

GRAŻYNA KOSTKA, KATARZYNA URBANEK

METYLACJA DNA – ALTERNATYWNY MECHANIZM CHEMICZNEJ KANCEROGENEZY

DNA METHYLATION – ALTERNATIVE MECHANISM OF CHEMICAL CARCINOGENESIS

Zakład Toksykologii Środowiskowej
Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: prof. dr hab. J. K. Ludwicki

Na podstawie piśmiennictwa omówiono podstawy epigenetycznych zmian metylacji DNA, jako alternatywnego mechanizmu transformacji nowotworowej komórki. Przedstawiono rolę metylacji DNA w regulacji ekspresji genów w aspekcie rakotwórczego działania związków chemicznych nie wywołujących bezpośrednich uszkodzeń DNA.

WSTĘP

Jeszcze do niedawna, przeważał pogląd, że do inicjacji chemicznej kancerogenezy dojść może wyłącznie wskutek bezpośredniego uszkodzenia materiału genetycznego komórek. Aktualnie, istnieją przekonujące dowody, że inicjacja procesu nowotworowego polega na przekształceniu komórki prawidłowej w nowotworową, w wyniku nagromadzenia w niej nie tylko zmian genetycznych, ale również zmian epigenetycznych*, związanych głównie z uaktywnieniem protoonkogenów i unieczynnieniem genów supresorowych. Uwzględniając rolę jaką spełniają w prawidłowej komórce te dwie, podstawowe klasy genów, ich nieprawidłowa ekspresja będąca konsekwencją uszkodzeń struktury DNA lub zmian epigenetycznych powoduje, że komórka przestaje podlegać mechanizmom regulującym i kontrolującym jej wzrost i różnicowanie. Taka patologia komórki zwiększa prawdopodobieństwo transformacji nowotworowej.

Niezwykle rozwinięte w ostatnich latach badania metylacji DNA wnoszą nowe, istotne elementy w zrozumienie transformacji komórki nowotworowej. Jednocześnie wskazują na kierunek badań chemicznych kancerogenów, których działanie rakotwórcze ma podstawy epigenetyczne. Związki te nazywane niegenotoksycznymi kancerogenami (NGCs), obejmują liczne zanieczyszczenia przemysłowe, rozpuszczalniki, leki oraz środki ochrony roślin [22,23,24]. Przypisywana znacząca rola niegenotoksycznym czynnikom w rozwoju

* Zmiana epigenetyczna definiowana jest jako każda zmiana w fenotypie komórki, która nie jest wynikiem zmiany w sekwencji DNA.

procesu nowotworowego wskazuje, że mechanizmy ich działania należy rozważać w perspektywie określającej ryzyko dla zdrowia ludzi narażonych na ten rodzaj zanieczyszczeń środowiskowych.

Wspólną cechą NGCs jest zdolność stymulowania proliferacji komórkowej w docelowych narządach i tkankach oraz hamowania apoptozy [11, 41, 45, 49]. Wywoływanie takich efektów biologicznych, związanych z zaburzeniem równowagi pomiędzy replikacją i śmiercią komórek uważane jest za podstawowy czynnik determinujący zachwianie homeostazy komórkowej, której konsekwencją może być transformacja nowotworowa [45, 49, 59].

Do takich założeń upoważnia rola, jaka przypisywana jest prawidłowej kontroli regulacji zarówno cyklu komórkowego jak i apoptozy, która sprawowana jest przez wiele białek kodowanych przez protoonkogeny i geny supresorowe. Przyczynami nieprawidłowego funkcjonowania białek regulatorowych mogą być nie tylko mutacje punktowe, translokacje i amplifikacje genów, ale również zmiany epigenetyczne, które uniemożliwiają prawidłową ekspresję genów przy niezmienionej sekwencji nukleotydu. Piśmiennictwo ostatnich lat wskazuje, że w nieprawidłowej aktywności transkrypcyjnej genów, decydującą rolę odgrywają powiązane ze sobą mechanizmy modyfikujące strukturę chromatyny i położenie nukleosomów względem DNA [1, 57, 61].

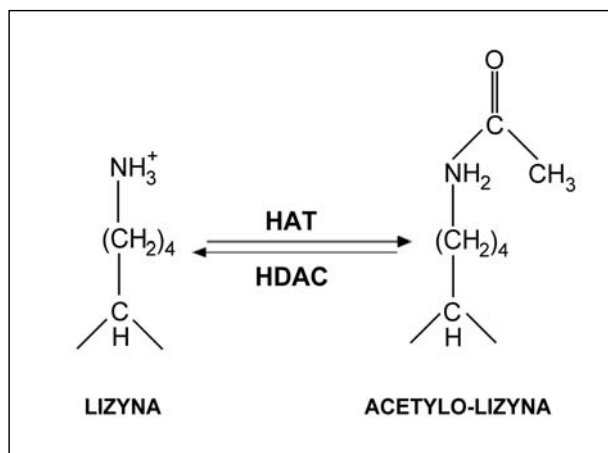
STRUKTURA CHROMATYNY A REGULACJA EKSPRESJI GENÓW

W prawidłowej komórce, tylko niektóre geny charakteryzują się stałą aktywnością transkrypcyjną. Są to geny warunkujące podstawowe funkcje komórki, określane jako *house keeping genes*. Natomiast ekspresja większości genów podlega regulacji i uwarunkowana jest nukleosomową organizacją chromatyny. Każdy nukleosom to oktamer histonowy (8 cząsteczek białek histonowych) na który nawinięta jest cząsteczka DNA o długości 147 pz. Kolejne nukleosomy połączone są DNA łącznikowym [1].

W transkrypcyjnie nieaktywnej chromatynie, białka histonowe zawierające zasadowe aminokwasy (głównie lizynę) są silnie związane z ujemnymi ładunkami fosforanów DNA. Tak skondensowana chromatyna utrudnia dostęp czynnikom transkrypcyjnym oraz polimeraz RNA do DNA i w konsekwencji aktywność transkrypcyjna zostaje ograniczona. Zmiana stopnia upakowania chromatyny przejawiająca się bardziej rozwiniętą jej strukturą, ułatwia dostęp DNA dla kompleksów transkrypcyjnych.

