

Rola procesu metylacji DNA – praktyczne zastosowania oraz możliwe kierunki badań

Paulina Dudko¹, Krzysztof Nazar²,
Andrzej Junkuszew¹

¹Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

²ALEX-MED Sp. z o.o., Puławy

Przeglądając dostępną literaturę naukową można zauważyć, że większość prowadzonych dotychczas badań związanych z genetyką molekularną dotyczyło genów, a głównie sekwencji kodujących. Powodem tego jest rola, jaką spełniają one w kodowaniu 1-rzędowej struktury białek, czyli sekwencji aminokwasów w białku. Jednak wraz z rozwojem badań odkryto, że niektóre białka mogą odgrywać bardzo ważną rolę w regulacji ekspresji genów poprzez regulowanie dostępności DNA w procesie transkrypcji. Odkrycie, że ekspresja genów nie jest warunkowana tylko przez kod genetyczny DNA, spowodowało rozwój nowej gałęzi genetyki zwanej epigenetyką [16].

Jednym z pierwszych mechanizmów epigenetycznych, którym zaczęli zajmować się naukowcy, był proces metylacji DNA. Udowodniono, że w wyniku metylacji dochodzi do takich procesów, jak wyciszanie genów pojedynczej kopii w czasie rozwoju nowotworu oraz wyciszanie elementów powtarzalnych. W trakcie prowadzenia badań stwierdzono, że istnieją także inne mechanizmy epigenetyczne mające wpływ na wyciszenie genów, które zależą na przykład od modyfikacji histonów. Zainteresowanie tymi procesami jest istotne ze względu na niektóre cechy epigenetycznie wyciszonych genów, do których zaliczyć należy ich stabilność oraz możliwość dziedziczenia somatycznie wyciszonej ekspresji, bez trwałej zmiany w sekwencji zasad. Stwarza to możliwość powrotu do stanu funkcjonalnego, czego nie umożliwia ich wyciszenie na drodze mutacji [22].

U ssaków epigenetyczne modyfikacje obejmują dwie główne grupy: modyfikacje histonów i metylację DNA [4]. Modyfikacje histonów mają bardzo istotne znaczenie w wielu procesach manipulacji i ekspresji DNA. W wyniku badań stwierdzono, że N-końcowe aminokwasy z ogona histonu mogą wystawać i łączyć się z sąsiednim nukleosomem, co powoduje zmianę struktury chromatyny. W histonach rdzeniowych dochodzi do wielu modyfikacji potranslacyjnych, z których najlepiej poznane są acetylowanie, ubikwitynacja, metylacja i fosforylacja [3, 4]. Opisano dwa główne mechanizmy modyfikacji histonów. W pierwszym modyfikacja lub modyfikacje mają bezpośredni wpływ na strukturę chromatyny, w drugim zaś regulacja modyfikacji (pozytywna lub negatywna) jest dokonywana poprzez wiązanie cząsteczek efektorowych [3].

Warto zaznaczyć, że w procesie metylacji oprócz modyfikacji chromatyny cząsteczka DNA jest modyfikowana sama w sobie poprzez przyłączanie grup metylowych ($-CH_3$) do węgla w pozycji 5 pierścienia cytozyny, co prowadzi do powstania metylcytozyny. Metylacja DNA należy do poreplikacyjnych zmian epigenetycznych, których rolą jest zmiana funkcji lub ekspresji genu. Proces ten jest katalizowany przez enzymy DNA metylotransferazy, dla których substratami są dinukleotydy CpG (cytosine that precede the guanosine), czyli sekwencje 5'-CG-3' zwane wyspami CpG [15, 24, 26].

Opisując znaczenie dla organizmu procesu metylacji DNA trzeba podkreślić, że jest ona istotnym mechanizmem regulującym funkcje genomu poprzez modyfikację ekspresji genów w regionach regulatorowych [6]. Naturalnie miejsca, w których ge-

nom jest metylowany nie są przypadkowe. Metylacji nie ulegają na przykład geny odpowiedzialne za podstawowe funkcje komórki, tzw. house keeping genes, które są cały czas aktywne transkrypcyjnie [2]. Natomiast procesowi temu ulegają cytozyny, znajdujące się w obrębie sekwencji CpG i warunkują aktywność pozostałych genów. Komórki eukariotyczne zawierają 60-80% metylowanej cytozyny w obrębie wysp CpG i każda z nich ma charakterystyczny wzór metylacji DNA, który jest przekazywany komórkom potomnym podczas replikacji [23, 27]. Po replikacji grupy metylowe są przyłączane do nici potomnej w tych samych miejscach, w których były przyłączone na nici matczynej, dzięki czemu jest zachowany oryginalny wzór metylacji. Ponieważ dwie cząsteczki nici potomnej są tak samo zmetylowane jak cząsteczka rodzicielska, proces ten nosi nazwę metylacji zachowawczej [11].

