

Received: 2014.01.28  
Accepted: 2015.04.27  
Published: 2015.08.19

## Wpływ modyfikacji struktury chromatyny na rozwój przewlekłych powikłań cukrzycowych

### The impact of chromatin modification on the development of chronic complications in patients with diabetes

Małgorzata Wegner<sup>1</sup>, Maria Pioruńska-Stolzmann<sup>2</sup>, Paweł P. Jagodziński<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Metabolizmu Lipidów, Katedra Chemii i Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

<sup>2</sup>Zakład Biochemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej, Katedra Chemii i Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

<sup>3</sup>Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

#### Streszczenie

Cukrzyca jest chorobą metaboliczną dotyczącą prawie 347 milionów ludzi na świecie. Do najgroźniejszych następstw należą jej przewlekłe powikłania: retinopatia, nefropatia oraz neuropatia. Wyniki najnowszych badań wskazują na istotny udział epigenetycznej regulacji genów w rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych. Pod wpływem hiperglikemii zaburzeniu ulega aktywność enzymów biorących udział w potranslacyjnej modyfikacji histonów (post-translational histone modifications, PTHMs) oraz metylacji DNA. Prowadzi to do modyfikacji struktury chromatyny, zmienia się ekspresja wielu genów zaangażowanych m.in. w inicjowanie przewlekłego procesu zapalnego, takich jak *NF-KAPPAB* (gen transkrypcyjnego czynnika jądrowego kappa B), *TNF $\alpha$*  (gen czynnika martwicy nowotworu), *IL6* (gen interleukiny 6) czy *MCP1* (gen białka chemotaktycznego dla monocytów). Nasila to uszkodzenie komórek śródbłonna, najważniejszego wykładnika przewlekłych powikłań cukrzycowych. Ponadto epigenetyczne modyfikacje struktury chromatyny pozwalają wyjaśnić zjawisko "pamięci metabolicznej", czyli obecności patologicznych ścieżek metabolicznych wynikających z wcześniejszych epizodów hiperglikemii, mimo późniejszego, ścisłego wyrównania metabolicznego cukrzycy.

Słowa kluczowe:

epigenetyka • pamięć metaboliczna • późne powikłania cukrzycowe

#### Summary

Diabetes is a chronic, metabolic disease. Over 347 million people worldwide have diabetes. Chronic complications (retinopathy, nephropathy or neuropathy) are the major dangerous outcome of this disease. Recent studies indicate a significant role of epigenetic regulation in the development of chronic complications in patients with diabetes. Hyperglycemia could cause abnormal regulation of the activity of enzymes participating in the post-translational histone modifications (PTHMs) and initiation of changes in patterns of DNA methylation. It leads to modification of chromatin structure. These epigenetic abnormalities result in changes in the expression of genes involved in development of chronic inflammation, such as *NF-KAPPAB* (nuclear factor kappaB gene), *TNF $\alpha$*  (tumor necrosis factor  $\alpha$  gene), *IL6* (interleukin 6 gene) or *MCP1* (monocyte chemoattractant protein 1 gene). It enhances endothelial cell dysfunction, which plays an important role in development of chronic, diabetic complications. In addition, caused by hyperglycemia epigenetic modifications changes in structure of chromatin explains "metabolic memory", a phenomenon of presence of pathological pathways related to the prolonged hyperglycemia in the past, despite maintaining good metabolic control later on.

Keywords:

epigenetic • metabolic memory • chronic complications associated with diabetes



**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1165198>

**Word count:** 1157  
**Tables:** –  
**Figures:** 1  
**References:** 29

**Adres autorki:** dr n. med. Małgorzata Wegner, Pracownia Metabolizmu Lipidów, Katedra Chemii i Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań; e-mail: malgoweg@ump.edu.pl

**Wykaz skrótów:** **DHATs** – deacetylazy histonów (histone deacetylases); **DM2** – cukrzyca typu 2 (type 2 diabetes); **HATs** – acetylazy histonów (histone acetylases); **HMTs** – metylotransferazy histonów (histone methyltransferase); **IL6** – gen interleukiny 6 (interleukin 6 gene); **K** – lizyna; **M1** – cukrzyca typu 1 (type 1 diabetes); **MCP1** – gen białka chemotaktycznego dla monocytów (monocyte chemoattractant protein 1 gene); **NF-KAPPAB** – gen transkrypcyjnego czynnika jądrowego kappa B (nuclear factor kappa B); **POLG1** – polimeraza gamma 1 (polymerase gamma 1); **PTHMs** – postranslacyjna modyfikacja histonów (post-translational histone modifications); **S** – seryna; **T** – treonina; **TNFα** – gen czynnika martwicy nowotworu alpha (tumor necrosis factor alpha)

