

## WPŁYW METYLACJI DNA NA FUNKCJONOWANIE GENOMU

Marcin Łukasik<sup>1\*</sup>, Jolanta Karmalska<sup>1</sup>, Mirosław M. Szutowski<sup>1</sup>, Jacek Łukaszkiwicz<sup>2</sup>

Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

<sup>1</sup> Katedra i Zakład Toksykologii

<sup>2</sup> Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej

\*Autor korespondujący, tel./faks: +22 5720760, e-mail: [marcin.lukasik@wum.edu.pl](mailto:marcin.lukasik@wum.edu.pl)

Otrzymany 17.11.2008; zaakceptowany 22.12.2008; zamieszczony 26.02.2009

### STRESZCZENIE

W biochemii metylacja odnosi się do zamiany atomu wodoru na grupę metylową. Metylacja DNA jest typem modyfikacji DNA, która może zostać odziedziczona i później usunięta bez zmiany oryginalnej sekwencji DNA. Zostało udowodnione, że metylacja DNA występuje w wielu istotnych biologicznych procesach, takich jak regulacja imprintingu rodzicielskiego, unieczynnienie chromosomu X czy rozwój nowotworów. Artykuł stanowi przegląd informacji o procesie metylacji.

**SŁOWA KLUCZOWE:** metylacja DNA, genom, imprinting

### ABSTRACT

#### EFFECT OF DNA METHYLATION ON GENOME FUNCTION

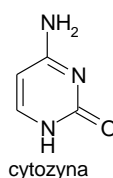
In biochemistry, methylation refers to the replacement of a hydrogen atom with a methyl group. DNA methylation is a type of chemical modification of DNA that can be inherited and subsequently removed without changing the original DNA sequence. It has been demonstrated that DNA methylation is involved in a number of biological processes such as parental imprinting, X chromosome inactivation, and development of tumors. In this article, the present knowledge on the methylation process is reviewed.

**KEYWORDS:** DNA methylation, genome, imprinting

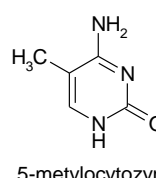
### WPROWADZENIE

Metylacja jest poreplikacyjną enzymatyczną modyfikacją DNA. Proces ten należy do zmian epigenetycznych, które w odróżnieniu od genetycznych nie zależą od sekwencji DNA i polegają na zmianie funkcji lub ekspresji genu. Są to zmiany odwracalne. Oprócz metylacji do tych zmian należy zmiana struktury chromatyny spowodowana modyfikacją białek histonowych.

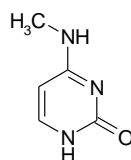
Metylacja to proces kowalencyjnego przyłączania grup metylowych do zasad azotowych nukleotydów. W procesie tym uczestniczą enzymy przenoszące grupy metylowe (metylotransferazy). Najczęściej produktami metylacji są: C<sup>5</sup>-metylocytosyna (m<sup>5</sup>C), N<sup>6</sup>-metyloadenina (m<sup>6</sup>A) i N<sup>4</sup>-metylocytosyna (m<sup>4</sup>C), przy czym m<sup>4</sup>C występuje w obrębie Procaryota, m<sup>5</sup>C u Procaryota i Eucaryota, a m<sup>6</sup>A u Procaryota i zasadniczo u niższych Eucaryotów (bezkęgowców) [6], chociaż niektóre badania dowodzą, że wykryto je u alg, grzybów, porostów i roślin [19]. W wyizolowanym materiale DNA wielu roślin wyższych znaleziono m<sup>6</sup>A i udowodniono, że w przeciwieństwie do zwierząt, mitochondria roślinne zawierają DNA-metylotransferazę adeninową, ale nie zawierają DNA-metylotransferazy cytozynowej [19].



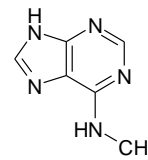
cytozyna



5-metylocytosyna



N<sup>4</sup>-metylocytosyna



N<sup>6</sup>-metyloadenina

Ryc. 1. Substrat i produkty metylacji DNA.

