Najvažniji mehanizmi epigenetike

Baković, Tanja

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:244128

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-21**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski studij biologije

Tanja Baković

NAJVAŽNIJI MEHANIZMI EPIGENETIKE

Završni rad

Mentorica: doc. dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac

Osijek, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Završni rad

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

NAJVAŽNIJI MEHANIZMI EPIGENETIKE

Tanja Baković

Rad je izrađen: na Odjelu za biologiju

Mentor: doc. dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac

Sažetak: Epigenetika proučava uzročne interakcije između gena i njihovih produkata koji dovode do nastanka fenotipa. Genom je programiran epigenomom. Epigenetski mehanizmi su metilacija DNA, modifikacija histona i RNA interferencija. Epigenetičke promjene su potrebne za normalan razvoj i zdravlje, no mogu biti odgovorne za mnoge bolesti. Epigenetičke preinake mogu nastati kao odgovor na poticaje iz okoliša, npr. prehrane.

Broj stranica: 20

Broj slika: 7

Broj tablica: 2

Broj literaturnih navoda: 22

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: epigenetika, metilacija, acetilacija, histon, RNAi

Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor's thesis

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department od Biology

Undergraduate university study programme in Biology

Scientific area: Natural science

Scientific field: Biology

THE MOST IMPORTANT MECHANISMS OF EPIGENETICS

Tanja Baković

Thesis performed at: Department of Biology

Supervisor: Ph. D. Ivna Štolfa Čamagajevac, assistant professor

Short abstract: Epigenetics studies interactions between genes and their products that lead to phenotype. Genom is programmed by epigenom. Epigenetic changes are important for a normal development and health but can be responsible for many diseases. Epigenetic changes can be produced as a response to different environmental stimulanses, i.e. food.

Number of pages: 20

Number of figures: 7

Number of tables: 2

Number of references: 22

Original in: Croatian

Key words: epigenetics, methylation, acetylation, histone, RNAi

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, Universityof J. J. Strossmayer Osijek and in National University Library in Zagreb. It is also available on the web site of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

SADRŽAJ:

1. UVOD 1

2. OSNOVNI DIO 2

2.1. Epigentika 2

2.2. DNA metilacija 3

2.2.1. DNA metiltransferaze 6

2.3. Modifikacije histona 6

2.3.1. Acetilacija histona 8

2.3.1.1. Poveznica između acetilacije histona i acetilacije DNA 10

2.3.2. Metilacija histona 10

2.3.2.1. Inaktivacija X kromosoma 11

2.3.3. Fosforilacija histona 11

2.3.4. Ubikvitinacija histona 12

2.3.4.1. Enzimi uključeni u ubikvitinaciju 12

2.3.5. Sumoilacija histona 13

2.4. RNA interferencija (RNAi) 14

2.5. Epigenetika i bolesti 15

2.5.1. Epigenetika i tumori 15

2.5.2. Epigenetski lijekovi 16

2.6. Epigenetika i prehrana 17

3. ZAKLJUČAK 19

4. LITERATURA 20

1. UVOD

Epigenetika se definira kao grana znanosti koja izučava sve potencijalno stabilne nasljedne promjene u ekspresiji gena ili staničnom fenotipu, koje se događaju bez promjena u rasporedu baza DNA. Sam prefiks "epi" u nazivu epigenetika (*grč. epi-na, preko, izvan*) ističe ovo važno svojstvo, da se promjene ne događaju u DNA sekvenci. Genom je programiran epigenomom. Genom predstavlja potpunu genetsku informaciju sadržanu u DNA, unutar stanica organizma. S druge strane, epigenom uključuje modifikacije povezane s genomskom DNA, koje igraju ulogu u uspostavljanju jedinstvenog staničnog i razvojnog identiteta. Genom nije taj koji stanici može osigurati prilagodljivost, jer kad bi se mijenjao ovisno o zahtjevima okoliša ili organizma, degradirala bi se nasljedna svojstva kodirana u DNA sekvenci. Suprotno genomu koji je konzistentan, epigenom dinamično i fleksibilno odgovara na unutarstanične i izvanstanične podražaje. Epigenetske modifikacije uvjetuju ekspresiju pojedinog dijela genoma i inaktivaciju preostalog, te omogućuju rast, programiranu smrt, proliferaciju, mirovanje, diferencijaciju, te akomodaciju stanice na eventualne promjene. Epigenom tako omogućuje organizmu da se prilagodi podražajima okoliša kroz ekspresiju određenih karakteristika ili fenotipa. Razumijevanje transgeneracijskog prijenosa epigenetske informacije može dovesti do metoda liječenja mnogih složenih bolesti. (Jaenisch i Bird, 2003; Weinhold, 2006).

Cilj ovog rada je definirati i opisati epigentiku, navesti i opisati njene mehanizme te opisati utjecaj epigenetike na razvoj određenih bolesti.

2. OSNOVNI DIO

2.1. Epigenetika

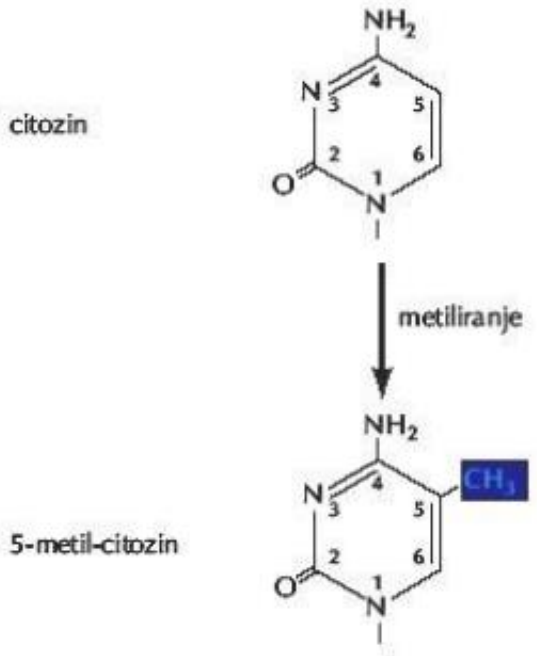
Pojam epigenetika osmislio je, 1942. godine, britanski znanstvenik C.H. Waddington. Definirao ju je kao granu biologije koja proučava uzročne interakcije između gena i njihovih produkata koji dovode do nastanka fenotipa. Prema ovoj definiciji, epigenetika se odnosila na sve molekularne puteve koji moduliraju ekspresiju genotipa u određeni fenotip. Tijekom godina, razvoj znanosti doveo je i do velikog napretka u genetici i boljeg razumijevanja epigenetike kao i do saznanja da iako sve somatske stanice organizma imaju istu DNA, obrasci ekspresije gena uvelike se razlikuju između različitih tipova stanica, a ti obrasci se mogu klonalno naslijeđivati. To je dovelo do suvremenije definicije epigenetike kao studije o mitotički i mejotički nasljednim promjenama u funkciji gena, koje se ne mogu objasniti promjenama u DNA sekvenci. Epigenetika proučava procese koji dovode do promjene ekspresije pojedinih gena koji uzrokuju promjenu fenotipa, bez promjene u DNA sekvenci, odnosno genotipa.

