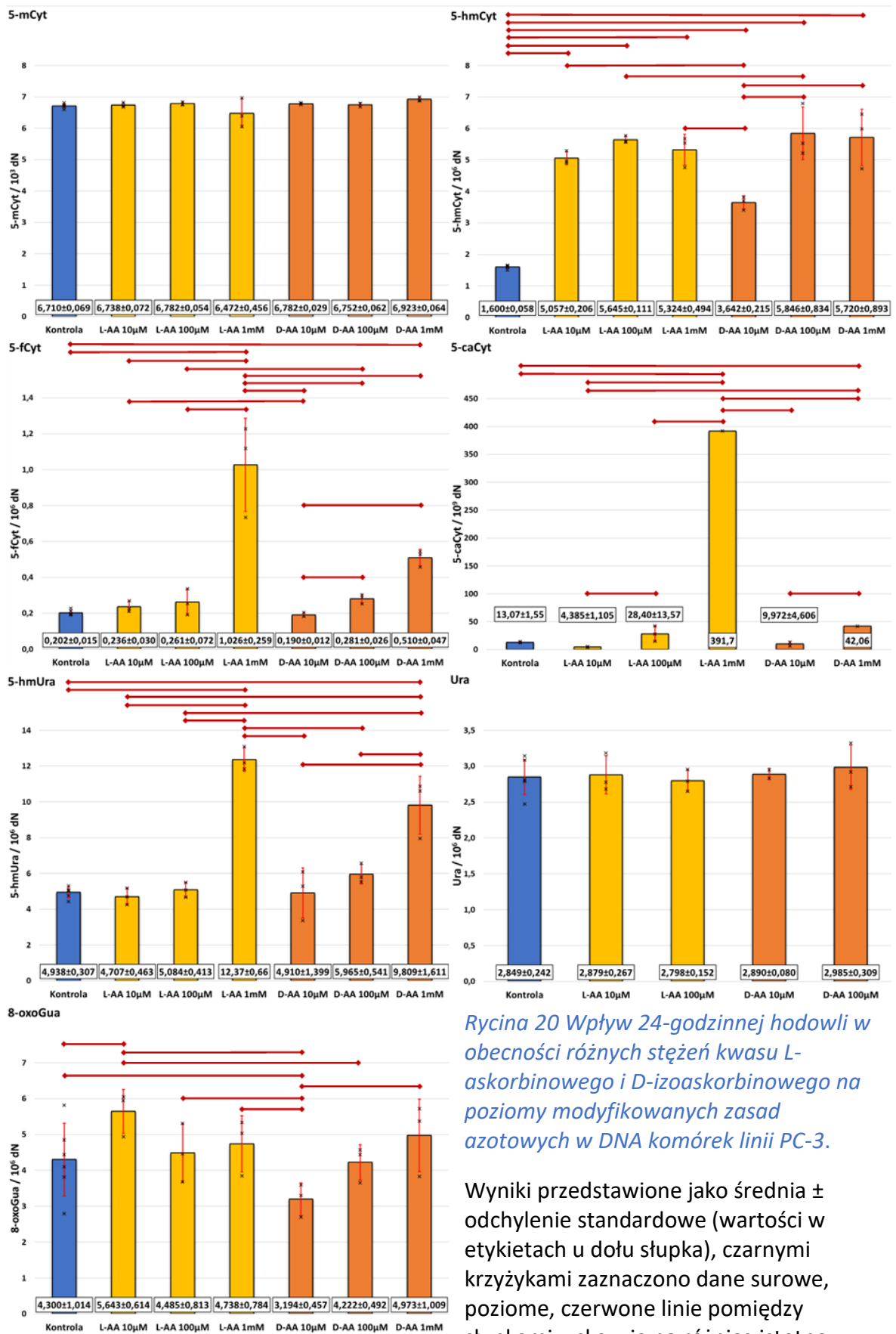
Rycina 19 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HCT116.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

L-AA – kwas L-askorbinowy;
D-AA – kwas D-izoaskorbinowy;

Tabela 19 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek PC-3 po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego.

5-mCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-hmCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,757	1,000	1,000	0,231	1,000	1,000	Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
L-AA 10µM	0,886	1,000	1,000	0,521	1,000		L-AA 10µM	0,755	0,552	0,026	0,999	0,857	
L-AA 100µM	0,977	1,000	1,000	0,318			L-AA 100µM	1,000	1,000	0,001	0,997		
L-AA 1mM	0,034	0,453	0,320				L-AA 1mM	0,986	0,922	0,005			
D-AA 10µM	0,976	1,000					D-AA 10µM	<0,001	<0,001				
D-AA 100µM	0,924						D-AA 100µM	1,000					
5-fCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-caCyt	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,034	1,000	0,999	<0,001	1,000	1,000	Kontrola	0,044		0,741	<0,001	0,117	0,373
L-AA 10µM	0,125	1,000	1,000	<0,001	1,000		L-AA 10µM	0,018		0,556	<0,001	0,031	
L-AA 100µM	0,213	1,000	0,998	<0,001			L-AA 100µM	0,240		0,072	<0,001		
L-AA 1mM	<0,001	<0,001	<0,001				L-AA 1mM	<0,001		<0,001			
D-AA 10µM	0,043	0,990					D-AA 10µM	0,032					
D-AA 100µM	0,303						D-AA 100µM						
5-hmUra	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	Ura	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	<0,001	1,000	0,990	<0,001	0,999	0,953	Kontrola	0,056	0,711	1,000	1,000	0,999	1,000
L-AA 10µM	<0,001	0,926	1,000	<0,001	1,000		L-AA 10µM	0,140	0,806	1,000	1,000	1,000	
L-AA 100µM	0,001	0,992	1,000	<0,001			L-AA 100µM	0,080	0,639	0,992	1,000		
L-AA 1mM	0,194	<0,001	<0,001				L-AA 1mM	0,243	0,887	1,000			
D-AA 10µM	0,001	0,974					D-AA 10µM	0,270	0,951				
D-AA 100µM	0,009						D-AA 100µM	0,811					
8-oxoGua	D-AA 1mM	D-AA 100µM	D-AA 10µM	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM							
Kontrola	0,276	0,652	0,015	0,539	0,925	0,019							
L-AA 10µM	0,264	0,023	<0,001	0,135	0,059								
L-AA 100µM	0,413	0,657	0,037	0,670									
L-AA 1mM	0,692	0,387	0,014										
D-AA 10µM	0,005	0,092											
D-AA 100µM	0,212												



Rycina 20 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii PC-3.

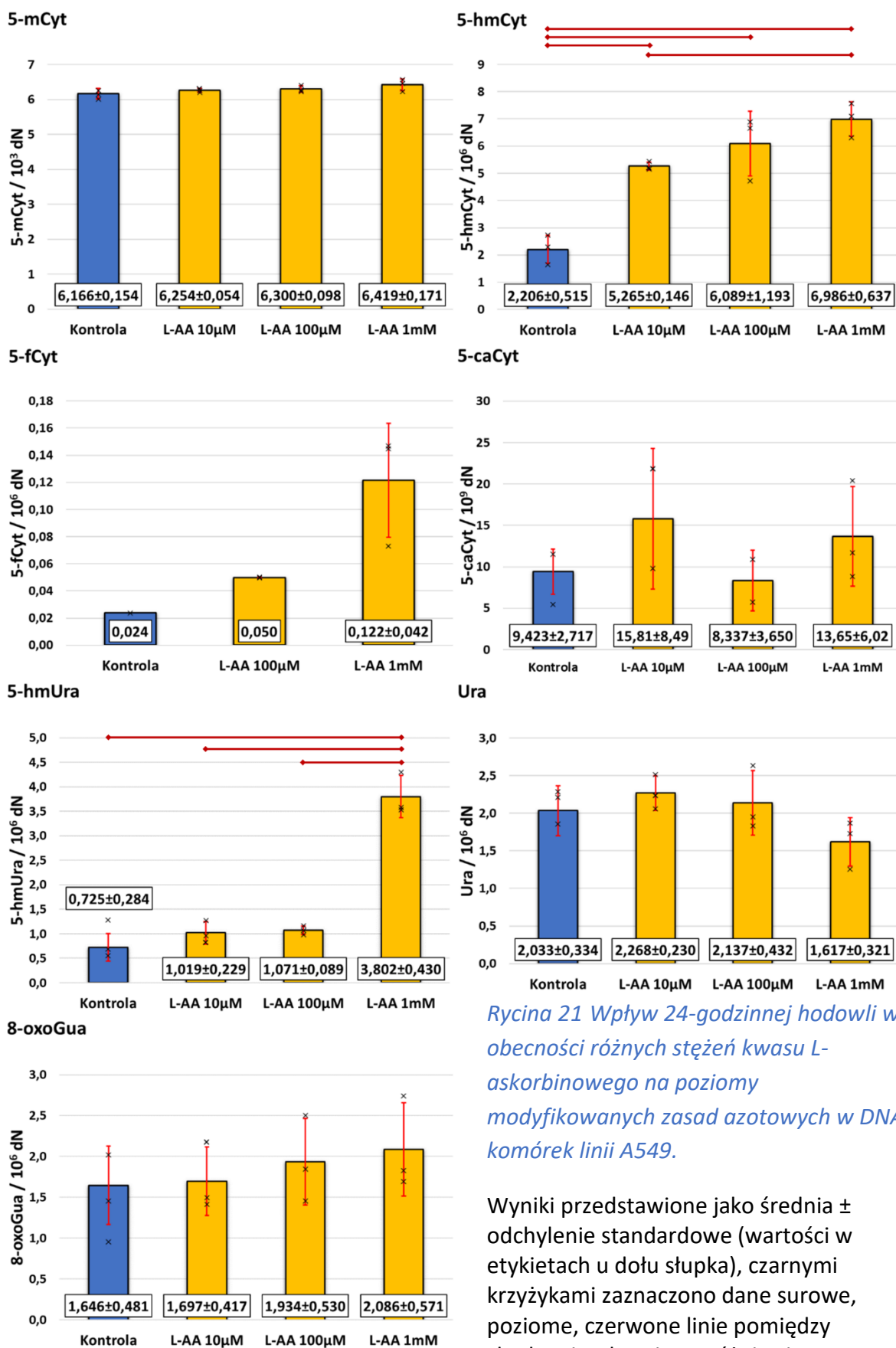
Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżkami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

L-AA – kwas L-askorbinowy;

D-AA – kwas D-izoaskorbinowy;

Tabela 20 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek A549 po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego.

5-mCyt	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-hmCyt	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,608	0,966	0,996	Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001
L-AA 10µM	0,952	1,000		L-AA 10µM	0,033	0,627	
L-AA 100µM	0,990			L-AA 100µM	0,537		
5-fCyt	L-AA 1mM	L-AA 100µM		5-caCyt	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,091	0,106		Kontrola	0,349	0,827	0,221
L-AA 100µM	0,579			L-AA 10µM	0,681	0,216	
				L-AA 100µM	0,326		
5-hmUra	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	Ura	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	<0,001	0,062	0,107	Kontrola	0,258	0,774	0,518
L-AA 10µM	<0,001	0,799		L-AA 10µM	0,132	0,753	
L-AA 100µM	<0,001			L-AA 100µM	0,223		
8-oxoGua	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM				
Kontrola	0,184	0,377	0,876				
L-AA 10µM	0,304	0,526					
L-AA 100µM	0,685						



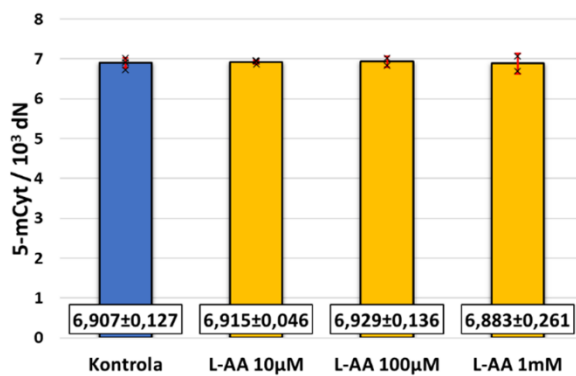
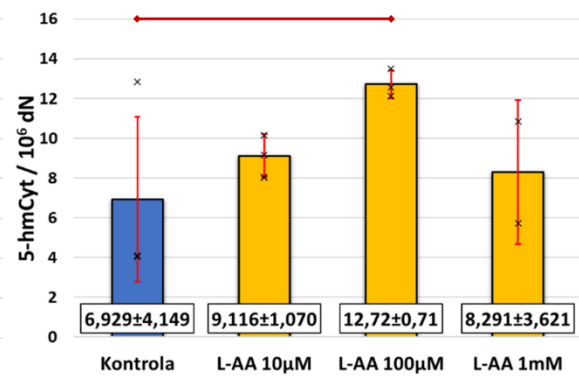
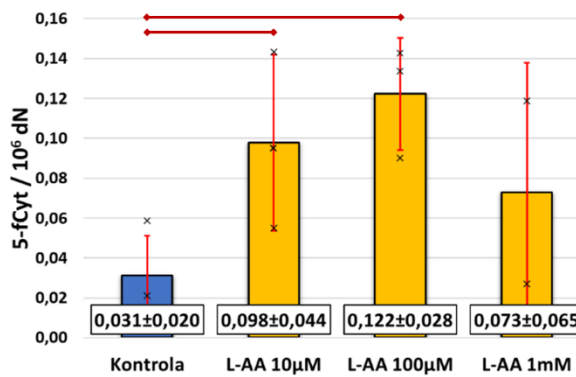
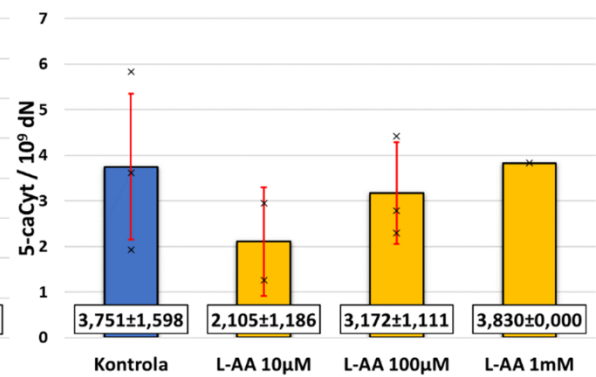
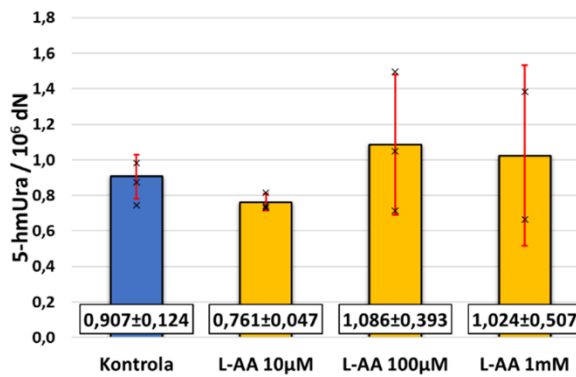
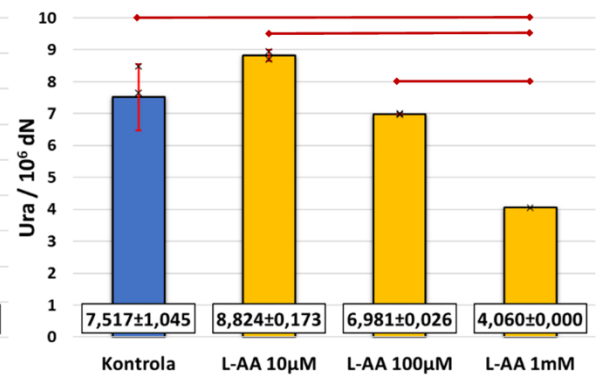
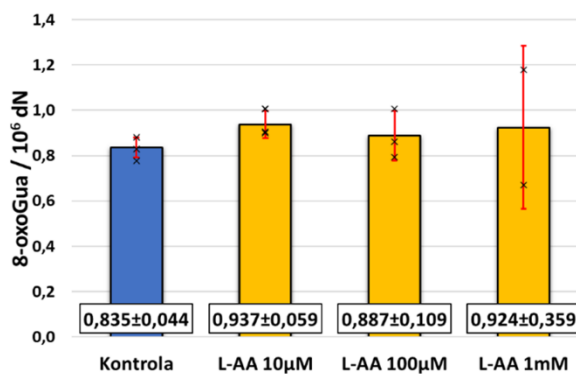
Rycina 21 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii A549.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżkami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

L-AA – kwas L-askorbinowy;

Tabela 21 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek MDA-MB-231 po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego.

5-mCyt	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-hmCyt	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	1,000	1,000	1,000	Kontrola	0,605	0,032	0,355
L-AA 10µM	0,999	1,000		L-AA 10µM	0,764	0,168	
L-AA 100µM	0,997			L-AA 100µM	0,135		
5-fCyt	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	5-caCyt	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,227	0,012	0,045	Kontrola	0,961	0,604	0,220
L-AA 10µM	0,481	0,442		L-AA 10µM	0,349	0,432	
L-AA 100µM	0,182			L-AA 100µM	0,695		
5-hmUra	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM	Ura	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM
Kontrola	0,638	0,423	0,513	Kontrola	0,016	0,474	0,127
L-AA 10µM	0,330	0,190		L-AA 10µM	0,006	0,068	
L-AA 100µM	0,814			L-AA 100µM	0,033		
8-oxoGua	L-AA 1mM	L-AA 100µM	L-AA 10µM				
Kontrola	0,496	0,649	0,380				
L-AA 10µM	0,923	0,681					
L-AA 100µM	0,786						

5-mCyt**5-hmCyt****5-fCyt****5-caCyt****5-hmUra****Ura****8-oxoGua**

Rycina 22 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń kwasu L-askorbinowego na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii MDA-MB-231.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

L-AA – kwas L-askorbinowy;

4.1.3.2 Wpływ jednoczesnej ekspozycji na witaminę C, jony żelaza i α -ketoglutaran na aktywność białek TET

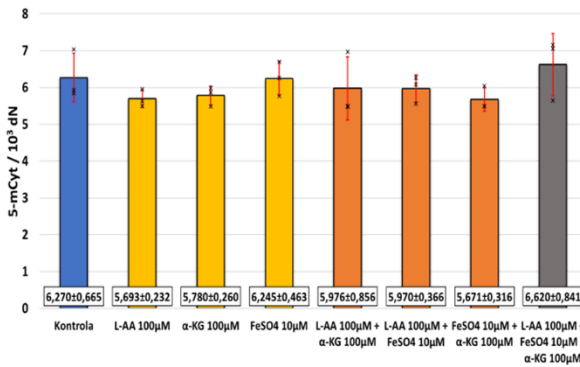
W dalszym toku prowadzonych badań postanowiono odpowiedzieć na pytanie, czy jednoczesna administracja różnych kombinacji witaminy C (L-AA), siarczanu żelaza i α -ketoglutaranu okaże się skuteczniejsza w stymulowaniu aktywności białek TET, niż każdy z tych związków z osobna. W tym celu komórki parentalnej linii HAP1^{WT} hodowano przez 24 godziny w medium hodowlanym Iscove's DMEM (brak związków żelaza, witaminy C i α -ketoglutaranu w składzie), w obecności: 100 $\mu\text{mol/l}$ L-AA; 100 $\mu\text{mol/l}$ α -ketoglutaranu; 10 $\mu\text{mol/l}$ FeSO₄, a także połączeń tych substancji tj. 100 $\mu\text{mol/l}$ L-AA i 100 $\mu\text{mol/l}$ α -ketoglutaranu, 100 $\mu\text{mol/l}$ L-AA i 10 $\mu\text{mol/l}$ FeSO₄, 100 $\mu\text{mol/l}$ α -ketoglutaranu i 10 $\mu\text{mol/l}$ FeSO₄ oraz 100 $\mu\text{mol/l}$ L-AA, 100 $\mu\text{mol/l}$ α -ketoglutaranu i 10 $\mu\text{mol/l}$ FeSO₄. Wyniki eksperymentu zamieszczono na Rycinie 23, a w Tabeli 22 zamieszczono wyniki analizy statystycznej. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych.

Należy zwrócić uwagę na fakt, iż hodowla komórek HAP1 w obecności użytych stężeń α -ketoglutaranu i 10 $\mu\text{mol/l}$ FeSO₄, jak również połączenie tych dwóch substancji, nie wpływała w sposób istotny na obserwowane poziomy epigenetycznych modyfikacji w DNA badanych komórek. Co więcej, połączenie tych związków z witaminą C w stężeniu 100 $\mu\text{mol/l}$, jakkolwiek istotnie zwiększało poziom 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt i 5-hmUra, to nie był to wzrost większy niż zaobserwowany w komórkach eksponowanych tylko na witaminę C.

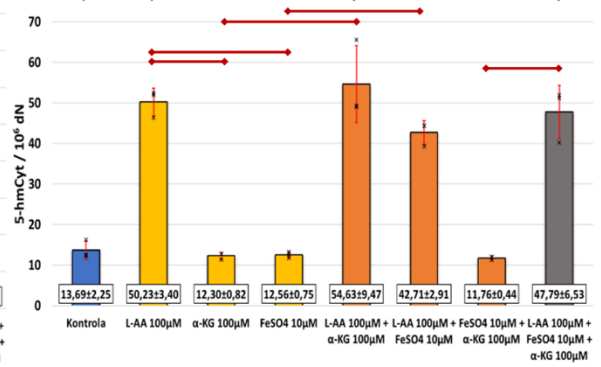
Tabela 22 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1 po 24-godzinnej hodowli w obecności kwasu L-askorbinowego, FeSO₄, α-ketoglutaranu i kombinacji tych substancji.

5-mCyt	L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM	L-AA 100μM + α-KG 100μM	FeSO ₄ 10μM	α-KG 100μM	L-AA 100μM
Kontrola	0,992	0,877	0,997	0,997	1,000	0,952	0,895
L-AA 100μM	0,481	1,000	0,998	0,998	0,914	1,000	
α-KG 100μM	0,594	1,000	1,000	1,000	0,963		
FeSO ₄ 10μM	0,988	0,898	0,998	0,999			
L-AA 100μM + α-KG 100μM	0,834	0,997	1,000				
L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM	0,827	0,997					
FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	0,455						
5-hmCyt	L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM	L-AA 100μM + α-KG 100μM	FeSO ₄ 10μM	α-KG 100μM	L-AA 100μM
Kontrola	<0,001	0,999	<0,001	<0,001	1,000	1,000	<0,001
L-AA 100μM	0,997	<0,001	0,473	0,917	<0,001	<0,001	
α-KG 100μM	<0,001	1,000	<0,001	<0,001	1,000		
FeSO ₄ 10μM	<0,001	1,000	<0,001	<0,001			
L-AA 100μM + α-KG 100μM	0,581	<0,001	0,071				
L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM	0,846	<0,001					
FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	<0,001						
5-fCyt	L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM	L-AA 100μM + α-KG 100μM	FeSO ₄ 10μM	α-KG 100μM	L-AA 100μM
Kontrola	0,001	1,000	0,008	<0,001	1,000	1,000	<0,001
L-AA 100μM	<0,001	<0,001	<0,001	0,983	<0,001	<0,001	
α-KG 100μM	0,001	1,000	0,005	<0,001	1,000		
FeSO ₄ 10μM	0,001	1,000	0,004	<0,001			
L-AA 100μM + α-KG 100μM	<0,001	<0,001	<0,001				
L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM	0,929	0,005					
FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	0,001						
5-caCyt	L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM	L-AA 100μM + α-KG 100μM	FeSO ₄ 10μM	α-KG 100μM	L-AA 100μM
Kontrola	0,044	1,000	0,044	<0,001	1,000	1,000	<0,001
L-AA 100μM	<0,001	<0,001	<0,001	0,992	<0,001	<0,001	
α-KG 100μM	0,068	1,000	0,069	<0,001	1,000		
FeSO ₄ 10μM	0,029	1,000	0,030	<0,001			
L-AA 100μM + α-KG 100μM	<0,001	<0,001	<0,001				
L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM	1,000	0,030					
FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	0,030						
5-hmUra	L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM	L-AA 100μM + α-KG 100μM	FeSO ₄ 10μM	α-KG 100μM	L-AA 100μM
Kontrola	0,569	1,000	0,980	0,043	1,000	1,000	0,051
L-AA 100μM	0,769	0,056	0,247	1,000	0,078	0,051	
α-KG 100μM	0,573	1,000	0,981	0,044	1,000		
FeSO ₄ 10μM	0,706	1,000	0,996	0,066			
L-AA 100μM + α-KG 100μM	0,720	0,047	0,215				
L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM	0,970	0,985					
FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	0,598						
Ura	L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM	L-AA 100μM + α-KG 100μM	FeSO ₄ 10μM	α-KG 100μM	L-AA 100μM
Kontrola	1,000	0,978	1,000	0,995	0,978	1,000	1,000
L-AA 100μM	1,000	0,945	1,000	0,999	0,947	1,000	
α-KG 100μM	1,000	0,984	1,000	0,993	0,984		
FeSO ₄ 10μM	0,896	1,000	0,993	0,721			
L-AA 100μM + α-KG 100μM	1,000	0,719	0,984				
L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM	0,999	0,993					
FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	0,894						
8-oxoGua	L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM	L-AA 100μM + α-KG 100μM	FeSO ₄ 10μM	α-KG 100μM	L-AA 100μM
Kontrola	0,998	0,865	1,000	0,266	0,999	0,872	1,000
L-AA 100μM	1,000	0,976	1,000	0,462	0,973	0,979	
α-KG 100μM	0,999	1,000	0,907	0,929	0,578		
FeSO ₄ 10μM	0,940	0,567	0,997	0,109			
L-AA 100μM + α-KG 100μM	0,742	0,935	0,304				
L-AA 100μM + FeSO ₄ 10μM	0,999	0,900					
FeSO ₄ 10μM + α-KG 100μM	0,999						

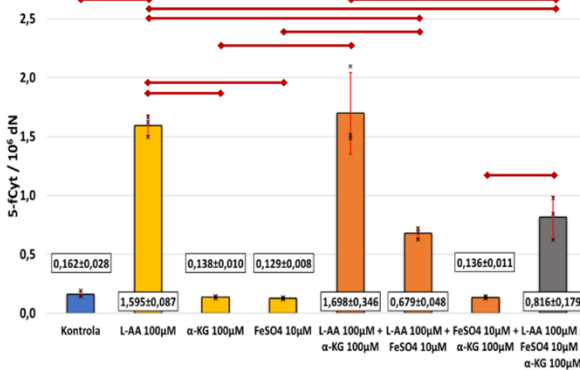
5-mCyt



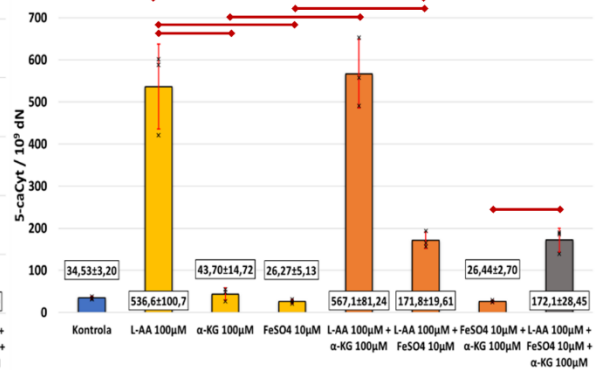
5-hmCyt



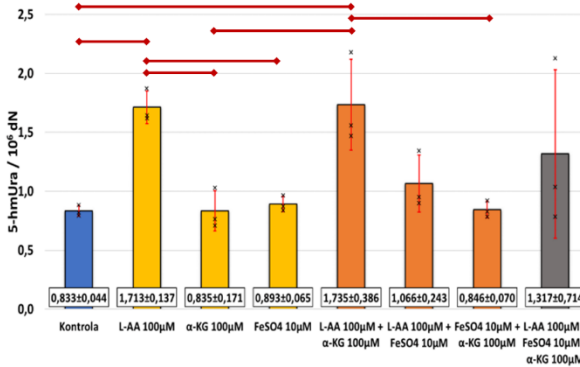
5-fCyt



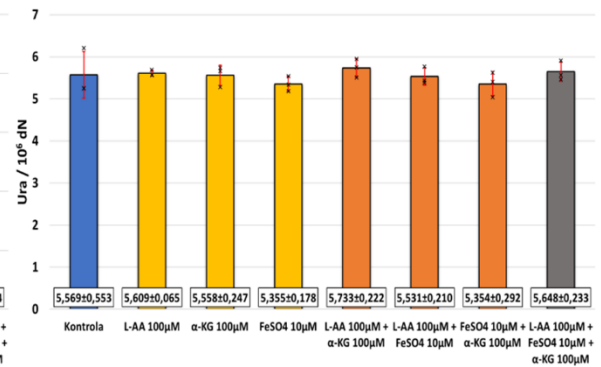
5-caCyt



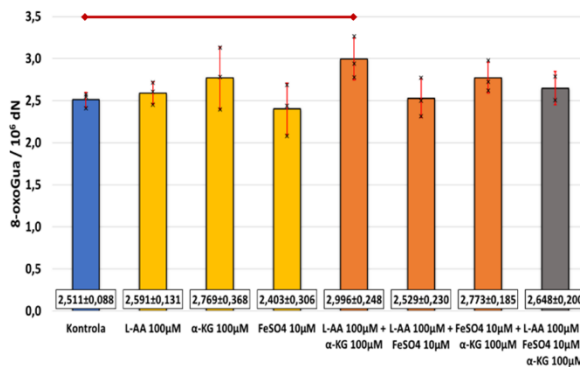
5-hmUra



Ura



8-oxoGua



Rycina 23 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności kwasu L-askorbinowego, FeSO₄, α-ketoglutaranu i kombinacji tych substancji na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

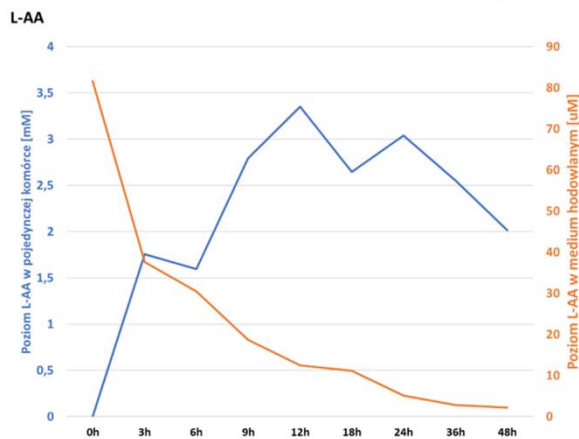
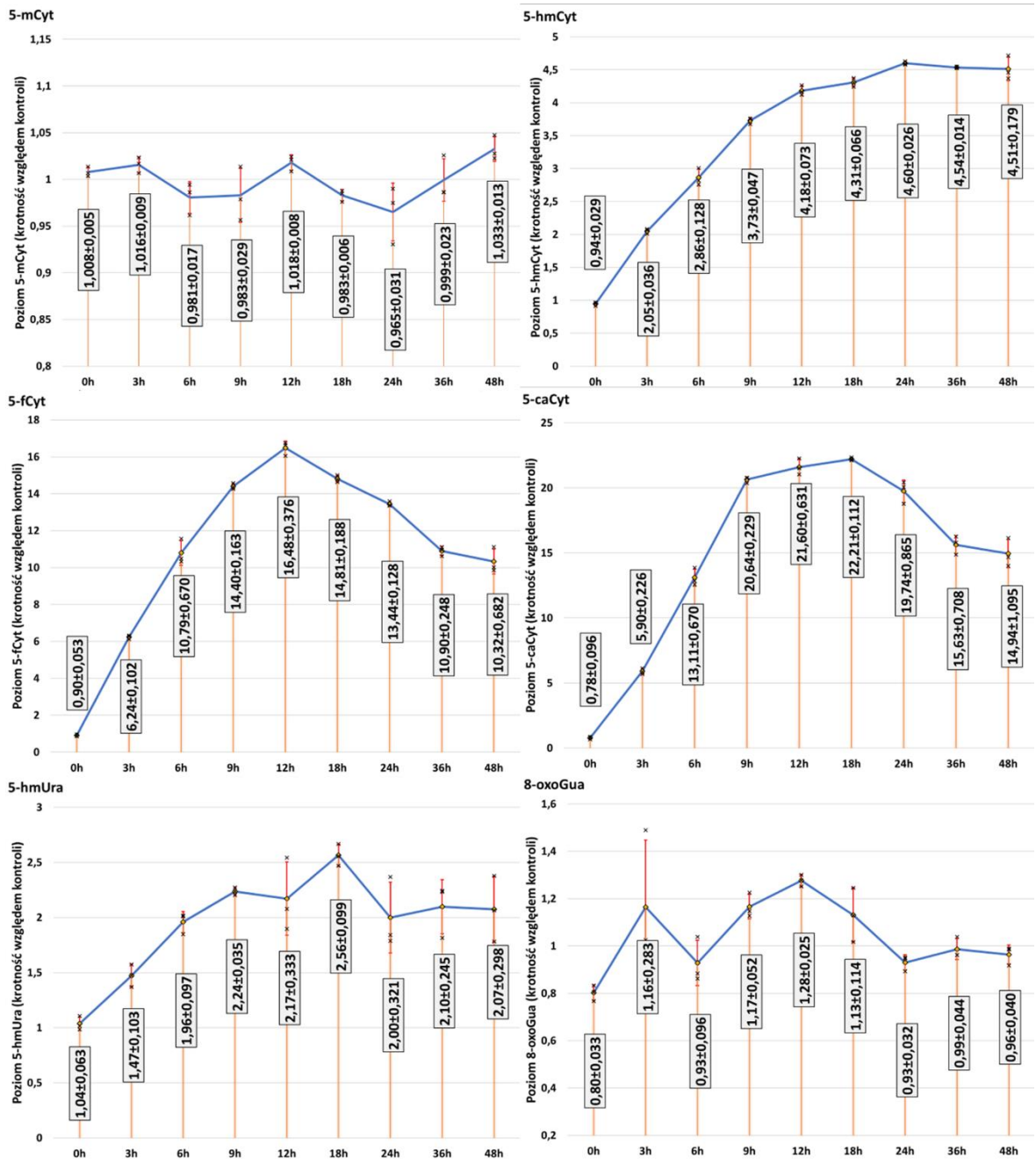
L-AA – kwas L-askorbinowy;
α-KG – α-ketoglutaran;
FeSO₄ – siarczan żelaza(II)

4.1.3.3 Kinetyka zmian poziomów epigenetycznych modyfikacji w DNA po ekspozycji na witaminę C

Postanowiono zbadać dynamikę zmian poziomu epigenetycznych modyfikacji w DNA, jakie zachodzą w komórkach po ekspozycji na witaminę C (L-AA), a zarazem w pośredni sposób odpowiedzieć na pytanie o charakter reakcji, na drodze których powstają obserwowane we wcześniejszych eksperymentach zmiany. W tym celu komórki parentalnej linii HAP1^{WT}, jak również z funkcjonalnymi nokautami: *TET1*, *TET3* i *TET3*, narażono na jednorazową dawkę witaminy C, uzyskując finalne stężenie 100 µmol/l w medium hodowlanym. Następnie prowadzono hodowlę komórkową, którą kończono i zbierano komórki w czasach: 0 (natychmiast po dodaniu), 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 i 48 godzin od dodania witaminy C. Równolegle hodowano i zbierano w tych samych punktach czasowych komórki kontrolne, rosnące w standardowym, niewzbogaconym o witaminę C medium hodowlanym. Zebrane komórki policzono i podzielono na dwie porcje - część z nich (75 %) przeznaczono na chromatograficzne analizy poziomu epigenetycznych modyfikacji w DNA, a pozostałe 25 % wykorzystano na potrzeby analizy wewnątrzkomórkowego stężenia witaminy C. Odlano również porcje medium hodowlanego pobranego w każdym z badanych punktów czasowych, by określić w nim stężenie witaminy C. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych, a jego wyniki, wyrażone jako krotność poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA, zmierzonych dla komórek kontrolnych, przedstawiono na Rycinie 25 (dla linii HAP1^{WT}), Rycinie 26 (HAP1^{TET1KO}), Rycinie 27 (dla linii HAP1^{TET2KO}) i Rycinie 28 (dla linii HAP1^{TET3KO}). Na każdej z Rycin zamieszczono także wykres stężenia witaminy C wewnątrz komórek danej linii i jej stężenia w medium hodowlanym.

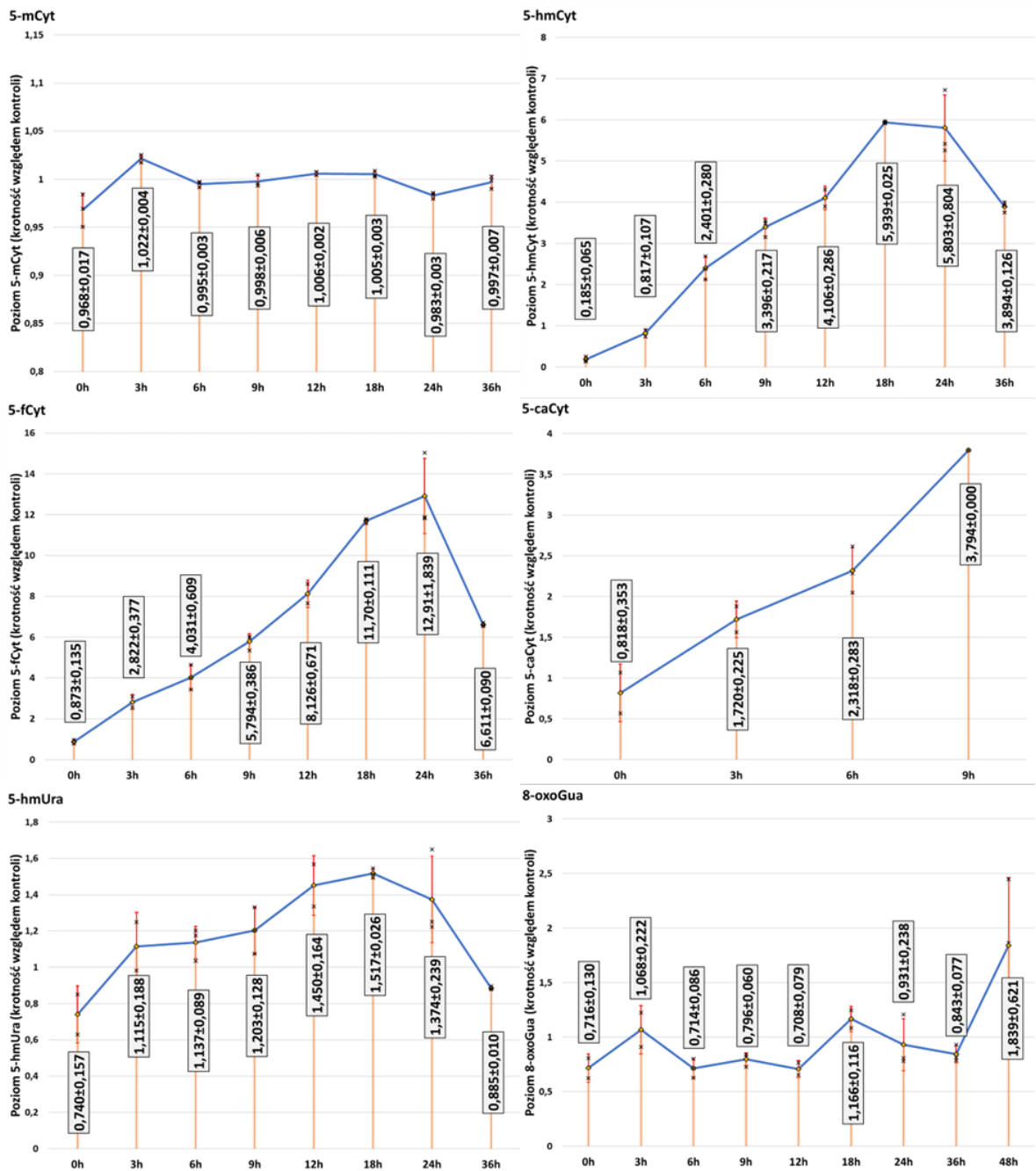
Warto zauważyć, iż we wszystkich badanych liniach komórkowych obserwujemy stopniowy, korelujący z wewnątrzkomórkowym stężeniem witaminy C, wzrost poziomu 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt, którego szczyt przypada na przedział pomiędzy 18 a 24 godziną hodowli, a następnie spada (za wyjątkiem 5-hmCyt w linii HAP1^{WT}), równoległe ze spadkiem wewnątrzkomórkowego stężenia witaminy C. W przypadku linii HAP1^{WT} zaobserwowano silną i istotną statystycznie korelację pomiędzy wewnątrzkomórkowym stężeniem witaminy C a poziomem 5-fCyt, 5-caCyt (odpowiednio $r=0,8353$ przy $p=0,010$ i $r=0,8246$ przy $p=0,012$), a w przypadku linii HAP1^{TET2KO} wewnątrzkomórkowe stężenie witaminy C

silnie i istotnie korelowało z poziomem 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt i 5-hmUra (odpowiednio: $r=0,7419$ przy $p=0,022$; $r=0,7905$ przy $p=0,011$; $r=0,6879$ przy $p=0,041$ i $r=0,7419$ przy $p=0,022$). Wyniki korelacji pomiędzy poziomem modyfikowanych zasad azotowych w DNA a wewnątrzkomórkowym stężeniem witaminy C dla wszystkich badanych linii komórkowych zestawiono w Tabeli 23. Nokaut któregokolwiek z genów TET powodował osłabienie i opóźnienie w reakcji komórek na witaminę C, której szczyt przesunął się o 6-12 godzin w porównaniu do komórek linii parentalnej.

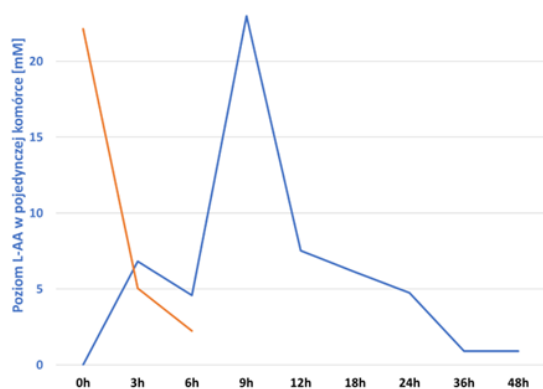


Rycina 24 Kinetyka modyfikowanych zasad azotowych w DNA i stężenia witaminy C w komórkach linii HAP1^{WT} na przestrzeni 48-godzinnej hodowli komórkowej w obecności 100 μmol/l kwasu L-askorbinowego.

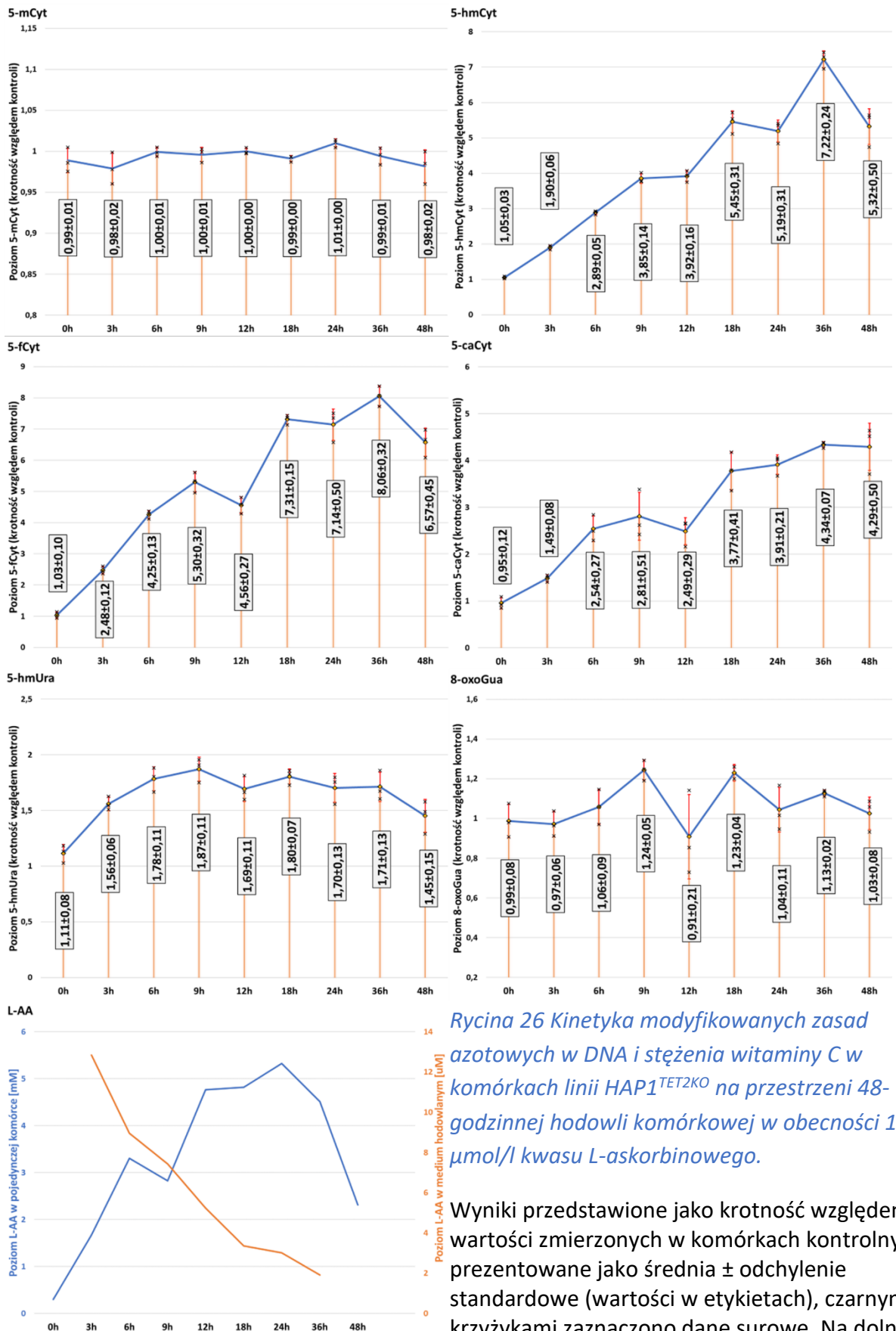
Wyniki przedstawione jako krotność względem wartości zmierzonych w komórkach kontrolnych, prezentowane jako średnia ± SD (wartości w etykietach), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe. Na dolnym wykresie przedstawiono zmiany stężenia L-AA (kwasu L-askorbinowego) w komórce (lewa oś, niebieska linia) i medium hodowlanym (oś prawa, linia pomarańczowa), wyniki prezentowane jako średnia.



Rycina 25 Kinetyka modyfikowanych zasad azotowych w DNA i stężenia witaminy C w komórkach linii HAP1^{TET1KO} na przestrzeni 48-godzinnej hodowli komórkowej w obecności 100 μmol/l kwasu L-askorbinowego.

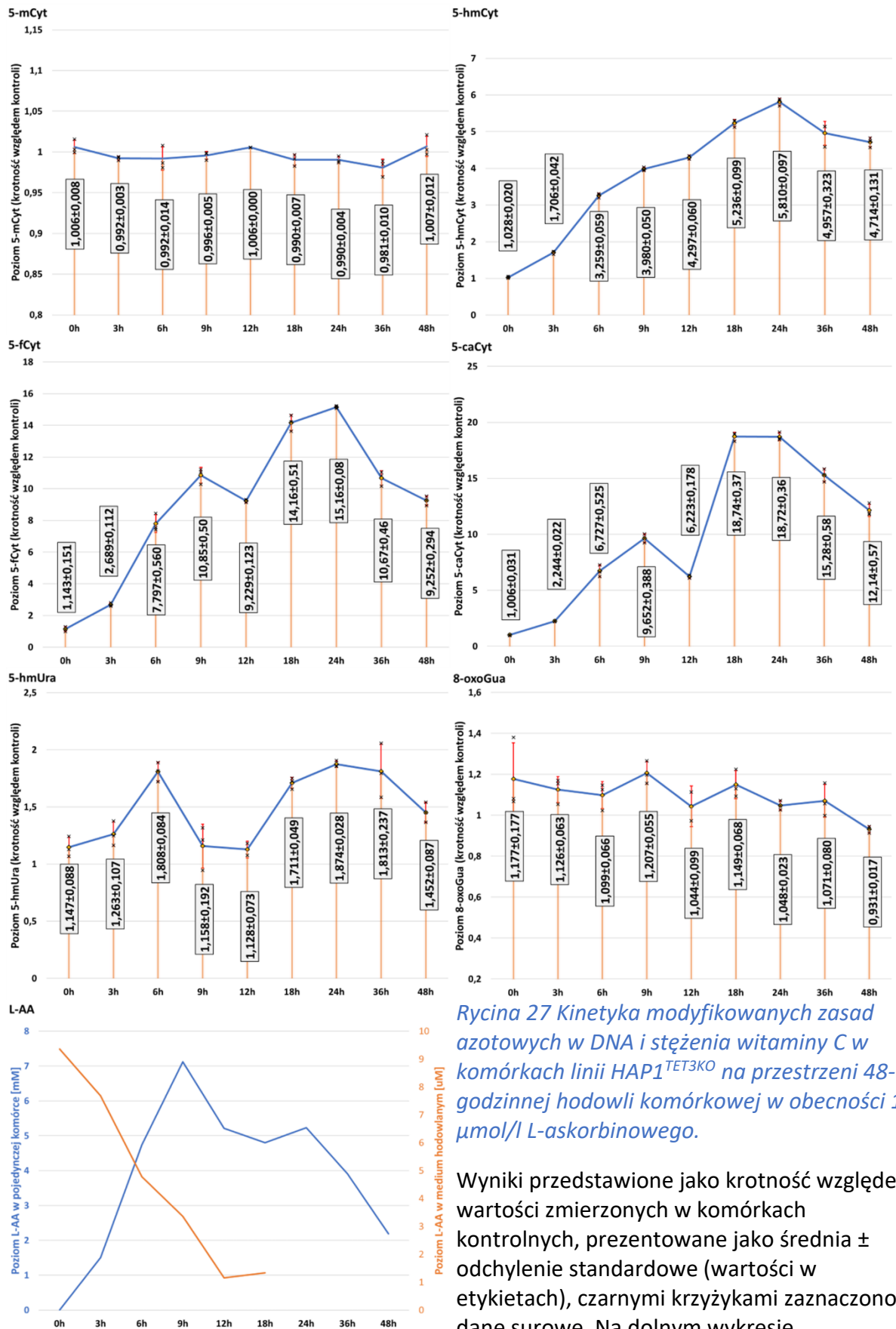


Wyniki przedstawione jako krotność względem wartości zmierzonych w komórkach kontrolnych, prezentowane jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach), czarnymi krzyżkami zaznaczono dane surowe. Na dolnym wykresie przedstawiono zmiany stężenia L-AA (kwasu L-askorbinowego) w komórce (lewa oś, niebieska linia) i medium hodowlanym (oś prawa, linia pomarańczowa), wyniki prezentowane jako średnia.



Rycina 26 Kinetyka modyfikowanych zasad azotowych w DNA i stężenia witaminy C w komórkach linii HAP1^{TET2KO} na przestrzeni 48-godzinnej hodowli komórkowej w obecności 100 μmol/l kwasu L-askorbinowego.

Wyniki przedstawione jako krotność względem wartości zmierzonych w komórkach kontrolnych, prezentowane jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe. Na dolnym wykresie przedstawiono zmiany stężenia L-AA (kwasu L-askorbinowego) w komórce (lewa oś, niebieska linia) i medium hodowlanym (oś prawa, linia pomarańczowa), wyniki prezentowane jako średnia.



Rycina 27 Kinetyka modyfikowanych zasad azotowych w DNA i stężenia witaminy C w komórkach linii HAP1^{TET3KO} na przestrzeni 48-godzinnej hodowli komórkowej w obecności 100 μmol/l L-askorbinowego.