## WSTĘP

Cukrzyca jest chorobą metaboliczną spowodowaną niewłaściwym działaniem insuliny (cukrzyca typu 2, DM2) lub całkowitym brakiem tego hormonu (cukrzyca typu 1, DM1) [20,22]. Obecnie chorobę rozpoznano prawie u 347 milionów ludzi na świecie [5]. Najgroźniejszymi następstwami są jej przewlekłe powikłania, takie jak: retinopatia, nefropatia czy neuropatia, które mogą spowodować utratę wzroku, rozwój schyłkowej niewydolności nerek czy amputację stóp [11]. Istotne jest zatem prowadzenie badań mających na celu zapobieganie oraz intensyfikację leczenia tych powikłań. Najnowsze wyniki badań wskazują na istotny udział epigenetycznej regulacji genów w rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych [21,23]. Coraz szersze grono naukowców zajmuje się tym zagadnieniem, aby jak najdokładniej wyjaśnić i zrozumieć epigenetyczne mechanizmy prowadzące do przewlekłych wielonarządowych zmian patologicznych wynikających ze szkodliwego oddziaływania hiperglikemii. Wydaje się, że w przyszłości wyniki tych badań mogą zaowocować wprowadzeniem skutecznych terapii mających na celu zahamowanie, a nawet zapobieganie rozwojowi przewlekłych powikłań u osób chorych na cukrzycę [28,29].

## MODYFIKACJE STRUKTURY CHROMATYNY

### Epigenetyka

Termin “epigenetyka” pierwszy raz został użyty przez C. H. Waddingtona w 1938 r., w celu wskazania gałęzi badań biologicznych zajmujących się zrozumieniem pojawiania się określonych fenotypów w wyniku oddziaływań między genami i produktami ich ekspresji [24].

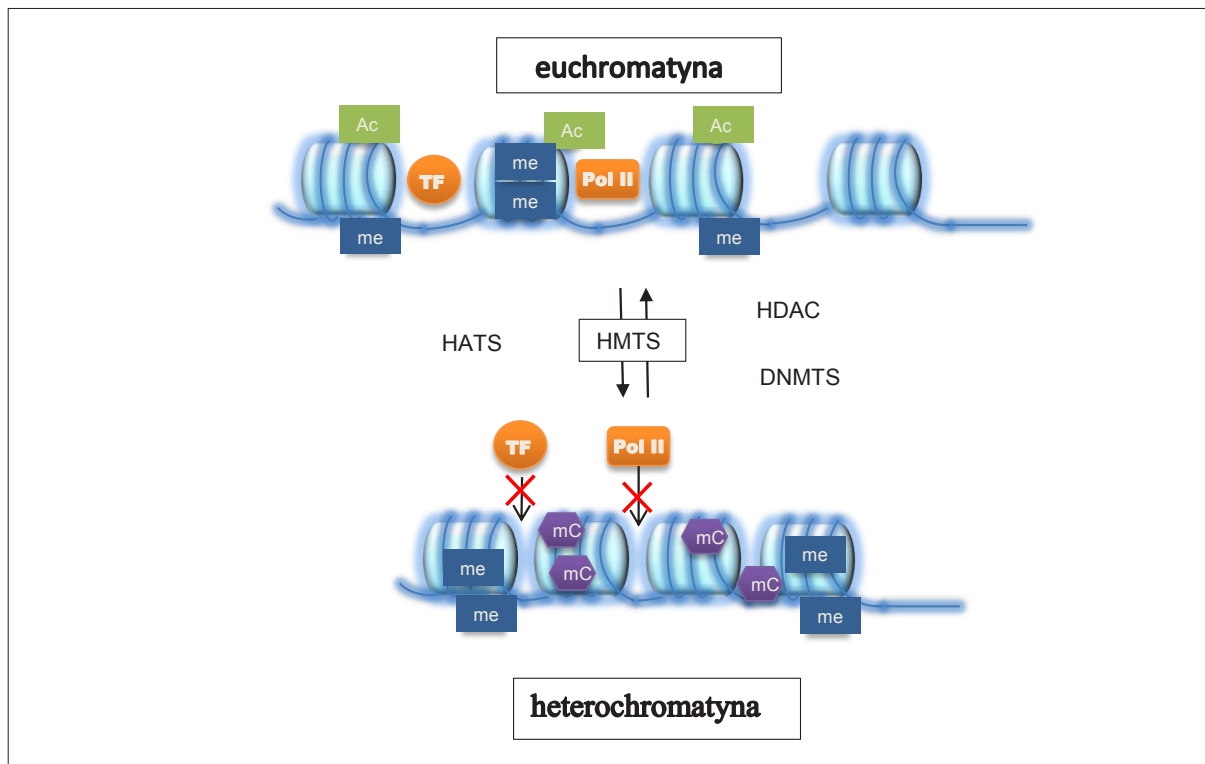
Obecnie termin ten dotyczy głównie badań nad zmianami w ekspresji genów, które podlegają dziedziczeniu i nie są związane ze zmianą sekwencji DNA [9]. Ponadto, epigenetyka zajmuje się oddziaływaniem czynników środowiskowych na ekspresję genów, czego skutkiem są różnice fenotypowe [11]. Jednym z mechanizmów epigenetycznych jest modyfikacja struktury chromatyny, która wynika z postranslacyjnej modyfikacji histonów (post-translational histone modifications, PTHMs) oraz metylacji nici DNA [4,26].

