

KAMILA PAWLICKA, PATRICK PERRIGUE, JAN BARCISZEWSKI*

Epigenetyczna kontrola procesów komórkowych

Wprowadzenie

Dlaczego w organizmach wielokomórkowych, mimo że komórki posiadają ten sam genom, możliwe jest wytworzenie zarówno tkanki kostnej, nerwowej czy mięśniowej? Jest to niewątpliwie wynikiem regulacji ekspresji genów, które prowadzą do powstania ponad 200 typów komórek. Podczas rozwoju embrionalnego następuje zróżnicowanie poszczególnych komórek do odpowiedniej roli tak, by w efekcie stworzyć w pełni funkcjonalny organizm. Conrad Waddington w 1939 roku jako pierwszy użył określenia „epigenetyczny” dla przekształcenia komórek embrionalnych w zupełnie odmienne tkanki, chociaż posiadają identyczny materiał genetyczny. Termin *epigenetyka* stanowi połączenie: łacińskiego *epi* – *poza* oraz *genetyka*.

W 1971 roku Roumen Tsanev, badając rolę chromatyny w różnicowaniu komórek, zaproponował mechanizm przekazywania informacji epigenetycznej opartej na kodzie histonowym, podkreślając zmiany w strukturze chromatyny jako nieodzowny element powiązany ze zmianami na poziomie ekspresji genów oraz regulacją wielu procesów komórkowych. Kod histonowy w połączeniu z białkami związanymi z chromatyną determinuje wzór ekspresji genów w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne (Nonchev, 2009).

Pierwsza definicja epigenetyki dotyczyła dziedziczonych podczas podziałów komórkowych zmian w aktywności genów bez zmiany sekwencji DNA i odnosiła się głównie do komórek zarodkowych. Obecnie wiadomo, że zmiany epigenetyczne mogą być indukowane przez czynniki środowiskowe na każdym etapie rozwoju oraz są odwracalne. W 2007 roku Brenda Weis zaproponowała poszerzenie rozumienia epigenetyki o zmiany, które nie są przekazywane następnemu pokoleniu.

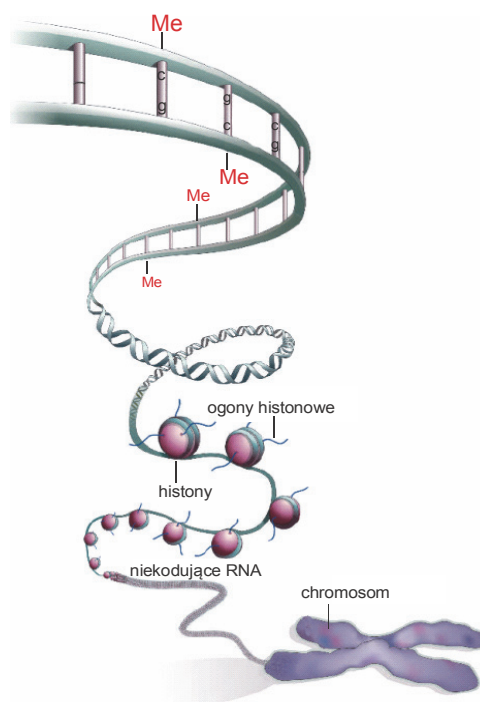
Epigenetyka to stosunkowa nowa gałąź nauki, mimo to stała się jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin badań biologicznych. Na przełomie 2015 i 2016 roku agencja rządowa NASA rozpoczęła badania braci Scotta i Marka Kelly, którzy są bliźniętami jednojajowymi, a więc pod względem genetycznym są identyczni. Scott Kelly przez 342 dni przebywał na Międzynarodowej Stacji Kosmicznej (ISS). Mark pozostał na Ziemi. Obaj są astronautami, mają podobne nawyki i dietę. W 2017 roku pokazano wstępne wyniki analizy wpływu długotrwałego pobytu w kosmosie na organizm ludzki, które ujawniły różnice w poziomie ekspresji wielu genów, co wskazuje na dostosowanie ludz-

* Mgr Kamila Pawlicka (Pawlicka_Kamila@wp.pl), dr Patrick Perrigue (Patrick.Perrigue@ibch.poznan.pl), prof. dr hab. Jan Barciszewski (Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl) – Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań

kiego organizmu do pobytu w kosmosie, a tym samym potwierdza wpływ zmian epigenetycznych.

Regulacja ekspresji genów

Modyfikacje epigenetyczne wpływają na ekspresję genów bez konieczności zmiany ich sekwencji nukleotydowej. Kontrolują ekspresję genów, różnicowanie i rozwój komórek, a wyrazem tych modyfikacji są indywidualne różnice międzysobnicze dotyczące nawet par bliźniąt jednojajowych. Mogą one prowadzić do wyciszenia genów odpowiedzialnych za kontrolę cyklu komórkowego, apoptozę czy naprawę DNA. Proces ten zachodzi na skutek modyfikacji DNA, która zmienia dostępność i oddziaływanie genów z czynnikami transkrypcyjnymi (ryc. 1).



Ryc. 1. Elementy składowe epigenomu. Epigenetyczna kontrola ekspresji genów zachodzi głównie poprzez przyłączenie grupy metylowej do DNA, modyfikację białek histonowych oraz interferencję informacyjnego RNA

Epigenetyczna kontrola ekspresji genów może być związana m.in. z:

- metylacją ($-\text{CH}_3$) cytozyny (m^5C) w DNA, która zachodzi zazwyczaj w sekwencjach bogatych w dinukleozyd cytydyna–fosforan–guanozyna, często nazywanych wyspami CpG,

- modyfikacją białek histonowych, głównie acetylacją, metylacją lizyny i argininy histonu
- rodzicielskim piętnem genomowym,
- oddziaływaniem białek Polycomb i Trithorax,
- potranskrypcyjną regulacją informacyjnego RNA (mRNA) poprzez interferencję RNA (RNAi) (Chen, 2014).