Wyniki przedstawione jako krotność względem wartości zmierzonych w komórkach kontrolnych, prezentowane jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe. Na dolnym wykresie przedstawiono zmiany stężenia L-AA (kwasu L-askorbinowego) w komórce (lewa oś, niebieska linia) i medium hodowlanym (oś prawa, linia pomarańczowa), wyniki prezentowane jako średnia.

Tabela 23 Zestawienie wyników korelacji poziomu poszczególnych modyfikowanych zasad azotowych w DNA i wewnątrzkomórkowego poziomu witaminy C (L-AA) w komórkach linii HAP1^{WT}, HAP1^{TET1KO}, HAP1^{TET2KO} i HAP1^{TET3KO}. W tabeli przedstawiono wartości r Pearsona, liczbę ważnych przypadków i wartość p.

	wewnątrzkomórkowe stężenie L-AA			
	WT	TET1KO	TET2KO	TET3KO
5-mCyt (krotność względem kontroli)	-0,2142	0,0477	0,6887	-0,0774
	N=8	N=7	N=9	N=8
	p=0,610	p=0,919	p=0,040	p=0,855
5-hmCyt (krotność względem kontroli)	0,6580	-0,1189	0,7419	0,4096
	N=8	N=7	N=9	N=8
	p=0,076	p=0,799	p=0,022	p=0,314
5-fCyt (krotność względem kontroli)	0,8353	-0,1742	0,7905	0,6049
	N=8	N=7	N=9	N=8
	p=0,010	p=0,709	p=0,011	p=0,112
5-caCyt (krotność względem kontroli)	0,8246	0,9229	0,6879	0,2793
	N=8	N=3	N=9	N=8
	p=0,012	p=0,252	p=0,041	p=0,503
5-hmUra (krotność względem kontroli)	0,5339	0,1485	0,7419	-0,0212
	N=8	N=7	N=9	N=8
	p=0,173	p=0,751	p=0,022	p=0,960
8-oxoGua (krotność względem kontroli)	0,4198	-0,3763	0,2543	0,5084
	N=8	N=8	N=9	N=8
	p=0,300	p=0,358	p=0,509	p=0,198

4.1.3.4 Porównanie wpływu różnych postaci witaminy C na aktywność białek TET

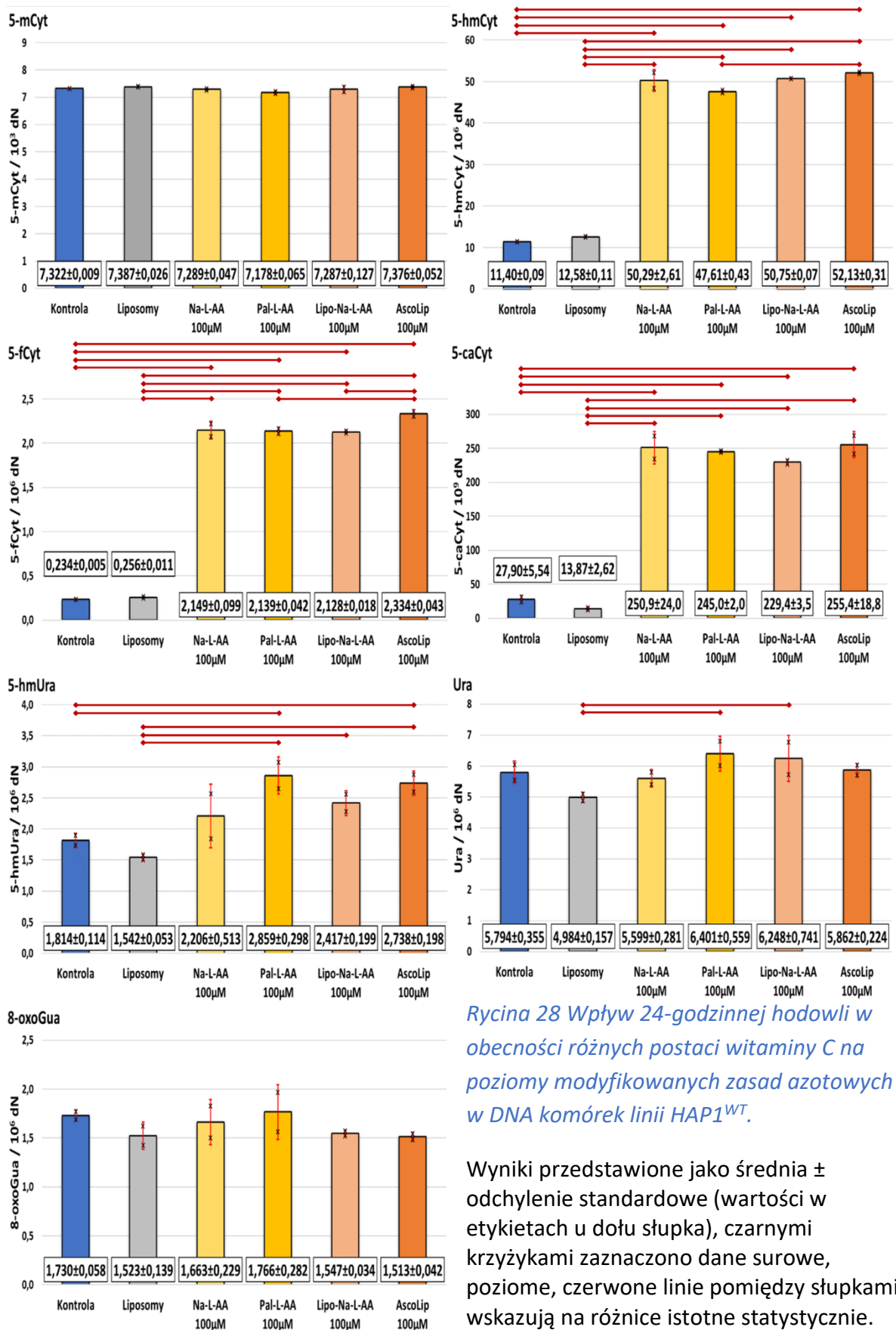
Zachęcające wyniki eksperymentów z użyciem witaminy C, a w szczególności izomeru L w stężeniu 100 $\mu\text{mol/l}$, sprawiły, iż postanowiono odpowiedzieć na pytanie, czy różne postaci tego związku w odmienny sposób wpływają na aktywność enzymatyczną białek rodziny TET. W tym celu wykonano eksperyment na parentalnej linii komórek HAP1^{WT} i z funkcjonalnymi nokautami: *TET1KO/TET2KO*, *TET1KO/TET3KO* i *TET2KO/TET3KO* polegający na prowadzeniu 24-godzinnej hodowli komórkowej w obecności 100 $\mu\text{mol/l}$ różnych postaci witaminy C, które obejmowały: sól sodową kwasu L-askorbinowego, kwas 6-O-palmitoilo-L-askorbinowy, sól sodową kwasu askorbinowego zamkniętą w nośniku liposomalnym oraz preparat ASCOLIP[®], zawierający liposomalną witaminę C firmy LIPID SYSTEMS. Kontrolę stanowiły zarówno komórki hodowane w niewzbogaconym medium hodowlanym (Iscove`s DMEM), jak i komórki eksponowane na „pusty” nośnik liposomowy. Warto nadmienić, iż formy liposomalne, powinny przenikać do wnętrza komórki w sposób niezależny od transporterów witaminy C, a tym samym wydajniej suplementować komórki.

Eksperyment wykonano w dwóch powtórzeniach biologicznych, a jego wyniki zamieszczono na Rycinie 28 (dla linii HAP1^{WT}), Rycinie 29 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET2KO}), Rycinie 30 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET3KO}) i Rycinie 31 (dla linii HAP1^{TET2KO/TET3KO}). Wyniki analiz statystycznych zaprezentowano w Tabeli 24 (dla linii HAP1^{WT}), Tabeli 25 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET2KO}), Tabeli 26 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET3KO}) i Tabeli 27 (dla linii HAP1^{TET2KO/TET3KO}).

W przypadku każdej z badanych linii obserwowano wzrost poziomu 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt i 5-hmUra, po zastosowaniu witaminy C, niezależnie od jej postaci, a niewielkie różnice w poziomach tych modyfikacji pomiędzy poszczególnymi formami nie były istotne statystycznie (za wyjątkiem 5-hmUra po zastosowaniu Pal-L-AA w linii HAP1^{TET2KO/TET3KO}). Co więcej, nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w poziomach 5-mCyt, 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt w DNA pomiędzy komórkami kontrolnymi, a eksponowanymi na „pusty” nośnik liposomowy w badanych liniach. Jednakże istotny statystycznie spadek poziomu 5-hmUra wraz z istotnym statystycznie spadkiem Ura w linii HAP1^{TET1KO/TET2KO} po narażeniu na „pusty” nośnik może świadczyć o indukcji niespecyficznego deaminacji. Ponadto, zastosowanie jakiegokolwiek z badanych form witaminy C, nie skutkowało przywróceniem poziomów 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt w liniach z funkcjonalnymi, podwójnymi nokautami białek TET, do tych obserwowanych w linii HAP1^{WT}.

Tabela 24 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{WT} po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych postaci witaminy C.

5-mCyt	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,952	0,992	0,359	0,994	0,906
Liposomy	1,000	0,664	0,121	0,684	
Na-L-AA 100µM	0,768	1,000	0,581		
Pal-L-AA 100µM	0,145	0,601			
Lipo-Na-L-AA 100µM	0,748				
5-hmCyt	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,872
Liposomy	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
Na-L-AA 100µM	0,581	0,997	0,267		
Pal-L-AA 100µM	0,042	0,166			
Lipo-Na-L-AA 100µM	0,796				
5-fCyt	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,997
Liposomy	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
Na-L-AA 100µM	0,058	0,997	1,000		
Pal-L-AA 100µM	0,047	1,000			
Lipo-Na-L-AA 100µM	0,037				
5-caCyt	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,867
Liposomy	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
Na-L-AA 100µM	0,999	0,585	0,996		
Pal-L-AA 100µM	0,954	0,815			
Lipo-Na-L-AA 100µM	0,420				
5-hmUra	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,015	0,069	0,009	0,201	0,357
Liposomy	0,005	0,018	0,003	0,051	
Na-L-AA 100µM	0,099	0,468	0,054		
Pal-L-AA 100µM	0,673	0,156			
Lipo-Na-L-AA 100µM	0,284				
Ura	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,880	0,338	0,213	0,671	0,113
Liposomy	0,091	0,027	0,017	0,208	
Na-L-AA 100µM	0,568	0,187	0,115		
Pal-L-AA 100µM	0,263	0,737			
Lipo-Na-L-AA 100µM	0,411				
8-oxoGua	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,759	0,855	1,000	0,998	0,788
Liposomy	1,000	1,000	0,678	0,942	
Na-L-AA 100µM	0,926	0,973	0,984		
Pal-L-AA 100µM	0,648	0,754			
Lipo-Na-L-AA 100µM	1,000				



Rycina 28 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych postaci witaminy C na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{WT}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

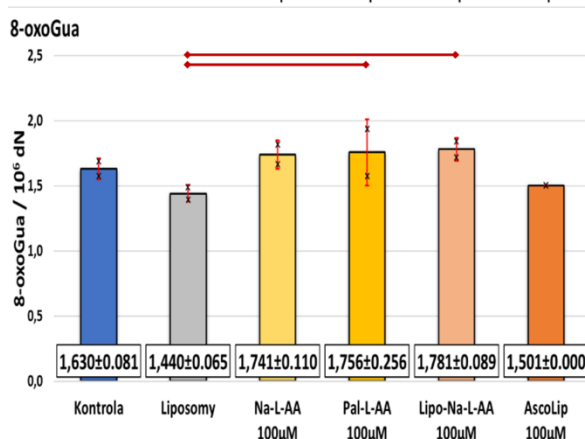
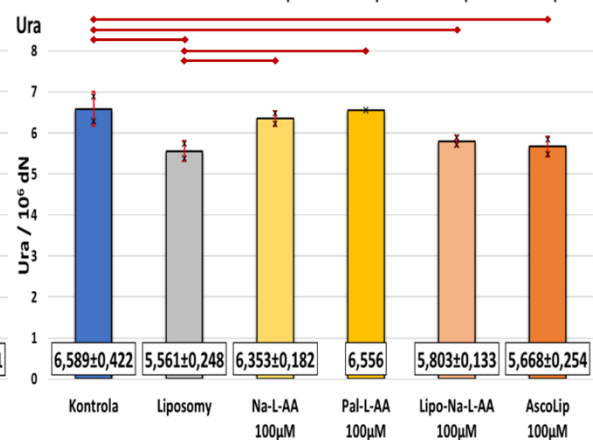
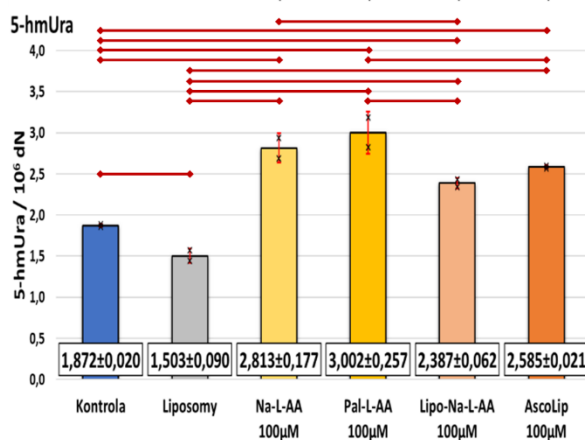
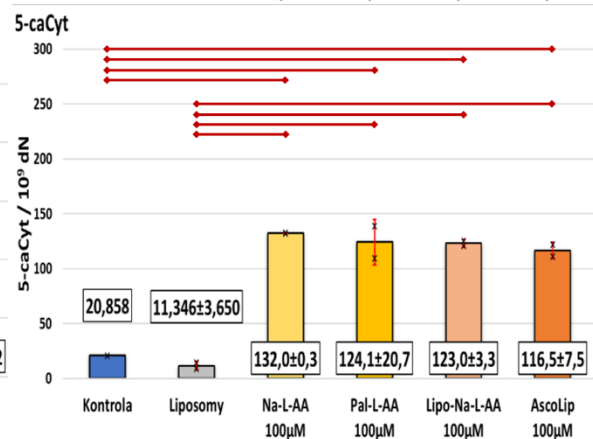
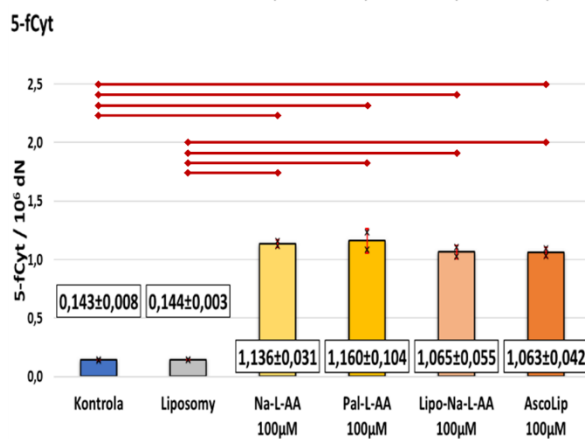
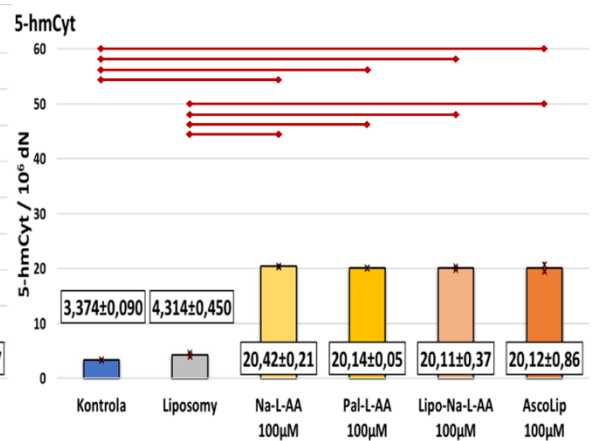
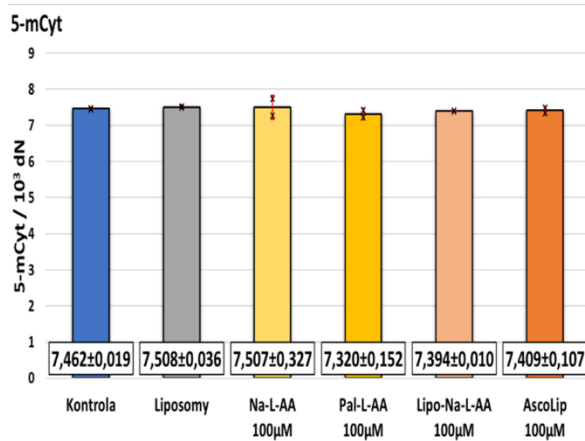
Na-L-AA - askorbinian sodu;

Pal-L-AA - kwas 6-O-palmitoilo-L-askorbinowy;

Lipo-Na-L-AA – askorbinian sodu w nośniku liposomowym;

Tabela 25 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET1KO/TET2KO} po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych postaci witaminy C.

5-mCyt	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,999	0,997	0,928	1,000	0,999
Liposomy	0,983	0,970	0,815	1,000	
Na-L-AA 100µM	0,984	0,970	0,817		
Pal-L-AA 100µM	0,989	0,995			
Lipo-Na-L-AA 100µM	1,000				
5-hmCyt	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,365
Liposomy	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
Na-L-AA 100µM	0,978	0,973	0,982		
Pal-L-AA 100µM	1,000	1,000			
Lipo-Na-L-AA 100µM	1,000				
5-fCyt	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000
Liposomy	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
Na-L-AA 100µM	0,736	0,755	0,996		
Pal-L-AA 100µM	0,510	0,528			
Lipo-Na-L-AA 100µM	1,000				
5-caCyt	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,004	0,003	0,003	0,002	0,962
Liposomy	0,001	0,001	0,001	0,001	
Na-L-AA 100µM	0,661	0,934	0,959		
Pal-L-AA 100µM	0,964	1,000			
Lipo-Na-L-AA 100µM	0,981				
5-hmUra	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,002	0,009	<0,001	<0,001	0,034
Liposomy	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	
Na-L-AA 100µM	0,144	0,020	0,213		
Pal-L-AA 100µM	0,022	0,004			
Lipo-Na-L-AA 100µM	0,193				
Ura	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,018	0,032	0,925	0,418	0,012
Liposomy	0,704	0,404	0,028	0,031	
Na-L-AA 100µM	0,050	0,094	0,562		
Pal-L-AA 100µM	0,042	0,069			
Lipo-Na-L-AA 100µM	0,634				
8-oxoGua	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,349	0,280	0,358	0,416	0,185
Liposomy	0,646	0,036	0,047	0,055	
Na-L-AA 100µM	0,108	0,764	0,906		
Pal-L-AA 100µM	0,091	0,855			
Lipo-Na-L-AA 100µM	0,070				



Rycina 29 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych postaci witaminy C na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET1KO/TET2KO}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżkami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

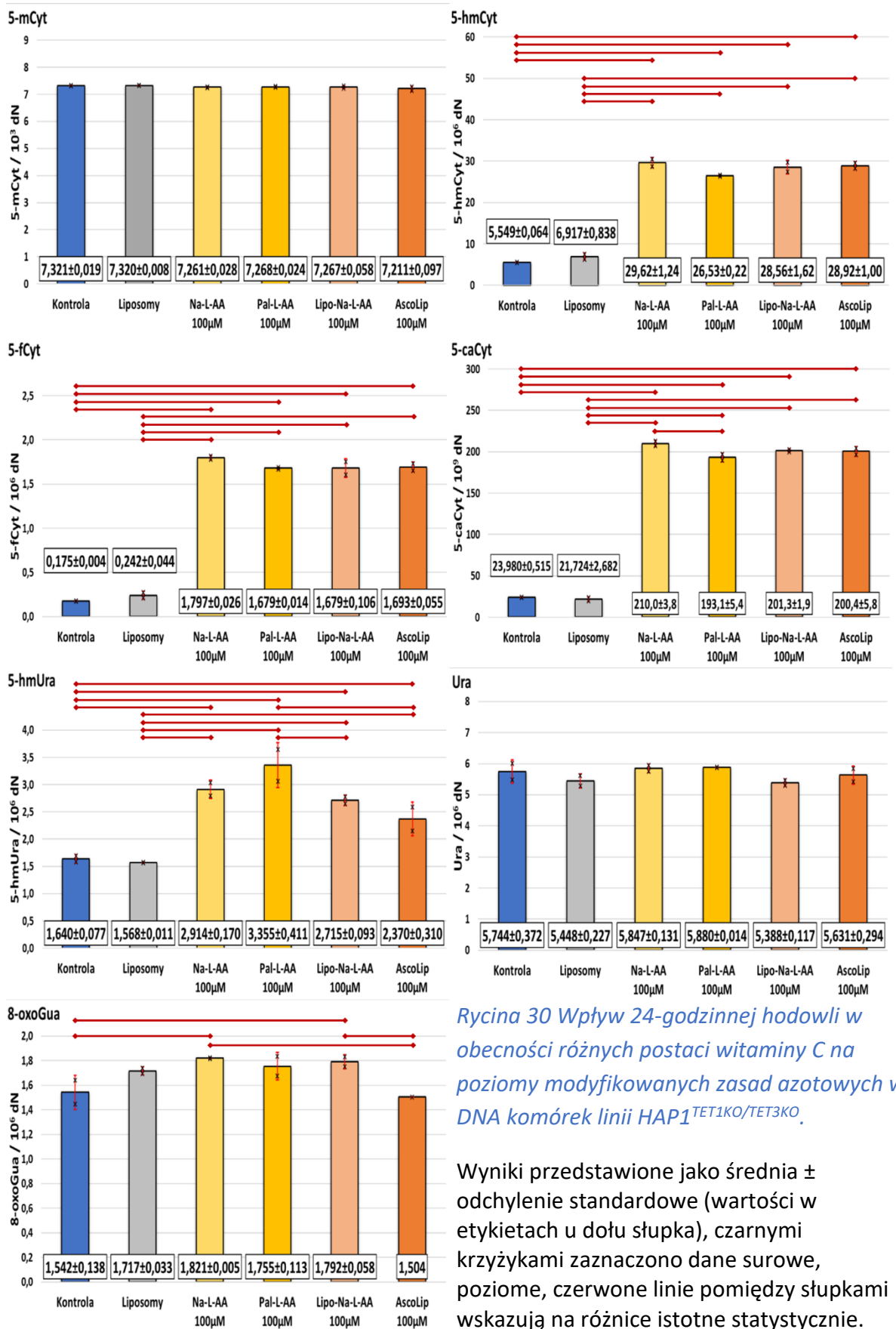
Na-L-AA - askorbinian sodu;

Pal-L-AA - kwas 6-O-palmitoilo-L-askorbinowy;

Lipo-Na-L-AA – askorbinian sodu w nośniku liposomowym;

Tabela 26 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET1KO/TET3KO} po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych postaci witaminy C.

5-mCyt	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,339	0,865	0,877	0,814	1,000
Liposomy	0,344	0,871	0,883	0,821	
Na-L-AA 100µM	0,896	1,000	1,000		
Pal-L-AA 100µM	0,836	1,000			
Lipo-Na-L-AA 100µM	0,849				
5-hmCyt	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,740
Liposomy	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
Na-L-AA 100µM	0,974	0,878	0,129		
Pal-L-AA 100µM	0,284	0,415			
Lipo-Na-L-AA 100µM	0,999				
5-fCyt	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,796
Liposomy	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
Na-L-AA 100µM	0,460	0,353	0,356		
Pal-L-AA 100µM	1,000	1,000			
Lipo-Na-L-AA 100µM	1,000				
5-caCyt	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,988
Liposomy	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
Na-L-AA 100µM	0,255	0,330	0,032		
Pal-L-AA 100µM	0,481	0,380			
Lipo-Na-L-AA 100µM	1,000				
5-hmUra	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,018	0,003	<0,001	0,001	0,764
Liposomy	0,012	0,002	<0,001	0,001	
Na-L-AA 100µM	0,054	0,415	0,100		
Pal-L-AA 100µM	0,005	0,030			
Lipo-Na-L-AA 100µM	0,179				
Ura	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,994	0,640	0,987	0,996	0,773
Liposomy	0,955	1,000	0,474	0,543	
Na-L-AA 100µM	0,918	0,423	1,000		
Pal-L-AA 100µM	0,866	0,364			
Lipo-Na-L-AA 100µM	0,875				
8-oxoGua	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,731	0,032	0,054	0,022	0,095
Liposomy	0,097	0,415	0,672	0,276	
Na-L-AA 100µM	0,029	0,752	0,475		
Pal-L-AA 100µM	0,061	0,679			
Lipo-Na-L-AA 100µM	0,039				

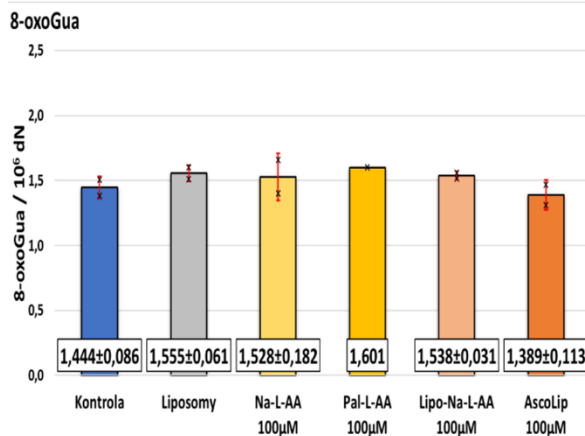
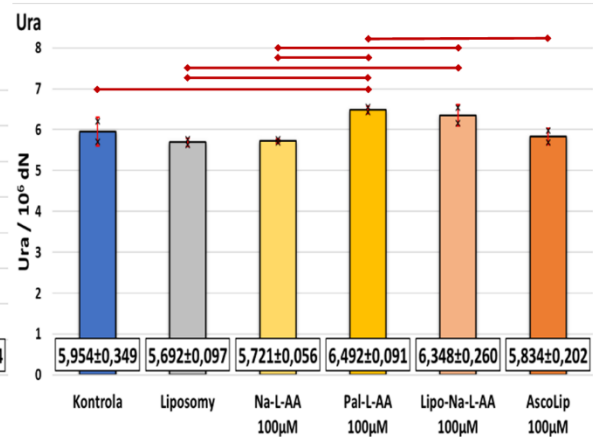
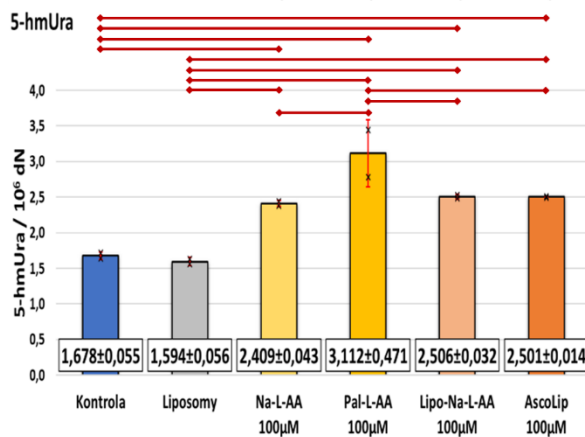
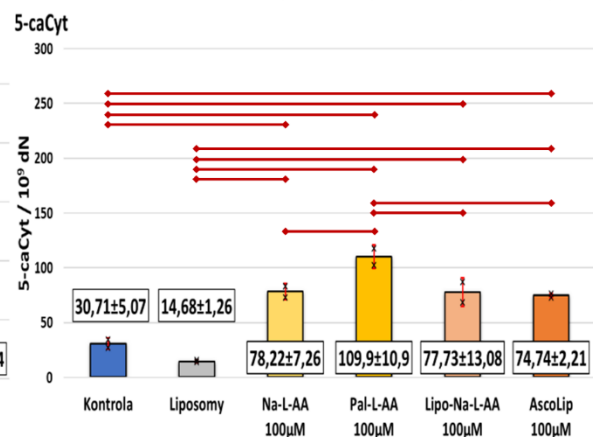
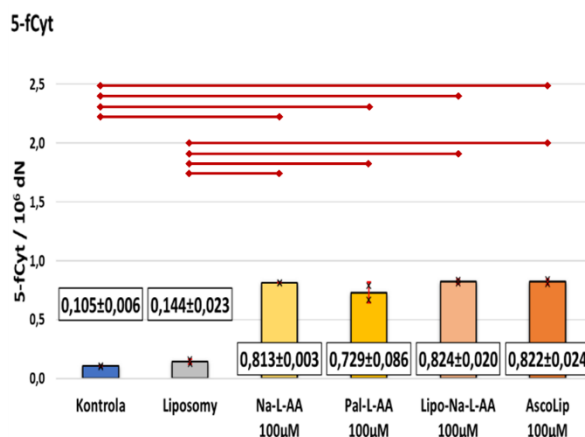
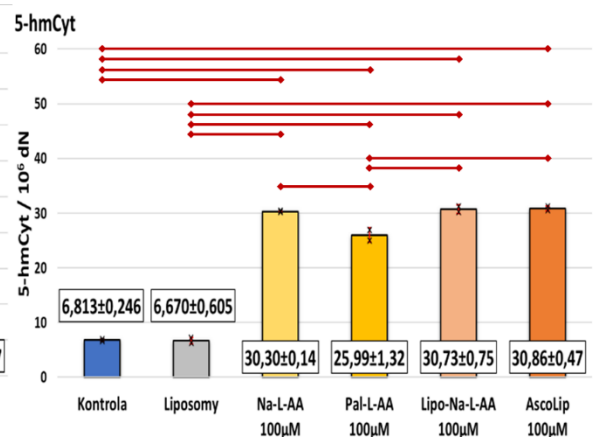
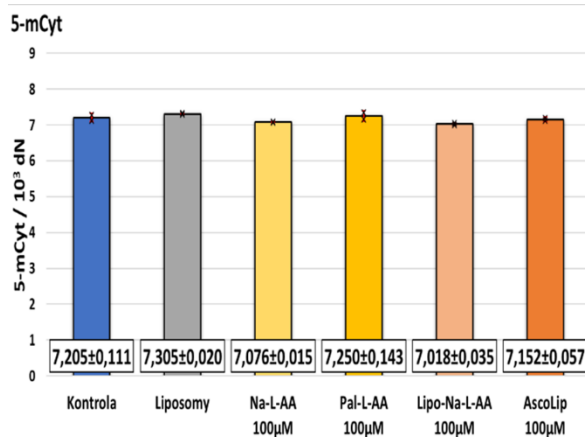


Rycina 30 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych postaci witaminy C na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET1KO/TET3KO}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżkami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.
Na-L-AA - askorbinian sodu;
Pal-L-AA - kwas 6-O-palmitoilo-L-askorbinowy;
Lipo-Na-L-AA – askorbinian sodu w nośniku liposomowym;

Tabela 27 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1TET2KO/TET3KO po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych postaci witaminy C.

5-mCyt	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,980	0,305	0,990	0,617	0,795
Liposomy	0,469	0,075	0,976	0,168	
Na-L-AA 100µM	0,917	0,972	0,360		
Pal-L-AA 100µM	0,812	0,163			
Lipo-Na-L-AA 100µM	0,586				
5-hmCyt	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000
Liposomy	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
Na-L-AA 100µM	0,958	0,985	0,007		
Pal-L-AA 100µM	0,004	0,004			
Lipo-Na-L-AA 100µM	1,000				
5-fCyt	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,904
Liposomy	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
Na-L-AA 100µM	1,000	1,000	0,363		
Pal-L-AA 100µM	0,285	0,269			
Lipo-Na-L-AA 100µM	1,000				
5-caCyt	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,011	0,008	0,001	0,007	0,421
Liposomy	0,002	0,002	<0,001	0,002	
Na-L-AA 100µM	0,997	1,000	0,048		
Pal-L-AA 100µM	0,031	0,045			
Lipo-Na-L-AA 100µM	0,998				
5-hmUra	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,006	0,006	0,000	0,010	0,685
Liposomy	0,004	0,003	0,000	0,006	
Na-L-AA 100µM	0,654	0,638	0,012		
Pal-L-AA 100µM	0,021	0,021			
Lipo-Na-L-AA 100µM	0,982				
Ura	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,993	0,940	0,828	0,960	0,891
Liposomy	0,660	1,000	0,999	1,000	
Na-L-AA 100µM	0,781	1,000	0,991		
Pal-L-AA 100µM	0,627	0,995			
Lipo-Na-L-AA 100µM	0,739				
8-oxoGua	AscoLip 100µM	Lipo-Na-L- AA 100µM	Pal-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,993	0,940	0,828	0,960	0,891
Liposomy	0,660	1,000	0,999	1,000	
Na-L-AA 100µM	0,781	1,000	0,991		
Pal-L-AA 100µM	0,627	0,995			
Lipo-Na-L-AA 100µM	0,739				



Rycina 31 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych postaci witaminy C na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET2KO/TET3KO}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

Na-L-AA - askorbinian sodu;

Pal-L-AA - kwas 6-O-palmitoilo-L-askorbinowy;

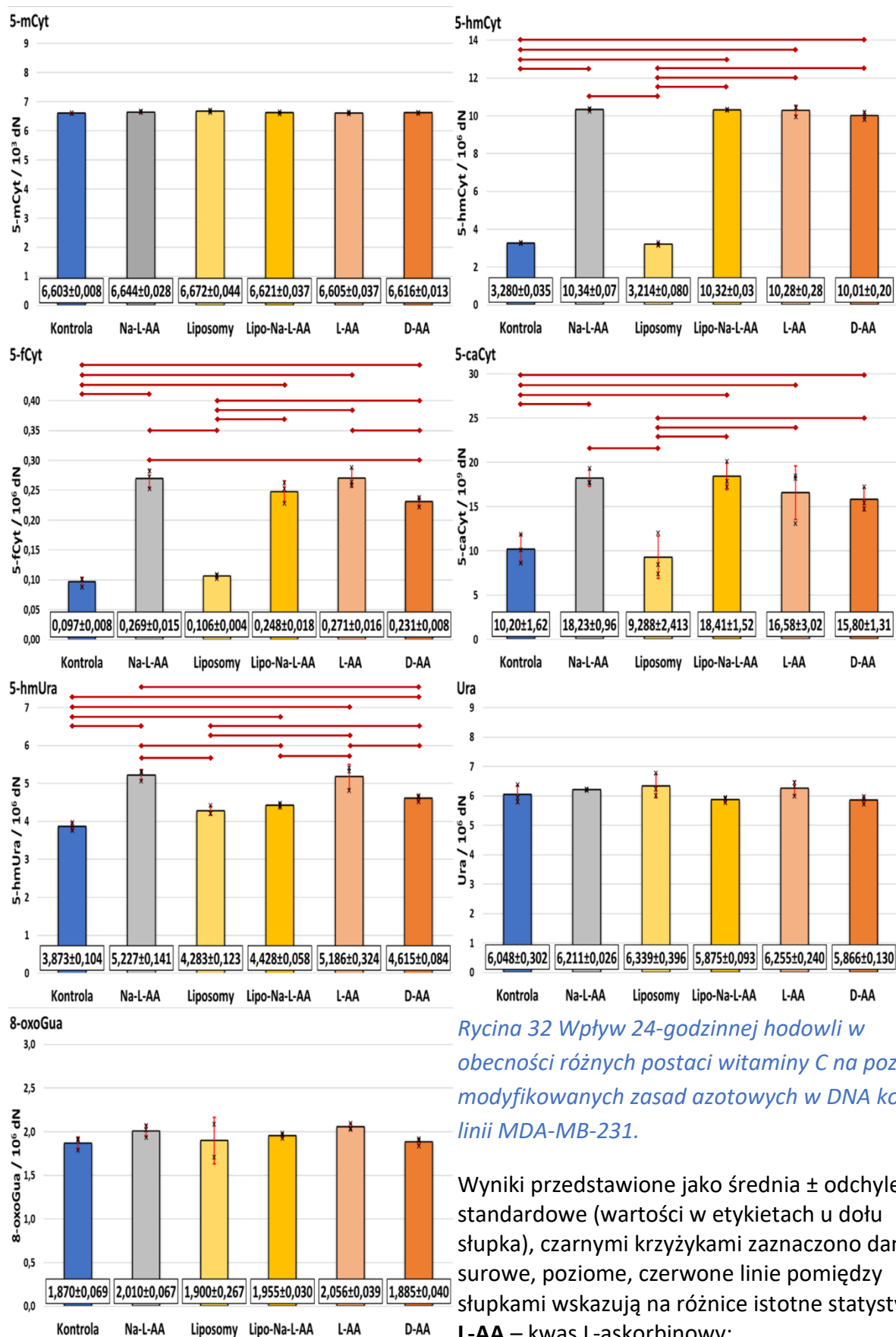
Lipo-Na-L-AA – askorbinian sodu w nośniku liposomowym;

W dalszym toku prowadzonych badań postanowiono przetestować działanie poszczególnych form witaminy C w linii komórkowej MDA-MB-231. Linia ta charakteryzuje się zaburzeniami w ekspresji receptorów odpowiedzialnych za transport tego związku do wnętrza komórki, a co za tym idzie stanowi doskonały model do badania wpływu liposomalnej witaminy C, która teoretycznie powinna działać w sposób niezależny od obecności transporterów tego związku na powierzchni komórek. W tym celu komórki wspomnianej linii eksponowano na kwas askorbinowy (izomer L i D), sól sodową kwasu L-askorbinowego i jej postać liposomalną, w stężeniu 100 $\mu\text{mol/l}$. Kontrolę stanowiły zarówno komórki hodowane w medium bez dodatków, jak i te eksponowane na „puste” liposomy. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych, a jego wyniki przedstawiono na Rycinie 32, a wyniki analiz statystycznych w Tabeli 28.

Warto zwrócić uwagę, iż podobnie jak miało to miejsce w przypadku linii HAP1, obserwowano znaczący wzrost 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt po ekspozycji na którąkolwiek z form witaminy C, a jednocześnie różnice pomiędzy poszczególnymi formami wykazywały brak istotności statystycznej. Nie zaobserwowano także istotnych różnic pomiędzy grupą kontrolną, a komórkami eksponowanymi na „puste” liposomy.

Tabela 28 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek MDA-MB-231 po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych postaci witaminy C.

5-mCyt	Lipo-Na-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	D-AA 100µM	L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,972	0,577	0,992	1,000	0,126
Liposomy	0,369	0,858	0,288	0,149	
L-AA 100µM	0,986	0,640	0,997		
D-AA 100µM	1,000	0,869			
Na-L-AA 100µM	0,933				
5-hmCyt	Lipo-Na-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	D-AA 100µM	L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,593
Liposomy	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
L-AA 100µM	0,787	0,659	0,041		
D-AA 100µM	0,025	0,018			
Na-L-AA 100µM	0,862				
5-fCyt	Lipo-Na-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	D-AA 100µM	L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,933
Liposomy	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
L-AA 100µM	0,295	1,000	0,021		
D-AA 100µM	0,584	0,025			
Na-L-AA 100µM	0,344				
5-caCyt	Lipo-Na-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	D-AA 100µM	L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,002	0,003	0,037	0,016	0,991
Liposomy	0,001	0,001	0,014	0,006	
L-AA 100µM	0,849	0,895	0,996		
D-AA 100µM	0,585	0,651			
Na-L-AA 100µM	1,000				
5-hmUra	Lipo-Na-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	D-AA 100µM	L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,010
Liposomy	0,300	<0,001	0,029	<0,001	
L-AA 100µM	<0,001	0,765	0,001		
D-AA 100µM	0,189	0,001			
Na-L-AA 100µM	<0,001				
Ura	Lipo-Na-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	D-AA 100µM	L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,939	0,952	0,927	0,880	0,660
Liposomy	0,224	0,982	0,210	0,997	
L-AA 100µM	0,405	1,000	0,384		
D-AA 100µM	1,000	0,504			
Na-L-AA 100µM	0,529				
8-oxoGua	Lipo-Na-L-AA 100µM	Na-L-AA 100µM	D-AA 100µM	L-AA 100µM	Liposomy
Kontrola	0,870	0,496	1,000	0,233	0,999
Liposomy	0,985	0,790	1,000	0,496	
L-AA 100µM	0,777	0,989	0,303		
D-AA 100µM	0,936	0,603			
Na-L-AA 100µM	0,977				



Rycina 32 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych postaci witaminy C na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii MDA-MB-231.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

- L-AA** – kwas L-askorbinowy;
- D-AA** – kwas D-izoaskorbinowy;
- Na-L-AA** – askorbinian sodu;
- Lipo-Na-L-AA** – askorbinian sodu w nośniku liposomowym;

4.2. Wpływ potencjalnych inhibitorów aktywności enzymatycznej białek rodziny TET na poziomy ich produktów w DNA

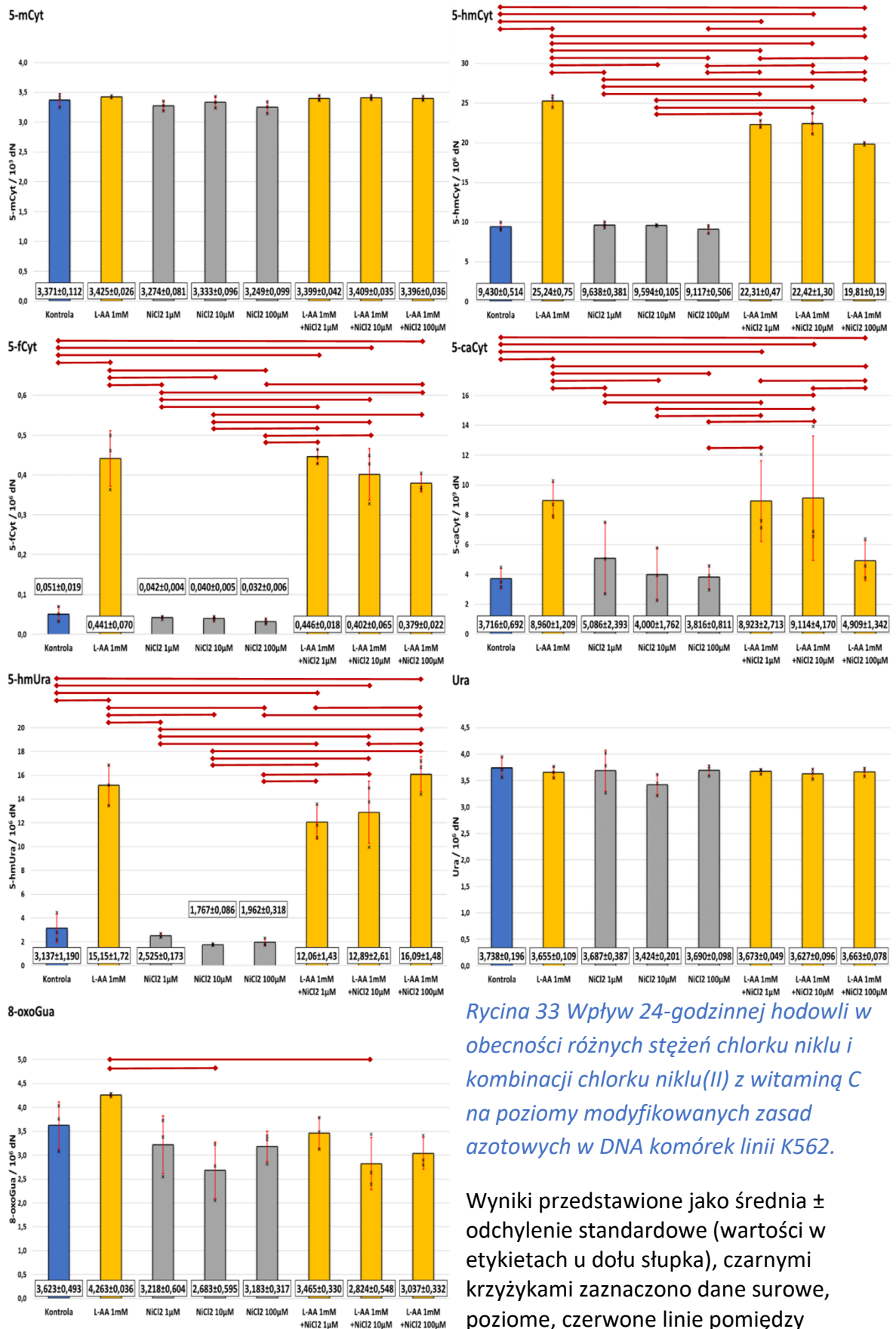
4.2.1 Jony niklu(II)

Jak już wcześniej wspomniano, jednym z czynników niezbędnych dla aktywności białek rodziny TET jest obecność jonów żelaza na drugim stopniu utlenienia w centrum aktywnym enzymu. Jednakże inne dwuwartościowe jony metali, o podobnym ładunku i rozmiarach, mogą potencjalnie łączyć się z centrum aktywnym dioksygenaz, wpływając na ich aktywność. W duchu tej teorii, jony niklu(II) mogą niejako wypierać jony żelaza z centrum aktywnego białek TET, tym samym obniżać/hamować ich aktywność. Aby przetestować tę teorię, wykonano eksperyment polegający na 24-godzinnej hodowli komórek linii K562 w trzech stężeniach (1 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$ i 100 $\mu\text{mol/l}$) chlorku niklu (NiCl_2). Do części naczyń hodowlanych zawierających chlorek niklu, dodano witaminę C w stężeniu 1 mmol/l , by odpowiedzieć na pytanie, czy obecność jonów tego metalu wpływa na zdolność witaminy C do stymulowania aktywności białek TET. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych, a jego wyniki przedstawiono na Rycinie 33. Jednocześnie w Tabeli 29 zamieszczono wyniki analiz statystycznych.

Uwagę zwraca brak różnic statystycznych w zmierzonych poziomach epigenetycznych modyfikacji DNA pomiędzy grupą kontrolną, a komórkami hodowanymi w obecności jonów chlorku niklu. Podobnie jak w poprzednich eksperymentach, ekspozycja na witaminę C skutkowała istotnym statystycznie wzrostem poziomu 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt i 5-hmUra, jednakże w obecności jonów niklu, związek ten istotnie słabiej indukował powstawanie 5-hmCyt.

Tabela 29 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek K562 po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń chlorku niklu i kombinacji chlorku niklu z witaminą C.

5-mCyt	L-AA 1mM + NiCl ₂ 100μM	L-AA 1mM + NiCl ₂ 10μM	L-AA 1mM + NiCl ₂ 1μM	NiCl ₂ 100μM	NiCl ₂ 10μM	NiCl ₂ 1μM	L-AA 1mM
Kontrola	1,000	1,000	1,000	0,620	1,000	0,842	0,998
L-AA 1mM	1,000	1,000	1,000	0,302	0,932	0,491	
NiCl ₂ 1μM	0,621	0,493	0,589	1,000	0,991		
NiCl ₂ 10μM	0,987	0,957	0,982	0,925			
NiCl ₂ 100μM	0,386	0,284	0,359				
L-AA 1mM + NiCl ₂ 1μM	1,000	1,000					
L-AA 1mM + NiCl ₂ 10μM	1,000						
5-hmCyt	L-AA 1mM + NiCl ₂ 100μM	L-AA 1mM + NiCl ₂ 10μM	L-AA 1mM + NiCl ₂ 1μM	NiCl ₂ 100μM	NiCl ₂ 10μM	NiCl ₂ 1μM	L-AA 1mM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000	<0,001
L-AA 1mM	<0,001	0,013	0,009	<0,001	<0,001	<0,001	
NiCl ₂ 1μM	<0,001	<0,001	<0,001	0,998	1,000		
NiCl ₂ 10μM	<0,001	<0,001	<0,001	0,999			
NiCl ₂ 100μM	<0,001	<0,001	0,000				
L-AA 1mM + NiCl ₂ 1μM	0,035	1,000					
L-AA 1mM + NiCl ₂ 10μM	0,025						
5-fCyt	L-AA 1mM + NiCl ₂ 100μM	L-AA 1mM + NiCl ₂ 10μM	L-AA 1mM + NiCl ₂ 1μM	NiCl ₂ 100μM	NiCl ₂ 10μM	NiCl ₂ 1μM	L-AA 1mM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	0,999	1,000	1,000	<0,001
L-AA 1mM	0,415	0,884	1,000	<0,001	<0,001	<0,001	
NiCl ₂ 1μM	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000		
NiCl ₂ 10μM	<0,001	<0,001	<0,001	1,000			
NiCl ₂ 100μM	<0,001	<0,001	<0,001				
L-AA 1mM + NiCl ₂ 1μM	0,327	0,808					
L-AA 1mM + NiCl ₂ 10μM	0,997						
5-caCyt	L-AA 1mM + NiCl ₂ 100μM	L-AA 1mM + NiCl ₂ 10μM	L-AA 1mM + NiCl ₂ 1μM	NiCl ₂ 100μM	NiCl ₂ 10μM	NiCl ₂ 1μM	L-AA 1mM
Kontrola	0,500	0,006	0,007	0,954	0,872	0,439	0,007
L-AA 1mM	0,030	0,930	0,983	0,008	0,010	0,037	
NiCl ₂ 1μM	0,920	0,031	0,039	0,473	0,539		
NiCl ₂ 10μM	0,606	0,008	0,010	0,917			
NiCl ₂ 100μM	0,536	0,006	0,008				
L-AA 1mM + NiCl ₂ 1μM	0,032	0,913					
L-AA 1mM + NiCl ₂ 10μM	0,025						
5-hmUra	L-AA 1mM + NiCl ₂ 100μM	L-AA 1mM + NiCl ₂ 10μM	L-AA 1mM + NiCl ₂ 1μM	NiCl ₂ 100μM	NiCl ₂ 10μM	NiCl ₂ 1μM	L-AA 1mM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	0,982	0,952	1,000	<0,001
L-AA 1mM	0,996	0,559	0,190	<0,001	<0,001	<0,001	
NiCl ₂ 1μM	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	0,999		
NiCl ₂ 10μM	<0,001	<0,001	<0,001	1,000			
NiCl ₂ 100μM	<0,001	<0,001	<0,001				
L-AA 1mM + NiCl ₂ 1μM	0,036	0,999					
L-AA 1mM + NiCl ₂ 10μM	0,158						
Ura	L-AA 1mM + NiCl ₂ 100μM	L-AA 1mM + NiCl ₂ 10μM	L-AA 1mM + NiCl ₂ 1μM	NiCl ₂ 100μM	NiCl ₂ 10μM	NiCl ₂ 1μM	L-AA 1mM
Kontrola	1,000	0,999	1,000	1,000	0,625	1,000	1,000
L-AA 1mM	1,000	1,000	1,000	1,000	0,894	1,000	
NiCl ₂ 1μM	1,000	1,000	1,000	1,000	0,806		
NiCl ₂ 10μM	0,877	0,948	0,848	0,796			
NiCl ₂ 100μM	1,000	1,000	1,000				
L-AA 1mM + NiCl ₂ 1μM	1,000	1,000					
L-AA 1mM + NiCl ₂ 10μM	1,000						
8-oxoGua	L-AA 1mM + NiCl ₂ 100μM	L-AA 1mM + NiCl ₂ 10μM	L-AA 1mM + NiCl ₂ 1μM	NiCl ₂ 100μM	NiCl ₂ 10μM	NiCl ₂ 1μM	L-AA 1mM
Kontrola	0,840	0,511	1,000	0,966	0,305	0,980	0,768
L-AA 1mM	0,079	0,024	0,513	0,164	0,011	0,194	
NiCl ₂ 1μM	1,000	0,983	0,999	1,000	0,897		
NiCl ₂ 10μM	0,992	1,000	0,539	0,928			
NiCl ₂ 100μM	1,000	0,991	0,998				
L-AA 1mM + NiCl ₂ 1μM	0,971	0,766					
L-AA 1mM + NiCl ₂ 10μM	1,000						



Rycina 33 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń chlorku niklu i kombinacji chlorku niklu(II) z witaminą C na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii K562.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

L-AA – kwas L-askorbinowy;
NiCl2 – chlorek niklu(II)

4.2.2 Deferoksyamina

Podążając za teorią o możliwości modulowania aktywności białek TET poprzez wprowadzanie zmian w puli dostępnych jonów żelaza postanowiono zbadać wpływ deferoksyaminy – chelatora jonów Fe(III) na profil epigenetyczny komórek. W tym celu przez 24 godziny hodowano komórki parentalnej linii HAP1^{WT} i z funkcjonalnymi nokautami: *TET1KO*, *TET2KO* i *TET3KO* w obecności deferoksyaminy (DFO) w stężeniach 100 μmol/l, 50 μmol/l, 25 μmol/l i 10 μmol/l; chlorku żelaza (FeCl₃) w stężeniach 100 μmol/l, 50 μmol/l, 25 μmol/l i 10 μmol/l, witaminy C w stężeniu 100 μmol/l, a także kombinacji powyższych związków. Takie podejście pozwala nie tylko określić wpływ samej deferoksyaminy na aktywność białek TET, ale także suplementacji komórek jonami Fe(III), potencjalną możliwość odwrócenia efektu deferoksyaminy poprzez dodatek równo molowego ekwiwalentu jonów żelaza, jak również odpowiedzieć na pytanie, czy zubożenie puli dostępnych w środowisku jonów żelaza wpływa na zdolność witaminy C do stymulowania aktywności białek TET.

