



Nükleobazların Demetilasyonu ve Güncel Gelişmeler

Demethylation of Nucleobases and Current Developments

Kezban Kartlaşmış¹, Nurten Dikmen¹

¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana, Turkey

ABSTRACT

Epigenetics is defined as changes in gene function that do not change the DNA sequence, but result in changes in the functions and regulation mechanisms of DNA, proteins and RNAs. Studies conducted in the field of epigenetics with the developing technology in recent years have enabled us to discover its important effects on humans and to understand its relationship with diseases. Many diseases occur as a result of excessive increase / suppression of the expression of genes by error or irregularity in the regulation of epigenetic mechanisms. The epigenetic mechanism that has been studied a lot and the most known epigenetic mechanism is DNA and RNA methylation. In addition to methylations, molecular-level research on DNA and RNA demethylation processes has gained great importance in understanding and evaluating epigenetic disease mechanisms.

Keywords: Demethylation, epigenesis, nucleobases

ÖZET

DNA dizisi aynı kalarak DNA, RNA ve proteinlerin işlev ve düzenleme mekanizmalarının etkilenmesi ile sonuçlanan gen işlevlerindeki değişiklikler epigenetik olarak tanımlanır. Son yıllarda gelişen teknolojiyle birlikte epigenetik alanında yapılan çalışmalar, insanlar üzerindeki önemli etkilerinin keşfedilmesini ve hastalıklarla ilişkisinin anlaşılmasını sağlamıştır. Birçok hastalık, epigenetik mekanizmaların düzenlenmesindeki hata ya da düzensizlik ile genlerin ifadesinin aşırı artması/baskılanması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Son dönemlerde üzerinde çok çalışılan ve hakkında en çok bilgi sahibi olunan epigenetik mekanizmalar DNA ve RNA metilasyonudur. Epigenetik hastalık mekanizmalarının anlaşılma ve değerlendirilmesinde metilasyonların yanı sıra DNA ve RNA demetilasyon süreçleriyle ilgili olarak yapılan moleküler düzeydeki araştırmalar da büyük önem kazanmıştır.

Anahtar kelimeler: Demetilasyon, epigenezis, nükleobaz

Giriş

Epigenetik, DNA dizisine bağımlı olmaksızın gen ifadesindeki kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanmaktadır¹. Epigenetik alanında yapılan moleküler çalışmalar arttıkça bu konu ile ilgili bilgiler daha da çok önem arz etmektedir. Moleküler düzeyde yapılan epigenetik çalışmaların sonucunda hastalıklarla olan ilişkisinin de keşfedilmesi sağlanmıştır². Hastalıkların birçoğu epigenetik mekanizmalardaki hatalardan meydana gelmektedir. Organizmanın normal gelişimi için bu mekanizmaların birbiriyle uyumlu çalışması gerekmektedir. Bunu sağlayan mekanizmaların herhangi birindeki bir hata, genlerin ifadesinin aşırı artmasına veya baskılanmasına neden olarak epigenetik kaynaklı hastalıkları meydana getirmektedir³. Son dönemlerde üzerinde en çok çalışılan epigenetik mekanizma DNA ve RNA metilasyon-demetilasyon süreçleridir⁴.

Metilasyon bir bileşiğe metil grubunun bağlanmasıdır. Bu olay metile edici ajanlar varlığında (S-Adenozilmetiyonin, metiyonin, kolin, dimetilglisin, trimetilglisin/betain, sarkozin, Metiltetrahidrofolat, metilkobalamin) non-enzimatik ya da enzimatik aktivite sonucu olarak DNA ve RNA'nın nükleobazlarında meydana gelmektedir^{4,5}. Son yıllarda sadece kimyasal değil aynı zamanda enzimatik metilasyonun da tersine çevrilebilir (demetilasyon) olduğu netleşmiştir. Nükleobaz metilasyonunun α -ketoglutarat'a bağlı oksidatif tersine çevrilmesinin keşfi, oksidatif demetilasyon ve oksidasyon kavramlarını α -ketoglutarat'a bağlı hidroksilasyonla birleştirdi. Demetilasyon genellikle oksidasyon aşamasını içeren yollarla ilerler ve metillenmemiş nükleobaz şekline çevirim (direkt) ya da metillenmiş nükleobazın modifiye olmamış nükleobazla yer değiştirmesi (dolaylı) ile sonuçlanır⁵. Direkt ve dolaylı demetilasyon süreçlerinin çoğunluğunda ALKBH (α -ketoglutarat bağımlı hidroksilazlar) ve TET (on-onbir translokasyon) hidroksilazlar majör rol oynamaktadır⁶. Bu derlemede öncelikle DNA ve RNA'daki enzimatik nükleobaz



metilasyonu sınıflandırılarak ardında da demetilasyon süreçleri, bu süreçlerde yer alan önemli enzim grupları ve güncel gelişmelerin aydınlatılması amaçlanmaktadır.