Chromatyna to struktura występująca w jądrze komórkowym, jest zbudowana z DNA, histonów oraz białek niehistonowych [18]. Wyróżnia się dwa rodzaje chromatyny: aktywną genetycznie euchromatynę, która wykazuje stosunkowo luźną strukturę oraz silnie upakowaną, nieaktywną transkrypcyjnie heterochromatynę. Na upakowanie chromatyny wpływają oddziaływania między nicią DNA a histonami, które wynikają z PTHMs oraz metylacji DNA, zależnych od specyficznych enzymów (ryc. 1) [10].

PTHMs oraz metylowane regiony DNA w zależności od panujących warunków ulegają odwracalnym lub nieodwracalnym zmianom. Dlatego dynamiczne zmiany struktury chromatyny pod wpływem bodźców środowiskowych są najważniejszym elementem kontroli ekspresji genów [4].

### Postranslacyjna modyfikacja histonów (PTHMs)

Histony ulegają licznym modyfikacjom: acetylacji lizyny (K), metylacji K, fosforylacji seryny (S) i treoniny (T) czy ubikwitynacji K [14,19]. Zmienia to siły oddziaływania między tymi białkami a nicią DNA, a to zmienia stopień upakowania chromatyny i przyspiesza lub hamuje



**Ryc. 1.** Struktura euchromatyny oraz heterochromatyny. Struktura euchromatyny jest związana z nasiloną acetylacją histonów oraz zmniejszoną metylacją cytozyny na nici DNA. Natomiast struktura heterochromatyny wynika ze zwiększonej metylacji cytozyny oraz braku acetylacji histonów. Metylacja histonów może nasilać kondensację chromatyну lub rozluźniać jej strukturę. Metylacja reszt lizynowych -4 i -36 na histonie 3 związana jest z tworzeniem aktywnej transkrypcyjnie euchromatyny, natomiast metylacja reszt lizynowych -9 i -27 tego samego histonu prowadzi do powstania heterochromatyny. Przekształcenie euchromatyny w heterochromatynę i odwrotnie jest regulowane przez acetylazy (HATS, histone acetylases), metylotransferazy (HMTs, methyltransferases) oraz DNA metylotransferazy (DNMTs, DNA methyltransferase). Luźna struktura euchromatyny umożliwia przyłączanie się czynników transkrypcyjnych (TFs, transcription factors) oraz polimerazy RNA II (POLII, polymerase RNA II) niezbędnych dla przeprowadzenia procesu transkrypcji [3,16].

proces transkrypcji [4]. Proces acetylacji jest najczęściej związany z aktywacją transkrypcji, natomiast deacetylacja z jej wyciszeniem. Procesy te są regulowane przez acetylazy (histone acetylases, HATs) oraz deacetylazy (histone deacetylases, DHATs) [18]. Proces metylacji może natomiast prowadzić zarówno do aktywacji, jak i wyciszenia transkrypcji [19]. Za markery euchromatyny są uważane H3K4me1, H3K4me2 oraz H3K4me3, natomiast obecność me1, me2 czy me3 w H3K9, H3K27 świadczy o obecności heterochromatyny [16]. Proces metylacji histonów regulują metylotransferazy (histone methyltransferases, HMTs) [1].