Z racji szerokiego spektrum zastosowanych związków i stężeń, eksperyment wykonano w jednym powtórzeniu biologicznym, a jego wyniki zebrano w Tabeli 30 (dla linii HAP1^{WT}), Tabeli 31 (dla linii HAP1^{TET1KO}), Tabeli 32 (dla linii HAP1^{TET2KO}) i Tabeli 33 dla linii HAP1^{TET3KO}).

Uwagę zwraca fakt, iż zarówno suplementacja chlorkiem żelaza, deferoksyaminą, jak i mieszkanką tych dwóch związków, niezależnie od zastosowanego stężenia, nie wpływa istotnie na poziom epigenetycznych modyfikacji w DNA badanych linii. Jednocześnie, w przypadku wszystkich linii suplementacja 100 μmol/l witaminy C skutkowała wzrostem 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt.

Tabela 30 Poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA po ekspozycji na różne stężenia deferoksyminy (DFO), chlorku żelaza (FeCl₃), witaminy C (L-AA) i kombinacji tych związków w linii HAP1^{WT}.

Zastosowany związek	5-mCyt/10 ³ dN	5-hmCyt/10 ⁶ dN	5-fCyt/10 ⁶ dN	5-caCyt/10 ⁹ dN	5-hmUra/10 ⁶ dN	Ura/10 ⁶ dN	8-oxoGua/10 ⁶ dN
Kontrola (DPBS)	7,070	7,400	0,147	14,543	1,073	3,581	1,562
DFO 100µM	b.d.	4,905	0,090	13,430	1,075	b.d.	b.d.
FeCl ₃ 100µM	6,932	7,169	0,165	16,282	1,231	3,034	1,771
L-AA 100µM	6,943	27,391	1,344	197,07	1,312	2,848	1,190
FeCl ₃ 100µM + DFO 100µM	7,026	6,027	0,115	13,248	0,857	2,667	1,353
L-AA 100µM + DFO 100µM	7,113	10,951	0,292	31,236	1,098	2,689	1,361
L-AA 100µM + FeCl ₃ 100µM	6,978	23,635	0,776	91,002	1,187	2,867	1,466
DFO 50µM	7,115	4,517	0,097	12,540	0,995	3,182	1,447
FeCl ₃ 50µM	7,081	7,383	0,169	13,371	1,062	2,770	1,120
FeCl ₃ 50µM + DFO 50µM	6,841	8,504	0,173	18,055	1,130	3,536	1,324
L-AA 100µM + DFO 50µM	7,096	21,97	0,781	91,280	1,441	3,813	1,643
L-AA 100µM + FeCl ₃ 50µM	6,939	31,43	0,979	114,79	1,358	3,500	1,556
DFO 25µM	7,162	5,186	0,094	11,865	1,101	3,415	1,496
FeCl ₃ 25µM	6,907	7,746	0,145	16,460	1,010	b.d.	1,540
FeCl ₃ 25µM + DFO 25µM	6,967	7,992	0,162	17,205	1,211	b.d.	b.d.
L-AA 100µM + DFO 25µM	7,061	22,37	1,004	127,55	1,349	3,053	1,470
L-AA 100µM + FeCl ₃ 25µM	6,603	27,53	0,994	127,87	1,005	2,871	b.d.
DFO 10µM	7,079	5,003	0,100	12,399	0,888	2,884	1,597
FeCl ₃ 10µM	6,863	7,368	0,143	15,046	1,012	3,209	1,481
FeCl ₃ 10µM + DFO 10µM	6,957	7,554	0,144	16,657	1,063	3,503	1,461
L-AA 100µM + DFO 10µM	6,773	31,74	1,591	240,50	1,708	3,506	1,795
L-AA 100µM + FeCl ₃ 10µM	6,769	29,44	1,265	189,84	1,076	2,877	1,470
L-AA 100µM + FeCl ₃ 100µM + DFO 100µM	6,910	38,68	1,430	210,72	1,395	4,075	2,154
L-AA 100µM + FeCl ₃ 50µM + DFO 50µM	6,809	37,37	1,505	216,66	1,438	3,781	2,191
L-AA 100µM + FeCl ₃ 25µM + DFO 25µM	6,833	38,06	1,733	251,96	1,618	3,776	2,132
L-AA 100µM + FeCl ₃ 10µM + DFO 10µM	6,949	39,41	1,725	242,99	1,569	3,688	3,398

Tabela 31 Poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA po ekspozycji na różne stężenia deferoksyminy (DFO), chlorku żelaza (FeCl₃), witaminy C (L-AA) i kombinacji tych związków w linii HAP1^{TET}KO.

Zastosowany związek	5-mCyt/10 ³ dN	5-hmCyt/10 ⁶ dN	5-fCyt/10 ⁶ dN	5-caCyt/10 ⁹ dN	5-hmUra/10 ⁶ dN	Ura/10 ⁶ dN	8-oxoGua/10 ⁶ dN
Kontrola (DPBS)	7,016	4,196	0,082	14,06	0,783	5,490	2,425
DFO 100µM	b.d.	3,525	0,055	24,47	0,801	b.d.	b.d.
FeCl ₃ 100µM	6,938	4,597	0,113	14,74	0,996	5,084	1,899
L-AA 100µM	6,925	20,61	1,034	151,3	1,163	5,440	1,600
FeCl ₃ 100µM + DFO 100µM	6,941	4,816	0,111	15,87	0,859	5,258	1,775
L-AA 100µM + DFO 100µM	6,970	10,18	0,282	47,56	1,258	b.d.	2,983
L-AA 100µM + FeCl ₃ 100µM	6,899	18,59	0,583	73,13	1,295	5,625	1,526
DFO 50µM	7,173	4,018	0,055	21,66	0,949		2,638
FeCl ₃ 50µM	7,118	4,960	0,113	15,51	0,997	4,998	2,427
FeCl ₃ 50µM + DFO 50µM	7,019	4,970	0,100	16,90	0,895	6,012	2,298
L-AA 100µM + DFO 50µM	7,132	12,60	0,510	64,05	1,158	6,419	2,451
L-AA 100µM + FeCl ₃ 50µM	6,882	18,53	0,572	77,40	0,988	5,838	2,482
DFO 25µM	7,171	3,561	0,055	16,85	0,745	6,418	2,516
FeCl ₃ 25µM	7,067	4,492	0,082	15,70	0,775	b.d.	2,175
FeCl ₃ 25µM + DFO 25µM	7,057	4,678	0,097	18,69	0,766	b.d.	b.d.
L-AA 100µM + DFO 25µM	7,169	16,11	0,770	111,7	1,219	6,385	2,573
L-AA 100µM + FeCl ₃ 25µM	7,057	20,40	0,739	102,7	0,902	5,597	b.d.
DFO 10µM	7,057	3,514	0,068	16,04	0,723	5,302	2,531
FeCl ₃ 10µM	6,932	4,412	0,093	15,76	0,811	5,336	2,954
FeCl ₃ 10µM + DFO 10µM	7,051	4,450	0,087	15,54	0,775	5,203	2,535
L-AA 100µM + DFO 10µM	6,979	19,48	0,930	140,1	1,120	5,335	2,557
L-AA 100µM + FeCl ₃ 10µM	6,882	20,70	0,889	133,5	0,876	5,743	2,727
L-AA 100µM + FeCl ₃ 100µM + DFO 100µM	7,009	23,08	1,076	157,6	1,124	5,824	2,175
L-AA 100µM + FeCl ₃ 50µM + DFO 50µM	6,770	23,01	1,046	161,9	1,066	5,826	2,853
L-AA 100µM + FeCl ₃ 25µM + DFO 25µM	7,126	22,97	1,072	167,2	0,805	5,728	2,871
L-AA 100µM + FeCl ₃ 10µM + DFO 10µM	6,946	16,42	0,762	115,9	0,744	b.d.	1,628

Tabela 32 Poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA po ekspozycji na różne stężenia deferoksyminy (DFO), chlorku żelaza (FeCl₃), witaminy C (L-AA) i kombinacji tych związków w linii HAP1^{TET2KO}.

Zastosowany związek	5-mCyt/10 ³ dN	5-hmCyt/10 ⁶ dN	5-fCyt/10 ⁶ dN	5-caCyt/10 ⁹ dN	5-hmUra/10 ⁶ dN	Ura/10 ⁶ dN	8-oxoGua/10 ⁶ dN
Kontrola (DPBS)	6,919	3,508	0,066	21,81	0,877	4,391	5,494
DFO 100μM	b.d.	5,161	0,159	130,1	1,910	b.d.	b.d.
FeCl ₃ 100μM	6,988	3,542	0,087	18,43	1,367	3,968	4,630
L-AA 100μM	6,981	14,83	0,437	69,90	1,150	4,327	4,791
FeCl ₃ 100μM + DFO 100μM	7,196	4,223	0,076	27,60	1,022	4,922	5,418
L-AA 100μM + DFO 100μM	7,135	6,074	0,115	53,31	1,035	4,875	6,599
L-AA 100μM + FeCl ₃ 100μM	7,002	11,69	0,241	38,90	1,295	4,068	5,525
DFO 50μM	7,085	2,917	0,022	36,72	0,971	4,533	4,246
FeCl ₃ 50μM	7,218	3,976	0,075	24,46	1,053	4,289	4,687
FeCl ₃ 50μM + DFO 50μM	6,956	3,862	0,063	20,64	0,931	4,392	4,348
L-AA 100μM + DFO 50μM	7,191	8,235	0,191	49,03	1,223	4,436	5,004
L-AA 100μM + FeCl ₃ 50μM	6,912	13,27	0,289	43,76	1,852	4,683	3,963
DFO 25μM	7,007	2,855	0,043	31,94	0,813	4,476	4,935
FeCl ₃ 25μM	6,812	6,607	0,108	39,64	1,611	b.d.	7,883
FeCl ₃ 25μM + DFO 25μM	7,023	7,248	0,099	37,12	1,755	b.d.	b.d.
L-AA 100μM + DFO 25μM	7,036	9,248	0,273	44,93	1,098	3,854	4,858
L-AA 100μM + FeCl ₃ 25μM	6,895	17,19	0,401	61,89	1,395	5,808	b.d.
DFO 10μM	6,932	3,164	0,046	22,30	0,941	4,504	7,446
FeCl ₃ 10μM	6,915	3,889	0,073	25,64	0,968	4,488	6,789
FeCl ₃ 10μM + DFO 10μM	6,791	3,628	0,046	30,26	0,973	4,374	4,853
L-AA 100μM + DFO 10μM	6,982	13,70	0,407	60,81	1,504	4,740	4,555
L-AA 100μM + FeCl ₃ 10μM	6,959	15,73	0,390	61,79	1,198	4,603	6,158
L-AA 100μM + FeCl ₃ 100μM + DFO 100μM	6,894	16,22	0,443	61,96	1,215	4,762	6,340
L-AA 100μM + FeCl ₃ 50μM + DFO 50μM	7,086	15,83	0,428	69,39	1,188	4,608	5,764
L-AA 100μM + FeCl ₃ 25μM + DFO 25μM	7,034	16,47	0,467	69,58	1,339	4,703	6,224
L-AA 100μM + FeCl ₃ 10μM + DFO 10μM	7,109	17,00	0,473	65,74	1,431	4,599	6,671

Tabela 33 Poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA po ekspozycji na różne stężenia deferoksyminy (DFO), chlorku żelaza (FeCl₃), witaminy C (L-AA) i kombinacji tych związków w linii HAP1^{TET3KO}.

Zastosowany związek	5-mCyt/10 ⁵ dN	5-hmCyt/10 ⁵ dN	5-fCyt/10 ⁶ dN	5-caCyt/10 ⁹ dN	5-hmUra/10 ⁶ dN	Ura/10 ⁶ dN	8-oxoGua/10 ⁶ dN
Kontrola (DPBS)	7,001	8,378	0,111	17,56	0,898	4,812	5,223
DFO 100µM	b.d.	7,208	0,045	30,74	1,021		
FeCl ₃ 100µM	7,038	9,311	0,162	16,38	1,456	4,528	6,157
L-AA 100µM	6,976	39,18	1,641	228,2	1,792	4,579	5,553
FeCl ₃ 100µM + DFO 100µM	7,103	8,979	0,114	18,90	0,990	4,314	5,987
L-AA 100µM + DFO 100µM	7,367	15,40	0,293	56,49	1,422	4,703	5,752
L-AA 100µM + FeCl ₃ 100µM	7,120	35,13	1,081	132,2	1,523	4,559	6,189
DFO 50µM	7,335	7,036	0,085	23,22	1,041	4,509	6,437
FeCl ₃ 50µM	7,099	9,157	0,142	18,01	1,127	4,390	5,740
FeCl ₃ 50µM + DFO 50µM	6,783	8,282	0,123	14,73	0,998	4,797	5,726
L-AA 100µM + DFO 50µM	7,155	20,20	0,531	65,69	1,304	4,674	6,018
L-AA 100µM + FeCl ₃ 50µM	7,102	35,00	1,064	141,9	1,183	4,505	6,099
DFO 25µM	7,094	6,988	0,093	18,29	0,901	4,683	5,962
FeCl ₃ 25µM	7,037	8,606	0,123	19,09	0,995	b.d.	5,209
FeCl ₃ 25µM + DFO 25µM	7,058	8,375	0,118	17,25	0,880	b.d.	b.d.
L-AA 100µM + DFO 25µM	7,100	24,42	0,863	113,7	1,493	4,261	2,815
L-AA 100µM + FeCl ₃ 25µM	7,053	34,23	1,081	149,2	0,948	4,143	b.d.
DFO 10µM	7,139	6,384	0,085	13,96	0,833	4,047	2,085
FeCl ₃ 10µM	7,155	6,976	0,105	16,60	0,745	3,922	2,172
FeCl ₃ 10µM + DFO 10µM	7,036	7,089	0,087	14,98	0,688	3,729	2,027
L-AA 100µM + DFO 10µM	7,054	29,27	1,191	162,6	1,387	3,923	2,756
L-AA 100µM + FeCl ₃ 10µM	7,058	32,99	1,221	166,3	0,917	3,820	1,884
L-AA 100µM + FeCl ₃ 100µM + DFO 100µM	7,004	34,68	1,360	191,2	1,070	4,411	2,235
L-AA 100µM + FeCl ₃ 50µM + DFO 50µM	7,046	38,76	1,469	208,3	1,295	5,054	2,576
L-AA 100µM + FeCl ₃ 25µM + DFO 25µM	7,100	39,42	1,591	224,6	1,458	4,907	2,698
L-AA 100µM + FeCl ₃ 10µM + DFO 10µM	7,025	40,08	1,482	203,1	1,226	4,940	2,622

4.3. Wpływ innych czynników na białka TET

Podczas realizacji niniejszej pracy w głównej mierze skupiono się na potencjalnych aktywatorach i inhibitorach aktywności białek rodziny TET. Jednakże w toku prowadzonych badań pojawiły się aspekty i pytania, które być może nie zawsze dotyczyły wpływu poszczególnych substancji *per se* na aktywność białek rodziny TET, ale obejmowały zagadnienia mogące wpływać na nią pośrednio, a których zbadanie niejako dopełnia obrazu, jaki wyłania się z wcześniejszych doświadczeń. Poniżej zestawiono wyniki eksperymentów z użyciem szeregu czynników, o nie do końca poznanych mechanizmach działania, które potencjalnie mogą wpływać na epigenom komórki, a w szczególności wpływać na poziomy epigenetycznych modyfikacji w DNA, których powstawanie tradycyjnie przypisuje się aktywności białek TET.

4.3.1 Ditiotreitrol

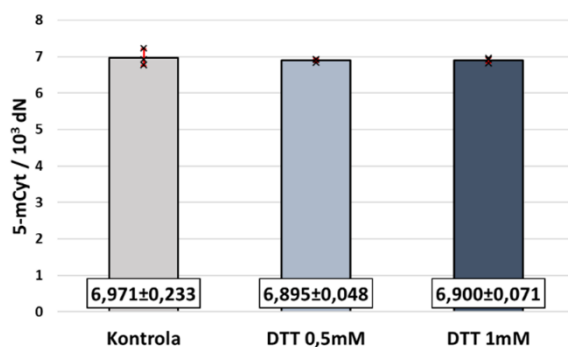
Ditiotreitrol (DTT) jest słabym, hydrofilowym reduktorem, zdolnym do redukcji mostków disiarczkowych w łańcuchach białkowych, a co za tym idzie, jest częstym dodatkiem do buforów używanych podczas izolacji materiału genetycznego. O ile w odczynnikach zastosowanych na potrzeby realizacji niniejszej pracy nie występuje ten związek, to autorzy wielu publikacji dotyczących analiz modyfikacji epigenetycznych w DNA zeznają jego używanie. Dlatego też postanowiono zbadać, czy ekspozycja komórek na DTT wpływa na poziomy analizowanych modyfikacji epigenetycznych w DNA, a niejako przy okazji odpowiedzieć na pytanie, czy inne związki o potencjale redukcyjnym mogą wpływać na obserwowane w DNA poziomy pochodnych 5-mCyt. W tym celu komórki linii HAP1^{WT} hodowano przez 24 godziny w obecności 0,5 mmol/l i 1 mmol/l DTT. Kontrolę stanowiły komórki hodowane w medium z dodatkiem ekwiwalentnej objętości rozpuszczalnika, a sam eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych, którego wyniki przedstawiono na Rycinie 34, a wyniki analiz statystycznych zamieszczono w Tabeli 34.

Warto zwrócić uwagę na zależny od dawki, znamieny statystycznie wzrost poziomu 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt po 24 godzinach ekspozycji na DTT.

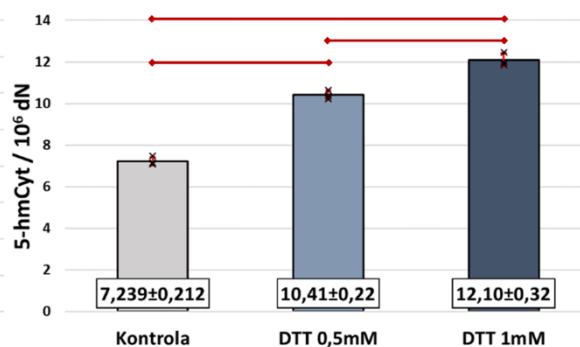
Tabela 34 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{WT} po 24-godzinnej hodowli w obecności ditionitroretolu w stężeniu 0,5 mmol/l i 1 mmol/l.

5-mCyt	DTT 1mM	DTT 0,5mM	5-hmCyt	DTT 1mM	DTT 0,5mM
Kontrola	0,819	0,801	Kontrola	<0,001	<0,001
DTT 0,5mM	0,999		DTT 0,5mM	0,001	
5-fCyt	DTT 1mM	DTT 0,5mM	5-caCyt	DTT 1mM	DTT 0,5mM
Kontrola	<0,001	<0,001	Kontrola	<0,001	<0,001
DTT 0,5mM	0,074		DTT 0,5mM	0,197	
5-hmUra	DTT 1mM	DTT 0,5mM	Ura	DTT 1mM	DTT 0,5mM
Kontrola	0,262	0,620	Kontrola	0,070	0,918
DTT 0,5mM	0,725		DTT 0,5mM	0,117	
8-oxoGua	DTT 1mM	DTT 0,5mM			
Kontrola	1,000	0,960			
DTT 0,5mM	0,956				

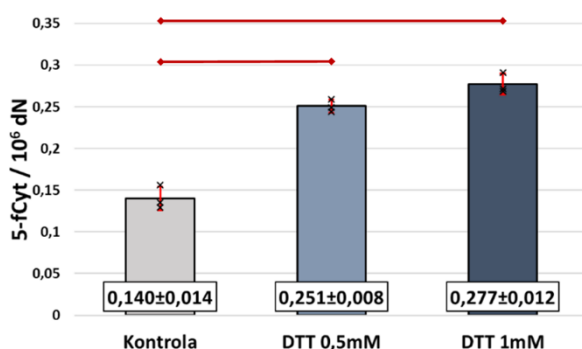
5-mCyt



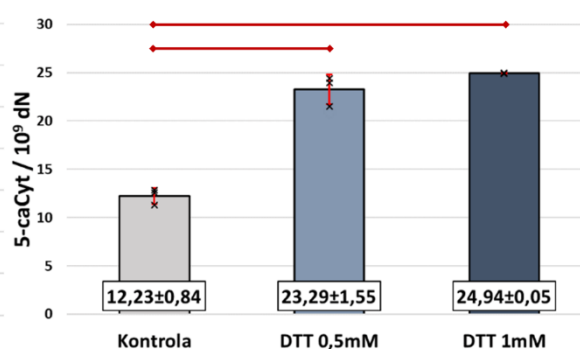
5-hmCyt



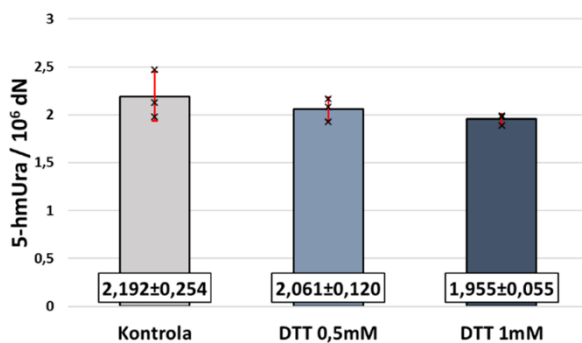
5-fCyt



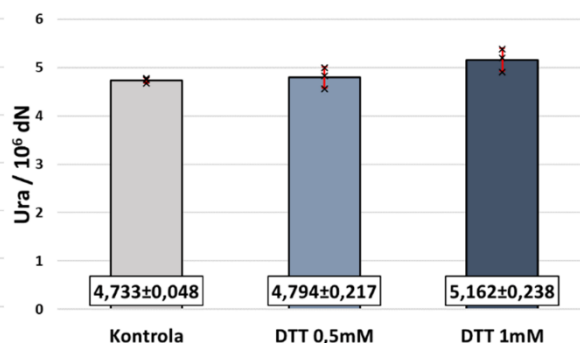
5-caCyt



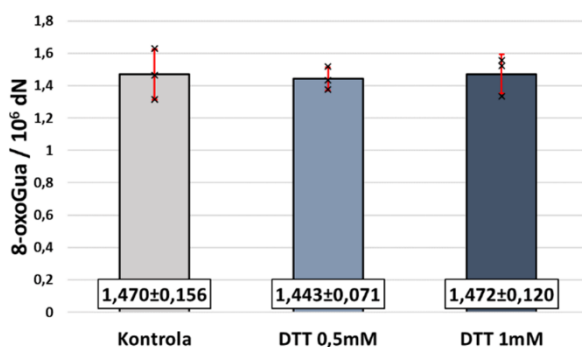
5-hmUra



Ura



8-oxoGua



Rycina 34 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności 0,5 mmol/l i 1 mmol/l DTT na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{WT}

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżkami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

DTT- ditiotreitol;

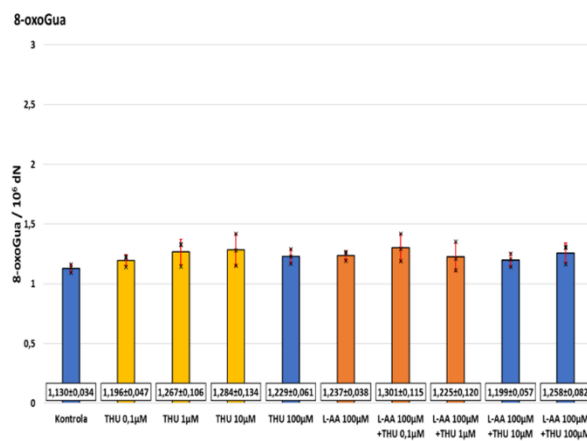
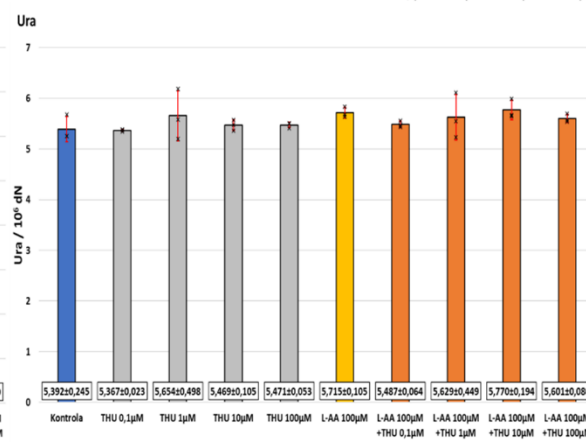
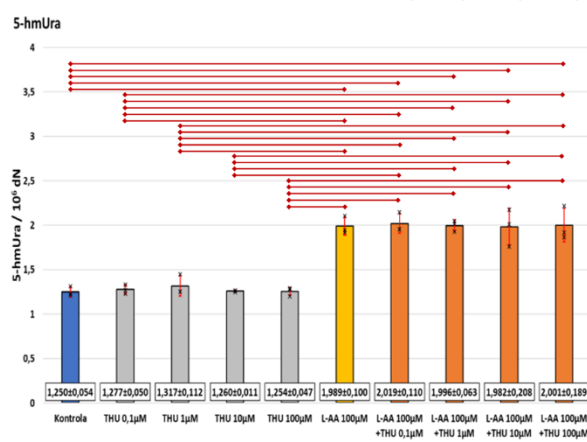
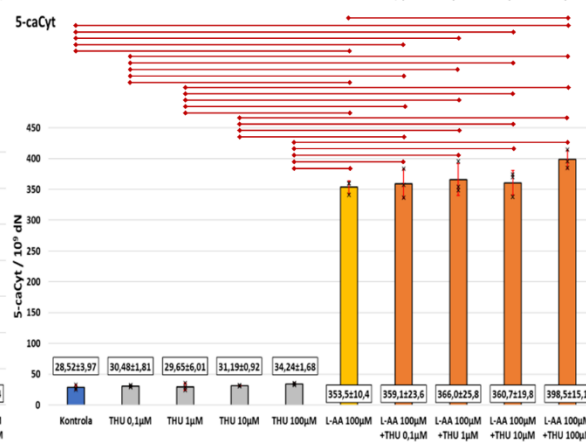
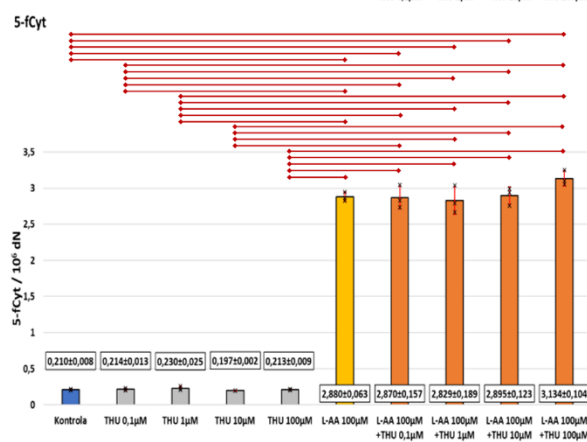
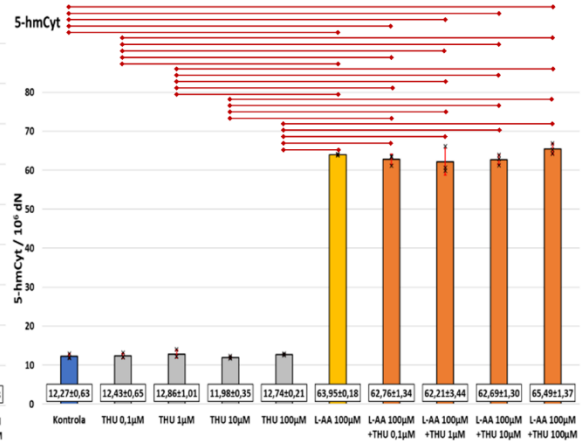
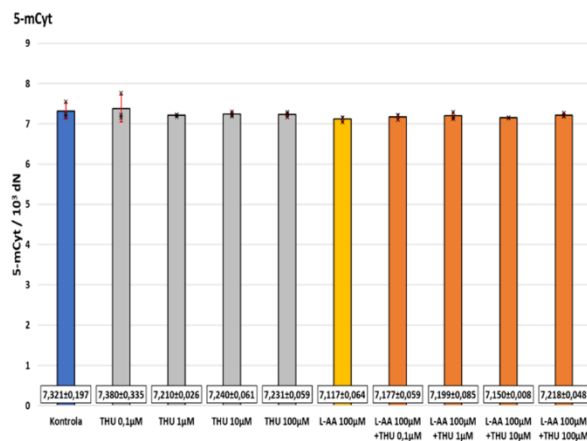
4.3.2 Tetrahidrourydyna

Tetrahidrourydyna jest kompetycyjnym inhibitorem enzymów należących do deaminaz cytydyny, a co za tym idzie jest zdolna do hamowania aktywności enzymów, takich jak białko AID czy białka rodziny APOBEC, które potencjalnie mogą przeprowadzać deaminację 5-hydroksymetylocytozyny do 5-hydroksymetylouracylu. Teoretycznie, po jednoczesnej ekspozycji komórek na witaminę C i tetrahidrourydynę, obserwowane w DNA poziomy 5-hmUra powinny wynikać jedynie z aktywności białek TET. Potencjalnie, dzięki takiemu podejściu można odpowiedzieć na pytanie, o źródła tej modyfikacji w DNA oraz oszacować udział procesów deaminacji i utleniania w jej powstawaniu. Ponadto monitorując poziom uracylu i 8-oxoguaniny możliwym jest określenie czy obserwowany poziom 5-hmUra może być wynikiem niespecyficznego deaminacji i oksydacji. Z powyższych powodów postanowiono przeprowadzić eksperyment na parentalnej linii HAP1^{WT} i z funkcjonalnymi, podwójnymi nokautami *TET1KO/TET2KO*, *TET1KO/TET3KO* i *TET2KO/TET3KO* polegający na 24-godzinnej hodowli komórek w obecności tetrahidrourydyny (w końcowych stężeniach 0,1 μmol/l, 1 μmol/l, 10 μmol/l i 100 μmol/l), a także kombinacji tego związku (wszystkich wymienionych stężeń) z witaminą C w końcowym stężeniu 100 μmol/l. Kontrolę stanowiły komórki hodowane w medium z dodatkiem ekwiwalentnej objętości rozpuszczalnika, a sam eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych. Jego wyniki przedstawiono na Rycinie 35 (dla linii HAP1^{WT}), Rycinie 36 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET2KO}), Rycinie 37 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET3KO}) i Rycinie 38 (dla linii HAP1^{TET2/TET3KO}). Wyniki analiz statystycznych zawarto w Tabeli 35 (dla linii HAP1^{WT}), Tabeli 36 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET2KO}), Tabeli 37 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET3KO}) i Tabeli 38 (dla linii HAP1^{TET2KO/TET3KO}).

Warto zwrócić uwagę na fakt, iż we wszystkich przebadanych liniach komórkowych tetrahidrourydyna, niezależnie od stężenia, nie wpływała na poziomy 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt i, co szczególnie istotne, 5-hmUra. Nie obserwowano także różnic pomiędzy stymulującym efektem witaminy C, a jednoczesną administracją tego związku w połączeniu z tetrahidrourydyną (niezależnie od stężenia). Wyjątek stanowiły podwyższone poziomy 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt w linii HAP1^{TET1KO/TET3KO} po jednoczesnej ekspozycji na witaminę C i tetrahidrourydynę w stężeniu 100 μmol/l.

Tabela 35 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{WT} po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń tetrahydrydyny i ich kombinacji z 100 µmol/l witaminy C.

5-mCyt	L-AA 100µM + THU 100µM	L-AA 100µM + THU 10µM	L-AA 100µM + THU 1µM	L-AA 100µM + THU 0,1µM	THU 100µM	THU 10µM	THU 1µM	THU 0,1µM	L-AA 100µM
Kontrola	0,992	0,840	0,976	0,934	0,997	0,999	0,987	1,000	0,677
L-AA 100µM	0,993	1,000	0,999	1,000	0,984	0,974	0,996	0,359	
THU 0,1µM	0,879	0,528	0,798	0,684	0,920	0,944	0,847		
THU 1µM	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000			
THU 10µM	1,000	0,997	1,000	1,000	1,000				
THU 100µM	1,000	0,999	1,000	1,000					
L-AA 100µM + THU 0,1µM	1,000	1,000	1,000						
L-AA 100µM + THU 1µM	1,000	1,000							
L-AA 100µM + THU 10µM	1,000								
5-hmCyt	L-AA 100µM + THU 100µM	L-AA 100µM + THU 10µM	L-AA 100µM + THU 1µM	L-AA 100µM + THU 0,1µM	THU 100µM	THU 10µM	THU 1µM	THU 0,1µM	L-AA 100µM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	<0,001
L-AA 100µM	0,924	0,977	0,863	0,985	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
THU 0,1µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000		
THU 1µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	0,998			
THU 10µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,999				
THU 100µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001					
L-AA 100µM + THU 0,1µM	0,370	1,000	1,000						
L-AA 100µM + THU 1µM	0,170	1,000							
L-AA 100µM + THU 10µM	0,335								
5-fCyt	L-AA 100µM + THU 100µM	L-AA 100µM + THU 10µM	L-AA 100µM + THU 1µM	L-AA 100µM + THU 0,1µM	THU 100µM	THU 10µM	THU 1µM	THU 0,1µM	L-AA 100µM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	<0,001
L-AA 100µM	0,088	1,000	1,000	1,000	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
THU 0,1µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000		
THU 1µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000			
THU 10µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000				
THU 100µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001					
L-AA 100µM + THU 0,1µM	0,069	1,000	1,000						
L-AA 100µM + THU 1µM	0,024	0,996							
L-AA 100µM + THU 10µM	0,129								
5-caCyt	L-AA 100µM + THU 100µM	L-AA 100µM + THU 10µM	L-AA 100µM + THU 1µM	L-AA 100µM + THU 0,1µM	THU 100µM	THU 10µM	THU 1µM	THU 0,1µM	L-AA 100µM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	<0,001
L-AA 100µM	0,025	1,000	0,982	1,000	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
THU 0,1µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000		
THU 1µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000			
THU 10µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000				
THU 100µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001					
L-AA 100µM + THU 0,1µM	0,067	1,000	1,000						
L-AA 100µM + THU 1µM	0,200	1,000							
L-AA 100µM + THU 10µM	0,088								
5-hmUra	L-AA 100µM + THU 100µM	L-AA 100µM + THU 10µM	L-AA 100µM + THU 1µM	L-AA 100µM + THU 0,1µM	THU 100µM	THU 10µM	THU 1µM	THU 0,1µM	L-AA 100µM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	0,999	1,000	<0,001
L-AA 100µM	1,000	1,000	1,000	1,000	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
THU 0,1µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000		
THU 1µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,999	1,000			
THU 10µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000				
THU 100µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001					
L-AA 100µM + THU 0,1µM	1,000	1,000	1,000						
L-AA 100µM + THU 1µM	1,000	1,000							
L-AA 100µM + THU 10µM	1,000								
Ura	L-AA 100µM + THU 100µM	L-AA 100µM + THU 10µM	L-AA 100µM + THU 1µM	L-AA 100µM + THU 0,1µM	THU 100µM	THU 10µM	THU 1µM	THU 0,1µM	L-AA 100µM
Kontrola	0,984	0,660	0,964	1,000	1,000	1,000	0,935	1,000	0,815
L-AA 100µM	1,000	1,000	1,000	0,971	0,956	0,954	1,000	0,747	
THU 0,1µM	0,966	0,581	0,934	1,000	1,000	1,000	0,893		
THU 1µM	1,000	1,000	1,000	0,997	0,993	0,993			
THU 10µM	0,999	0,865	0,997	1,000	1,000				
THU 100µM	0,999	0,869	0,998	1,000					
L-AA 100µM + THU 0,1µM	1,000	0,902	0,999						
L-AA 100µM + THU 1µM	1,000	0,999							
L-AA 100µM + THU 10µM	0,996								
8-oxoGua	L-AA 100µM + THU 100µM	L-AA 100µM + THU 10µM	L-AA 100µM + THU 1µM	L-AA 100µM + THU 0,1µM	THU 100µM	THU 10µM	THU 1µM	THU 0,1µM	L-AA 100µM
Kontrola	0,720	0,990	0,930	0,368	0,912	0,504	0,648	0,993	0,869
L-AA 100µM	1,000	1,000	1,000	0,995	1,000	1,000	1,000	1,000	
THU 0,1µM	0,996	1,000	1,000	0,886	1,000	0,957	0,989		
THU 1µM	1,000	0,992	1,000	1,000	1,000	1,000			
THU 10µM	1,000	0,965	0,997	1,000	0,998				
THU 100µM	1,000	1,000	1,000	0,988					
L-AA 100µM + THU 0,1µM	1,000	0,901	0,983						
L-AA 100µM + THU 1µM	1,000	1,000							
L-AA 100µM + THU 10µM	0,997								

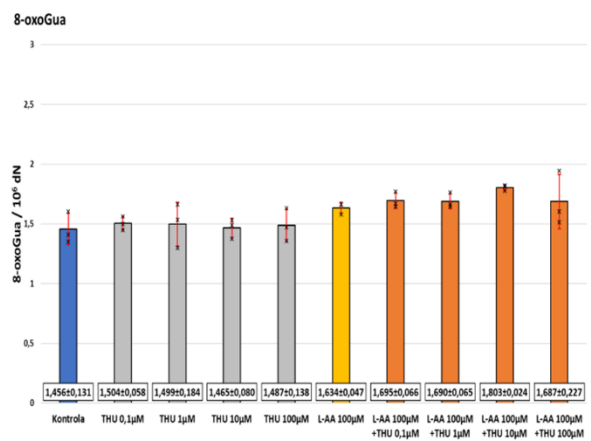
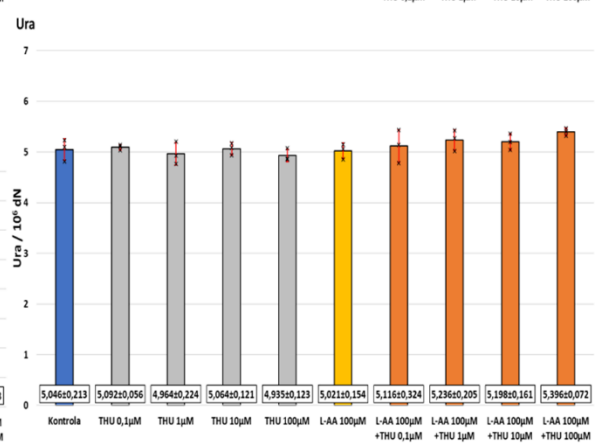
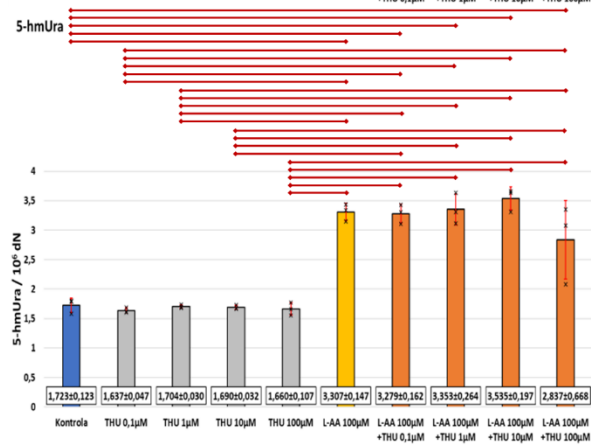
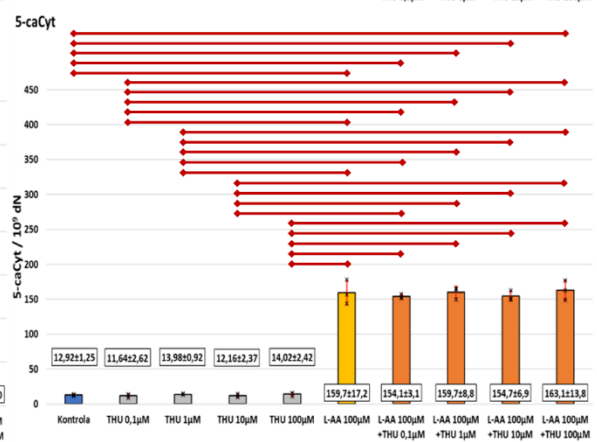
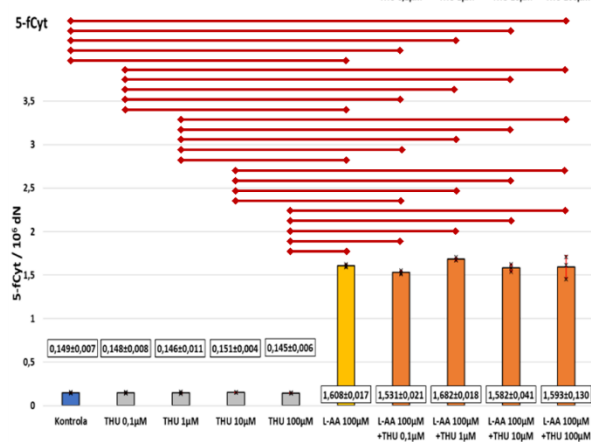
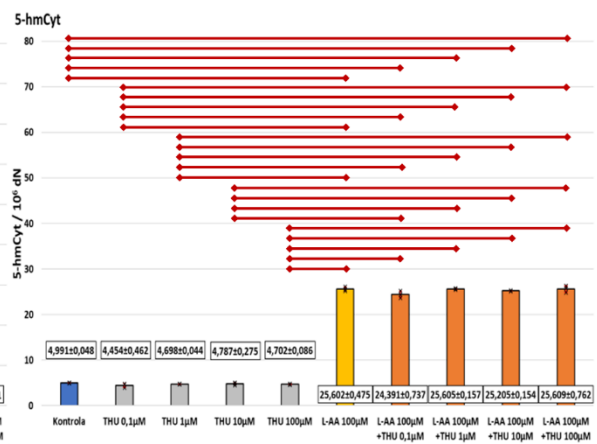
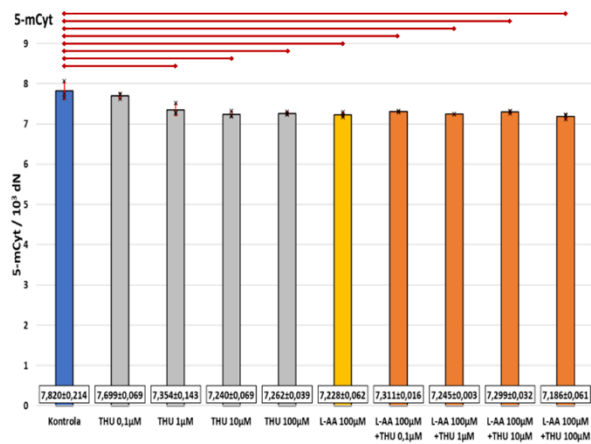


Rycina 35 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń tetrahydrourydyny i ich kombinacji z 100 µmol/l witaminy C na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{WT}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżkami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.
THU - tetrahydrourydyna;
L-AA – kwas L-askorbinowy;

Tabela 36 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET1KO/TET2KO} po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń tetrahydryourydyny i ich kombinacji z 100 μmol/l witaminy C.

5-mCyt	L-AA 100μM + THU 100μM	L-AA 100μM + THU 10μM	L-AA 100μM + THU 1μM	L-AA 100μM + THU 0,1μM	THU 100μM	THU 10μM	THU 1μM	THU 0,1μM	L-AA 100μM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,837	<0,001
L-AA 100μM	1,000	0,993	1,000	0,980	1,000	1,000	0,805	<0,001	
THU 0,1μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	0,006		
THU 1μM	0,482	0,999	0,901	1,000	0,961	0,879			
THU 10μM	0,999	0,998	1,000	0,993	1,000				
THU 100μM	0,989	1,000	1,000	1,000					
L-AA 100μM + THU 0,1μM	0,814	1,000	0,996						
L-AA 100μM + THU 1μM	0,998	0,999							
L-AA 100μM + THU 10μM	0,881								
5-hmCyt	L-AA 100μM + THU 100μM	L-AA 100μM + THU 10μM	L-AA 100μM + THU 1μM	L-AA 100μM + THU 0,1μM	THU 100μM	THU 10μM	THU 1μM	THU 0,1μM	L-AA 100μM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,997	1,000	0,996	0,851	<0,001
L-AA 100μM	1,000	0,986	1,000	0,054	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
THU 0,1μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,999	0,991	0,999		
THU 1μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000			
THU 10μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000				
THU 100μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001					
L-AA 100μM + THU 0,1μM	0,052	0,537	0,053						
L-AA 100μM + THU 1μM	1,000	0,985							
L-AA 100μM + THU 10μM	0,984								
5-fCyt	L-AA 100μM + THU 100μM	L-AA 100μM + THU 10μM	L-AA 100μM + THU 1μM	L-AA 100μM + THU 0,1μM	THU 100μM	THU 10μM	THU 1μM	THU 0,1μM	L-AA 100μM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	<0,001
L-AA 100μM	1,000	0,999	0,581	0,545	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
THU 0,1μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000		
THU 1μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000			
THU 10μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000				
THU 100μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001					
L-AA 100μM + THU 0,1μM	0,777	0,911	0,014						
L-AA 100μM + THU 1μM	0,356	0,222							
L-AA 100μM + THU 10μM	1,000								
5-caCyt	L-AA 100μM + THU 100μM	L-AA 100μM + THU 10μM	L-AA 100μM + THU 1μM	L-AA 100μM + THU 0,1μM	THU 100μM	THU 10μM	THU 1μM	THU 0,1μM	L-AA 100μM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	<0,001
L-AA 100μM	1,000	0,998	1,000	0,997	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
THU 0,1μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000		
THU 1μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000			
THU 10μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000				
THU 100μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001					
L-AA 100μM + THU 0,1μM	0,924	1,000	0,996						
L-AA 100μM + THU 1μM	1,000	0,998							
L-AA 100μM + THU 10μM	0,946								
5-hmUra	L-AA 100μM + THU 100μM	L-AA 100μM + THU 10μM	L-AA 100μM + THU 1μM	L-AA 100μM + THU 0,1μM	THU 100μM	THU 10μM	THU 1μM	THU 0,1μM	L-AA 100μM
Kontrola	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	<0,001
L-AA 100μM	0,436	0,978	1,000	1,000	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
THU 0,1μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000		
THU 1μM	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000			
THU 10μM	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000				
THU 100μM	0,001	<0,001	<0,001	<0,001					
L-AA 100μM + THU 0,1μM	0,517	0,955	1,000						
L-AA 100μM + THU 1μM	0,320	0,995							
L-AA 100μM + THU 10μM	0,067								
Ura	L-AA 100μM + THU 100μM	L-AA 100μM + THU 10μM	L-AA 100μM + THU 1μM	L-AA 100μM + THU 0,1μM	THU 100μM	THU 10μM	THU 1μM	THU 0,1μM	L-AA 100μM
Kontrola	0,396	0,987	0,947	1,000	0,999	1,000	1,000	1,000	1,000
L-AA 100μM	0,311	0,965	0,897	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
THU 0,1μM	0,577	0,999	0,991	1,000	0,984	1,000	0,996		
THU 1μM	0,167	0,845	0,711	0,987	1,000	0,999			
THU 10μM	0,464	0,994	0,971	1,000	0,996				
THU 100μM	0,116	0,742	0,591	0,959					
L-AA 100μM + THU 0,1μM	0,678	1,000	0,998						
L-AA 100μM + THU 1μM	0,981	1,000							
L-AA 100μM + THU 10μM	0,933								
8-oxoGua	L-AA 100μM + THU 100μM	L-AA 100μM + THU 10μM	L-AA 100μM + THU 1μM	L-AA 100μM + THU 0,1μM	THU 100μM	THU 10μM	THU 1μM	THU 0,1μM	L-AA 100μM
Kontrola	0,392	0,048	0,375	0,348	1,000	1,000	1,000	1,000	0,712
L-AA 100μM	1,000	0,768	1,000	1,000	0,872	0,767	0,919	0,932	
THU 0,1μM	0,681	0,125	0,662	0,630	1,000	1,000	1,000		
THU 1μM	0,655	0,115	0,635	0,603	1,000	1,000			
THU 10μM	0,446	0,059	0,427	0,399	1,000				
THU 100μM	0,576	0,091	0,557	0,525					
L-AA 100μM + THU 0,1μM	1,000	0,978	1,000						
L-AA 100μM + THU 1μM	1,000	0,971							
L-AA 100μM + THU 10μM	0,966								



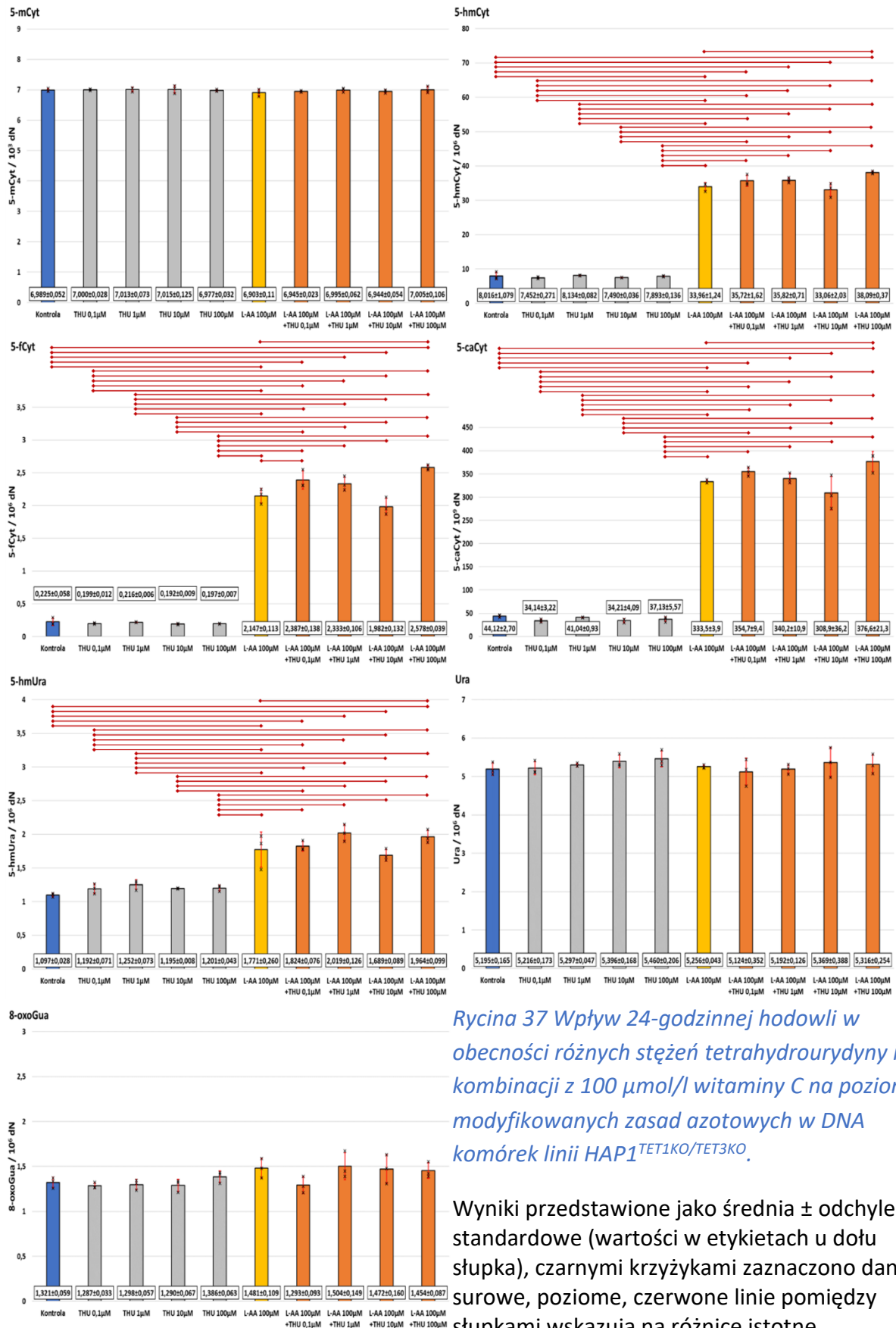
Rycina 36 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń tetrahydrourydyny i ich kombinacji z 100 µmol/l witaminy C na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET1KO/TET2KO}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

THU – tetrahydrourydyna;
L-AA – kwas L-askorbinowy;

Tabela 37 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET1KO/TET3KO} po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń tetrahydryourydyny i ich kombinacji z 100 µmol/l witaminy C.