W przeciwieństwie do zmian na poziomie genetycznym modyfikacje epigenetyczne są z reguły odwracalne, dlatego stanowią one potencjalny cel działania farmakoterapii.

Metylacja DNA

Najlepiej poznanym zjawiskiem epigenetycznym jest metylacja DNA, która polega na kowalencyjnym wiązaniu grupy metylowej ($-CH_3$) do cytozyny w pozycji 5. Miejsca metylacji nie są przypadkowe, modyfikacji ulegają nukleotydy wchodzące głównie w skład sekwencji CpG (dinukleozyd cytydyna-fosforan-guanozyna) (Tuorto, 2015). W ludzkim DNA regiony bogate w cytozynę i guaninę mogą być rozproszone po całym genomie lub skoncentrowane w krótkich regionach zwanych wyspami CpG (CGI, CpG *island*). Około 60% wszystkich promotorów genów jest bogata w CGI, co umożliwia kontrolę ich aktywności (Tuorto i wsp., 2015). Wyspy CpG leżące w regionach promotorowych prawidłowych komórek są na ogół niezmetylowane, umożliwiając ekspresję genów zaangażowanych w podstawowy metabolizm komórki (ang. *housekeeping genes*) oraz funkcje tkankowo-specyficzne. Z kolei CpG znajdujące się poza promotorami i poza wyspami CpG są zmetylowane, zapewniając tym samym integralność genomu, zapobiegając ekspresji sekwencji powtórzonych, pasożytniczych oraz retrotranspozonów (Tuorto, 2015).

Każda komórka eukariotyczna posiada swoisty wzór metylacji, który przekazywany jest komórkom potomnym. Jego zachowanie polega na przyłączeniu grup $-CH_3$ do cytozyny w nowosyntetyzowanej nici w miejscach komplementarnych do miejsc metylowanych w nici rodzicielskiej. Donorem grupy metylowej jest S-adenozylometionina (SAM), a głównym produktem tej reakcji jest 5-metylocytozyna, a uwolniona zostaje S-adenozylhomocysteina (SAH). Proces katalizowany jest przez rodzinę metylotransferaz DNA (ang. *DNA methyltransferase*, DNMT) (Łuczak, 2006), do której należą: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b, DNMT3L.

DNMT1 wykazuje duże powinowactwo do hemimetylowanego DNA (DNA tylko z jedną nicią metylowaną), dlatego też odpowiada za przekazanie stałego profilu metylacji podczas replikacji (metylację zachowawczą) (Łuczak, 2006). Rolą DNMT3a i 3b jest metylacja *de novo*. Ich aktywność jest niezwykle istotna w procesie embriogenezy i różnicowania komórek organizmu, kiedy to ustala się wzór metylacji. Wykazano, że zablokowanie ekspresji zarówno DNMT3b, jak i DNMT1 u myszy jest letalne dla płodu

(Okano, 1999). DNMT3L nie ma właściwości metylotransferazy. Wykazuje jednak aktywność wiązania niezmetylowanej lizyny 4 histonu H3 oraz indukcji DNMT3a i 3b (Jia, 2007).

Z kolei funkcja DNMT2 nie została dokładnie poznana, ale dotychczasowe badania wskazują, że jest to metylaza tRNA. Wykazano, że u myszy z wyciszonym genem (knock-out) DNMT2 enzym ten wpływa w znaczący sposób na proces hematopoezy. Brak aktywności metylotransferazy DNMT2 skutkowało opóźnionym kostnieniem chrząstki oraz redukcją populacji komórek macierzystych krwiotwórczych i progenitorowych (Tuorto, 2015).

Metylacja cytozyny w sekwencjach CpG wpływa na wyciszenie genów i jest jednocześnie powiązana z obniżeniem acetylacji histonów (Gigek, 2016). W procesie tym pośredniczą białka MBP (ang. *methyl-CpG binding proteins*, MBP), które przyłączają się preferencyjnie do metylowanych cytozyn, a także do kompleksu składającego się z deacetylaz histonowych (ang. *histone deacetylase*, HDAC) oraz zależnych od ATP białek remodelujących chromatynę. W efekcie dochodzi do deacetylacji histonów i powstania zwartej struktury chromatyny ograniczającej transkrypcję (heterochromatyny). Proces ten powiązany jest z białkami z rodziny Polycomb, np. EZH2, które mogą oddziaływać z DNMT (Gigek, 2016).

Pokazano, że metylacja DNA odgrywa istotną rolę w tworzeniu struktury heterochromatyny w regionach okołocentromerowych, wyciszeniu genów u samic na jednym z chromosomów X oraz regulacji genów podlegających imprintingowi (Rose, 2014).