### Metylacja DNA

Metylacja DNA jest to proces kowalencyjnego przyłączenia grup metylowych (-CH<sub>3</sub>) do zasad azotowych nukleotydów, najczęściej cytozyny. Proces jest katalizowany przez DNA-metylotransferazy (methyltransferase, DNMT) [10]. Donorem grup metylowych jest S-adenozyl-L-metionina (AdoMet), która w wyniku tej reakcji przekształca się w S-adenozyl-L-homocysteinę (AdoHcy) [25]. Wzór metylacji DNA jest cechą charakterystyczną danego gatunku, tkanki, a nawet typu komórki

i ulega dużym zmianom w czasie rozwoju embrionalnego [14]. Metylacja DNA jest typowa dla rejonów bogatych w powtórzenia cytozyna-guanina. Regiony te są nazywane „wyspami dinukleotydów cytozyna-guanina, CpG”. Stopień nasilenia metylacji jest związany z wyciszeniem lub wzmocnieniem transkrypcji. Niski poziom metylacji nasila ekspresję genów, natomiast silna metylacja rejonów CpG wycisza proces [8]. Metylacja wysp CpG regionów promotorowych jest ważnym czynnikiem regulacji ekspresji genów istotnych dla rozwoju osobniczego (dojrzwania/remodelingu tkanek) dojrzwania płodu, ale również starzenia się organizmu [3].

### UDZIAŁ EPIGENETYCZNEJ MODYFIKACJI STRUKTURY CHROMATYNY W ROZWOJU PRZEWLEKŁYCH POWIKŁAŃ CUKRZYCOWYCH PTHMs A ROZWÓJ PRZEWLEKŁYCH POWIKŁAŃ CUKRZYCOWYCH

Najnowsze wyniki badań wskazują, że hiperglikemia (zarówno ostra, jak i przewlekła) zaburza pracę enzymów regulujących PTHMs, co zmienia ekspresję wielu genów [23]. W badaniu przeprowadzonym na linii komórek monocytarnych zaobserwowano, że hiperglikemia zwiększa aktywność HATs, a to koreluje ze zwiększoną acetylacją histonów w rejonie promotorowym podjednostki



p65 jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-kappa B (nuclear factor kappa B, Nf-κB), pełniącego istotną rolę w procesach zapalnych [12]. W innym badaniu zaobserwowano, że hiperglikemia aktywuje swoistą HMT – SET7 (histone-lysine N-methyltransferase), która metylując H3Lys4, wywołuje stałe zmiany ekspresji genów biorących udział w inicjowaniu procesu zapalnego w komórkach śródbłonna i monocytach. Wykazano, że delecja tego enzymu hamuje ekspresję NF-κB oraz zależnych od tego czynnika transkrypcyjnego prozapalnych cytokin, np. czynnika martwicy nowotworu alpha (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) czy interleukiny 1 beta (IL-1 $\beta$ ) [2].

Prowadzone na coraz szerszą skalę badania eksperymentalne, mające wyjaśnić udział czynników epigenetycznych w rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych, wskazują, że modyfikacje chromatyny wywołane hiperglikemią mogą być nieodwracalne, co może tłumaczyć istnienie tzw. „pamięci metabolicznej”, czyli przetrwałej po stosunkowo krótkim okresie hiperglikemii zmian ekspresji genów/białek decydujących o powstaniu odległych objawów powikłań naczyniowych [6]. Wykazano, że inkubacja ludzkich kardiomiocytów w warunkach hiperglikemii obniża ilość swoistej HMT – Suv39h1, regulującej metylację H3K9, co w konsekwencji zwiększa ekspresję IL-6. Wynik nie zmienił się po traktowaniu kardiomiocytów medium z prawidłowym stężeniem glukozy po zakończeniu części eksperymentalnej z zastosowaniem dużych stężeń glukozy [28]. W innym badaniu przeprowadzonym na komórkach siatkówki szczurów z cukrzycą wykazano, że hiperglikemia zmniejsza stężenie H3K4me1 na regionie enhancerowym genu *sod2* oraz zwiększa aktywność demetylazy LSD1 na promotorze genu *sod2*. Wynik pozostał niezmienny nawet po traktowaniu tych komórek medium z prawidłowym stężeniem glukozy [29].

