



Modyfikacje epigenetyczne a ekspresja genów w nowotworzeniu

Epigenetic modifications and gene expression in cancerogenesis

Marta Poczęta, Ewa Nowak, Dominik Bieg, Ilona Bednarek

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

STRESZCZENIE

Modyfikacje epigenetyczne są zmianami regulującymi ekspresję genów. Spośród tych modyfikacji metylacja DNA w regionach promotorowych genów jest najlepiej poznaną zmianą. Za metylację DNA odpowiada rodzina metylo-transferaz DNA. Proces ten jest odwracalny w wyniku reakcji demetylacji, w których pośrednią rolę odgrywają białka TET. Hipometylacja DNA oraz hipermetylacja regionów promotorowych genów bogatych w wyspy CpG należy do epigenetycznych mechanizmów powszechnie występujących w wielu typach nowotworów. Epigenetyczny mechanizm transformacji nowotworowej związany jest nie tylko ze zmianami w poziomie metylacji poszczególnych onkogenów czy też genów supresorowych, ale także z potranslacyjnymi modyfikacjami białek histonowych wymuszających zmiany w strukturze chromatyny. Określone modyfikacje, takie jak: metylacja, acetylacja, fosforylacja, ubikwitynacja, biotynylacja, ADP-rybozylacja oraz sumoilacja, mogą wpływać na kondensację chromatyny oraz na białka i kompleksy enzymatyczne decydujące o dostępności DNA, co z kolei wpływa na upakowanie, replikację, rekombinację, procesy naprawy oraz ekspresję DNA. W mechanizmach modulacji ekspresji genów zaangażowanych w procesy prowadzące do rozwoju nowotworów znaczącą rolę odgrywają dwa główne rodzaje małych interferencyjnych RNA siRNA oraz miRNA.

Uzyskiwane dane z prowadzonych badań pokazują, że mechanizmy epigenetyczne uczestniczą w procesach prowadzących do rozwoju nowotworów, a poszukiwanie epigenetycznych biomarkerów może być przydatne w terapii nowotworów.

SŁOWA KLUCZOWE

zmiany epigenetyczne, nowotwory, metylacja DNA, białka histonowe, mikroRNA, ekspresja genów

Received: 01.12.2016

Revised: 17.01.2017

Accepted: 15.09.2017

Published online: 30.04.2018

Adres do korespondencji: Mgr Ewa Nowak, Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec, Polska, tel. + 48 32 364 12 57, e-mail: ewa.nowak@sum.edu.pl

Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
www.annales.sum.edu.pl

**ABSTRACT**

Epigenetic modifications are changes which can regulate gene expression. DNA methylation in gene promoter regions is the most well-known change among epigenetic modifications. The family of DNA methyltransferases is responsible for DNA methylation. Methylation is reversible due to the demethylation reaction, executed by TET proteins. DNA hypomethylation and hypermethylation of gene promoter regions rich in CpG islands belonging to epigenetic mechanisms commonly occur in many tumors. The epigenetic mechanism of malignant transformation is related not only to changes in the level of methylation of oncogenes or tumor suppressor genes, but also to post-translational modifications of histone proteins, forcing changes in the chromatin structure. Certain modifications, such as methylation, acetylation, phosphorylation, ubiquitination, biotinylation, ADP-ribosylation, and sumoylation may affect chromatin condensation, protein and enzyme complexes that determine the availability of DNA, which then affects the condensation, replication, recombination and repair processes, as well as gene expression.

Among the modulatory mechanisms of the expression of genes involved in the processes leading to cancer development, two main types of small interfering RNA play an important role: siRNA and miRNA. Research data show that epigenetic mechanisms are involved in the processes leading to tumor development, and searching for epigenetic biomarkers may be useful in epigenetic cancer therapy.

KEY WORDS

epigenetic modifications, cancers, DNA methylation, histone proteins, microRNA, gene expression

WPROWADZENIE

O budowie i funkcji komórek decydują procesy związane z ekspresją genów, w tym produkty tej ekspresji – kwasy rybonukleinowe i białka. Regulacja ekspresji genów zachodzi na wielu poziomach i obejmuje tak procesy transkrypcji, zmian potranskrypcyjnych, jak i translacji wraz ze zmianami potranslacyjnymi. Znanych jest wiele czynników regulujących ekspresję genów. Wśród nich wymienia się tak zwane czynniki *cis* i *trans*, z których pierwsze przynależą do materiału genetycznego (np. sekwencje nukleotydowe o charakterze tzw. wzmacniających lub wyciszających transkrypcję – odpowiednio, z ang.: *enhancery* i *silencer*), zaś drugie najczęściej należą do białek regulatorowych wiążących się z materiałem genetycznym. Zmiany sekwencji nukleotydowej w materiale genetycznym, szczególnie te o charakterze mutacji zmiany sensu czy mutacji nonsensowych, w zrozumiały sposób wpływają na procesy ekspresji genów. Zmianom o charakterze tzw. cichych mutacji czy polimorfizmów genów trudniej już przypisać rolę w modyfikacji ekspresji genów. Zawsze jednak takim zmianom można próbować przypisywać rolę między innymi w indukowaniu zmian w konformacji materiału genetycznego, a tym samym jego potencjalnie odmiennym „zachowaniu” na dalszych etapach ekspresji w komórkach, chociażby „dostępnością” wybranych sekwencji nukleotydowych dla białek regulatorowych czy enzymatycznych. Coraz częściej doniesienia literaturowe przynoszą liczne informacje dotyczące roli innych zmian w obrębie informacji genetycznej, nie wiążące

się ze zmianami sekwencji nukleotydowej, ale z tak zwanymi modyfikacjami epigenetycznymi [1,2].

Można wysunąć hipotezę, iż na przykład polimorfizmy czy mutacje „ciche” nie muszą wnosić innej/nowej informacji „kodującej”, ale poprzez wpływ na strukturę pierwszorzędową materiału genetycznego mogą współdziałać ze zmianami epigenetycznymi, a tym samym wpływać na ekspresję genów. Należy podkreślić, że w przeciwieństwie do mutacji, modyfikacje epigenetyczne są odwracalne i w rezultacie mogą być modyfikowane poprzez zastosowanie celowanych terapii epigenetycznych [2,3,4].

O tym, iż modyfikacje epigenetyczne są zmianami regulującymi ekspresję genów, świadczy między innymi często opisywany w literaturze proces modyfikacji DNA o charakterze metylacji w regionach promotorowych genów. Globalna hipometylacja DNA oraz hipermetylacja regionów promotorowych genów bogatych w wyspy CpG należy do epigenetycznych mechanizmów powszechnie spotykanych w licznych nowotworach [5,6]. Badania epigenetyczne, których celem jest analiza sekwencji regionów promotorowych genów, struktury chromatyny oraz enzymów odpowiedzialnych za modyfikację chromatyny, mają na celu poszukiwanie innych niż zmiany genetyczne mechanizmów warunkujących ekspresję genów [2].