### ROLA DNA - METYLOTRANSFERAZ W PROCESIE METYLACJI

Proces metylacji jest przeprowadzany przy udziale enzymów przenoszących grupy metylowe: DNA-metylotransferaz (DNMT) adenino- i cytozyno- specyficznych. Enzymy te katalizują przyłączenie się grup metylowych pochodzących od donora S-adenozylu-L-metioniny (Ado-

Met) do węgla C5 w obrębie pierścienia pirymidynowego cytozyny lub do grupy aminowej adeniny (N6) lub cytozyny (N4) [19]. Produktami tych reakcji są: zmetylowany DNA i S-adenozyl-L-homocysteina (AdoHcy) [14].

DNA - metylotransferazy to rodzina enzymów, do których zalicza się DNMT1, DNMT2, DNMT3A i DNMT3B [11] oraz DNMT3L [19]. DNMT1 katalizuje 97-99,9% procesu metylacji zachodzącego podczas mitozy. Enzym ten jest odpowiedzialny za przekazanie stałego profilu metylacji. Rozpoznaje hemimetylowane dinukleotydy CpG na matczynej i potomnej nici DNA i przenosi grupy metylowe z AdoMet do cytydyny zlokalizowanej na niezmetrylowanej nici potomnej [19]. DNMT2, czyli TRDMT1, pomimo strukturalnego podobieństwa do innych DNMT, nie ma właściwości katalitycznych [7].

DNMT3A i 3B są odpowiedzialne za metylację *de novo* [12]. Enzymy te są szczególnie ważne w rozwoju embrionalnym, kiedy to ustala się wzór metylacji. Ich rola w dojrzałych komórkach jest nie do końca wyjaśniona. Podejrzewa się, że DNMT3B podtrzymuje metylację pericentrycznej heterochromatyny. DNMT3L pośrednio uczestniczy w procesie metylacji DNA. Nie ma właściwości katalitycznych, ale stymuluje aktywność metylotransferaz *de novo* i zwiększa ich powinowactwo do DNA [18].

#### DINUKLEOTYDY I WYSPIY CPG

W genomie kręgowców około 70-80% dinukleotydów CpG ma grupę metylową przyłączoną do cytozyny [14], co sprawia, że kodowane przez te sekwencje geny są niedostępne dla komórkowych układów transkrypcyjnych [8]. Metylacja na odcinkach CpG zachodzi symetrycznie na obu niciach, tylko niewielka liczba sekwencji CpG jest metylowana asymetrycznie [18]. W genomie występują krótkie (1000-1500 pz) odcinki DNA niezwykle bogate w dinukleotydy CpG zwane wyspami CpG [14]. Chromatyna zawierająca wyspy CpG jest silnie zacetylowana. Taką strukturę chromatyny nazywa się otwartą i może być ona konsekwencją interakcji czynników transkrypcyjnych z genami promotorowymi. Około połowa wszystkich ludzkich genów zawiera wyspy CpG: są to tzw. housekeeping genes (niezbędne do funkcjonowania komórki) i specyficzne tkankowe geny (ok. 40% wszystkich tkankowych genów) [18].

Wyspy CpG znajdują się na końcu 5' w regionach promotorowych genów mających zasadnicze znaczenie dla czynności komórki [8]. Z reguły są to geny regulatorowe i nie ulegają metylacji [14, 18]. Brak metylacji w regionach promotorowych bywa warunkiem wstępnym dla kontrolowanej, aktywnej transkrypcji genów. Metylacja wysp CpG może skutkować brakiem lub zaburzoną syntezą produktów tych genów [8].

#### METYLACJA W TRAKCIE ROZWOJU ORGANIZMU

Największa część metylacji DNA zachodzi w fazie S cyklu komórkowego [20]. Wzór metylacji DNA jest charakterystyczny dla typu komórki i podlega silnym zmianom podczas rozwoju embrionalnego. Metylacja odgrywa znaczącą rolę w regulacji ekspresji genów podczas embriogenezy u ssaków i dalej podczas różnicowania komórek [2]. O tym jak istotny dla rozwoju organizmu jest ten proces świadczy fakt, iż myszy pozbawione genu DNA-

metylotransferazy umierają w ciągu ośmiu dni od zapłodnienia [18].