Demetylacja DNA

Utrzymywanie specyficznego poziomu metylacji jest nie tylko wynikiem przyłączania grup metylowych do cytozyn, ale również demetylacji DNA. Wykazano, że proces ten odgrywa istotną rolę podczas rozwoju zarodkowego, różnicowania komórkowego, czy hematopoezy (Wu, 2011). Można wyróżnić demetylację pasywną oraz aktywną. Obniżenie aktywności metylotransferaz powoduje, że wzór metylacji nie zostanie powielony przy kolejnym podziale komórkowym, co oznacza demetylację pasywną. Choć zjawisko aktywnej demetylacji nadal nie zostało dokładnie poznane, to uważa się, że w proces ten zaangażowane są trzy grupy enzymów. Pierwszą z nich są białka z rodziny TET (ang. *ten-eleven translocation protein*) katalizujące utlenienie 5-metylocytozyny (5mC) do 5-hydroksymetylocytozyny (5hmC), która następnie może być przekształcona do 5-formylocytozyny (5fC) i 5-karboksylocytozyny (5caC). Przekształcenie 5-metylocytozyny do 5-hydroksymetylocytozyny przez enzymy TET umożliwia utrzymanie wysp CpG w stanie aktywnym (Wu, 2011).

Inną grupą białek biorącą udział w aktywnej demetylacji są deaminazy AID/APOBEC, których najintensywniej badanym przedstawicielem jest deaminaza cytydyny

indukowana aktywacją limfocytów B (ang. *activation-induced cytidine deaminase*, AID). Enzym ten wykazuje aktywność deaminacji 5mC (lub 5hmC) do tyminy lub 5-hydroksyuracylu (5hmU), który może tworzyć parę z guanozyną, wprowadzając tym samym mutację w łańcuchu DNA (Gong, 2011).

Z kolei glikozylaza TDG (ang. *thymine DNA glycosylase*), która uczestniczy w ścieżce naprawy DNA poprzez wycinanie zasad (ang. *base-excision repair*, BER), usuwa 5fC, 5caC i 5hmU oraz zastępuje je niezmetylowaną cytozyną (Nabel, 2012). Powyższy mechanizm wskazuje, że w procesie aktywnej demetylacji istotną rolę odgrywają oksydacja i deaminacja.

Początkowo uważano, że ekspresja enzymów biorących udział w aktywnej demetylacji następuje jedynie w liniach zarodkowych i w okresie wczesnego rozwoju organizmu. Jednak ich aktywność w późniejszych etapach życia dowodzi, że zjawisko to ma charakter ciągły i dla utrzymania odpowiedniego jej poziomu konieczne jest działanie metylotransferaz DNA (Jeltsch, 2014).

Modyfikacje białek histonowych

W komórkach eukariotycznych ekspresja większości genów regulowana jest poprzez zmianę organizacji chromatyny, której podstawową jednostką strukturalną jest nukleosom. Rdzeń nukleosomu składa się z 8 cząsteczek białek histonowych (zawierających zasadowe aminokwasy – głównie argininę i lizynę), na które nawinięta zostaje nić DNA o długości około 147 par zasad. Jest ona stabilizowana przez histon H1, tworząc chromosom. Pomędzy kolejnymi chromosomami występuje odcinek DNA łącznikowego o zmiennej długości (Kim, 2014).

Białka histonowe tworzą zachowawczą globularną domenę, która umożliwia oddziaływanie między histonami w obrębie oktameru. Dodatkowo dwa peptydy (ogony) wystające z globularnej domeny: koniec aminowy (N), bogaty w aminokwasy zasadowe, zwany ogonem histonu i będący często obiektem modyfikacji potranslacyjnych oraz krótszy koniec karboksylowy (C), stanowiąc zawinięcie histonu (Kim, 2014)

Modyfikacje potranslacyjne białek histonowych wpływają na zmianę struktury chromatyny, w wyniku czego następuje jej rozluźnienie oraz transkrypcja genów lub przeciwnie, skondensowanie i tym samym zahamowanie ekspresji (Zoom, 2014). W nieaktywnej transkrypcyjnie chromatynie zasadowe białka histonowe są silnie związane z ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi cząsteczki DNA (Sawan, 2008). W ten sposób skondensowana chromatyna utrudnia dostęp czynnikom transkrypcyjnym oraz polimerazom DNA i RNA, a tym samym ogranicza jej aktywność transkrypcyjną. Z kolei zmiana stopnia upakowania chromatyny ułatwia przyłączenie się kompleksów transkrypcyjnych, umożliwiając ekspresję genów (Zoom, 2014).

W połowie lat 90. XX w. zauważono, że modyfikacja struktury chromatyny determinowana jest również przez acetylację i deacetylację histonów (Imhof, 1997). Najczęst-

szym miejscem ulegającym tej modyfikacji jest ogon histonowy (przy końcu aminokwasowym), rzadziej odnotowuje się zmiany w domenie globularnej (Zoom, 2014).

Znane są inne modyfikacje ogona histonowego. Obecnie do najlepiej poznanych należą acetylacja i metylacja białek histonowych. Enzymami modyfikującymi chromatynę są acetylotransferazy histonowe (ang. *histone acetyltransferases*), deacetylazy histonowe (ang. *histone deacetylases*), metylotransferazy histonowe (*histone methyltransferases*) oraz demetylazy (*histone demethylases*) (Kim, 2014).

Acetylacja reszt lizyny przy końcu aminowym histonu obniża dodatni ładunek tego aminokwasu, co powoduje rozluźnienie wiązania DNA–histon i umożliwia przyłączenie czynników transkrypcyjnych do wybranych sekwencji DNA, powodując relaksację struktury chromatyny (Kim, 2014). Donorem grup acetylowych dla HAT jest acetylo-CoA. Deacetylaza histonów katalizuje proces odwrotny. Acetylazy i deacetylazy utrzymują homeostazę organizmu przez stymulowanie wzrostu komórek, różnicowanie miotubul, proliferację adipocytów czy regulację kurczliwości miofilamentów (Seto, 2014).