5-mCyt	L-AA 100µM + THU 100µM	L-AA 100µM + THU 10µM	L-AA 100µM + THU 1µM	L-AA 100µM + THU 0,1µM	THU 100µM	THU 10µM	THU 1µM	THU 0,1µM	L-AA 100µM
Kontrola	1,000	0,999	1,000	0,999	1,000	1,000	1,000	1,000	0,916
L-AA 100µM	0,805	0,999	0,879	0,999	0,963	0,716	0,733	0,844	
THU 0,1µM	1,000	0,994	1,000	0,995	1,000	1,000	1,000		
THU 1µM	1,000	0,977	1,000	0,977	1,000	1,000			
THU 10µM	1,000	0,973	1,000	0,973	1,000				
THU 100µM	1,000	1,000	1,000	1,000					
L-AA 100µM + THU 0,1µM	0,990	1,000	0,997						
L-AA 100µM + THU 1µM	1,000	0,997							
L-AA 100µM + THU 10µM	0,990								
5-hmCyt	L-AA 100µM + THU 100µM	L-AA 100µM + THU 10µM	L-AA 100µM + THU 1µM	L-AA 100µM + THU 0,1µM	THU 100µM	THU 10µM	THU 1µM	THU 0,1µM	L-AA 100µM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000	0,999	<0,001
L-AA 100µM	0,002	0,979	0,454	0,525	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
THU 0,1µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	0,997		
THU 1µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	0,998			
THU 10µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000				
THU 100µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001					
L-AA 100µM + THU 0,1µM	0,179	0,092	1,000						
L-AA 100µM + THU 1µM	0,219	0,073							
L-AA 100µM + THU 10µM	<0,001								
5-fCyt	L-AA 100µM + THU 100µM	L-AA 100µM + THU 10µM	L-AA 100µM + THU 1µM	L-AA 100µM + THU 0,1µM	THU 100µM	THU 10µM	THU 1µM	THU 0,1µM	L-AA 100µM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	<0,001
L-AA 100µM	<0,001	0,331	0,197	0,041	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
THU 0,1µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000		
THU 1µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000			
THU 10µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000				
THU 100µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001					
L-AA 100µM + THU 0,1µM	0,171	<0,001	0,997						
L-AA 100µM + THU 1µM	0,035	0,001							
L-AA 100µM + THU 10µM	<0,001								
5-caCyt	L-AA 100µM + THU 100µM	L-AA 100µM + THU 10µM	L-AA 100µM + THU 1µM	L-AA 100µM + THU 0,1µM	THU 100µM	THU 10µM	THU 1µM	THU 0,1µM	L-AA 100µM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	0,997	1,000	0,996	<0,001
L-AA 100µM	0,037	0,542	1,000	0,722	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
THU 0,1µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000		
THU 1µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000			
THU 10µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000				
THU 100µM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001					
L-AA 100µM + THU 0,1µM	0,686	0,023	0,956						
L-AA 100µM + THU 1µM	0,116	0,246							
L-AA 100µM + THU 10µM	0,001								
5-hmUra	L-AA 100µM + THU 100µM	L-AA 100µM + THU 10µM	L-AA 100µM + THU 1µM	L-AA 100µM + THU 0,1µM	THU 100µM	THU 10µM	THU 1µM	THU 0,1µM	L-AA 100µM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,970	0,980	0,769	0,984	<0,001
L-AA 100µM	0,514	0,994	0,213	1,000	0,000	<0,001	0,001	<0,001	
THU 0,1µM	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	0,999		
THU 1µM	<0,001	0,003	<0,001	<0,001	1,000	1,000			
THU 10µM	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	1,000				
THU 100µM	<0,001	0,001	<0,001	<0,001					
L-AA 100µM + THU 0,1µM	0,850	0,873	0,501						
L-AA 100µM + THU 1µM	1,000	0,037							
L-AA 100µM + THU 10µM	0,124								
Ura	L-AA 100µM + THU 100µM	L-AA 100µM + THU 10µM	L-AA 100µM + THU 1µM	L-AA 100µM + THU 0,1µM	THU 100µM	THU 10µM	THU 1µM	THU 0,1µM	L-AA 100µM
Kontrola	0,999	0,991	1,000	1,000	0,889	0,978	1,000	1,000	1,000
L-AA 100µM	1,000	1,000	1,000	0,999	0,974	0,998	1,000	1,000	
THU 0,1µM	1,000	0,997	1,000	1,000	0,927	0,989	1,000		
THU 1µM	1,000	1,000	1,000	0,991	0,994	1,000			
THU 10µM	1,000	1,000	0,975	0,873	1,000				
THU 100µM	0,998	1,000	0,883	0,689					
L-AA 100µM + THU 0,1µM	0,983	0,926	1,000						
L-AA 100µM + THU 1µM	0,999	0,990							
L-AA 100µM + THU 10µM	1,000								
8-oxoGua	L-AA 100µM + THU 100µM	L-AA 100µM + THU 10µM	L-AA 100µM + THU 1µM	L-AA 100µM + THU 0,1µM	THU 100µM	THU 10µM	THU 1µM	THU 0,1µM	L-AA 100µM
Kontrola	0,784	0,652	0,413	1,000	0,997	1,000	1,000	1,000	0,585
L-AA 100µM	1,000	1,000	1,000	0,379	0,962	0,356	0,413	0,338	
THU 0,1µM	0,528	0,395	0,214	1,000	0,951	1,000	1,000		
THU 1µM	0,614	0,475	0,269	1,000	0,976	1,000			
THU 10µM	0,549	0,414	0,227	1,000	0,959				
THU 100µM	0,996	0,979	0,876	0,967					
L-AA 100µM + THU 0,1µM	0,576	0,439	0,244						
L-AA 100µM + THU 1µM	1,000	1,000							
L-AA 100µM + THU 10µM	1,000								



Rycina 37 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń tetrahydrydyny i ich kombinacji z 100 μmol/l witaminy C na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET1KO/TET3KO}.

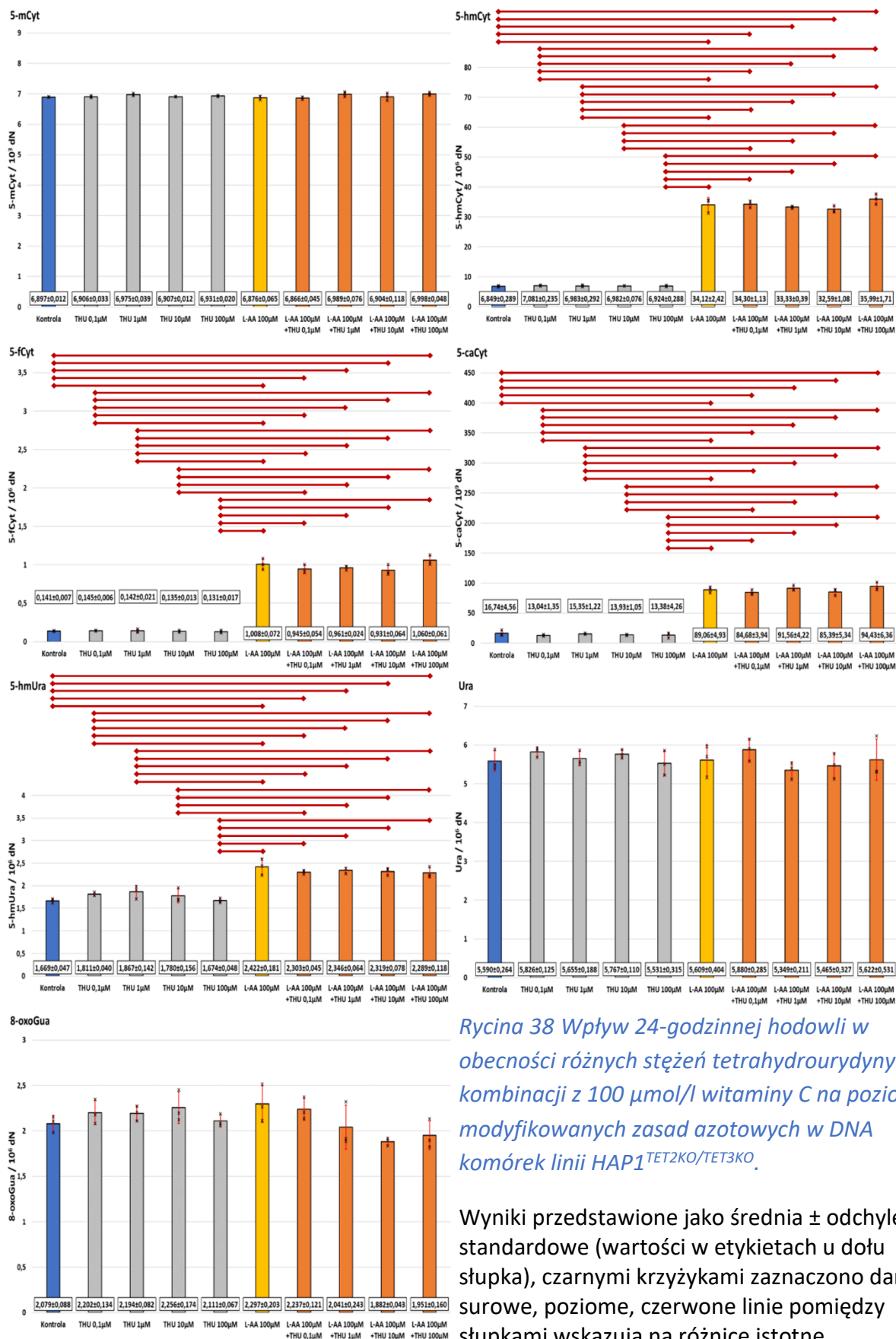
Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżkami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

THU – tetrahydrydyna;

L-AA – kwas l-askorbinowy;

Tabela 38 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET2KO/TET3KO} po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń tetrahydryourydyny i ich kombinacji z 100 μmol/l witaminy C.

5-mCyt	L-AA 100μM + THU 100μM	L-AA 100μM + THU 10μM	L-AA 100μM + THU 1μM	L-AA 100μM + THU 0,1μM	THU 100μM	THU 10μM	THU 1μM	THU 0,1μM	L-AA 100μM
Kontrola	0,486	1,000	0,612	0,999	0,999	1,000	0,784	1,000	1,000
L-AA 100μM	0,255	1,000	0,350	1,000	0,964	0,999	0,514	1,000	
THU 0,1μM	0,600	1,000	0,724	0,995	1,000	1,000	0,872		
THU 1μM	1,000	0,853	1,000	0,379	0,992	0,881			
THU 10μM	0,613	1,000	0,737	0,995	1,000				
THU 100μM	0,893	1,000	0,954	0,901					
L-AA 100μM + THU 0,1μM	0,171	0,997	0,243						
L-AA 100μM + THU 1μM	1,000	0,698							
L-AA 100μM + THU 10μM	0,572								
5-hmCyt	L-AA 100μM + THU 100μM	L-AA 100μM + THU 10μM	L-AA 100μM + THU 1μM	L-AA 100μM + THU 0,1μM	THU 100μM	THU 10μM	THU 1μM	THU 0,1μM	L-AA 100μM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	<0,001
L-AA 100μM	0,541	0,761	0,995	1,000	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
THU 0,1μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000		
THU 1μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000			
THU 10μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000				
THU 100μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001					
L-AA 100μM + THU 0,1μM	0,662	0,646	0,980						
L-AA 100μM + THU 1μM	0,140	0,997							
L-AA 100μM + THU 10μM	0,026								
5-fCyt	L-AA 100μM + THU 100μM	L-AA 100μM + THU 10μM	L-AA 100μM + THU 1μM	L-AA 100μM + THU 0,1μM	THU 100μM	THU 10μM	THU 1μM	THU 0,1μM	L-AA 100μM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	<0,001
L-AA 100μM	0,869	0,453	0,922	0,700	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
THU 0,1μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	1,000		
THU 1μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000			
THU 10μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000				
THU 100μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001					
L-AA 100μM + THU 0,1μM	0,071	1,000	1,000						
L-AA 100μM + THU 1μM	0,171	0,995							
L-AA 100μM + THU 10μM	0,031								
5-caCyt	L-AA 100μM + THU 100μM	L-AA 100μM + THU 10μM	L-AA 100μM + THU 1μM	L-AA 100μM + THU 0,1μM	THU 100μM	THU 10μM	THU 1μM	THU 0,1μM	L-AA 100μM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,989	0,997	1,000	0,979	<0,001
L-AA 100μM	0,835	0,980	0,999	0,942	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
THU 0,1μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000	0,999		
THU 1μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	1,000			
THU 10μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000				
THU 100μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001					
L-AA 100μM + THU 0,1μM	0,171	1,000	0,582						
L-AA 100μM + THU 1μM	0,996	0,709							
L-AA 100μM + THU 10μM	0,243								
5-hmUra	L-AA 100μM + THU 100μM	L-AA 100μM + THU 10μM	L-AA 100μM + THU 1μM	L-AA 100μM + THU 0,1μM	THU 100μM	THU 10μM	THU 1μM	THU 0,1μM	L-AA 100μM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	0,942	0,421	0,803	<0,001
L-AA 100μM	0,854	0,963	0,995	0,915	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
THU 0,1μM	0,001	<0,001	<0,001	0,001	0,831	1,000	1,000		
THU 1μM	0,003	0,001	0,001	0,002	0,454	0,988			
THU 10μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,955				
THU 100μM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001					
L-AA 100μM + THU 0,1μM	1,000	1,000	1,000						
L-AA 100μM + THU 1μM	0,999	1,000							
L-AA 100μM + THU 10μM	1,000								
Ura	L-AA 100μM + THU 100μM	L-AA 100μM + THU 10μM	L-AA 100μM + THU 1μM	L-AA 100μM + THU 0,1μM	THU 100μM	THU 10μM	THU 1μM	THU 0,1μM	L-AA 100μM
Kontrola	1,000	1,000	0,991	0,968	1,000	0,999	1,000	0,992	1,000
L-AA 100μM	1,000	1,000	0,984	0,979	1,000	1,000	1,000	0,995	
THU 0,1μM	0,997	0,891	0,650	1,000	0,965	1,000	0,999		
THU 1μM	1,000	0,998	0,956	0,994	1,000	1,000			
THU 10μM	1,000	0,959	0,786	1,000	0,992				
THU 100μM	1,000	1,000	0,999	0,908					
L-AA 100μM + THU 0,1μM	0,985	0,792	0,515						
L-AA 100μM + THU 1μM	0,978	1,000							
L-AA 100μM + THU 10μM	1,000								
8-oxoGua	L-AA 100μM + THU 100μM	L-AA 100μM + THU 10μM	L-AA 100μM + THU 1μM	L-AA 100μM + THU 0,1μM	THU 100μM	THU 10μM	THU 1μM	THU 0,1μM	L-AA 100μM
Kontrola	0,981	0,798	1,000	0,932	1,000	0,876	0,991	0,986	0,704
L-AA 100μM	0,163	0,053	0,508	1,000	0,848	1,000	0,996	0,998	
THU 0,1μM	0,535	0,234	0,925	1,000	0,998	1,000	1,000		
THU 1μM	0,576	0,261	0,944	1,000	0,999	1,000			
THU 10μM	0,286	0,103	0,713	1,000	0,959				
THU 100μM	0,927	0,642	1,000	0,983					
L-AA 100μM + THU 0,1μM	0,365	0,139	0,803						
L-AA 100μM + THU 1μM	0,999	0,930							
L-AA 100μM + THU 10μM	1,000								



Rycina 38 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń tetrahydrydyny i ich kombinacji z 100 µmol/l witaminy C na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET2KO/TET3KO}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

THU – tetrahydrydyna;
L-AA – kwas L-askorbinowy;

4.3.3 5-azacytydyna

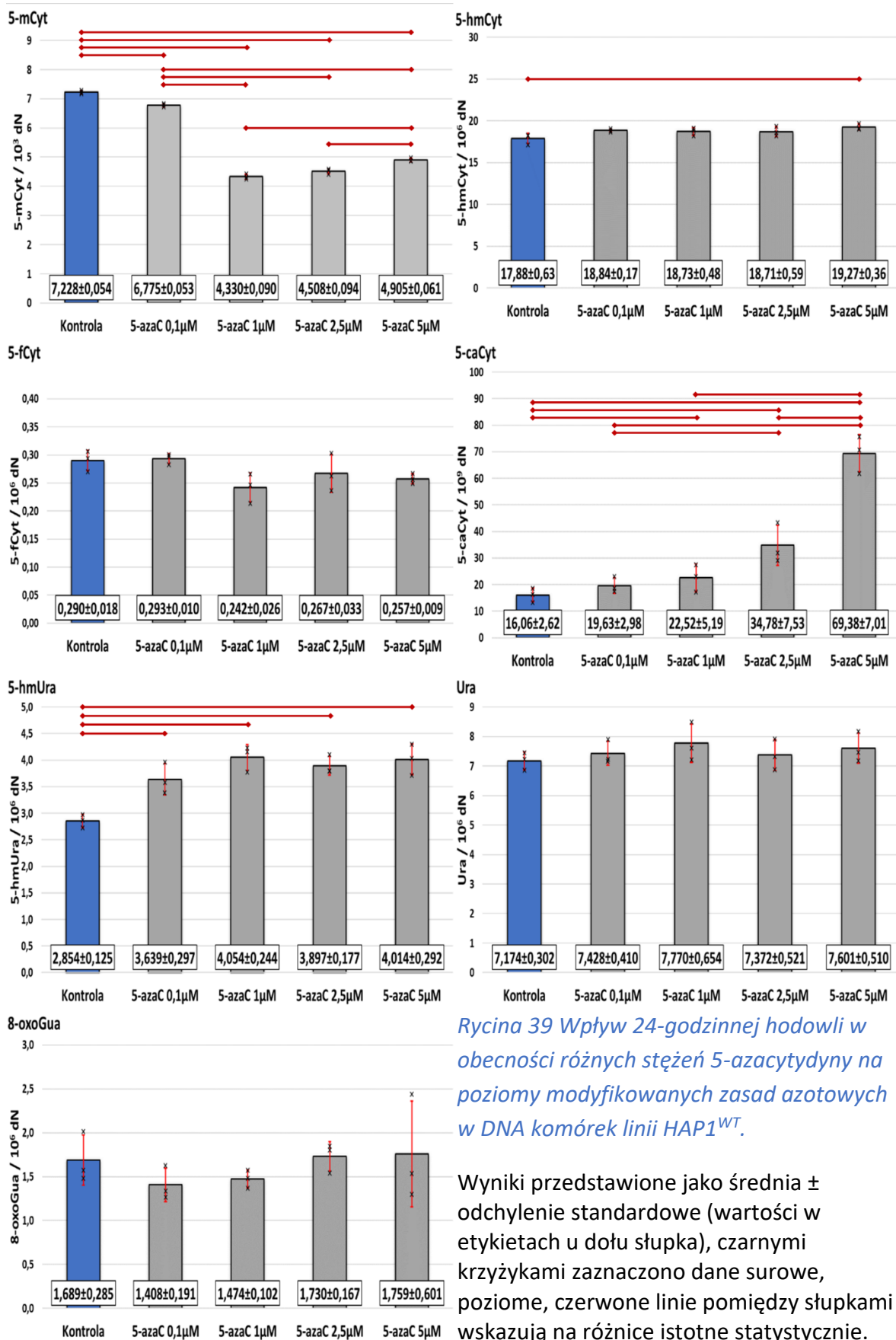
Kolejnym ciekawym zagadnieniem w kontekście aktywności białek rodziny TET jest ich specyficzność substratowa, gdyż dane literaturowe wskazują na większe powinowactwo omawianych enzymów do hemimetylowanego DNA (169). Co więcej, w terapii wielu nowotworów stosuje się czynniki demetylujące, takie jak 5-azacytydyna, by zredukować hipermetylację w obrębie regionów promotorowych genów supresorowych (144). Wprowadzane przez ten związek miejsca hemimetylowane mogą potencjalnie stanowić atrakcyjny substrat dla białek TET, co pozwala zintensyfikować proces aktywnej demetylacji DNA (170). Postanowiono zatem zbadać wpływ 5-azacytydyny na poziomy epigenetycznych modyfikacji w DNA komórek parentalnej linii HAP1^{WT} i z funkcjonalnymi, podwójnymi nokautami *TET1KO/TET2KO*, *TET1KO/TET3KO* i *TET2KO/TET3KO*, po ekspozycji na 0,1 μmol/l, 1 μmol/l, 2,5 μmol/l i 5 μmol/l 5-azacytydyny. Takie podejście powinno pomóc odpowiedzieć na pytanie, czy poszczególne białka rodziny TET różnią się pod względem powinowactwa do hemimetylowanego DNA.

Hodowlę komórkową wymienionych linii prowadzono przez 24 godziny w obecności wybranych stężeń 5-azacytydyny, a komórki kontrolne hodowano w niezmodyfikowanym medium. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych, a jego wyniki przedstawiono na Rycinie 39 (dla linii HAP1^{WT}), Rycinie 40 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET2KO}), Rycinie 41 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET3KO}) i Rycinie 42 (dla linii HAP1^{TET2KO/TET3KO}). Wyniki analiz statystycznych zamieszczono w Tabeli 39 (dla linii HAP1^{WT}), Tabeli 40 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET2KO}), Tabeli 41 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET3KO}) i Tabeli 42 (dla linii HAP1^{TET2KO/TET3KO}).

24-godzinna ekspozycja komórek na 5-azacytydynę skutkowała znaczącym obniżeniem poziomu 5-mCyt w każdej z badanych linii, a największe spadki obserwowano w komórkach narażonych na 2,5 μmol/l tego związku. Jednocześnie zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu 5-hmUra w liniach HAP1^{WT}, HAP1^{TET1KO/TET2KO} i HAP1^{TET2KO/TET3KO} dla każdego ze stężeń 5-azacytydyny i w linii HAP1^{TET1KO/TET3KO} dla stężenia 5 μmol/l. Co więcej obserwowano zależny od dawki wzrost poziomu 5-caCyt po ekspozycji na 5-azacytydynę w linii HAP1^{WT}, HAP1^{TET1KO/TET2KO} i HAP1^{TET2KO/TET3KO} – w tej ostatniej obserwowano również jednoczesny spadek poziomu 5-fCyt. W przypadku 8-oxoGua w linii HAP1^{TET1KO/TET2KO} odrzucono wyniki dla stężeń 2,5 μmol/l i 5 μmol/l z uwagi na RSD przekraczające 15%.

Tabela 39 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{WT} po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń 5-azacytydyny.

5-mCyt	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM	5-hmCyt	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	Kontrola	0,033	0,278	0,260	0,178
5-azaC 0,1μM	<0,001	<0,001	<0,001		5-azaC 0,1μM	0,798	0,997	0,999	
5-azaC 1μM	<0,001	0,081			5-azaC 1μM	0,653	1,000		
5-azaC 2,5μM	0,001				5-azaC 2,5μM	0,625			
5-fCyt	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM	5-caCyt	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM
Kontrola	0,396	0,703	0,120	1,000	Kontrola	<0,001	0,012	0,612	0,925
5-azaC 0,1μM	0,311	0,595	0,090		5-azaC 0,1μM	<0,001	0,042	0,963	
5-azaC 1μM	0,904	0,624			5-azaC 1μM	<0,001	0,114		
5-azaC 2,5μM	0,977				5-azaC 2,5μM	<0,001			
5-hmUra	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM	Ura	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM
Kontrola	0,001	0,002	0,001	0,015	Kontrola	0,823	0,987	0,596	0,967
5-azaC 0,1μM	0,358	0,677	0,274		5-azaC 0,1μM	0,992	1,000	0,909	
5-azaC 1μM	1,000	0,922			5-azaC 1μM	0,992	0,854		
5-azaC 2,5μM	0,971				5-azaC 2,5μM	0,977			
8-oxoGua	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM					
Kontrola	0,999	1,000	0,918	0,817					
5-azaC 0,1μM	0,677	0,737	0,999						
5-azaC 1μM	0,810	0,860							
5-azaC 2,5μM	1,000								

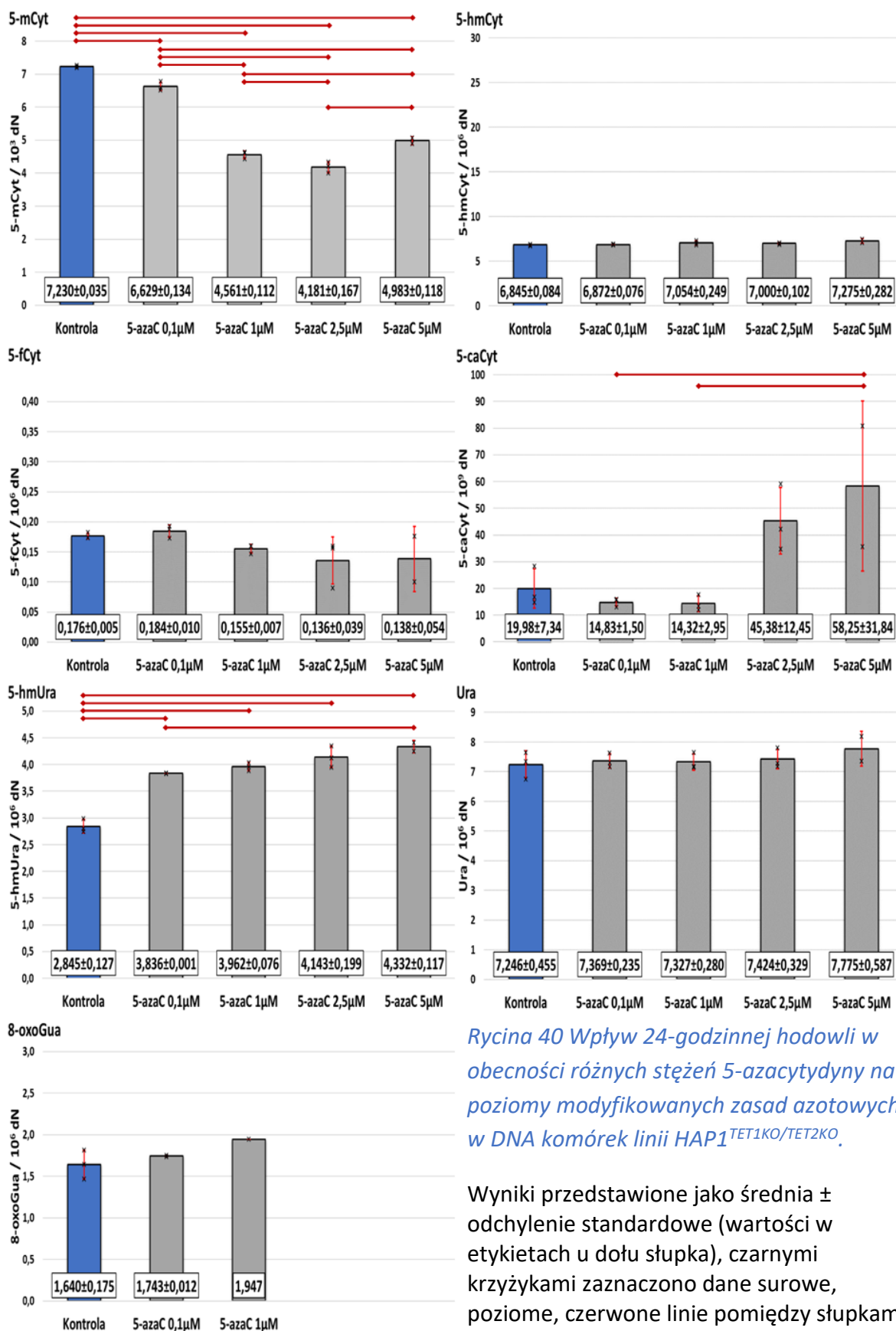


Rycina 39 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń 5-azacytyny na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{WT}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.
5-azaC – 5-azacytyna;

Tabela 40 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET1KO/TET2KO} po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń 5-azacydyny.

5-mCyt	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM	5-hmCyt	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	Kontrola	0,109	0,782	0,568	1,000
5-azaC 0,1μM	<0,001	<0,001	<0,001		5-azaC 0,1μM	0,141	0,873	0,679	
5-azaC 1μM	0,026	0,026			5-azaC 1μM	0,612	0,994		
5-azaC 2,5μM	<0,001				5-azaC 2,5μM	0,426			
5-fCyt	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM	5-caCyt	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM
Kontrola	0,544	0,387	0,863	0,995	Kontrola	0,055	0,187	0,980	0,986
5-azaC 0,1μM	0,379	0,243	0,679		5-azaC 0,1μM	0,029	0,092	1,000	
5-azaC 1μM	0,949	0,882			5-azaC 1μM	0,027	0,086		
5-azaC 2,5μM	1,000				5-azaC 2,5μM	0,798			
5-hmUra	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM	Ura	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	Kontrola	0,554	0,974	0,999	0,993
5-azaC 0,1μM	0,011	0,079	0,723		5-azaC 0,1μM	0,754	1,000	1,000	
5-azaC 1μM	0,056	0,432			5-azaC 1μM	0,687	0,997		
5-azaC 2,5μM	0,487				5-azaC 2,5μM	0,835			
8-oxoGua	5-azaC 1μM		5-azaC 0,1μM						
Kontrola	0,294		0,736						
5-azaC 0,1μM	0,545								

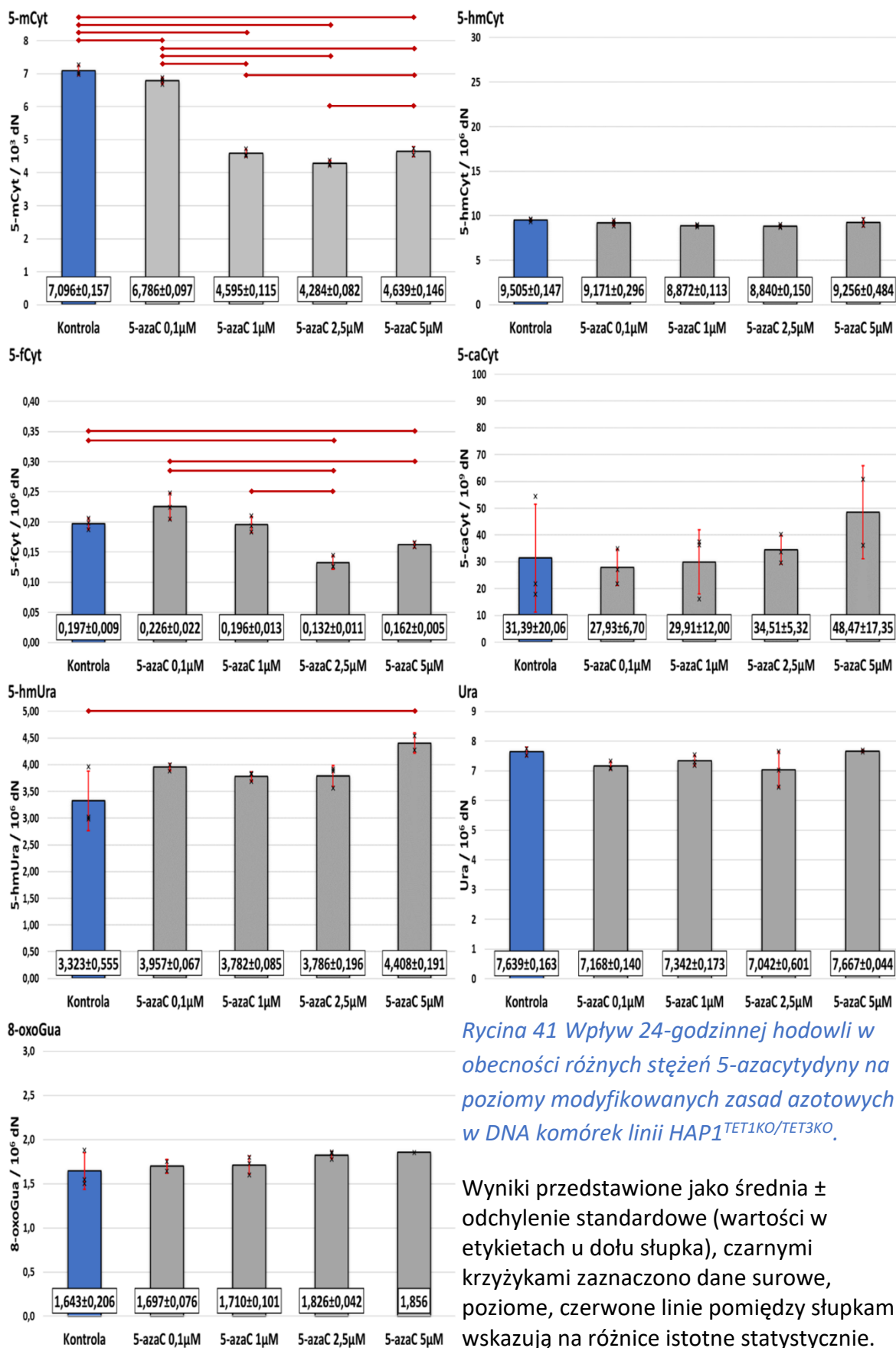


Rycina 40 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń 5-azacytyny na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET1KO/TET2KO}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżkami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie. **5-azaC** – 5-azacytyna;

Tabela 41 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET1KO/TET3KO} po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń 5-azacytydyny.

5-mCyt	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM	5-hmCyt	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	0,049	Kontrola	0,980	0,325	0,368	0,844
5-azaC 0,1μM	<0,001	<0,001	<0,001		5-azaC 0,1μM	0,550	0,848	0,889	
5-azaC 1μM	0,998	0,048			5-azaC 1μM	0,175	1,000		
5-azaC 2,5μM	0,030				5-azaC 2,5μM	0,151			
5-fCyt	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM	5-caCyt	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM
Kontrola	0,048	0,001	1,000	0,143	Kontrola	0,305	0,998	1,000	0,997
5-azaC 0,1μM	0,001	<0,001	0,115		5-azaC 0,1μM	0,195	0,968	1,000	
5-azaC 1μM	0,060	0,001			5-azaC 1μM	0,253	0,991		
5-azaC 2,5μM	0,126				5-azaC 2,5μM	0,439			
5-hmUra	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM	Ura	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM
Kontrola	0,016	0,353	0,361	0,129	Kontrola	1,000	0,342	0,849	0,544
5-azaC 0,1μM	0,653	0,947	0,942		5-azaC 0,1μM	0,496	0,988	0,961	
5-azaC 1μM	0,284	1,000			5-azaC 1μM	0,807	0,789		
5-azaC 2,5μM	0,292				5-azaC 2,5μM	0,306			
8-oxoGua	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM					
Kontrola	0,628	0,467	0,963	0,989					
5-azaC 0,1μM	0,843	0,800	1,000						
5-azaC 1μM	0,855	0,799							
5-azaC 2,5μM	1,000								

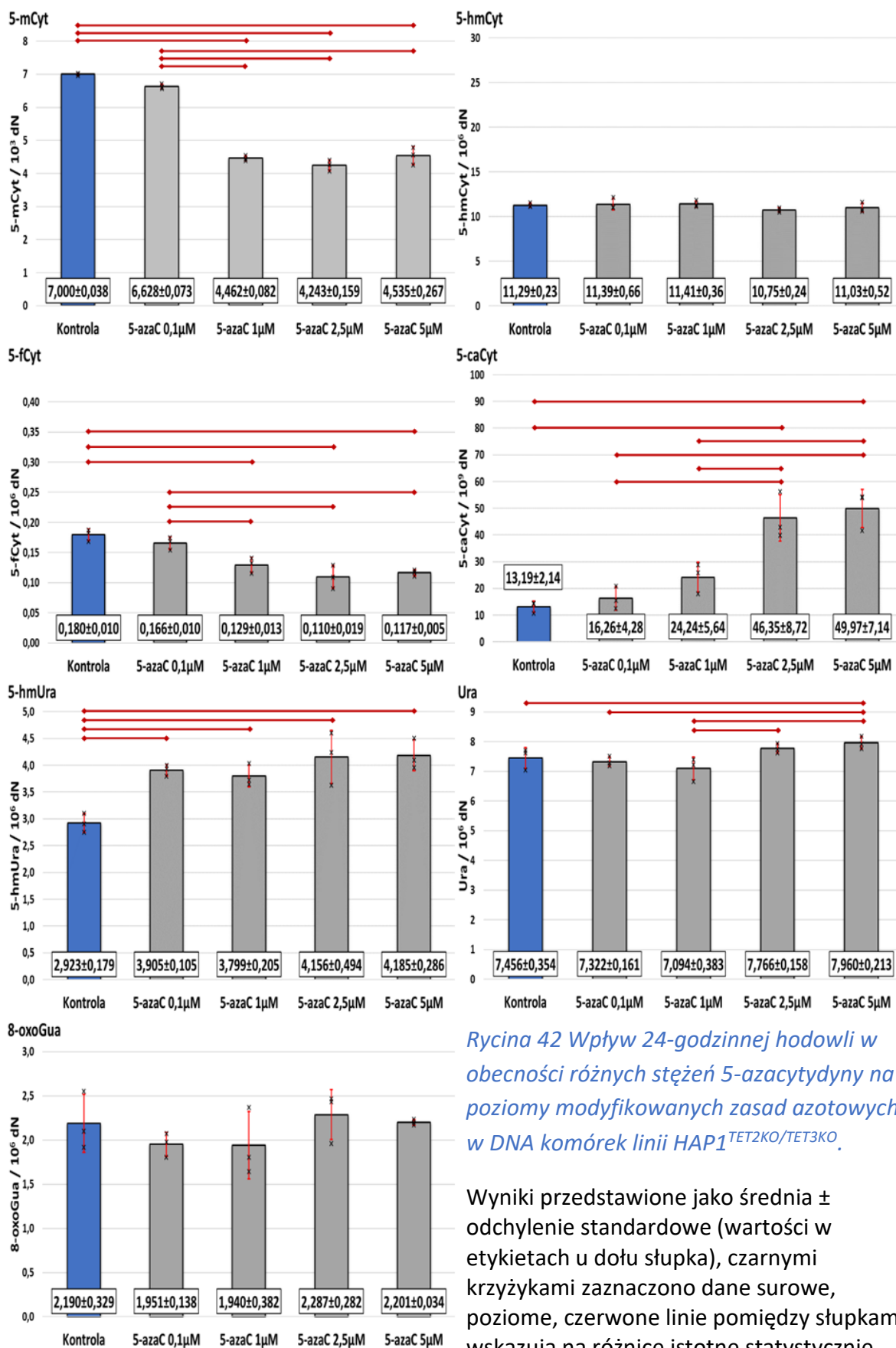


Rycina 41 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń 5-azacytydyny na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET1KO/TET3KO}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.
5-azaC – 5-azacytydyna;

Tabela 42 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET2KO/TET3KO} po 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń 5-azacydyny.

5-mCyt	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM	5-hmCyt	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM
Kontrola	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	Kontrola	0,946	0,577	0,997	0,998
5-azaC 0,1μM	<0,001	<0,001	<0,001		5-azaC 0,1μM	0,844	0,422	1,000	
5-azaC 1μM	0,971	0,421			5-azaC 1μM	0,826	0,403		
5-azaC 2,5μM	0,189				5-azaC 2,5μM	0,927			
5-fCyt	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM	5-caCyt	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM
Kontrola	0,001	<0,001	0,004	0,640	Kontrola	<0,001	0,001	0,239	0,968
5-azaC 0,1μM	0,004	0,002	0,030		5-azaC 0,1μM	<0,001	0,001	0,517	
5-azaC 1μM	0,699	0,332			5-azaC 1μM	0,003	0,008		
5-azaC 2,5μM	0,951				5-azaC 2,5μM	0,943			
5-hmUra	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM	Ura	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM
Kontrola	0,002	0,003	0,025	0,012	Kontrola	0,046	0,193	0,133	0,557
5-azaC 0,1μM	0,754	0,817	0,990		5-azaC 0,1μM	0,016	0,073	0,328	
5-azaC 1μM	0,502	0,571			5-azaC 1μM	0,003	0,013		
5-azaC 2,5μM	1,000				5-azaC 2,5μM	0,401			
8-oxoGua	5-azaC 5μM	5-azaC 2,5μM	5-azaC 1μM	5-azaC 0,1μM					
Kontrola	1,000	0,991	0,777	0,803					
5-azaC 0,1μM	0,779	0,559	1,000						
5-azaC 1μM	0,751	0,529							
5-azaC 2,5μM	0,994								



Rycina 42 Wpływ 24-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń 5-azacytyny na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET2KO/TET3KO}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżkami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.
5-azaC – 5-azacytyna;

4.3.4 Chlorek kobaltu(II)

Jak już wspomniano wcześniej, dwuwartościowe jony metali ciężkich mogą konkurować z jonami żelaza o miejsce w centrum aktywnym różnych enzymów w tym białek TET. Jony kobaltu stanowią szczególnie ciekawy przypadek, ponieważ potrafią również wypierać jony żelaza z centrum aktywnego hydroksylaz prolinowych, hamując ich aktywność, co skutkuje akumulacją białka HIF1 α i indukcją w komórce stanu podobnego do hipoksji. Postanowiono zatem zbadać wpływ tego związku na komórki parentalnej linii HAP1^{WT} i z funkcjonalnymi, podwójnymi, nokautami: *TET1KO/TET2KO*, *TET1KO/TET3KO* i *TET2KO/TET3KO*, hodując je przez 24 i 48 godzin w obecności chlorku kobaltu (II) w stężeniach: 50 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$ i 200 $\mu\text{mol/l}$. Do komórek kontrolnych dodawano 100 μl czystej chemicznie, sterylnej wody. Wyniki eksperymentu przedstawiono na Rycinie 43 (dla linii HAP1^{WT}), Rycinie 44 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET2KO}), Rycinie 45 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET3KO}) i Rycinie 46 (dla linii HAP1^{TET2KO/TET3KO}). Wyniki analiz statystycznych zamieszczono w Tabeli 43 (dla linii HAP1^{WT}), Tabeli 44 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET2KO}), Tabeli 45 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET3KO}) i Tabeli 46 (dla linii HAP1^{TET2KO/TET3KO}).

W linii HAP1^{WT} obserwowano zależny od dawki spadek 5-hmCyt i 5-fCyt po w komórkach narażonych na chlorek kobaltu(II), zarówno po 24, jak i 48 godzinach inkubacji. W przypadku 5-caCyt spadek był istotny statystycznie jedynie w przypadku komórek hodowanych przez 48 godzin w obecności jonów kobaltu. Warto zauważyć, iż bazowy poziom tych modyfikacji był istotnie wyższy, w komórkach hodowanych przez 48 godzin.

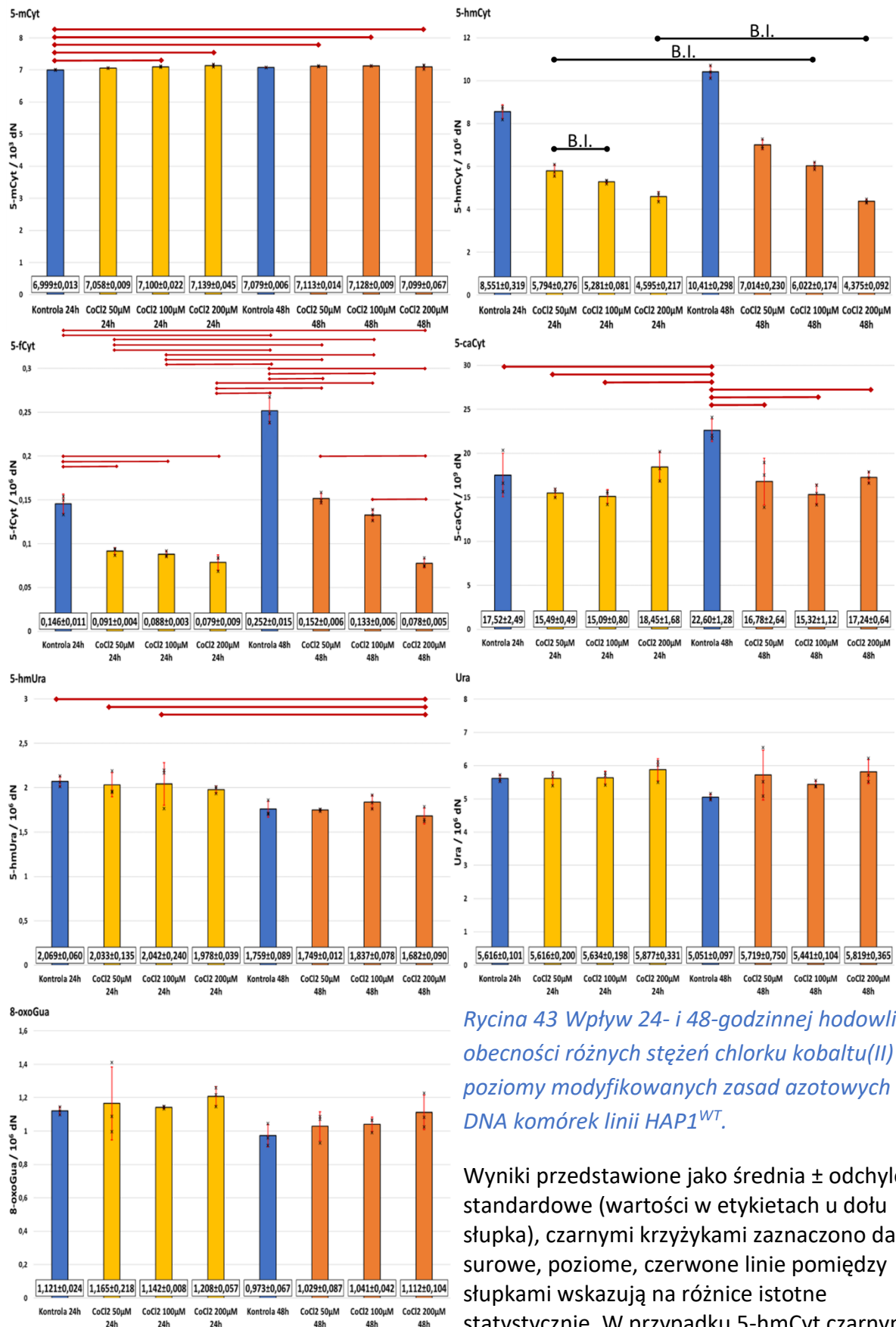
W linii HAP1^{TET1KO/TET2KO} obserwowano istotny statystycznie spadek poziomu 5-hmCyt po ekspozycji na chlorek kobaltu, w obu punktach czasowych. Co ciekawe zaobserwowano również istotny statystycznie wzrost poziomu 5-caCyt po 24-godzinnej ekspozycji na 200 $\mu\text{mol/l}$ chlorku kobaltu.

W przypadku linii HAP1^{TET1KO/TET3KO}, obserwowano istotny statystycznie spadek 5-hmCyt i 5-fCyt w komórkach narażonych na chlorek kobaltu(II), zarówno po 24, jak i 48 godzinach inkubacji. W przypadku 48-godzinnej ekspozycji efekt był zależny od dawki badanego związku. W przypadku 5-caCyt obserwowany spadek był istotny statystycznie jedynie w przypadku komórek hodowanych przez 48 godzin w obecności jonów kobaltu. Ponadto, w komórkach kontrolnych zaobserwowano istotne statystycznie różnice w poziomie 5-hmCyt, 5-fCyt, 5caCyt (wzrost) i 8-oxoGua (spadek) pomiędzy 24 a 48 godzinami hodowli.

W linii HAP1^{TET2KO/TET3KO} obserwowano istotne statystycznie spadki poziomu 5-hmCyt (zależne od dawki) i 5-fCyt po ekspozycji na jony kobaltu w obu badanych punktach czasowych. Ponadto, 24-godzinna hodowla w obecności chlorku kobaltu, niezależnie od stężenia, istotnie obniżyła poziom 5-hmUra w tej linii komórkowej.

Tabela 43 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{WT} po 24- i 48-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń chlorku kobaltu(II).