Glavni epigenetski mehanizmi su metilacija DNA, modifikacija histona i RNA interferencija. Svi oni djeluju zajedno kao jedinstven sustav u regulaciji ekspresije gena (Bagić, 2015).

2.2. DNA metilacija

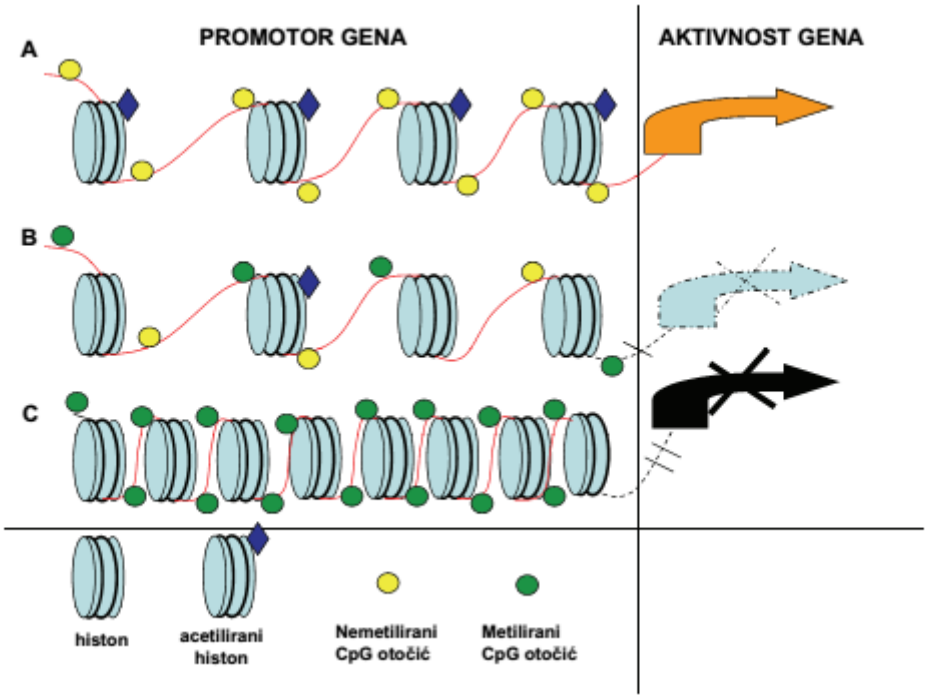
Najistraživaniji epigenetski proces je DNA metilacija. DNA metilacija je proces u kojem se, s univerzalnog staničnog metil donora S-adenozil metionina (SAM), metilna skupina dodaje na DNA. Tim dodavanjem se mijenja funkcija DNA. DNA metilacija je važna za normalan razvoj i povezana je s mnogim ključnim procesima uključujući genomski utisak, inaktivaciju X kromosoma, represiju repetitivnih elemenata, starenje i kancerogenezu.

Dva od četiri DNA nukleotida mogu biti metilirana – citozin i adenin. Metilacija adenina se pojavljuje kod prokariota. Stopa metilacije citozina se razlikuje ovisno o vrsti, npr. 7,6% kod vrste *Mus musculus*, 2,3% kod vrste *Escherichia coli*, 0,034% kod vrste *Drosophila* itd. (Capuano, 2014). Metilacija citozina, čime nastaje 5-metilcitozin, odvija se na istom petom mjestu pirimidinskog prstena gdje se nalazi metilna skupina timina, odvajajući ga od analoga RNA baze uracila koji nema metilnu skupinu (Slika 1).



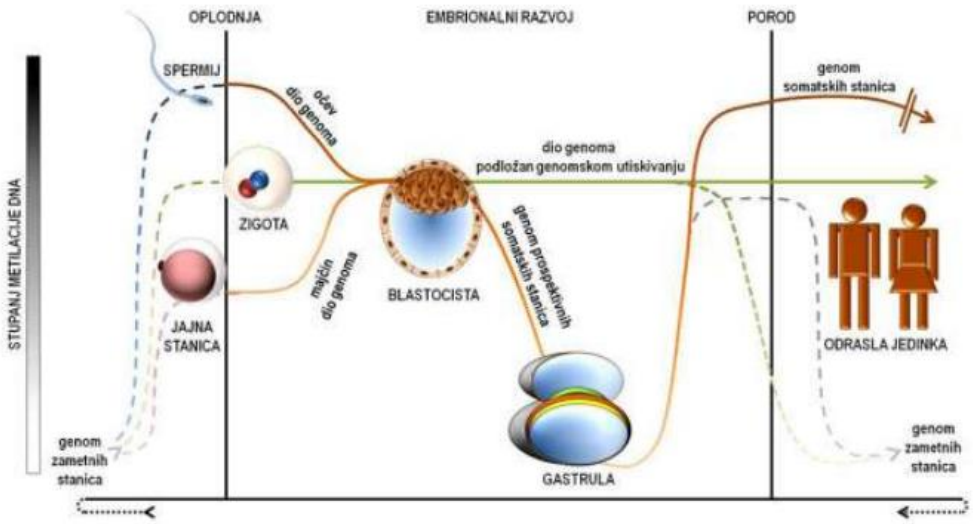
Slika 1. Metilacija citozina (Web 1).

Iako se CpG dinukleotidi (metilirani i nemetilirani) mogu naći u relativno niskoj frekvenciji posvuda u ljudskom genomu, frekvencija im značajno raste u kratkim odsječcima DNA nazvanima po gustoći CpG dinukleotida tzv. CpG otocima. CpG otoci se mogu definirati kao odsječci DNA dulji od 0,5 kb gdje suma gvanina i citozina iznosi više od 55% ukupnog broja baza. Zanimljivo obilježje CpG otoka u kralježnjaka jest da se tipično mogu naći u područjima 5' kraja ljudskih gena, odnosno u područjima genskih promotora i ovisno o stanju metiliranosti imaju važnu ulogu kao regulatori genske transkripcije. Otprilike 60% ljudskih gena ima u području svojih genskih promotora CpG otoke i za razliku od većine CpG dinukleotida drugdje u genomu, CpG dinukleotidi u području CpG otoka većinom nisu metilirani u normalnim ljudskim stanicama.



Slika 2. Shematski prikaz epigenetičkih promjena u genu čiji je promotor bogat CpG otočićima. A. Histoni su acetilirani. CpG otočići su nemetilirani, gen je aktivan. B. Dio histona je izgubio acetilne skupine, dioCpG otočića je metiliran, gen nije aktivan ali je promjena reverzibilna. C. Histoni su hipoacetilirani a CpG otočići metilirani, Gen je utišan a promjena ireverzibilna (Trošelj, 2009).