Metylacja lizyny jest intensywnie badaną modyfikacją histonów. Jej wpływ na ekspresję genów zależy od ilości przyłączonych grup metylowych (mono-, di- lub trimetylacja) (Sharma, 2010). Trimetylacja lizyny 4 histonu 3 (H3K4me3) często obserwowana jest w regionach startu transkrypcji i wiąże się z aktywacją tego procesu. Z kolei trimetylacja lizyny 27 histonu 3 (H3K27me3) powoduje zahamowanie ekspresji genu (Kim, 2014). Zmetylowane reszty są miejscem wiązania różnych białek odpowiadających za utrzymanie nieaktywnego stanu chromatyny–heterochromatyny, między innymi HP1 (ang. *heterochromatin protein 1*) czy ING (ang. *inhibitor of growth family*), które są białkami supresorowymi (Kim, 2014). Oddziaływania między modyfikacjami histonów a metylacją DNA warunkują utrzymanie prawidłowego statusu upakowania chromatyny oraz jej dostępność dla czynników transkrypcyjnych (Rose, 2014). Przykładem może być zjawisko imprintingu, które polega na ekspresji tylko jednego z alleli danego genu, pochodzącego od matki bądź ojca. Przypuszcza się, że podczas rozwoju embrionalnego przejściowa ekspresja genów ojcowskich, w której uczestniczy H3K27me3 pochodzący od matki, może prowadzić do ustalenia wzoru metylacji na jednym z alleli genów (Hanna, 2017).

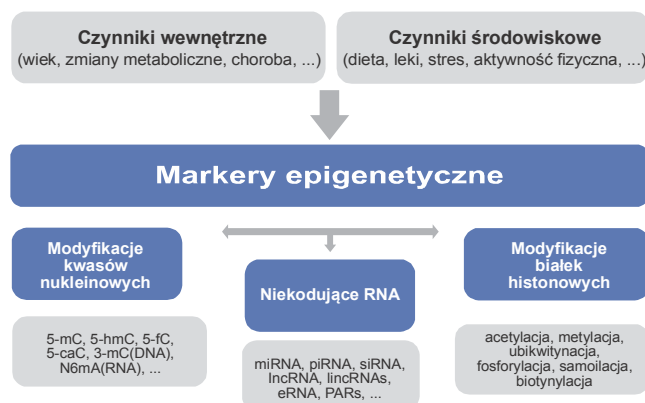
Zmiany we wzorze modyfikacji histonowych mają wpływ na naprawę DNA, replikację i transkrypcję genów, mogą prowadzić do procesu kancerogenezy (Esteller, 2007). Dlatego redukcja aktywności deacetylazy histonów (HDAC) jest jedną ze strategii terapeutycznych, a kilka inhibitorów jest obecnie w fazie badań klinicznych.

Interferencja RNA

Niekodujące białek cząsteczki RNA (ang. *protein non-coding RNA*, ncRNA) są to transkrypty, które nie stanowią matrycy dla syntezy łańcucha polipeptydowego. W prze-

ciwieństwie do wcześniej wymienionych mechanizmów epigenetycznych, ncRNA reguluje ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym. Dotychczas zidentyfikowano kilkanaście rodzajów niekodujących RNA, w tym mikroRNA (miRNA), małe interferencyjne RNA (siRNA, ang. *small interfering RNA*), piRNA (ang. *Piwi-interacting RNA*), PAR (ang. *promoter-associated RNA*), oraz snoRNA (ang. *small nucleolar RNA*) (Rolle, 2016).

Ze względu na wielkość wyróżniono trzy główne klasy ncRNA: małe niekodujące RNA (ang. *small ncRNA*) o długości mniejszej niż 200 nt; klasę długich ncRNA, które mają więcej niż 200 nt i stanowią transkrypty rejonów wewnątrzgenowych oraz bardzo długich niekodujących cząsteczek (ang. *very long ncRNA*) o wielkości nawet setek tysięcy zasad, które zaangażowane są w regulację sekwencji międzygenowych (Mitra, 2012).



Ryc. 2. Epigenetyczna regulacja ekspresji genów. Zarówno czynniki wewnętrzne, jak i środowiskowe wpływają na regulację epigenomu. Do markerów epigenetycznych należą: modyfikacje kwasów nukleinowych, niekodujące RNA oraz modyfikacje białek histonowych

MiRNA są to krótkie (18–20 nukleotydów), jednoniciowe ncRNA, które wykazują zdolność do wiązania informacyjnego RNA w rejonie końca 3' nieulegającego transkrypcji oraz jego degradacji przy pomocy kompleksu RISC (ang. *RNA-induced silencing complex* – indukowany przez RNA kompleks wyciszający), prowadząc do zahamowania translacji (Piwecka, 2015). MiRNA regulują cykl komórkowy, różnicowanie, proliferację, apoptozę oraz wiele innych istotnych procesów biologicznych. Niektóre z tych niekodujących cząsteczek RNA wiąże się również z radio- i chemioopornością komórek guza, a tym samym z odpowiedzią chorego na terapię (Magee, 2015). W zależności od poziomu ich ekspresji miRNA mogą spełniać funkcję supresorów lub onkogenów w procesie kancerogenezy. Dlatego możemy je podzielić na: oncomiRs (zaangażowane w etap promocji nowotworu), supresorowe miRNAs oraz metastamiRs (biorące udział w przerzutowaniu) (Rolle, 2015).

Natomiast siRNA (21-22 nukleotydów) są to dwuniciowe niekodujące białek transkrypty biorące udział w wyciszeniu elementów transpozycyjnych oraz obronie przeciw-wirusowej (Jeang, 2012).