Modyfikacja struktury chromatyny w aspekcie regulacji jej aktywności transkrypcyjnej, zdeterminowana jest przede wszystkim acetylacją i deacetylacją histonów [1, 46, 61], co zostało udowodnione w połowie lat 90-tych, wraz z odkryciem kompleksów enzymatycznych: acetylaz i deacetylaz histonowych.

W acetylacji reszt lizynowych histonów biorą udział histonowe acetylotransferazy (HATs) wymagające do swojego działania acetylo CoA, źródła reszt acetylowych. Acetylacja znosi dodatni ładunek reszt lizynowych w histonach co doprowadza do osłabienia oddziaływań DNA-histony i dekondensacji chromatyny. Odwrotny proces, deacetylacja histonów zwiększająca stopień kondensacji chromatyny, katalizowana jest przez histonowe deacetylazy (HDACs). Te naprzemienne procesy acetylacji i deacetylacji przebiegają w komórce w sposób ciągły i odwracalny, a enzymy biorące w nich udział tj. acetylotransferazy i deacetylazy razem z białkami zależnymi od ATP [1, 34], swoiście oddziałując z czynnikami transkrypcyjnymi pełnią rolę regulatorów transkrypcji.



Ryc. 1. Acetylacja i deacetylacja reszt lizyny.

Fig. 1. Acetylation and deacetylation of the lysine residues.

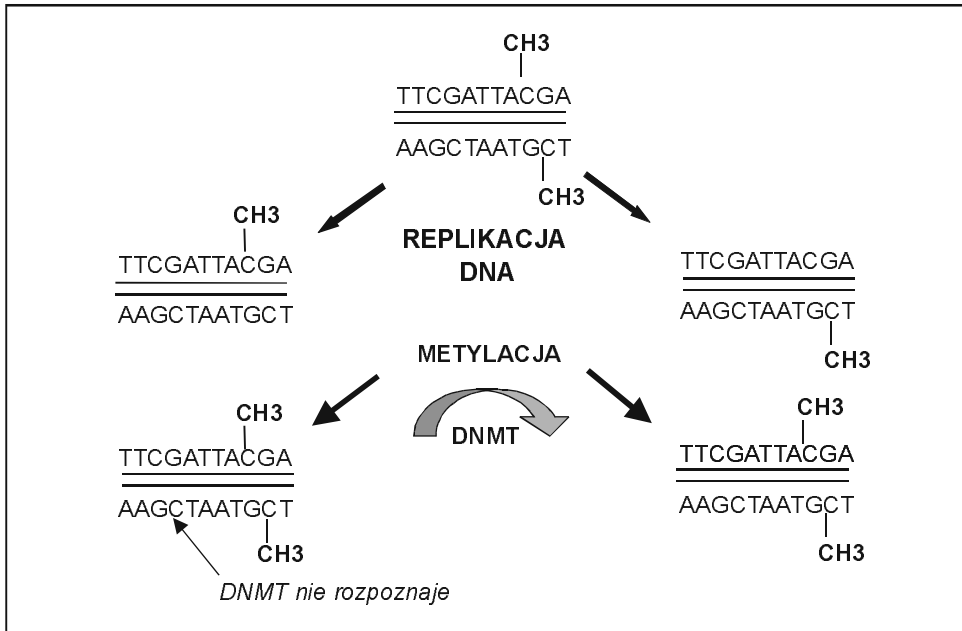
Aktualnie, w regulacji ekspresji genów na poziomie struktury chromatyny, istotną rolę przypisuje się również metylacji DNA [1, 35, 51]. O jej roli w ekspresji genów, przypuszczano od wielu lat, ale dopiero pod koniec lat 90-tych udowodniono wzajemne zależności pomiędzy metylacją DNA i deacetylacją histonów, wyjaśniając częściowo w jaki sposób procesy te wspólnie uczestniczą w regulacji transkrypcji.

Metylacja DNA jest poreplikacyjną modyfikacją DNA, związaną z wyciszeniem genów [1, 4, 26]. Miejsca metylacji nie są przypadkowe; metylowane są tylko cytozyny wchodzące w skład niektórych sekwencji CpG (dinukleotyd cytydyna-fosforan-guanozyna). W komórkach organizmów wyższych, metylowana cytozyna występuje w 60-80% wszystkich sekwencji CpG [1, 51, 61]. Część niemetylowanych sekwencji CpG jest zgrupowana w obszary, nazywane wyspami bogatymi w sekwencje CpG. Takie regiony bogate w niemetylowane sekwencje nukleotydowe obejmują swym zasięgiem promotor (część regulatorowa genu) oraz egzon 1. W genach nieaktywnych, wyspy CpG są metylowane.

Każda eukariotyczna komórka somatyczna charakteryzuje się określonym wzorem metylacji DNA, który przekazywany jest komórkom potomnym podczas podziałów mitotycznych [61].

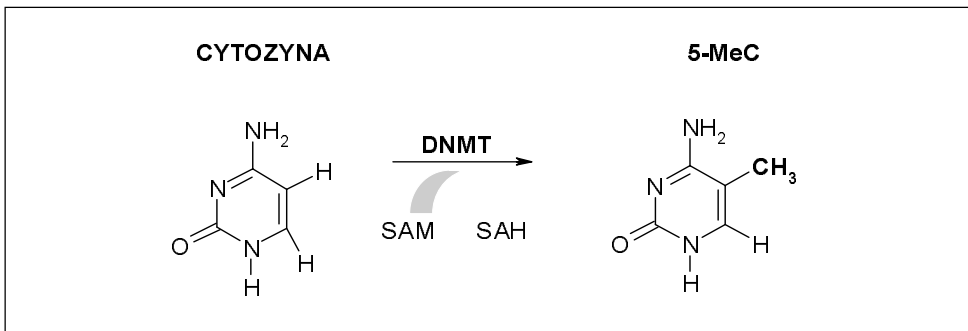
Po replikacji DNA, następuje przyłączanie grup metylowych do nowo zsyntetyzowanych nici DNA, w miejscach komplementarnych do miejsc metylowanych w nici rodzicielskiej. W ten sposób oryginalny wzór metylacji zostaje zachowany, ponieważ dwie cząsteczki potomne DNA są metylowane w identyczny sposób jak cząsteczka rodzicielska (metylacja zachowawcza).