DNA metilacija može izmijeniti ekspresiju gena u stanicama pri diobi i diferencijaciji iz embrijskih matičnih stanica u specifična tkiva. Rezultat promjene je trajan i jednosmjeran, što onemogućuje stanici da se vrati u matičnu stanicu i diferencira u neko drugo tkivo. Metilacijske modifikacije koje reguliraju gensku ekspresiju su uglavnom nasljedne tijekom mitotičke stanične diobe. Neke metilacije su nasljedne i tijekom mejotične stanične diobe kojom nastaju spolne stanice. Nakon oplodnje, majčin i očev genom podliježu opsežnoj demetilaciji i *de novo* metilaciji (Slika 3). Svega 3-6 sati nakon oplodnje, očeva DNA prolazi kroz demetilacijski proces, dok majčina DNA započinje metilaciju. Genom spermija je izrazito metiliran, za razliku od genoma jajne stanice koji je gotovo nemetiliran.

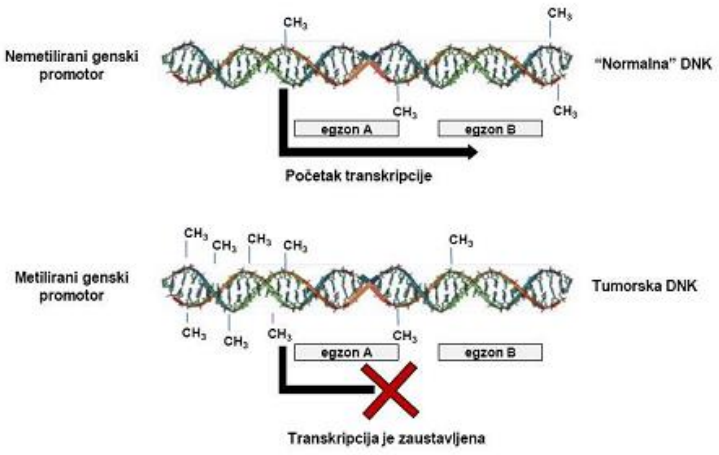


Slika 3. Promjena razine metilacije DNA tijekom života čovjeka (Bagić, 2015).

Danas se smatra da su epigenetske promjene (uključujući deacetilaciju histona i metilaciju DNA) odgovorne za nastanak i razvoj malignih promjena barem u jednakoj mjeri kao i mutacije. Klasična Knudsonova hipoteza kaže da je za tumorigenezu potreban gubitak oba alela određenog gena sa svojstvom tumor supresora. Za utišavanje oba alela potencijalnog tumor supresor gena može biti odgovorna bilo koja kombinacija genetske i epigenetske promjene, pri čemu epigenetske promjene gena kao epigenetski mehanizam utišavanja tumor supresora (Slika 4) dokazana je u brojnim solidnim i hematološkim novotvorinama, a poznati su i primjeri gena odgovornih za popravak DNA utišanih metilacijom njihovih genskih promotora u kolorektalnom karcinomu i u limfomu. Metilacija također može potencirati učinak egzogenih karcinogena, kao u primjeru benzo(a)piren diola iz dima cigarete koji se učestalije vezuje za gvanin u sklopu metiliranog CpG dimera nego za ostale gvaninske baze, što olakšava mutaciju gvanina u timin. Metilna skupina također mijenja valnu duljinu apsorpcije ultraljubičaste svjetlosti za citozinsku bazu, što olakšava stvaranje pirimidinskih dimera (CC-TT) u DNA stanica epidermisa i vodi povećanoj incidenciji mutacija tumor supresor gena TP53 (Kalac, 2010).

2.2.1. DNA metiltransferaze

Reakcija DNA metilacije je katalizirana pomoću DNA metil-transferaza, odn. DNMT. Metilacija DNA se odvija neposredno nakon replikacije prijenosom metilne skupine s donora S-adenozil-L-metionin (SAM ili AdoMet) u reakciji kataliziranoj pomoću DNMT.



Slika 4. Utjecaj metilacije genskog promotora na inicijaciju transkripcije (Kalac, 2010).

U sisavaca su pronađene tri specifične DNA-metiltransferaze. DNMT1 preferira hemimetilirane DNA *in vitro* što je dosljedno s njenom ulogom očuvanja metilacije, dok DNMT3a i DNMT3b metiliraju nemetiliranu i metiliranu DNA istim tempom, što je dosljedno s *de novo* metilaznom ulogom. Očito je da se ova klasična razlika između *de novo* metilacije i njenog očuvanja ne primjenjuje uvijek (Szyf, 2009).