5-mCyt	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	0,019	0,002	0,007	0,085	0,001	0,017	0,336
CoCl2 50µM 24h	0,717	0,164	0,403	0,987	0,077	0,696	
CoCl2 100µM 24h	1,000	0,945	0,999	0,988	0,775		
CoCl2 200µM 24h	0,756	1,000	0,962	0,311			
Kontrola 48h	0,990	0,539	0,866				
CoCl2 50µM 48h	0,999	0,998					
CoCl2 100µM 48h	0,936						
5-hmCyt	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CoCl2 50µM 24h	<0,001	0,910	<0,001	<0,001	<0,001	0,172	
CoCl2 100µM 24h	0,003	0,018	<0,001	<0,001	0,032		
CoCl2 200µM 24h	0,924	<0,001	<0,001	<0,001			
Kontrola 48h	<0,001	<0,001	<0,001				
CoCl2 50µM 48h	<0,001	0,001					
CoCl2 100µM 48h	<0,001						
5-fCyt	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	<0,001	0,574	0,983	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CoCl2 50µM 24h	0,498	<0,001	<0,001	<0,001	0,575	1,000	
CoCl2 100µM 24h	0,778	<0,001	<0,001	<0,001	0,842		
CoCl2 200µM 24h	1,000	<0,001	<0,001	<0,001			
Kontrola 48h	<0,001	<0,001	<0,001				
CoCl2 50µM 48h	<0,001	0,169					
CoCl2 100µM 48h	<0,001						
5-caCyt	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	1,000	0,686	0,999	0,021	0,995	0,582	0,759
CoCl2 50µM 24h	0,863	1,000	0,968	0,001	0,356	1,000	
CoCl2 100µM 24h	0,708	1,000	0,884	0,001	0,227		
CoCl2 200µM 24h	0,978	0,296	0,890	0,080			
Kontrola 48h	0,014	0,001	0,007				
CoCl2 50µM 48h	1,000	0,940					
CoCl2 100µM 48h	0,803						
5-hmUra	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	0,013	0,263	0,051	0,062	0,971	1,000	1,000
CoCl2 50µM 24h	0,027	0,450	0,104	0,126	0,999	1,000	
CoCl2 100µM 24h	0,022	0,396	0,087	0,106	0,996		
CoCl2 200µM 24h	0,082	0,788	0,274	0,321			
Kontrola 48h	0,988	0,987	1,000				
CoCl2 50µM 48h	0,995	0,975					
CoCl2 100µM 48h	0,701						
Ura	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	0,994	0,998	1,000	0,485	0,976	1,000	1,000
CoCl2 50µM 24h	0,994	0,998	1,000	0,485	0,976	1,000	
CoCl2 100µM 24h	0,997	0,996	1,000	0,448	0,984		
CoCl2 200µM 24h	1,000	0,756	0,999	0,118			
Kontrola 48h	0,169	0,840	0,297				
CoCl2 50µM 48h	1,000	0,967					
CoCl2 100µM 48h	0,859						
8-oxoGua	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	1,000	0,967	0,934	0,595	0,947	1,000	0,999
CoCl2 50µM 24h	0,997	0,762	0,679	0,296	0,999	1,000	
CoCl2 100µM 24h	1,000	0,897	0,836	0,442	0,988		
CoCl2 200µM 24h	0,917	0,451	0,373	0,125			
Kontrola 48h	0,661	0,987	0,996				
CoCl2 50µM 48h	0,960	1,000					
CoCl2 100µM 48h	0,982						



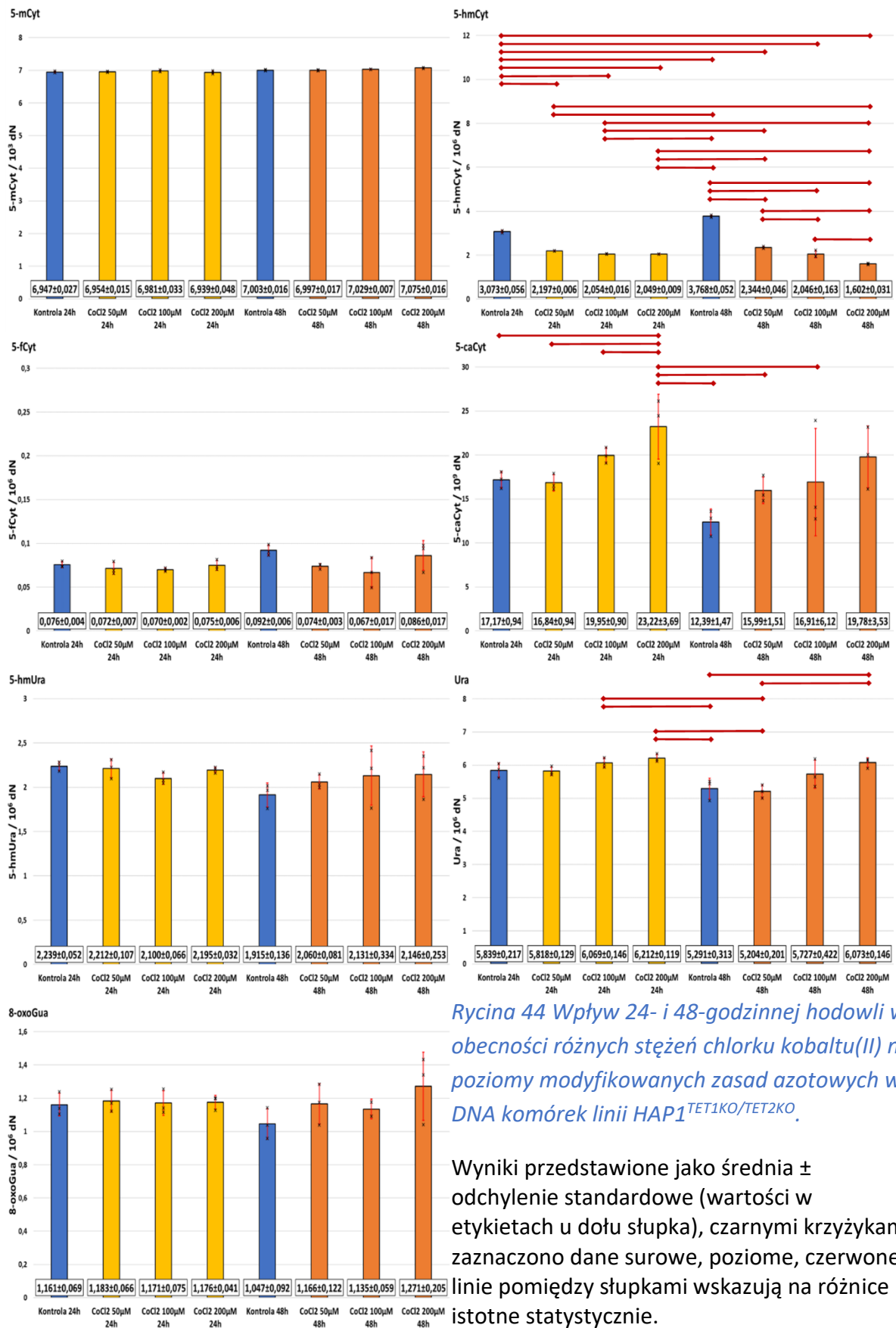
Rycina 43 Wpływ 24- i 48-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń chlorku kobaltu(II) na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{WT}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie. W przypadku 5-hmCyt czarnymi, poziomymi liniami zaznaczono brak istotnych różnic statystycznych.

CoCl2 – chlorek kobaltu(II)

Tabela 44 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET1KO/TET2KO} po 24- i 48-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń chlorku kobaltu(II).

5-mCyt	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	<0,001	0,020	0,293	0,197	1,000	0,738	1,000
CoCl2 50µM 24h	0,001	0,038	0,463	0,330	0,993	0,897	
CoCl2 100µM 24h	0,006	0,330	0,990	0,954	0,495		
CoCl2 200µM 24h	<0,001	0,009	0,152	0,097			
Kontrola 48h	0,046	0,897	1,000				
CoCl2 50µM 48h	0,029	0,783					
CoCl2 100µM 48h	0,384						
5-hmCyt	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CoCl2 50µM 24h	<0,001	0,174	0,199	<0,001	0,191	0,221	
CoCl2 100µM 24h	<0,001	1,000	0,002	<0,001	1,000		
CoCl2 200µM 24h	<0,001	1,000	0,001	<0,001			
Kontrola 48h	<0,001	<0,001	<0,001				
CoCl2 50µM 48h	<0,001	0,001					
CoCl2 100µM 48h	<0,001						
5-fCyt	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	0,864	0,929	1,000	0,450	1,000	0,994	0,999
CoCl2 50µM 24h	0,573	0,998	1,000	0,209	1,000	1,000	
CoCl2 100µM 24h	0,460	1,000	1,000	0,152	0,997		
CoCl2 200µM 24h	0,831	0,948	1,000	0,410			
Kontrola 48h	0,994	0,070	0,327				
CoCl2 50µM 48h	0,746	0,978					
CoCl2 100µM 48h	0,251						
5-caCyt	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	0,297	0,918	0,633	0,066	0,024	0,267	0,896
CoCl2 50µM 24h	0,244	0,978	0,728	0,085	0,018	0,218	
CoCl2 100µM 24h	0,943	0,228	0,121	0,007	0,197		
CoCl2 200µM 24h	0,175	0,019	0,009	<0,001			
Kontrola 48h	0,008	0,081	0,157				
CoCl2 50µM 48h	0,137	0,707					
CoCl2 100µM 48h	0,255						
5-hmUra	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	0,996	0,991	0,880	0,308	1,000	0,963	1,000
CoCl2 50µM 24h	1,000	0,999	0,944	0,404	1,000	0,989	
CoCl2 100µM 24h	1,000	1,000	1,000	0,860	0,996		
CoCl2 200µM 24h	1,000	1,000	0,969	0,473			
Kontrola 48h	0,683	0,744	0,953				
CoCl2 50µM 48h	0,998	0,999					
CoCl2 100µM 48h	1,000						
Ura	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	0,912	0,999	0,065	0,145	0,538	0,919	1,000
CoCl2 50µM 24h	0,871	1,000	0,080	0,175	0,474	0,880	
CoCl2 100µM 24h	1,000	0,633	0,007	0,016	0,994		
CoCl2 200µM 24h	0,995	0,246	0,002	0,004			
Kontrola 48h	0,015	0,360	1,000				
CoCl2 50µM 48h	0,006	0,182					
CoCl2 100µM 48h	0,620						
8-oxoGua	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	0,895	1,000	1,000	0,874	1,000	1,000	1,000
CoCl2 50µM 24h	0,963	0,999	1,000	0,755	1,000	1,000	
CoCl2 100µM 24h	0,931	1,000	1,000	0,824	1,000		
CoCl2 200µM 24h	0,945	1,000	1,000	0,800			
Kontrola 48h	0,227	0,980	0,852				
CoCl2 50µM 48h	0,913	1,000					
CoCl2 100µM 48h	0,837						



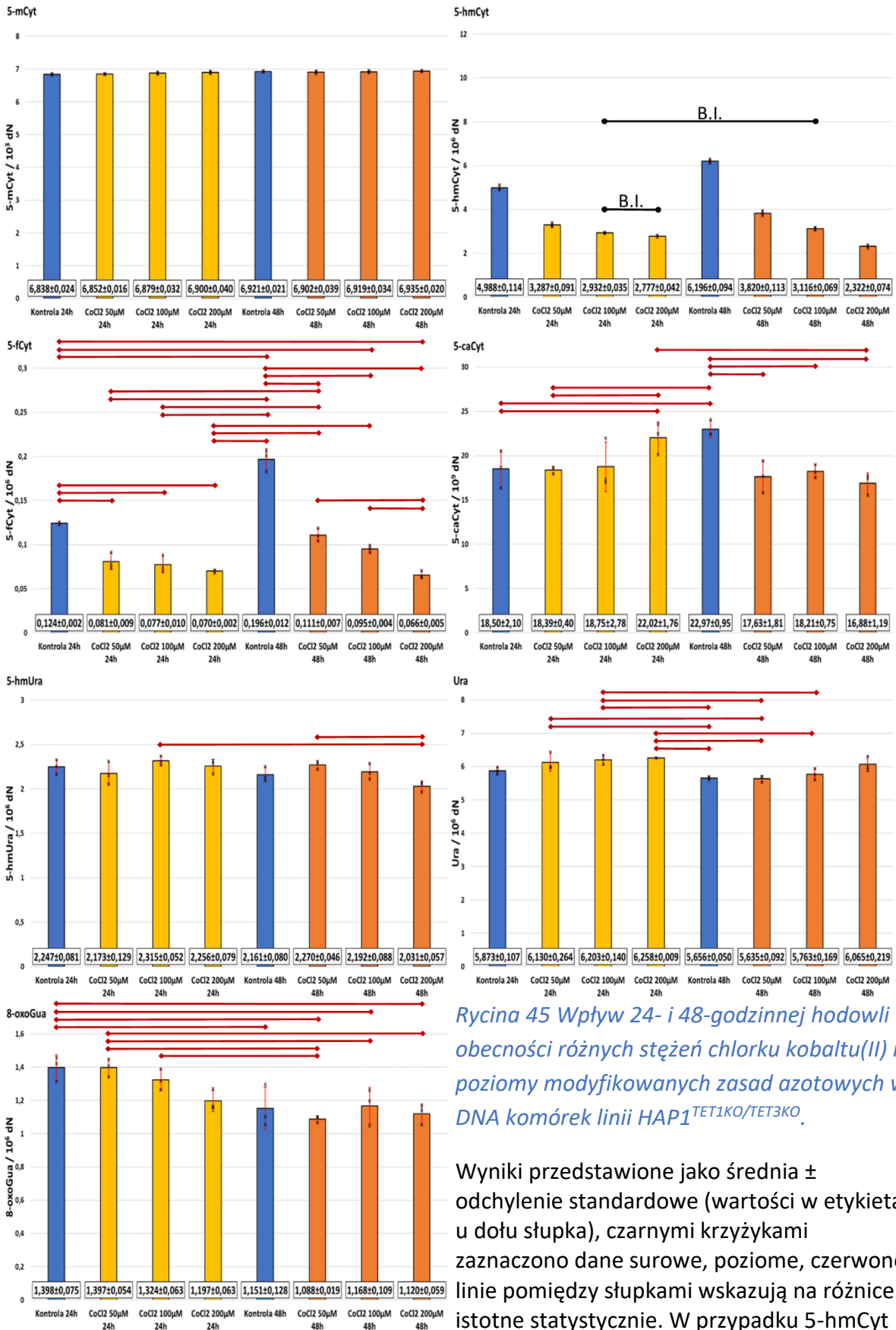
Rycina 44 Wpływ 24- i 48-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń chlorku kobaltu(II) na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET1KO/TET2KO}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

CoCl2 – chlorek kobaltu(II);

Tabela 45 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET1KO/TET3KO} po 24- i 48-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń chlorku kobaltu(II).

5-mCyt	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	0,018	0,062	0,214	0,053	0,243	0,699	0,999
CoCl2 50µM 24h	0,051	0,164	0,464	0,142	0,510	0,940	
CoCl2 100µM 24h	0,338	0,708	0,975	0,658	0,985		
CoCl2 200µM 24h	0,819	0,991	1,000	0,984			
Kontrola 48h	0,999	1,000	0,991				
CoCl2 50µM 48h	0,856	0,995					
CoCl2 100µM 48h	0,997						
5-hmCyt	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CoCl2 50µM 24h	<0,001	0,259	<0,001	<0,001	<0,001	0,002	
CoCl2 100µM 24h	<0,001	0,197	<0,001	<0,001	0,365		
CoCl2 200µM 24h	<0,001	0,003	<0,001	<0,001			
Kontrola 48h	<0,001	<0,001	<0,001				
CoCl2 50µM 48h	<0,001	<0,001					
CoCl2 100µM 48h	<0,001						
5-fCyt	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	<0,001	0,003	0,366	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CoCl2 50µM 24h	0,238	0,317	0,003	<0,001	0,609	0,999	
CoCl2 100µM 24h	0,527	0,124	0,001	<0,001	0,907		
CoCl2 200µM 24h	0,995	0,012	<0,001	<0,001			
Kontrola 48h	<0,001	<0,001	<0,001				
CoCl2 50µM 48h	<0,001	0,203					
CoCl2 100µM 48h	0,003						
5-caCyt	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	0,243	0,834	0,524	0,004	0,018	0,852	0,933
CoCl2 50µM 24h	0,276	0,900	0,579	0,003	0,015	0,787	
CoCl2 100µM 24h	0,180	0,692	0,412	0,006	0,027		
CoCl2 200µM 24h	0,001	0,012	0,005	0,488			
Kontrola 48h	<0,001	0,003	0,001				
CoCl2 50µM 48h	0,583	0,667					
CoCl2 100µM 48h	0,333						
5-hmUra	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	0,068	0,987	1,000	0,878	1,000	0,963	0,940
CoCl2 50µM 24h	0,417	1,000	0,807	1,000	0,903	0,422	
CoCl2 100µM 24h	0,010	0,583	0,997	0,327	0,981		
CoCl2 200µM 24h	0,054	0,972	1,000	0,824			
Kontrola 48h	0,524	1,000	0,704				
CoCl2 50µM 48h	0,035	0,921					
CoCl2 100µM 48h	0,283						
Ura	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	0,145	0,393	0,076	0,103	0,007	0,018	0,057
CoCl2 50µM 24h	0,612	0,010	0,001	0,002	0,323	0,565	
CoCl2 100µM 24h	0,285	0,003	<0,001	<0,001	0,671		
CoCl2 200µM 24h	0,144	0,001	<0,001	<0,001			
Kontrola 48h	0,005	0,407	0,869				
CoCl2 50µM 48h	0,003	0,323					
CoCl2 100µM 48h	0,028						
8-oxoGua	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	0,009	0,038	0,003	0,023	0,088	0,932	1,000
CoCl2 50µM 24h	0,009	0,039	0,003	0,024	0,090	0,935	
CoCl2 100µM 24h	0,081	0,285	0,032	0,190	0,515		
CoCl2 200µM 24h	0,918	1,000	0,680	0,995			
Kontrola 48h	1,000	1,000	0,968				
CoCl2 50µM 48h	0,999	0,900					
CoCl2 100µM 48h	0,993						



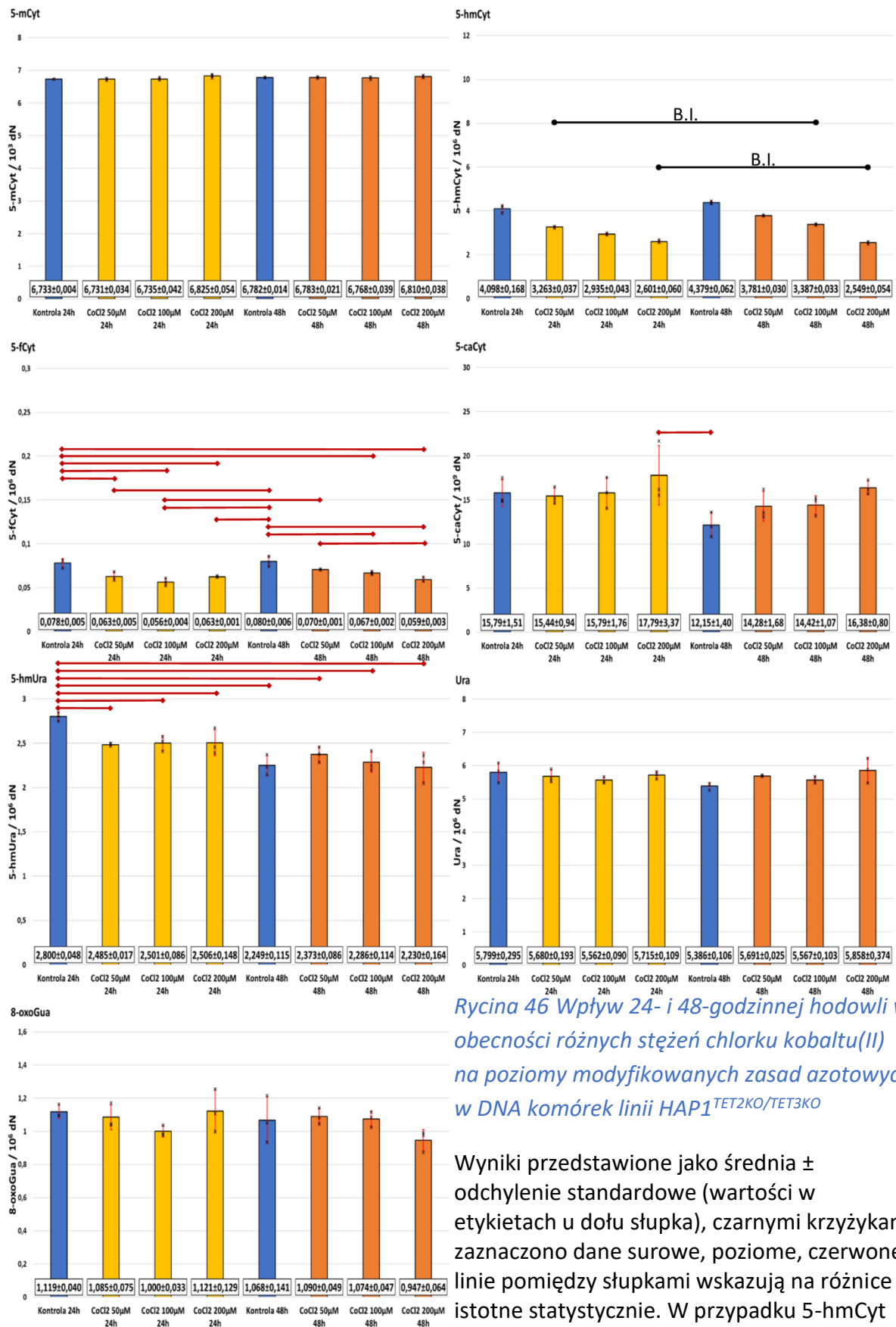
Rycina 45 Wpływ 24- i 48-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń chlorku kobaltu(II) na poziomy modyfikowanych zasad azotowych DNA komórek linii HAP1^{TET1KO/TET3KO}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie. W przypadku 5-hmCyt czarnymi, poziomymi liniami zaznaczono brak istotnych różnic statystycznych.

CoCl2 – chlorek kobaltu(II);

Tabela 46 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET2KO/TET3KO} po 24- i 48-godzinnej hodowli w obecności różnych chlorku kobaltu(II).

5-mCyt	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	0,188	0,916	0,656	0,667	0,072	1,000	1,000
CoCl2 50µM 24h	0,169	0,894	0,617	0,628	0,064	1,000	
CoCl2 100µM 24h	0,204	0,931	0,685	0,696	0,079		
CoCl2 200µM 24h	0,999	0,481	0,791	0,781			
Kontrola 48h	0,972	0,999	1,000				
CoCl2 50µM 48h	0,974	0,999					
CoCl2 100µM 48h	0,798						
5-hmCyt	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	<0,001	<0,001	0,002	0,005	<0,001	<0,001	<0,001
CoCl2 50µM 24h	<0,001	0,488	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	
CoCl2 100µM 24h	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001		
CoCl2 200µM 24h	0,986	<0,001	<0,001	<0,001			
Kontrola 48h	<0,001	<0,001	<0,001				
CoCl2 50µM 48h	<0,001	<0,001					
CoCl2 100µM 48h	<0,001						
5-fCyt	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	<0,001	0,033	0,275	0,999	0,002	<0,001	0,003
CoCl2 50µM 24h	0,937	0,890	0,261	0,001	1,000	0,448	
CoCl2 100µM 24h	0,973	0,056	0,006	<0,001	0,492		
CoCl2 200µM 24h	0,955	0,859	0,232	0,001			
Kontrola 48h	<0,001	0,011	0,112				
CoCl2 50µM 48h	0,035	0,916					
CoCl2 100µM 48h	0,289						
5-caCyt	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	1,000	0,974	0,957	0,241	0,841	1,000	1,000
CoCl2 50µM 24h	0,997	0,995	0,989	0,342	0,717	1,000	
CoCl2 100µM 24h	1,000	0,973	0,957	0,239	0,842		
CoCl2 200µM 24h	0,969	0,317	0,276	0,019			
Kontrola 48h	0,121	0,748	0,797				
CoCl2 50µM 48h	0,810	1,000					
CoCl2 100µM 48h	0,853						
5-hmUra	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,004	0,004	0,002
CoCl2 50µM 24h	0,010	0,038	0,220	0,016	0,810	0,856	
CoCl2 100µM 24h	0,007	0,026	0,164	0,011	0,953		
CoCl2 200µM 24h	0,006	0,023	0,148	0,010			
Kontrola 48h	0,830	0,678	0,179				
CoCl2 50µM 48h	0,124	0,340					
CoCl2 100µM 48h	0,531						
Ura	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	1,000	0,820	0,997	0,230	0,999	0,805	0,994
CoCl2 50µM 24h	0,944	0,996	1,000	0,607	1,000	0,994	
CoCl2 100µM 24h	0,600	1,000	0,990	0,947	0,975		
CoCl2 200µM 24h	0,982	0,979	1,000	0,478			
Kontrola 48h	0,126	0,940	0,566				
CoCl2 50µM 48h	0,960	0,992					
CoCl2 100µM 48h	0,618						
8-oxoGua	CoCl2 200µM 48h	CoCl2 100µM 48h	CoCl2 50µM 48h	Kontrola 48h	CoCl2 200µM 24h	CoCl2 100µM 24h	CoCl2 50µM 24h
Kontrola 24h	0,234	0,997	1,000	0,993	1,000	0,643	0,999
CoCl2 50µM 24h	0,470	1,000	1,000	1,000	0,999	0,896	
CoCl2 100µM 24h	0,991	0,946	0,870	0,967	0,624		
CoCl2 200µM 24h	0,222	0,996	1,000	0,990			
Kontrola 48h	0,626	1,000	1,000				
CoCl2 50µM 48h	0,433	1,000					
CoCl2 100µM 48h	0,565						



Rycina 46 Wpływ 24- i 48-godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń chlorku kobaltu(II) na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET2KO/TET3KO}

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie. W przypadku 5-hmCyt czarnymi, poziomymi liniami zaznaczono brak różnic istotnych statystycznie. **CoCl2** – chlorek kobaltu(II).

4.3.5 Hipoksja

Obiecujące wyniki eksperymentów z chlorkiem kobaltu(II) i indukowanej przez ten związek „pseudohipoksji” zrodziły pytania o wpływ samej hipoksji na poziomy epigenetycznych modyfikacji w DNA, będących produktami aktywności białek TET. Aby na nie odpowiedzieć postanowiono wykonać eksperyment polegający na hodowli komórek parentalnej linii HAP1^{WT} i z pojedynczymi, funkcjonalnymi nokautami: *TET1KO*, *TET2KO* i *TET3KO* przez 24 i 72 godziny w warunkach obniżonego stężenia tlenu (0,5 % O₂, 5 % CO₂), uzyskanego poprzez wpompowanie do komory inkubatora gazowego azotu. Jednocześnie, komórki kontrolne hodowano w standardowych dla hodowli komórkowej warunkach (21 % O₂, 5 % CO₂). Wyniki eksperymentu przedstawiono na Rycinie 47 (dla linii HAP1^{WT}), Rycinie 48 (dla linii HAP1^{TET1KO}), Rycinie 49 (dla linii HAP1^{TET2KO}) i Rycinie 50 (dla linii HAP1^{TET3KO}). Wyniki analiz statystycznych zebrano w Tabeli 47 (dla linii HAP1^{WT}), Tabeli 48 (dla linii HAP1^{TET1KO}), Tabeli 49 (dla linii HAP1^{TET2KO}) i Tabeli 50 (dla linii HAP1^{TET3KO}). Eksperyment wykonano w dwóch powtórzeniach biologicznych.

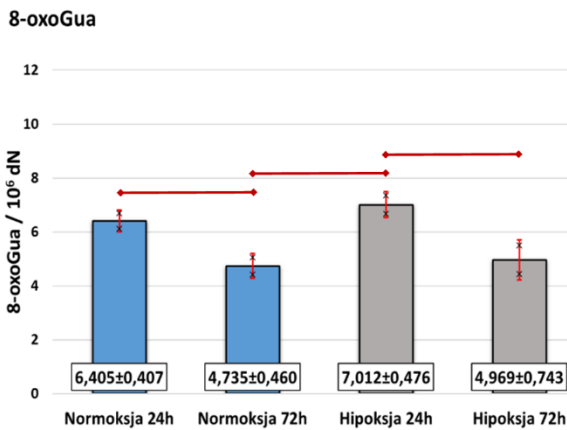
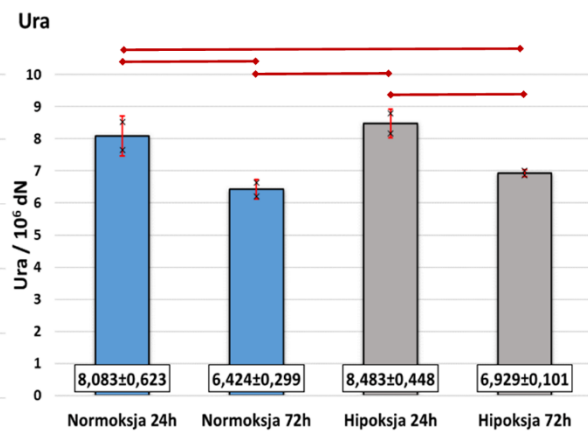
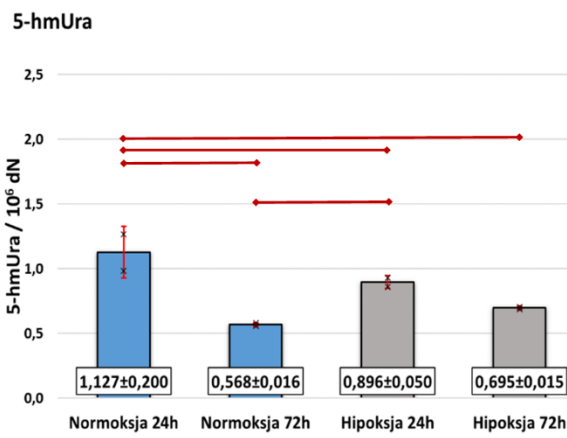
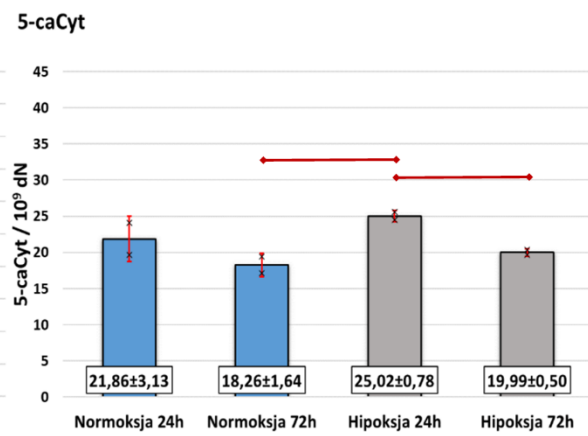
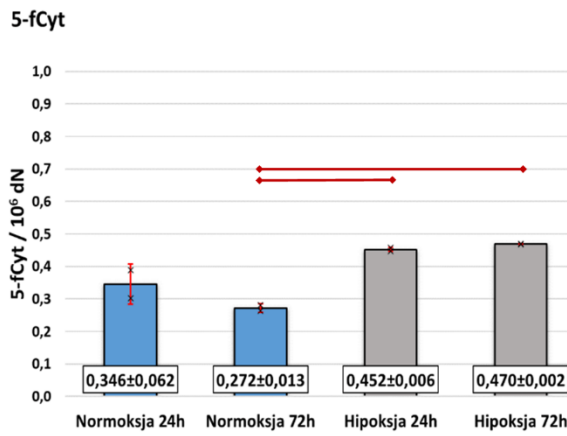
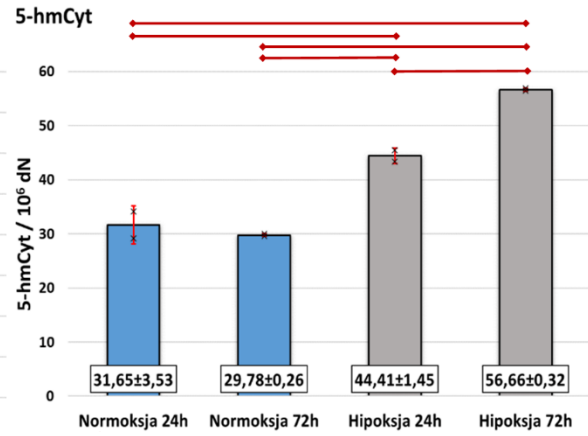
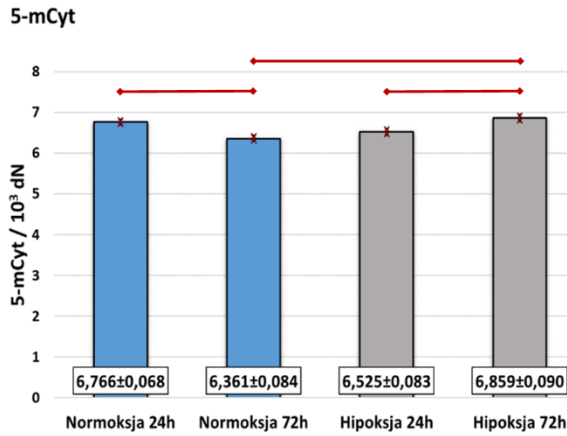
W linii HAP1^{WT} zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu 5-hmCyt po 24 i 72 godzinach narażenia na 0,5 % O₂ w porównaniu do komórek kontrolnych, jak również istotny statystycznie wzrost poziomu 5-fCyt po 72-godzinnym narażeniu na obniżone stężenie tlenu, w porównaniu do komórek kontrolnych, a także niewielki, choć istotny spadek poziomu 5-hmUra po 24-godzinach ekspozycji, względem komórek hodowanych w 21 % O₂. Co ciekawe, nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie 8-oxoGua pomiędzy komórkami hodowanymi przez ten sam czas w warunkach hipoksji i normoksji.

W przypadku linii HAP1^{TET1KO} zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu 5-hmCyt w komórkach hodowanych przez 24 i 72 godziny w atmosferze zawierającej 0,5 % tlenu, w porównaniu do odpowiadających im komórek kontrolnych, a także istotnie podwyższony poziom 8-oxoGua po 24 godzinach hodowli w warunkach hipoksji.

Komórki linii HAP1^{TET2KO} wykazywały istotnie wyższy poziom 5-hmCyt jedynie w przypadku 72-godzinnej hodowli w atmosferze ubogiej w tlen, natomiast w linii HAP1^{TET3KO} istotny statystycznie wzrost poziomu tej modyfikacji obserwowano zarówno po 24, jak i 72 godzinach hodowli w atmosferze zawierającej 0,5 % O₂, w porównaniu do odpowiadających komórek kontrolnych.

Tabela 47 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{WT} po 24- i 72-godzinnej hodowli w atmosferze zawierającej 0,5 % tlenu.

5-mCyt	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,785	0,103	0,011
Normoksja 72h	0,004	0,331	
Hipoksja 24h	0,026		
5-hmCyt	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	<0,001	0,003	0,881
Normoksja 72h	<0,001	0,001	
Hipoksja 24h	0,004		
5-fCyt	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,035	0,066	0,239
Normoksja 72h	0,004	0,006	
Hipoksja 24h	0,986		
5-caCyt	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,840	0,451	0,340
Normoksja 72h	0,874	0,040	
Hipoksja 24h	0,128		
5-hmUra	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,002	0,036	0,001
Normoksja 72h	0,186	0,009	
Hipoksja 24h	0,058		
Ura	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,121	0,866	0,028
Normoksja 72h	0,734	0,010	
Hipoksja 24h	0,037		
8-oxoGua	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,110	0,740	0,062
Normoksja 72h	0,993	0,016	
Hipoksja 24h	0,026		



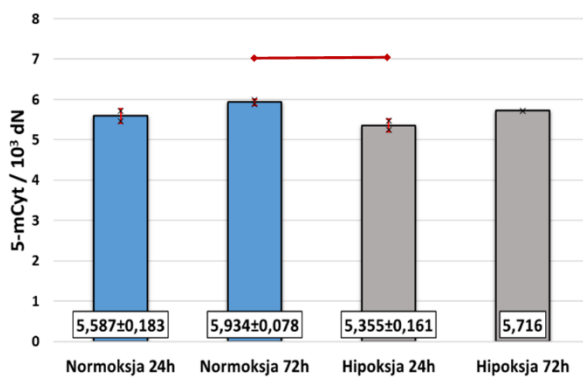
Rycina 47 Wpływ 24- i 72-godzinnej hodowli w atmosferze zawierającej 0,5 % tlenu na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{WT}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżkami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

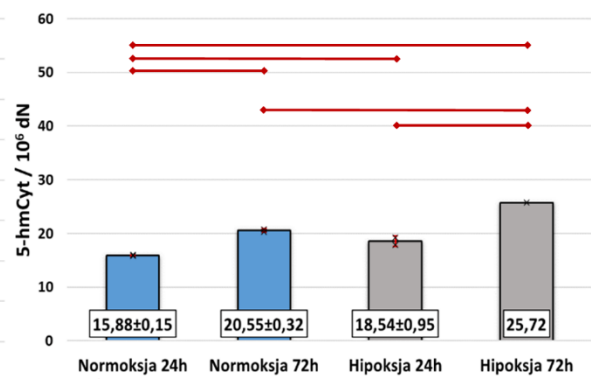
Tabela 48 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET1^{KO}} po 24- i 72-godzinnej hodowli w atmosferze zawierającej 0,5 % tlenu.

5-mCyt	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,860	0,361	0,109
Normoksja 72h	0,372	0,012	
Hipoksja 24h	0,106		
5-hmCyt	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	<0,001	0,026	0,002
Normoksja 72h	0,001	0,083	
Hipoksja 24h	<0,001		
5-fCyt	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,352	0,922	0,018
Normoksja 72h	0,188	0,008	
Hipoksja 24h	0,125		
5-caCyt	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,171	0,894	0,617
Normoksja 72h	0,804	0,988	
Hipoksja 24h	0,509		
5-hmUra	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,599	0,658	0,991
Normoksja 72h	0,867	0,909	
Hipoksja 24h	1,000		
Ura	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,994	1,000	0,840
Normoksja 72h	0,981	0,800	
Hipoksja 24h	0,988		
8-oxoGua	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,170	0,025	0,170
Normoksja 72h	0,997	0,004	
Hipoksja 24h	0,004		

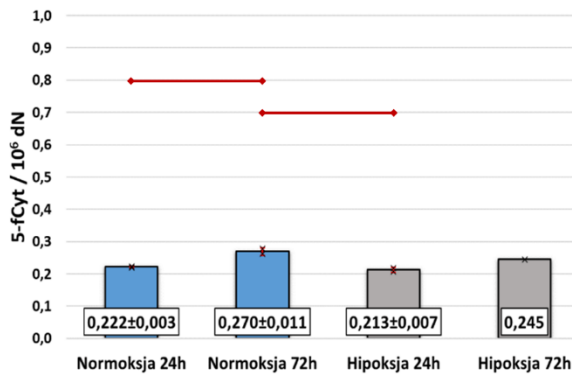
5-mCyt



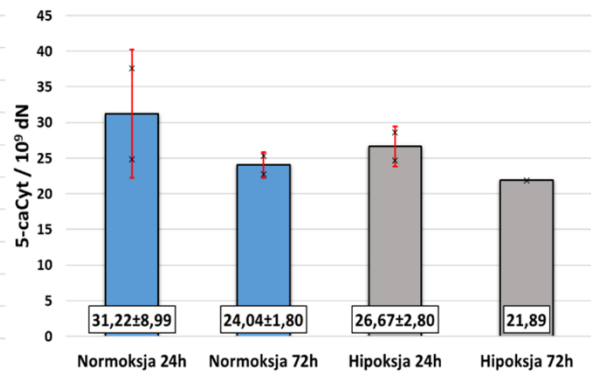
5-hmCyt



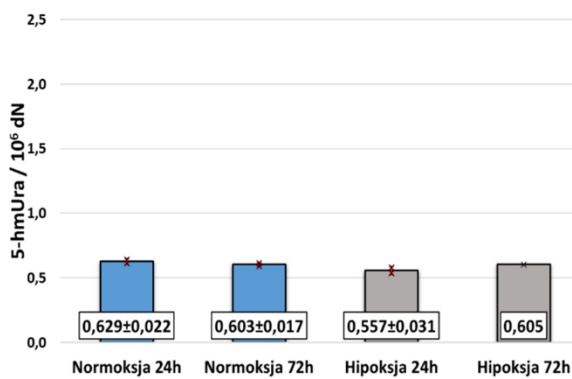
5-fCyt



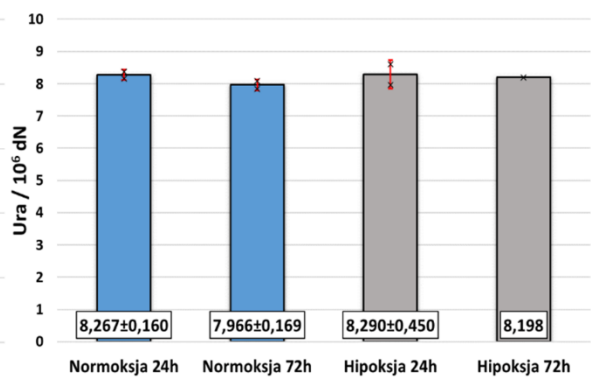
5-caCyt



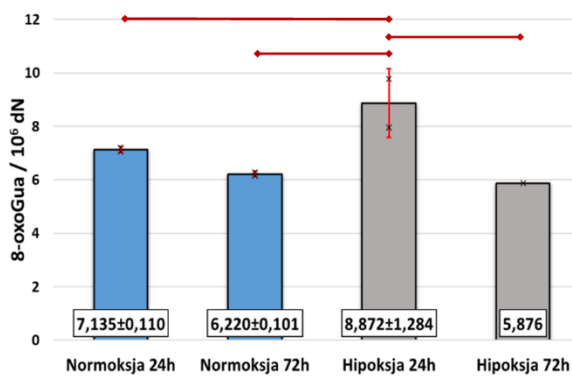
5-hmUra



Ura



8-oxoGua

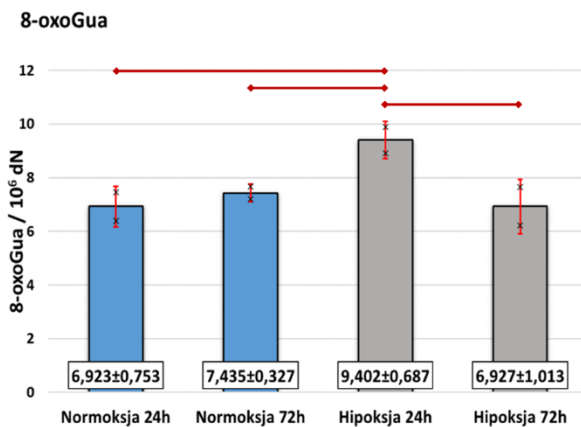
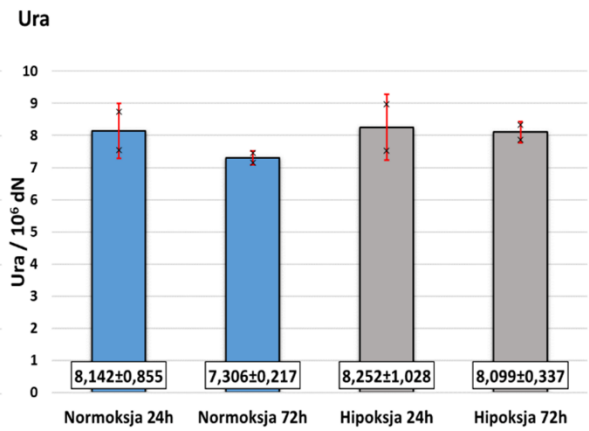
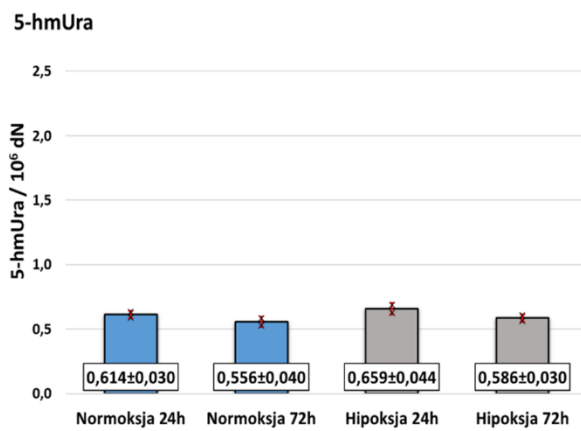
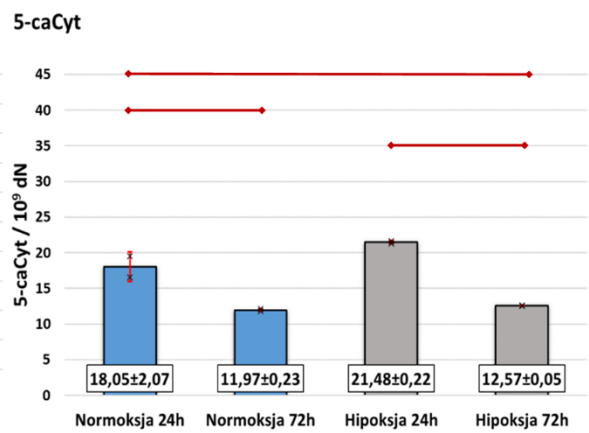
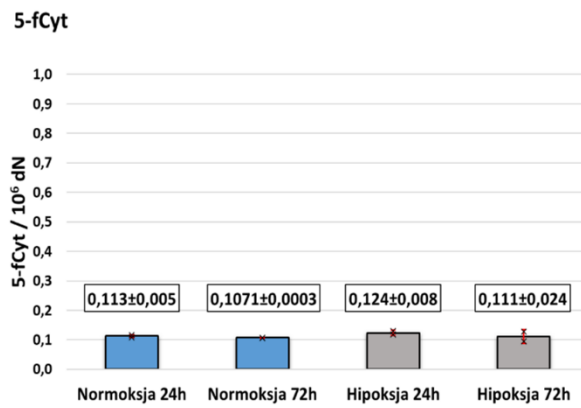
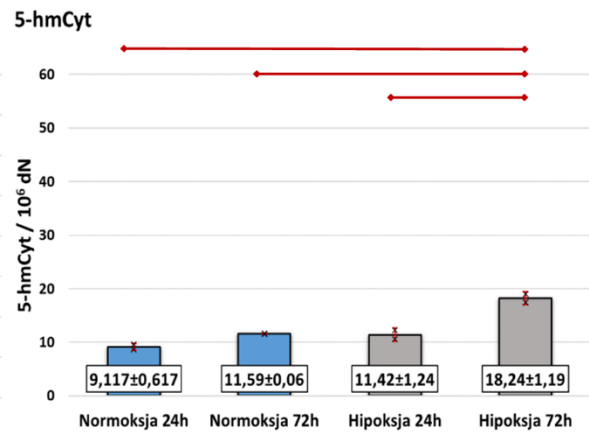
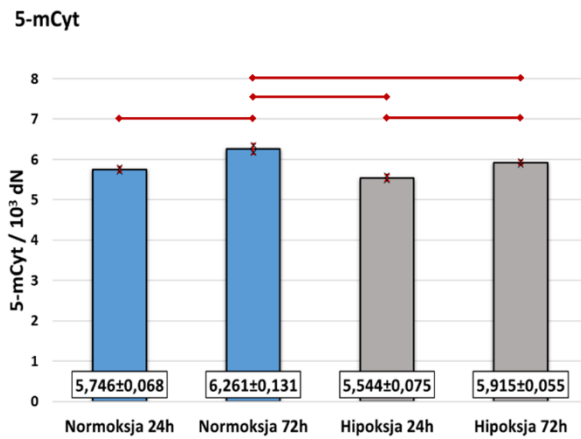


Rycina 48 Wpływ 24- i 72-godzinnej hodowli w atmosferze zawierającej 0,5 % tlenu na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET1KO}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżkami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

Tabela 49 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET2KO} po 24- i 72-godzinnej hodowli w atmosferze zawierającej 0,5 % tlenu.

5-mCyt	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,361	0,232	0,004
Normoksja 72h	0,031	0,001	
Hipoksja 24h	0,022		
5-hmCyt	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	<0,001	0,156	0,123
Normoksja 72h	0,001	1,000	
Hipoksja 24h	0,001		
5-fCyt	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	1,000	1,000	1,000
Normoksja 72h	1,000	0,999	
Hipoksja 24h	1,000		
5-caCyt	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,006	0,053	0,003
Normoksja 72h	0,977	0,000	
Hipoksja 24h	0,001		
5-hmUra	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	1,000	1,000	1,000
Normoksja 72h	1,000	1,000	
Hipoksja 24h	1,000		
Ura	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	1,000	1,000	0,752
Normoksja 72h	0,786	0,662	
Hipoksja 24h	1,000		
8-oxoGua	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,996	0,011	0,486
Normoksja 72h	0,489	0,029	
Hipoksja 24h	0,012		

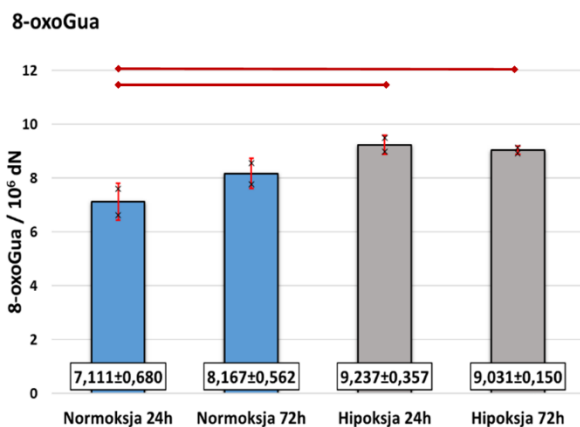
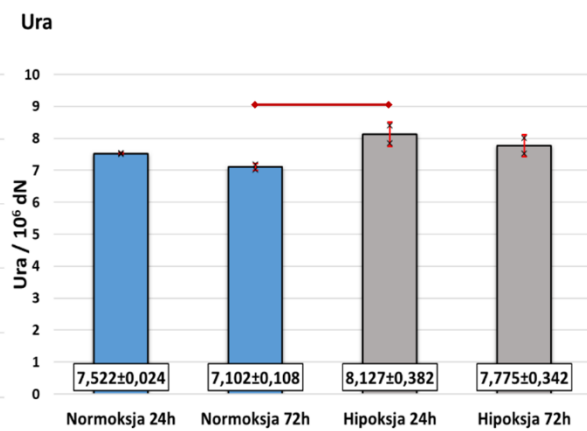
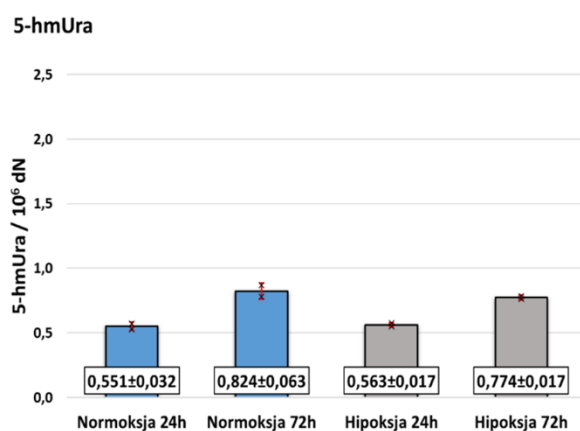
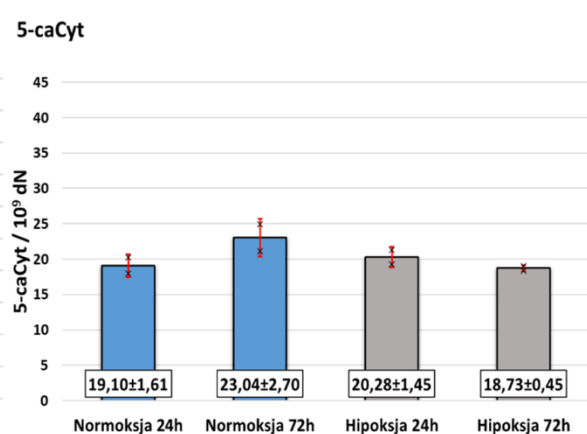
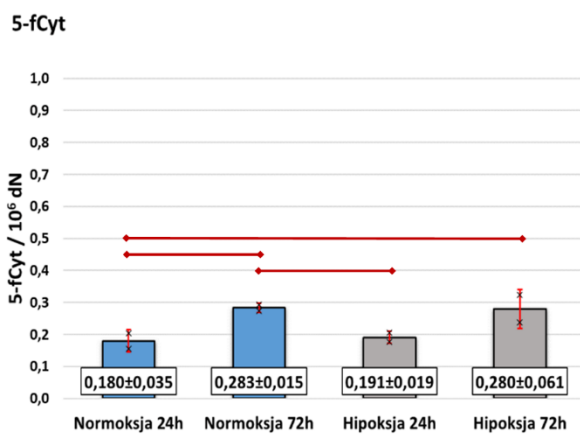
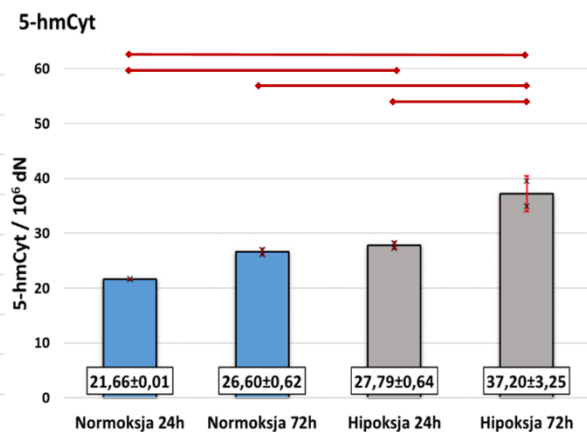
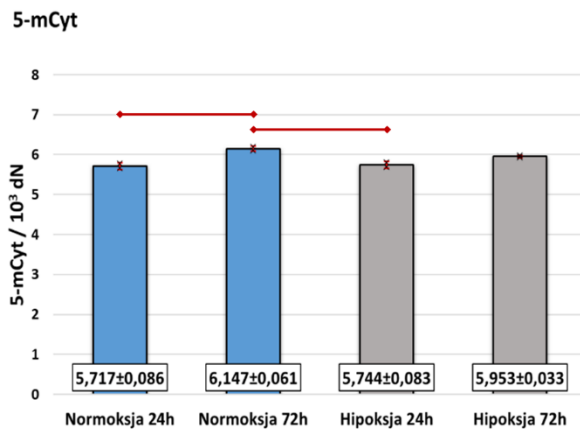


Rycina 49 Wpływ 24- i 72-godzinnej hodowli w atmosferze zawierającej 0,5 % tlenu na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET2KO}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

Tabela 50 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET3KO} po 24- i 72-godzinnej hodowli w atmosferze zawierającej 0,5 % tlenu.