Przeprowadzone badania naukowe wykazały, że proces metylacji odgrywa bardzo ważną rolę w wielu procesach życiowych, m.in. ma wpływ na imprinting genomowy, inaktywację chromosomu X u samic ssaków łżyskowych, regulację ekspresji genów i modulację struktury chromatyny, co bezpośrednio przekłada się na rozwój nowotworów, w którym dochodzi do zmiany epigenotypu komórki [10, 15, 24].

Poziom metylacji można analizować na poziomie globalnym, czyli całkowitej zawartości 5-metylocytozyny, wykorzystując matryce do wykrywania zmetylowanego DNA oraz dla specyficznych genów, gdzie określa się poziom zmetylowanych cytozyn zlokalizowanych w określonym genie lub promotorze [17].

Analiza metylacji całego genomu oraz poszczególnych genów jest możliwa dzięki wykorzystaniu technik biologii molekularnej. Techniki wykorzystywane do badania metylacji w całym genomie wymagają dużych ilości DNA, dlatego nie mają zastosowania do analizy biomarkerów. Mogą natomiast znaleźć zastosowanie np. do poszukiwania genów supresorowych guzów nowotworowych [5]. Metody badań dotyczących metylacji można sklasyfikować według następujących kryteriów: zakres analizy w materiale biologicznym (genom, pojedyncze geny) oraz rodzaj zastosowanej techniki: cięcie enzymami restrykcyjnymi wraz z metylacją (w połączeniu z hybrydyzacją lub PCR – Polymerase Chain Reaction); metody hybrydyzacji (Southern blot, mikromacierze); PCR (jakościowy i ilościowy) [9].

Rzeczywiście badania w zakresie biologii molekularnej pozwoliły stwierdzić, że błędy występujące w genomie na poziomie epigenetycznym mogą być podłożem do rozwoju wielu chorób. Warto podkreślić, że rezultaty wielu badań wskazują, że nieprawidłowości w metylacji węgla C5 w pierścieniu cytozyny w wyspach CpG mogą powodować takie procesy, jak przewlekłe zapalenia, infekcje wirusowe, starzenie oraz choroby nowotworowe [12]. Zmiany we wzorze metylacji są wykrywane w różnych typach komórek nowotworowych. Komórki nowotworowe mają zmieniany wzór metylacji w wyniku hipermetylacji regionów CpG lub globalnej hipometylacji DNA. Hipermetylacja, czyli podwyższony stopień metylacji, powoduje wyciszenie genów naprawy DNA i genów supresorowych (antyonkogenów). Skutkiem tego procesu jest brak ograniczeń w proliferacji komórki, a dodatkowo istnieje duże prawdopodobieństwo, że nieprawidłowa komórka nie zostanie skierowana na szlak apoptozy. Ponadto hipermetylacja genów naprawy DNA powoduje wyłączenie genów, które kodują białka odpowiedzialne za naprawę nieprawidłowych genów [11]. Wzór metylacji może być zmieniony na skutek metylacji *de novo*, czyli przyłączenia grup metylowych do niezmetylowanych cytozyn w DNA lub usunięcia grup metylowych w DNA (demetylacja) [11]. Procesem odwrotnym do hipermetylacji jest hipometylacja. Proces ten jest obserwowany w przypadku przewlekłych chorób, takich jak nowotwory czy choroby autoimmunologiczne [6]. Hipometylacja może powodować zmniejszenie stabilności chromosomów i aktywować protoonkogeny, a w regionach niepromotorowych genów może wpływać na osłabienie stabilności genomu poprzez demetylację transpozonów [21].