Nükleobaz metilasyonunun kimyasal sınıflaması

Nükleobaz metilasyonu kimyasal olarak, metilin bağlandığı atomun karbon, azot ve oksijen olmasına göre sırasıyla C-tipi, N-tipi ve O-tipi olarak sınıflandırılmaktadır⁷. Azot atomunun aromatik halkaya göre göreceli konumuna bağlı olarak N-tipi metilasyon, ekzosiklik (halkasal yapının dışında, exN) ve endosiklik (halkasal yapının içinde, enN ve enN⁺) olarak 2 gruba ayrılmaktadır. Endosiklik azot metilasyonları arasındaki ayırım endosiklik azotun bir protona sahip olup (enN) olmamasına (enN⁺) bağlıdır. enN⁺, metillenmiş bazı fizyolojik pH'da zwitteriyonik veya katyonik karışım olarak bulunduğunu gösterir. Diğer tüm metilasyon türleri için metil transferine bir proton kaybı eşlik eder ve bu nedenle modifiye edilmiş baz nötrdür⁸.

Bu şekilde bir sınıflama, katalize edilmemiş olan tepkimelerin gerçekleşmesinin öngörülebilirliği açısından yararlıdır. Aynı zamanda Watson-Crick baz eşleşmesindeki hatalar hakkında da bilgilendirici olup nükleobazı mı yoksa glikozidik bağın stabilitesini mi etkilediği hakkında ipuçları vermektedir. Örneğin N-metilasyon türleri Watson-Crick eşleşmesi için uyumlu iken O-metilasyonda metil grubu doğrudan sterik girişime neden olmasa bile genellikle baz eşleşmeleri ile uyumsuzdur. Çünkü metilasyon keto-tautomer yerine hidroksil grubunu hapsedir⁹. Bu dolaylı etki genellikle alkilasyon için ifade edilen 'O-alkilasyonların yüksek oranda mutajenik ve genotoksik olmasını, N-alkilasyonların ise sitotoksik fakat nispeten daha az mutajenik olduğu' iddiasını açıklayabilir¹⁰.

Ekzosiklik-N atomundan metillenme tipinde konjugasyon, metil grubunu nükleobaz düzlemine yakın bir pozisyona yönlendirir ve böylece iki farklı konfigürasyon mümkündür. Teknik olarak 4 konformasyon vardır çünkü metil grubunun sterik çatışma nedeniyle düzlemin dışında kaldığı durum çok nadirdir¹¹. Endosiklik-N⁺ atomundan metillenmiş nükleobazlar protonlanmış veya zwitteriyonik formların bir karışımı olarak ortaya çıkmaktadır¹².

RNA'daki Enzimatik Nükleobaz Metilasyonları

RNA'daki enzimatik nükleobaz metilasyonu çok çeşitlidir. Neredeyse tüm azot atomları metile olur ve 4 standart bazdaki birkaç karbon atomu da metillenebilir¹³. Bununla birlikte S_N1 reaktifleri ile kimyasal metilasyon basit bir şekilde ilerlemesine rağmen oksijen atomlarının enzimatik metilasyonun mekanizmasına dair yapılan çalışmalar devam etmektedir¹⁴.

Nükleobaz metilasyonu tek bir metilasyon tepkimesi ile sınırlı değildir; aynı konumun (exN konumu için mümkün olan metil-6-Adenozin) veya farklı konumların (metil2-metil8-Adenozin) çift metilasyon örnekleri bilinmektedir¹⁵⁻¹⁶. RNA cap'te metil-2,2,7Guanozin olduğu gibi üçlü metilasyon da meydana gelebilir¹⁷. Ayrıca nükleobaz metilasyonu, modifiye RNA nükleotitlerinin repertuarını daha da çeşitlendirerek riboz 2'OH metilasyonu ile de birleştirebilir. Enzimatik metilasyon tüm majör RNA tiplerinde (tRNA, rRNA, snRNA, snoRNA, mRNA) görülmektedir. Metillenmiş nükleobazlar;

- tRNA antikodon ilmeğinin baz eşleştirme yeteneğini modüle etme ve tRNA yapısının stabilizasyonunda görev alırlar¹⁸.
- RNA ekspresyonundan uç birleştirme (splicing), çekirdek eksportu (çekirdekte sitoplazmaya geçişi), translasyon ve turnover kadar RNA yaşam döngüsünün hemen hemen her aşamasını etkileyen sinyalleme sistemleri olmak üzere çok çeşitli rollere sahiptir^{18,19}. Metil-6-Adenozin ökaryotlarda RNA'da en yaygın görülen metil modifikasyondur ve tüm RNA metilasyonunun %80'inden fazlasını oluşturur. 5.RNA bazı olarak adlandırılmakta ve embriyonik gelişim ile hücre yaşam döngüsünde önemli rollere sahip olduğu bilinmektedir. Bu modifikasyonun 3'UTR bölgesindeki zenginliği mRNA regülasyonu açısından önemlidir. Ayrıca lösemi, meme ve prostat kanserleriyle de bağlantılıdır¹⁹.