Metylacja DNA

Spośród modyfikacji epigenetycznych metylacja DNA jest najlepiej poznana u człowieka zmianą prowadzącą do inaktywacji genów. Zjawisko metylacji DNA pełni podstawową rolę w procesach, takich jak: inaktywacja chromosomu X, rozwój embrionalny, tzw. imprinting



genowy czy też wyciszenie sekwencji powtórzonych [2,7,8]. Najczęstszym miejscem metylacji w genomie człowieka są dinukleotydy CpG (*cytosine that precede a guanosine*), czyli obszary DNA określane mianem wysp CpG, zazwyczaj zlokalizowane w regionach promotorowych genów. Proces metylacji u człowieka polega na kowalencyjnym przyłączeniu grupy metylowej, pochodzącej z S-adenozylu-L-metioniny do węgla w pozycji 5 pierścienia pirymidynowego cytozyny, powodując w konsekwencji utworzenie 5-metylocytozyny [2,3,8]. Bardzo często w wyniku metylacji w obrębie wysp CpG w regionach promotorowych genów dochodzi do wyciszenia ich aktywności [5,6].

Za metylację DNA odpowiada rodzina metylotransferaz DNA – DNMTs (*DNA methyltransferases*). Pod względem aktywności katalitycznej w komórkach ssaków wyodrębnione zostały trzy metylotransferazy: DNMT1, DNMT3a i DNMT3b. Enzymem charakteryzującym się większym powinowactwem do hemimetylowanego DNA niż niemetylowanego DNA jest metylotransferaza DNMT1. Pełni ona ważną rolę w kopiowaniu wzoru metylacji DNA na nowo syntetyzowanej nici DNA podczas procesu replikacji. Biorąc pod uwagę znaczenie replikacji DNA, ekspresja DNMT1 podlega ścisłej regulacji w czasie trwania cyklu komórkowego, osiągając maksymalny poziom w fazie S [4,9].

DNMT3a i DNMT3b są to metylotransferazy odgrywające kluczową rolę w metylacji *de novo*. Odpowiadają za określenie specyficznego wzoru metylacji DNA podczas rozwoju [4,8]. Niezbędna dla aktywności enzymatycznej metylotransferaz DNMT3a i DNMT3b jest metylotransferaza DNMT3L, która sama nie posiada aktywności katalitycznej [8,9].

Metylotransferaza DNMT2 wykazuje silną aktywność metylotransferazy tRNA, jest enzymem związanym raczej z metylacją RNA niż DNA. Obecnie DNMT2 określa się zgodnie z nomenklaturą genów według HUGO (HGNC – *Gene Nomenclature Committee*) jako TRDMT1 (metylotransferaza 1 tRNA kwasu asparaginowego – *tRNA aspartic acid methyltransferase 1*) [8,9].

Spośród kilku głównych mechanizmów zaangażowanych w ekspresję genów poprzez metylację DNA u ssaków, pierwszy polega na bezpośrednim przestrzennie blokującym wpływie 5-metylocytozyny na czynniki transkrypcyjne i elementy wiążące DNA typu *cis*. Kolejny mechanizm polega na bezpośrednim zahamowaniu aktywności czynników transkrypcyjnych wiążących DNA poprzez interakcję z białkami wiążącymi metylowane CpG-MBP (*methyl-CpG-binding protein*), do których zaliczamy, m.in. MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3, MBD4, Kaiso. Białka MeCP2 oraz MBDs (domeny wiążące metylowane CpG – *methyl-CpG binding domains*), wychwytywane przez metylowane CpG, mogą pełnić rolę mediatorów w wyciszaniu transkrypcji poprzez związanie z Sin3A

kompleksem wyciszającym deacetylaz histonów HDACs (*histone deacetylases*). Trzeci z opisywanych mechanizmów regulujących ekspresję genów poprzez metylację DNA polega na zdolności białek związanych z metylowanymi wyspami CpG do rozpoznawania dużych kompleksów białkowych odpowiadających za ostateczną weryfikację dostępności DNA poprzez modyfikację struktury chromatyny. Białko MBD2 pośredniczy w procesie przyłączania metylowanego DNA do dwóch kompleksów MeCP1 oraz Mi2/NuRD wyciszających transkrypcję. Kompleksy te, związane z białkiem MBD2, wykorzystywane są następnie do skierowania HDAC i modulatorów chromatyny do metylowanych promotorów, gdzie powodują stłumienie transkrypcji. MBD4 pełni natomiast istotne znaczenie w zachowaniu roli metylowanego DNA w regulacji genów oraz hamowaniu występowania mutacji w miejscach CpG. Białko Kaiso w jądrze komórkowym pełni rolę represora transkrypcji poprzez kierowanie kompleksu N-CoR do metylowanych i niemetylowanych promotorów genów. Ponadto kompleks N-CoR zawiera deacetylazę histonów 3, która odpowiada za generowanie transkrypcyjnie nieaktywnej struktury chromatyny [8,10,11]. Jedno z białek – białko hCGBP (*human CpG binding protein*) – pełni rolę aktywatora transkrypcji i może specyficznie rozpoznawać i przyłączać niemetylowane dinukleotydy CpG [8].

Proces metylacji cytozyn jest odwracalny na drodze demetylacji, w której pośrednią rolę odgrywają białka TETs (*ten-eleven translocation proteins*) [5,6].

Proces metylacji DNA może być również zaangażowany w regulację struktury chromatyny, ściśle przy tym współpracując z potranslacyjnymi modyfikacjami histonów, a istotą tego oddziaływania jest wzajemne wzmocnienie lub hamowanie poprzez sprzężenie zwrotne. Dowodem bezpośredniego związku pomiędzy dwoma głównymi, wyciszającymi epigenetycznymi mechanizmami jest rola białka EZH2 (*Enhancer of Zeste homolog 2*) należącego do grupy białek Polycomb (PcG – *polycomb group*) w rozpoznawaniu DNMTs. Ponadto utrata funkcji histonu H1 może zapoczątkować określone modyfikacje w strukturze chromatyny, m.in. ograniczenie lokalnej kondensacji chromatyny bez wpływu całkowitej metylacji DNA. Prawdopodobnie histon H1 pełni rolę w utrzymaniu czy też ustanowieniu określonego wzoru metylacji DNA, na co może wskazywać fakt, że wiele genów z ekspresją regulowaną właśnie poprzez utratę histonu łącznikowego charakteryzuje się obniżonym poziomem metylacji CpG w specyficznych regionach regulacyjnych tych genów [10].

Epigenetyczny mechanizm regulacji ekspresji genów, a także transformacji nowotworowej związany jest nie tylko ze zmianami w poziomie metylacji poszczególnych genów, w tym onkogenów czy genów supresorowych, lecz także z potranslacyjnymi modyfikacjami



białek histonowych – zmianami wymuszającymi przebudowę w strukturze chromatyny. Określone modyfikacje histonów, takie jak: metylacja, acetylacja, fosforylacja, ubikwitynacja, biotynylacja, ADP-rybozylacja oraz sumoilacja, mogą wpływać na kondensację chromatyny decydując o „dostępności” DNA dla innych białek i kompleksów enzymatycznych, co z kolei wpływa nie tylko na procesy replikacji, rekombinacji czy naprawy DNA, lecz także na ekspresję informacji genetycznej [3,4,7,8,12]. W tym ostatnim aspekcie szczególnie istotny jest wpływ różnych kombinacji modyfikacji histonowych na wychwytywanie białek regulujących transkrypcję i wiązanie ich do specyficznie zmienionych wariantów histonowych [2].