Globalna hipometylacja nie zależy od lokalnych zmian w metylacji DNA w regionach regulatorowych genów. Dane genetyczne oraz komórkowe popierają koncepcję, że globalna metylacja DNA odpowiada za integralność genomu, jak również może doprowadzić do aberracji chromosomów. Badania na zarodkach szczurów [20] oraz pawianów [26] wykazały, że nieprawidłowe odżywianie w czasie ciąży może prowadzić do zmian w globalnym poziomie metylacji DNA. Ponadto dieta o wysokiej zawartości tłuszczu w czasie ciąży wpływa na modyfikację ekspresji genów, a także na lokalne i globalne zmiany wzorca metylacji w łożyskach u myszy. Jest to istotna informacja ze względu na to, że łożysko jest podstawowym środkiem łączącym matkę z płodem oraz odpowiada za dostarczanie składników odżywczych do płodu, a zatem może stanowić odpowiedni organ do badania wpływu diety matki na poziom metylacji [6].

Interesującym problemem badawczym jest związek pomiędzy metylacją a rozwojem zarodka. Rozwój zarodka jest bardzo złożonym procesem, który rozpoczyna się od etapu zygoty i prowadzi do powstania wielu typów wyspecjalizowanych komórek, które budują tkankę, a następnie organy tworzące strukturalną i funkcjonalną całość. Po procesie zapłodnienia rozwijający się zarodek dziedziczy modyfikacje epigenetyczne po obojgu rodzicach i w trakcie pierwszych podziałów jego DNA ulega całkowitej demetylacji. Ojcowski genom przed fuzją przedjądrzy ulega natychmiastowej i całkowitej demetylacji, podczas gdy w genomie matki demetylacja następuje stopniowo podczas pierwszych podziałów komórkowych. Zarodek w fazie 16 komórek ulega hipometylacji, po czym po implantacji blastocysty następuje metylacja genomu *de novo* [7].

Gryzińska i wsp. [7] w badaniach dotyczących kur rasy polbar postawili hipotezę, że globalny wzór metylacji DNA zmienia się w krytycznych okresach embrionalnego rozwoju kurcząt. Należy podkreślić, że w trwającym 21 dni rozwoju zarodka kurczaka, jego śmiertelność osiąga najwyższy stopień w dwóch okresach: w 6. dniu inkubacji, kiedy omocznia pełni funkcje układu oddechowego oraz w dniu 18., kiedy zarodek zaczyna oddychać płucami. Przeprowadzone badania [7] pozwoliły stwierdzić wyraźną zależność pomiędzy fazą rozwoju a całkowitym poziomem 5-metylocytozyny w DNA. Warto zauważyć, że procesy metylacji i demetylacji są wysoce specyficzne oraz zależą od konkretnego etapu rozwoju w każdym organizmie. W konsekwencji zmetylowana cytozyna może być istotnym czynnikiem epigenetycznym, który odpowiada za regulację czynników biorących udział w procesie różnicowania [7]. U kręgowców metylacja odgrywa istotną rolę w regulacji ekspresji genu podczas embriogenezy, a następnie podczas różnicowania komórek [1].

Bardzo ważną informacją mającą wpływ na postrzeganie zmian zachodzących w organizmach zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych jest wykazanie, że na zmiany epigenetyczne w strukturze DNA, takie jak hipo- lub hipermetylacja ma wpływ środowisko. Przeprowadzone na ludziach i zwierzętach badania jednoznacznie sugerują, że takie zmiany mogą prowadzić do wielu przewlekłych chorób. Szczególnie niekorzystne oddziaływanie na organizm ma narażenie go na zanieczyszczenie powietrza. Jest to istotny czynnik mogący oddziaływać na wzory metylacji globalnej oraz metylacji na poziomie genu. Należy podkreślić, że wśród genów ze zmienionym wzorem metylacji są m.in. odpowiedzialne za regulację szlaku T-efektorowego i T-regulacyjnego oraz za zapalenie dróg oddechowych [14]. Rozszyfrowanie epigenetycznego wpływu środowiska pozwoli na wprowadzenie metod leczenia lub prewencji dla narażonych populacji, ponieważ markery epigenetyczne mają charakter odwracalny [18].