Diğer nükleobaz metilasyon türlerinin önemi pek bilinmemekte ve hala araştırılmaya açık bir konu olarak görülmektedir. Bu metilasyonların varlığı tRNA ya da rRNA metiltransferazların rastgele aktivitelerinden kaynaklanabilir ya da geri dönüşümlü modifiye edilmiş nükleotitlerin dahil edilmesine katkıda bulunabilir.

DNA'daki Enzimatik Nükleobaz Metilasyonları

DNA'da enzimatik olarak kataliz edilmiş nükleobaz metilasyon repertuarı çok daha kısıtlıdır. Nükleobaz metilasyonu: Watson-Crick baz eşleşmesini engellememeli (1-metiladenozin), DNA ve RNA polimerazlar için nükleobaz 'handle'larını bloke etmemeli (3-metiladenozin), glikozidik bağları kararsız hale getirmemeli (7-metilguanozin), glikozidik bağların oryantasyonu için anti/syn tercihini bozmamalıdır (8-metiladenozin). 5-metilsitozin ve 6-metiladenozin mükemmel olmasa da bu kısıtlamaları kabul edilebilir şekilde gerçekleştirilmektedir²⁰.

Ayrıca 6-metiladenozin hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve yanlış baz eşleşme onarımında görev almaktadır. Çoğu ökaryotta 6-metiladenozin sıklıkla bulunmaktadır. Bu durum hem transkripsiyonel başlangıç bölgesinin işaretlenmesinde önemli hem de DNA çift zinciri üzerinde sahip olduğu destabilize edici etkisi ile transkripsiyonu aktive etmektedir. Yüksek ökaryotlarda 6-metiladenozin varlığının büyük kısmı RNA'dan nükleotit geri dönüşümünden kaynaklanır¹⁸⁻¹⁹.

6-metiladenozin'in aksine 5-metilsitozin enzimatik olarak eklenen ve korunan nükleobaz metilasyonudur. 5-metilsitozin aynı zamanda promotör ve enhancer'ların varlığında transkripsiyonu baskılar. Hem adenin hem de sitozin metilasyonu için DNA zincirindeki eşleşme üzerindeki etkileri yalnızca fiziksel gerekçelerle açıklamak mümkün değildir²¹. Bununla birlikte DNA metilasyonunun günümüzdeki biyolojik etkileri muhtemelen bu zayıf intrinsik etkiler üzerine inşa edilen evrimin bir sonucudur.

Nükleobaz demetilasyon mekanizma ve çeşitleri

Birçok kimyasal ya da enzimatik metilasyon tepkimesi doğrudan veya dolaylı olarak geri dönüşümlüdür. DNA bazlarının kimyasal metilasyonu bir DNA hasar şeklidir ve genom bütünlüğünü korumak için onarılması gereklidir. RNA bazlarının 'hasar' metilasyonlarının sonucu ise iyi karakterize edilememiştir. RNA'nın DNA'ya kıyasla daha kısa yaşam süresine rağmen onarım en azından özel durumlarda gerçekleşiyor gibi görünmektedir. RNA'da Yağ kütlesi ve Obezite ile ilişkili (FTO) protein ve ALKBH5 hedef mRNA'nın demetilazlarıdır²².

Replikasyondan bağımsız aktif metilasyonun tersine çevrilmesi için yollar oldukça çeşitlidir. Bazı metilasyon türleri nükleofilik yer değiştirme veya hidroksilasyon ile doğrudan tersine çevrilebilir. Bu yola uygun olmayan metilasyon türleri için metillenmiş 2'-deoksiniükleotitlerin baz eksizyon tamiri ile yer değiştirmesi DNA'da alternatif bir yöntemdir. Aynı zamanda hidroksilasyon ve eksizyon da kombine edilebilir. Bu gibi durumlarda hidroksilasyon; glikozidik bağı, Watson-Crick eşleşmesini zayıflatarak veya hasarlı bazın diğer özelliklerini metile edilmiş baza aktararak eksizyonu başlatır²³.

O-metil gruplarının demetilasyonu

Oksijene bağlı metil grupları nükleofilik yer değiştirme ile ortadan kaldırılır. Bu durum çift zincirli DNA'da tercihen 6-metil-Guanozini onaran O⁶-metilguanin metiltransferaz (MGMT) ile gerçekleştirilebilir. MGMT, tepkime sonucu olarak metillenen nükleofilik saldırı için sistein kalıntılarını kullanır. MGMT'nin aktif bölgesinde bulunan sistein metilasyonu geri dönüşümsüzdür ve protein her tepkimeden sonra yeni proteinle yer değiştirip parçalanmalıdır. Bu nedenle bu tepkime hücre için masraflıdır²⁴.