Metylacja jest procesem dynamicznym: w zygocie niezwłocznie po zapłodnieniu następują silne zmiany obejmujące acetylację histonów i demetylację DNA. W stadium wczesnego embrionu następuje dramatyczna redukcja poziomu metylacji (tzw. globalna demetylacja). Po implantacji następuje fala metylacji *de novo* większości CpG [18]. Tak dzieje się w przypadku genomu męskiego, w genomie żeńskim w tym czasie zachodzi pasywna demetylacja [14]. Podczas gastrulacji geny specyficzne tkankowo są w odpowiednich tkankach demetylowane i ulegają ekspresji, ale należy podkreślić, że większość genomu pozostaje nadal zmetylowana. Kolejny etap intensywnej metylacji *de novo* zależy od płci i zachodzi podczas gametogenezy. Niewielki spadek metylacji zaobserwowano w stadium postembrionalnym podobnie jak *in vitro* w starzejących się komórkach [18].

#### WPLYW WIEKU NA POZIOM METYLACJI

Metylacja jest gatunkowo-, tkankowo-, organello-specyficzna, lecz obserwuje się także zależność metylacji od wieku, zarówno u zwierząt, jak i u roślin. Vanyushin i wsp. [19] już w 1967 roku opublikowali badania dowodzące, że u łososia poziom metylacji z wiekiem zmniejsza się. Dalsze badania większości organów bydła i szczurów potwierdziły te doniesienia. Kolejne amerykańskie i japońskie badania dowiodły, że wiele mysich organów również wykazywało obniżanie się poziomu metylacji z wiekiem.

Obecnie niektórzy naukowcy traktują poziom metylacji jako wskaźnik wieku lub narzędzie do przewidywania długości życia. Nieprawidłowa metylacja może prowadzić do przedwczesnego starzenia [19].

#### ZNACZENIE METYLACJI

Metylacja jest związana z następującymi procesami:

- Imprinting rodzicielski
- Inaktywacja chromosomu X w komórkach samic ssaków łożyskowych
- Regulacja ekspresji genu
- Modulacja struktury chromatyny

Zaburzenia metylacji są przyczyną chorób dziedzicznych, np. zespołów Angelmana, Pradera-Williego, Beckwitha-Wiedemana, a także transformacji nowotworowych [3], ICF (*facial anomalies syndrome* - zespół niedoboru odporności, niestabilności centrometrów i anomalii twarzy), syndromu Retta i zespołu łamiwego chromosomu X [6].

##### 1. Imprinting rodzicielski

Imprinting rodzicielski, inaczej piętno genomowe lub piętno rodzicielskie prowadzi do różnicowej ekspresji alleli niektórych genów pochodzących od matki i od ojca [3]. Istnieje wiele genów, których ekspresja zależy od tego, na którym allelu - pochodzącym od matki czy od ojca - się znajdują. Dwa allele imprintowanych genów różnią się stopniem metylacji DNA, strukturą chromatyny (modyfikacja histonów, nadwrażliwość na nukleazę) i czasem replikacji. Cechą imprintingu jest dziedziczność podczas podziałów komórkowych i odwracalność podczas gametogenezy [14]. Obecnie znanych jest ok. 30 genów

Tabela 1. Przykłady genów podlegających imprintingowi [15, 16].

| Gen   | Wyciszany allel | Różnice w ekspresji                             |   |
|---|-----------------|---|---|
|   |                 | Imprinting                                      | Ekspresja bialleliczna                    |
| <i>IGF2</i><br>(insulinopodobny czynnik wzrostu typ2) | Matczyny        | W większości tkanek                             | W wątrobie, mózgu i chondrocytach         |
| <i>PEG1/MEST</i>                                      | Matczyny        | W tkankach płodu                                | W tkankach, we krwi u dorosłych osobników |
| <i>UBE3A</i><br>(ligaza ubikwityna-białko)            | Ojcowski        | Tylko w mózgu                                   | W większości tkanek                       |
| <i>KCNQ1</i><br>(białko związane z kanałem potasowym) | Ojcowski        | W większości tkanek                             | W sercu                                   |
| <i>WT1</i><br>(gen nowotworu Wilms'a)                 | Ojcowski        | Częsty imprinting w komórkach łożyska i w mózgu | W nerce                                   |

Na podst. [15] i Tom Strachan, Andrew P. Read, Human Molecular Genetics 2.

występujących u ludzi i u myszy podlegających imprintingowi [15].