Inne badania pokazują wpływ takich czynników, jak homocysteina i proces metylacji DNA na hiperhomocysteinemię, która może prowadzić do patologii naczyńowych. Niedobory dietetyczne wpływają na stężenie homocysteiny, a w konsekwencji na metylację DNA. Jednak jeśli brakuje w diecie towarzyszą

niedobory enzymów, to można oczekiwać większego wpływu homocysteiny i metylacji DNA na organizm. Badania na modelach szczurzych i mysich wykazują taki sam wpływ diety, jak badania przeprowadzone na zwierzętach z nokautem w określonym genie [17].

Metylacja DNA zależy przede wszystkim od gatunku, rodzaju tkanki, jednak ze względów poznawczych interesująca jest zaobserwowana zarówno u roślin, jak i zwierząt zależność pomiędzy wiekiem a poziomem metylacji. W przeprowadzonych badaniach wyróżniono dwa zjawiska, które mają wpływ na starzenie się organizmu: hipermetylacja promotorów genów w obrębie wysp CpG oraz hipometylacja 5-metylocytozyny [8].

Ze względu na to, że hipermetylacja regionów promotorowych powoduje utratę funkcji genów, ma duży wpływ na funkcje komórki oraz może powodować inaktywację genów i kluczowych ścieżek biologicznych, co wywołuje starzenie, choroby serca, występowanie nieprawidłowości rozwojowych, np. guzów [13]. Zachodzące zmiany epigenetyczne podczas starzenia mogą bezpośrednio przyczynić się do rozpoczęcia transformacji nowotworowej. Na profil metylacji DNA może mieć wpływ polimorfizm pojedynczego nukleotydu w specyficznym genie oraz wspomniane wcześniej czynniki środowiskowe i dieta. Niedobory składników odżywczych w diecie, takich jak kwas foliowy, metionina lub selen, mogą powodować hipometylację DNA, przyczyniając się do ekspresji genów i genetycznej niestabilności. Warto zaznaczyć, że we wczesnym stadium embriogenezy dieta matki i środowisko mogą mieć znaczący wpływ na profil metylacji, a zaburzenia tego procesu mogą doprowadzić do konsolidacji nieprawidłowych profili metylacji DNA w zarodku. Określenie metylacji DNA może być dobrym parametrem kompleksowej diagnostyki wielu chorób, szczególnie że wzory metylacji mogą być nieocenionym źródłem informacji, zapewniającej wgląd w aktualny stan aktywności oraz potencjalnych środków aktywacji lub hamowania genów, na które mogą mieć wpływ zastosowane w terapii leki [7].

Badania metylacji DNA mogą być przeprowadzane także w celu określenia stopnia metylacji wybranego nukleotydu w sekwencji (np. zmiany stopnia metylacji wysp CpG genów supresorowych) lub w celu poszukiwania nowych, specjalnie zmylowanych miejsc w genomie, które odpowiadają za istotne zmiany funkcjonalne w organizmie [1]. W przyszłości może to pozwolić na określenie wzorów metylacji dla różnych chorób oraz – co jest szczególnie interesujące – może być potencjalnym biomarkerem dla nowotworów [19].

Badania nad epigenomem, choć są bardzo różnorodne i mają ogromny zasięg, to dopiero zaczynają opisywać złożone mechanizmy epigenetycznej regulacji ważnych funkcji genomu. Dokładniejsze zrozumienie roli metylacji cytozyny oraz modyfikacji histonów w trakcie normalnego rozwoju osobniczego, a także w trakcie choroby, wymaga większej liczby obserwacji oraz ciągłego doskonalenia metod badawczych [4]. Szczególnie pomocne może być doskonalenie narzędzi statystycznych, które pozwolą na analizę i łączenie różnych danych dotyczących metylacji cytozyny, modyfikacji histonów, przy jednoczesnym uwzględnianiu zróżnicowania tkankowego oraz stadiów rozwojowych [4].

Praktyczne zastosowanie wiedzy o epigenomie w medycynie stanowi jedynie małą część potencjalnego jej wykorzystania. Epigenetyka może mieć szczególne zastosowanie w przypadku deregulacji pojedynczych genów, następującej m.in. przy przywróceniu aktywności genów supresorów nowotworzenia kodujących czynniki transkrypcyjne lub DNA-metylotransferazy, które zostały wyciszone przez metylację. Podsumowując należy podkreślić, że wprowadzenie technologii epigenetycznych do diagnostyki i leczenia niesie ze sobą ogromny potencjał zarówno dla chorych, jak i lekarzy [25], ale także powinno znaleźć szersze zastosowanie w niedalekiej przyszłości w hodowli zwierząt.