LncRNA są to długie (powyżej 200 nukleotydów) cząsteczki niekodującego białka RNA, które zaburzają transkrypcję genów przez wiązanie do mRNA oraz zmianę struktury chromatyny. Ponadto cząsteczki te zdolne są do hamowania ekspresji przez wiązanie z czynnikami translacyjnymi oraz rybosomami (Long, 2017). Ekspresja lncRNA zmienia się w odpowiedzi na stres oraz inne sygnały środowiskowe (Mitra., 2012). LncRNA biorą również udział w regulacji transportu międzykomórkowego, dojrzewaniu RNA oraz formowaniu kompleksów rybonukleoproteinowych (Mitra, 2012).

Epigenetyczne podłoże chorób

Regulacja epigenetyczna jest niezbędna do rozwoju i utrzymania tkankowo-specyficznej ekspresji genów. Zaburzenia tego procesu mogą prowadzić do aktywacji lub wyciszenia genów, przyczyniając się do rozwoju wielu chorób (ryc. 3). Postępujących jest wiele badań wskazujących, że część chorób dziedzicznych lub skłonności do zapałania na niektóre schorzenia może mieć podłoże epigenetyczne (Rorbach-Dolata, 2017).

Niektóre z chorób psychicznych mogą mieć również podłoże w zmianach epigenetycznych. Pośmiertna analiza tkanki mózgowej pacjentów ze schizofrenią i chorobą afektywną dwubiegunową wykazała różnice w poziomie zewnątrzkomórkowego białka reliny związanego z plastycznością synaptyczną. Wykazano, że u pacjentów ze schizofrenią na skutek hipermetylacji promotora genu kodującego relinę poziom ekspresji jest znacząco niższy niż u grupy kontrolnej. Natomiast w przypadku genu COMT, kodującego enzym degradujący katecholaminy, zaobserwowano hipometylację promotora, co powoduje, że enzym jest bardziej aktywny w płacie czołowym zarówno u pacjentów ze schizofrenią, jak i z chorobą afektywną dwubiegunową (Grayson, 2005).



Ryc. 3. Wpływ mechanizmów epigenetycznych na regulację procesów komórkowych

Zauważono, że długotrwały stres wpływa na zmiany w obrębie epigenomu, co widoczne jest już podczas rozwoju embrionalnego człowieka. W prawidłowych warunkach

plód chroniony jest przed zwiększeniem poziomu glikokortykosteroidów (hormonów stresu) matki dzięki aktywności dehydrogenazy 11- β -hydrosteroidowej (11 β -HSD1), która przekształca tę grupę hormonów do formy nieaktywnej. Jednakże istnieją dowody sugerujące, że długotrwały stres kobiety ciężarnej powoduje hipermetylację genu 11 β -HSD1 w łożysku oraz hipometylację w podwzgórzu płodu, co prowadzi do zwiększonej odpowiedzi na stres u potomstwa (Jensen, 2012).

Wykazano również, że czynniki epigenetyczne odpowiadają za mechanizmy związane z uzależnieniem od leków (Renthal, 2008). Uważa się, że zmiany w ekspresji genów w ośrodku przyjemności w mózgu najprawdopodobniej mają wpływ na patogenezę i trwałość uzależnienia od niektórych substancji chemicznych. W modelu zwierzęcym pokazano, że nadużywanie leków w powiązaniu z czynnikami środowiskowymi (jak na przykład stres) przekłada się na zmiany w poziomach ekspresji niektórych genów w neuronach (Robison, 2011).

Zauważono, że dieta może odgrywać rolę w prawidłowej regulacji ekspresji genów. Wykazano również, że wybory dietetyczne rodziców mają wpływ na zdrowie potomstwa i prawdopodobieństwo wystąpienia choroby metabolicznej. Klasycznym przykładem jest wielki głód w Holandii podczas drugiej wojny światowej. Głodujące matki rodziły wtedy dzieci o obniżonej tolerancji na glukozę i znacząco bardziej skłonne do otyłości i innych zaburzeń metabolizmu. Zauważono także, że cecha ta przekazywana jest w linii męskiej, jednak nie jest do końca jasne, jaki mechanizm epigenetyczny stoi za modyfikacją materiału genetycznego plemników (Hardy, 2011).

Epigenetyka stanowi podłoże do różnicowania komórek do poszczególnych linii komórkowych oraz utrzymania puli komórek macierzystych. Odgrywa kluczową rolę w starzeniu czy inicjacji procesu nowotworowego.

Modyfikacje epigenetyczne a nowotwory

Istnieje wiele dowodów, że obok czynników genetycznych znaczącą rolę w inicjacji i progresji nowotworów odgrywają zjawiska epigenetyczne (Yang, 2017). W trakcie inicjacji procesu nowotworowego epigenotyp komórki ulega zmianie (ryc. 3), co może być wynikiem między innymi: globalnej hipometylacji, hipermetylacji wysp CpG czy niestabilności chromosomalnej (Yang, 2017). Modyfikacje te mogą być zarówno skutkiem, jak i efektem toczącego się procesu nowotworowego. Fakt, że zachodzą one na różnych etapach kancerogenezy, wskazuje na potencjalne wykorzystanie ich jako celu oddziaływania zarówno czynników chemoprewencyjnych, jak i chemioterapeutyków (Jones, 2016).