W metylacji DNA, donorem grup metylowych przyłączanych do cytozyny, jest S-adenozylometionina (SAM). Reakcja katalizowana jest przez enzym metylotransferazę DNA (DNMT- E.C. 2.1.1.37). W jej wyniku powstaje 5-metylocytozyna (5-MeC) i uwalniana jest S-adenozylhomocysteina (SAH) [51, 61]. Z dotychczas zidentyfikowanych 4 izoform metylotransferazy, DNMT1 bierze udział we wspomnianej już tzw. zachowawczej metylacji DNA i stąd ta forma enzymu określana jest jako „zachowawcza” metylotransferaza.



Ryc. 2. Zachowawcza metylacja DNA.

Fig. 2. Maintenance DNA methylation.

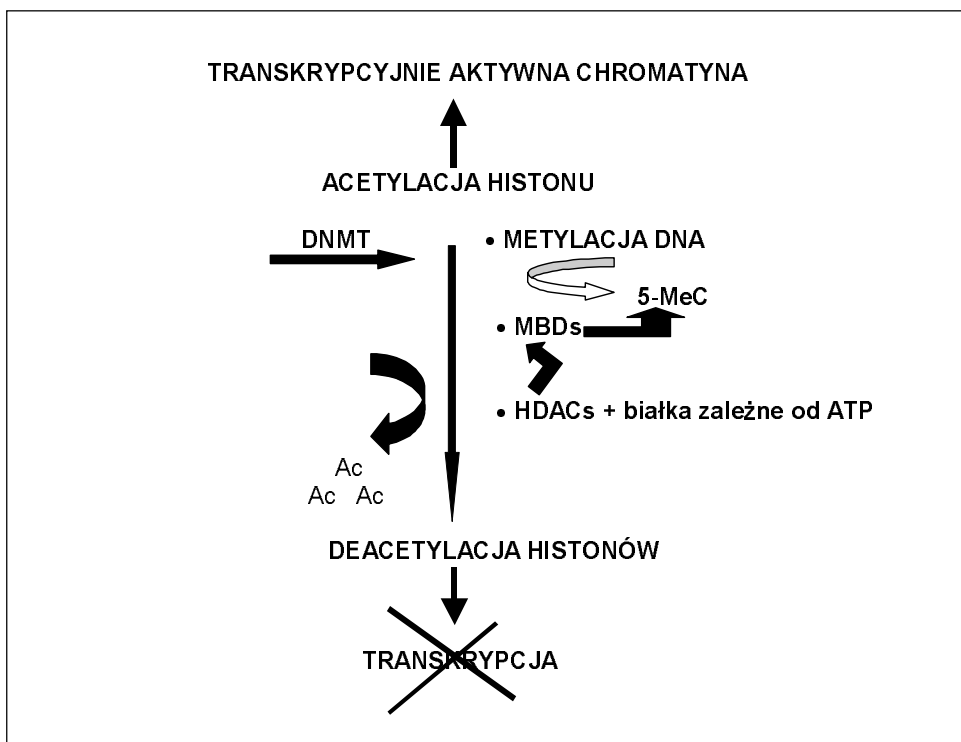


Ryc. 3. Mechanizm metylacji DNA.

Fig. 3. Mechanism of DNA methylation.

DNMT1, przypisywana jest rola w kontroli cyklu komórkowego poprzez interakcję enzymu z jądrowym antygenem komórki proliferującej (PCNA, proliferating cell nuclear antigen) i inhibitorem kinaz cyklino-zależnych-CDKs (p21WAF1) [8]. Funkcja biologiczna DNMT2 nie jest dotychczas poznana, a izoformom 3A i 3B przypisuje się udział głównie w metylacji *de novo* zachodzącej w embriogenezie i w procesie różnicowania komórek [2, 35, 36].

Pytanie w jaki sposób metylacja cytozyny w sekwencjach CpG wpływa na wyciszenie aktywności transkrypcyjnej genów nie ma, jak dotąd pełnej odpowiedzi, aczkolwiek wia-



Ryc. 4. Model represji transkrypcji.

Fig. 4. Model of transcriptional repression.

domo już [1, 57], że efekt ten związany jest z obniżeniem acetylacji histonów, w którym pośredniczą białka MBDs (ang. methyl-CpG binding proteins- białka wiążące metylowane CpG). Schemat mechanizmu wyciszenia aktywności transkrypcyjnej przedstawia ryc. 4.

W zaproponowanym modelu wyciszenia aktywności transkrypcyjnej chromatywny w wyniku metylacji DNA [61] zakłada się preferencyjne rozpoznawanie przez białka MBDs, metylowanych cytozyn w sekwencjach CpG. Białka te przyłączając się do 5-MeC, jednocześnie wiążą kompleks białkowy składający się z deacetylaz histonowych (HDACs) i białek zależnych od ATP, remodelujących chromatyne. W efekcie następuje deacetylacja histonów, która doprowadza do powstania zwartej struktury chromatywny ograniczającej transkrypcję. W przyłączeniu HDACs do metylowanych cytozyn mogą również brać udział metylotransferazy DNA, pełniąc rolę supresorów transkrypcji [26].

ZMIANA WZORU METYLACJI W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Zmiany wzoru metylacji DNA są powszechnie wykrywane w komórkach różnego typu nowotworów.

Metylację cytozyny, inaktywującą gen p16, p15 stwierdzono między innymi w komórkach raka żołądka, prostaty, płuca [15, 37]. Wykazano również [43], że w przypadku raka

Tabela I. Przykłady zmian metylacji DNA w nowotworach
Examples changes of DNA methylation In cancer

Gen	Funkcja	Piśmiennictwo
p16	inhibitor CDKs	15, 32
CDH1 (E-kadheryny)	regulacja adhezji komórka-komórka	53
p53	regulacja cyklu komórkowego, apoptozy	43
bcl-2	regulacja apoptozy	19
c-myc	regulacja cyklu komórkowego	50
BRCA1 ^{*1}	naprawa uszkodzeń DNA	15
APC ^{*2}	regulacja β -katein	15, 16
p15	inhibitor CDKs	15, 32