Literatura: 1. Azhikina T.L., Sverdlov E.D., 2005 – Biochemistry (Mosc.) 70 (5), 596-603. 2. Ballestar E., Esteller M., 2002 – Carcinogenesis 23, 1103-1109. 3. Bannister A.J., Kouzarides T., 2011 – Cell Res. 21 (3), 381-395. 4. Bernstein B.E., Meissner A., Lander E.S., 2007 – Cell 128 (4), 669-681. 5. Brena R.M., Huang T.H., Plass C., 2006 – J. Mol. Med. 84, 365-377. 6. Ergaz Z., Guillemin C., Neeman-Azulay M., Weinstein-Fudim L., Stodgell C.J., Miller R.K., Szyf M., Ornoy A., 2014 – Toxicol. App. Pharmacol. 276, 220-230. 7. Gryzińska M., Andraszek K., Jeżewska-Witkowska G., 2014 – Folia Biol. (Kraków) 62 (2), 97-101. 8. Gryzińska M., Andraszek K., Jocek G., 2013 – Folia Biol. (Kraków) 61, 165-171. 9. Gryzińska M., Andraszek K., Strachec-ka A., Błaszczak E., 2012 – Przegląd Hod. 5-6, 3-6. 10. Jabłońska J., Jesionek-Kupnicka D., 2004 – Onkol. Pol. 7 (40), 181-185. 11. Kostka G., Urbanek K., 2005 – Rocz. PZH 56 (1), 1-14. 12. Lewandowska J., 2009 – Kowalencyjne wiązanie się z DNA pochodnych 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 oraz 1-nitroakrydyny C-857 i niektóre skutki takiej modyfikacji DNA. Praca doktorska, Politechnika Gdańska. 13. Li E., 2002 – Nat. Rev. Gen. 3, 662-673. 14. Lovinsky-Desir S., Miller R.L., 2012

– Curr. Allergy Asthma Rep. 12 (3), 211-220. 15. Łukasik M., Karmalska J., Szutowski M.M., Łukaszewicz J., 2009 – Biul. Wydz. Farm. WUM 2, 13-18. 16. Mai A., Massa S., Rotili D., 2005 – Med. Research Rev. 25, 261-309. 17. Mandaviya P.R., Stolk L., Heil S.G., 2014 – Mol. Gen. Metab. 113, 243-252. 18. Monterose L., Noonan C.W., Cho Y.Ch., Lee J., Harley J., O'Hara T., Cahill C., Ward T.J., 2015 – Sci. Total Environ. 512-513, 489-494. 19. Murrell A., Rakyan V.K., Beck S., 2005 – Hum. Mol. Genet. 1 (1), R3-R10. 20. Park J.H., Stoffers D.A., Nicholls R.D., Simmons R.A., 2008 – J. Clin. Invest. 118, 2316-2324. 21. Robertson K.D., Jones P.A., 2000 – Carcinogenesis 21, 461-467. 22. Rodin S.N., Prakhomchuk D.V., Riggs A.D., 2005 – Biochemistry (Mosc.) 70 (5), 559-567. 23. Singal R., Ginder G.D., 1999 – Blood 93, 4059-4070. 24. Sulewska A., Niklińska W., Kozłowski M., Minarowski Ł., Naumnik W., Nikliński J., Dąbrowska K., Chyczewski L., 2007 – Folia Histochem. Cytobiol. 45 (3), 149-158. 25. Szpecht-Potocka A., 2004 – Kosmos 53, 281-293. 26. Unterberger A., Szyf M., Nathaniels P.W., Cox L.A., 2009 – J. Med. Primatol. 38, 219-227. 27. Worm J., Guldborg P., 2002 – J. Oral. Pathol. Med. 31 (8), 443-449.