Jednym z najlepszych modeli używanych do badania procesu imprintingu jest system genów H19/IGF2. H19 i IGF2 to 2 geny zlokalizowane w odległości około 90 par zasad. Gen H19 ulega transkrypcji tylko gdy jest zlokalizowany na chromosomie matczynym, za to IGF2 odwrotnie, tylko gdy znajduje się na chromosomie ojcowskim. Kluczową rolę w regulacji tych genów odgrywa odcinek złożony z 2 tysięcy par zasad DNA zlokalizowany tuż przed regionem promotorowym genu H19. Ten fragment nazywany jest DMR (Differentially Methylated Region), ponieważ jest silnie zmetylowany na ojcowskim chromosomie, a niezmetylowany na matczynym.

Zgodnie z zasadą dziedziczenia geny podlegające ekspresji z ojcowskiego allelu stymulują wzrost i różnicowanie komórek, a geny z matczynego allelu mają działanie przeciwnie. Na przykład: usunięcie genów PEG1/MEST lub PEG3 z ojcowskiego chromosomu prowadzi do zaburzenia wzrostu. Usunięcie genu H19 powoduje nadmierny rozrost płodu.

Prawidłowa ekspresja genów podlegających imprintingowi jest bardzo ważna w ontogenezie. Każda nieprawidłowość może powodować nowotwory lub takie genetyczne zaburzenia, jak zespoły Prader-Willy'ego, Angelmana i Bechwith-Wiedemann'a [14].

## 2. Inaktywacja chromosomu X w komórkach samic ssaków łożyskowych

Samice ssaków łożyskowych posiadają dwie kopie chromosomu X. Inaktywacja chromosomu X jest mechanizmem kompensacyjnym, wyrównującym poziom ekspresji genów zlokalizowanych na chromosomach płciowych. Oba chromosomy są aktywne w stadium wczesnego zarodka. Później w komórkach płodu dochodzi do losowej inaktywacji jednego chromosomu X. Zmiany te są przekazywane podczas podziałów mitotycznych [15].

W odróżnieniu od imprintingu inaktywacja chromosomu X obejmuje cały chromosom. Proces ten jest kierowany przez Xic (*X-inactivation center*). Xic zawiera 2 ważne geny: XIST i TSIX kodujące nieulegające translacji mRNA. TSIX jest zlokalizowany w regionie 3' XIST i jego mRNA jest antysensowym transkryptem dla XIST mRNA.

Początkowo XIST i TSIX ulegają ekspresji równolegle z obu chromosomów X, ale represja transkrypcji TSIX na jednym z chromosomów X prowadzi do zwiększenia poziomu ekspresji XIST i dalej do tworzenia się XIST mRNA w chromosomie X, substytucji histonu H2A poprzez macro-H2A i metylacji lizyny w pozycji 9. i 27. histonu H3.

Inaktywacja genów zlokalizowanych na chromosomie X następuje podczas rozprzestrzeniania się nieaktywnej struktury chromatyny wzdłuż chromosomu. Jest to proces, który obejmuje działanie różnych czynników, w tym modyfikację histonów i częściową metylację wysp CpG powiązanych z promotorami tych genów [14].

Nieaktywny chromosom ulega aktywacji w profazie I podziału mejotycznego w komórkach linii płciowej [15].