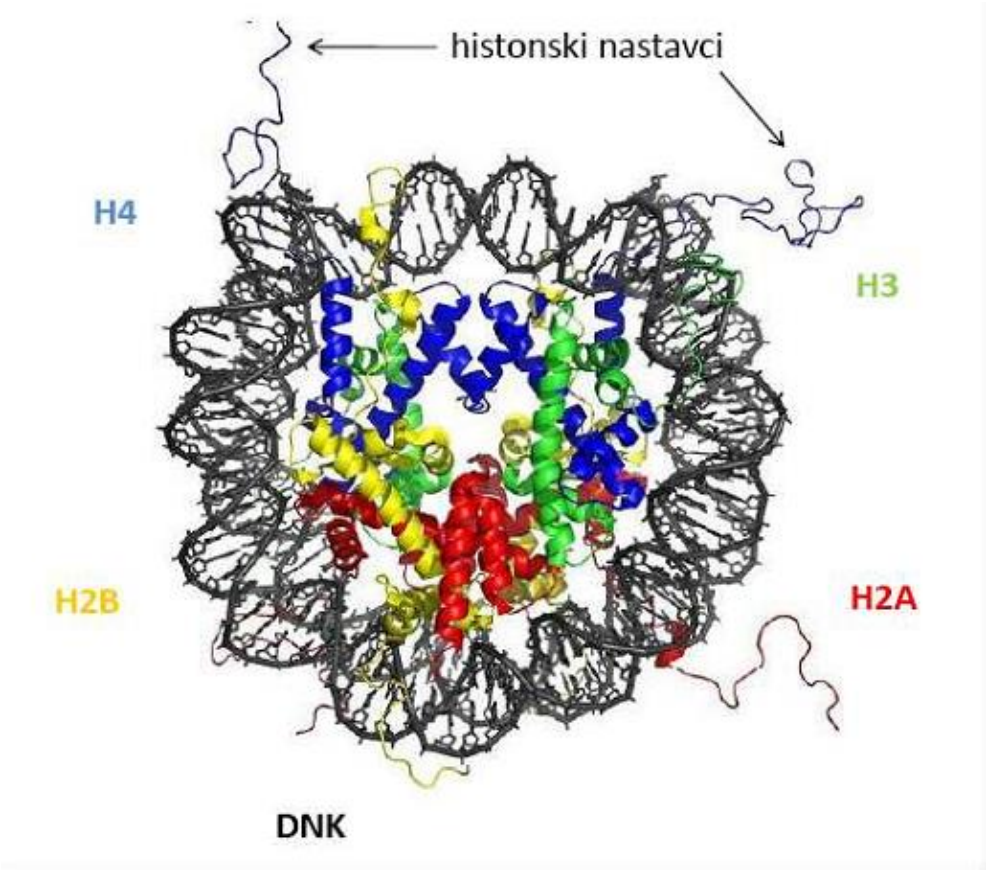
2.3. Modifikacije histona

Histoni su bazični proteini u eukariotskim stanicama koji zajedno s namotanom DNA čine kromatin. Nukleosom predstavlja prvu razinu organizacije kromatina i sastoji se od parova histona H2A, H2B, H3 i H4 organiziranih u oktamersku jezgru koju omata DNA. Histoni reguliraju pakiranje DNA i imaju veliku ulogu u kompakciji kromatina što utječe na transkripcijsku aktivnost. U stanicama koje se ne dijele, kromatin može biti u dva funkcionalna stanja: eukromatin i heterokromatin. Eukromatin ili otvoreni kromatin predstavlja način pakiranja kromatina u kojem je DNA dostupna transkripciji. S druge strane, kod heterokromatina ili zatvorenog kromatina, DNA je gusto pakirana i nije dostupna transkripciji. Način na koji je kromatin organiziran tijekom različitih stadija staničnog ciklusa i u različitim stanicama regulira se putem epigenetičkih mehanizama.

Histoni H2A, H2B, H3 i H4 čine srž, a histoni H1 i H5 su vezujući kromosomi. Oko srži oktamera je omotano oko 145 parova baza DNA. Histoni podliježu posttranslacijskim modifikacijama što mijenja njihove interakcije sa molekulama DNA i nuklearnim proteinima.

H3 i H4 histoni imaju duge repove koji vire iz nukleosoma. Ti repovi mogu biti kovalentno modificirani na nekoliko mjesta.

Srž histona također može biti modificirana. Kombinacije modifikacija čine takozvani "histonski kod". Modifikacije histona imaju ulogu u različitim biološkim procesima poput regulacije gena, popravka DNA, mitozi i spermatogenezi. Modifikacije acetilacije i fosforilacije aktiviraju transkripciju, sumoilacije inhibiraju, a metilacije i ubikvitinacije mogu aktivirati i inhibirati ekspresiju gena (Bagić, 2015).

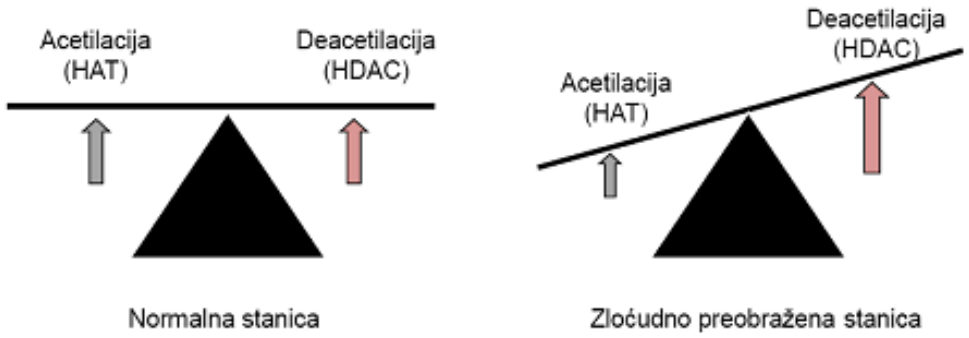


Slika 5. Trodimenzionalni prikaz nukleosoma: oko oktamera histonskih proteina (po par H2A, H2B, H3 i H4) omotano je oko 150 parova baza DNA, tvoreći osnovnu građevnu jedinicu kromatina – nukleosom. Iz nukleosoma se projiciraju histonski nastavci s lizinskim aminokiselinskim ostatcima podložnim posttranslacijskim enzimatskim promjenama (Kalac, 2010).

2.3.1. Acetilacija histona

Acetilacija histona se događa enzimatskim dodavanjem acetilne skupine s acetil-koenzima A. Proces acetilacije histona je usko vezan za regulaciju mnogih staničnih procesa

uključujući transkripciju i dinamiku kromatina, utišavanje gena, progresiju staničnog ciklusa, apoptozu, diferencijaciju, DNA replikaciju, DNA popravak, import u jezgru i neuronsku represiju. Enzimi uključeni u acetilaciju se nazivaju histon acetil-transferaze (HAT) i igraju važnu ulogu u kontroli acetilacije H3 i H4 histona. Pronađeno je više od 20 acetil-transferaza. Jačina acetilacije H3 histona se može povećati povećanjem inhibicije deacetilacije histona pomoći histon-deacetilaza (HDAC) i smanjenjem inhibicije HAT (Kuo, 1998). Histon-deacetilaze kataliziraju hidrolitičko uklanjanje acetilnih skupina. Neuravnotežena acetilacija histona se povezuje s tumorogenezom i napretkom razvoja tumora. Otkrivanje je li H3 histon acetliziran bi omogućilo korisne informacije za daljnju karakterizaciju uzoraka acetilacije što bi dovelo do boljeg razumijevanja epigenetske regulacije genske aktivacije kao i razvoj lijekova koji ciljaju acetil-transferaze (Dokmanović, 2007).



Slika 6. Kontrola nad "epigenetskim kodom" – acetilacija i deacetilacija u normalnoj stanici su u ravnoteži što drži transkripciju pod kontrolom. U stanici zloćudnog tumora prevladava proces deacetilacije dovodeći do kondenzacije i zatvaranja kromatina transkripcijskim čimbenicima što u konačnici snižava količinu proteina proizvoda tumor supresorskih gena.

U ljudskom se organzimu HAT enzimi mogu podijeliti prema svojoj rasprostanjenosti po tkivima i specifičnosti za proteinski supstrat. Tri obitelji histonskih acetiltransferaza su navedene u Tablici 1.

Tablica 1. Obitelj histonskih acetil-transferaza u ljudskom organizmu (Kalac, 2010).

GNAT	MYST	P300
1. Gcn5	1. Tip60	1. CBP
2. p/CAF	2. MOF	p300
	3. Sas3	4.Rtt109
	4. MOZ	

Do danas je u ljudskim stanicama otkriveno 18 različitih HDAC enzima, koji su podijeljeni u 4 razreda prema homohlogiji s HDAC enzimima kvasca, organizmima u kojima su prvi puta otkriveni. Razlike među razredima su bitne s farmakološkog stajališta otvarajući put sintetiziranju specifičnih molekula za njihovu inhibiciju (Kalac, 2010).