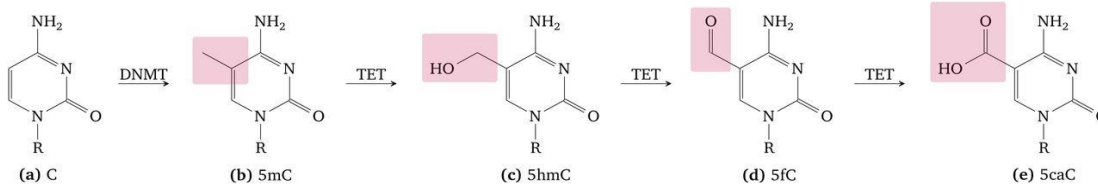
N-metil gruplarının demetilasyonu

Azot bağlı metil grupları oksidasyonla uzaklaştırılabilir. Ortaya çıkan hemiaminaller (OH ve aynı C atomuna bağlı amine sahip işlevsel bileşikler) N-metilasyonun tüm tipleri için tutulabilir ve fizyolojik koşullardaki stabiliteyi büyük oranda farklılık gösterebilir. Bozulma kendiliğinden oluşur ve enN⁺ tipi için en hızlıdır. Bunun aksine exN-tipi hemiaminaller daha stabildir. Metil-6-adenozin için 1. ve 2.tur oksidasyon ürünleri olan 6-hidroksimetiladenozin (hm6A) ve N⁶-formiladenozin (f6A) sonunda metillenmemiş nükleobazlara geri dönüşüncüye kadar fizyolojik koşullarda saatlerce kalır²⁵. 6mA için şimdiye kadar sadece ilk hidroksilasyon turunun ürünü olan 6hmA rapor edilmiştir. enN metilasyonunu destabilize eden glikozidik bağlar için baz eksizyon onarım enzimleri (BER) ile 2'-deoksiniükleotit değişimi, DNA'da geçerli bir alternatif demetilasyon yoludur. enN metilasyon için doğrudan ve dolaylı geri dönüşüm tepkimeleri farklı konuları

hedef alır; baz eksizyon onarım enzimleri ile 3-metiladenozin ve 7-metilguanozin doğrudan eksizye ve metillenmiş bazların hidroksile olmadığı bilinmektedir²⁶.

C-metil gruplarının demetilasyonu

C-metil gruplarının sadece 5-metilsitozin durumunda iken demetile olduğu bilinmektedir. Hayvanlarda Şekil 1'de de gösterildiği gibi 5-metilsitozin, 3 ardışık hidroksilasyon turunda; 5-hidroksimetil sitozin (5hmC), 5-formilsitozin (5fC) ve 5-karboksitosozin (5caC)'e oksitlenir. 5fC ve 5caC bazları, DNA hasar belirteci olduklarından dolayı, BER enzimleri tarafından eksizye edilebilirler. Bununla birlikte Timin DNA glikozilaz enzimi (TDG) de bu 5fC ve 5caC üzerinde aktiftir. Her üç oksidasyon ürünü de katalizör yokluğunda stabil olup demetilasyon tepkimeleri mekanik olarak benzer olmasına rağmen DNA metiltransferazlar ile de kataliz edilebilir. Bununla birlikte bu tepkimeler metiltransferaz kofaktörü olan S-Adenozilmetiyonin yokluğunda da devam edebildiğinden bunların fizyolojik önemi net değildir²⁷.



Şekil 1. Sitozinin kademeli değişimi. Sitozin, DNA metil-transferaz (DNMT) tarafından metillenerek (b) on-onbir translokasyon (TET) enzimi tarafından oksitlenen 5-metilsitozin, (c) 5-hidroksimetilsitozin (d) 5-formilsitozin olarak, 5fC (e) 5-karboksilsitozine oksitlenmektedir²⁷.

α -Ketoglutarat bağımlı dioksijenazlarla hidroksilasyon

Nükleobaz demetilasyonundaki hidroksilasyon tepkimeleri kosubstrat olarak moleküler oksijen ve α -ketoglutarat gerektiren dioksijenazlar tarafından kataliz edilir. Tepkimeler; hidroksimetile edilmiş nükleobaz, süksinat ve CO₂'den oluşmaktadır. Kabul edilen bu mekanizmaya göre; Fe (IV)=O ve Fe (III)-OH anahtar ara ürünlerin birikimine ve en son Fe (II) oluşumuna yol açmaktadır. Genel olarak tepkime moleküler oksijenden bir oksijen atomunu α -ketoglutarat dekarboksilasyon ürünü olan süksinattan süksinatsemialdehite, diğer oksijen atomunu ise metillenmiş nükleobazın bir C-H bağına ekler. Son hidroksilasyon herhangi bir karbon yer değişimini içermez. Bu nedenle tepkime, metil gruplarının önceki oksidasyon aşamalarından oluşan oksidasyon ürünlerinin en azından geçici olarak stabil kalması için yaklaşık 3 kez (her bir C-H bağı için 1 kez olmak üzere) gerçekleştirilebilir²⁸.

ALKBH ve TET dioksijenazlarla hidroksilasyonun temelinde;

1. Fe (IV)=O oluşumu. Bu adım kosubstrat olan oksijen ve α -ketoglutaratın aktif bölgeye bağlanmasıyla başlar. Katalitik demirin oksidasyonu, alfa-keto grubunun karbonil grubuna nükleofilik saldırı için elektron sağlamaktadır. Heterolitik O-O köprü parçalanması ile eşleşmiş dekarboksilasyon, tepkime ortak ürünü olan süksinatu ve aktif bölgede oldukça reaktif olan Fe (IV)=O türünü oluşturur.
2. Fe (III)-OH oluşumu. Bu adımda oldukça reaktif Fe (IV)=O türleri, nükleobazın metil grubundan bir hidrojen atomunun ayrılmasıyla bir Fe (III)-OH ara ürününe dönüşür ve geride bir nükleobaz radikalı kalır.
3. Fe (II) oluşumu. Bu üçüncü aşamada, metillenmiş nükleobaz, Fe (III)-OH 'den hidroksil grubunu ayırarak kendisini hidroksile hale getirir ve demiri Fe (II) dinlenme durumuna döndürür²⁹.