## 3. Regulacja ekspresji genów i modulacja struktury chromatyny

Metylacja DNA powoduje na ogół wyciszenie ekspresji genów. Wiąże się to ze zmianą struktury chromatyny na nieaktywną, skondensowaną (heterochromatyna). Białka MeCPs (*Methyl-CpG-Binding Proteins*) wiążą się ze zmetylowanym DNA poprzez domeny wiążące fragment zmetylowany (*MBD-Methyl Binding Domain*). MeCPs oddziałują z deacetylazą histonów oraz kompleksami remodelującymi chromatynę. Dokładny mechanizm tego procesu nie jest poznany. Skutkiem powyższych zmian jest deacetylacja histonów i metylacja lizyny 9. histonu H3.

## 4. Wpływ metylacji na rozwój nowotworu

Podczas powstawania nowotworu epigenotyp komórki znacząco zmienia się. Możliwe są następujące zmiany w metylacji DNA:

- Hipermetylacja wysp CpG
- Hipometylacja genów normalnie zmetylowanych [8, 14] (globalna demetylacja genów i lokalna w genach promotorowych)
- Tranzycja: 5-metylocytozyna do tyminy i metylacja „non-CpG” w komórkach nowotworowych
- Indukcja niestabilności chromosomów - poprzez nieprawidłowy poziom metylacji dochodzi do zmienności poziomu ekspresji genów, co objawia się niestabilnością

bilnością chromosomów i stymuluje tym samym rozwój nowotworu [18].

### Hipometylacja

Wpływ hipometylacji na onkogenezę wyraża się nadekspresją onkogenów spowodowaną demetylacją regionów promotorowych tych onkogenów. W ten sposób dochodzi do nadmiernej stymulacji proliferacji komórkowej [8].

W raku jelita grubego stwierdzono redukcję ogólnej metylacji o 10-30%, a w przednowotworowych stadiach gruczolaka zaobserwowano znaczące zmniejszenie ilości 5-metylocytozyny. Hipometylacja powyżej 50% występuje w nowotworach klatki piersiowej. Przy nowotworach krwi hipometylacja występuje w przewlekłej białaczce limfocytowej (CLL), podczas gdy w przewlekłej (CML) i ostrej białaczce szpikowej (AML) oraz w szpiczaku mnogim występuje tylko niewielka zmiana w schemacie metylacji DNA.

Globalna demetylacja występuje we wczesnych stadiach nowotworów klatki piersiowej, jelita grubego i CLL. W raku jelita grubego ponadto hipometylacja występuje w zdrowych tkankach przylegających do guza. W innych nowotworach np. raku wątrobowokomórkowym hipometylacja wzrasta wraz z zaawansowaniem i stadium histologicznym guza.

Hipometylacja specyficznych genów występuje w nowotworach jelita okrężnicy, trzustki, klatki piersiowej, żołądka, prostaty i w białaczce. Z reguły są to geny regulujące wzrost, kodujące enzymy, ważne dla rozwoju organizmu, geny tkankowospecyficzne i onkogeny [18].

### Hipermetylacja

Najczęstszymi miejscami podlegającymi hipermetylacji w różnych rodzajach nowotworów są chromosomy 3p, 11p i 17p [18]. Zjawisko to zachodzi w obrębie wysp CpG, które normalnie w genomie pozostają niemetylowane. Najważniejszą tego konsekwencją jest wyciszenie funkcji genów supresorowych [8].

Przykładem może być hipermetylacja promotora genu p16 (INK4A), która występuje w wielu nowotworach. p16 jest inhibitorem kinazy cyklicznej, który negatywnie reguluje przejście komórki z fazy G1 do S. Zatem nieprawidłowa ekspresja prowadzi do zaburzeń cyklu komórkowego i utratą kontroli nad nim, co stymuluje proliferację i wpływa na rozwój nowotworu [14]. Zjawisko to zachodzi w nowotworach: pęcherza moczowego, nosa i gardła, trzustki, jelita grubego, płuc, czerniaka, glejaka i białaczce [18]. W kancerogenezie raka gruczolowego przetyku metylacja promotora genu p16 może pojawiać się już w stadium metaplastji [8].

Z kolei represja transkrypcji innego genu, MLH1, kodującego O<sup>6</sup>-metyloguanino-DNA-metylotransferazę powoduje zwiększenie częstości mutacji i w rezultacie nieprawidłową ekspresję innych genów [14].