Tablica 2. Podjela histonskih deacetilaza prema razredima s karakteristikama pojedinog enzima

Enzim	Razred	Lokalizacija
HDAC1	I	Prisutan u jezgri, rasprostanjen u svim tkivima
HDAC2	I	U kompleksu s HDAC1 rasprostanjen u svim tkivima
HDAC3	I	Prisutan u jezgri, rasprostanjen u svim tkivima
HDAC4	II	Prisutan u jezgri i citoplazmi
HDAC5	II	Sposoban prelaziti iz jezgre u citoplazmu
HDAC6	II	Sposoban prelaziti iz jezgre u citoplazmu
HDAC7	II	Izrazito visoka koncentracija u CD4+CD8+ timocitima, sposoban prelaziti iz jezgre u citoplazmu
HDAC8	I	Sposoban prelaziti iz jezgre u citoplazmu
HDAC9	II	Sposoban prelaziti iz jezgre u citoplazmu
HDAC10	II	Sposoban prelaziti iz jezgre u citoplazmu
HDAC11	IV	U katalitičkom mjestu enzima sadrži aminokiselinske ostatke specifične za I. i II. HDAC razred

2.3.1.1. Poveznica između acetilacije histona i metilacije DNA

Grupa proteina s funkcijom represora transkripcije i afinitetom za hipermetilirane CpG otoke su: MBD1, MBD2, MBD3, MeCP2 i Kaiso. Dokazano je da ovi proteini kada su vezani za DNA tvore komplekse s drugim proteinima, između ostalog histonskim deacetilazama. Histonske deacetilaze u ovom kompleksu lokalizirano deacetiliraju lizinske ostatke na histonima i još više zatvaraju pristup transkripcijskim faktorima i histonskim acetil-transferazama tako modificirajući ravnotežu kromatina posredovanu ovim dvama grupama enzima. Histoni su osim acetilaciji i deacetilaciji podložni i metilaciji posredovanoj brojnim metil-transferazama, a ovisno o aminokiselinskom ostatku koji biva metiliran kromatin postaje transkripcijski aktivan i neaktivan. Trimetilacija lizinskih aminokiselinskih ostataka na poziciji 9, 27 i 39 N-terminalnog kraja histona i lizina na poziciji 20 na histonu H4 dovodi do inhibicije transkripcije. Trimetilacija lizina na poziciji 4 i 79 i histona H3 s druge strane dovodi do otvaranja kromatina i inicijacije transkripcije. Epigenetske promjene DNA u nastanku malignih stanica su za razliku od genetskih promjena (mutacije, delecije, ampflikacije, translokacije) potencijalno reverzibilne, a reaktivacija epigenetski utišanog tumor supresor gena bi dovela do teminalne diferencijacije zloćudne stanice (Kalac, 2010).

2.3.2. Metilacija histona

Metilacija histona se definira kao prijenos jedne, dvije ili tri metilne skupine sa S-adenozil-L-metionina na lizinske ili argininske ostatke histonskih proteina pomoću metil-transferaze (HMT). HMT kontroliraju ili reguliraju DNA metilaciju kroz represiju ili aktivaciju transkripciju ovisnu o kromatinu. U staničnoj jezgri kada se odvija metilacija histona, specifični geni na histonskoj DNA mogu biti aktivirani ili utišani. Uklanjanje metilnih skupina se naziva demetilacija histona. Odvija se pomoću histon demetilaza. Ove demetilaze imaju potencijalnu onkogenu ulogu i također sudjeluju u drugim patološkim procesima. Otkriće histon demetilaza pokazuje da metilacija histona nije stalna modifikacija nego više dinamičan proces (Greer, 2012).

2.3.2.1. Inaktivacija X kromosoma

U ženki, kada spermij koji sadrži X kromosom oplodi jaje, nastaje embrio s dvije kopije X kromosoma. Ženke ne trebaju obje kopije X kromosoma jer bi to samo udvostručilo količinu proteina koji se proizvode. Očinski X kromosom se brzo inaktivira te nastaje inaktivni X kromosom (Xi) koji je pakiran u heterokromatin. To pakiranje se događa uslijed metilacije

raznih lizinskih ostataka. Iako se metilacija odvija na različitim histonima, najkarakterističnija metilacija na Xi se javlja na devetom lizinu trećeg histona (H3K9). Iako je dovoljna jedna metilacija u ovoj regiji da bi geni ostali transkripcijski aktivni, u heterokromatinu ovaj lizin je često metiliran dva ili tri puta. Tijekom metilacije histona se odvija utišavanje gena tako da Xi ostane inaktiviran tijekom replikacije i diobe stanice. (Ahn, 2008).

2.3.3. Fosforilacija histona

Fosforilacija histona se može odvijati na serinu, treoninu i tirozinu i sačinjava esencijalni dio "histonskog koda". Fosforilacija H2A (X) je važna modifikacija histona koja igra važnu ulogu u odgovoru DNA na oštećenja. Kod sisavaca, ova modifikacija se nalazi na serinu 139. Događa se u svim fazama staničnog ciklusa. Kataliziraju je protein kinaze ATM i ATR. Značajan broj fosforiliziranih histonskih ostataka se povezuje sa ekspresijom gena. Fosforilacija serina 10 i 28 H3 histona je povezan s regulacijom transkripcije gena za faktor epidermalnog rasta. Fosforilacija H3 histona je visoko očuvana među eukariotima od kvasaca pa do čovjeka, i opsežno je proučavana tijekom godina. Budući da je fosforilacija H3 histona uključena u relaksaciju kromosoma i regulaciju genske ekspresije, ova modifikacija se izvorno povezivala sa zbijanjem kromosoma tijekom mejoze i mitoze. Sveukupno su pronađena 4 fosforilirana ostatka u N-terminalnom H3 repu koja su povezana sa kondenzacijom i razdvajanjem kromosoma: T3, S10, T11 i S28, no još uvijek je nejasno jesu li te modifikacije funkcionalno povezane sa kondenzacijom kromosoma i jesu li povezani međusobno. Fosforilacija na S10 je vjerojatno najbolje dokumentirana oznaka povezana s kondenzacijom kromatina vezanim za mitozu i mejozu u mnogim eukariotskim organizmima, i uglavnom se koristi kao glavna oznaka ovih procesa.

Postoji nekoliko poveznica između fosforilacije histona i apoptoze. Fosforilacija N-terminalnog repa histona H2B je esencijalna za kondenzaciju kromatina izazvanu apoptozom. U apoptičnim stanicama sisavaca je pronađen fosforiliran serin 14. Odgovarajuća fosforilacija S10 histona H2B kod kvasca je potvrđena kao esencijalna za kondenzaciju kromatina izazvanu vodikovim peroksidom i apoptozu (Rossetto, 2012).

2.3.4. Ubikvitinacija histona

Ubivkvitin je protein sa 76 amino kiselina. S njim su povezani mnogi stanični procesi poput razgradnje proteina, odgovora na stres, regulacije staničnog ciklusa, transporta proteina, regulacije transkripcije i ostalih. Prvi histon kod kojeg je zabilježena ubikvitinacija je H2A, na

lizinu 119. Ubikvitinirani H2A (uH2A) je pronađen kod mnogih viših eukariotskih organizama (5-15%), ali nije pronađen kod vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Većina H2A proteina je u monoubikvitiniranoj formi, no poliubikvitinirani H2A su također pronađeni kod mnogih tkiva i staničnih tipova.