α -Ketoglutarat bağımlı ALKBH ve TET dioksijenazlar

Nükleobazlar üzerinde etkili olan α -ketoglutarat bağımlı dioksijenazlar, ALKBH ve TET aile üyelerine aittir. Bu 2 protein ailesi homolog domainlere sahiptir.

ALKBH ailesi (α -ketoglutarat bağımlı hidroksilazlar)

AlkB homologları (ALKBH); ssDNA, dsDNA, mRNA, tRNA ve proteinler dahil olmak üzere farklı substratlar üzerinde demetilasyonu katalize etmek için Fe⁺² ve α -ketoglutarata bağımlı olan bir spesifik

demetilaz ailesidir. 9 homolog üyeden meydana gelmektedir. Bu aile üyelerinin en önemli özelliği geniş spektrumlu substrat seçiciliğidir³⁰.

TET (on-on bir translokasyon dioksijenaz ailesi)

TET proteinleri, Cys açısından zengin bir bölge ve C-terminalinde çift sarmallı bir heliks (DSBH) içerir. TET proteinlerinin substratlarını hidrosile edebilmesi için ALKBH enzimlerinde olduğu gibi Fe (II) ve α -ketoglutarat gibi kofaktörler gerekmektedir. Hem TET1 hem de TET3 proteinleri ALKBH'dan farklı olarak DNA'nın metilasyon durumunu ayırt edebilen N-terminalinde bir CXXC çinko bağlama alanı içerir³⁰⁻³¹.

Hem ALKBH hem de TET proteinleri için kristal yapı araştırmaları mevcuttur. Her ikisi de katalitik domainleri çok benzer aktif merkez kalıntılarına sahiptir. Bu bölgede HxD, Hxs ve Rx5a olarak adlandırılmış çeşitli karakteristik motifler tanımlanmıştır. HxD ve Hxs motiflerinin Histidinleri ve Aspartat¹, katalitik demir katyonunun koordinasyonunda doğrudan rol oynar. Rx5a motifinin Arjinini, α -ketoglutarat'ın 5-karboksilat grubu ile tuz köprüsü oluşturmaktadır. ALKBH proteinindeki Rx5a motifi uzatılarak bu motifteki 2.arjininin, α -ketoglutarat'ın 1-karboksilat grubu ile tuz köprüsü oluşturması sağlanır. Bu 2.arjinin TET proteinlerinde görülmez. TET proteinleri bunun yerine tuz köprüsü oluşturmak için dizinin daha yukarıdaki bir arjinin kalıntısını kullanır. Katalitik domaindeki benzerliklere rağmen ALKBH ve TET proteinleri metillenmiş (ya da alkilenmiş) bir substrat bazı için oldukça farklı ceplere sahiptir. Ayrıca substrat 2'deoksi nükleotidin glikozidik bağının konfigürasyonları da farklıdır. ALKBH substratları olan pürin ve pirimidin bazlarını en uygun anti konformasyonda glikozidik bağ ile bağlarken, kristalize TET2 proteinleri substrat bazına daha az uygun olan syn konformasyona zorlamaktadır. Bu farklılıklar muhtemelen bu enzimlerin farklı substrat tercihlerinin nedenidir²⁸.

ALKBH Proteinlerinin Biyolojik Roller ve Biyokimyasal Aktiviteleri

ALKBH benzeri proteinler çoğu öbakteri ve ökaryotlarda bulunmaktadır. Kosubstrat moleküler oksijen olduğundan dolayı anaeroblarda doğal olarak bulunmazlar. ALKBH benzeri proteinlerin aynı zamanda arkeabakteriyel türlerde de bulunmadığı gösterilmiştir. Bakteriyel aile üyeleri için prototip olan *E.coli* AlkB proteini, DNA ve RNA'daki nükleobazların N-metil grupları üzerinde çok geniş aktiviteye sahiptir. İnsanda 9 tane ALKBH proteini mevcuttur³².

ALKBH1: Substrat özgüllüğü açısından oldukça karmaşıktır. Histon 2A'nın demetilazı olmasının yanı sıra metil1Adenozin-tRNA demetilazı olarak da hareket ederek translasyonu etkiler ve tRNA'ların antikodon ilmeğindeki 5-metilsitozini 5-formilsitozine oksitleyerek kodon-antikodon eşleşmesine yol açar³³.

ALKBH2: Özel bir DNA hata onarım enzimidir. Replizomda lokalize olur. enN⁺ / enN metile edilmiş nükleobazları ve çift sarmal DNA'daki büyük alkilasyon lezyonlarını onarır³⁴.