Modyfikacje epigenetyczne białek histonowych

Niezwykle istotnym mechanizmem epigenetycznym, zaangażowanym w regulację ekspresji genów, jest modyfikacja struktury chromatyny. Modyfikacje potranslacyjne białek histonowych są procesami bardzo dynamicznymi. Heterochromatyna charakteryzuje się wyższym poziomem kondensacji z ograniczonym dostępem do DNA, w związku z tym może ograniczać proces transkrypcji genów. Z kolei euchromatyna, ze względu na strukturę o niższym poziomie kondensacji, jest głównie związana z genami aktywnymi transkrypcyjnie [8,13]. Nukleosom, najmniejsza, powtarzająca się podjednostka strukturalna chromatyny, zbudowany jest z odcinka DNA, którego około 147 par zasad nawiniętych jest wokół 8 histonów rdzeniowych tworzących oktamer. W skład oktameru wchodzi po dwa histony H2A, H2B, H3 oraz H4. Histon H1, określany jako histon łącznikowy, oraz białka niehistonowe związane są we włókna nukleosomowe, co w konsekwencji prowadzi do utworzenia struktur chromatyny wyższego rzędu oraz domen jądrowych. Włókna chromatyny charakteryzują się różnicą w poziomie kondensacji oraz obecnością składników podstawowych, ze względu na obecność wariantów histonowych oraz ich potranslacyjnych modyfikacji. Czynniki te stanowią dodatkową ochronę informacji, które są dziedziczone przez liczne pokolenia komórek i odpowiadają za kontrolę ekspresji genów, a także ostatecznie decydują o funkcji komórek. Istnieje kilka czynników pełniących kluczową rolę w przebudowie chromatyny, m.in. enzymy modyfikujące białka histonowe, a także chaperony histonowe, które odgrywają zasadniczą rolę w metabolizmie histonów, a jednocześnie są zaangażowane w ochronę i organizowanie białek histonowych w chromatynę. Podatność chromatyny na różnorodne dynamiczne modyfikacje jest niezwykle ważna podczas procesów naprawczych DNA, gdzie ułatwia to przywrócenie jej integralności [3,7,14]. Stabilność kompleksu nukleosomu sprawia, że obecne w nim DNA jest niedostępne dla innych białek

wiązujących, w związku z tym wysoko skondensowana chromatyna przyczynia się do hamowania procesów komórkowych wymagających bezpośrednich interakcji z DNA, takich jak replikacja, transkrypcja oraz naprawa. W warunkach *in vivo* dostępność DNA jest regulowana przez różnorodne procesy komórkowe, m.in. dynamiczne interakcje pomiędzy kompleksem ATP-zależnym, modyfikacje kowalencyjne histonów, wykorzystanie wariantów histonowych oraz metylację DNA [13].

Białka histonowe, podlegając różnym modyfikacjom potranslacyjnym, decydują o dostępności szeregu czynników do DNA. Różne kombinacje modyfikacji histonowych w dużym stopniu wywierają wpływ na ekspresję poszczególnych genów poprzez wychwytywanie białek regulujących transkrypcję i wiązanie ich do specyficznie zmienionych wariantów histonowych [2,4].

Acetylacja i deacetylacja histonów

Acetylacja histonów zachodzi w obrębie reszt argininy lub lizyny tych białek i prowadzi do wzrostu aktywności transkrypcyjnej DNA. Proces acetylacji histonów katalizowany jest przez acetylotransferazy histonowe (HATs – *histone acetyltransferases*), które wykorzystują acetylo-CoA jako kofaktor reakcji, przyłączając grupę acetylową do grupy ε-aminowej zlokalizowanej w resztach lizyny. Konsekwencją tej modyfikacji jest rozluźnienie struktury chromatyny, co stwarza możliwość oddziaływania z czynnikami transkrypcyjnymi. Enzymami wykazującymi przeciwną aktywność do acetylotransferaz są deacetylazy histonów (HDACs – *histone deacetylases*). Reakcje te wpływają na kondensację chromatyny i inaktywację transkrypcji specyficznych genów [3,8].

Acetylotransferazy histonów zostały podzielone na cztery główne grupy. Pierwszą grupę GNAT (*GCN5-related-N-acetyltransferases*) tworzą białka, które są związane z inicjacją transkrypcji (GCN5, PCAF), elongacją (Elp3) oraz usuwaniem histonów i wyciszeniem telomerów (HAT1). Do drugiej grupy należą acetylazy MYST: MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 i Tip60 zaangażowane w proces apoptozy, wchodzące w skład kompleksów białkowych związanych z DNA w miejscach *origin* replikacji (HBO1), a także uczestniczące w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Trzecia grupa acetylaz obejmuje białka p300 i CBP (*p300/cyclic-AMP-response-element binding protein*), stanowiące koaktywatory transkrypcji, które charakteryzują się obecnością sekwencji homologicznych do acetylaz grupy GNAT. W skład czwartej grupy wchodzi czynniki transkrypcyjne (TAFII250), a także kofaktory receptorów jądrowych ACTR (*activator of retinoid receptor*), SRC1 (*steroid receptor coactivator 1*). Należy podkreślić, że wiele spośród HAT jest związa-



nych z modyfikacją innych czynników transkrypcyjnych, takich jak białko p53 czy podstawowe czynniki transkrypcyjne TFIIE i TFIIF [10,15,16].

Acetylacja białek histonowych pozwala na większy dostęp czynników transkrypcyjnych do DNA. Poszczególne modyfikacje histonowe są specyficzne wobec wyspecjalizowanych domen białkowych. Bromodomena to domena białkowa, która rozpoznaje regiony ulegające acetylacji przy specyficznych resztach lizyny. Obecna jest w czynnikach transkrypcyjnych oraz HAT, m.in. TAFII250, PCAF, GCN5, ATP-zależnych kompleksach przebudowujących chromatinę (BAZ1B), metylotransferazach (MLL, ASH1L), helikazach (SMARCA) czy też rodzinie białek BET [15,17]. Znaczna acetylacja reszt lizyny może pociągać za sobą aktywację transkrypcji poprzez neutralizację ładunku tych reszt oraz wiązanie kompleksów białkowych zawierających bromodomenę, które mogą obejmować inne enzymy HAT oraz enzymy zaangażowane w reorganizację struktury chromatinu. Proces ten związany jest z łatwo dostępną konfiguracją chromatinu, w związku z czym ułatwiona jest transkrypcja [8]. Po połączeniu z innymi białkami acetylazy tworzą kompleksy enzymatyczne złożone z licznych podjednostek, takie jak kompleks STAGA: SPT3, TAF i acetylaza GCNP. Kompleksy te uczestniczą w acetylacji różnych reszt lizyny poszczególnych histonów, a także łączą się z czynnikami transkrypcyjnymi powodując aktywację lub zahamowanie transkrypcji specyficznych genów. HAT mogą acetylować także białka niehistonowe, do których należą czynniki transkrypcyjne: E2F (*transcription factor required for repression of the adenovirus E2 promoter*), GATA1 (*globin transcription factor 1*), p53, MyoD. Może to powodować większą zdolność łączenia się z DNA i stymulację transkrypcji [16,18].