^{*1/} Breast cancer type 1

^{*2/} Adenomatous polyposis coli

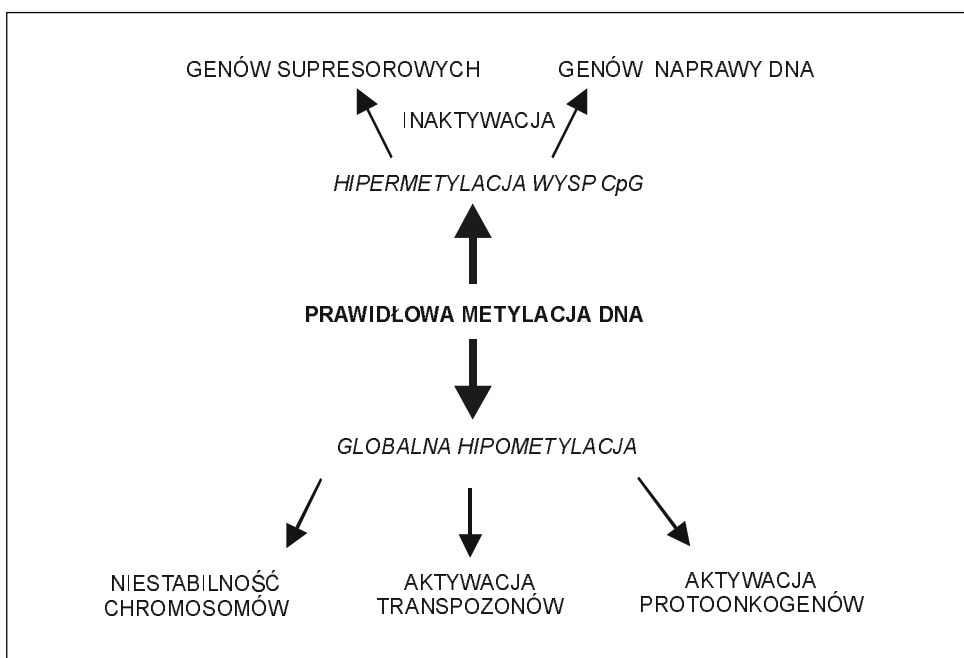
wątroby, sekwencja promotorowa genu p53 jest silnie zmetylowana, a ekspresja genu ograniczona. W komórkach raka żołądka zwiększony poziom metylacji wykazany został również dla regionu promotorowego genu kodującego E-kadheryny, stanowiące błonowe receptory adhezyjne, odpowiedzialne za adhezję międzykomórkową [53]. W komórkach nowotworów wykazywany jest również obniżony poziom metylacji sekwencji promotorowych genów. W białaczce limfoblastycznej stwierdzono hipometylację genu bcl-2 [19], a w raku okrężnicy genu c-myc [6, 50]. Jednocześnie nadekspresja genu c-myc jest powszechnie wykrywana w komórkach np. raka okrężnicy [6].

Ogólnie, zmiana wzoru metylacji może być konsekwencją przyłączenia grup metylowych do cytozyn w niemetylowanych sekwencjach DNA (metylacja *de novo*) lub demetylacji DNA, czyli obniżenia poziomu metylacji genomu [46, 58].

Demetylacja rozpatrywana jest jako proces zależny i niezależny od replikacji DNA [3, 60]. Ten pierwszy rodzaj, zwany demetylacją pasywną może mieć miejsce kiedy DNMT1 nie metyluje nowo zsintetyzowanego łańcucha DNA. Drugi rodzaj, demetylacja aktywna przebiegająca niezależnie od replikacji DNA zachodzi jak sądzi się, przy udziale demetylaz, które hydrolizują 5-MeC do cytozyny i metanolu [60].

W komórkach nowotworowych, zmiana wzoru metylacji DNA identyfikowana jest jako hipermetylacja wysp CpG lub globalna hipometylacja DNA [58, 61]. Zwiększony poziom metylacji (hipermetylacja) związany jest z unieczynnieniem genów supresorowych oraz genów naprawy DNA. Uwzględniając rolę jaką spełniają geny supresorowe w prawidłowej komórce, konsekwencje hipermetylacji ich sekwencji promotorowych związanej z wyciszeniem genu są oczywiste. Komórka zostaje pozbawiona niezbędnych ograniczeń w proliferacji, a także zmniejszona zostaje szansa na przeprowadzenie programu śmierci apoptotycznej, w którym to programie ważną rolę spełniają geny supresorowe. Również osłabienie wydajności naprawy DNA, wynikające z unieczynnienia genów kodujących białka naprawcze może w istotny sposób zwiększyć ryzyko rozwoju procesu nowotworowego.

Globalna hipometylacja może być przyczyną redukcji stabilności chromosomów i akty-



Ryc. 5. Przypuszczalna rola hipermetylacji wysp CpG i globalnej hipometylacji DNA w rozwoju nowotworu.

Fig. 5. Possible role of hypermethylation CpG island and hypomethylation of global DNA methylation in tumor development.

wacji protoonkogenów. Ponadto, hipometylacja niepromotorowych regionów prowadzić może do obniżenia stabilności genomu poprzez wzrost ekspresji transpozonów*, które w prawidłowych warunkach są wyciszone poprzez metylację [46].

Globalna hipometylacja wydaje się być relatywnie późnym zdarzeniem w rozwoju procesu nowotworowego [58], w przeciwieństwie do zmian metylacji regionów promotorowych genów, które są zmianami wczesnymi, znacznie poprzedzającymi wystąpienie jawnej postaci choroby nowotworowej [31]. Fakt ten po uwzględnieniu, że nowotwory wykazują specyficzny dla siebie wzór metylacji DNA [15, 35], daje szansę rozwoju nowej, wczesnej diagnostyki zmian nowotworowych.

Należy podkreślić, że metylacja DNA prowadzić może również do mutacji jako wynik metylacji cytozyny do 5-metylocytozyny i jej spontanicznej deaminacji do tyminy. Hipermetylacja może również w sposób pośredni prowadzić do zmian genetycznych; aktywna DNMT1 może blokować procesy naprawcze DNA [51].

* Transpozony, ruchome fragmenty DNA nie kodujące żadnych białek. Z ich przemieszczaniem w obrębie genomu związane mogą być zmiany w DNA, typu delecje, inwersje czy duplikacje powodujące utratę funkcji lub wzmożoną ekspresję genu.