### Wpływ metylacji DNA na przewlekłe powikłania cukrzycowe

Wyniki badań epigenetycznych dotyczących wpływu hiperglikemii na metylację DNA wskazują, że wysokie stężenie glukozy prowadzi do istotnych zmian regionów DNA ulegających metylacji, co może być zwią-

zane z rozwojem przewlekłych powikłań cukrzycowych [17,21]. W badaniach przeprowadzonych na szczurach z cukrzycą wywołaną streptozotocyną wykazano związek między zmniejszoną replikacją genów mitochondrialnych a hipermetylacją regionów CpG w miejscu regulatorowym genu polimerazy gamma 1 (polymerase gamma 1, Polg1). Wyniki tego badania ponadto wykazują, że zmiany epigenetyczne wywołane przez hiperglikemie są nieodwracalne i powodują powstanie zjawiska „pamięci metabolicznej” [21]. Innym badaniem potwierdzającym związek między zmianami nasilenia metylacji całego genomu a hiperglikemią są badania przeprowadzone na otyłych szczurach z DM2 [27]. Związek między stopniem metylacji genomu oraz występowaniem późnych powikłań cukrzycowych wykazano również u ludzi. W jednym z klinicznych eksperymentów znaleziono różnice między metylacją genów związanych ze ścieżkami MAPK, Wnt oraz insuliny w próbkach mięśni pobranych od osób z pozytywnym oraz negatywnym wywiadem DM2 w rodzinie [17]. W innym eksperymencie przeprowadzonym na leukocytach pobranych od pacjentów z cukrzycą typu 1 znaleziono korelację między występowaniem hipermetylacji genu *UNC13B* oraz rozwojem nefropatii cukrzycowej [2]. Innych, ciekawych wniosków dostarczyło badanie poziomu metylacji całego genomu u pacjentów z cukrzycą typu 2 z rozwinętą retinopatią cukrzycową. Znaleziona istotna korelacja między nasileniem metylacji całego genomu oraz klinicznym stopniem retinopatii wykazała istotny wpływ modyfikacji epigenetycznych na rozwój przewlekłych powikłań cukrzycowych [21].

### PODSUMOWANIE

Znaczny postęp w badaniach nad wywołanymi hiperglikemią zmianami epigenetycznymi materiału jądrowego komórek istotnie przyczynia się do zrozumienia molekularnych mechanizmów prowadzących do rozwoju przewlekłych powikłań u pacjentów z cukrzycą. Ponadto pozwala na dokładniejsze wyjaśnienie molekularnych podstaw tzw. „pamięci metabolicznej” [7,15]. Jednak pełne zrozumienie wpływu modyfikacji epigenetycznych na rozwój przewlekłych powikłań cukrzycowych wymaga jeszcze wiele badań i zaangażowania grona naukowców zajmujących się tym zagadnieniem.

### PISMIENICTWO

[1] Barski A., Cuddapah S., Cui K., Roh T.Y., Schones D.E., Wang Z., Wei G., Chepelev I., Zhao K.: High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 2007; 129: 823-837

[2] Brasacchio D., Okabe J., Tikellis C., Balcerzyk A., George P., Baker E.K., Calkin A.C., Brownlee M., Cooper M.E., El-Osta A.: Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that coexist at the lysine tail. *Diabetes*, 2009; 58: 1229-1236

[3] Bush K.M., Yuen B.T., Barrilleaux B.L., Riggs J.W., O'Geen H., Cotterman R.F., Knoepfler P.S.: Endogenous mammalian histone H3.3 exhibits chromatin-related functions during development. *Epigenetics Chromatin*, 2013; 6: 7

[4] Butler J.S., Koutelou E., Schibler A.C., Dent S.Y.: Histone-modifying enzymes: regulators of developmental decisions and drivers of human disease. *Epigenomics*, 2012; 4: 163-177