5-mCyt	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,068	0,997	0,004
Normoksja 72h	0,141	0,006	
Hipoksja 24h	0,108		
5-hmCyt	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,001	0,048	0,112
Normoksja 72h	0,004	0,963	
Hipoksja 24h	0,006		
5-fCyt	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,035	0,770	0,032
Normoksja 72h	0,946	0,048	
Hipoksja 24h	0,053		
5-caCyt	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	1,000	0,985	0,409
Normoksja 72h	0,336	0,707	
Hipoksja 24h	0,956		
5-hmUra	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,964	1,000	0,923
Normoksja 72h	1,000	0,934	
Hipoksja 24h	0,971		
Ura	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,393	0,070	0,178
Normoksja 72h	0,050	0,010	
Hipoksja 24h	0,248		
8-oxoGua	Hipoksja 72h	Hipoksja 24h	Normoksja 72h
Normoksja 24h	0,046	0,029	0,341
Normoksja 72h	0,512	0,330	
Hipoksja 24h	0,997		



Rycina 50 Wpływ 24- i 72-godzinnej hodowli w atmosferze zawierającej 0,5 % tlenu na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET3KO}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżkami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

Postanowiono także wykonać nieco zmodyfikowany eksperyment (24 i 48 godzin hodowli) na parentalnej linii HAP1 z podwójnymi, funkcjonalnymi nokautami: *TET1KO/TET2KO*, *TET1KO/TET3KO* i *TET2KO/TET3KO*.

Aby uniknąć potencjalnych zaburzeń wyników związanych ze znacznym odsunięciem w czasie względem poprzednich eksperymentów i związaną z tym faktem zmianą partii odczynników użytych do hodowli, postanowiono również wykonać eksperyment na linii HAP1^{WT}. Komórki wszystkich linii hodowano przez 24 i 48 godzin w atmosferze zawierającej 0,5 % O₂ i 5 % CO₂, natomiast komórki kontrolne były hodowane w atmosferze zawierającej 21 % O₂ i 5% CO₂. Wyniki eksperymentu przedstawiono na Rycinie 51 (dla linii HAP1^{WT}), Rycinie 52 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET2KO}), Rycinie 53 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET3KO}) i Rycinie 54 (dla linii HAP1^{TET2KO/TET3KO}). Wyniki analiz statystycznych zamieszczono w Tabeli 51 (dla linii HAP1^{WT}), Tabeli 52 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET2KO}), Tabeli 53 (dla linii HAP1^{TET1KO/TET3KO}) i Tabeli 54 (dla linii HAP1^{TET2KO/TET3KO}). Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych.

Ponownie, w linii HAP1^{WT} zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt w DNA komórek badanych, zarówno po 24, jak i 48 godzinach hodowli w warunkach ubogo tlenowych, w porównaniu do odpowiadających komórek kontrolnych, któremu nie towarzyszyły zmiany w poziomie 8-oxoGua.

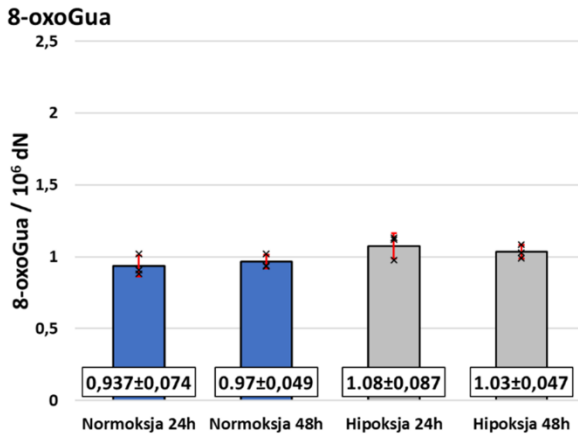
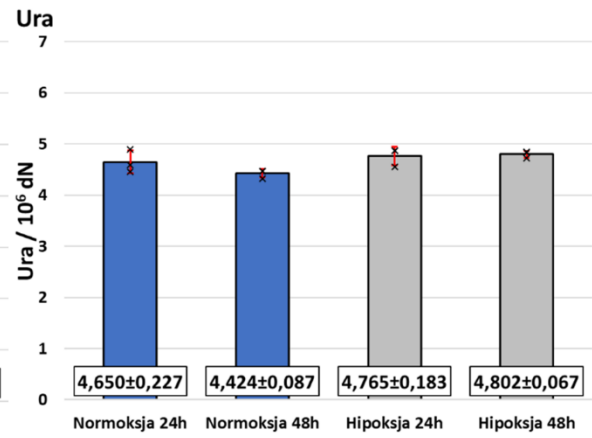
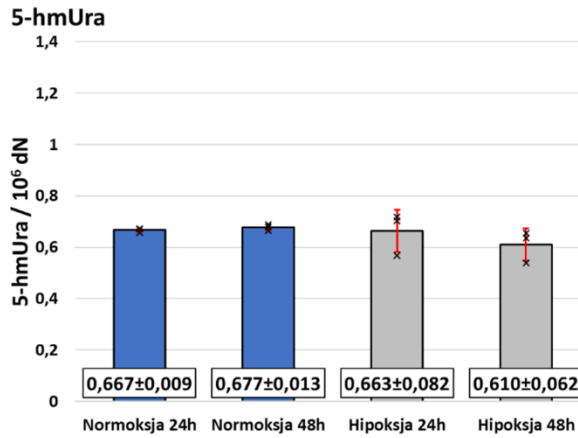
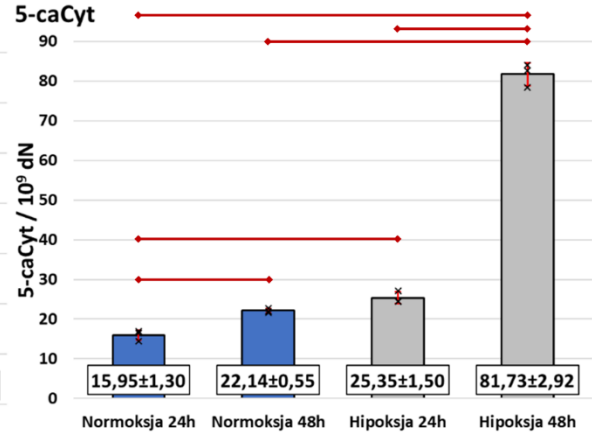
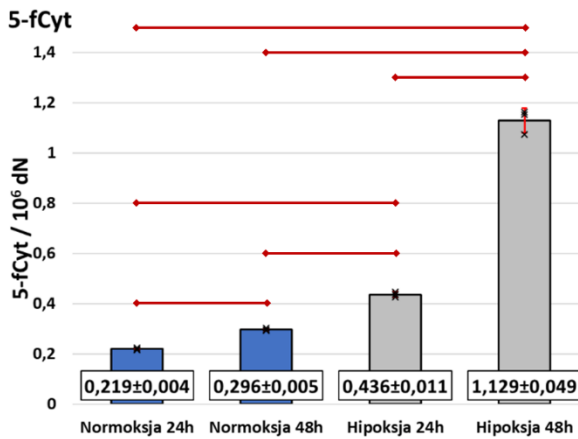
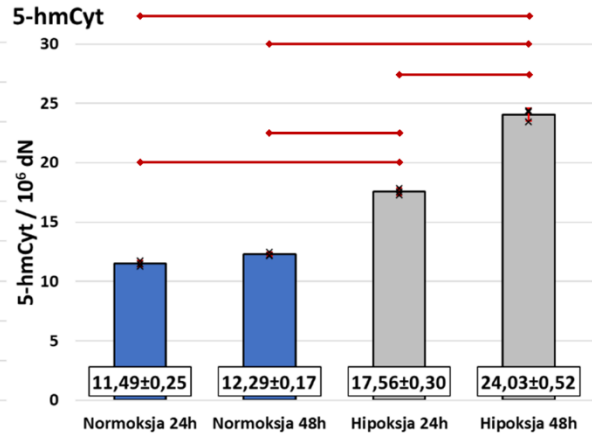
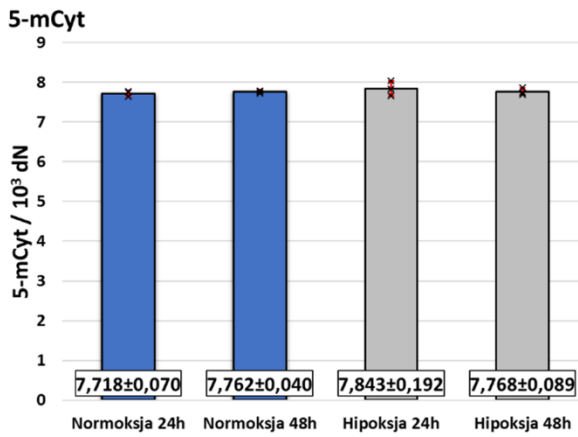
W przypadku linii HAP1^{TET1KO/TET2KO} również obserwowano istotny statystycznie wzrost 5-hmCyt i 5-fCyt, po hodowli w obu punktach czasowych, w warunkach hipoksji, w porównaniu do komórek kontrolnych. Ponadto zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu 5-caCyt i 8-oxoGua w przypadku 48 godzin hodowli w 0,5 % O₂.

Także w komórkach linii HAP1^{TET1KO/TET3KO}, hodowanych w warunkach hipoksji, obserwowano istotny statystycznie wzrost 5-hmCyt i 5-caCyt (w obu punktach czasowych) i 5-fCyt (po 48-godzinach narażenia) w porównaniu do komórek kontrolnych.

W linii HAP1^{TET2KO/TET3KO} zaobserwowano istotny statystycznie wzrost 5-hmCyt i 5-fCyt, po hodowli w obu punktach czasowych, w warunkach hipoksji, w porównaniu do komórek kontrolnych. Ponadto zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu 5-caCyt w przypadku 48 godzin hodowli w 0,5 % O₂.

Tabela 51 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{WT} po 24- i 48-godzinnej hodowli w atmosferze zawierającej 0,5 % tlenu lub 21% tlenu.

5-mCyt	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	0,947	0,558	0,964
Normoksja 48h	1,000	0,813	
Hipoksja 24h	0,845		
5-hmCyt	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	<0,001	<0,001	0,076
Normoksja 48h	<0,001	<0,001	
Hipoksja 24h	<0,001		
5-fCyt	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	<0,001	<0,001	0,024
Normoksja 48h	<0,001	0,001	
Hipoksja 24h	<0,001		
5-caCyt	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	<0,001	0,001	0,012
Normoksja 48h	<0,001	0,204	
Hipoksja 24h	<0,001		
5-hmUra	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	0,560	1,000	0,995
Normoksja 48h	0,439	0,987	
Hipoksja 24h	0,614		
Ura	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	0,646	0,805	0,348
Normoksja 48h	0,069	0,105	
Hipoksja 24h	0,990		
8-oxoGua	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	0,345	0,123	0,951
Normoksja 48h	0,609	0,251	
Hipoksja 24h	0,863		

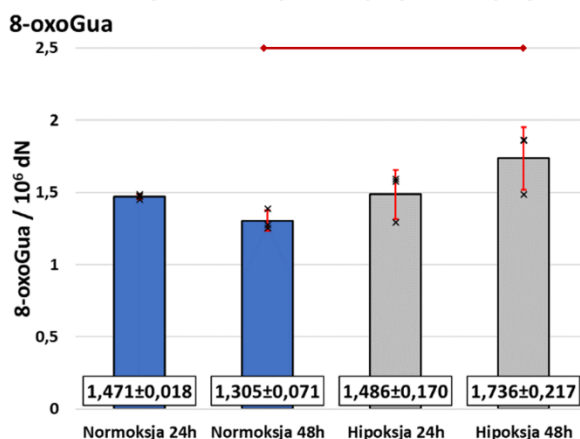
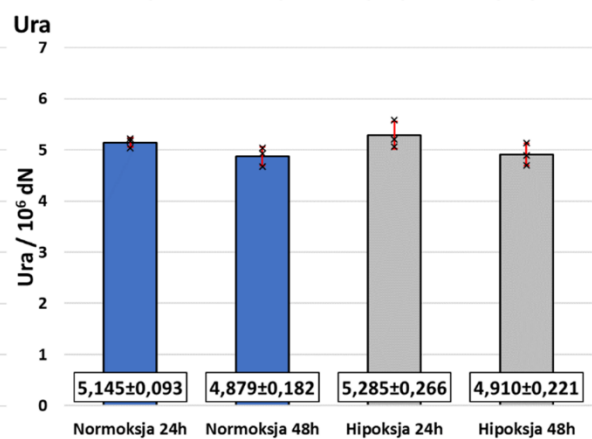
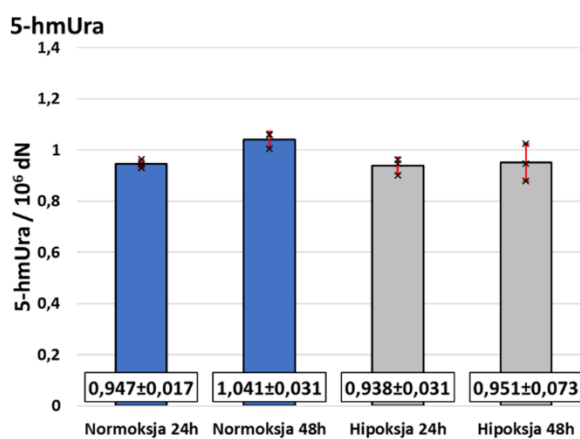
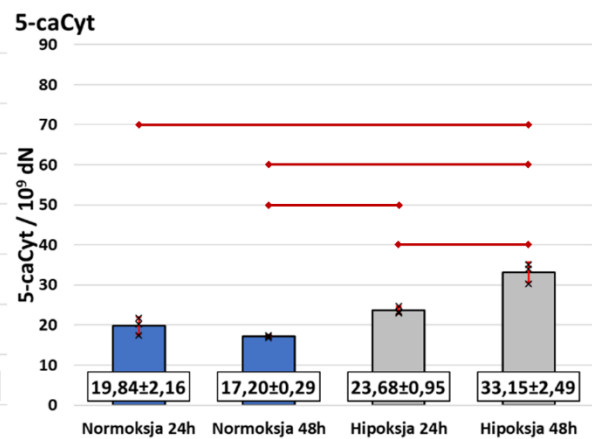
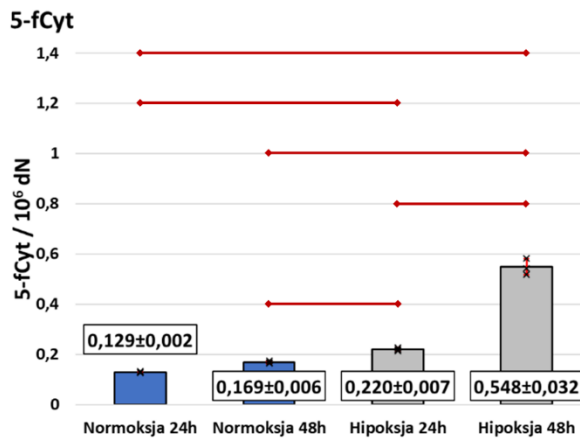
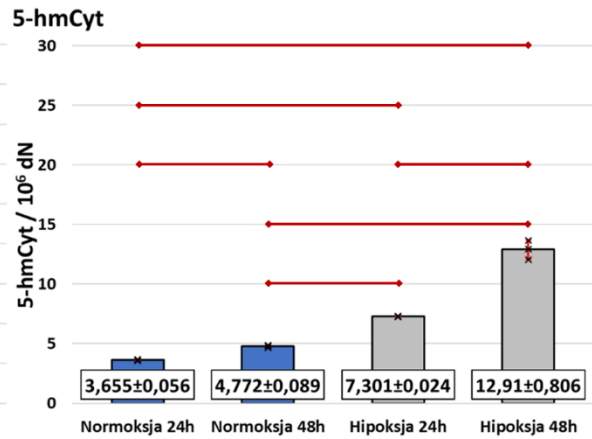
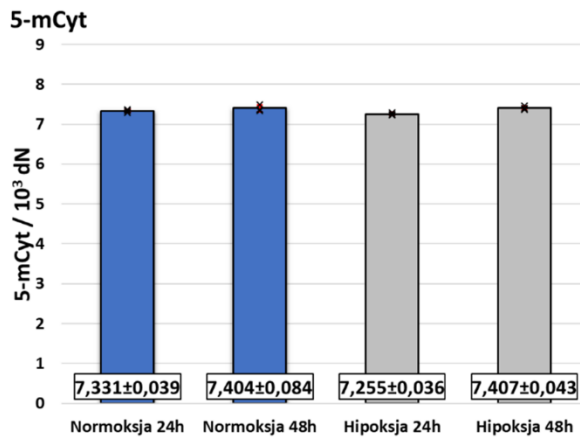


Rycina 51 Wpływ 24- i 48-godzinnej hodowli w atmosferze zawierającej 0,5 % tlenu lub 21% tlenu na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{WT}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

Tabela 52 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET1KO/TET2KO} po 24- i 48-godzinnej hodowli w atmosferze zawierającej 0,5 % tlenu lub 21% tlenu.

5-mCyt	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	0,373	0,384	0,408
Normoksja 48h	1,000	0,041	
Hipoksja 24h	0,037		
5-hmCyt	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	<0,001	<0,001	0,040
Normoksja 48h	<0,001	<0,001	
Hipoksja 24h	<0,001		
5-fCyt	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	<0,001	0,001	0,078
Normoksja 48h	<0,001	0,023	
Hipoksja 24h	<0,001		
5-caCyt	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	<0,001	0,097	0,310
Normoksja 48h	<0,001	0,008	
Hipoksja 24h	0,001		
5-hmUra	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	1,000	0,994	0,111
Normoksja 48h	0,129	0,078	
Hipoksja 24h	0,982		
Ura	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	0,516	0,830	0,418
Normoksja 48h	0,997	0,139	
Hipoksja 24h	0,182		
8-oxoGua	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	0,183	0,999	0,520
Normoksja 48h	0,025	0,452	
Hipoksja 24h	0,218		

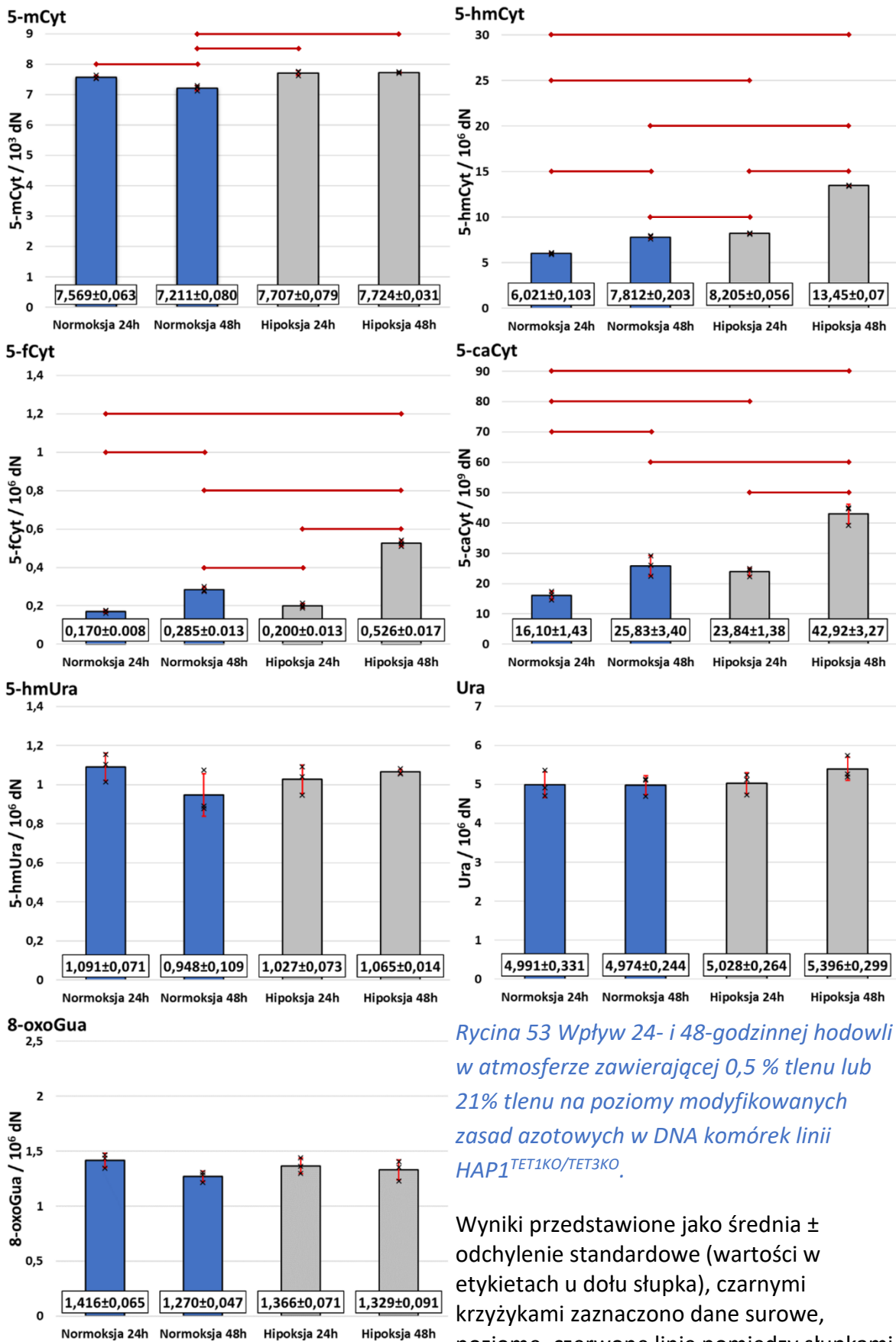


Rycina 52 Wpływ 24- i 48-godzinnej hodowli w atmosferze zawierającej 0,5 % tlenu lub 21% tlenu na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET1KO/TET2KO}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

Tabela 53 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET1KO/TET3KO} po 24- i 48-godzinnej hodowli w atmosferze zawierającej 0,5 % tlenu lub 21% tlenu.

5-mCyt	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	0,080	0,125	0,001
Normoksja 48h	<0,001	<0,001	
Hipoksja 24h	0,989		
5-hmCyt	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	<0,001	<0,001	<0,001
Normoksja 48h	<0,001	0,018	
Hipoksja 24h	<0,001		
5-fCyt	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	<0,001	0,091	<0,001
Normoksja 48h	<0,001	<0,001	
Hipoksja 24h	<0,001		
5-caCyt	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	<0,001	0,025	0,007
Normoksja 48h	<0,001	0,780	
Hipoksja 24h	<0,001		
5-hmUra	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	0,975	0,733	0,171
Normoksja 48h	0,295	0,595	
Hipoksja 24h	0,921		
Ura	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	0,369	0,998	1,000
Normoksja 48h	0,339	0,995	
Hipoksja 24h	0,444		
8-oxoGua	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	0,470	0,817	0,124
Normoksja 48h	0,731	0,391	
Hipoksja 24h	0,916		

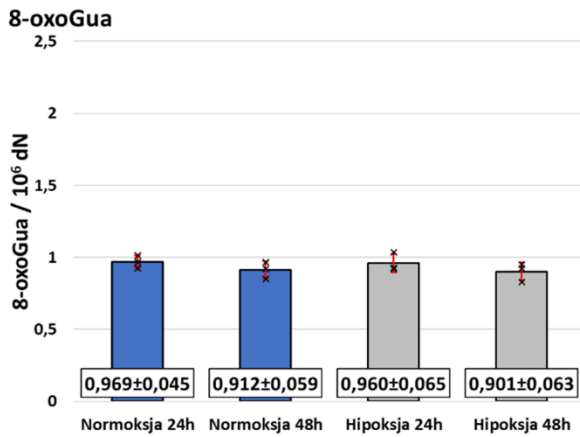
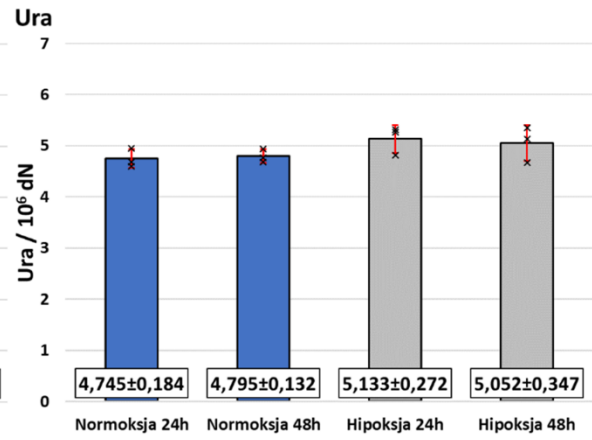
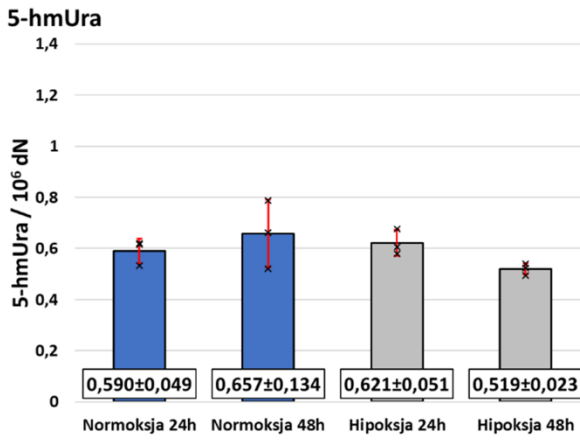
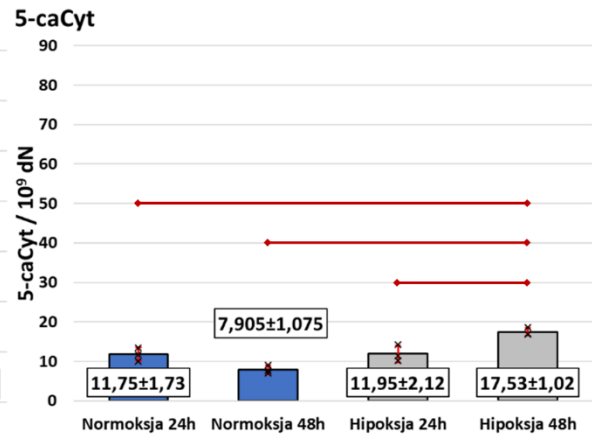
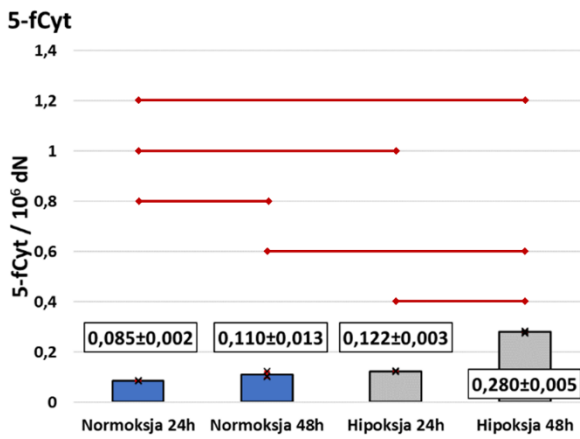
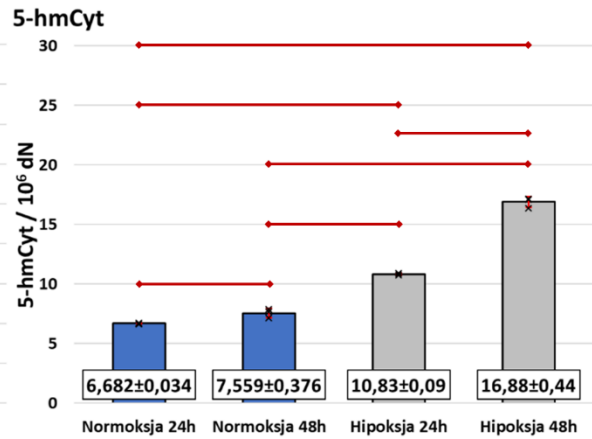
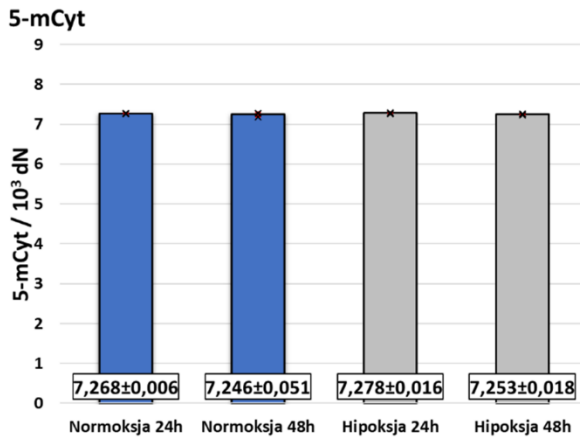


Rycina 53 Wpływ 24- i 48-godzinnej hodowli w atmosferze zawierającej 0,5 % tlenu lub 21% tlenu na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET1KO/TET3KO}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

Tabela 54 Wyniki testów post-hoc dla porównań poziomów modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek HAP1^{TET2KO/TET3KO} po 24- i 48-godzinnej hodowli w atmosferze zawierającej 0,5 % tlenu lub 21% tlenu.

5-mCyt	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	0,909	0,973	0,782
Normoksja 48h	0,991	0,548	
Hipoksja 24h	0,708		
5-hmCyt	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	<0,001	<0,001	0,026
Normoksja 48h	<0,001	<0,001	
Hipoksja 24h	<0,001		
5-fCyt	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	<0,001	0,001	0,012
Normoksja 48h	<0,001	0,186	
Hipoksja 24h	<0,001		
5-caCyt	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	0,008	0,998	0,064
Normoksja 48h	<0,001	0,051	
Hipoksja 24h	0,010		
5-hmUra	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	0,678	0,960	0,713
Normoksja 48h	0,199	0,932	
Hipoksja 24h	0,418		
Ura	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	0,474	0,295	0,994
Normoksja 48h	0,606	0,398	
Hipoksja 24h	0,977		
8-oxoGua	Hipoksja 48h	Hipoksja 24h	Normoksja 48h
Normoksja 24h	0,528	0,998	0,653
Normoksja 48h	0,996	0,754	
Hipoksja 24h	0,629		



Rycina 54 Wpływ 24- i 48-godzinnej hodowli w atmosferze zawierającej 0,5 % tlenu lub 21% tlenu na poziomy modyfikowanych zasad azotowych w DNA komórek linii HAP1^{TET2KO/TET3KO}.

Wyniki przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (wartości w etykietach u dołu słupka), czarnymi krzyżykami zaznaczono dane surowe, poziome, czerwone linie pomiędzy słupkami wskazują na różnice istotne statystycznie.

5. Dyskusja

Bezpośrednią przyczyną wyboru tematu niniejszej pracy były badania, których wyniki opublikowaliśmy w 2016 roku (166). Udało się nam po raz pierwszy wykazać, iż ekspozycja komórek, w tym przypadku linii HCT116, na witaminę C w stężeniach 10 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$ i 1 mmol/l skutkowała zależnym od dawki wzrostem zawartości 5-hydroksymetylouracylu w DNA eksponowanych komórek, podobnie jak to miało miejsce w przypadku 5-fCyt i 5-caCyt. Ponadto po raz pierwszy określiliśmy wewnątrzkomórkowe stężenie witaminy C w badanej linii, które dochodziło do 8 mmol/l w 24 godzinie eksperymentu, a więc w czasie, w którym określano zawartość modyfikacji zasad azotowych, będących produktami białek TET, w komórkowym DNA. Zbieżne obserwacje dla „kanonicznych” produktów białek TET i 5-hmUra wskazywały na udział białek TET w powstawaniu tej modyfikacji i zrodziły pytania o udział poszczególnych białek TET w generowaniu 5-hydroksymetylouracylu, jak i innych modyfikacji zasad azotowych w DNA. Przebadano również wpływ witaminy C w szeregu różnych linii komórkowych, by potwierdzić obserwacje płynące z eksperymentu na linii HCT116, jak i zbadać wpływ szerokiego spektrum potencjalnych modulatorów aktywności enzymatycznej białek TET na poziomy modyfikacji zasad azotowych, będących ich produktami, w DNA komórek hodowlanych. Wyniki tych eksperymentów umożliwiły autorowi niniejszej rozprawy uzyskanie grantu badawczego w ramach konkursu Narodowego Centrum Nauki Preludium 15 pt. „Badanie udziału poszczególnych białek rodziny TET w generowaniu epigenetycznych modyfikacji w DNA.” (projekt nr 2018/29/N/NZ1/00497). Realizacja tego projektu w znacznej mierze nadała kształt niniejszej rozprawie doktorskiej, znacznie ją wzbogacając, w szczególności o badania na liniach komórkowych z funkcjonalnymi nokautami białek TET.

Warto także wspomnieć, iż podczas realizacji badań na potrzeby tej dysertacji doskonalono i optymalizowano zarówno metodę izolacji DNA na potrzeby chromatograficznych analiz modyfikacji zasad azotowych wynikających z aktywności enzymatycznej białek TET, jak i technikę prowadzenia tychże analiz. Miało to kluczowe znaczenie, gdyż większość badań nad aktywnością enzymatyczną białek TET i wpływem różnych substancji na zawartość poszczególnych produktów tych enzymów w DNA opiera się na półilościowych metodach wykorzystujących przeciwciała, a co za tym idzie, posiadających szereg ograniczeń i mogących generować nieprecyzyjne i trudne do interpretacji ilościowej wyniki. Ponadto większość badań opierających się na technikach chromatograficznych

proszono bez odpowiednio dobranych standardów wewnętrznych, które gwarantują rzetelny pomiar ilościowy, jak również możliwość porównywania wyników pomiędzy poszczególnymi badaniami. Na potrzeby niniejszej pracy wykorzystano, jak dotąd, najbardziej czułą i dokładną metodę wykrywania modyfikowanych zasad azotowych, będących produktami enzymatycznej aktywności białek TET, z użyciem znakowanych stabilnymi izotopami wzorców wewnętrznych, która umożliwia uzyskanie wiarygodnych i powtarzalnych danych ilościowych, a jednocześnie pozbawiona jest wad i ograniczeń charakterystycznych dla metod opartych na przeciwciałach. Istotną zaletą użytej metodyki jest możliwość jednoczesnego oznaczania 8-oxoGua, która stanowi dobrze poznany i powszechnie uznawany marker niespecyficznego utleniania kwasów nukleinowych, jak również uracylu, który stanowi marker niespecyficznego procesu deaminacji DNA, co pozwala do pewnego stopnia oszacować wpływ tych procesów na obserwowane w danej próbce poziomy produktów białek TET. Opracowana i zoptymalizowana metodyka została opublikowana w postaci rozdziałów monografii pt. „DNA Modifications: Methods and Protocols” (164, 165).

Od momentu odkrycia w 2009 roku, białka TET wzbudzają niesłabnące zainteresowanie środowiska naukowego, a szerokie spektrum badań jasno wskazuje nie tylko na udział tych enzymów w fizjologicznych procesach związanych z epigenetyczną regulacją ekspresji genów, dojrzewaniem i różnicowaniem się komórek, ale co szczególnie istotne, wiąże utratę ich aktywności z rozwojem nowotworów. Obniżenie globalnego poziomu 5-hydroksymetylocytozyny, będącej produktem aktywności enzymatycznej białek TET, a jednocześnie stanowiącej stabilny marker epigenetyczny powiązany z aktywnymi transkrypcyjnie genami, jest uznawane za jedną z cech charakterystycznych komórek nowotworowych (171). Z tej przyczyny białka TET stanowią interesujący cel molekularny w badaniach nad rozwojem i przebiegiem chorób nowotworowych, a poszukiwanie metod modulacji i związków wpływających na ich aktywność, w szczególności w kontekście możliwości jej przywrócenia w przypadku wcześniejszej utraty, wydaje się być obiecującym kierunkiem badań.

Dlatego też postanowiliśmy przeprowadzić szereg eksperymentów z użyciem potencjalnych modulatorów aktywności enzymatycznej białek rodziny TET w modelu komórkowym, by zbadać ich wpływ na powstawanie modyfikowanych zasad azotowych w DNA, będących produktami tych enzymów. Punktem wyjścia dla przeprowadzonych badań był

fakt, iż białka rodziny TET należą do grupy dioksygenaz zależnych od jonów Fe(II) i α -ketoglutaranu, a także wymagają obecności witaminy C, by pełnić swą funkcję. Stanowiło to przesłankę, by dokonać suplementacji komórek ustalonych linii komórkowych nowotworów złośliwych człowieka związkami bezpośrednio zaangażowanymi w mechanizm katalityczny białek TET, tj. witaminą C, jonami żelaza i α -ketoglutaranem, celem określenia ich potencjału do stymulowania aktywności tych enzymów. Bazując na doniesieniach literaturowych dotyczących budowy i aktywności enzymatycznej innych białek z grupy dioksygenaz (116-118, 120, 121), postanowiono eksponować komórki na inne, potencjalne modulatory aktywności enzymatycznej białek TET m. in. na jony niklu(II), kobaltu(II) czy też deferoksyaminę, które teoretycznie mogą pełnić rolę inhibitorów w katalizowanej reakcji enzymatycznej. Ponadto, eksponowano komórki na czynniki takie jak DTT, 5-azacytydyna, tetrahydrourydyna czy też stan hipoksji, które potencjalnie mogą wpływać na aktywność enzymatyczną białek TET, choć mechanizmy tych interakcji nie są dostatecznie dobrze poznane.

Postanowiliśmy przeprowadzić wyżej wymienione eksperymenty w szerokim spektrum ustalonych linii komórkowych nowotworów złośliwych człowieka, by w sposób kompleksowy zbadać aktywność enzymatyczną białek TET. Niezwykle istotne okazały się eksperymenty na modelu komórkowym, w którym jedno lub dwa białka TET pozostają aktywne, który uzyskano dzięki wprowadzeniu pojedynczych i podwójnych nokautów genów kodujących białka rodziny TET do linii komórek HAP1.

Komórki te są haploidalne, a co za tym idzie, w odróżnieniu od komórek diploidalnych, nokaut jednego allela bezpośrednio przekłada się na fenotyp, który nie jest zaburzony przez ekspresję białka z drugiego, niezmodyfikowanego allela. Jednocześnie, w przypadku podwojenia materiału genetycznego w komórce i ewentualnego przywrócenia diploidalnej liczby chromosomów, wprowadzone modyfikacje genetyczne wystąpią w obu allelach. Ponadto, komórki te wywodzą się z linii komórek przewlekłej białaczki szpikowej, tak więc poprzez wprowadzenie do ich genomu nokautów poszczególnych genów *TET* otrzymano cztery modele tej jednostki chorobowej, z których każdy odpowiada innemu statusowi mutacyjnemu. Warto zaznaczyć, iż w linii parentalnej wszystkie trzy geny *TET* pozostają niezmodyfikowane, tak więc charakteryzuje się ona pełną aktywnością enzymatyczną białek TET. Pozwala to do pewnego stopnia oszacować potencjalny wpływ modulacji aktywności białek TET w komórkach o podobnych zaburzeniach w aktywności tych enzymów, co obserwowane w przebiegu szeregu nowotworów hematologicznych.

Jednocześnie w komórkach HAP1, w których wprowadzono nokauty w dwóch z trzech genów TET tylko jeden pozostaje aktywny. Teoretycznie, w takim modelu cała pula modyfikacji 5-metylocytozyny powinna powstawać wyłącznie w wyniku aktywności enzymatycznej jednego z trzech białek TET. Jest to dobry model umożliwiający nie tylko badanie wpływu wybranych czynników modulujących na aktywność konkretnych białek TET, ale również pozwala oszacować udział aktywności enzymatycznej każdego z członków rodziny TET w generowaniu poszczególnych produktów katalizowanej reakcji. Jednocześnie, zastosowanie takiego podejścia pozwala na uzyskanie bardziej wiarygodnych wyników, gdyż w zasadzie wyklucza wpływ kompensacji utraty aktywności jednego z białek poprzez nadekspresję lub nadmierną aktywację dwóch pozostałych w komórce białek, co może mieć miejsce w modelu z pojedynczym nokautem, a znalazło potwierdzenie w najnowszych doniesieniach Gurnari i wsp., którzy wykazali kompensacyjny wzrost ekspresji TET3 w grupie pacjentów z MDS ze zmniejszoną ekspresją TET2, niezależną od występowania mutacji TET2 (172).

Warto także nadmienić, iż w użytych na potrzeby niniejszej pracy komórkach nokauty zostały wprowadzone za pomocą techniki CRISPR/Cas9 i mają charakter funkcjonalny, co oznacza, iż zmodyfikowane geny wciąż są obecne w komórce, posiadają w pełni funkcjonalne regiony promotorowe i regulatorowe, są transkrybowane, lecz z racji z krótkich insercji lub delecji w początkowych eksonach genu, skutkujących przesunięciem ramki odczytu, ich końcowym produktem jest białko nieaktywne katalitycznie.

W przebiegu wielu nowotworów obserwuje się znaczący spadek stężenia witaminy C w osoczu pacjentów, co najprawdopodobniej przekłada się również na jej obniżony poziom we wnętrzu komórek, zarówno prawidłowych, jak i nowotworowych (173-175). Fakt ten, wraz z obniżonym globalnym poziomem 5-hmCyt i danymi literaturowymi na temat udziału witaminy C w regulacji aktywności enzymatycznej białek TET (125, 126, 131, 132) stanowił przesłankę do wykonania eksperymentów polegających na suplementacji komórek wybranych linii nowotworów złośliwych człowieka witaminą C i jej różnymi formułacjami.

W przypadku wszystkich badanych linii komórkowych ekspozycja na witaminę C skutkowałą wzrostem zawartości 5-hmCyt i 5-fCyt w genomowym DNA, natomiast indywidualne różnice w poziomach produktów enzymatycznego utleniania 5-mCyt pomiędzy liniami najprawdopodobniej mogą wynikać zarówno z różnic w ekspresji poszczególnych białek rodziny TET, co wykazał już Foksiński i wsp. (176) jak i z odmiennego profilu ekspresji błonowych białek transportujących witaminę C do wnętrza komórki, takich jak SVCT1 i SVCT2

(ang. sodium-dependent vitamin C transporter 1 and 2), czy białka z rodziny GLUT (GLUT1, GLUT3 i GLUT4) (124, 177). Jednocześnie w literaturze brakuje danych na temat ekspresji białek SVCT w przypadku wszystkich ze zbadanych linii komórkowych, za wyjątkiem linii MDA-MB-231, w przypadku której wykazano zmniejszoną ekspresję tych transporterów (178).

Kwas askorbinowy posiada chiralne atomy węgla, a co za tym idzie może występować w postaci wielu izomerów. Do najczęściej występujących i używanych w badaniach i przemyśle należą: kwas L-askorbinowy i D-izoaskorbinowy, różniące się jedynie przestrzennym położeniem grupy OH przy piątym atomie węgla, charakteryzujące się podobnym potencjałem antyoksydacyjnym (179, 180). Oznacza to, iż teoretycznie nie powinny wykazywać znaczących różnic w zdolności do redukcji jonów Fe(III). Jednakże zaobserwowano znacząco wyższe powinowactwo białka SVCT1, będącego transporterem witaminy C, do kwasu L-askorbinowego w porównaniu do kwasu D-izoaskorbinowego (181, 182), co może wskazywać na zmniejszony transport izomeru D do wnętrza komórki. Jednocześnie kwas L-askorbinowy, z racji swojej konformacji, może uczestniczyć w szerszym spektrum interakcji, nie ograniczającym się jedynie do białek TET, ale także modulować aktywność innych dioksygenaz między innymi enzymów z rodziny Jumonji modyfikujących białka histonowe (174, 183). Ponadto oba izomery są powszechnie używane jako dodatek do żywności, w szczególności kwas D-izoaskorbinowy (E315) stosowany jest jako konserwant i przeciwutleniacz, nie będący witaminą, w szerokim spektrum produktów (184). Dlatego też postanowiono określić wpływ obu izomerów kwasu askorbinowego na aktywność enzymatyczną białek TET.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów sugerują, iż izomer L kwasu askorbinowego użyty w stężeniach obserwowanych fizjologicznie w ludzkim osoczu (10 $\mu\text{mol/l}$ i 100 $\mu\text{mol/l}$) wydaje się silniej stymulować aktywność enzymatyczną białek TET, w porównaniu do izomeru D użytego w tych samych stężeniach. Najprawdopodobniej wynika to z faktu, iż z racji swojej konformacji, izomer L może wiązać się z białkami TET w sposób stereospecyficzny i modulować ich aktywność nie tylko poprzez podtrzymanie katalitycznego jonu żelaza w formie zredukowanej, co najprawdopodobniej jest jedynym mechanizmem działania izomeru D. Nie można jednak wykluczyć, że podobny efekt molekularny 1 mmol/l kwasu D-izoaskorbinowego do efektów obserwowanych w przypadku fizjologicznych stężeń kwasu L-askorbinowego może wynikać ze zwiększonego stresu oksydacyjnego i niespecyficznego utleniania 5-metylocytozyny, na co może wskazywać podniesiony poziom 8-oxoGua w komórkach ekspozycyjnych na najwyższe z użytych stężeń kwasu D-izoaskorbinowego.

Warto także zauważyć, że oba izomery w każdym modelu komórkowym powodowały wzrost zawartości 5-hmCyt i 5-fCyt, co sugeruje, iż mechanizm ich działania jest najprawdopodobniej uniwersalny dla wszystkich komórek.

Ponadto w świetle powyższych wyników, wskazujących na zdolność kwasu D-izoaskorbinowego do stymulacji aktywności białek TET, powinno się dokonać rewaluacji bezpieczeństwa i zasadności stosowania tego związku jako dodatku do żywności, gdyż może on potencjalnie wpływać na epigenom człowieka.

Wyniki przeprowadzonych analiz w linii komórek HAP1^{WT} eksponowanych na jednorazową dawkę witaminy C (100 $\mu\text{mol/l}$) wykazały, iż zawartość 5-fCyt i 5-caCyt silnie i istotnie statystycznie koreluje z stężeniem wewnątrzkomórkowej witaminy C (odpowiednio $r=0,8353$ przy $p=0,010$ i $r=0,8246$ przy $p=0,012$). Jednocześnie obserwowano umiarkowaną, choć nieistotną statystycznie korelację pomiędzy poziomem wewnątrzkomórkowej witaminy C a zawartością 5-hmCyt i 5-hmUra. Podobne obserwacje poczyniono w linii HAP1^{TET2KO}, gdzie poziom wewnątrzkomórkowej witaminy C silnie i istotnie statystycznie korelował z zawartością 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt i 5-hmUra (odpowiednio: $r=0,7419$ przy $p=0,022$; $r=0,7905$ przy $p=0,011$; $r=0,6879$ przy $p=0,041$ i $r=0,7419$ przy $p=0,022$). Obserwacje te sugerują, iż odpowiednio wysokie stężenie witaminy C wewnątrz komórki jest kluczowe dla zachowania i podtrzymania aktywności enzymatycznej białek TET, w szczególności w przypadku utraty aktywności TET2.

Ponadto przyrost poziomu 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt na przestrzeni pierwszych 12 godzin (do osiągnięcia plateau) hodowli komórek HAP1^{WT} jednorazowo eksponowanych na 100 $\mu\text{mol/l}$ witaminy C, wraz z relatywnie długim okresem półtrwania tych białek w komórce, licznym w dniach (185) i faktem, iż ekspozycja na witaminę C nie powodowała zmian w ekspresji białek rodziny TET (130) wskazuje, iż wynika on raczej ze wzrostu aktywności enzymatycznej białek TET, niż ze zwiększenia ich ekspresji. Jednocześnie taki profil przyrostu zawartości wymienionych modyfikowanych zasad azotowych w DNA w zasadzie wyklucza zachodzenie tego procesu na drodze prostej reakcji chemicznej.

Ponadto uzyskane wyniki są tożsame z naszymi wcześniejszymi obserwacjami w linii HCT116 (186), co może wskazywać na to, iż podobne zależności mogą występować we wszystkich liniach komórkowych. Co więcej utrata aktywności któregośkolwiek z białek TET skutkuje nie tylko obniżeniem globalnego poziomu 5-hmCyt, 5-caCyt i 5-fCyt, ale również

znacząco spowalnia generowanie tych modyfikacji, co znajduje odzwierciedlenie w przesunięciu czasu osiągnięcia plateau dla poszczególnych modyfikacji.

Należy zwrócić uwagę, iż w przeprowadzonych eksperymentach komórki suplementowano *de facto* jonem askorbinowym, który jest aktywnie transportowany do komórek poprzez wysoce specyficzne względem tego związku białka SVCT1 i SVCT2, wbrew gradientowi stężeń, wraz z jonami sodu (124, 174). SVCT2 ulega ekspresji w niemalże każdym rodzaju komórek ludzkiego organizmu, zwłaszcza w komórkach silnie akumulujących witaminę C tj. leukocyty komórki mózgu czy nadnerczy (187). Natomiast białko SVCT1 jest silnie zaangażowane w utrzymanie prawidłowego poziomu witaminy C w organizmie, a jego silna ekspresja została zaobserwowana w komórkach wątroby, trzustki, jelita cienkiego, a także w błonie rąbka szczoteczki kanalików proksymalnych w tkance nerkowej, gdzie bierze udział w reabsorpcji kwasu askorbinowego przez nerki (124).

Nie można jednak wykluczyć, iż część dodanej do medium hodowlanego witaminy C ulega przekształceniu do kwasu dehydroaskorbinowego (DHA) pod wpływem zmian pH lub aktywności wolnych rodników, czy to na etapie przygotowania roztworów roboczych, czy też w medium hodowlanym w trakcie trwania eksperymentów. DHA jest transportowany do komórki na drodze ułatwionej dyfuzji wraz z glukozą przy udziale białek transportujących: GLUT1, GLUT3 i GLUT4 (177), gdzie jest redukowany do askorbinianu przy pomocy glutationu, co jednocześnie prowadzi do podtrzymania gradientu stężeń DHA i może stanowić jeden z mechanizmów odpowiedzialnych za akumulację witaminy C we wnętrzu komórki. Warto nadmienić, iż w przypadku enterocytów nabłonka jelita cienkiego, gdzie zachodzi wchłanianie witaminy C, za wychwyt DHA odpowiadają głównie białka GLUT2 i GLUT8 (124).

Biorąc pod uwagę fakt, iż efekt działania witaminy C na białka TET w poszczególnych liniach komórkowych może być zależny od tego, który z przytoczonych mechanizmów transportu dominuje w danym typie komórek lub od potencjalnych zaburzeń w funkcjonowaniu poszczególnych transporterów, czy to wynikających z tkankowo specyficznego profilu ich ekspresji, czy też z mutacji w genach je kodujących, postanowiono dostarczyć do komórek witaminę C w sposób niezależny od białek transportujących.