ZMIANA METYLACJI DNA JAKO MECHANIZM DZIAŁANIA NIEGENOTOKSYCZNYCH KANCEROGENÓW (NGCS)

Piśmiennictwo ostatnich lat wskazuje, że zmiany metylacji DNA można rozpatrywać jako kluczowy mechanizm rakotwórczego działania związków chemicznych, które nie wywołują zmian strukturalnych w materiale genetycznym komórki. Ten nowy kierunek badań toksykologicznych dotyczy wpływu niegenotoksycznych kancerogenów na poziom metylacji regionów promotorowych genów związanych głównie z cyklem komórkowym, co jest zrozumiałe biorąc pod uwagę wspólną cechę NGCs tj. stymulację proliferacji komórkowej i hamowania apoptozy.

Dostępne wyniki badań [9, 17, 18, 38, 39, 56] przeprowadzonych w warunkach *in vivo* wskazują, że narażenie zwierząt laboratoryjnych (myszy, szczury) na związki chemiczne zaliczane do NGCs, powoduje hipometylację regionów promotorowych genów tzw. reakcji wczesnej, związanych z proliferacją komórkową. *Tao* i wsp. [56] oraz *Coffin* i wsp. [9] w badaniach chloroformu oraz związków zaliczanych do proliferatorów peroksyosomów (PPs), takich jak kwas dichlorooctowy (DCA) oraz kwas trichlorooctowy (TCA), wykazali obniżony poziom metylacji regionów promotorowych genów *c-myc* i *c-jun*. Hipometylację genu *c-myc* stwierdzono również w wątrobie myszy narażonych na inne PPs: Wy-14,643, gemfibrozil i kwas 2,4-dichlorofenylooctowy [17, 18]. Wyniki badań wskazujące na zmianę metylacji sekwencji promotorowych genu *c-myc*, pod wpływem związków zaliczanych do NGCs, wydają się być szczególnie interesujące. Gen *c-myc* koduje bowiem białko transkrypcyjne aktywujące geny cyklin i kinaz cyklino-zależnych (CDKs), inicjujących i uczestniczących w progresji cyklu komórkowego. Białko *c-Myc* ma również wpływ na ekspresję genów biorących udział w apoptozie; indukuje np. transkrypcję genu *p53* [10, 12, 14, 21]. Istnieją również hipotezy o współdziałaniu białka *c-Myc* z białkiem *Bcl-2*, które należy do białek antyapoptotycznych [13].

Tabela II. Przykłady zmian metylacji sekwencji promotorowych genów pod wpływem NGCs
Examples changes of promoter region of genes methylation by NGCs

Związek	Rodzaj genu	Piśmiennictwo
Wy-14,643 ¹	<i>c-myc</i>	<i>Ge et al.</i> , 2001
Chloroform	<i>c-myc</i> , <i>c-fos</i>	<i>Pereira et al.</i> , 2001
DCA ²	<i>c-myc</i> , <i>c-jun</i>	<i>Tao et al.</i> , 2000 <i>Coffin et al.</i> , 2000
TCA ³	<i>c-myc</i> , <i>c-jun</i>	<i>Kramer et al.</i> , 2002
DBP ⁴	<i>c-myc</i>	<i>Ge et al.</i> , 2002
DBA ⁵	<i>c-myc</i> , IGF-II	<i>Tao et al.</i> , 2004

¹ kwas (4-chloro-6-(2,3-ksylidino)-2-pirydynylo) octowy

² kwas dichlorooctowy

³ kwas trichlorooctowy

⁴ ftalan dibutyłu

⁵ kwas dibromooctowy

Podjęte zostały również próby ingerencji w proces metylacji DNA. Wykazano [17], że metionina, prekursor S-adenozylometioniny, która jest donorem grupy metylowej w reakcji metylacji DNA, zapobiegała indukowanej DCA i TCA hipometylacji protoonkogenu *c-myc*. Co więcej, stwierdzono również, że indukowane zmiany metylacji DNA można modulować przywracając prawidłowy jej poziom. Metionina podawana myszom po ich narażeniu na Wy-14,643 powodowała cofanie się obniżonego poziomu 5-metylocytozyny w genie *c-myc* [18].

Wykazano ponadto [39], że metionina może nie tylko zapobiegać indukowanej DCA hipometylacji genu *c-myc*, ale może również obniżać progresję AHF (altered hepatic foci) do nowotworów wątroby u myszy narażonych na DCA. Zdaniem Autorów cytowanej pracy wyniki te świadczyć mogą, iż hipometylacja DNA stanowi krytyczny czynnik w rakotwórczej aktywności DCA.

Pogląd [60], że hipometylacja zdeterminowana jest obniżoną aktywnością metylotransferazy DNA, zredukowaną dostępnością donora grupy metylowych, wzrostem stężenia SAH (inhibitor DNMT), a także zmianą struktury chromatyny w regionach dinukleotydów CpG, nie znalazła potwierdzenia [18], przynajmniej w odniesieniu do pierwszych trzech zależności. Wykazanej pod wpływem Wy-14,643 hipometylacji protoonkogenu *c-myc* nie towarzyszyło obniżenie aktywności DNMT; nie stwierdzono również zmian w stężeniu SAM oraz SAH. Zmiana profilu metylacji *c-myc*, jak sugerują Autorzy badań, mogła być konsekwencją blokady dostępności enzymu do reszt cytozyny w DNA, w wyniku zmiany struktury chromatyny w sekwencjach CpG. Powyższe sugestie są zgodne z aktualnym poglądem [5], że NGCs mogą wywoływać zmiany metylacji DNA (hiper- i hipometylację) poprzez bezpośredni wpływ na aktywność enzymów odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg zachowawczej metylacji DNA. Do tych enzymów, jak już wcześniej zaznaczono, oprócz DNMT należą enzymy biorące udział w acetylacji i deacetylacji histonów (HATs, HDACs) oraz białka zależne od ATP, przyczyniające się do rearanżacji struktury chromatyny. Badania, w których zastosowano inhibitor metylotransferazy, 5-aza C (ang. 5-aza-cytidine) oraz deacetylazy histonowej, SAHA (ang. suberoylanilide hydroxamic acid) wykazały pod wpływem tych związków zmiany w metylacji DNA i ekspresji genów [27].