Przeprowadzono badanie profilu hipermetylacji 15 nowotworów: okrężnicy, żołądka, trzustki, wątroby, nerki, płuca, głowy, szyi, piersi, jajników, pęcherza moczowego, endometrium, mózgu, chłoniaka i białaczki. Analiza obejmowała 3 grupy genów:

- Geny supresorowe: p16, p15, p14, p73, APC (gen polipowatości jelita grubego) i BRCA1

- Geny odpowiedzialne za naprawę DNA lub metabolizm ksenobiotyków: hMLH1, GSTP1 (gen transferazy S-glutathionu klasy p), MGMT
- Geny odpowiedzialne za inwazyjność i przerzuty: CDH1, TIMP3, DAPK

Metylacja w przynajmniej jednym genie była obecna w każdym typie nowotworu. Profile metylacji były zależne zarówno od genu jak i od nowotworu. Niektóre geny, np. p16, MGMT, DAPK były zmetylowane w różnych typach nowotworów (okrężnicy, płuca, głowy, szyi, jajników, pęcherza moczowego, chłoniaka i białaczki). Hipermetylacja p14, APC [18], p16, MGMT, hMLH1 [5] występowała w nowotworach przewodu pokarmowego (okrężnica, żołądek), a GSTP1 w steroidozależnych nowotworach (piersi, wątroby, prostaty) [18].

Inne badanie potwierdziło powyższe doniesienia. Metylacja zależy od typu nowotworu w przypadku następujących genów:

- BRCA1- rak piersi i jajników
- hMLH1- rak odbytu, endometrium, żołądka
- p73 i p15 w białaczce [5]

### Metylacja „non-CpG” w komórkach nowotworowych

W mysich embrionalnych komórkach macierzystych występuje metylacja niezwiązana z sekwencjami CpG. Za ten proces najprawdopodobniej odpowiada DNMT3. DNMT3A i DNMT3B są odpowiedzialne za metylację *de novo*, która może występować w dinukleotydach CpA, CpC i CpT znajdujących się w DNA komórek embrionalnych macierzystych i w episomalnym DNA [18].

Sugeruje się, że metylacja „non-CpG” katalizowana przez DNMT3 może występować w ludzkim genie p53. To zjawisko występuje w tkankach przylegających do nowotworu płuca, co wskazuje, że metylacja „non-CpG” może występować we wczesnym stadium kancerogenezy i służyć jako wskaźnik dla wczesnego rozpoznania procesu nowotworowego [18].

### Tranzycja m<sup>5</sup>C- tymina

m<sup>5</sup>C częściej niż cytozyna ulega spontanicznej deaminacji. Produktem tej reakcji jest tymina (jeden z nukleotydów DNA), podczas gdy deaminacja cytozyny daje uracyl. Uracyl jest usuwany z DNA przez glikozylazę uracylową. Tymina nie jest efektywnie usuwana i jest mutagenem [6, 18], ponieważ powoduje nieprawidłowe połączenia G/T. Deaminacja adeniny i m<sup>6</sup>A daje ten sam produkt: hipoksantynę. Metylacja adeniny nie jest potencjalnym mutagenem czynnikiem [6]. Znaczenie metylacji adeniny u wyższych *Eucaryota* jest nadal mało znane. Sugeruje się, że podobnie jak metylacja cytozyny może ona kontrolować replikację DNA i ekspresję genów [19].

### 5. Zespół Wernera (WS)

Jest to autosomalna recesywna choroba dziedziczna charakteryzująca się przedwczesnym starzeniem i częstym występowaniem nowotworów. Choroba jest spowodowana mutacjami genu WRN, należącego do rodziny RecQ i posiadającego aktywność enzymatyczną helikazy i egzonukleazy [1]. Helikaza WRN odgrywa znaczącą rolę w stabilizacji funkcji telomeru [9]. W komórkach nowotworowych funkcja genu WRN jest zniesiona poprzez wyciszenie na drodze

hipermetylacji wysp CpG w obrębie promotora. Epigenetyczna inaktywacja WRN na poziomie biochemicznym i komórkowym prowadzi do straty egzonukleazowej aktywności WRN, zwiększonej niestabilności chromosomów i apoptozy indukowanej przez inhibitory topoizomerazy. Analiza 630 przypadków różnych nowotworów wykazała, że hipermetylacja wysp CpG genu WRN występowała powszechnie w procesie nowotworzenia w komórkach nabłonkowych i mezenchymalnych. Hipermetylacja WRN w nowotworach okrężnicy świadczyła o dobrej klinicznej odpowiedzi na analog kamptotecyny, irynotekan, inhibitor topoizomerazy [1].