W niniejszej pracy zbadano wpływ innych form witaminy C na zawartość w komórkowym DNA produktów enzymatycznej aktywności białek TET. Posłużono się kwasem 6-O-palmitoilo-L-askorbinowym, będącym estrem kwasu palmitynowego i kwasu askorbinowego. Związek ten, posiadając część hydrofobową stanowi rozpuszczalną w

tłuszczach formę witaminy C, która efektywnie przechodzi przez błonę komórkową do cytoplazmy (188, 189), gdzie przy udziale wewnątrzkomórkowych esteraż jest przekształcana do askorbinianu i może pełnić swoje funkcje biologiczne (190).

Jednocześnie, przy współpracy z wrocławską firmą Lipid Systems posłużono się witaminą C zamkniętą w nośniku liposomowym przy pomocy opatentowanej technologii LIPOSHEEL®. Cząsteczki te zbudowane są z podwójnej warstwy fosfolipidów, nadającej im hydrofobowy charakter i umożliwiającej interakcje z błonami komórkowymi. Natomiast w ich wnętrzu znajduje się faza wodna, o optymalnych warunkach zapewniających stabilność witaminy C pod postacią soli sodowej kwasu askorbinowego. Sprawia to, iż liposomy mogą uwalniać witaminę C bezpośrednio po integracji z błoną komórkową lub też po pobraniu przez komórkę na drodze endocytozy i degradacji endosomów w lizosomach, co w obu przypadkach pozwala dostarczyć ten związek do komórki niezależnie od obecności i aktywności transporterów błonowych (191, 192).

Co więcej najnowsze doniesienia Gąbki i wsp. wykorzystujące zaawansowane modele matematyczne (193) sugerują, iż w przypadku komórek nowotworowych obecność białek SVCT może nie być tak istotna, jak to się wcześniej wydawało, gdyż przy założeniu, że ekspresja SVCT jest stała, akumulacja tego związku w komórkach nowotworowych może zachodzić w sposób zależny od ich właściwości fizykochemicznych, takich jak wewnątrzkomórkowe pH i potencjał błonowy. Zastosowanie witaminy C zamkniętej w nośniku liposomowym może umożliwić efektywne dostarczenie tego związku do komórek, gdyż niejako omija ograniczenia wynikające z powyższych faktów.

W niniejszej pracy nie wykazano istotnych różnic pomiędzy wpływem soli sodowej kwasu L-askorbinowego, solą sodową kwasu L-askorbinowego zamkniętą w nośniku liposomowym, kwasem 6-O-palmitoilo-L-askorbinowym i preparatem AscoLip® na poziomy 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt i 5-hmUra w linii komórkowej HAP1, zarówno w komórkach parentalnych, jak i w liniach z podwójnymi, funkcjonalnymi nokautami genów *TET*, choć warto zauważyć, iż w przypadku linii z podwójnymi nokautami kwas 6-O-palmitoilo-L-askorbinowy, wydaje się nieco silniej indukować powstawanie 5-hmUra, w porównaniu do pozostałych z zastosowanych związków. Co więcej obserwacje dla linii HAP1 były zbieżne z obserwacjami dla linii MDA-MB-231. Witamina C zamknięta w nośniku liposomowym z jednej strony może być dostarczana do komórek niezależnie od obecności białek transportujących ten związek, ma więc większą biodostępność, a jednocześnie charakteryzuje się większą stabilnością (192).

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wskazują, iż przy braku różnic w zdolności do stymulacji aktywności białek rodziny TET, używanie w badaniach soli sodowej kwasu L-askorbinowego zamkniętej w nośniku liposomowym, zapewniającym większą stabilność tego związku, może stanowić alternatywę dla roztworów wodnych witaminy C w praktycznie każdym modelu komórkowym wymagającym suplementacji tym związkiem. Jednocześnie taka forma dostarczania witaminy C do komórek może również znaleźć zastosowanie w przypadku suplementacji tym związkiem komórek o zaburzonej aktywności białek transportujących lub komórek o dotąd niezbadanej ekspresji transporterów witaminy C.

Eksperymenty przeprowadzone na komórkach HAP1 z pojedynczymi i podwójnymi nokautami funkcjonalnymi genów TET, polegające na ich hodowli w obecności witaminy C, jak również jednoczesna ekspozycja tych komórek na tetrahydrourydynę i witaminę C pozwoliły częściowo odpowiedzieć na pytanie o udział aktywności enzymatycznych poszczególnych białek rodziny TET w generowaniu 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt i 5-hmUra. W zaproponowanym modelu komórkowym dodatek tetrahydrourydyny teoretycznie powinien zahamować aktywność komórkowych deaminaz, która potencjalnie może stanowić źródło Ura i 5-hmUra w genomowym DNA, a zatem obserwowane poziomy poszczególnych produktów enzymatycznej aktywności białek TET powinny wynikać tylko z wpływu witaminy C na konkretne białko tej rodziny.

Przeprowadzone analizy sugerują, iż białko TET2 ma dominującą rolę w tworzeniu 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt, jako że utrata jego aktywności powoduje największy spadek zawartości tych modyfikacji zasad azotowych w DNA. Natomiast w generowaniu 5-hmUra największy udział ma najprawdopodobniej białko TET1. Co więcej w komórkach HAP1 jednocześnie eksponowanych na tetrahydrourydynę (0,1 $\mu\text{mol/l}$, 1 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$ i 100 $\mu\text{mol/l}$) i 100 $\mu\text{mol/l}$ witaminy C obserwowano znaczący wzrost zawartości 5-hmUra w DNA komórek, co sugeruje, iż najprawdopodobniej powstał on w wyniku aktywności enzymatycznej białek TET, a nie w wyniku aktywności komórkowych deaminaz czy na drodze uszkodzeń oksydacyjnych DNA, o czym świadczy brak istotnych zmian w zawartości uracylu i 8-oxoGua.

W jednych z pierwszych badań nad aktywnością enzymatyczną białek TET Blaschke i wsp. (125) wykazali, iż to witamina C, a nie inne antyoksydanty, takie jak glutation czy DTT wpływają na zawartość 5-hmCyt w DNA komórek macierzystych. Jednocześnie w badaniach Jaiswal i wsp.(194) z 2017 wykazano, iż aktywność białka TET2, izolowanego z bakterii *E. coli*,

wcześniej transfekowanych wektorem ekspresyjnym zawierającym domenę katalityczną ludzkiego genu *TET2*, znacząco zmniejszyła się, gdy z mieszaniny reakcyjnej usunięto witaminę C, jak również w przypadku usunięcia DTT. Co ciekawe, w eksperymentach tych aktywność enzymatyczna białka TET2 była określana na podstawie przyrostu zawartości 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt, a więc w sposób tożsamy z przyjętym w tej rozprawie, w oligomerze DNA zawierającym 5-metylocytozynę w dinukleotydach CpG, w buforze o pH=8,0 zawierającym niezbędne do zajścia katalizowanej reakcji związki (75 μ mol/l FeSO_4 , 1 mmol/l α -ketoglutaranu, 2 mmol/l kwasu askorbinowego) jak i 1 mmol/l DTT. Powyższe, nieco sprzeczne przesłanki skłoniły nas do zbadania wpływu ditiotreitolu na aktywność enzymatyczną białek TET.

W naszym eksperymencie eksponowaliśmy komórki linii HAP1 na DTT w stężeniu 0,5 mmol/l jak i 1 mmol/l, co skutkowało istotnym statystycznie i zależnym od dawki wzrostem zawartości 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt w DNA tych komórek. Obserwacje te znacząco różnią się od wyników Blaschke i wsp. i sugerują, iż DTT może indukować powstawanie produktów szlaku aktywnej demetylacji 5-metylocytozyny w jak dotąd niedostatecznie dobrze poznanym mechanizmie. Potencjalnie, DTT jako związek o właściwościach redukujących, mógłby niejako naśladować działanie witaminy C poprzez utrzymanie katalitycznego jonu Fe(II) w centrum aktywnym białek TET w formie zredukowanej. Jednocześnie nie można wykluczyć, iż związek ten niespecyficznie utlenia 5-mCyt do 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt poprzez generowanie wolnych rodników (195, 196), choć brak istotnych zmian w poziomie 8-oxoGua w naszych eksperymentach wskazuje, iż raczej inne mechanizmy mogą być źródłem tych obserwacji. Co więcej, badania nad aktywnością metylotransferaz DNA przeprowadzone przez Chun-Chang i wsp. (197) wskazują, iż obecność DTT w stężeniach z zakresu 1-5 mmol/l hamuje, w sposób zależny od dawki, aktywność hydroksymetylazy (niekanoniczną zdolność do przekształcania *in vitro* 5-mCyt do 5-hmCyt) rekombinowanego białka DNMT3a, izolowanego z komórek HEK 293T transfekowanych wektorem ekspresyjnym zawierającym gen *DMNT3a*, najprawdopodobniej poprzez modulowanie stanu redoks enzymu. W świetle tych wyników, nie można wykluczyć, iż DTT również może wpływać na aktywność białek TET na drodze podobnych mechanizmów, co stanowi przesłankę do dalszych badań nad wpływem tego związku na proces aktywnej demetylacji DNA. Jest to szczególnie ważne, gdyż DTT jest związkiem powszechnie występującym w wielu odczynnikach używanych w biologii

molekularnej, w tym w badaniach nad aktywnością białek TET, a co za tym idzie, jego obecność może potencjalnie wpływać na wyniki analiz.

W świetle obiecujących wyników eksperymentów z udziałem witaminy C postanowiono eksponować komórki linii HAP1 na kolejne drobnocząsteczkowe związki biorące udział w mechanizmie katalitycznym białek TET tj. jony żelaza i α -ketoglutaran. W 2013 roku Dickson i współpracownicy (130) wykazali, iż zawartość 5-hmCyt w DNA mysich embrionalnych fibroblastów nie jest zależna od komórkowego poziomu żelaza i α -ketoglutaranu. Jednakże w swoich eksperymentach nie dodawali bezpośrednio α -ketoglutaranu do medium hodowlanego, a jedynie manipulowali stężeniem glukozy, z której miał on powstawać przy pomocy enzymów zaangażowanych w jego powstawanie w ramach cyklu Krebsa. Co więcej, używali $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ w stężeniach 0,25 $\mu\text{mol/l}$ i 2,5 $\mu\text{mol/l}$ jako źródła jonów $\text{Fe}(\text{III})$, a poziom 5-hmCyt w komórkach oznaczali przy użyciu opartych o przeciwciała technik: dot-blot i barwienia immunochemicznego. Skłoniło nas to do wykonania eksperymentów z użyciem FeSO_4 , którego użycie powinno dostarczyć do komórki jonów $\text{Fe}(\text{II})$, które mogą być bezpośrednio wykorzystane przez białka TET, jak i α -ketoglutaranu, tak by zaopatrzyć komórki we wszystkie niezbędne składowe reakcji enzymatycznej. Jednakże 24-godzinna hodowla komórek linii HAP1 w obecności α -ketoglutaranu dodanego do medium hodowlanego do ostatecznych stężeń: 100 $\mu\text{mol/l}$, 1 mmol/l i 5 mmol/l jak i w obecności jonów $\text{Fe}(\text{II})$ w stężeniach 1 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$ nie zmieniła poziomu modyfikowanych zasad azotowych stanowiących produkt aktywności enzymatycznej białek TET. Obserwacje te są do pewnego stopnia zgodne z przytoczonymi wyżej wynikami grupy Dickson'a (130), lecz należy zaznaczyć, iż w naszych badaniach oznaczano nie tylko poziom 5-hmCyt, ale także 5-fCyt, 5-caCyt i 5-hmUra w DNA w badanych komórkach, przy pomocy dalece bardziej precyzyjnej i czułej metody, jaką jest 2D-UPLC-MS/MS, co przekłada się na bardziej kompleksowy obraz zawartości modyfikowanych zasad azotowych w DNA.

Początkowe hipotezy zakładały, iż brak wpływu α -ketoglutaranu na aktywność białek TET może wynikać z wysycenia enzymu substratem, jako że α -ketoglutaran, będąc bezpośrednim intermediatem w cyklu Krebsa jest obecny w komórkach w wysokich, najprawdopodobniej nadmiarowych stężeniach, a co za tym idzie dalsze dostarczanie tego związku do komórek nie zwiększa jego dostępności dla enzymu. Z drugiej strony MacKenzie i współpracownicy (198) wykazali, iż przechodzenie α -ketoglutaranu przez błonę komórkową jest utrudnione ze względu na jego hydrofilowy charakter i dopiero jego sprzęgnięcie z

cząsteczką hydrofobową umożliwia jego efektywny transport do wnętrza komórki. Fakt ten może tłumaczyć nasze obserwacje, a także stanowi podstawę do wykonania w przyszłości eksperymentów obejmujących ekspozycję komórek na zmodyfikowane chemicznie postaci α -ketoglutaranu. Równie interesującym kierunkiem dalszych badań wydaje się być dostarczenie α -ketoglutaranu do wnętrza komórek przy użyciu nośników liposomowych, które potencjalnie umożliwiłyby efektywny transport niezmodyfikowanej, hydrofilowej cząsteczki przez błonę komórkową.

Ponadto najnowsze wyniki badań, które ukazały się na kilka miesięcy przed złożeniem niniejszej dysertacji wskazują na nieco odmienny mechanizm generowania α -ketoglutaranu na potrzeby reakcji katalizowanych przez białka TET3. Zespół pod przewodnictwem Thomasa Carella (199) udowodnił, iż w neuronach mitochondrialny enzym dehydrogenaza glutaminianowa (ang. *glutamate dehydrogenase*, GDH), odpowiedzialny za generowanie α -ketoglutaranu z glutaminianu, jest rekrutowany do jądra komórkowego, gdzie lokalizuje się w bezpośredniej bliskości białka TET3 i lokalnie syntetyzuje *de novo* α -ketoglutaran z jądrowej puli glutaminianu na potrzeby enzymatycznego utleniania 5-mCyt do 5-hmCyt. Jest to wydajny mechanizm, który z jednej strony zapewnia zaopatrzenie białek TET w niezbędny substrat, a z drugiej pozwala uniknąć globalnej zmiany poziomu tego metabolitu w komórce, co potencjalnie mogłoby pociągać za sobą niekorzystne skutki uboczne. Powyższy mechanizm został jak dotąd opisany jedynie w przypadku białka TET3, w komórkach neuronalnych, lecz nie można wykluczyć jego występowania w innych rodzajach komórek, w tym w użytej przez nas linii HAP1, co tłumaczyłoby nasze obserwacje.

Co więcej, w przeprowadzonych przez nas eksperymentach z wykorzystaniem jonów Fe(II) i Fe(III) nie obserwowaliśmy istotnych statystycznie zmian w zawartości 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt i 5-hmUra w DNA badanych komórek, poza 24-godziną inkubacją komórek HAP1 z 1 mmol/l FeSO₄, co jest zbieżne z wynikami grupy Dicksona i wsp., którzy nie obserwowali zmian w zawartości 5-hmCyt, oznaczanej przy pomocy metody blot-dot, w komórkach mysich embrionalnych fibroblastów po ekspozycji na 0,25 μ mol/l i 2,5 μ mol/l Fe(NO₃)₃ (130). Można przypuszczać, iż dodatek surowicy w medium hodowlanym mógł zadziałać jako czynnik chelatujący i dopiero zastosowanie bardzo wysokiego stężenia (1 mmol/l) jonów Fe(II) wywołało na tyle istotną zmianę w labilnej puli jonów Fe(II) w komórce, iż znalazła ona odzwierciedlenie w zwiększeniu aktywności białek TET, które skutkowało zwiększoną produkcją 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt. Ponadto, wzrosła zawartość wspomnianych zasad

azotowych po ekspozycji na 1 mmol/l FeSO_4 nie towarzyszyła istotna zmiana zawartości 8-oxoGua, co sugeruje, iż najprawdopodobniej nie powstały w wyniku działania reaktywnych form tlenu na DNA, a raczej są efektem reakcji enzymatycznych. Ponadto jednoczesna ekspozycja komórek HAP1 na α -ketoglutaran, jony Fe(II) , jak i witaminę C jasno wykazała, iż to obecność tego ostatniego związku ma kluczowe znaczenie dla aktywności enzymatycznej białek TET, co pozostaje w zgodzie z wynikami eksperymentów Guan i współpracowników (133).

Warto zauważyć, iż wyniki naszych eksperymentów z deferoksyaminą w linii HAP1, gdzie nie obserwowaliśmy istotnych statystycznie zmian w zawartości 5-hmCyt w DNA komórek narażonych na ten związek stoją w sprzeczności z wynikami badań przeprowadzonych na linii komórek hepatocytopodobnych OUMS29 (200). We wspomnianym eksperymencie, chelatacja jonów Fe(III) za pomocą DFO, w stężeniach 50 $\mu\text{mol/l}$ i 100 $\mu\text{mol/l}$, a więc tożsamy z stężeniami przez nas użytymi, skutkowała obniżeniem zawartości 5-hmCyt w DNA badanych komórek. Zwraca uwagę fakt, iż zawartość 5-hmCyt w tym badaniu była określana jedynie w sposób półilościowy za pomocą opartej o przeciwciała techniki dot-blot, co wraz z potencjalnie inną podatnością komórek HAP1 na chelatację jonów Fe(III) przez DFO może tłumaczyć zaobserwowane rozbieżności. Co więcej w naszym eksperymencie nie zaobserwowano różnic pomiędzy zawartością modyfikacji zasad azotowych będących produktami enzymatycznej aktywności białek TET w komórkach kontrolnych, jak i eksponowanych na jony Fe(III) , DFO, jak i kombinację tych związków, co sugeruje, iż ekspozycja komórek na jony Fe(III) raczej nie wpływa na aktywność badanych enzymów w linii HAP1. Jednocześnie nie zaobserwowaliśmy istotnego statystycznie wpływu DFO na stymulujące działanie witaminy C na aktywność enzymatyczną białek rodziny TET. Jednakże eksperyment został wykonany w jednym powtórzeniu biologicznym, a co za tym idzie jego wyniki mogą nie być w pełni wiążące, dlatego też zauważamy potrzebę jego powtórzenia w większej liczbie powtórzeń biologicznych i rozszerzenia o bardziej specyficzne chelatory jonów Fe(II) , by jednoznacznie określić wpływ zmniejszenia wewnątrzkomórkowej puli jonów Fe(II) na aktywność enzymatyczną białek rodziny TET. Ponadto warto mieć na uwadze, iż w zaproponowanym modelu badawczym trudno jednoznacznie określić, czy deferoksyamina chelatuje wolne jony Fe(III) obecne w medium hodowlanym i w ten sposób zmniejsza pulę jonów możliwych do pobrania przez komórkę, czy też dostaje się do wnętrza komórki, i niejako *in situ* wpływa na pulę wolnych jonów żelaza. Tym niemniej jej działanie najprawdopodobniej

ogranicza się do wolnych jonów Fe(III), gdyż związek ten nie jest na tyle silnym chelatorem by konkurować o wiązanie jonu żelaza z centrum aktywnym enzymu, na co może wskazywać zaniedbywalny wpływ DFO na stymulujący wpływ witaminy C na zawartość produktów enzymatycznej aktywności białek TET w DNA komórek HAP1.

Przytoczone wcześniej badania Jaiswal i wsp. (194) wykazały, iż w obecności jonów Fe(II) w stężeniu 75 $\mu\text{mol/l}$ tożsame stężenia jonów Co(II), Cu(II) i Zn(II) prawie całkowicie zahamowały aktywność katalitycznej domeny białka TET2 *in vitro*. Jednocześnie Yin R. i wsp., na podstawie eksperymentów przeprowadzonych na oczyszczonej domenie katalitycznej mysiego białka Tet1 wykazali, iż jony niklu wykazują 7,5 razy większe powinowactwo do centrum aktywnego tego enzymu, niż jony Fe(II) (117). Powyższe przesłanki, wraz z doniesieniami literaturowymi, wskazującymi na modulujący wpływ dwuwartościowych jonów metali ciężkich na aktywność enzymów z grupy dioksygenaz zależnych od Fe(II) i α -ketoglutaranu (121, 122, 201), do których również należą białka TET, skłoniły nas do zbadania wpływu wybranych jonów metali na aktywność tych enzymów.

W niniejszej pracy zbadano wpływ jonów Ni(II) na zawartość produktów enzymatycznej aktywności białek TET w DNA komórek K562. Ich 24-godzinna ekspozycja na 1 μM , 10 $\mu\text{mol/l}$ i 100 $\mu\text{mol/l}$ chlorku niklu(II) nie prowadziła do istotnych zmian w poziomie 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt i 5-hmUra, a także nie wpływała na stymulujący aktywność białek TET efekt witaminy C. Obserwacje te są rozbieżne z wynikami uzyskanymi przez Yin R. i współpracowników (119), którzy po ekspozycji komórek linii: HEK293T (ludzkie embrionalne komórki nerki), MRC5 (linia fibroblastów płuca) i mysich ES na jony Ni(II) w stężeniach 20 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$ i 200 $\mu\text{mol/l}$ obserwowali zależny od dawki i czasu ekspozycji spadek poziomu 5-hmCyt w DNA tych komórek, choć w przypadku linii MRC5 statystycznie istotne spadki zaobserwowano jedynie w przypadku 100 $\mu\text{mol/l}$ i 200 $\mu\text{mol/l}$. Jednocześnie we wszystkich badanych liniach stężenie 20 $\mu\text{mol/l}$ nie wpływało w sposób istotny na zawartość 5-hmCyt w genomowym DNA, co jest zbieżne z naszymi obserwacjami dla komórek K562 eksponowanych na 10 $\mu\text{mol/l}$ jonów Ni(II). Ponadto w linii mysich komórek macierzystych obserwowano również zależny od dawki spadek 5-fCyt, jak również hamujący wpływ jonów Ni(II) (200 $\mu\text{mol/l}$) na stymulacyjny efekt witaminy C w stężeniu 20 $\mu\text{mol/l}$. Najprawdopodobniej różnice pomiędzy naszymi wynikami a obserwacjami Yin R. i wsp. wynikają z indywidualnej podatności konkretnej linii komórkowej na hamujący aktywność białek TET efekt jonów Ni(II), która może wynikać z szeregu czynników, takich jak zdolność do wychwytu i transportu tych jonów, a także proporcji jonów

Ni(II) do zawartości jonów Fe(II) w komórce. Ponadto w komórkach ludzkiego organizmu w generowanie 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt w DNA mogą być zaangażowane wszystkie białka rodziny TET, a jej poszczególni członkowie mogą charakteryzować się innym powinowactwem do jonów Ni(II), niż to określone dla domeny katalitycznej mysiego białka Tet1. Co więcej zróżnicowany profil ekspresji tychże białek w poszczególnych liniach komórkowych może po części odpowiadać za ich różną odpowiedź na jony Ni(II). Nie można także wykluczyć, iż powyższe obserwacje mogą wynikać z chelatujących właściwości surowicy dodawanej do hodowli komórkowej. Jednocześnie tak diametralne różnice pomiędzy wynikami przeprowadzonych eksperymentów, a danymi literaturowymi wskazują na konieczność przeprowadzenia badań nad wpływem jonów niklu(II) w szerszym spektrum linii komórkowych.

Badania przeprowadzone przez Lin i wsp. w 2017 roku (135) na komórkach linii HepG2 raka wątroby wykazały, iż zarówno w przypadku hodowli w obecności 1% O₂, jak i ekspozycja tych komórek na chlorek kobaltu w stężeniu 150 i 200 μmol/l skutkowało znaczącym wzrostem poziomu mRNA w przypadku białek TET1, TET2 i TET3. Jednocześnie w przytoczonych badaniach Jaiswal i wsp. (194) chlorek kobaltu hamował aktywność katalityczną TET2. Ta niejednoznaczność doniesień skłoniła nas do porównania wpływu hipoksji i chlorku kobaltu na zawartość produktów enzymatycznej aktywności białek TET. Aby zapewnić jak najbardziej rzetelną i kompleksową ocenę, postanowiono wykonać eksperymenty na linii HAP1.

Chlorek kobaltu jest bardzo często stosowany jako związek naśladujący stan niedotlenienia w komórce, zwłaszcza w sytuacjach, gdy badacze nie dysponują komorą hipoksyczną, a jego postulowany mechanizm działania opiera się na wypieraniu żelaza z centrum aktywnego białek PHD i następczą aktywacją HIF1α, regulującym ekspresję genów zależnych od hipoksji (202). W prawidłowo funkcjonującej komórce poziom białka HIF1α jest precyzyjnie regulowany przez aktywność zależnych od Fe(II) i α-ketoglutaranu hydroksylaz 4-prolinowych, które przy prawidłowym stężeniu O₂ w komórce hydroksylują konserwatywne reszty proliny w białku HIF1α, które następnie ulegają ubikwitynacji przez kompleks białka VHL z ligazą ubikwityny E3, co skutkuje proteasomalną degradacją białka HIF1α. W przypadku spadku stężenia O₂ lub wywołanego innym czynnikiem (np. obecnością jonów kobaltu) zahamowania aktywności hydroksylaz 4-prolinowych, HIF1α nie ulega degradacji i może pełnić swoją biologiczną rolę czynnika transkrypcyjnego (134, 203).

O ile zaobserwowane w naszych badaniach wzrosty zawartości 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt w DNA komórek linii HAP1 hodowanych w atmosferze o obniżonej zawartości tlenu (0,5 %) pozostają w zgodności z danymi literaturowymi (135-137), to w przypadku 24 i 48-godzinnej ekspozycji na 100 $\mu\text{mol/l}$ i 200 $\mu\text{mol/l}$ chlorku kobaltu (II) zaobserwowano całkowicie odwrotny efekt, mianowicie zależny od dawki spadek poziomu 5-hmCyt i 5-fCyt. Wyniki te wskazują na odmienny od hipoksji mechanizm działania chlorku kobaltu(II), który najprawdopodobniej wypiera katalityczne jony żelaza (II), unieczynniając enzym, tak jak to robi w przypadku innych dioksygenaz zależnych od jonów Fe(II) i α -ketoglutaranu (116, 117, 122). Stawia to pod znakiem zapytania zasadność stosowania go jako związku naśladującego stan hipoksji, a także sugeruje, iż globalne zahamowanie procesu aktywnej demetylacji DNA po ekspozycji na CoCl_2 , może stanowić nowy, dotąd nie opisany mechanizm odpowiedzialny za toksyczne właściwości jonów kobaltu(II) (204).

Eksperymenty przeprowadzone w 2018 roku przez Ma L. i wsp. (205) na szeregu linii komórkowych nowotworów złośliwych jelita grubego wskazują, iż w stanie hipoksji aktywacja HIF1 α skutkuje wzmożoną ekspresją białka TET1, które niejako zwrotnie demetyluje, wcześniej metylowane, miejsca HRE (ang. *hypoxia-responsive elements*) w genach biorących udział w odpowiedzi na niedotlenienie, co umożliwia przyłączenie się do tych miejsc HIF1 α i zainicjowanie ich ekspresji. Jednocześnie autorzy wskazują na istotny udział TET1 w odpowiedzi na warunki niedotlenienia. Jednakże w przeprowadzonych przez nas eksperymentach na wariantach linii HAP1, w których tylko jedno z białek TET pozostaje aktywne, obserwowano wzrost zawartości 5-hmCyt w genomowym DNA w zarówno w komórkach z funkcjonalnymi nokautami TET1KO/TET2KO, TET1KO/TET3KO, jak i TET2/TET3KO, choć zawartość ta w każdym przypadku była niższa niż w linii parentalnej. Wskazuje to na zaangażowanie wszystkich trzech członków tej rodziny w komórkową odpowiedź na obniżone stężenie tlenu. Warto także wspomnieć, iż w naszych badaniach najprawdopodobniej po raz pierwszy określono zawartość 5-hmUra w komórkach z podwójnymi, funkcjonalnymi nokautami genów *TET*, hodowanych w warunkach hipoksji. Brak istotnych zmian w genomowej zawartości tej modyfikacji w porównaniu do komórek hodowanych w 21 % O_2 , może sugerować, iż 5-hmUra nie powstaje, a co za tym idzie najprawdopodobniej nie bierze udziału w odpowiedzi komórki na warunki niedotlenienia.

Jednocześnie należy mieć świadomość, iż w omówionym wyżej modelu badawczym za stan normoksji przyjęto stężenie tlenu (ok. 21 %), jakie występuje w inkubatorze w warunkach

standardowej hodowli komórkowej, a za stan hipoksji najniższe stężenie tlenu (0,5 %), jakie było możliwe do uzyskania w inkubatorze jakim dysponowaliśmy. W ludzkim organizmie, w zależności od rodzaju tkanki stężenie tlenu znacząco różni się od warunków panujących w hodowli komórkowej i przyjmuje wartości z szerokiego spektrum, poczynając od około 13 % w krwi tętniczej i około 5 % w krwi żyłnej, przez $9,5 \pm 2,6$ % w nerkach, $7,6 \pm 0,3$ % w tkance jelit, czy około 1 % w powierzchniowych warstwach skóry, a w poszczególnych komórkach może przyjmować wartości z zakresu 1.3–2.5 % (206). W tym świetle warunki standardowej hodowli komórkowej można interpretować jako nefizjologiczny stan hiperoksji, a wyniki obserwacji płynące z hodowli komórek w obecności 1-5 % tlenu przyjąć za odzwierciedlające stan fizjologiczny ludzkiego organizmu. Ponadto w zaproponowanym modelu badawczym określano poziom modyfikowanych zasad azotowych po 24, 48 i 72 godzinach hodowli w atmosferze o obniżonym stężeniu tlenu. Biorąc pod uwagę fakt, iż aktywność białka HIF1 α ulega dynamicznej zmianie już od pierwszych godzin ekspozycji na 1 % O₂ i bardzo szybko osiąga swoje maksimum (207), to nasze wyniki niejako *post factum* obrazują zawartość modyfikowanych zasad azotowych w genomie komórek już przystosowanych do stanu niedotlenienia, a niekoniecznie odzwierciedlają aktywność białek TET w zaproponowanych punktach czasowych. Stanowi to przesłankę do wykonania dalszych eksperymentów w większej rozdzielczości pod względem punktów czasowych, by dokładniej określić zmiany aktywności enzymatycznej białek TET w warunkach niedotlenienia komórki.

Szerokie spektrum badań wskazuje, iż nadmierna metylacja i zaburzenia w procesach demetylacji DNA są kluczowym elementem procesu nowotworzenia (17-19, 208), a terapie oparte na czynnikach demetylujących są od lat z stosowane w próbach leczenia nowotworów złośliwych (143, 144, 209-213). W badaniach Sajadian i wsp. z 2015 roku (145), przeprowadzonych na szeregu linii komórkowych: Huh7 (rak wątrobowokomórkowy), HLE (rak wątrobowokomórkowy) i HLF (ludzkie fibroblasty płuc) wykazano wzrost ekspresji mRNA dla TET2 i TET3 po ekspozycji na 20 $\mu\text{mol/l}$ znanego czynnika hipometylującego: 5-azacytydyny, któremu towarzyszył wzrost 5-hmCyt. Podobne obserwacje płyną z badań Yan i wsp. (214), którzy obserwowali wzrost poziomu mRNA dla TET2 i TET3 i jednoczesny wzrost zawartości 5-hmCyt w ludzkich mezenchymalnych komórkach macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej zdrowych dawców, po ekspozycji na 5 $\mu\text{mol/l}$. Jednakże w powyższych badaniach zawartość produktów enzymatycznej aktywności białek TET była badana przy pomocy technik immunofluorescencyjnych opartych na przeciwciałach i ograniczała się

jedynie do 5-hydroksymetylocytozyny, co skłoniło nas do przeprowadzenia eksperymentów z użyciem tego związku w modelu komórkowym, w którym jedno z białek TET pozostaje aktywne, z następczą analizą poziomu wszystkich produktów aktywności białek TET.

W każdym wariancie linii HAP1 poddanym działaniu 5-azacytydyny związek ten w każdym z użytych stężeń indukował istotny statystycznie spadek zawartości 5-metylocytozyny w komórkowym DNA, przy czym stężenie 2,5 $\mu\text{mol/l}$ wydaje się być najbardziej optymalne. Jednocześnie, ku naszemu zaskoczeniu, ekspozycja na 5-azacytydynę nie wpłynęła na zmianę zawartości 5-hmCyt w DNA badanych komórek, co znacząco odbiega od wyników obu przytoczonych wyżej badań. Najprawdopodobniej różnice te wynikają z zastosowanej metodologii, gdyż techniki oparte o przeciwciała mogą nie charakteryzować się niewystarczającą specyficznością, by odróżnić 5-hmCyt od 5-mCyt. Jednocześnie zaobserwowaliśmy istotny statystycznie i zależny od dawki wzrost poziomu 5-caCyt w liniach HAP1^{WT}, HAP1^{TET1KO/TET2KO} i HAP1^{TET2KO/TET3KO}, Co ciekawe, w tej ostatniej wzroście 5-caCyt towarzyszył zależny od dawki spadek 5-fCyt. Natomiast w linii HAP1^{TET1KO/TET3KO} zaobserwowano zależny od dawki spadek zawartości 5-fCyt po ekspozycji na ten związek. Nasilona produkcja 5-caCyt po ekspozycji na 5-azacytydynę w wariantach linii z funkcjonalnymi nokautami TET1KO/TET2KO i TET2KO/TET3KO, ale nie TET1KO/TET3KO, iż to raczej białko TET1 i do pewnego stopnia TET3 są zaangażowane w rozpoznawanie i demetylację hemimetylowanych CpG, co wydaje się być w zgodzie z wcześniejszymi odkryciami (55). Ponadto w naszym eksperymencie wedle naszej najlepszej wiedzy, po raz pierwszy określono poziom 5-hmUra w komórkach z podwójnymi, funkcjonalnymi nokautami genów *TET*, eksponowanych na 5-azacytydynę. Zwiększenie zawartości tej modyfikacji w DNA komórek HAP1^{WT} i z podwójnymi nokautami genów TET1KO/TET2KO i TET2KO/TET3KO, lecz nie TET1KO/TET3KO eksponowanych na szereg stężeń tego związku sugeruje, iż modyfikacja ta może być wprowadzana do DNA przez białko TET1 i do pewnego stopnia TET3 w kontekście hemimetylowanego DNA.

Podsumowując, w niniejszej przebadaliśmy wpływ szeregu potencjalnych modulatorów aktywności enzymatycznej białek TET na zawartość produktów katalizowanej przez te enzymy reakcji w komórkowym DNA. Wedle naszej najlepszej wiedzy po raz pierwszy w tak kompleksowy sposób określono ilościowo wpływ różnych stężeń dwóch izomerów witaminy C (użycie kwasu L-askorbinowego i kwasu D-izoaskorbinowego) na poziom 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt i 5-hmUra w DNA badanych linii komórkowych, przy użyciu techniki 2D-UPLC-

MS/MS. Również po raz pierwszy określono stopień zmian w zawartości wymienionych wyżej modyfikowanych zasad azotowych po ekspozycji na różne formy witaminy C, w tym zamkniętą w nośniku liposomowym. Co więcej po raz pierwszy dokonano analizy zmian wewnątrzkomórkowego stężenia witaminy C w komórkach HAP1, z jednoczesną oceną zawartości produktów enzymatycznej aktywności białek TET w DNA tej linii. Ponadto wykorzystanie komórek z funkcjonalnymi nokautami poszczególnych genów rodziny TET umożliwiło kompleksową ocenę roli kodowanych przez nie enzymów w generowaniu modyfikacji zasad azotowych w DNA.

W świetle przeprowadzonych badań witamina C, jawi się jako kluczowy czynnik niezbędny dla prawidłowego przebiegu procesu aktywnej demetylacji DNA, a odpowiedź komórki na jej stymulujące działanie jest silnie uzależniona od statusu mutacyjnego genów *TET*. Utrzymanie optymalnego stężenia tego związku w osoczu, a docelowo w komórce jest warunkiem sine qua non dla zachowania prawidłowego funkcjonowania epigenomu, a otrzymane wyniki stanowią istotny przyczynek dla dalszych badań nad suplementacją witaminą C, w szczególności w jej stabilnych postaciach, takich jak sól sodowa zamknięta w nośniku liposomalnym, w jednostkach chorobowych, w których przebiegu obserwuje się zaburzenia procesu aktywnej demetylacji DNA. Jednocześnie poszczególne białka rodziny TET, pomimo możliwości katalizowania tej samej reakcji enzymatycznej, pełnią odrębne funkcje w komórce. Co więcej utrata aktywności enzymatycznej poszczególnych członków tej rodziny skutkuje powstaniem odrębnego profilu epigenetycznego, który jedynie w niewielkim stopniu poddaje się modulacji, co sugeruje, iż analiza statusu mutacyjnego genów TET jest kluczowa z punktu widzenia potencjalnych terapii z wykorzystaniem witaminy C.

Potencjalny wpływ takich czynników modulujących aktywność białek TET jak jony żelaza, α -ketoglutaran, jony niklu czy DTT wciąż pozostaje niedostatecznie dobrze poznany i wymaga dalszych badań.

6. Wnioski

1. Spośród zbadanych, potencjalnych modulatorów aktywności enzymatycznej białek TET, witamina C najsilniej stymulowała te białka, a DTT wykazywał nieco słabsze działanie. Natomiast nie zaobserwowano znaczącego wpływu jonów Fe(II), Fe(III) i α -ketoglutaranu na zawartość produktów białek TET w komórkowym DNA. Z zastosowanych potencjalnych inhibitorów aktywności białek TET jedynie jony kobaltu były zdolne do obniżenia zawartości produktów katalizowanej przez te białka reakcji enzymatycznej.
2. Izomer L kwasu askorbinowego silniej stymulował aktywność enzymatyczną białek TET, w porównaniu do izomeru D, można zatem przyjąć, iż mechanizm działania kwasu L-askorbinowego obejmuje zarówno zdolność do podtrzymania katalitycznego jonu Fe(II) w centrum aktywnym białek TET w formie zredukowanej, jak i stereospecyficzne interakcje z tymi białkami.
3. Utrata aktywności enzymatycznej poszczególnych członków rodziny białek TET, wiąże się z ukonstytuowaniem się specyficznego profilu ilościowych zależności produktów aktywności białek TET, jedynie w niewielkim stopniu poddającego się modulacji, a obserwowane po stymulacji witaminą C zmiany zawartości modyfikowanych zasad azotowych w DNA w komórkach z zaburzeniami funkcjonowania poszczególnych białek TET mają raczej charakter ilościowy niż jakościowy i w żadnym wypadku nie skutkują przywróceniem profilu charakterystycznego dla komórek prawidłowych. Najprawdopodobniej każde z białek rodziny TET, jakkolwiek zdolne do katalizowania tej samej reakcji enzymatycznej, charakteryzuje się odmienną specyficznością substratową, kontekstem w jakim przeprowadza utlenianie 5-metylocytozyny, jak i różną rekrutacją do poszczególnych regionów genomu.
4. 5-hydroksymetylouracyl może być generowany w DNA przez białka rodziny TET, z dominującym udziałem TET1, a jego powstawanie jest stymulowane przez witaminę C, w sposób podobny do zaobserwowanego dla „kanonicznych” produktów aktywności enzymatycznej białek TET.
5. Białko TET2 ma dominującą rolę w powstawaniu 5-hydroksymetylocytozyny, 5-formylcytozyny i 5-karboksycytozyny w komórkowym DNA, a stymulacja

aktywności TET1 i TET3 nie pozwala na pełną kompensację utraty jego aktywności.

6. W hodowli komórkowej obecność witaminy C w medium hodowlanym jest kluczowa dla poprawnego funkcjonowania komórek i jest nieodzowna w badaniach, w których istotnym jest zapewnienie optymalnej aktywności białek TET. Stężenie 10 $\mu\text{mol/l}$ kwasu L-askorbinowego w medium hodowlanym jest wystarczające do zwiększenia aktywności enzymatycznej białek TET, a ich maksymalną aktywację uzyskano po zastosowaniu witaminy C w stężeniu 100 $\mu\text{mol/l}$ i wyższych. Jon askorbinowy, niezbędny dla reakcji katalizowanej przez białka TET, może być dostarczony do komórek przy użyciu kwasu askorbinowego, soli sodowej kwasu askorbinowego, kwasu 6-O-palmitoilo-L-askorbinowego i soli sodowej kwasu askorbinowego, zamkniętej w nośniku liposomowym z porównywalną skutecznością. Jednocześnie, z praktycznego punktu widzenia najbardziej optymalną jest forma liposomowa witaminy C, która dodatkowo zapewnia dostarczenie tego związku do komórki niezależnie od błonowych transporterów specyficznych dla witaminy C.
7. DTT istotnie wpływa na poziom 5-hmCyt, 5-fCyt i 5-caCyt i może potencjalnie wzmacniać aktywność enzymatyczną białek rodziny TET, jednak przeprowadzone eksperymenty nie pozwalają jednoznacznie określić mechanizmu jego działania.
8. Chlorek kobaltu wpływa w odmienny sposób na aktywność białek TET niż stan hipoksji, a hamowanie aktywności enzymatycznej białek TET może stanowić kolejny mechanizm toksyczności jonów kobaltu.
9. Profil produktów utleniania 5-metylocytozyny w hemimetylowanym DNA, generowanym w komórkach eksponowanych na działanie 5-azacytydyny, jest zależny od statusu mutacyjnego lub aktywności poszczególnych białek TET. Wydaje się, iż białka TET1 i TET3, w przeciwieństwie do TET2 utleniają hemimetylowany substrat aż do końcowego produktu – 5-caCyt.

7. Streszczenie

W DNA każdej komórki ludzkiego organizmu znajduje się dokładnie taka sama informacja genetyczna, pozwalająca uzyskać szereg unikalnych fenotypów, charakterystycznych dla komórek poszczególnych tkanek i narządów. Uzyskanie tak szerokiego spektrum potencjalnych fenotypów jest możliwe dzięki dokładnej i dynamicznej regulacji ekspresji genów, która leży u podstaw proliferacji, dojrzewania i różnicowania się komórek, a także umożliwia szybką odpowiedź na zmienne czynniki środowiskowe. Tak duża plastyczność ludzkiego genomu osiągana jest zarówno poprzez mechanizmy genetyczne zależne od sekwencji DNA, jak i procesy epigenetyczne, które stanowią dodatkową warstwę informacji, niezależną od sekwencji DNA. Do najlepiej poznanych epigenetycznych mechanizmów regulacji ekspresji genów należy metylacja DNA i niedawno poznana, aktywna demetylacja DNA, zależna od białek z rodziny TET (Ten-Eleven-Translocations), należących do grupy dioksygenaz zależnych od α -ketoglutaranu i jonów żelaza. Te nowo poznane enzymy, do których zalicza się białka TET1, TET2 i TET3 katalizują reakcje utleniania 5-metylocytozyny, produktu procesu metylacji DNA, do 5-hydroksymetylocytozyny, którą następnie utleniają do dalszych produktów – 5-formylocytozyny i 5-karboksycytozyny. I choć dwie ostatnie modyfikacje mogą być usuwane z DNA poprzez system naprawy BER i zastępowane niezmodyfikowaną cytozyną, to wraz z 5-hydroksymetylocytozyną, mogą pełnić rolę znaczników epigenetycznych, rozpoznawanych przez szereg białek takich jak czynniki transkrypcyjne czy też białka zaangażowane w remodelowanie struktury chromatyny. Białka rodziny TET posiadają także zdolność do enzymatycznego utleniania tyminy do 5-hydroksymetylouracylu, którego rola w DNA wciąż nie została dostatecznie dobrze poznana.

Zaburzenia w aktywności białek TET, w tym mutacje w obrębie ich genów, są bardzo często spotykane w wielu nowotworach, zwłaszcza hematologicznych, u podstaw których leżą nieprawidłowości w proliferacji i różnicowaniu się komórek.

Proces aktywnej demetylacji DNA, a w szczególności możliwość jej modulacji, budzi duże zainteresowanie świata naukowego. Dlatego też postanowiono zbadać wpływ szeregu drobnocząsteczkowych związków mogących modulować aktywność enzymatyczną białek TET w szerokim spektrum komórek ustalonych linii komórkowych nowotworów złośliwych człowieka, w tym na komórkach z funkcjonalnymi nokautami w obrębie genów TET. Wykonano liczne eksperymenty polegające na ekspozycji komórek badanych linii na związki kluczowe dla

reakcji enzymatycznych, katalizowanych przez enzymy z grupy dioksygenaz, tj. α -ketoglutaran, jony żelaza i różne postaci witaminy C, jak również eksponowano komórki na potencjalne inhibitory aktywności białek TET tj. jony niklu i kobaltu czy deferoksyaminę. Ponadto przebadano wpływ innych, potencjalnie modulujących czynników, takich jak ditiotreitoliol, tetrahydrourydyna, 5-azacytydyna czy stan hipoksji. Aktywność enzymatyczną białek TET, wyrażoną jako poziom epigenetycznych modyfikacji zasad azotowych mierzono w komórkowym DNA przy pomocy dwuwymiarowej ultrasprawnej chromatografii cieczowej z tandemową detekcją mas, z użyciem znakowanych stabilnymi izotopami standardów wewnętrznych.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wskazują na znikomy wpływ zwiększenia stężenia α -ketoglutaranu i jonów żelaza w medium hodowlanym na aktywność białek TET. Najprawdopodobniej związki te występują w komórce w stężeniach znacząco przewyższających zapotrzebowanie badanych reakcji i nie stanowią czynnika limitującego. Podobnie chelatacja jonów żelaza za pomocą deferoksyaminy, jak i ekspozycja na jony niklu, nie wpłynęła na zmianę aktywności tych enzymów, gdyż najprawdopodobniej jony żelaza, niezbędne dla aktywności białek TET pozostają ściśle związane z centrum aktywnym enzymu przez cały okres trwania białka w komórce. Co ciekawe, jony kobaltu istotnie wpłynęły na obniżenie poziomów epigenetycznych modyfikacji w DNA, w sposób odmienny od stanu hipoksji, który potencjalnie miały imitować. Najprawdopodobniej, przy braku w komórce związków specyficznie je chelatujących, jony kobaltu są zdolne wypierać żelazo z centrum aktywnego białek TET, hamując ich aktywność, co potencjalnie może stanowić kolejny mechanizm ich cytotoksyczności.

Ze wszystkich przebadanych związków, największy, stymulujący wpływ na aktywność enzymatyczną białek TET miała witamina C, która indukowała wzrost poziomu epigenetycznych modyfikacji DNA w każdej ze zbadanych linii, co stanowi o uniwersalności jej mechanizmu działania. Co ciekawe, izomer L kwasu askorbinowego wydaje się mieć silniejsze działanie, niż izomer D, co wskazuje na to, iż jego wpływ na aktywność białek TET nie wynika jedynie z potencjału antyoksydacyjnego, ale również ze stereospecyficznych interakcji z białkami TET.

Wyniki eksperymentów kinetycznych sugerują, iż obserwowane poziomy produktów procesu aktywnej demetylacji DNA są silnie korelują z wewnątrzkomórkowym stężeniem witaminy C, a mutacje w obrębie poszczególnych białek TET osłabiają i opóźniają reakcję

komórek na ten związek. Co ciekawe, utrata aktywności poszczególnych białek TET skutkuje powstaniem specyficznych profili epigenetycznych, które w niewielkim stopniu poddają się modulacji, co wskazuje na odrębne funkcje tych enzymów. Ponadto wydaje się, iż białko TET2 ma największy udział w generowaniu 5-hydroksymetylocytozyny, 5-formylocytozyny i 5-karboksycytozyny, a także, będąc pozbawionym domeny CXXC, charakteryzuje się odmienną od pozostałych białek TET specyficznością względem miejsc hemimetylowanych, których najprawdopodobniej nie jest w stanie rozpoznawać. Co więcej, profil produktów utleniania 5-metylocytozyny w hemimetylowanym DNA, generowanym w komórkach eksponowanych na działanie 5-azacytydyny, jest zależny od statusu mutacyjnego lub aktywności poszczególnych białek TET. Obserwacje te mogą stanowić przesłankę do włączenia analizy statusu mutacyjnego białek TET u pacjentów przed zastosowaniem terapii czynnikami demetylującymi takimi jak 5-azacytydyna.

Ponadto, przeprowadzone eksperymenty jasno wskazują, iż suplementacja komórek witaminą C w stężeniu 100 $\mu\text{mol/l}$ pozwala niejako przywrócić prawidłową aktywność białek TET w modelach *in vitro* i *in cellulo*, co jest szczególnie istotne w przypadku badań nad aktywną demetylacją DNA. Wydaje się, iż suplementacja komórek stabilnymi formami witaminy C, na przykład solami kwasu askorbinowego zamkniętymi w nośnikach liposomalnych, powinna zbliżyć warunki hodowli komórkowej do warunków panujących w organizmie, a tym samym pozytywnie wpłynąć na jakość i rzetelność badań nad procesami wymagającymi optymalnej aktywności białek rodziny TET. Co więcej, wnioski płynące z przeprowadzonych eksperymentów stanowią przesłankę do dalszych badań nad wpływem witaminy C na procesy epigenetyczne, a także mogą w przyszłości być podwaliną dla nowych strategii terapeutycznych obejmujących synergiczne zastosowanie czynników demetylujących i witaminy C w leczeniu nowotworów złośliwych, w szczególności zaś nowotworów hematologicznych.