Większość NGCs wykazuje również hamujący wpływ na połączenia międzykomórkowe, typu gap (ang. gap junctional intracellular communication, GJIC). Efekt taki wykazano w badaniach *in vitro* i *in vivo*, między innymi dla polichlorowanych i polibromowanych bifenyli, fenwaleratu (pyretroid), niektórych PPs (nafenopin, Wy-14,643, klofibrat), fenobarbitalu oraz dla ftalanów (np. DEHP, ftalan di-2-etylo heksylu) [25, 28, 33].

W warunkach fizjologicznych, GJIC umożliwiają wymianę jonową i metaboliczną pomiędzy sąsiadującymi komórkami. Ten typ połączeń międzykomórkowych warunkuje homeostazę tkankową uczestnicząc w regulacji proliferacji komórkowej. Sądzi się, że GJIC stanowią drogę przekazywania sygnałów stymulujących i hamujących wzrost komórek [7,62]. Przypuszcza się również [7], że połączenia gap biorą udział w przekazywaniu sygnałów odpowiedzialnych za apoptozę. Nieprawidłowe więc funkcjonowanie transportu międzykomórkowego za pośrednictwem połączeń gap, może być przyczyną zmian patologicznych komórek. Przypuszcza się również, że defekty GJIC mogą odgrywać istotną rolę w transformacji nowotworowej [9, 47].

Dysfunkcja GJIC wydaje się być głównie konsekwencją nieprawidłowej ekspresji genów koneksynowych (Cx) i/lub zmiany wewnątrzkomórkowej lokalizacji koneksyn [62],

aczkolwiek inne mechanizmy są również uwzględniane (np. zaburzenie fosforylacji koneksyn). Pod wpływem wielu NGCs wykazano obniżoną i/lub brak ekspresji genów Cx. Ester forbolu (TPA) hamował ekspresję Cx43 w komórkach nabłonkowych wątroby szczura [48]. Obniżoną ekspresję Cx32 w komórkach wątroby szczura wykazano pod wpływem Wy-14,643 i DDT [7, 44]. W wątrobie szczura oraz w hodowli hepatocytów gryzoni, również fenobarbital blokował ekspresję Cx32; ponadto, stwierdzono nieprawidłową lokalizację (w cytoplazmie) produktu białkowego Cx32 [25]. Zmiany ekspresji genów koneksynowych stwierdzane są również w liniach komórkowych różnego typu nowotworów. Obniżony poziom ekspresji Cx43 stwierdzono zarówno w liniach komórkowych nowotworu sutka jak i w tkankach ludzkich [29]. W nowotworach sutka wykazano również obniżoną ekspresję Cx26 [54], a w komórkach raka nerek zahamowanie ekspresji genu Cx32 [20]. Ponadto, wykazywana w komórkach nowotworowych obniżona aktywność transkrypcyjna genów koneksynowych często korelowała z hipermetylacją ich regionów promotorowych [20, 54]. Stąd pojawiają się sugestie, że zmiana metylacji DNA stanowić może ważny mechanizm nieprawidłowej ekspresji genów koneksynowych.

W badaniach regulacji ekspresji Cx32 i Cx43, przeprowadzonych w warunkach *in vitro* na liniach komórkowych wątroby oraz na izolowanych hepatocytach z wątroby szczura stwierdzono [40], że aktywność transkrypcyjna badanych genów zdeterminowana jest poziomem metylacji ich sekwencji promotorowych. Wykazano również, że 5-aza-2-deoksy-cytydyna (5-AZA), inhibitor metylotransferazy DNA, wywoływała reekspresję Cx32, wzrost połączeń międzykomórkowych i ponowne przywrócenie funkcjonowania GJIC.

Powyższe wyniki badań sugerują, że hamujący wpływ NGCs na komunikację międzykomórkową typu gap może być konsekwencją hipermetylacji sekwencji promotorowych genów Cx.

PODSUMOWANIE

Badaniom metylacji DNA przypisywane są ogromne perspektywy zarówno w rozwoju wczesnej diagnostyki zmian nowotworowych jak i w działaniach terapeutycznych [30,37,42,52]. Zmiana profilu metylacji DNA rozpatrywana jest jako wczesny molekularny marker zmian towarzyszących rozwojowi procesu nowotworowego [15, 30]. Wyniki badań metylacji DNA wskazują również na możliwość interwencji farmakologicznej w ten proces, poprzez regulację stopnia metylacji regionów promotorowych genów [42].

O roli metylacji DNA świadczą również podjęte przez niemiecką firmę biotechnologiczną Epigenomic z firmą Roche z Bazylei, prace zmierzające do opracowania testów diagnostycznych raka, opartych na badaniu wzoru metylacji DNA.

Dotychczasowe wyniki badań metylacji DNA, wnoszą również istotne elementy w mechanizmy działania przynajmniej niektórych NGCs. I aczkolwiek dokładne zrozumienie roli metylacji DNA w kancerogenezie wymaga jeszcze wielu badań, trudno nie zgodzić się z aktualnym poglądem, że zmiany wzoru i poziomu metylacji DNA stanowią ważny element procesu nowotworowego.

G. Kostka, K. Urbanek

DNA METHYLATION – ALTERNATIVE MECHANISM
OF CHEMICAL CARCINOGENESIS

Summary

It is increasingly accepted that the initiation of chemical carcinogenesis should be considered as a transformation process of a normal cell caused by genetic changes, i.e. mutational DNA damage and/or epigenetic changes, which render normal gene expression impossible with the preservation of the DNA sequence intact. Epigenetic DNA methylation changes have been among the most extensively investigated processes in the recent years. Many types of cancer cells have been found to exhibit an increased or reduced level of CpG sequence methylation in promoter regions of genes, especially the genes whose protein products take part in the control of cell cycle regulation. In view of the fact that DNA methylation is thought to play a role in gene expression, its abnormal level in the genes that encode proteins participating in the control of the cell cycle and apoptosis regulation may disturb cell homeostasis resulting in pathologies that may, in turn, lead to neoplastic transformation. Although changes in the mechanisms of transcriptional activity caused by methylation of cytosine in CpG sequences have not been completely elucidated, it has been determined that this relationship is associated with a decreased level of histone acetylation, which induced a more densely-packaged chromatin structures in the methylated regions of chromosomal DNA.

A large proportion of chemical carcinogens consists of chemicals whose carcinogenic activity is not related to direct damage of the genetic material. The changes in DNA methylation are being considered as one mechanism of action for non-genotoxic carcinogens (NGCs). The significance of non-genotoxic agents in the development of the carcinogenesis process indicate that their mechanisms of the action should be investigated in terms of health hazards they pose to humans exposed to this type of environmental pollutants.