Zmiana poziomu metylacji DNA była pierwszą epigenetyczną modyfikacją zaobserwowaną w tkankach nowotworowych (Feinberg, 1983). Zaburzona metylacja CGI powoduje zmiany cyklu komórkowego, apoptozy czy naprawy DNA. Zrodziły się więc przypuszczenia, że głównie metylacja DNA jest odpowiedzialna za regulację aktywności

genów, prowadząc do rozpoczęcia kancerogenezy. Hipermetylacja w komórkach nowotworowych dotyczy przede wszystkim regionów promotorowych genów supresorowych, co wiąże się z wyciszeniem ich ekspresji. W wielu typach nowotworów podwyższenie poziomu metylacji najczęściej zaobserwowano na chromosomie 3p, 11p i 17p (Łuczak, 2006). Zauważono, że hipermetylację DNA w locus DIRAS3 genu supresorowego ARHI można powiązać ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia raka jajnika, sutka i raka pęcherzykowego tarczycy (Lu, 2013). Z kolei zmiana ta pojawiająca się w miejscu MEST zaobserwowana została u pacjentów z glejakiem wielopostaciowym (Martinez, 2009). Hipermetylacja locus IGF2-H19(H19) wykazuje związek z występowaniem takich nowotworów, jak: guz Wilmsa, rak okrężnicy oraz rak wątrobowokomórkowy (Cui, 2001).

Zaobserwowano, że metylacja cytozyny poza regionami CpG („non-CpG”) może indukować rozwój nowotworu. Zauważono, że tkanki przylegające do objętego procesem nowotworowym płuca wykazują metylację „non-CpG” w genie p53, co wskazuje, że modyfikacja ta może występować we wczesnym stadium kancerogenezy i służyć jako wskaźnik diagnostyczny (Kouidou, 2005).

Zaburzenie aktywności enzymów TET prowadzi do obniżenia wydajności demetylasy DNA, a tym samym do globalnego podwyższenia poziomu metylacji. Zaobserwowano, że mutacje TET2 powiązane są z hipermetylacją DNA u pacjentów z ostrą białaczką szpikową czy guzem mózgu (Turcan, 2012).

W komórkach nowotworowych, obok lokalnej hipermetylacji genów supresorowych, obserwuje się globalną hipometylację całego genomu (Hon, 2012). Hipometylacja DNA w procesie kancerogenezy polega na uaktywnieniu protoonkogenów spowodowanym demetylacją ich promotorów (Bender, 2013). W efekcie dochodzi do m.in. niekontrolowanej proliferacji komórek. Aktywacja ekspresji powtórzonych elementów, retrotranspozonów oraz sekwencji intronowych prowadzi do niestabilności genomowej, co manifestuje się zwiększoną predyspozycją do rearanżacji chromosomalnych, delecji lub translokacji. Zauważono, że hipometylacja w locus IGF2-H19 (DMR0) jest skorelowana z rakiem jelita grubego (Cui, 2002) czy pęcherza (Luo, 2012). Z kolei u pacjentów z rakiem okrężnicy wykazano, że metylacja genów HPP1 oraz HLTF wykryta w surowicy wiąże się z występowaniem zmian przerzutowych (Philipp, 2012).

W komórkach nowotworowych zaobserwowano również zmiany w potranslacyjnej modyfikacji białek histonowych. Są one wynikiem mutacji w genach kodujących enzymy odpowiedzialne za deacetylację (HDAC), metylację oraz demetylację histonów. Wyróżnia się cztery klasy deacetylaz histonowych. W komórkach nowotworowych enzymy HDAC I i II wpływają na proliferację komórek, mobilność, potencjał metastatyczny oraz oporność na chemioterapię (Kalle, 2010). Klasa III – enzymy SIRT – bierze udział w procesach związanych ze starzeniem. Wykazano, że wysoki poziom SIRT1 przyczynia się do wzrostu guzów litych, a upośledzenie jego aktywności prowadzi do zatrzymania pro-

liferacji, indukcji apoptozy oraz aktywacji wyciszonych wcześniej genów supresorowych nowotworów (Kalle, 2010). Ze zmianą wzoru tych modyfikacji wiąże się reorganizacja chromatyny, co uniemożliwia prawidłową ekspresję genów supresorowych oraz zahamowanie aktywności onkogenów (Jones, 2016). Z uwagi na funkcję, jaką pełnią HDAC w procesie kancerogenezy, stanowią one jeden z głównych celów terapii epigenetycznej.

Wcześniej wspomniana korelacja acetylacji i metylacji również odgrywa znaczącą rolę w komórkach nowotworowych. W przypadku raka stercza niski poziom acetylacji histonu w pozycjach H3K18, H3K9 oraz dimetylacja H3K4 wiążą się z gorszym rokowaniem w porównaniu do pacjentów z wysokim poziomem tej modyfikacji. Analiza modyfikacji H3K18, H3K9 oraz H3K4 pozwala także na rozróżnienie grupy ze zwiększonym ryzykiem nawrotu raka stercza po pierwotnym wyleczeniu (Yegnasubramanian, 2016).

Z uwagi na funkcję, jaką pełni miRNA w regulacji genów zaangażowanych w proliferację, kontrolę cyklu komórkowego lub apoptozę, zmiany ekspresji tych cząsteczek powiązane z procesem kancerogenezy. Dalsze badania wykazały, że microRNA odgrywa kluczową rolę w progresji nowotworowej, angiogenezie czy przerzutowaniu. Wykazano, że cząsteczki takie, jak: miR-192, miR-194 i miR-215 zdolne są do modulacji ekspresji genu supresorowego p53. W komórkach prawidłowych aktywowane przez ten gen miRNA hamuje działanie białka Mdm2, które odpowiada za degradację p53. Z kolei w szpiczaku mnogim dochodzi do obniżenia ekspresji tych niekodujących cząsteczek, co przyczynia się do niekontrolowanej proliferacji oraz inicjacji kancerogenezy (Peng, 2016). Inny przykład stanowi miR-10b, które w raku piersi nadmiernie produkowane prowadzi do zwiększenia inwazyjności komórek nowotworowych (Ma, 2007).