ALKBH3: ALKBH2'den daha dar bir substrat özgüllüğüne sahip olup tek sarmal DNA'daki hasarlı nükleotitleri onarır. Aynı zamanda kimyasal olarak inaktive edilmiş mRNA ve tRNA'yı yeniden aktifleştirerek protein sentezini ve kanser progresyonunu uyarır³⁵.

ALKBH4: Aktin metilasyonundan sorumludur. Bu protein çekirdekte olduğundan transkripsiyon ve kromatinle ilgili proteinlerle kolokelize olup muhtemelen ek işlevlere de sahiptir. Dahası, ALKBH4 delesyonları defektif spermatogeneze yol açar ve erken embriyonik gelişim sırasında letaldir³⁶.

ALKBH5: mRNA'da m6A'yı demetile eder, böylece RNA metabolizması ve fertilitiyi etkilemektedir. Şaşırtıcı şekilde, FTO katalizli demetilasyonda görülen yarı stabil m6A ve f6A ara ürünleri, ALKBH5 katalizli tepkimelerde rapor edilmemiştir. Demetilasyon ara ürünlerinin hm6A oluşumunun potansiyel olarak kararsız ca6A'ya (6-karboksiladenozin) yol açan sonraki varsayımsal oksidasyon adımlarından çok daha yavaş olması veya ALKBH5 aktif bölgesinin hemiaminal parçalanmayı teşvik etmesi durumunda tespit edilmesi zor olabilir³⁷.

ALKBH6 ve ALKBH7: ALKBH proteinlerinden en az anlaşılanlarıdır. Korunmuş bir mitokondriyal lokalizasyon bölgesine sahiptir. Organel içinde dinamiktir³⁸.

ALKBH8: İşlevsel olarak bağlı metiltransferaz ve dioksijenaz domainlerine sahip olup diğer ALKBH proteinlerden farklıdır. Metiltransferaz domaini 5-metoksi karbonilmetilüridin biyogenezinin son metilasyon

adımı için, dioksijenaz domaini ise bazı tRNA'larda antikodon ilmeğinin wobble pozisyonunda 5-metoksikarbonil (hidroksil)metil üridin'e hidroksil grubunu eklenmesi görevini yapar³⁹.

ALKBH9 (FTO): Temel olarak yağ kütlesi ve obezite ile ilişkili olan ve en yoğun çalışan ALKBH üyesidir. Ana işlevi RNA'da m6A ve m6A_m (2'O-riboz metilasyonlu bir m6A varyantı)'nın demetilasyonudur⁴⁰.

ALKBH bir grup olarak DNA ve RNA'da N-metilasyonu tersine çevirir, RNA'daki C-metil gruplarını okside eder ve potansiyel olarak protein demetilaz olarak da işlev görür. Geniş aktivite spektrumlarına ve kanserdeki potansiyel rollerine rağmen ALKBH paraloglarının hiçbiri yüksek frekanslı bir Pan-kanser (çeşitli tümör tiplerinde bulunan ve hücrel, genomik çeşitliliğe neden olan) geni olarak adlandırılmaz⁴⁰.

TET Proteinlerinin Biyolojik Roller ve Biyokimyasal Aktiviteleri

TET benzeri proteinler hayvanlarda ve birçok ökaryotta bulunur, protist ve mantarlarda dikkate değer bir soy yayılımı vardır ancak bitkilerde yoktur. TET proteinleri başlangıçta insanlarda Akut Miyeloid lösemide çok sık görülen mutasyonları nedeniyle tanımlanmış olsa da aslında bu proteinleri ilgi odağı haline getiren, DNA demetilasyonunu teşvik etme potansiyellerinin tanımlanmasıdır⁴¹.

Omurgalılarıdaki homolog TET proteinleri, 5-metilsitozin'in hidroksilasyonunda analog işlev gerçekleştirir. Omurgasızlarda bu işlev farklılık gösterebilir. Memelilerdeki 3 TET paraloğunun tümü DNA'daki 5-metilsitozini; 5-hidroksimetilsitozin, 5-formilsitozin ve 5-karboksisisitozin'e oksitlemektedir. TET proteinleri pronükleer ve gastrulasyon aşamasında gelişimsel olarak önemli genler dahil olmak üzere onkogen, embriyogenez vb çeşitli biyolojik bağlarla ilgili genomik elementlerin demetilasyonuna ve gen transkripsiyonuna katkıda bulunur. Bu 3 oksidasyon ürünü de prensipte sadece kendilerine spesifik işlevleri uygulamasına rağmen TET enzimlerinin rolü sadece demetilasyonu teşvik etmekle sınırlı değildir. 5-hidroksimetilsitozin, DNA hasarına yanıtta yer almaktadır. Dendritik hücreler yüksek seviyelerde genomik 5-hidroksimetilsitozine sahiptir bu da demetilasyon için bir ara ürün olarak hareket etmenin yanı sıra farklı bir rol oynayabilir⁴².