PÍSMIENNICTWO

1. *Ballestar E., Esteller M.*: The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing. *Carcinogenesis* 2002, 23, 1103-1109.
2. *Bestor T.H.*: The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* 2000, 9, 2395-2402.
3. *Bhattacharya S.K., Ramchandani S., Cervoni N., Szyf M.*: A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 1999, 397, 579-583.
4. *Bird A.*: DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Dev.* 2002, 16, 6-21.
5. *Bombai V., Moggs J.G., Orphanides G.*: Perturbation of epigenetic status by toxicants. *Toxicol. Lett.* 2004, 149, 51-58.
6. *Bourgarel-Rey V., El Khyari S., Rimet O., Bordas B., Guigal N., Braguere D., Seree E., Barra Y., Briand L.*: Opposite effects of antimicrotubule agents on *c-myc* oncogene expression depending on the cell lines used. *Eur. J. Cancer* 2000, 36, 1043-1049.
7. *Chipman J.K., Mally A. and Edwards G.O.*: Disruption of gap junctions in toxicity and carcinogenicity. *Toxicol. Sci.* 2003, 71, 146-153.
8. *Chuang L.S., Inn H.I., Koh T.W., Ng H.H., Xu G. and Li B.F.*: Human DNA– (cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21 WAF1. *Science* 1997, 277, 1996-2000.
9. *Coffin J.C., Ge R., Yang S., Kramer P.M., Tao L., Pereira M.A.*: Effect of trihalomethanes on cell proliferation and DNA methylation in female B6C3F1 mouse liver. *Toxicol. Sci.* 2000, 58, 243-252.
10. *Cole M.D., McMahon S.B.*: The myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene* 1999, 18, 2916-2924.

11. *Crasl-Kraupp B., Luebeck G., Wagner A., Löw-Baselli A., de Gunst M., Waldhör T., Moolgavkar S., Schulte-Hermann R.*: Quantitative analysis of tumor initiation in rat liver: role of cell replication and cell death (apoptosis). *Carcinogenesis* 2000, 21, 1411-1421.
12. *Dang C.V.*: c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol. Cell Biol.* 1999, 19, 1-11.
13. *Dedampo N.D., Wilson M.R. and Trosko J.E.*: Cooperation of *bcl-2* and *myc* in the neoplastic transformation of normal rat liver epithelial cells is related to the down-regulation of gap junction-mediated intercellular communication. *Carcinogenesis* 2000, 21, 1501-1506.
14. *Dynlacht B.D.*: Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle. *Nature* 1997, 389, 149-152.
15. *Esteller M., Corn P.G., Baylin S.B., and Herman J.G.*: A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001, 61, 3225-3229.
16. *Esteller M., Sparks A., Toyota M., Sanchez-Cespedes M., Capella G., Peinado M.A., Gonzalez S., Tarafa G., Sidransky D., Meltzer S.J., Baylin S., Herman J.G.*: Analysis of Adenomatous Polyposis promoter Hypermethylation in Human Cancer. *Cancer Res.* 2000, 60, 4366-4371.
17. *Ge R., Tao L., Kramer P.M., Cunningham M.L., Pereira M.A.*: Effect of peroxisome proliferators on the methylation and protein level of the c-myc protooncogene in B6C3F1 mice liver. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2002, 16, 41-47.
18. *Ge R., Wang W., Kramer P.M., Yang S., Tao L., Pereira M.A.*: Wy-14,643-induced hypomethylation of the c-myc gene in mouse liver. *Toxicol. Sci.* 2001, 62, 28-35.
19. *Hanada M., Delia D., Aiello A., Stadtmauer E. and Reed J.C.*: *bcl-2* gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993, 82, 1820-1828.
20. *Hirai A., Yano T., Nishikawa K., Suzuki K., Asano R., Satoh H., Hagiwara K., Yamasaki H.*: Down-regulation of connexin 32 gene expression through DNA methylation in a human renal cell carcinoma cell. *Am. J. Nephrology* 2003, 23, 172-177.
21. *Holden P.R., Odum J., Soames A.R., Foster J.R., Elcombe C.R., Tugwood J.D.*: Immediate-early gene expression during regenerative and mitogen-induced liver growth in the rat. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 1998, 12, 79-82.
22. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances. 1999, 73, 131-182.
23. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some industrial chemicals. 2000, 77, 41-148.
24. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some thyrotropic agents. 2001, 79, 161-289, 411-493.
25. *Ito S., Tsuda M., Yoshitake A., Yanoi T. and Masegi T.*: Effect of Phenobarbital on hepatic gap junctional intercellular communication in rats. *Toxicol. Pathol.* 1998, 26, 253-259.
26. *Jones P.A., Takai D.*: The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 2001, 293, 1068-1070.
27. *Kelly W.K., Richon V.M., O'Conner O., Curley T., MacGregor-Curtelli B., Tong W., Klang M., Schwartz L., Richardson S., Rosa E., Drobnjak M., Cordon-Cordo C., Xchiao J.H., Rifking R., Marks O.A., Scher H.*: Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously. *Chin. Cancer Res.* 2003, 9, 3578-3588.
28. *Kolaja K.L., Engelken D.S.T. and Klaassen C.D.*: Inhibition of gap-junctional communication in intact rat liver by nongenotoxic hepatocarcinogens. *Toxicology* 2000, 146, 15-22.
29. *Laird D.W., Fistouris P., Batist G., Alpert L., Huynh H.T., Carystions G.D., Carystinos G.D., and Alaoni-Jamali M.D.*: Deficiency of connexin 43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. *Cancer Res.* 1999, 59, 4104-4110.
30. *Laird P.W.*: The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3, 253-266.
31. *Lehmann U., Langer F., Feist H., Flockner S., Hasaemeier B. and Kreipe H.*: Quantitative asses-