Pronađen je i ubikvitiniran H2B (1-2%), i iako je manje zastupljen nego uH2A pronađen je u više organizama, od kvasaca do čovjeka. Ubikvitinacija se, kao i kod H2A histona, odvija na lizinu, kod ljudi na lizinu 120, a kod kvasaca na lizinu 123. Dosada je pronađen samo monoubikvitiniran H2B.Pronađeni su ubikvitinirani H3 i H1, no oni nisu tako zastupljeni kao H2A i H2B, i još nije istraženo na kojem se mjestu ubikvitiniraju.

Dosadašnja istraživanja ukazuju da ubikvitin ima važnu ulogu u regulaciji transkripcije, i mogu sudjelovati u aktivaciji gena (Zhang, 2016).

2.3.4.1. Enzimi uključeni u ubikvitinaciju

Ubikvitinacija histona je reverzibilna modifikacija, kao acetilacija i fosforilacija. Stupnjevi ubikvitinacije histona određeni su dostupnošću slobodnih enzimskih aktivnosti uključenih u dodavanje ili uklanjanje ubikvitina.Dodavanje ubikvitina ovisi o E1, E2 i E3 enzimima. Uklanjanje ubikvitina se postiže putem izopeptidaza. Kod kvasaca proteini Rad6 i Cdc34 mogu ubikvitinirati H2B *in vitro* bez prisutstva E3 proteina. *In vivo* je samo Rad6 neizostavan za ubikvitinaciju H2B. Posljednja istraživanja pokazuju da je i protein Bre1 vjerojatno uključen u ubikvitinaciju H2B jer mutacija RING domene proteina Bre1 poništava ubikvitinaciju H2B *in vivo*. Hr6A i HR6B su dva proteina kod sisavaca koja su homologna Rad6 proteinu. Kod ljudi su također pronađeni proteini za koje se pretpostavlja da su homolozi Bre1 proteina.

E2 i E3 enzimi koji bi bili uključeni u H2A ubikvitinaciju nisu pronađeni. *In vitro* pročišćeni Rad6 može ubikvitinirati H2A kao i H2B, no nije jasno dijele li H2A i H2B isti E2 *in vivo*.

Ubikvitin može biti uklonjen hidrolizom peptidne veze na glicinu 76 ubikvitinske molekule. Kod kvasaca je pronađeno 19 proteina koji su sposobni katalizirati ovaj proces. Deubikvitinacijski enzimi (DUB) se sastoje od ubikvitin C-terminalne hidrolaze (UCH) i ubikvitin-specifičnih proteaza (UBP). UCH imaju 230 aminokiselina, a UBP 350 aminokiselina. Razlika među UBP-ovima je u varijabilnom N-terminalnom dijelu koji

doprinosi specifičnosti za supstrat. Prvi UBP protein koji je genetički i biokemijski opisan je Ubp4 (Zhang, 2016).

2.3.5. Sumoilacija histona

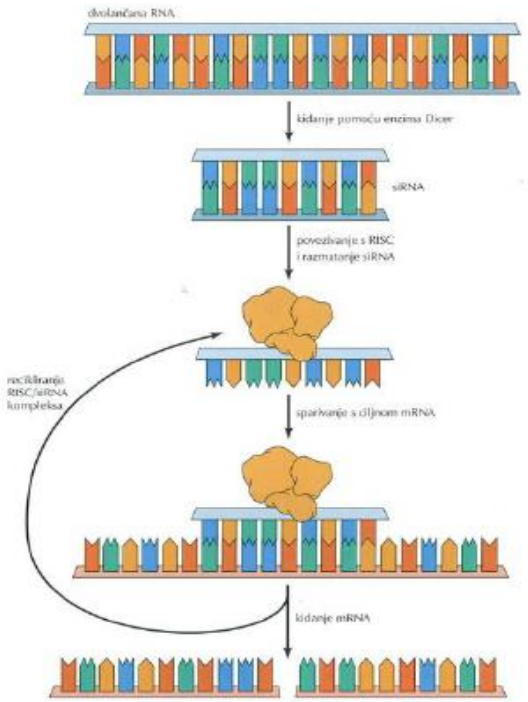
Nedavno se pokazalo da se u stanicama sisavaca histoni sumoiliraju. SUMO (SMT3 kod kvasca *S. cerevisiae*) je mali modificirajući protein od oko 100 aminokiselina koji se nalazi kod eukariota. Kod kvasaca heterodimer Aos1/Uba2 formira visoko energetsku tioestersku vezu da bi aktivirao SUMO. SUMO se zatim prenosi na Ubc9. Ubc9 je sposoban povezati SUMO na lizin 6 ili lizin 7 na N-terminalnom kraju histona H2B.

Sumoilacija je uključena u regulaciju transkripcije, regulaciju proteina transkripcijske mašinerije i komponenata koji modificiraju strukturu kromatina. Jedna od uloga sumoilacije histona je gen-specifična negativna kontrola, gdje sumoilacija pomaže u održavanju niske razine transkripcije. Druga negativna regulatorna uloga sumoilacije je povećanje intenziteta utišavanja telomera. Treće, sumoilacija histona je u negativnoj korelaciji s acetilacijom i ubivkitinacijom histona. Smanjenje sumoilacije rezultira povećanjem acetilacije (Nathan, 2006).

2.4. RNA interferencija (RNAi)

RNAi je jednostavna i brza metoda utišavanja gena kod raznolikih organizama. Utišavanje gena je posljedica razgradnje RNA u kratke RNA koji aktiviraju ribonukleaze koje ciljaju na mRNA. Utišavanje gena se povezuje s regulatornim procesima poput utišavanjem transpozona, mehanizmima obrane od virusa, regulacije gena i modifikacije kromosoma. Genetička i biokemijska analiza je otkrila mehanizam od dva koraka utišavanja gena pomoću RNAi. Prvi korak uključuje degradaciju dsRNA u male interferirajuće RNA (siRNA), duge 21-25 nukleotida pomoću aktivnosti poput Rnaze III. U drugom koraku, siRNA se pridružuju kompleksu RNaze, RISC (*engl. "RNA-induced silencing complex"*), koji dolazi na mRNA i razlaže ju (Slika 7). Neke ključne komponente RNA interferencije su otkrivene kod različitih organizama; Dicer, RNA-ovisna RNA polimerala, helikaze i dsRNA endonukleaze. Neke od ovih komponenata kontroliraju razvoj mnogih organizama procesuirajući mnoge nekodirajuće RNA zvane mikro-RNA. Članovi obitelji Rnaza III su jedne od malog broja nukleaza koje imaju specifičnost za dsRNA. Dicer je enzim iz obitelji Rnaza III i dobio je naziv prema sposobnosti razgradnje dsRNA u manje RNA (siRNA). Evolucijski su ovi enzimi sačuvani u

muhama, gljivama, biljkama i sisavcima. Dicer ima 4 specifične domene: amino-terminalnu helikaznu domenu, dvostruku RNaznu sekvencu, dsRNA vezanu domenu i PAZ domenu.