Reakcje odwracające acetylację histonów katalizowane są przez enzymy zwane deacetylazami (HDAC). Klasyfikacja HDAC opiera się na ich podobieństwie do struktury pierwszorzędowej białka. Zgodnie z tym enzymy te podzielono na cztery grupy. Klasa I obejmuje HDAC1-3 oraz HDAC8, które występują jedynie w jądrze komórkowym. W skład klasy II wchodzi HDAC4-7, HDAC9-10 zdolne do łączenia się z czynnikiem transkrypcyjnym MEF2. Enzymy tej klasy mogą przemieszczać się między cytoplazmą a jądrem komórkowym i pośredniczą w hamowaniu transkrypcji. Klasa III zawiera enzymy SIRT 1 do 7 (*homologue of silent information regulator 2*) obecne w jądrze komórkowym, cytoplazmie lub mitochondriach. Do klasy IV zaliczane są HDAC11. Poza klasą III, której enzymy są NAD^+ -zależne, enzymy wchodzące w skład pozostałych grup są Zn^{2+} -zależne [7,8,18,10].

W przypadku zdecydowanej większości HDAC ich aktywność podlega regulacji na skutek interakcji białkowych. Mechanizmy, które również przyczyniają się do funkcjonowania deacetylaz to modyfikacje potrans-

lacyjne oraz lokalizacje subkomórkowe. Deacetylazy histonów często stanowią składniki dużych kompleksów złożonych z wielu podjednostek, oddziałujących z innymi białkami komórkowymi, które mogą aktywować bądź hamować aktywność enzymatyczną HDAC [10]. Funkcjonowanie deacetylaz powoduje kondensację struktur chromatynowych, co w efekcie przyczynia się do zahamowania transkrypcji. Zastosowanie inhibitorów HDAC może prowadzić do zahamowania wzrostu, różnicowania lub procesów apoptozy komórek nowotworowych w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* [19,20].

Metylacja i demetylacja histonów

Metylacja w obrębie białek histonowych może dotyczyć reszt lizynowych lub argininowych. Pojedyncze reszty lizyny mogą podlegać mono-, di- oraz trimetylacji, natomiast reszty argininy ulegają mono- lub dimetylacji. Proces metylacji histonów nie wpływa bezpośrednio na zmiany strukturalne chromatinu, ale powoduje utworzenie miejsc wiązania dla innych białek, które mogą wpływać na jej kondensację [3]. Najlepiej poznaną formą metylacji jest modyfikacja histonów H3 i H4. Takie same modyfikacje zachodzące w różnych regionach genów mogą powodować przeciwstawne efekty w regulacji ekspresji genów. Z transkrypcyjnie wyciszoną heterochromatiną związane są utworzone trimetylowane formy – H3K9me3, H3K27me3, H3K36me3, H4K20me3 – natomiast z transkrypcyjnie aktywną euchromatiną – H3K4me3 oraz H3K79me3 [2,8,10,21].

Za metylację histonów odpowiedzialne są enzymy metylotransferazy histonów (HMTs – *histone methyltransferases*), które katalizują reakcję przyłączenia grupy metylowej, natomiast antagonistyczne działanie wykazują demetylazy histonów. Modyfikacje te, w połączeniu z acetylacją, determinują wzór białek histonowych, a w konsekwencji oddziałują z odpowiednimi czynnikami transkrypcyjnymi regulując ekspresję genów [2,10]. Enzymy katalizujące reakcje metylacji charakteryzowane są na podstawie specyficzności wobec konkretnego histonu, docelowej reszty aminokwasowej oraz ilości przyłączanych grup metylowych [22]. Do tej pory zidentyfikowano wiele enzymów zaangażowanych w metylację reszt lizyny histonów w obrębie ich N-końca (HKMT – *histone lysine methyltransferase*). Podstawową jednostką strukturalną większości HKMT jest domena SET (Su(var)3-9, enhancer of zeste [E(Z)], trithorax – [TRX]), zbudowana ze 130 aminokwasów, która decyduje o aktywności enzymatycznej metylotransferaz. Jedynym enzymem pozbawionym tej domeny jest Dot1 (*disruptor of telomeric silencing*), który odpowiada za metylację histonu H3 – H3K79. HKMT katalizują przeniesienie grupy metylowej z S-adenozylometioniny (SAM) do grupy ϵ -aminowej lizyny



[19]. W przypadku enzymów przeprowadzających metylację reszt argininy wyróżniono dwie klasy metylotransferaz argininy (*arginine methyltransferases*) – typ I oraz typ II, do których zalicza się rodzinę białek PRMTs (*protein arginine methyltransferases*). Reakcją katalizowaną przez PRMT, w podobnym mechanizmie do HKMT, jest przeniesienie grupy metylowej z S-adenozylometioniny do grupy ω-guanidynowej argininy. PRMT odpowiadają za mono- i dimetylację reszt argininy w N-końcu histonów. Modyfikacje te obejmują zmiany w obrębie histonu H3: odpowiednio 2, 8, 17, 26 reszty argininy H3R2, H3R8, H3R17, H3R26, a także histonu H4 – H4R3. Do najważniejszych enzymów uczestniczących w procesie metylacji argininy należą PRMT1, PRMT4, PRMT5 i PRMT6 [19,23].

Demetylaza histonów odpowiadają za mechanizm demetylacji. Enzym LSD1 (*lysine-specific demethylase 1*) jest wysoce konserwatywnym białkiem wykazującym zdolność do demetylacji mono- i dimetylowanych form H3K4 lub H3K9 [4]. Scharakteryzowano także peptydyloargininodeaminazę 4 (PADI4 – *peptidyl arginine deiminase 4*), która katalizuje usunięcie grupy metylowej z reszty argininy w obrębie histonów H3 i H4 [10]. Przykładem demetylaz, których aktywność enzymatyczna wiąże się z obecnością domeny Jumonji C (JmJC – *domain containing protein*), jest JHDM1 katalizująca demetylację H3K36me₂. JHDM1 wykorzystuje jako kofaktory jony żelaza Fe²⁺ oraz α-ketoglutaran. Zarówno enzym LSD1, jak i JHDM1 wykazują specyficzność wobec mono- lub dimetylowanych białek histonowych. Demetylaza charakteryzująca się przeprowadzaniem reakcji demetylacji wobec trimetylowanych histonów to rodzina JMJD2 składająca się z JMJD2A, JMJD2B, JMJD2C oraz JMJD2D. Odpowiadają one m.in. za reakcję demetylacji H3K9me₃ oraz H3K36me₃ [8,24,19]. Aktywność enzymatyczna demetylaz histonów może wpływać zarówno na aktywację, jak i wyciszenie transkrypcji genów [5]. Nieprawidłowa regulacja enzymów odpowiedzialnych za metylację i demetylację obserwowana jest w różnych typach nowotworów, m.in. raku prostaty, płuca, piersi i mózgu [6].