- sment of promoter hypermethylation during breast cancer development. *Am. J. Pathol.* 2002, 160, 605-612.
32. *Loung W.K., Yu I., Ng E.K.W., To K.F., Ma P.K., Lee T.L., Go M.Y., Chung S.C. and Sung J.J.*: Cocurrent hypermethylation of multiple tumor-related genes in gastric carcinoma and adjacent normal tissues. *Cancer* 2001, 91, 2294-2301.
 33. *Mally A. and Chipman J.K.*: Non-genotoxic carcinogens: Early effects on gap junctions, cell proliferation and apoptosis in the rat. *Toxicology* 2002, 180, 233-248.
 34. *Narlikar G.J., Fan H.Y., Kingston R.E.*: Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 2002, 108, 475-487.
 35. *Novik K.L., Nimmrich I., Gene B., Maier S., Piepenbrock C., Olek A., Beck S.*: Epigenomics: Genome-Wide Study of Methylation Phenomena. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2002, 4, 111-128.
 36. *Okano M., Bell D.W., Haber D.A., and Li E.*: DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt 3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999, 99, 247-257.
 37. *Palmisano W.A., Divine K.K., Saccomanno G., Gilliland F.D., Baylin S.B., Herman J.G., and Belinsky S.A.*: Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res.* 2000, 60, 5954-5958.
 38. *Pereira M.A., Kramer P.M., Conran P.B., Tao L.*: Effect of chloroform on dichloroacetic and trichloroacetic acid-induced hypomethylation and expression of the c-myc gene and on their promotion of liver and kidney tumors in mice. *Carcinogenesis* 2001, 22, 1511-1519.
 39. *Pereira M.A., Wang W., Kramer P.M. and Tao L.*: Prevention by methionine of dichloroacetic acid-induced liver cancer and DNA hypomethylation in mice. *Toxicol. Sci.* 2004, 77, 243-248.
 40. *Piechocki M.P., Burk R.D., and Ruch R.J.*: Regulation of connexin 32 and connexin 43 gene expression by DNA methylation in rat liver cells. *Carcinogenesis* 1999, 20, 401-406.
 41. *Plant N.J., Horley N.J., Dickins M., Hasmall S., Elcombe C.R., Bell D.R.*: The coordinate regulation of DNA synthesis and suppression of apoptosis is differentially regulated by the liver growth agents, phenobarbital and methylclofenapate. *Carcinogenesis* 1998, 19, 1521-1527.
 42. *Plumb J.A.*: Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5- azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Res.* 2000, 60, 6039-6044.
 43. *Pogribny I.P., James S.J.*: Reduction of p53 gene expression in human primary hepatocellular carcinoma is associated with promoter region methylation without coding region mutation. *Cancer Lett.* 2002, 176, 169-174.
 44. *Ren P., Mehta P.P. and Ruch R.J.*: Inhibition of gap junctional intercellular communication by tumor promoters in connexin 43 and connexin 32-expressing liver cells: Cell specificity and role protein kinase C. *Carcinogenesis* 1998, 19, 169-175.
 45. *Roberts R., A., Nebert D.W., Hickman J.A., Richburg J.H., Goldsworthy T.L.*: Perturbation of the mitosis/apoptosis balance: a fundamental mechanism in toxicology. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1997, 38, 107-115.
 46. *Robertson K.D., Jones P.A.*: DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 2000, 21, 461-467.
 47. *Rosenkranz H.S., Pollack N., Cunningham A.R.*: Exploring the relationship between the inhibition of gap junctional intercellular communication and other biological phenomena. *Carcinogenesis* 2000, 21, 1007-1011.
 48. *Ruch R.J., Trasko J.E. and Madhukar B.V.*: Inhibition of connexin 43 gap junctional intercellular communication by TPA requires ERK activation. *J. Cell Biochem.* 2001, 83, 163-169.
 49. *Schulte-Hermann R., Bursch W., Marian B., Grasl-Kraupp B.*: Active cell death (Apoptosis) and cellular proliferation as indicators of exposure to carcinogens. *IARC Sci. Publ. Lyon* 1999, 146, 273-285.
 50. *Sharrard R.M., Royds J.A., Rogers S., Shorthouse A.J.*: Patterns of methylation of the c-myc gene in human colorectal cancer progression. *Br. J. Cancer* 1992, 65, 667-672.
 51. *Singal R., Ginder G.D.*: DNA Methylation. *Blood* 1999, 93, 4059-4070.

52. *Szyf M.*: The DNA methylation machinery as a therapeutic target. *Curr. Drug Targets* 2000, 1, 101-118.
53. *Tamura G., Yin L., Wang S., Fleisher A.S., Zou T., Abraham J.M., Kong D., Smolinski K.N., Wilson K.T., James S.P., Silverberg S.G., Nishizuka S., Terrashima M., Motoyama T. and Meltzer S.I.*: E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. *J. Natl.Cancer Inst.* 2000, 92, 569-573.
54. *Tan L.W., Bianco T., Dubrovic A.*: Variable promoter region CpG island methylation of the putative tumor suppressor gene connexin 26 in breast cancer. *Carcinogenesis* 2002, 23, 231-236.
55. *Tao L., Wang W., Li L., Kramer M., and Pereira M.A.*: Effect of dibromoacetic acid on DNA methylation, glycogen accumulation, and peroxisome proliferation in mouse and rat liver. *Toxicol. Sci.* 2004, 82, 62-69.
56. *Tao L., Yang S., Xie M., Kramer P.M., Pereira M.A.*: Hypomethylation and over expression of c-jun and c-myc protooncogenes and increased DNA methyltransferase activity in dichloroacetic, trichloroacetic acid-promoted mouse liver tumors. *Cancer Lett.* 2000, 158, 185-193.
57. *Watson R.E., Goodman J.I.*: Epigenetics and DNA methylation come of age in toxicology. *Toxicol. Sci.* 2002, 67, 11-16.
58. *Watson R.E., Curtin G.M., Doolittle D.J., and Goodman J.I.*: Progressive alteration in global and GC-rich DNA methylation during tumorigenesis. *Toxicol. Sci.* 2003,75, 289-299.
59. *Weinstein I.B.*: Discorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis. *Carcinogenesis* 2000, 21, 857-864.
60. *Wolffe A.P., Jones P.L., Wade P.A.*: DNA demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 5894-5896.
61. *Worm J., Guldberg P.*: DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J. Oral Pathol. Med.* 2002, 32, 443-449.
62. *Yamasaki H., Naus Ch.C.G.*: Role of connexin genes in growth control. *Carcinogenesis* 1996, 17, 1199-1213.

Otrzymano: 2004.10.20