Pan-kanser çalışmaları TET2 paraloğunu myeloid neoplazi ile ilişkili tipe özgü kanser-driver gen olarak tanımlamaktadır. Gerçekten de TET2 işlev kaybı mutasyonlarının insidansı hematopoietik malignitelerin tüm spektrumunda dikkate değer şekilde yüksektir. TET1 ve TET3'deki mutasyonlar hematopoietik malignitelerde daha az sıklıkla görülmektedir. Son zamanlarda TET3 defektinin insanlarda mental retardasyona neden olduğu böylece bir DNA demetilasyon geninin Mendel hastalığı ile ilişkilendirildiği görülmüştür⁴³.

Sonuç

Sonuç olarak, α -ketoglutarat bağımlı hidroksilasyon, nükleobaz C-metilasyonunun dolaylı tersine çevrilmesi ile bağlantılıdır. Nükleobaz metilasyonunun tersine çevrilmesi konusundaki anlayışımızdaki önemli ilerlemelere rağmen, hala bu konu hakkında cevaplanması gereken birçok soru var. Genel olarak 2-ketoasite bağımlı dioksijenazlar tarafından katalize edilen genişletilmiş reaksiyon repertuarı bir yol gösterici gibi görünse de daha fazla bu tür atipik reaksiyonların meydana gelmesi olası görünmektedir. Kanonik bir α -ketoglutarat bağlanma bölgesi olmayan ALKBH veya TET benzeri proteinler veya hala bilinmeyen biyokimyasal aktiviteleri ve fizyolojik rolleri olan ALKBH6 ve ALKBH7 oldukça ilgi çekicidir. FTO'nun substrat özgülüğü hakkındaki sürekli artan bilginin yansıttığı biyokimyasal çalışmaların sınırlaması göz önüne alındığında, diğer ALKBH ve TET enzimlerinin daha fazla incelenmesi, biyokimyasal işlevlerin tanımlanması için umut vermektedir.

Kaynaklar

1. Gürel Ç, Nursal AF, Yiğit S. Epigenetik ve kanser. Türkiye Klinikleri J Radiat Oncol-Special Topics 2016;2:45-51.
2. Kaellin WG, Mcknight S. Influence of metabolism on epigenetics and disease. Cell J. 2013;153:56-69.
3. Cheng Z, Zheng L, Almeida FA. Epigenetic reprogramming in metabolic disorders: nutritional factors and beyond. J Nutr Biochem. 2018;54:1-10.
4. İzmirli M, Tufan T, Alptekin D. DNA Metilasyonu. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. 2012;21:274-282.
5. Traube FR, Carell T. The chemistries and consequences of DNA and RNA methylation and demethylation. RNA Biol. 2017;14:1099-1107.