Fosforylacja histonów

Ważnym mechanizmem epigenetycznym jest fosforylacja białek histonowych, która odgrywa znaczącą rolę w procesach komórkowych, takich jak: apoptoza, mitoza, naprawa DNA, replikacja oraz transkrypcja. Fosforylacja dotyczy przede wszystkim reszt seryny, treoniny oraz tyrozyny wszystkich histonów rdzeniowych, przez co wpływa na strukturę i funkcję chromatyny. Fosforylacja białek histonowych może wpływać na kondensację chromatyny i regulację transkrypcji [25].

Enzymy katalizujące te modyfikacje to kinazy i fosfatazy, które odpowiednio dodają i usuwają te zmiany. Wszystkie z opisanych dotychczas w literaturze kinaz histonowych (*histone kinases*) przeprowadzają reakcję przyłączenia grupy fosforanowej do grupy hydroksylowej w łańcuchu aminokwasowym histonów, wykorzystując jako kofaktor ATP. Przykładem fosforylacji histonów jest H3Y41, katalizowana przez kinazę JAK2 (*Janus kinase 2*) [19]. Podział fosfataz, które przeprowadzają reakcje specyficzne wobec tych samych aminokwasów co kinazy, opiera się na jonach metalu, które są niezbędne dla ich aktywności enzymatycznej. Najlepiej poznana funkcja tych enzymów, poza wpływem na strukturę i funkcjonowanie chromatyny, dotyczy udziału w procesach naprawy DNA oraz regulacji mitozy [25].

ADP-rybozylacja, ubikwitynacja i sumoilacja histonów

Reszty glutaminy i argininy histonów mogą ulegać mono- i poly-ADP rybozylacji (*poly-ADP-ribosylation*, *PARYlation*), potranslacyjnej modyfikacji, zaangażowanej w wiele procesów komórkowych, m.in. naprawę DNA, podziały komórkowe, progresję cyklu komórkowego, transkrypcję, reorganizację chromatyny czy też śmierć komórkową. Reakcja poly-ADP rybozylacji polega na kowalencyjnym przyłączaniu wielu nukleotydów ADP-rybozy pochodzących z dinukleotydu nikotynoamidowego NAD⁺ do reszt aminokwasowych docelowych białek histonowych. Modyfikacje te katalizowane są przez specyficzną rodzinę enzymów: polimerazy poli-(ADP-rybozy) (*poly-ADP-ribose polymerase*, *PARP*) oraz transferazy mono-(ADP-rybozy) (*mono-ADP-ribosyltransferase*, *MART*), a także wykazujące wobec nich antagonistyczne działanie glikohydrolazy poli-(ADP-rybozy) (*poly-ADP-ribose-glycohydrolase*). Polimerazy poli-ADP-rybozy zostały podzielone na trzy klasy. Pierwsza grupa przeprowadza reakcje poly-ADP rybozylacji i należą do niej enzymy PARP1, PARP2, PARP3, PARP4 oraz PARP5. Druga grupa obejmuje enzymy wykazujące tylko zdolność mono-ADP-rybozylacji: PARP6, PARP7, PARP8, PARP10, PARP11, PARP12, PARP14, PARP15 i PARP16. Ostatnią grupę stanowią PARP9 i PARP13, do aktywności których wymagana jest obecność dinukleotydu nikotynoamidowego NAD⁺ [19,26,27]. Połączenie mono-ADP-rybozylacji z metylacją czy też acetylacją histonów, może stanowić wskaźnik poziomu uszkodzenia DNA i wpływać na szlaki sygnałowe regulujące procesy proliferacji, apoptozy lub nekrozy czy zatrzymania cyklu komórkowego. Z kolei reakcje poli-ADP-rybozylacji prawdopodobnie związane są z relaksacją struktury chromatyny [28].



Kolejnym procesem zaangażowanym w potranslacyjne modyfikacje białek histonowych jest ubiquitynacja, będąca polipeptydem zbudowanym z 76-reszt aminokwasowych, o masie cząsteczkowej 8.5 kDa. Reakcja, w której główną rolę pełni to białko, polega na kowalencyjnym przyłączeniu grupy karboksylowej C-końca reszty glicyny ubiquityny do miejsca docelowego, którym najczęściej są reszty lizyny w cząsteczce histonu [19,29,30]. Proces katalizowany jest przez trzy enzymy uczestniczące w poszczególnych etapach reakcji: E1 – enzym odpowiadający za aktywację (*ubiquitin-activating enzyme*), E2 – enzym zaangażowany w proces sprzęgania (*ubiquitin-conjugating enzyme*) oraz E3 – enzym odpowiadający za etap łączenia (*ubiquitin-ligating enzyme*). Za proces odłączenia ubiquityny odpowiadają enzymy deubikwitujące (DUBs, *deubiquitinating enzymes*) [19,29]. Ze względu na ilość docelowych cząsteczek substratu uczestniczących w reakcji, a także ilość przyłączanych cząsteczek ubiquityny możemy mówić o monoubikwitynacji lub multi-monoubikwitynacji. Poli-ubikwitynacja z kolei polega na przyłączeniu przynajmniej dwóch łańcuchów polipeptydowych ubiquityny [29]. Do najlepiej poznanych modyfikacji należy ubiquitynacja w obrębie histonu H2A- H2AK119ub1, która związana jest z wyciszeniem funkcji genów oraz H2BK123ub1, zlokalizowana w histonie H2B, odpowiadająca za inicjację i elongację transkrypcji [19].

Modyfikacją potranslacyjną histonów o podobnym mechanizmie działania do ubiquitynacji jest sumoilacja. Białka SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*) stanowią rodzinę małych podobnych do ubiquityny białek, złożonych ze 100 reszt aminokwasowych, o masie cząsteczkowej 12 kDa. Mechanizm sumoilacji jest analogiczny do ubiquitynacji i polega na kowalencyjnym przyłączeniu białka SUMO do reszt lizyny histonów w procesie katalizowanym również przez trzy enzymy: E1 (*SUMO activating enzyme*), E2 (*SUMO conjugating enzyme*) i E3 (*SUMO ligase*). Odwrócenie reakcji sumoilacji odbywa się przy udziale enzymów należących do rodziny SENPs (*SUMO-specific proteases*) [29]. Zmianom epigenetycznym na drodze sumoilacji podlegają histony H2A, H2B, H3 oraz H4. Dane na temat sumoilacji białek histonowych sugerują, że jest ona związana m.in. z hamowaniem transkrypcji [19,30]. Proces sumoilacji ponadto może w konsekwencji wpływać na naprawę DNA, modyfikację struktury chromatyny, proliferację komórkową czy apoptozę [30].