Slika 7. Mehanizam RNA interferencije (Cooper, 2010).

RNAi tehnologija se dokazuje kao korisna u brzim analizama funkcija mnogih gena u raznovrsnim organizmima. Pomoću RNAi su se uspjeli zabilježiti geni na kromosomima I i III kod vrste *Caenorhabditis elegans* koji su uključeni u diobu stanice i embrionalni razvitak (Agrawal, 2003).

2.5. Epigenetika i bolesti

Epigenetičke promjene su potrebne za normalan razvoj i zdravlje, no one također mogu biti odgovorne za mnoge bolesti. Poremećaj bilo koje epigenetske promjene može uzrokovati abnormalnu aktivaciju ili utišavanje gena. Takvi poremećaji su povezani sa tumorima, sindromima vezanim za nestabilnost kromosoma, mentalnom retardacijom, itd.

2.5.1. Epigenetika i tumori

Prva bolest povezana s epigenetikom je tumor. 1983. godine znanstvenici su otkrili da bolesno tkivo pacijenta s kolorektalnom tumorom je imalo manje metiliranu DNA nego normalno tkivo. Zbog toga što su metilirani geni većinom utišani, gubitak metilacije DNA može

uzrokovati abnormalno visoku aktivaciju gena. S druge strane, prevelika metilacija može spriječiti zaštitnu ulogu gena koji potiskuju tumore.

DNA metilacija se odvija na CpG mjestima, a većina CpG citozina je kod sisavaca metilirana. Kakogod, postoje mjesta na DNA blizu promotorskih regija koje imaju veću koncentraciju CpG-a (CpG otoci) koji su u normalnim stanicama nemetilirani. U tumorskim stanicama ti CpG otoci bivaju pretjerano metilirani uzrokujući da geni budu utišani. Ova abnormlanost je zaštitni znak epigenetskih promjena koji se pojavljuje u tumorima i pojavljuje se u ranim stadijima razvoja tumora. Hipermetilacija CpG otoka može potaknuti razvoj tumora utišavajući tumor-supresorske gene. Zapravo, svi ovi tipovi promjena mogu biti učestaliji u tumorskim stanicama nego sama mutacija DNA sekvence.

Nadalje, iako epigenetske promjene ne mijenjaju sekvencu DNA, mogu uzrokovati mutacije. Oko polovice gena koji uzrokuju obiteljske ili nasljedne oblike tumora su ugašeni metilacijom. Većina tih gena normalno potiskuje stvaranje tumora i pomaže pri popravku DNA, uključujući O^6-metilgvanin-DNA-metiltransferaze (MGMT), mutL homolog 1 (MLH1) ciklin-ovisna-kinaza inhibitor 2B (CDKN2B), i RASSF1A (*engl. "Ras assosiation domain-containing protein 1"*). Primjerice, hipermetilacija promotora MGMT uzrokuje povećanje G-A mutacija.

Hipermetilacija može dovesti do nestabilnosti mikrosatelita, koji su ponavljajuće sekvence DNA. Mikrosateliti su česti u normalnim DNA i uglavnom se sastoje od ponavljajućih citozin-adenin dinukleotida. Previše metilacije na promotoru gena za popravak DNA MLH1 može uzrokovati nestabilnost mikrosatelita i produljiti ili skratiti ih. Nestabilnost mikrosatelita se povezuje s razvojem mnogih tumora, uključujući kolorektalni, endometrijalni, tumor jajnika i želuca (Trošelj, 2009).

2.5.2. Epigenetski lijekovi

Sama činjenica da su epigenetske promjene reverzibilne, otvara mogućnost novom epigenetskom liječenju. Nadalje, s obzirom da je reverzibilnost procesa temelj kemoprevencije, epigenetski bi pristup vrlo brzo mogao u potpunosti promijeniti naše sadašnje shvaćanje kemoprevencije.

Trenutno postoje dvije vrste epigenetskih lijekova: inhibitori DNA metiltransferaza i inhibitori histon-deacetilaza. Prva skupina lijekova poznata je pod nazivom "demetilatori" koji svoje djelovanje ostvaruju ugradnjom u molekulu DNA, tijekom njene replikacije. Ovo im omogućuje njihova kemijska struktura po kojoj su vrlo slični citozinu. Posljedica njihove

ugradnje u novonastajući lanac molekule DNA je "zarobljavanje" DNA metiltransferaze, zbog čega dolazi do gubitka njezine aktivnosti, a cijeli sustav postaje hipometiliran. Na tržištu SAD-a se nalaze dva lijeka, derivata citozina hipometilatora koje je odobrila FDA: Vidaza i Dacogen. Prva indikacija za primjenu ovih dvaju lijekova je mijelodisplastični sindrom (MDS). Dok se Dacogen veže samo na molekulu DNA, Vidaza se veže i za molekulu RNA, pa negativno utječe na translaciju u citoplazmi. Oba lijeka svoj terapijski učinak prvenstveno ostvaruju hipometilacijom promotora gena koji su neophodni za diferencijaciju, ali i izravnim citotoksičnim učinkom na hematopoetske stanice u koštanoj srži koje su u potpunosti izgubile regulatorne mehanizme uključene u kontrolu staničnog ciklusa i zbog toga postale u potpunosti neosjetljive na podražaje fiziološkim signalima rasta. Neproliferirajuće stanice su relativno neosjetljive na Vidazu (Trošelj, 2009).

2.6. Epigenetika i prehrana

Epigentičke preinake mogu nastati kao odgovor na poticaje iz okoliša, a jedan od najvažnijih takvih poticaja je prehrana. Točan mehanizam utjecaja prehrane na epigenetiku nije u potpunosti razjašnjen, ali neki su primjeri dobro proučeni.

Tijekom zime između 1944. i 1945. godine, Nizozemci su patili od strašne gladi zbog njemačke okupacije. Nutritivni unos bio je niži od 1000 kalorija dnevno. Djeca su se rađala čak i u ovakvim uvjetima, a ta su djeca danas odrasli ljudi. Na temelju nedavnih studija ustanovljeno je da ovi pojedinci koji su bili izloženi kalorijskom deficitu u majčinom tijelu, imaju višu stopu kroničnih bolesti, kao što su dijabetes, bolesti krvožilnog sustava i pretilost, u usporedbi sa svojim braćom. Čini se da su prvi mjeseci trudnoće imali najznačajniji utjecaj na rizik od razvoja bolesti. Točna priroda epigenetičkih preinaka još nije razjašnjena, ali otkriveno je da ljudi koji su bili izloženi gladi u majčinu tijelu imaju nižu razinu metilacije gena uključenog u metabolizam inzulina (faktor rasta sličan inzulinu II) od svoje braće (Heijmans, 2008). Ovo ima iznenađujuće posljedice: iako su genetičke promjene teoretski reverzibilne, neke promjene koje nastaju tijekom razvoja embrija mogu se zadržati i tijekom života odraslog čovjeka, čak i kada nisu više korisne, nego mogu postati i štetne. Neke od ovih promjena mogu se čak i zadržati nekoliko generacija, djelujući na unučad žena izloženih gladi (Painter, 2008).