8. Abstract

In the DNA of each cell of the human body there is exactly the same genetic information, which allows to obtain a number of unique phenotypes, characteristic for the cells of individual tissues and organs. Obtaining such a broad spectrum of potential phenotypes is possible thanks to the precise and dynamic regulation of gene expression, which underlies the proliferation, maturation and differentiation of cells, and enables a rapid response to changing environmental factors. Such a high plasticity of the human genome is achieved both through DNA sequence-dependent genetic mechanisms and epigenetic processes, which constitute an additional, sequence-independent information layer. One of the best-known epigenetic mechanisms of regulation of gene expression are: DNA methylation and recently discovered, active DNA demethylation, an enzymatic process dependent on the TET family proteins (Ten-Eleven-Translocations), members of α -ketoglutarate and iron-dependent dioxygenases. These newly discovered group of enzymes, including TET1, TET2 and TET3 proteins, catalyze the iterative oxidation reactions of 5-methylcytosine, a product of the DNA methylation process, to 5-hydroxymethylcytosine, which they subsequently oxidize to further products - 5-formylcytosine and 5-carboxycytosine. Although the last two modifications can be removed from DNA through the BER repair system and replaced with unmodified cytosine, together with 5-hydroxymethylcytosine, they can act as an epigenetic marker, recognized by a number of proteins such as transcription factors or proteins involved in chromatin remodeling. The TET family proteins also have the ability to enzymatically oxidize thymine to 5-hydroxymethyluracil, which role in the DNA has not yet been studied well enough. Abnormalities in the activity of TET proteins, including mutations within their genes, are very common in many types of cancer, especially hematological cancers, in which impairment of cell proliferation and differentiation are main driver factor. The process of active DNA demethylation, and in particular the possibility of its modulation, arouses great interest in the scientific world. Therefore, we decided to investigate the effect of a number of small molecule compounds that can modulate the enzymatic activity of TET proteins in a broad spectrum of established human cancer cell lines, including cells with functional knockouts within TET genes. We have performed numerous experiments in which cells of selected cancer cell lines were exposed to compounds that are crucial for enzymatic reactions, catalyzed by enzymes

from the dioxygenase group, i.e., α -ketoglutarate, iron ions and various forms of vitamin C, as well as potential inhibitors of activity of TET proteins, i.e., nickel and cobalt ions or deferoxamine. Moreover, the effect of other, potentially modulating factors, such as dithiothreitol, tetrahydrouridine, 5-azacytidine and hypoxia was investigated. Enzymatic activity of TET proteins, expressed as the level of epigenetic modifications of nucleobases was measured in cellular DNA by two-dimensional ultraperformance liquid chromatography with tandem mass spectrometry, with incorporation of stable isotope-labeled internal standards. The results of our experiments show the negligible effect of increasing the concentration of α -ketoglutarate and iron ions in the culture medium on the activity of TET proteins. Most likely, these compounds are present in the cell in concentrations that significantly exceed the requirements of the TET-mediated reactions and do not constitute a limiting factor. Similarly, chelation of iron ions with deferoxamine, as well as exposure to nickel ions, did not change the activity of TET enzymes. Most likely iron ions, necessary for the activity of TET proteins, remain attached to the enzyme's active center throughout the protein duration in the cell. Interestingly, cobalt ions significantly reduced levels of epigenetic modifications in DNA, in a way that differed from the hypoxic state they were supposed to mimic. Most likely, in the absence of specific chelating compounds in the cell, cobalt ions are able to displace iron from the active center of TET proteins, inhibiting their activity, which could potentially be another mechanism of cobalt cytotoxicity. Vitamin C had the greatest stimulating effect on the enzymatic activity of TET proteins of all tested the compounds. It induced an increase in the level of epigenetic DNA modifications in each tested cell line, which proves the universality of its mechanism of action. Interestingly, the L-isomer of ascorbic acid seems to have a stronger effect than the D-isomer, which indicates that its influence on the activity of TET proteins may not be due solely to the antioxidant potential and may potentially involve stereospecific interactions with TET proteins. The results of kinetic experiments suggest that the observed levels of active DNA demethylation products are significantly dependent on the intracellular concentration of vitamin C. Moreover, mutations within individual TET proteins weaken and delay the cells' response to this compound. Interestingly, the loss of individual TET proteins activity results in the formation of specific epigenetic profiles that can only be modulated to a small extent, which indicates the distinct functions of these enzymes. Moreover, it seems that the TET2 protein has the greatest share in the generation of 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine and 5-carboxycytosine and being devoid of the CXXC domain, it has a different

from other TET proteins specificity for hemimethylated sites, which is most likely unable to recognize. Moreover, the profile of the oxidation products of 5-methylcytosine in hemimethylated DNA generated in cells exposed to 5-azacytidine is dependent on the mutational status or activity of individual TET proteins. These observations may constitute a rationale to include the analysis of the mutational status of TET proteins in patients prior to treatment with demethylating agents such as 5-azacytidine. Results of conducted experiments clearly show that supplementing cells with vitamin C in a concentration of 100 μ M allows to restore the normal activity of TET proteins in *in vitro* and *in cellulo* models, which is particularly important in studies on active DNA demethylation. It seems that supplementing cells with stable forms of vitamin C, for example ascorbic acid salts enclosed in liposomal carriers, should bring the cell culture conditions closer to the conditions in the human body, and thus positively affect the quality and reliability of research in which optimal TET proteins activity is required. Moreover, the conclusions drawn from the conducted experiments constitute a premise for further research on the influence of vitamin C on epigenetic processes, and may in the future constitute the basis for new therapeutic strategies including the synergistic use of demethylating agents and vitamin C in the treatment of malignant neoplasms, in particular hematological neoplasms.

9. Spis piśmiennictwa

1. Yao B, Christian KM, He C, Jin P, Ming GL, Song HJ. Epigenetic mechanisms in neurogenesis. *Nat Rev Neurosci.* 2016;17(9):537-49.
2. Chen PJ, Huang C, Meng XM, Li J. Epigenetic modifications by histone deacetylases: Biological implications and therapeutic potential in liver fibrosis. *Biochimie.* 2015;116:61-9.
3. Ferri E, Petosa C, McKenna CE. Bromodomains: Structure, function and pharmacology of inhibition. *Biochem Pharmacol.* 2016;106:1-18.
4. Araki Y, Mimura T. The Histone Modification Code in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Mediat Inflamm.* 2017;2017.
5. Gardner EE, Poirier JT, Rudin CM. Histone Code Aberrancies in Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2017;12(4):599-601.
6. Janssen KA, Sidoli S, Garcia BA. Recent Achievements in Characterizing the Histone Code and Approaches to Integrating Epigenomics and Systems Biology. *Method Enzymol.* 2017;586:359-78.
7. Herrera-Solorio AM, Armas-Lopez L, Arrieta O, Zuniga J, Pina-Sanchez P, Avila-Moreno F. Histone code and long non-coding RNAs (lncRNAs) aberrations in lung cancer: implications in the therapy response. *Clin Epigenetics.* 2017;9.
8. Breiling A, Lyko F. Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. *Epigenet Chromatin.* 2015;8.
9. Giehr P, Kyriakopoulos C, Ficz G, Wolf V, Walter J. The Influence of Hydroxylation on Maintaining CpG Methylation Patterns: A Hidden Markov Model Approach. *Plos Comput Biol.* 2016;12(5).
10. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet.* 2008;9(6):465-76.
11. Butta N, Larrucea S, Alonso S, Rodriguez RB, Arias-Salgado EG, Ayuso MS, et al. Role of transcription factor Sp1 and CpG methylation on the regulation of the human podocalyxin gene promoter. *Bmc Mol Biol.* 2006;7.
12. Parry L, Clarke AR. The Roles of the Methyl-CpG Binding Proteins in Cancer. *Genes Cancer.* 2011;2(6):618-30.
13. Fatemi M, Wade PA. MBD family proteins: reading the epigenetic code. *J Cell Sci.* 2006;119(15):3033-7.
14. Hashimoto H, Vertino PM, Cheng XD. Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics-Uk.* 2010;2(5):657-69.
15. Johnson LM, Bostick M, Zhang XY, Kraft E, Henderson I, Callis J, et al. The SRA methyl-cytosine-binding domain links DNA and histone methylation. *Curr Biol.* 2007;17(4):379-84.
16. Li T, Wang LS, Du YM, Xie S, Yang X, Lian FM, et al. Structural and mechanistic insights into UHRF1-mediated DNMT1 activation in the maintenance DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(6):3218-31.
17. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell.* 2007;128(4):683-92.
18. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(10):726-34.
19. Varley KE, Gertz J, Bowling KM, Parker SL, Reddy TE, Pauli-Behn F, et al. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res.* 2013;23(3):555-67.
20. Ehrlich M. DNA hypermethylation in disease: mechanisms and clinical relevance. *Epigenetics-Us.* 2019;14(12):1141-63.
21. Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, D'Souza C, Fouse SD, et al. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature.* 2010;466(7303):253-U131.
22. Zhang YQ, Yang LX, Kucherlapati M, Hadjipanayis A, Pantazi A, Bristow CA, et al. Global impact of somatic structural variation on the DNA methylome of human cancers. *Genome Biol.* 2019;20(1).

23. Baribault C, Ehrlich KC, Ponnaluri VKC, Pradhan S, Lacey M, Ehrlich M. Developmentally linked human DNA hypermethylation is associated with down-modulation, repression, and upregulation of transcription. *Epigenetics-U.S.* 2018;13(3):275-89.
24. Deobagkar D. Epigenetics with special reference to the human X chromosome inactivation and the enigma of *Drosophila* DNA methylation. *J Genet.* 2018;97(2):371-8.
25. Lu ZP, Carter AC, Chang HY. Mechanistic insights in X-chromosome inactivation. *Philos T R Soc B.* 2017;372(1733).
26. Csankovszki G, Nagy A, Jaenisch R. Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J Cell Biol.* 2001;153(4):773-83.
27. Elhamamsy AR. Role of DNA methylation in imprinting disorders: an updated review. *J Assist Reprod Gen.* 2017;34(5):549-62.
28. Lyko F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet.* 2018;19(2):81-92.
29. Guz J, Foksinski M, Olinski R. [Mechanism of DNA methylation and demethylation--its role in control of genes expression]. *Postepy Biochem.* 2010;56(1):7-15.
30. Ren WD, Gao LF, Song JK. Structural Basis of DNMT1 and DNMT3A-Mediated DNA Methylation. *Genes-Basel.* 2018;9(12).
31. Jeltsch A, Jurkowska RZ. Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases - a new regulatory paradigm. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(18):8556-75.
32. Stresemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer.* 2008;123(1):8-13.
33. Gailhouse L, Liew LC, Hatada I, Nakagama H, Ochiya T. Epigenetic reprogramming using 5-azacytidine promotes an anti-cancer response in pancreatic adenocarcinoma cells. *Cell Death Dis.* 2018;9.
34. Kuehl PJ, Tellez CS, Grimes MJ, March TH, Tessema M, Revelli DA, et al. 5-Azacytidine inhaled dry powder formulation profoundly improves pharmacokinetics and efficacy for lung cancer therapy through genome reprogramming. *Brit J Cancer.* 2020;122(8):1194-204.
35. Hoang NM, Rui LX. DNA methyltransferases in hematological malignancies. *J Genet Genomics.* 2020;47(7):361-72.
36. Miller BF, Sanchez-Vega F, Elnitski L. The Emergence of Pan-Cancer CIMP and Its Elusive Interpretation. *Biomolecules.* 2016;6(4).
37. Valinluck V, Sowers LC. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res.* 2007;67(3):946-50.
38. Ramiro AR, Barreto VM. Activation-induced cytidine deaminase and active cytidine demethylation. *Trends Biochem Sci.* 2015;40(3):172-81.
39. Fritz EL, Papavasiliou FN. Cytidine deaminases: Aiding DNA demethylation? *Genes Dev.* 2010;24(19):2107-14.
40. Bochtler M, Kolano A, Xu GL. DNA demethylation pathways: Additional players and regulators. *Bioessays.* 2017;39(1).
41. Rozalski R, Gackowski D, Siomek-Gorecka A, Banaszkiwicz Z, Olinski R. Urinary Measurement of Epigenetic DNA Modifications: A Non-Invasive Assessment of the Whole-Body Epigenetic Status in Healthy Subjects and Colorectal Cancer Patients. *Chemistryopen.* 2016;5(6):550-3.
42. Kriaucionis S, Heintz N. The Nuclear DNA Base 5-Hydroxymethylcytosine Is Present in Purkinje Neurons and the Brain. *Science.* 2009;324(5929):929-30.
43. Tahiliani M, Koh KP, Shen YH, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science.* 2009;324(5929):930-5.
44. Lorschach RB, Moore J, Mathew S, Raimondi SC, Mukatira ST, Downing JR. 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(3):637-41.
45. Iyer LM, Tahiliani M, Rao A, Aravind L. Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids. *Cell Cycle.* 2009;8(11):1698-710.

46. Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, et al. Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *Science*. 2011;333(6047):1300-3.
47. Pfaffeneder T, Spada F, Wagner M, Brandmayr C, Laube SK, Eisen D, et al. Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA. *Nat Chem Biol*. 2014;10(7):574-81.
48. Olinski R, Starczak M, Gackowski D. Enigmatic 5-hydroxymethyluracil: Oxidatively modified base, epigenetic mark or both? *Mutat Res-Rev Mutat*. 2016;767:59-66.
49. He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*. 2011;333(6047):1303-7.
50. Dianov GL, Hubscher U. Mammalian Base Excision Repair: the Forgotten Archangel. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(6):3483-90.
51. Weber AR, Krawczyk C, Robertson AB, Kusnierczyk A, Vagbo CB, Schuermann D, et al. Biochemical reconstitution of TET1-TDG-BER-dependent active DNA demethylation reveals a highly coordinated mechanism. *Nat Commun*. 2016;7.
52. Roldan-Arjona T, Ariza RR, Cordoba-Canero D. DNA Base Excision Repair in Plants: An Unfolding Story With Familiar and Novel Characters. *Front Plant Sci*. 2019;10.
53. Korytiakova E, Reichl A, Muller M, Carell T. Intragenomic Decarboxylation of 5-Carboxy-2'-deoxycytidine. *Angew Chem Int Edit*. 2021;60(43):23207-11.
54. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, Garcia-Manero G, Patel J, Wadleigh M, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*. 2009;114(1):144-7.
55. Zhang HK, Zhang X, Clark E, Mulcahey M, Huang S, Shi YG. TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. *Cell Res*. 2010;20(12):1390-3.
56. Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, et al. Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of alpha-Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases. *Cancer Cell*. 2011;19(1):17-30.
57. Ko M, An J, Bandukwala HS, Chavez L, Aijo T, Pastor WA, et al. Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. *Nature*. 2013;497(7447):122-+.
58. Melamed P, Yosefzon Y, David C, Tsukerman A, Pnueli L. Tet Enzymes, Variants, and Differential Effects on Function. *Front Cell Dev Biol*. 2018;6.
59. Yang YQA, Zhao JC, Fong KW, Kim J, Li SZ, Song CX, et al. FOXA1 potentiates lineage-specific enhancer activation through modulating TET1 expression and function. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(17):8153-64.
60. Tsai YP, Chen HF, Chen SY, Cheng WC, Wang HW, Shen ZJ, et al. TET1 regulates hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition by acting as a co-activator. *Genome Biol*. 2014;15(12).
61. Good CR, Madzo J, Patel B, Maegawa S, Engel N, Jelinek J, et al. A novel isoform of TET1 that lacks a CXXC domain is overexpressed in cancer. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(14):8269-81.
62. Lou H, Li H, Ho KJ, Cai LL, Huang AS, Shank TR, et al. The Human TET2 Gene Contains Three Distinct Promoter Regions With Differing Tissue and Developmental Specificities. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:99.
63. Jin SG, Zhang ZM, Dunwell TL, Harter MR, Wu X, Johnson J, et al. Tet3 Reads 5-Carboxylcytosine through Its CXXC Domain and Is a Potential Guardian against Neurodegeneration. *Cell Rep*. 2016;14(3):493-505.
64. Perera A, Eisen D, Wagner M, Laube SK, Kunzel AF, Koch S, et al. TET3 Is Recruited by REST for Context-Specific Hydroxymethylation and Induction of Gene Expression. *Cell Rep*. 2015;11(2):283-94.
65. Hu LL, Li Z, Cheng JD, Rao QH, Gong W, Liu MJ, et al. Crystal Structure of TET2-DNA Complex: Insight into TET-Mediated 5mC Oxidation. *Cell*. 2013;155(7):1545-55.
66. Lu JY, Hu LL, Cheng JD, Fang D, Wang C, Yu KQ, et al. A computational investigation on the substrate preference of ten-eleven-translocation 2 (TET2). *Phys Chem Chem Phys*. 2016;18(6):4728-38.

67. Hu LL, Lu JY, Cheng JD, Rao QH, Li Z, Hou HF, et al. Structural insight into substrate preference for TET-mediated oxidation. *Nature*. 2015;527(7576):118-22.
68. Crawford DJ, Liu MY, Nabel CS, Cao XJ, Garcia BA, Kohli RM. Tet2 Catalyzes Stepwise 5-Methylcytosine Oxidation by an Iterative and de novo Mechanism. *J Am Chem Soc*. 2016;138(3):730-3.
69. Tamanaha E, Guan SX, Marks K, Saleh L. Distributive Processing by the Iron(II)/alpha-Ketoglutarate-Dependent Catalytic Domains of the TET Enzymes Is Consistent with Epigenetic Roles for Oxidized 5-Methylcytosine Bases. *J Am Chem Soc*. 2016;138(30):9345-8.
70. Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, Marques CJ, Zakhartchenko V, Boiani M, et al. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat Commun*. 2011;2.
71. Shen L, Inoue A, He J, Liu YT, Lu FL, Zhang Y. Tet3 and DNA Replication Mediate Demethylation of Both the Maternal and Paternal Genomes in Mouse Zygotes. *Cell Stem Cell*. 2014;15(4):459-70.
72. Peat JR, Dean W, Clark SJ, Krueger F, Smallwood SA, Ficz G, et al. Genome-wide Bisulfite Sequencing in Zygotes Identifies Demethylation Targets and Maps the Contribution of TET3 Oxidation. *Cell Rep*. 2014;9(6):1990-2000.
73. Iqbal K, Jin SG, Pfeifer GP, Szabo PE. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *P Natl Acad Sci USA*. 2011;108(9):3642-7.
74. Gu TP, Guo F, Yang H, Wu HP, Xu GF, Liu W, et al. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*. 2011;477(7366):606-U136.
75. Krueger C, Peat JR, Eckersley-Maslin MA, Hore TA, Mohammed H, Andrews SR, et al. A non-catalytic role of TET3 promotes open chromatin and enhances global transcription. [Preprint]. In press 2017.
76. Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, Huang Y, Cunniff K, Nardone J, et al. Tet1 and Tet2 Regulate 5-Hydroxymethylcytosine Production and Cell Lineage Specification in Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2011;8(2):200-13.
77. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. 2010;466(7310):1129-U151.
78. Wu H, D'Alessio AC, Ito S, Xia K, Wang ZB, Cui KR, et al. Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Nature*. 2011;473(7347):389-U578.
79. Gu TP, Lin XQ, Cullen SM, Luo M, Jeong M, Estecio M, et al. DNMT3A and TET1 cooperate to regulate promoter epigenetic landscapes in mouse embryonic stem cells. *Genome Biol*. 2018;19.
80. Verma N, Pan H, Dore LC, Shukla A, Li QV, Pelham-Webb B, et al. TET proteins safeguard bivalent promoters from de novo methylation in human embryonic stem cells (vol 50, pg 83, 2017). *Nat Genet*. 2018;50(5):764-.
81. Khoueiry R, Sohni A, Thienpont B, Luo XL, Velde JV, Bartocetti M, et al. Lineage-specific functions of TET1 in the postimplantation mouse embryo. *Nat Genet*. 2017;49(7):1061-+.
82. Dawlaty MM, Breiling A, Le T, Raddatz G, Barrasa MI, Cheng AW, et al. Combined Deficiency of Tet1 and Tet2 Causes Epigenetic Abnormalities but Is Compatible with Postnatal Development. *Dev Cell*. 2013;24(3):310-23.
83. Dawlaty MM, Breiling A, Le T, Barrasa MI, Raddatz G, Gao Q, et al. Loss of Tet Enzymes Compromises Proper Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Dev Cell*. 2014;29(1):102-11.
84. Ko M, Bandukwala HS, An J, Lamperti ED, Thompson EC, Hastie R, et al. Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *P Natl Acad Sci USA*. 2011;108(35):14566-71.
85. Li Z, Cai XQ, Cai CL, Wang JP, Zhang WY, Petersen BE, et al. Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood*. 2011;118(17):4509-18.

86. Pronier E, Almire C, Mokrani H, Vasanthakumar A, Simon A, Mor BDRM, et al. Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulomonocytic differentiation of human hematopoietic progenitors. *Blood*. 2011;118(9):2551-5.
87. Cimmino L, Dawlaty MM, Ndiaye-Lobry D, Yap YS, Bakogianni S, Yu YT, et al. TET1 is a tumor suppressor of hematopoietic malignancy (vol 16, pg 653, 2015). *Nat Immunol*. 2015;16(8).
88. Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, Makishima H, Afable M, Huh J, et al. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;113(25):6403-10.
89. Langemeijer SMC, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, et al. Acquired Mutations in Tet2 Are Common in Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia. *Haematol-Hematol J*. 2009;94:197-.
90. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse A, et al. Mutation in TET2 in Myeloid Cancers. *New Engl J Med*. 2009;360(22):2289-301.
91. Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, Mrozek K, Margeson D, Becker H, et al. Mutations in the Tet Oncogene Family Member 2 (Tet2) Gene Refine the New European Leukemia Net Risk Classification of Primary, Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia in Adults: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Ann Hematol*. 2011;90:S8-S.
92. Quivoron C, Couronne L, Della Valle V, Lopez CK, Plo I, Wagner-Ballon O, et al. TET2 Inactivation Results in Pleiotropic Hematopoietic Abnormalities in Mouse and Is a Recurrent Event during Human Lymphomagenesis (vol 20, pg 25, 2011). *Cancer Cell*. 2011;20(2):276-.
93. Asmar F, Punj V, Christensen J, Pedersen MT, Pedersen A, Nielsen AB, et al. Genome-wide profiling identifies a DNA methylation signature that associates with TET2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*. 2013;98(12):1912-20.
94. Lemonnier F, Couronne L, Parrens M, Jais JP, Travert M, Lamant L, et al. Recurrent TET2 mutations in peripheral T-cell lymphomas correlate with T-FH-like features and adverse clinical parameters. *Blood*. 2012;120(7):1466-9.
95. Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Asaoka Y, Ijichi H, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Sci*. 2012;103(4):670-6.
96. Yang H, Liu Y, Bai F, Zhang JY, Ma SH, Liu J, et al. Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. *Oncogene*. 2013;32(5):663-9.
97. Eleftheriou M, Pascual AJ, Wheldon LM, Perry C, Abakir A, Arora A, et al. 5-Carboxylcytosine levels are elevated in human breast cancers and gliomas. *Clin Epigenetics*. 2015;7.
98. Yang Q, Wu KX, Ji MJ, Jin WL, He NY, Shi BY, et al. Decreased 5-Hydroxymethylcytosine (5-hmC) is an Independent Poor Prognostic Factor in Gastric Cancer Patients. *J Biomed Nanotechnol*. 2013;9(9):1607-16.
99. Du CP, Kurabe N, Matsushima Y, Suzuki M, Kahyo T, Ohnishi I, et al. Robust quantitative assessments of cytosine modifications and changes in the expressions of related enzymes in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2015;18(3):516-25.
100. Lian CG, Xu YF, Ceol C, Wu FZ, Larson A, Dresser K, et al. Loss of 5-Hydroxymethylcytosine Is an Epigenetic Hallmark of Melanoma. *Cell*. 2012;150(6):1135-46.
101. Kraus TFJ, Globisch D, Wagner M, Eigenbrod S, Widmann D, Munzel M, et al. Low values of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), the "sixth base," are associated with anaplasia in human brain tumors. *Int J Cancer*. 2012;131(7):1577-90.
102. Orr BA, Haffner MC, Nelson WG, Yegnasubramanian S, Eberhart CG. Decreased 5-Hydroxymethylcytosine Is Associated with Neural Progenitor Phenotype in Normal Brain and Shorter Survival in Malignant Glioma. *Plos One*. 2012;7(7).
103. Shim EH, Livi CB, Rakheja D, Tan J, Benson D, Parekh V, et al. L-2-Hydroxyglutarate: An Epigenetic Modifier and Putative Oncometabolite in Renal Cancer. *Cancer Discov*. 2014;4(11):1290-8.
104. Picca A, Berzero G, Di Stefano AL, Sanson M. The clinical use of IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018;18(12):1041-51.

105. Yan H, Parsons DW, Jin GL, McLendon R, Rasheed BA, Yuan WS, et al. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *New Engl J Med*. 2009;360(8):765-73.
106. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring Mutations Found by Sequencing an Acute Myeloid Leukemia Genome. *New Engl J Med*. 2009;361(11):1058-66.
107. Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, Schelen A, Koenders JE, Zeilemaker A, et al. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Blood*. 2010;116(12):2122-6.
108. Gross S, Cairns RA, Minden MD, Driggers EM, Bittinger MA, Jang HG, et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med*. 2010;207(2):339-44.
109. Thol F, Weissinger EM, Krauter J, Wagner K, Damm F, Wichmann M, et al. IDH1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes are associated with an unfavorable prognosis. *Haematol-Hematol J*. 2010;95(10):1668-74.
110. Cairns RA, Iqbal J, Lemonnier F, Kucuk C, de Leval L, Jais JP, et al. IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2012;119(8):1901-3.
111. Laukka T, Mariani CJ, Ihtola T, Cao JZ, Hokkanen J, Kaelin WG, et al. Fumarate and Succinate Regulate Expression of Hypoxia-inducible Genes via TET Enzymes. *J Biol Chem*. 2016;291(8):4256-65.
112. Cramer-Morales KL, Heer CD, Mapuskar KA, Domann FE. Succinate Accumulation Links Mitochondrial MnSOD Depletion to Aberrant Nuclear DNA Methylation and Altered Cell Fate. *J Exp Pathol (Wilmington)*. 2020;1(2):60-70.
113. Camarena V, Sant DW, Huff TC, Mustafi S, Muir RK, Aron AT, et al. cAMP signaling regulates DNA hydroxymethylation by augmenting the intracellular labile ferrous iron pool. *Elife*. 2017;6.
114. Spangler B, Morgan CW, Fontaine SD, Vander Wal MN, Chang CJ, Wells JA, et al. A reactivity-based probe of the intracellular labile ferrous iron pool. *Nat Chem Biol*. 2016;12(9):680-+.
115. Tammen SA, Park JE, Shin PK, Friso S, Chung J, Choi SW. Iron Supplementation Reverses the Reduction of Hydroxymethylcytosine in Hepatic DNA Associated With Chronic Alcohol Consumption in Rats. *J Cancer Prev*. 2016;21(4):264-70.
116. Baek JH, Reiter CEN, Manalo DJ, Buehler PW, Hider RC, Alayash AI. Induction of hypoxia inducible factor (HIF-1 alpha) in rat kidneys by iron chelation with the hydroxypyridinone, CP94. *Bba- Gene Regul Mech*. 2011;1809(4-6):262-8.
117. Hirsila M, Koivunen P, Xu L, Seeley T, Kivirikko KI, Myllyharju J. Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway. *FASEB J*. 2005;19(10):1308-10.
118. Yin RC, Mo JZ, Dai JY, Wang HL. Nickel(II) Inhibits Tet-Mediated 5-Methylcytosine Oxidation by High Affinity Displacement of the Cofactor Iron(II). *Acs Chem Biol*. 2017;12(6):1494-8.
119. Yin RC, Mo JZ, Dai JY, Wang HL. Nickel(ii) inhibits the oxidation of DNA 5-methylcytosine in mammalian somatic cells and embryonic stem cells. *Metallomics*. 2018;10(3):504-12.
120. Fujisawa H, Uyeda M. Protocatechuate 3,4-Dioxygenase - Cobalt Substitution for Iron. *Eur J Biochem*. 1974;45(1):223-31.
121. Liu YK, Xu SY, Zu TJ, Li F, Sang SB, Liu C, et al. Reversal of TET-mediated 5-hmC loss in hypoxic fibroblasts by ascorbic acid. *Lab Invest*. 2019;99(8):1193-202.
122. Li Q, Ke QD, Costa M. Alterations of histone modifications by cobalt compounds. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1243-51.
123. Liu S, Jiang J, Li L, Amato NJ, Wang Z, Wang YS. Arsenite Targets the Zinc Finger Domains of Tet Proteins and Inhibits Tet-Mediated Oxidation of 5-Methylcytosine. *Environ Sci Technol*. 2015;49(19):11923-31.
124. Linowiecka K, Foksinski M, Brozyna AA. Vitamin C Transporters and Their Implications in Carcinogenesis. *Nutrients*. 2020;12(12).
125. Blaschke K, Ebata KT, Karimi MM, Zepeda-Martinez JA, Goyal P, Mahapatra S, et al. Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature*. 2013;500(7461):222-+.

126. Minor EA, Court BL, Young JI, Wang GF. Ascorbate Induces Ten-Eleven Translocation (Tet) Methylcytosine Dioxygenase-mediated Generation of 5-Hydroxymethylcytosine. *J Biol Chem.* 2013;288(19):13669-74.
127. Lane DJR, Lawen A. Non-transferrin iron reduction and uptake are regulated by transmembrane ascorbate cycling in K562 cells. *J Biol Chem.* 2008;283(19):12701-8.
128. Lane DJR, Robinson SR, Czerwinska H, Bishop GM, Lawen A. Two routes of iron accumulation in astrocytes: ascorbate-dependent ferrous iron uptake via the divalent metal transporter (DMT1) plus an independent route for ferric iron. *Biochem J.* 2010;432:123-32.
129. Lane DJR, Chikhani S, Richardson V, Richardson DR. Transferrin iron uptake is stimulated by ascorbate via an intracellular reductive mechanism. *Bba-Mol Cell Res.* 2013;1833(6):1527-41.
130. Dickson KM, Gustafson CB, Young JI, Zuchner S, Wang GF. Ascorbate-induced generation of 5-hydroxymethylcytosine is unaffected by varying levels of iron and 2-oxoglutarate. *Biochem Bioph Res Co.* 2013;439(4):522-7.
131. Yin RC, Mao SQ, Zhao BL, Chong ZC, Yang Y, Zhao C, et al. Ascorbic Acid Enhances Tet-Mediated 5-Methylcytosine Oxidation and Promotes DNA Demethylation in Mammals. *J Am Chem Soc.* 2013;135(28):10396-403.
132. Young JI, Zuchner S, Wang GF. Regulation of the Epigenome by Vitamin C. *Annu Rev Nutr.* 2015;35:545-64.
133. Guan YH, Greenberg EF, Hasipek M, Chen S, Liu XC, Kerr CM, et al. Context dependent effects of ascorbic acid treatment in TET2 mutant myeloid neoplasia. *Commun Biol.* 2020;3(1).
134. Matuleviciute R, Cunha PP, Johnson RS, Foskolou IP. Oxygen regulation of TET enzymes. *Febs J.* 2021.
135. Lin GF, Sun WY, Yang Z, Guo JS, Liu HY, Liang J. Hypoxia induces the expression of TET enzymes in HepG2 cells. *Oncol Lett.* 2017;14(6):6457-62.
136. Cao JZ, Liu H, Wickrema A, Godley LA. HIF-1 directly induces TET3 expression to enhance 5-hmC density and induce erythroid gene expression in hypoxia. *Blood Adv.* 2020;4(13):3053-62.
137. Mariani CJ, Vasanthakumar A, Madzo J, Yesilkanal A, Bhagat T, Yu Y, et al. TET1-Mediated Hydroxymethylation Facilitates Hypoxic Gene Induction in Neuroblastoma. *Cell Rep.* 2014;7(5):1343-52.
138. Ho DHW, Bodey GP, Hall SW, Benjamin RS, Brown NS, Freireich EJ, et al. Clinical Pharmacology of Tetrahydrouridine. *J Clin Pharmacol.* 1978;18(5-6):259-65.
139. Cohen RM, Wolfenden R. Cytidine deaminase from *Escherichia coli*. Purification, properties and inhibition by the potential transition state analog 3,4,5,6-tetrahydrouridine. *J Biol Chem.* 1971;246(24):7561-5.
140. Sohal D, Krishnamurthi S, Tohme R, Gu X, Lindner D, Landowski TH, et al. A pilot clinical trial of the cytidine deaminase inhibitor tetrahydrouridine combined with decitabine to target DNMT1 in advanced, chemorefractory pancreatic cancer. *Am J Cancer Res.* 2020;10(9):3047-60.
141. Coyne GO, Wang L, Zlott J, Juwara L, Covey JM, Beumer JH, et al. Intravenous 5-fluoro-2'-deoxycytidine administered with tetrahydrouridine increases the proportion of p16-expressing circulating tumor cells in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2020;85(5):979-93.
142. Molokie R, Lavelle D, Gowhari M, Pacini M, Krauz L, Hassan J, et al. Oral tetrahydrouridine and decitabine for non-cytotoxic epigenetic gene regulation in sickle cell disease: A randomized phase 1 study. *PLoS Med.* 2017;14(9):e1002382.
143. Cogle CR, Scott BL, Boyd T, Garcia-Manero G. Oral Azacitidine (CC-486) for the Treatment of Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia. *Oncologist.* 2015;20(12):1404-12.
144. Dhillon S. Decitabine/Cedazuridine: First Approval. *Drugs.* 2020;80(13):1373-8.
145. Sajadian SO, Ehnert S, Vakilian H, Koutsouraki E, Damm G, Seehofer D, et al. Induction of active demethylation and 5hmC formation by 5-azacytidine is TET2 dependent and suggests new treatment strategies against hepatocellular carcinoma. *Clin Epigenetics.* 2015;7.
146. Informacje na temat linii A549 w bazie Cellosaurus [Internet]. 2021 [cited 11.10.2021]. Available from: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0023.

147. A549 - ATCC - detailed product information 2021 [Available from: <https://www.atcc.org/products/ccl-185#detailed-product-information>].
148. Informacje na temat linii CA46 w bazie Cellosaurus [Internet]. 2021 [cited 11.10.2021]. Available from: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_1101.
149. CA46 - ATCC - detailed product information [Available from: <https://www.atcc.org/products/crl-1648#detailed-product-information>].
150. Essletzbichler P, Konopka T, Santoro F, Chen D, Gapp BV, Kralovics R, et al. Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. *Genome Res.* 2014;24(12):2059-65.
151. Wytyczne do hodowli komórek HAP1 2021 [Available from: <https://horizondiscovery.com/-/media/Files/Horizon/resources/Protocols/hap1-cell-culture-guidelines.pdf>].
152. Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J, Brattain DE. Heterogeneity of Malignant-Cells from a Human Colonic-Carcinoma. *Cancer Res.* 1981;41(5):1751-6.
153. Informacje na temat linii HCT116 w bazie Cellosaurus [Internet]. 2021 [cited 11.10.2021]. Available from: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0291.
154. HCT116 - ECACC - detailed product information 2021 [Available from: https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refid=91091005&collection=ecacc_gc].
155. Informacje na temat linii K562 w bazie Cellosaurus [Internet]. 2021 [cited 11.10.2021]. Available from: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0004.
156. K562 - ECACC - detailed product information 2021 [Available from: https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refid=91091005&collection=ecacc_gc].
157. Informacje na temat linii MDA-MB-231 w bazie Cellosaurus [Internet]. 2021 [cited 11.10.2021]. Available from: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0062.
158. MDA-MB-231 - DSMZ - cell line details 2021 [Available from: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-732>].
159. Informacje na temat linii PC-3 w bazie Cellosaurus [Internet]. 2021 [cited 11.10.2021]. Available from: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0035.
160. PC-3 - ATCC - detailed product information 2021 [Available from: <https://www.atcc.org/products/crl-1435>].
161. Informacje na temat linii RAJI w bazie Cellosaurus [Internet]. 2021 [cited 11.10.2021]. Available from: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0511.
162. RAJI - ATCC - detailed product information 2021 [Available from: <https://www.atcc.org/products/ccl-86>].
163. Gackowski D, Starczak M, Zarakowska E, Modrzejewska M, Szpila A, Banaszkiwicz Z, et al. Accurate, Direct, and High-Throughput Analyses of a Broad Spectrum of Endogenously Generated DNA Base Modifications with Isotope-Dilution Two-Dimensional Ultrapformance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry: Possible Clinical Implication. *Anal Chem.* 2016;88(24):12128-36.
164. Starczak M, Gawronski M, Olinski R, Gackowski D. Quantification of DNA Modifications Using Two-Dimensional Ultrapformance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (2D-UPLC-MS/MS). *Methods Mol Biol.* 2021;2198:91-108.
165. Starczak M, Skalska A, Rozalski R, Olinski R, Gackowski D. Preparation of Internal Standards for 2D-UPLC-MS/MS Quantification of Noncanonical DNA Bases. *Methods Mol Biol.* 2021;2198:123-36.
166. Modrzejewska M, Gawronski M, Skonieczna M, Zarakowska E, Starczak M, Foksinski M, et al. Vitamin C enhances substantially formation of 5-hydroxymethyluracil in cellular DNA. *Free Radical Bio Med.* 2016;101:378-83.
167. Modrzejewska M, Gawronski M, Gackowski D. Normalization of metabolic data to total thymine content and its application to determination of 2-hydroxyglutarate. *Anal Biochem.* 2021;618.

168. Modrzejewska M, Gawronski M, Gackowski D. Normalization of metabolic data to total thymine content and its application to determination of 2-hydroxyglutarate. *Anal Biochem.* 2021;618:114129.
169. He SW, Wang FH, Zhang YX, Chen JL, Liang LN, Li Y, et al. Hemi-methylated CpG sites connect Dnmt1-knockdown-induced and Tet1-induced DNA demethylation during somatic cell reprogramming. *Cell Discov.* 2019;5.
170. Chowdhury B, McGovern A, Cui Y, Choudhury SR, Cho IH, Cooper B, et al. The hypomethylating agent Decitabine causes a paradoxical increase in 5-hydroxymethylcytosine in human leukemia cells. *Sci Rep-Uk.* 2015;5.
171. Jeschke J, Collignon E, Fuks F. Portraits of TET-mediated DNA hydroxymethylation in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2016;36:16-26.
172. Gurnari C, Pagliuca S, Guan Y, Adema V, Hershberger CE, Ni Y, et al. TET2 mutations as a part of DNA dioxygenase deficiency in myelodysplastic syndromes. *Blood Adv.* 2021.
173. Mayland CR, Bennett MI, Allan K. Vitamin C deficiency in cancer patients. *Palliative Med.* 2005;19(1):17-20.
174. Gillberg L, Orskov AD, Liu MM, Harslof LBS, Jones PA, Gronbaek K. Vitamin C - A new player in regulation of the cancer epigenome. *Semin Cancer Biol.* 2018;51:59-67.
175. Vissers MCM, Das AB. Potential Mechanisms of Action for Vitamin C in Cancer: Reviewing the Evidence. *Front Physiol.* 2018;9.
176. Foksinski M, Zarakowska E, Gackowski D, Skonieczna M, Gajda K, Hudy D, et al. Profiles of a broad spectrum of epigenetic DNA modifications in normal and malignant human cell lines: Proliferation rate is not the major factor responsible for the 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine level in cultured cancerous cell lines. *Plos One.* 2017;12(11).
177. Rivas CI, Zuniga FA, Salas-Burgos A, Mardones L, Ormazabal V, Vera JC. Vitamin C transporters. *J Physiol Biochem.* 2008;64(4):357-75.
178. Sant DW, Mustafi S, Gustafson CB, Chen J, Slingerland JM, Wang G. Vitamin C promotes apoptosis in breast cancer cells by increasing TRAIL expression. *Sci Rep.* 2018;8(1):5306.
179. Esselen WB, Powers JJ, Woodward R. D-Isoascorbic Acid as an Antioxidant. *Ind Eng Chem.* 1945;37(3):295-9.
180. Guggenheim K, Leibowitz J, Rakover D. Comparative Observations on the Chemical Properties and Biological Activities of L-Ascorbic and D-Isoascorbic Acids. *Biochem J.* 1953;55(3):388-92.
181. Wang YX, Mackenzie B, Tsukaguchi H, Weremowicz S, Morton CC, Hediger MA. Human vitamin C (L-ascorbic acid) transporter SVCT1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;267(2):488-94.
182. Mackenzie B, Illing AC, Hediger MA. Transport model of the human Na⁺-coupled L-ascorbic acid (vitamin C) transporter SVCT1. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 2008;294(2):C451-C9.
183. Mikkelsen SU, Gillberg L, Lykkesfeldt J, Gronbaek K. The role of vitamin C in epigenetic cancer therapy. *Free Radical Bio Med.* 2021;170:179-93.
184. Current EU approved additives and their E Numbers, Food Standards Agency [webpage]. 2020 [updated 30.12.2020. Available from: <https://www.food.gov.uk/business-guidance/approved-additives-and-e-numbers>.
185. Wang Y, Zhang Y. Regulation of TET Protein Stability by Calpains. *Cell Rep.* 2014;6(2):278-84.
186. Modrzejewska M, Gawronski M, Skonieczna M, Zarakowska E, Starczak M, Foksinski M, et al. Vitamin C enhances substantially formation of 5-hydroxymethyluracil in cellular DNA. *Free Radic Biol Med.* 2016;101:378-83.
187. Abdullah M, Jamil RT, Attia FN. Vitamin C (Ascorbic Acid). *StatPearls. Treasure Island (FL)2021.*
188. Mottola M, Wilke N, Benedini L, Oliveira RG, Fanani ML. Ascorbyl palmitate interaction with phospholipid monolayers: Electrostatic and rheological preponderancy. *Bba-Biomembranes.* 2013;1828(11):2496-505.
189. Pokorski M, Marczak M, Dymecka A, Suchocki P. Ascorbyl palmitate as a carrier of ascorbate into neural tissues. *J Biomed Sci.* 2003;10(2):193-8.

190. Shibuya S, Sakaguchi I, Ito S, Kato E, Watanabe K, Izuo N, et al. Topical Application of Trisodium Ascorbyl 6-Palmitate 2-Phosphate Actively Supplies Ascorbate to Skin Cells in an Ascorbate Transporter-Independent Manner. *Nutrients*. 2017;9(7).
191. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*. 2013;8.
192. Lukawski M, Dalek P, Borowik T, Forys A, Langner M, Witkiewicz W, et al. New oral liposomal vitamin C formulation: properties and bioavailability. *J Liposome Res*. 2020;30(3):227-34.
193. Gąbka M, Dałek P, Przybyło M, Gackowski D, Oliński R, Langner M. The Membrane Electrical Potential and Intracellular pH as Factors Influencing Intracellular Ascorbate Concentration and Their Role in Cancer Treatment. *Cells*. 2021;10(11):2964.
194. Jaiswal M, Bhar S, Vemula H, Prakash S, Ponnaluri VKC, Gutheil WG, et al. Convenient expression, purification and quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based analysis of TET2 5-methylcytosine demethylase. *Protein Expr Purif*. 2017;132:143-51.
195. Zhang N, Schuchmann HP, Vonsontag C. The Reaction of Superoxide Radical-Anion with Dithiothreitol - a Chain Process. *J Phys Chem-Us*. 1991;95(12):4718-22.
196. Fjelstrup S, Andersen MB, Thomsen J, Wang J, Stougaard M, Pedersen FS, et al. The Effects of Dithiothreitol on DNA. *Sensors-Basel*. 2017;17(6).
197. Chen CC, Wang KY, Shen CKJ. The Mammalian de Novo DNA Methyltransferases DNMT3A and DNMT3B Are Also DNA 5-Hydroxymethylcytosine Dehydroxymethylases. *J Biol Chem*. 2012;287(40):33116-21.
198. MacKenzie ED, Selak MA, Tennant DA, Payne LJ, Crosby S, Frederiksen CM, et al. Cell-permeating alpha-ketoglutarate derivatives alleviate pseudohypoxia in succinate dehydrogenase-deficient cells. *Mol Cell Biol*. 2007;27(9):3282-9.
199. Traube FR, Ozdemir D, Sahin H, Scheel C, Gluck AF, Geserich AS, et al. Redirected nuclear glutamate dehydrogenase supplies Tet3 with alpha-ketoglutarate in neurons. *Nat Commun*. 2021;12(1):4100.
200. Ji C, Nagaoka K, Zou J, Casulli S, Lu S, Cao KY, et al. Chronic ethanol-mediated hepatocyte apoptosis links to decreased TET1 and 5-hydroxymethylcytosine formation. *FASEB J*. 2019;33(2):1824-35.
201. Mukherji M, Chien W, Kershaw NJ, Clifton IJ, Schofield CJ, Wierzbicki AS, et al. Structure–function analysis of phytanoyl-CoA 2-hydroxylase mutations causing Refsum’s disease. *Human Molecular Genetics*. 2001;10(18):1971-82.
202. Jozwiak P, Ciesielski P, Zaczek A, Lipinska A, Pomorski L, Wieczorek M, et al. Expression of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha and its association with vitamin C level in thyroid lesions. *J Biomed Sci*. 2017;24.
203. Pugh CW, Ratcliffe PJ. The von Hippel-Lindau tumor suppressor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) degradation, and cancer pathogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2003;13(1):83-9.
204. Leysens L, Vinck B, Van Der Straeten C, Wuyts F, Maes L. Cobalt toxicity in humans-A review of the potential sources and systemic health effects. *Toxicology*. 2017;387:43-56.
205. Ma L, Qi T, Wang S, Hao M, Sakhawat A, Liang T, et al. Tet methylcytosine dioxygenase 1 promotes hypoxic gene induction and cell migration in colon cancer. *J Cell Physiol*. 2019;234(5):6286-97.
206. Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med*. 2011;15(6):1239-53.
207. Löfstedt T, Fredlund E, Holmquist-Mengelbier L, Pietras A, Ovenberger M, Poellinger L, et al. Hypoxia Inducible Factor-2 α in Cancer. *Cell Cycle*. 2007;6(8):919-26.
208. Joyce BT, Gao T, Zheng YA, Liu L, Zhang W, Dai Q, et al. Prospective changes in global DNA methylation and cancer incidence and mortality. *Brit J Cancer*. 2016;115(4):465-72.
209. Muller A, Florek M. 5-Azacytidine/Azacitidine. *Recent Results Canc*. 2010;184:159-70.

210. Lemonnier F, Dupuis J, Sujobert P, Tournilhac O, Cheminant M, Sarkozy C, et al. Treatment with 5-azacytidine induces a sustained response in patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2018;132(21):2305-9.
211. Venturelli S, Berger A, Weiland T, Essmann F, Waibel M, Nuebling T, et al. Differential induction of apoptosis and senescence by the DNA methyltransferase inhibitors 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine in solid tumor cells. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(10):2226-36.
212. Kroeger N, Sockel K, Wolschke C, Bethge W, Schlenk RF, Wolf D, et al. Prospective Multicenter Phase 3 Study Comparing 5-Azacytidine (5-Aza) Induction Followed By Allogeneic Stem Cell Transplantation Versus Continuous 5-Aza According to Donor Availability in Elderly MDS Patients (55-70 years) (VidazaAllo Study). *Blood*. 2018;132.
213. Delarue R, Dupuis J, Sujobert P, Barbieux S, Marçais A, Tournilhac O, et al. Treatment with Hypomethylating Agent 5-Azacytidine Induces Sustained Response in Angioimmunoblastic T Cell Lymphomas. *Blood*. 2016;128(22).
214. Yan XY, Ehnert S, Culmes M, Bachmann A, Seeliger C, Schyschka L, et al. 5-Azacytidine Improves the Osteogenic Differentiation Potential of Aged Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells by DNA Demethylation. *Plos One*. 2014;9(3).

10. Zgoda Komisji Bioetycznej

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 316/2018

Bydgoszcz, 24.04.2018 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U.Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu **24.04.2018 r.** przeanalizowała wniosek, który złożył kierownik badania:

mgr Maciej Gawroński
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

z zespołem w składzie:

- prof. dr hab. Ryszard Oliński, dr hab. n. med. Marek Foksiński, dr hab. n. med. Daniel Gackowski, dr hab. n. med. Karol Białkowski, prof. UMK, dr hab. n. med. Rafał Różalski, dr n. med. Jolanta Guz, dr n. med. Agnieszka Siomek-Górecka, dr n. med. Tomasz Dziaman, dr n. med. Anna Szpila, dr n. med. Ewelina Zarakowska, Martyna Modrzejewska, Marta Starczak, Kinga Linowiecka, Maciej Gawroński, Justyna Szpotan, Anna Łabejszo, uczestnicy studiów doktoranckich, magistranci,

w sprawie badania:

„Metody modulacji aktywności białek rodziny TET w komórkach - badania *in vitro*.”

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania Komisja podjęła

Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku

w sprawie przeprowadzenia badań w zakresie określonym we wniosku

Zgoda obowiązuje od daty posiedzenia (27.03.2018 r.) do końca 2023 r.

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:
mgr Maciej Gawroński
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

11. Wykaz użytych skrótów

2-HG – 2-hydroksyglutaran

5-caCyt – 5-karboksycytozyna

5-fCyt – 5-formylocytozyna

5-hmCyt – 5-hydroksymetylocytozyna

5-hmUra – 5-hydroksymetylouracyl

5-mCyt – 5-metylocytozyna

8-oxoGua – 8-oksyguanina

AID – (ang. *activation-induced cytidine deaminase*), deaminaza cytydiny indukowana aktywacją

AiTL – (ang. *angioimmunoblastic T-cell lymphoma*), chłoniak angioimmunoblastyczny z komórek T

ALL – (ang. *acute lymphoblast leukemia*), ostra białaczka limfoblastyczna

AML – (ang. *acute myeloid leukemia*), ostra białaczka szpikowa

APE1 – (ang. *apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease*), endonukleaza 1 miejsc apurynowych/apirymidynowych

APOBEC – (ang. *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like*), enzym edytujący mRNA apolipoproteiny B, podobny do katalitycznego polipeptydu

BER – (ang. *base excision repair*), naprawa przez wycięcie zasady azotowej

CD – (ang. *cys-rich domain*), domena katalityczna bogata w reszty cysteinowe

CGI – (ang. *CpG islands*), wyspy CpG

CMML – (ang. *chronic myelomonocytic leukemia*), przewlekła białaczka mielomonocytowa

CpG – (ang. *cytosine-guanine dinucleotide separated by a phosphate*), dinukleotyd cytozyna-guanina oddzielone grupą fosforanową

DHS – (ang. *DNase-hypersensitive sites*), miejsca hiperczułe na działanie DNAzy

DLBCL – (ang. *diffuse large B-cell lymphoma*), rozlany chłoniak z dużych komórek B

DMT1 – (ang. *divalent metal transporter 1*), białko transportujące biwalentne jony metali 1

DNMT – (ang. *DNA methyltransferases*), metylotransferazy DNA

DSB – (ang. *double-strand break*), pęknięcie podwójnej nici DNA

DSBH – (ang. *double-stranded β -helix-2-KG-Fe(II)-dependent dioxygenase domain*), domena podwójnej β -helisy dioksygenaz zależnych od α -ketoglutaranu i jonów Fe(II)

ESC – (ang. *embryonic stem cells*), embrionalne komórki macierzyste

GDH – (ang. *glutamate dehydrogenase*), dehydrogenaza glutaminianowa

HAT – (ang. *histone acetyltransferases*), acetylotransferazy histonowe

HDAC – (ang. *histone deacetylases*), deacetylazy histonowe

HDM – (ang. *histone demethylases*), demetylaz histonowe

HIF1 α – (ang. *hypoxia inducible factor 1 alpha*), czynnik aktywowany hipoksją 1 alfa

HIF-PHD – (ang. *hypoxia inducible prolyl hydroxylase domain (PHD) proteins*), indukowane hipoksją białka zawierające domenę hydroksylazy prolinowej

HMT – (ang. *histone methyltransferases*), metylotransferazy histonowe

HSC – (ang. *hematopoietic stem cells*), hematopoetyczne komórki macierzyste

IDH1/2 – (ang. *isocitrate dehydrogenase 1 and 2*), dehydrogenaza izocytrynianowa 1 i 2

LIG3 – (ang. *DNA ligase 3*), ligaza DNA 3

LIP – (ang. *intracellular labile Fe(II) pool*), labilna, wewnątrzkomórkowa pula jonów żelaza(II)

lncRNA – (ang. *long non-coding RNA*), długie niekodujące RNA

MBD – (ang. *methyl-CpG-binding domain*), domena wiążąca metylowane dinukleotydy cytozyna-guanina

MBD4 – (ang. *methyl-CpG-binding domain protein 4*), białko z domeną wiążącą metylowane dinukleotydy cytozyna-guanina 4

MDS – (ang. *myelodysplastic syndrome*), zespół mielodysplastyczny

MPS – (ang. *myeloproliferative syndrome*), syndrom mieloproliferacyjny

NLS – (ang. *nuclear localization sequence*), sekwencja lokalizacji jądrowej

PGC – (ang. *primordial germ cells*), pierwotne komórki rozrodcze

POL β – (ang. *DNA polymerase β*), β -polimeraza DNA

PRC2 – (ang. *polycomb repressive complex 2*), kompleks represyjny policomb 2

PTCL – (ang. *peripheral T-cell lymphoma*), chłoniak z obwodowych komórek T

SAH – S-adenozylhomocysteina

SAM – S-adenozylometionina

SMUG1 – (ang. *single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase 1*), glikozylaza uracylowa 1 selektywna dla pojedynczej nici DNA

SSB – (ang. *single-strand break*), pęknięcie pojedynczej nici DNA

SVCT1/2 – (ang. *sodium-dependent vitamin C transporter 1 and 2*), zależne od jonów sodu transportery witaminy C

TDG – (ang. *G/T mismatch-specific thymine DNA glycosylase*), glikozylaza DNA tyminy specyficzna względem niesparowań G/T

TET – (ang. *ten-eleven translocation*), białka z rodziny TET

THU – tetrahydrourydyna

UHRF1 – (ang. *ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domain 1*), białko ubikwitynopodobne 1, zawierające domeny palców PHD i RING

Ura – uracyl