[5] Danaei G., Finucane M.M., Lu Y., Singh G.M., Cowan M.J., Paciorek C.J., Lin J.K., Farzadfar F., Khang Y.H., Stevens G.A., Rao M., Ali M.K., Riley L.M., Robinson C.A., Ezzati M., Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Blood Glucose): National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*, 2011; 378: 31-40

- [6] Dembińska-Kieć A.: Pamięć metaboliczna – epigenetyczne modyfikacje materiału jądrowego jako przyczyna powikłań cukrzycy. *Diagn. Labor.*, 2011; 47: 263-268
- [7] El-Osta A., Brasacchio D., Yao D., Poci A., Jones P.L., Roeder R.G., Cooper M.E., Brownlee M.: Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J. Exp. Med.*, 2008; 205: 2409-2417
- [8] Fan S., Zhang X.: CpG island methylation pattern in different human tissues and its correlation with gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009; 383: 421-425
- [9] Holliday R.: The inheritance of epigenetic defects. *Science*, 1987; 238: 163-170
- [10] Jin B., Robertson K.D.: DNA methyltransferases (DNMTs), DNA damage repair, and cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2013; 754: 3-29
- [11] Karnafel W.: Przewlekłe powikłania cukrzycy – patogenezę, implikacje kliniczne. *Przew. Lek.*, 2000; 9: 61-68
- [12] Kim H.J., Kim S.H., Yun J.M.: Fisetin inhibits hyperglycemia-induced proinflammatory cytokine production by epigenetic mechanisms. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2012; 2012: 639469
- [13] Li B., Carey M., Workman J.L.: The role of chromatin during transcription. *Cell*, 2007; 128: 707-719
- [14] Li E.: Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.*, 2002; 3: 662-673
- [15] Ling C., Groop L.: Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes*, 2009; 58: 2718-2725
- [16] Martin C., Zhang Y.: The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005; 6: 838-849
- [17] Nitert M.D., Dayeh T., Volkov P., Elgzyri T., Hall E., Nilsson E., Yang B.T., Lang S., Parikh H., Wessman Y., Weishaupt H., Attema J., Abels M., Wierup N., Almgren P. i wsp.: Impact of an exercise intervention on DNA methylation in skeletal muscle from first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 2012; 61: 3322-3332
- [18] Serrano L., Vazquez B.N., Tischfield J.: Chromatin structure, pluripotency and differentiation. *Exp. Biol. Med.*, 2013; 238: 259-270
- [19] Shahbazian M.D., Grunstein M.: Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.*, 2007; 76: 75-100
- [20] Taylor R.: Type 2 diabetes: etiology and reversibility. *Diabetes Care*, 2013; 36: 1047-1055
- [21] Tewari S., Zhong Q., Santos J.M., Kowluru R.A.: Mitochondria DNA replication and DNA methylation in the metabolic memory associated with continued progression of diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2012; 53: 4881-4888
- [22] van Belle T.L., Coppieters K.T., von Herrath M.G.: Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol. Rev.*, 2011; 91: 79-118
- [23] Villeneuve L.M., Reddy M.A., Natarajan R.: Epigenetics: deciphering its role in diabetes and its chronic complications. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2011; 38: 451-459
- [24] Waddington C.H.: *Der Epigenotypus*. *Endeavour*, 1942; 1: 18-20
- [25] Walsh C.P., Bestor T.H.: Cytosine methylation and mammalian development. *Genes Dev.*, 1999; 13: 26-34
- [26] Wang Z., Zang C., Rosenfeld J.A., Schones D.E., Barski A., Cudapah S., Cui K., Roh T.Y., Peng W., Zhang M.Q., Zhao K.: Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat. Genet.*, 2008; 40: 897-903
- [27] Williams K.T., Schalinske K.L.: Tissue-specific alterations of methyl group metabolism with DNA hypermethylation in the Zucker (type 2) diabetic fatty rat. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2012; 28: 123-131
- [28] Zhang L., Chen B., Tang L.: Metabolic memory: mechanisms and implications for diabetic retinopathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2012; 96: 286-293
- [29] Zhong Q., Kowluru R.A.: Epigenetic modification of *Sod2* in the development of diabetic retinopathy and in the metabolic memory: role of histone methylation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2013; 54: 244-250

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