Warto zaznaczyć, iż zarówno zmiany epigenetyczne o charakterze metylacji DNA, jak i zmiany w obrębie białek histonowych będą mogły wpływać na ekspresję informacji genetycznej także poprzez dodatkowy mechanizm powiązany z bezpośrednim wpływem na aktywność w komórkach specyficznej grupy cząsteczek regulatorowych, jakimi są małe interferencyjne RNA. Na uwagę zasługują głównie małe niekodujące

cząsteczki RNA z grupy mikroRNA (miRNA) oraz z grupy bogatych w elementy transpozycyjne cząsteczek niekodujących RNA związanych z białkami PIWI (piRNA) [2,31,32,33].

Niekodujące cząsteczki RNA

W mechanizmach modulacji ekspresji genów znaczącą rolę odgrywają dwa główne rodzaje małych interferencyjnych RNA – siRNA (krótkie interferujące RNA – *small-interfering RNA*) oraz miRNA (*micro RNA*). Obecnie szczególną uwagę zwraca się na możliwość wykorzystania tych cząsteczek w badaniach klinicznych [34].

Klasyfikacja niekodujących cząsteczek RNA opiera się przede wszystkim na rozmiarach transkryptów, w związku z czym wyróżnić można małe niekodujące RNA (*small non-coding RNAs, ncRNAs*) oraz długie niekodujące RNA (*long non-coding RNAs, lncRNAs*). Niekodujące cząsteczki RNA pełnią ważną funkcję w modyfikacji ekspresji genów. Małe ncRNA odgrywają rolę w regulacji potranskrypcyjnej poprzez zjawisko interferencji RNA (RNAi – *RNA interference*) oraz tłumienie translacji. Zaangażowane są również w proces nowotworzenia. Z kolei ekspresja pewnych lncRNA jest charakterystyczna, m.in. dla efektów epigenetycznych czy alternatywnego składania. Pełnią one rolę prekursorów małych RNA, a także regulatorów w procesie rozkładu cząsteczek mRNA. Należy podkreślić ich znaczenie w modyfikacji chromatyny, transkrypcji, procesach potranskrypcyjnych oraz rozwoju nowotworów. Prowadzone badania dostarczają informacji odnośnie do możliwości wykorzystania ncRNA w terapii, jako potencjalnych biomarkerów w diagnostyce chorób o podłożu nowotworowym [35, 36,37].

Długie niekodujące cząsteczki RNA

Liczne lncRNA ulegają ekspresji w różnych typach nowotworów, m.in. HOTAIR (*HOX antisense intergenic RNA*) w raku piersi, wątroby, trzustki, PCGEM1 (*Prostate Specific Gene 1*), DD3 (*Differential Display Code 3*), PCNCR1 (*Prostate Cancer Non-Coding RNA 1*) w raku prostaty [35,37]. Fenotypowo-specyficzna ekspresja lncRNA oraz ich stopień zaangażowania w proces nowotworzenia sprawiają, że cząsteczki te są idealnymi kandydatami na biomarkery w diagnostyce i terapii nowotworów. Potwierdzono m.in. ważną rolę lncRNA w metastazie raka jajnika. Do mechanizmów epigenetycznych zaangażowanych w deregulację ekspresji lncRNA w komórkach nowotworowych można zaliczyć metylację DNA oraz modyfikacje białek histonowych. Metylacja DNA powoduje zmniejszenie lub całkowite wyciszenie ekspresji supresorowych lncRNA guza, a w konsekwencji może prowadzić do pozytywnej regulacji onkogenów. Za-



stosowanie inhibitorów metylacji DNA – 5-aza-2'-deoksytydyny, pozwala na włączenie ekspresji hipermetylowanych lncRNA, która z kolei może zostać wzmocniona w wyniku działania kwasu 4-fenylomasłowego lub trichostatyny, należących do inhibitorów deacetylazy histonów – HDAC [37].

Małe niekodujące cząsteczki RNA

Małe niekodujące RNA (small *ncRNA*) można podzielić, opierając się na ich szlakach biogenezy z udziałem rybonukleazy III RNA, tzw. Dicer. Do grupy zależnej od Dicer zaliczamy microRNA, siRNA, snoRNA, a do niezależnych od Dicer, m.in. piRNA. Małe ncRNA pełnią ważną rolę w rozwoju nowotworów [36].

microRNA

Wśród licznych małych niekodujących RNA zaangażowanych w procesy molekularne należy podkreślić istotne znaczenie i rolę, jaką odgrywa w zjawiskach związanych z progresją nowotworową *microRNA* (*miRNA*). *miRNA* to wysoko konserwatywne cząsteczki RNA o długości 18–25 nukleotydów, które odpowiadają za regulację ekspresji genów zaangażowanych w procesy embriogenezy, różnicowania i wzrostu komórek, proliferacji, apoptozy, metabolizm komórkowy, wewnątrzkomórkowe ścieżki sygnałowe czy też funkcjonowanie komórek macierzystych [38, 39,40]. Z kolei sama ekspresja *microRNA* może podlegać regulacji zarówno genetycznej, jak i epigenetycznej. Poziom specyficznych mRNA, charakterystyczny dla pewnych typów nowotworów, m.in. raka piersi, płuc, prostaty, trzustki, wątroby, jelita grubego, przewlekłej białaczki szpikowej, jest często związany z inwazyjnością guza czy też jego metastazą. Pierwszą odkrytą cząsteczką *miRNA* o wyraźnie zdefiniowanej roli w procesach metastazy komórek nowotworowych jest *miR-10b*. Badania wskazują, że nadekspresja tego typu cząsteczki w komórkach nieinwazyjnego raka piersi przyczynia się do procesu inwazji i wystąpienia odległych przerzutów. Ponadto wysoki stopień zezłóśliwienia w przypadku nowotworów wątroby, trzustki i mózgu związany jest z nieprawidłową podwyższoną ekspresją *miR-10b*. Z kolei dwie inne cząsteczki, *miR-373* oraz *miR-503c*, poprzez oddziaływanie na gen *CD44*, pobudzają migrację i inwazyjność komórek raka piersi MCF7, co zaobserwowane zostało w badaniach *in vitro* i *in vivo*. Do cząsteczek, które hamują procesy migracji i inwazji komórek nowotworowych, zaliczono, m.in. *miR-149* (rak piersi), *miR-138* (rak jajnika, nerek), *miR-126* (rak płuc, żołądka) oraz *miR-206* (czerniak, rak szyjki macicy) [41,39]. Ponadto dane naukowe pokazują, że zwiększenie liczby *miRNA* powiązane jest z występowaniem w komórkach nowotworowych nieprawidłowości na tle epigenetycznym. W epigenetyczną regulację cząsteczek *miRNA* zaangażowane są procesy metylacji

DNA, które odpowiadają za tak zwane wyciszenie aktywności genów kodujących *miRNA*, oraz swoiste modyfikacje na poziomie białek histonowych. Podkreśla się, iż metylacja histonów może pociągać za sobą zarówno aktywację, jak i supresję aktywności cząsteczek *miRNA*. W szczególności zmiany epigenetyczne związane z modyfikacją dostępności dla cząsteczek *miRNA* regionów regulatorowych genów supresorowych i onkogenów wydają się istotne z punktu widzenia rozwoju i przebiegu wielu chorób nowotworowych [41,42, 43,44].