Wyniki sierpniowej wyceny wartości hodowlanej buhajów HF

Tomasz Krychowski, Agnieszka Nowosielska

Polska Federacja Hodowców Bydła i Producentów Mleka

Czwarta wycena wartości hodowlanej buhajów na podstawie genomu została zrealizowana w sierpniu 2015 roku, według takiej samej metodyki, jak poprzednio. Realizując tę wycenę nie wykorzystano, niestety, bazy referencyjnej udostępnionej Polsce przez Eurogenomics po wycenie sierpniowej 2014 roku, co powiększyłoby w dużym stopniu precyzję polskich wyników. Baza ta zawiera bowiem ponad 25 000 buhajów, w stosunku do ponad 3000, które są w polskiej bazie.

Ocena 2015/2 na podstawie genomu dotyczy 899 buhajów, co stanowi spadek w stosunku do poprzedniej wyceny (967). Buhaje uczestniczące w ocenie wartości hodowlanej należą do 5 firm inseminacyjnych realizujących programy oceny i selekcji buhajów w Polsce. Ponadto 46 buhajów jest własnością hodowców i zostało poddanych genomowej ocenie wartości hodowlanej na potrzeby realizacji tych programów.

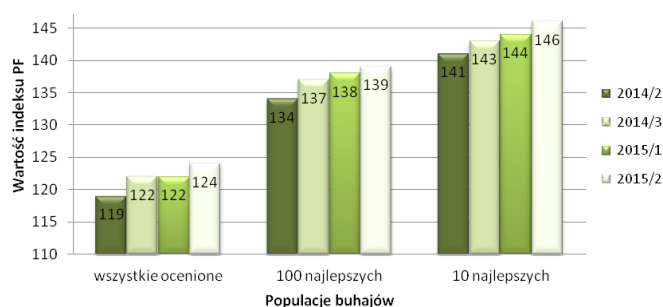
W ocenie 2015/2 przedstawiono wyniki szacowania krajowych i międzynarodowych genomowych wartości hodowlanych w ten sam sposób, jak poprzednio.

W artykule tym będziemy analizować wartość hodowlaną buhajów wycenionych konwencjonalnie i na podstawie genomu, podobnie jak to uczyniliśmy po poprzednich wycenach.

Wzrost średniej wartości hodowlanej buhajów ocenionych genomowo

Średnia wartość hodowlana buhajów wycenionych w sierpniu jest większa w porównaniu do średniej wartości hodowlanej buhajów wycenionych w kwietniu 2015 roku o 2 jednostki PF (124-122). Jest to dobry wynik, gdyż pomiędzy wcześniejszymi wycenami 2015/1 i 2014/3 nie było wzrostu średniej wartości hodowlanej buhajów (rys. 1).

Jeśli chodzi o porównanie subpopulacji 100 i 10 najlepszych buhajów, to różnica w średniej wartości hodowlanej pomiędzy oceną sierpniową i kwietniową wynosi 1 i 2 jednostki PF.



Rys. 1. Porównanie średnich wartości hodowlanych buhajów ocenionych na podstawie genomu w kolejnych sezonach ocen

Buhaje urodzone w 2014 roku mają wyraźnie wyższą wartość hodowlaną w porównaniu do buhajów urodzonych w latach wcześniejszych (+5 jednostek PF w stosunku do rocznika 2013 i +6 jednostek PF w stosunku do rocznika 2012 i 2011). Trzeba jednak zaznaczyć, że grupa najmłodszych buhajów jest dużo mniej liczna (78 buhajów), gdy poprzednie roczniki liczą odpowiednio 253, 283 i 229 buhajów. Niepokojący jest brak progresji w średniej wartości hodowlanej coraz młodszych buhajów dla podindeksu płodności (tab. 1). Zwracaliśmy już uwagę na ten problem, analizując wyniki międzynarodowej genomowej oceny wartości hodowlanej buhajów (Krychowski i wsp., „Przegląd Hodowlany” 5/2015).

Tabela 1

Średnie wartości hodowlane buhajów według roku urodzenia

Rok urodzenia	Liczba buhajów	Średnia wartość hodowlana					
		gPF	PPR	PPO	PPL	KS	DLUG
2014	78	129	114	122	99	107	118
2013	253	124	113	118	98	104	114
2012	283	123	111	118	99	105	116
2011	229	123	112	117	101	104	116
2010	54	117	109	113	97	105	112

PF – indeks Produkcja i Funkcjonalność, PPR – podindeks produkcyjny, PPO – podindeks pokroju, PPL – podindeks płodności, KS – indeks komórek somatycznych, DLUG – indeks długowieczności