## 6. Inne

Za rozwój zespołu Retta odpowiadają powtarzające się nonsensowne mutacje w regionie MBD (*Methyl binding domain*) MeCP2, proteinie wiążącej zmetylowany DNA [6]. W schizofrenii i chorobie dwubiegunowej zidentyfikowano niemal 100 pozycji ze zmienioną metylacją, większość nich była specyficzna dla płci [4].

Zespół łamliwego chromosomu X jest związany z wielokrotnymi powtórzeniami trinukleotydów CGG w obrębie genu FMR1, te powtórzenia idą w parze z anormalną metylacją tych regionów i w konsekwencji wywołują wyciszenie genu FMR1 [10].

Chroniczne narażenie na nikiel (II), chrom (VI) lub arsen nieorganiczny może także wywoływać modyfikację białek histonowych i zmianę profilu metylacji DNA [13].

## METODY DETEKCJI

Te metody muszą charakteryzować się dużą czułością z uwagi na materiał z jakiego jest izolowany DNA, a także specyficznością, by odróżnić metylację występującą w komórkach nowotworowych od metylacji w komórkach zdrowych. Żadna z metod nie jest uniwersalna, a przy wyborze należy zwrócić uwagę na typ, ilość i jakość materiału biologicznego. Prawidłowy wybór metody powinien minimalizować ryzyko skażenia próbki i zapewnić powtarzalność wyników [16].

Najczęściej stosowane metody to:

- REP - Restriction enzyme PCR
- MS-PCR - Methylation specific PCR
- BSSCP - Bisulfite single-strand conformation polymorphism
- BGS - Bisulfite genomic sequencing [8]
- Inne: MS-nested PCR, Real Time PCR, QAMA, Heavy Methyl, MSHRM

Najważniejszym celem analizy jest zróżnicowanie sekwencji zmetylowanych i niezmetylewanych. Osiąga się to albo przez użycie metylowrażliwego enzymu restrykcyjnego, albo przez chemiczną modyfikację DNA wodorosiarczonym sodem.

Wodorosiarczyn sodu deaminuje cytozynę do uracylu, tej reakcji może też ulegać m5C, z tym że bardzo wolne tworzenie produktu pośredniego znacznie limituje bieg tego procesu. [16]. Następnie określone fragmenty DNA są poddawane allelospecyficznej reakcji PCR (MS-PCR), SSCP (BSSCP) lub sekwencjonowaniu (BGS) [8].