Zaburzenia w mechanizmie działania *miRNA* mogą być obserwowane w różnych nowotworach. Wiedza o deregulacji ekspresji *miRNA* w środowisku komórek nowotworowych pozwala twierdzić, że cząsteczki *miRNA* mogą stanowić potencjalny cel terapii w walce z rakiem. Biorąc pod uwagę dane literaturowe na temat charakterystycznych cech tych cząsteczek, do których zaliczyć można przede wszystkim specyficzność tkankową ekspresji tego typu RNA, stabilność, łatwość wykrywania i modyfikacji, można je wykorzystywać jako markery do określenia pochodzenia danego typu nowotworu, m.in. raka płuc, trzustki, piersi czy jajnika, dzięki czemu istnieje szansa na stworzenie nowych i bardziej sprecyzowanych leków. Jest to niezwykle pożądane zjawisko, gdyż doniesienia naukowe pokazują, że zaburzenia w ekspresji pewnych mRNA związane są z gorszym rokowaniem w nowotworach [41,42,43].

Do najlepiej poznanych, ludzkich *miRNA* należy składająca się z 12 członków rodzina *let-7*, której aktywność polega na działaniu supresorowym w tkankach nowotworowych, m.in. w raku płuca. Ponadto wykazuje działanie antagonistyczne, m.in. wobec onkogenów MYC oraz Ras. Udowodniono, że obniżenie ekspresji *let-7* związane jest z rozwojem raka piersi, jajnika oraz jelita grubego. Z kolei jako *miRNA* wykazujące działanie onkogenne zostały zidentyfikowane homologiczne *miRNA*: *miR-17-3p*, *miR-17-5p*, *miR-18a*, *miR-20a*, *miR-19a*, *miR-19b-1* oraz *miR-92a-1* [43,39]. Znana jest także grupa cząsteczek określana jako *epi-miRNA*, która z kolei zgodnie z doniesieniami stanowi cel efektorów enzymatycznych zaangażowanych w modyfikacje epigenetyczne. Spośród *miRNA*, które związane są z regulacją epigenetyczną, *miR-9*, *miR-32*, *miR-124*, *miR-127*, *miR-137*, *miR-148*, *miR-512* mogą ulegać wyciszeniu w wyniku hipermetylacji wysp CpG w pewnych typach nowotworów [42].

Liczne dowody uzyskane w wyniku prowadzonych badań pokazują możliwy związek *miRNA* z metylacją DNA czy też modyfikacją białek histonowych w różnych typach nowotworów u człowieka. Istnieją doniesienia obrazujące wpływ inhibitorów metylacji DNA, 5-azacytydyny, 5-aza-2'-deoksytydyny, a także deacetylazy histonów, kwasu 4-fenylomasłowego, na mechanizm działania *miRNA*. Wykorzystanie tych



związków sprowadza się do przywrócenia ekspresji supresorowych miRNA lub wyciszenia w komórkach nowotworowych nadekspresji onkogennych miRNA [43,42].

piRNA

piRNA, charakteryzujące się wielkością cząsteczki od 20 do 25 nukleotydów, zgodnie z klasyfikacją należą do małych niekodujących RNA, tworzących kompleksy z białkami PIWI. piRNA ulegają ekspresji głównie w zwierzęcych komórkach płciowych. Białka PIWI należą do rodziny białek Argonaute i uczestniczą w tworzeniu kompleksu piRISC (*piRNA-induced silencing complexes*) zaangażowanego w tzw. wyciszenie informacji genetycznej. Cząsteczki piRNA występują w tzw. klastrach piRNA, które cechuje obecność znacznej ilości różnych rodzajów elementów transpozycyjnych, w związku z czym klastry piRNA pełnią rolę w regulacji ich aktywności [32,33]. Proces dojrzewania piRNA oraz tworzenia kompleksów piwi-piRISC odbywa się w cytoplazmie, skąd następnie są one transportowane do jądra komórkowego [33]. W porównaniu z siRNA czy miRNA proces przetwarzania piRNA zachodzi w sposób niezależny od rybonukleazy III Dicer, gdzie prekursorem cząsteczki piRNA jest jednoniciowy kwas rybonukleinowy [45]. Zakłada się, że kompleksy piwi-piRISC pośredniczą w modyfikacjach na poziomie chromatyny w odpowiednich *loci* elementów transpozycyjnych [33]. Ponadto metylotransferaza histonów (dSETDB1) odpowiedzialna za występowanie metylacji w obrębie histonu 3, w pozycji 9 lizyny (H3K9me3), odgrywa kluczową rolę w procesie transkrypcji klastrów piRNA

[32]. Najwięcej dowodów na to, że funkcjonowanie klastrów piRNA może być powiązane ze środowiskiem chromatyny, pochodzi z badań nad ich występowaniem w genomie *Drosophila*. Miejscom występowania klastrów piRNA są pericentromeryczne i subtelomeryczne regiony genomu. Należy podkreślić, że chromatyna i modyfikacje występujące w jej obrębie odgrywają istotną rolę w regulacji ekspresji klastrów piRNA [45].

PODSUMOWANIE

Analiza zmian epigenetycznych wydaje się wysoce pożądana w związku z coraz częściej obserwowanym ich udziałem w rozwoju wielu chorób, w tym nowotworów. Poznanie mechanizmów modyfikacji, obejmujących metylację DNA, reorganizację w strukturze chromatyny związane z funkcjonowaniem białek histonowych czy też zmiany w ekspresji niekodujących RNA, stwarza możliwość opracowania skuteczniejszych terapii przeciwnowotworowych. Dzięki nowoczesnym technologiom detekcji zmian epigenetycznych istnieje szansa na odkrycie nowych biomarkerów, które mogłyby znacząco przyczynić się do wykrywania nowotworów już na wczesnym etapie ich rozwoju. Zatem prowadzenie badań nad szeroko pojętymi zmianami epigenetycznymi jest wysoce pożądane, gdyż uzyskane wyniki mogą w przyszłości posłużyć do skonstruowania nowej, ale jednocześnie efektywnej strategii służącej leczeniu chorób o podłożu nowotworowym.

Praca finansowana ze środków Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach: KNW-2-005/N/3/N, KNW-2-015/N/4/K oraz KNW-1-043/N/6/B.