6. Shen L, Song CX, He C, Zhang Y. Mechanism and function of oxidative reversal of DNA and RNA methylation. *Annu Rev Biochem.* 2014;83:585-614.
7. Jabgunde AM, Jaziri F, Bande O, Froeyen M, Abramov M, Nguyen H et al. Methylated Nucleobases: Synthesis and evaluation for base pairing in vitro and in vivo. *Chemistry A European J.* 2018;24:12695-12707.
8. Moulay S. N-Methylation of Nitrogen-containing organic substrates: a comprehensive overview. *Current Organic Chemistry.* 2019;23:1695-1937.
9. Bencini A, Bianchi A, Giorgi C, Paoletti P, Valtancoli B, Fusi V et al. Effect of nitrogen methylation on cation and anion coordination by hexa- and heptaazamacrocycles. Catalytic properties of these ligands in ATP dephosphorylation. *Inorganic Chemistry.* 1996;35:1114-1120.
10. Swift LH, Golsteyn RM. Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *Int J Mol Sci.* 2014;15:3403-3431.
11. Auclair G, Weber M. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. *Biochimie.* 2012;94:2202-2211.
12. Rydberg B, Lindahl T. Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction. *EMBO J.* 1982;1:211-216.
13. Zhouab Y, Konge Y, Fanf W, Tao T, Xiaog Q, Li N et al. Principles of RNA methylation and their implications for biology and medicine. *Biomedicine & Pharmacotherapy J.* 2020;131:1-22.
14. Yan F, Fujimori DG. RNA methylation by Radical SAM enzymes RlmN and Cfr proceeds via methylene transfer and hydride shift. *PNAS J.* 2011;108:3930-3934.
15. Shen H, Lan Y, Zhao Y, Shi Y, Jin J, Xie W. The emerging roles of N6-methyladenosine RNA methylation in human cancers. *Biomarker Research.* 2020;24:8.
16. Golovina AY, Sergiev PV, Dontsova OA. Methods for modified nucleotide identification in ribosomal RNA. *Moscow University Chemistry Bulletin.* 2012;67:82-87.
17. Liu W, Anyszka MJ, Piecyk K, Dickson L, Wallace A, Niedzwiecka A et al. Structural basis for nematode eIF4E binding an m2,2,7G-Cap and its implications for translation initiation. *Nucleic Acids Res.* 2011;39:8820-8832.
18. Micura R, Pils W, Höbartner C, Grubmayr K, Ebert MO, Jaun B. Methylation of the nucleobases in RNA oligonucleotides mediates duplex-hairpin conversion. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:3997-4005.
19. Niu Y, Zhao X, Wu YS, Li MM, Wang XJ, Yang YG. N6-methyl-adenosine (m6A) in RNA: An Old Modification with A Novel Epigenetic Function. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics.* 2013;11:8-17.
20. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology J.* 2013;38:23-38.
21. Kumar S, Chinnusamy V, Mohapatra T. Epigenetics of modified DNA bases: 5-methylcytosine and beyond. *Front. Genet.* 2018;9:640.
22. Zou S, Toh JD, Wong KH, Gao YG, Hong W, Woon E. N6-Methyladenosine: a conformational marker that regulates the substrate specificity of human demethylases FTO and ALKBH5. *Scientific Reports.* doi.org/10.1038/srep25677.
23. Neri F, Rapelli S, Krepelova A, Incarnato D, Parlato C, Basile G et al. Intragenic DNA methylation prevents spurious transcription initiation. *Nature.* 2017;543:72-77.
24. Mitra S. MGMT: a personal perspective. *DNA Repair (Amst).* 2007;8:1064-1070.
25. Xiong J, Ye TT, Ma CJ, Cheng QY, Yuan BF, Feng YQ. N6-Hydroxymethyladenine: a hydroxylation derivative of N6-methyladenine in genomic DNA of mammals. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:1268-1277.
26. Settles S, Wang RW, Fronza G, Gold B. Effect of N3-methyladenine and an isosteric stable analogue on DNA polymerization. *Journal of Nucleic acids.* 2010. Article ID 426505.
27. Hahn MA, Szabó PE, Pfeifer GP. 5-Hydroxymethylcytosine: A stable or transient DNA modification? *Genomics.* 2014;104:314-323.
28. Hausinger RP. FeII/alpha-ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2004;39:21-68.
29. Guengerich FP. Introduction: Metals in Biology: α -ketoglutarate/iron-dependent dioxygenases. *Journal of Biological Chemistry.* 2015;290:20700-20701.
30. Xu B, Liu D, Wang Z, Tian R, Zuo Y. Multi-substrate selectivity based on key loops and non-homologous domains: new insight into ALKBH family. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2021;78:129-141.
31. Rasmussen KD, Helin K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Dev.* 2016;30:733-750.
32. Ougland R, Rognes T, Klungland A, Larsen E. Non-homologous functions of the AlkB homologs. *J Mol Cell Biol.* 2015;7:494-504.
33. Liu F, Clark W, Luo G, Wang X, Fu Y, Wei J et al. ALKBH1-Mediated tRNA Demethylation Regulates Translation. *Cell.* 2016;167:816-828.
34. Wilson DL, Beharry AA, Srivastava A, O'Connor TR, Kool ET. Fluorescence Probes for ALKBH2 Allow the Measurement of DNA Alkylation Repair and Drug Resistance Responses. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2018;57:12896-12900.
35. Bian K, Lenz SAP, Tang Q, Chen F, Qi R, Jost M et al. DNA repair enzymes ALKBH2, ALKBH3, and AlkB oxidize 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine in vitro. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:5522-5529.
36. Nilsen A, Fusser M, Greggains G, Fedorcsak P, Klungland A. ALKBH4 depletion in mice leads to spermatogenic defects. *PLoS One.* 2014;25:8-9.
37. Shen C, Sheng Y, Zhu AC, Robinson S, Jiang X, Dong L et al. RNA Demethylase ALKBH5 Selectively Promotes Tumorigenesis and Cancer Stem Cell Self-Renewal in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Stem Cell.* 2020;27:64-80.

38. Kulkarni CA, Nadtochiy SM, Kennedy L, Zhang J, Chhim S, Alwaseem H et al. ALKBH7 mediates necrosis via rewiring of glyoxal metabolism. *Elife*. 2020;14:9:e58573.
39. Ohshio I, Kawakami R, Tsukada Y, Nakajima K, Kitae K, Shimano T et al. ALKBH8 promotes bladder cancer growth and progression through regulating the expression of survivin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;47:413-418.
40. Zhao X, Yang Y, Sun BF, Zhao YL, Yang YG. FTO and obesity: mechanisms of association. *Curr Diab Rep*. 2014;14:486.
41. Yang J, Bashkenova N, Zang R, Huang X, Wang J. The roles of TET family proteins in development and stem cells. *Development*. 2020. doi: 10.1242/dev.183129.
42. Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*. 2011;333:1300-3.
43. Lee CJ, Ahn H, Jeong D, Pak M, Moon JH, Kim S. Impact of mutations in DNA methylation modification genes on genome-wide methylation landscapes and downstream gene activations in pan-cancer. *BMC Med Genomics*. 2020;13:27.

Correspondence Address / Yazışma Adresi

Kezban Kartlaşmış
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Adana, Türkiye
e-mail: kzbn.krtlsms@gmail.com

Geliş tarihi/ Received: 30.03.2021**Kabul tarihi/ Accepted:** 17.06.2021