## WYKAZ SKRÓTÓW:

|        |  |
|--------|--|
| m5C    | - C5-metylocytozyna  |
| m6A    | - N6-metyloadenina   |
| m4C    | - N4-metylocytozyna  |
| CpG    | - dinukleotyd cytozyna- guanina  |
| DNMT   | - DNA-metylotransferaza  |
| AdoMet | - S-adenozyl-L-metionina   |
| AdoHcy | - S-adenozyl-L-homocysteina  |
| ICF    | - zespół niedoboru odporności, niestabilności centromerów i anomalii twarzy        |
| DMR    | - region odmiennie zmetylowany   |
| IGF2   | - insulinopodobny czynnik wzrostu typ2   |
| UBE3A  | - ligaza ubikwityna-białko   |
| KCNQ   | - białko związane z kanałem potasowym  |
| WT1    | - gen nowotworu Wilms'a  |
| Xic    | - fragment odpowiedzialny za inaktywację chromosomu X                              |
| MeCPs  | - <i>Methyl-CpG-Binding Proteins</i> - Białka wiążące zmetylowane dinukleotydy CpG |
| MBD    | - domena wiążąca fragment zmetylowany  |
| CLL    | - przewlekła białaczka limfatyczna   |
| CML    | - przewlekła białaczka szpikowa  |
| AML    | - ostra białaczka szpikowa   |
| INK4A  | - promotor genu p16  |
| MLH1   | - gen kodujący O6-metyloguanino-DNA-metylotransferazę                              |
| APC    | - gen polipowatości jelita grubego   |
| GSTP1  | - gen transferazy S-glutatonu klasy p  |
| WS     | - Zespół Wernera   |
| PCR    | - reakcja łańcuchowej polimerazy   |
| MS-PCR | - reakcja łańcuchowa polimerazy wrażliwa na metylację                              |
| BSSCP  | - <i>bisulfite single-strand conformation polymorphism</i>                         |
| BGS    | - sekwencjonowanie genomu wodorosiarczonym sodem                                   |
| QAMA   | - <i>quantitative analysis of methylated alleles</i>                               |
| MSHRM  | - <i>methylation-sensitive high resolution melting</i>                             |

## BIBLIOGRAFIA

1. Agrelo R, Cheng WH, Setien F, Ropero S, Espada J, Fraga M, Herranz M, Paz MF, Sanchez-Céspedes M, Artiga MJ, Guerrero I, Castells A, von Kobbe C, Bohr VA, Esteller M, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA 2006 June 6; 103(23): 8822-8827.
2. Azhikina TL, Sverdlov ED, Biochemistry (Moscow) 2005 May;70(5):596-603.
3. Bulkowska U, [http://www.biol.uw.edu.pl/www/\\_php/index\\_base.php?Screen\\_Option=3&News\\_ID=122](http://www.biol.uw.edu.pl/www/_php/index_base.php?Screen_Option=3&News_ID=122).
4. Connor C, Akbarian S, Epigenetics. 2008 Mar-Apr;3(2):55-58.
5. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG, Cancer Research 2001;61: 3225-3229.
6. Hattman S, Biochemistry (Moscow) 2005 May; 70 (5):550-558
7. Hermann A, Schmitt S, Jeltsch A, The Journal of Biological Chemistry 2003 Aug 22; 278 (34): 31717-31721.
8. Jabłońska J, Jesionek-Kupnicka D, Onkologia Polska 2004; 7(4): 181-185.
9. Kawasaki T, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ, Liu Z, Yamamoto H, Loda M, Fuchs CS, Ogino S, Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology 2008 Feb; 21(2): 150-158.

10. Meijer H, de Graaff E, Merckx DM, Jongbloed RJ, de Die-Smulders CE, Engelen JJ, Fryns JP, Curfs PM, Oostra BA, Human Molecular Genetics 1994 Apr; 3(4):615-620.
11. Mund C, Brueckner B, Lyko F, Epigenetics 2006 Jan- Mar ;1(1):7-13.
12. Reik W, Dean W, Walter J, Science. Washington 2001 Aug 10; 293(5532): 1089-1094.
13. Salnikow K, Zhitkovich A, Chemical Research in Toxicology 2008 Jan; 21(1): 28-44.
14. Salozhin SV, Prokhorchuk EB, Georgiev GP, Biochemistry (Moscow) 2005 May;70(5):525-532.
15. Sikora W, <http://bioinfo.mol.uj.edu.pl/articles/Sikora05>.
16. Strachan T., Read A., Human Molecular Genetics 2, BIOS Scientific Publishers Ltd. 1999.
17. Sulewska A, Niklinska W, Kozłowski M, Minarowski L et al, Folia Histochemica et Cytobiologica Białystok 2007; 45 (4): 315-325.
18. Sulewska A, Niklinska W, Kozłowski M, Minarowski L et al, Folia Histochemica et Cytobiologica Białystok 2007; 45(3): 149-159.
19. Vanyushin BF, Enzymatic DNA, Biochemistry (Moscow) 2005; 70 (5): 488-598.
20. Volpe P, Biochemistry (Moscow) 2005 May ;70 (5):584-595.