PIŚMIENNICTWO:

1. Jones P.A., Baylin S.B. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007; 128(4): 683–692.
2. Choi J.D., Lee J.S. Interplay between epigenetics and genetics in cancer. *Genomics Inform*. 2013; 11(4): 164–173.
3. Hatzimichael E., Crook T. Cancer epigenetics: new therapies and new challenges. *J. Drug Deliv*. 2013; 2013: 529312.
4. Yun J., Johnson J.L., Hanigan C.L., Locasale J.W. Interactions between epigenetics and metabolism in cancers. *Front. Oncol*. 2012; 2: 163.
5. Johnson C., Warmoes M.O., Shen X., Locasale J.W. Epigenetics and cancer metabolism. *Cancer Lett*. 2015; 356(2 PtA): 309–314.
6. Baxter E., Windloch K., Gammon F., Lee J.S. Epigenetic regulation in cancer progression. *Cell Biosci*. 2014; 4: 45.
7. Vinci M.C. Sensing the Environment: Epigenetic regulation of gene expression. *J. Physic. Chem. Biophysic*. 2011; S3: 001, doi: 10.4172/2161-0398.S3-001.
8. Schleithoff C., Voelter-Mahlknecht S., Dahmke I.N., Mahlkecht U. On the epigenetics of vascular regulation and disease. *Clin. Epigenetics* 2012; 4(1): 7.
9. Delpu Y., Cordelier P., Cho W.C., Torrisoni J. DNA methylation and cancer diagnosis. *Int. J. Mol. Sci*. 2013; 14(7): 15029–15058.
10. Adcock I.M., Ford P., Ito K., Barnes P.J. Epigenetics and airways disease. *Respir. Res*. 2006; 7: 21.
11. Parry L., Clarke A.R. The roles of the methyl-CpG binding proteins in cancer. *Genes Cancer* 2011; 2(6): 618–630.
12. Snieppen K., Dodd I.B. A simple histone code opens many paths to epigenetics. *PLoS Comput. Biol*. 2012; 8(8): e1002643.
13. Czaja W., Mao P., Smerdon M.J. The emerging roles of ATP-dependent chromatin remodeling enzymes in nucleotide excision repair. *Int. J. Mol. Sci*. 2012; 13(9): 11954–11973.
14. Adam S., Polo S.E. Chromatin dynamics turing nucleotide excision repair: histones on the move. *Int. J. Mol. Sci*. 2012; 13(9): 11895–11911.
15. Grant P.A. A tale of histone modifications. *Genome Biol*. 2001; 2(4): REVIEWS0003.
16. Flis S., Flis K., Sławiński J. Modyfikacje epigenetyczne a nowotwory. *Nowotwory Journal of Oncology* 2007; 57(4): 427–434.
17. Filippakopoulos P., Picaud S., Mangos M., Keates T., Lambert J.P., Barsyte-Lovejoy D., Felletar I., Volkmer R., Müller S., Pawson T., Gingras A.C., Arrowsmith C.H., Knapp S. Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell*. 2012; 149(1): 214–231.



18. Stepulak A., Stryjecka-Zimmer M., Kupisz K., Polberg K. Histone deacetylase inhibitors as a new generation of anti-cancer agents. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2005; 59: 68–74.
19. Bannister A.J., Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011; 21(3): 381–395.
20. de Ruijter A.J.M., van Gennip A.H., Caron H.N., Kemp S., van Kuilenburg A.B. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* 2003; 370(Pt 3): 737–749.
21. Gronbaek K., Hother C., Jones P.A. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 2007; 115(10): 1039–1059.
22. Vega A., Baptissart M., Caira F., Brugnion F., Lobaccaro J.M., Volle D.H. Epigenetic: a molecular link between testicular cancer and environmental exposures. *Front. Endocrin. (Lausanne)* 2012; 3: 150.
23. Pollock R.M., Richon V.M. Epigenetic approaches to cancer therapy. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 2009; (6)2: 71–79.
24. Whetstone J.R., Nottke A., Lan F., Huarte M., Smolikov S., Chen Z., Spooner E., Li E., Zhang G., Colaiacovo M., Shi Y. Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell* 2006; 125(3): 467–481.
25. Dawson M.A., Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell.* 2012; 150(1): 12–27.
26. Barkauskaite E., Jankevicius G., Ladurner A.G., Ahel I., Timinszky G. The recognition and removal of cellular poly(ADP-ribose) signals. *FEBS J.* 2013; 280(15): 3491–3507.
27. Perina D., Mikoc A., Ahel J., Četković H., Žaja R., Ahel I. Distribution of protein poly(ADP-ribosyl)ation systems across all domains of life. *DNA Repair (Amst).* 2014; 23: 4–16.
28. Hassa P.O., Haenni S.S., Elser M., Hottiger M.O. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006; 70(3): 789–829.
29. Gao C., Xiao G., Hu J. Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by posttranslational modifications. *Cell Biosci.* 2014; 4(1):13.
30. Gill G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev.* 2004; 18(17): 2046–2059.
31. Banno K., Kisu I., Yanokura M., Masuda K., Kobayashi Y., Ueki A., Tsuji K., Yamagami W., Nomura H., Susumu N., Aoki D. Endometrial cancer and hypermethylation: regulation of DNA and microRNA by epigenetics. *Biochem. Res. Int.* 2012; 2012: 738274.
32. Stuwe E., Toth K.F., Aravin A.A. Small but sturdy: small RNAs in cellular memory and epigenetics. *Genes Dev.* 2014; 28(5): 423–431.
33. Yamanaka S., Siomi M.C., Siomi H. piRNA clusters and open chromatin structure. *Mob. DNA* 2014; 5: 22.
34. Pan X., Thompson R., Meng X., Wu D., Xu L. Tumor-targeted RNA-interference: functional non-viral nanovectors. *Am. J. Cancer Res.* 2011; 1(1): 25–42.
35. Gibb E.A., Brown C.J., Lam W.L. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol. Cancer.* 2011; 10: 38.
36. Sana J., Faltejskova P., Svoboda M., Slaby O. Novel classes of non-coding RNAs and cancer. *J. Transl. Med.* 2012; 10: 103.
37. Cao J. The functional role of long non-coding RNAs and epigenetics. *Biol. Proced. Online* 2014; 16: 11.
38. Rothschild S.I. MicroRNA therapies in cancer. *Mol. Cell Ther.* 2014; 2: 7.
39. Taylor M.A., Schiemann W.P. Therapeutic opportunities for targeting microRNAs in cancer. *Mol. Cell. Ther.* 2014; 2(30): 1–13.
40. Chen B., Li H., Zeng X., Yang P., Liu X., Zhao X., Liang S. Roles of microRNA on cancer cell metabolism. *J. Transl. Med.* 2012; 10: 228.
41. Chan S.H., Wang L.H. Regulation of cancer metastasis by microRNAs. *J. Biomed. Sci.* 2015; 22: 9.
42. Liu X., Chen X., Yu X., Tao Y., Bode A.M., Dong Z., Cao Y. Regulation of microRNAs by epigenetics and their interplay involved in cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2013; 32: 96.
43. Chen P.S., Su J.L., Hung M.C. Dysregulation of microRNAs in cancer. *J. Biomed. Sci.* 2012; 19: 90.
44. Das J., Podder S., Ghosh T.C. Insights into the miRNA regulations in human disease genes. *BMC Genomics.* 2014; 15: 1010.
45. Le Thomas A., Toth K.F., Aravin A.A. To be or not to be a piRNA: genomic origin and processing of piRNAs. *Genome Biol.* 2014; 15(1): 204.