Coraz więcej dowodów wskazuje, że miRNA odgrywają ważną rolę w procesie przejścia epithelialno-mezenchymalnego (EMT), tym samym indukując proces przerzutowania. MiR-155 aktywuje ścieżkę sygnałową regulującą TGF- β (Transformujący czynnik wzrostu β , ang. *transforming growth factor beta*), prowadząc do rozpoczęcia EMT oraz migrowania komórek nowotworowych poza miejsce guza pierwotnego (Kong, 2008).

LncRNA zaangażowane są w wiele procesów biologicznych, jak regulacja epigenetyczna, imprinting, apoptoza, różnicowanie oraz kontrola cyklu komórkowego (Yang, 2017). Badanie porównujące tkanki prawidłowe oraz nowotworowe wykazało różnice w ekspresji ponad 200 długich niekodujących RNA (Mitra, 2012). Nadekspresję lncRNA powiązano między innymi z rozwojem raka piersi (Xu, 2017), pęcherza (Luo, 2013) czy glejaka (Shi, 2017).

Epigenetyka w psychiatrii

W jaki sposób mózg przetwarza oraz utrzymuje informacje dostarczone z zewnątrz? Na poziomie molekularnym odpowiadają za to modyfikacje epigenetyczne, które wpły-

wają na aktywność genów regulujących zmiany w połączeniach synaptycznych, wspomagając tym samym proces tworzenia pamięci (Day, 2011).

Badania na zwierzętach pokazały, że w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) następują dynamiczne zmiany poziomu metylacji DNA pod wpływem doświadczenia oraz że modyfikacja ta niezbędna jest podczas tworzenia pamięci. Wykazano, że farmakologiczne hamowanie aktywności metylotransferaz DNA powoduje zaburzenia tego procesu. Zauważono również istniejącą zależność między metylacją/demetylacją DNA a tworzeniem się długotrwałych zmian zachowania u zwierząt (Day, 2011).

Rozwój jednostki jest związany z aktywnym procesem adaptacji, który zależy od kontekstu społecznego czy ekonomicznego. Przykładem może być bliskość relacji z rodzicami, która wpływa na powstanie różnic w odpowiedzi na stres, dojrzałość emocjonalną czy zdolność do koncentracji. Z punktu widzenia ewolucji proces ten daje potomstwu możliwość dostosowania ekspresji genów odpowiedzialnych za organizację i rozwój sieci neuronalnych, wpływając na biologiczny instynkt przetrwania (np. odporność na stres), dostosowanie do obecnych warunków środowiskowych, odpowiednie wychowanie następnego pokolenia. Badanie roli zjawisk epigenetycznych w psychologii może odpowiedzieć na wiele pytań dotyczących wpływu doświadczeń, zachowania czy osobowości na ekspresję genów.

Literatura

- Bender S., Tang Y., Lindroth A.M. et al. *Reduced H3K27me3 and DNA Hypomethylation Are Major Drivers of Gene Expression in K27M Mutant Pediatric High-Grade Gliomas*. *Cancer Cell*. 2013; 24: 660–672.
- Chen Q.W., Zhu X.Y., Li Y.Y., Meng Z.Q. *Epigenetic regulation and cancer (review)*. *Oncol. Rep.* 2014; 31: 523–532.
- Cui H., Onyango P., Brandenburg S., Wu Y. et al. *Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2*. *Cancer Res.* 2002; 62: 6442–6446.
- Day J.J., Sweatt J.D. *Epigenetic mechanisms in cognition*. *Neuron*, 2011; 70: 813–829.
- Feinberg A.P., Vogelstein B. *Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts*. *Nature*. 1983; 301: 89–92.
- Gigek C.O., Chen E.S., Smith M.A.C. *MethylCpG-Binding Protein (MBD) Family: Epigenomic Read-Outs Functions and Roles in Tumorigenesis and Psychiatric Diseases*. *J. Cell Biochem.* 2016; 117: 29–38.
- Grayson D.R., Jia X., Chen Y. et al. *Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 9341–9346.
- Hanna C.W., Kelsey G. *Genomic imprinting beyond DNA methylation: a role for maternal histones*. *Genome Biol.* 2017; 18: 177.
- Hardy T.M., Tollefsbol T.O. *Epigenetic diet: Impact on the epigenome and cancer*. *Epigenomics*. 2011; 3: 503–518.
- Imhof A., Yang X.J., Ogryzko V.V. et al. *Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases*. *Curr. Biol.* 1997; 7: 689–692.