Utjecaj rane prehrane na epigenetiku također su jasno vidljivi kod pčela. Neplodne pčele radilice i plodne matice se ne razlikuju genetički, već po prehrani u stadiju ličinke. Ličinke koje će postati matice isključivo se hrane matičnom mliječi koju proizvode radilice. Takva prehrana vodi do promjene genetskog programa i pčela postaje plodna.

Nedovoljan unos folne kiseline također utječe na razvoj čovjeka i može dovesti do stanja kao što su spina bifida (deformacija kralježničkog stupa) i drugih poremećaja neuralne cijevi. Da bi se izbjegli ovakvi poremećaji, folna kiselina se posebno preporuča trudnicama i ženama koje žele zatrudnjeti (Hayes, 2009).

Brokula i ostalo povrće iz porodice *Cruciferae* sadrži izotiocijanide, koji mogu povisiti razinu acetilacije histona. Soja je izvor izoflavona koji se zove genistein i smatra se da može niziti metilaciju DNA nekih gena. Polifenoli iz zelenog čaja imaju mnoge biološke akivnosti, primjerice inhibiciju metilacije DNA. Kurkumin, sastojak kurkume (*Curcuma longa*), može imati raznolike utjecaje na aktivnost gena jer inhibira metilaciju DNA, ali također utječe na acetilaciju histona. Većina informacija o ovim tvarima koju imamo do sada prikupljena je eksperimentima *in vitro* (Gerhauser, 2013).

Epidemiološke studije pokazuju da populacije koje unose veće količine neke od ove hrane pokazuju smanjenu sklonost određenim bolestima. No, većina ovih tvari ima utjecaj i na druge biološke funkcije, a ne samo na epigenetiku. Određena hrana može sadržavati različite biološki aktivne tvari pa je teško izravno zaključiti što je utjecaj na epigenetiku, a što je sveukupni utjecaj na tijelo. Osim toga, hrana prolazi kroz transformaciju u našem probavnom sustavu i nije poznato koja količina aktivnih tvari zapravo uspije doći do svojih molekularnih ciljeva (Esteller, 2007).

Prehrana bogata voćem i povrćem je zdrava za svakodnevni život, no čini se da takva prehrana ima značajno veću važnost jer utječe na naše dugoročno zdravlje i životni vijek.

3. ZAKLJUČAK

Epigenetika je važna grana biologije koja objašnjava pojave u genomu koje su programirane epigenomom. Genom je potpuna genetička informacija, a epigenom uključuje modifikacije povezane s genomskom DNA koje ne uključuju promjene u slijedu baza. Te modifikacije omogućuju prilagodljivost i uvjetuju mnoge pojave kao rast, smrt, diferencijaciju, akomodacije itd.

Glavni epigenetski mehanizmi su metilacija DNA, modifikacija histona i RNA interferencija. Svi oni reguliraju ekspresiju gena na različit način. Osim regulacije koja se

pozitivno odražava na organizam, događaju se modifikacije koje imaju štetan učinak što dovodi do bolesti. Utvrđeno je da prehrana također utječe na epigenetičke promjene.

Dakle, epigenetička istraživanja su vrlo bitna jer se na temelju otkrića mijenja pristup prema raznim bolestima i one se brže i lakše mogu izliječiti.

4. LITERATURA

Ahn, J., Lee, J. 2008. X chromosome: X inactivation. *Nat Educat* 1:24.

Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, K. R., Mukherjee, K. S. 2003. Rna Interference; Biology, mechanism and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 657-685.

Bagić, I. 2015. Utjecaj prehrane majke na epigenom djeteta. Medicinski fakultet, Zagreb, 1-8.

Capuano, F., Műlleder, M., Kok, R., Blom, H. J., Rasler, M. 2014. Cytosine DNA methylation is found in Drosophila melanogaster but absent in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomycer pombe*, and other yeast species. *Anal Chem* 86: 3697-3702.

Cooper, G. M., Hausman, R. E. 2010. Stanica: molekularni pristup. Medicinska naklada, Zagreb, 824 pp.

Dokmanović, M., Clarke, C., Marks, P. A. 2007. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Molecular Cancer Research* 5: 981-9.

Esteller, M. 2007. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Human Molecular Genetics.* 16:50-59.

Gerhauser, C. 2013. Cancer chemoprevention and nutri-epigenetics: state of the art and future challenges. *Topic in Current Chemistry.* 329: 73-132.

Greer, E. L., Shi, Y. 2012. Histone methylation: a dinamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet* 13: 343-357.

Hayes, E., Maul, H., Freerksen, N. 2009. Folic acid: why school students need to know about it. *Science in school.* 13: 50-64.

Heijmans, B. T., Tobi, E. W., Stein, A. D., Putter, H., Blauw, G. J., Susser, E. S., Slagboom, P. E., Lumey, L. H. 2008. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *P N A S USA.* 105: 17046-17049.

Jaenisch, R., Bird, A. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33: 245-54.

Kalac, M. 2010. Uloga epigenetske usmjerene terapije u liječenju difuznog B-velikostaničnog limfoma. Medicinski fakultet, Zagreb.1-9.

Kuo, M. H., Allis, C. D. Roles od histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. 1998. *Bioessays* 20: 615-26.

Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, E. D., Bylebyl, R. G., Dokmanovic, M., Dorsey, A. J., Whelan, A. K., Krsmanovic, M., Lane, S. W., Meluh, B. P., Johnson, S. E., Berger, S. L. 2006. Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modification. *Genes Dev* 20: 966-976.

Painter, R. C., Osmond, C., Gluckman, P., Hanson, M., Phillips, D. I., Roseboom, T. J. 2008. Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. *BJOG: Int J Obstet Gynaecol* 115: 1243-1249.

Rossetto, D., Avvakumov, N. 2012. Histone phosphorylation: A chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics* 7: 1098-1108.

Szyf, M. 2009. Epigenetics, DNA methylation and chromatin modifying drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49: 243-63.

Trošelj, G. K., Kujundžić, N. R., Grbeša, I. 2009. *Medicina*. 45: 127-135.

Weinhold, B. 2006. Epigenetics: The Science of Change. *Environ Health Perspect* 114: A160-A167.

Zhang, Y. 2016. Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes Dev* 17: 2733-2740.

Web stranice

Web 1. http://neuron.mefst.hr/docs/katedre/imunologija/2015-16/Farmacija/Molekularna%20biologija%20s%20genetikom/F_2015_Epigenetika.pdf