- Jensen Peña C., Monk C., Champagne F.A. *Epigenetic effects of prenatal stress on 11 (J-hydroxysteroid dehydrogenase-2 in the placenta and fetal brain.* PLoS One. 2012; 7: 39791–39791.
- Jeltsch A., Jurkowska R.Z. *New concepts in DNA methylation.* Trends Biochem. Sci. 2014; 39: 310–318.
- Jones P.A., Issa J.P.J., Baylin S. *Targeting the cancer epigenome for therapy.* Nat. Rev. Genet. 2016; 17: 630–641.
- Kalle A.M., Mallika A., Badiger J. et al. *Inhibition of SIRT1 by a small molecule induces apoptosis in breast cancer cells.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010; 401: 13–19.
- Kim Y.Z. *Altered Histone Modifications in Gliomas.* Brain Tumor Res. Treat. 2014; 2: 7–21.
- Kong W., Yang H., He L. et al. *MicroRNA-155 Is Regulated by the Transforming Growth Factor /Smad Pathway and Contributes to Epithelial Cell Plasticity by Targeting RhoA.* Mol. Cell Biol. 2008; 28: 6773–6784.
- Kouidou S., Agidou T., Kyrkou A. et al. *Non-CpG cytosine methylation of p53 exon 5 in non-small cell lung carcinoma.* Lung Cancer. 2005; 50: 299–307.
- Long Y., Wang X., Youmans D.T., Cech T.R. *How do lncRNAs regulate transcription?* Sci. Adv. 2017; 3: eaao2110.
- Lu Z., Bast R.C. *The tumor suppressor gene ARHI (DIRAS3) inhibits ovarian cancer cell migration through multiple mechanisms.* Cell Adh. Migr. 2013; 7: 232–236.
- Łuczak M.W., Jagodziński P.P. *The role of DNA methylation in cancer development.* Folia Histochem. Cytobiol. 2006; 44: 143–154.
- Ma L., Teruya-Feldstein J., Weinberg R.A. *Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer.* Nature 2007; 449, 682–688.
- Magee P., Shi L., Garofalo M. *Role of microRNAs in chemoresistance.* Ann. Transl. Med. 2015; 3: 332–341.
- Martinez R., Esteller M. *The DNA methylome of glioblastoma multiforme.* Neurobiol. Dis. 2010; 39: 40–46.
- Mitra S.A., Mitra A.P., Triche T.J. *A central role for long non-coding RNA in cancer.* Front Genet. 2012; 3: 1–9.
- Nabel C.S., Jia H., Ye Y. et al. *AID/APOBEC deaminases disfavor modified cytosines implicated in DNA demethylation.* Nat. Chem. Biol. 2012; 8: 751–758.
- Nonchev S., Tsaneva I. *From Chemical Embryology to Nucleosome Patterning. An interview with Roumen G. Tsanev.* Int. J. Dev. Biol. 2009; 53: 383–391.
- Okano M., Bell D.W., Haber D.A., Li E. *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development.* Cell. 1999; 99: 247–257.
- Peng Y., Croce C.M. *The role of MicroRNAs in human cancer.* Signal Transduct. Target Ther. 2016; 1: 15004.
- Philipp A.B., Stieber P., Nagel D. et al. *Prognostic role of methylated free circulating DNA in colorectal cancer.* Int. J. Cancer. 2012; 131: 2308–2319.
- Piwecka M., Rolle K., Belter A. et al. *Comprehensive analysis of microRNA expression profile in malignant glioma tissues.* Mol. Oncol. 2015; 9: 1324–1340.
- Renthal W., Nestler E.J. *Epigenetic mechanisms in drug addiction.* Trends Mol. Med. 2008; 14: 341–350.
- Robison A.J., Nestler E.J. *Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction.* Nat. Rev. Neurosci. 2011; 12: 623–637.

- Rolle K. *miRNA Multiplayers in glioma. From bench to bedside*. Acta Biochim. Pol. 2015; 62: 353–365.
- Rorbach-Dolata A., Kubis A., Piwowar A. *Modyfikacje epigenetyczne – ważny mechanizm w zaburzeniach cukrzycy*. Postepy Hig. Med. Dosw. 2017; 71: 960–974.
- Rose N.R., Kloise R.J. *Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation*. Biochim Biophys Acta – Gene Regul. Mech. 2014; 1839: 1362–1372.
- Sawan C., Vaissière T., Murr R., Herceg Z. *Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer*. Mutat Res – Fund Mol. Mech. of Mutagen. 2008; 642: 1–13.
- Seto E., Yoshida M. *Erasers of histone acetylation: The histone deacetylase enzymes*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014; 6: 1–26.
- Shi J., Dong B., Cao J. et al. *Long non-coding RNA in glioma: signaling pathways*. Oncotarget. 2017; 8: 27582–27592.
- Tuorto F., Herbst F., Alerasool N. et al. *The tRNA methyltransferase Dnmt2 is required for accurate polypeptide synthesis during haematopoiesis*. EMBO J. 2015; 34: 2350–2362.
- Wu H., Zhang Y. *Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation*. Genes Dev. 2011; 25: 2436–2452.
- Xu S., Kong D., Chen Q. et al. *Oncogenic long noncoding RNA landscape in breast cancer*. Mol. Cancer. 2017; 16: 129–144.
- Yang Y., Ren M., Song C. et al. *LINC00461, a long non-coding RNA, is important for the proliferation and migration of glioma cells*. Oncotarget 2017; 8: 84123–84139.
- Yegnasubramanian S. *Prostate cancer epigenetics and its clinical implications*. Asian J. Androl. 2016; 18: 549–558.

Epigenetic control of the cellular processes

Cells of a multicellular organism are genetically identical but differ in structure and function. This heterogeneity is created by several epigenetic mechanisms during the development of the organism. The epigenetic changes- including DNA methylation, histone post-translational modifications, chromatin remodeling and RNA interference have all been shown to control chromatin structure and regulate a plethora of cellular and organismal processes. There is a strong evidence that epigenetics play a crucial role in the development of diseases such as cancer, schizophrenia or metabolic disorders. The epigenetic regulation underlie memory formation or adaptation to external stimuli. The extent to which environmental effects can provoke epigenetic responses represents an exciting area of future research. Here we review the current knowledge about the epigenetic mechanisms and their relation to the human health and disease.

Key words: gene regulation, DNA methylation, histone modification, non-coding RNA, cancer