

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Odjel za biologiju  
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Ivan Drnasin

## **Epigenetička regulacija ekspresije gena**

Završni rad

Osijek, 2018.

**Temeljna dokumentacijska kartica**

**Završni rad**

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Odjel za biologiju**

**Preddiplomski sveučilišni studij Biologija**

**Znanstveno područje: Prirodne znanosti**

**Znanstveno polje: Biologija**

## **EPIGENETIČKA REGULACIJA EKSPRESIJE GENA**

Ivan Drnasin

**Rad je izrađen na:** Zavodu za biokemiju i ekofiziologiju biljaka, Odjel za biologiju

**Mentor:** Doc. Dr. Sc. Rosemary Vuković

**Kratak sažetak završnog rada:** Epigenetika je definirana kao nasljedne promjene u aktivnosti i ekspresiji gena koje se događaju bez promjena unutar DNA sekvence. Postoje razni epigenetički mehanizmi koji utječu na regulaciju ekspresije gena. U eukariota, DNA se nalazi unutar jezgre, pakirana s proteinima histonima u nukleosome, glavne jedinice kromatina. Repovi histona su podložni post-translacijskim modifikacijama kao što su metilacija, acetilacija i fosforilacija. Epigenetički procesi kao što su metilacija DNA, modifikacija histona i razni drugi procesi posredovani molekulama RNA, utječu na gensku ekspresiju prvenstveno na razini transkripcije, iako i translacija može također biti epigenetički regulirana. Novija istraživanja se bave povezivanjem utjecaja okoliša i prehrane na epigenetičke mehanizme. Epigenetičke promjene i adaptacije koje se javljaju kao odgovor na uvjete u ranim stadijima razvoja mogu utjecati na rizik obolijevanja i osjetljivost kasnije u životu. Zbog toga razumijevanje epigenetičkih promjena i mehanizama povezanih s odgovorom na okolinu mogu pružiti uvid u osnovne mehanizme početka bolesti kod odraslih.

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** Epigenetika, DNA, nekodirajuće RNA, metilacija, kromatin, histon, nukleosom

**Rad je pohranjen:** na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

**Basic documentation card**

**Bachelor thesis**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**

**Undergraduate university study programme in Biology**

**Scientific area:** Natural science

**Scientific field:** Biology

## **EPIGENETIC REGULATION OF GENE EXPRESSION**

Ivan Drnasin

**Thesis preformed at** the Subdepartment of Plant Ecophysiology and Biochemistry, Department of Biology

**Supervisor:** Rosemary Vuković, Asst. Prof.

**Sort abstract :** Epigenetics is defined as heritable changes in activity and expression of genes which are happening without the change of the DNA sequence. There are different types of epigenetic mechanisms which affect gene regulation. In eukaryotes , DNA is located within the nucleus,packed with histone proteins. Combined they make chromatine. Main unit of chromatine is nucleosome. Histone tails are subject to post transcriptional modifications such as methylation, acetylation, phosphorylation. Epigenic processes such as DNA methylation, histone modification, and other processes mediated by RNA molecules, can influence gene expression primarily at the transcription level, and also translation level. New researches are trying to understand the connection between the environment and food in regards to epigenetic mechanisms. Epigenetic changes and adaptations which occur during early stages of development may affect the risk of desease development and susceptibility in later stages of life. Because of that understanding epigenetic changes and mechanisms connected to environmental responses can provide insight in basic mechanisms for deseases in adults.

**Original in:** Croatian

**Key words:** Epigenetics, DNA, noncoing RNA, modification, metilation, chromatin, histone,nucleosome

**Thesis deposited:** on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University library in Zagreb

## SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
2. KROMATIN I NUKLEOSOMI.....	2
2.1. Modifikacije histona.....	3
2.2.1. Acetilacija histona .....	5
2.2.2. Metilacija histona .....	6
2.2.3. Fosforilacija.....	9
2.3. Uloga RNA kod epigenetičke regulacije ekspresije gena .....	10
2.3.1. Male molekule ncRNA.....	11
2.3.2. Duge molekule ncRNA .....	12
3. UTJECAJ OKOLINE I PREHRANE NA EPIGENETIČKE MEHANIZME .....	13
4. ZAKLJUČAK .....	16
5. LITERATURA.....	16

## 1.UVOD

Definicija epigenetike se mijenjala nekoliko puta u zadnjih desetljeća. Riječ epigenetika se izvorno koristila u opisivanju procesa koji su uključeni u razvoj zigote do zrelog organizma (Huang i sur. 2016). Danas je epigenetika definirana kao nasljedne promjene u aktivnosti i ekspresiji gena koje se događaju bez promjena unutar sekvence DNA (Aaron i sur. 2007). Sve stanice u organizmu u suštini sadrže istu DNA ali, vrste stanica i njihove funkcije razlikuju se zbog kvalitativnih i kvantitativnih razlika u ekspresiji gena. Prema tome kontrola ekspresije gena je ključna za diferencijaciju i razvoj. Smatra se da epigenetički procesi kao što su metilacija DNA, modifikacija histona i razni drugi procesi posredovani molekulama RNA, utječu na gensku ekspresiju prvenstveno na razini transkripcije, iako i translacija može također biti epigenetički regulirana (Gibney i Nolan 2010). Uzorak ekspresije gena koji karakterizira diferencirane stanice utvrđen za vrijeme razvoja, zadržava se i nakon mitoze stanice. Prema tome uz to što stanice nasljeđuju genetičku informaciju isto tako nasljeđuju i informaciju koja nije dio slijeda nukleotida DNA, a ta vrsta informacija nazvana je epigenetikom. Postoje i drugačije definicije koje su šire od navedene te koje obuhvaćaju ali i ne moraju obuhvaćati zahtjeve za nasljednost. Neovisno o definiciji, epigenetički procesi koji stabilno mijenjaju uzorak ekspresije gena (i/ili prenose te promijene i prilikom diobe stanica) obuhvaćaju: (1) metilaciju citozina; (2) post-translacijske modifikacije proteina histona i remodeliranje kromatina; i (3) mehanizme temeljene na RNA (Gibney i Nolan 2010).

Metilacija DNA je potencijalno najjednostavniji mehanizam za epigenetički prijenos informacija (Preface, Huang i sur. 2016). Još prije 40 godina istaknuto je kako se metilacija citozina na otocima CpG može „prekopirati“ za vrijeme replikacije uz pomoć enzima koji reorganizira hemiacetilirano područje i metilira CpG na novo-sintetizirani lancu. Model metilacije otoka CpG je zapravo služio kao poticaj za definiciju epigenetike koju imamo danas, zato što je predstavio prvi mogući put za prijenos informacija kroz replikaciju DNA, a da te informacije nisu dio DNA sekvence. Od tada je došlo i do otkrića uloge strukture kromatina i nekodirajućih molekula RNA (ncRNA) u regulaciji ekspresije gena, što je omogućilo nove uvide u mehanizme epigenetike. Svaki od tih mehanizama su detaljnije opisani u tekstu. Uz načine regulacije ekspresije gena uz pomoć epigenetičkih mehanizama, novija se istraživanja bave i odgovorima tih mehanizama na okolinu. Epigenetičke promjene i prilagodbe na uvjete u

ranim stadijima razvoja, naročito u maternici, mogu utjecati na rizik određenih bolesti i osjetljivost. Zbog toga razumijevanje epigenetičkih mehanizama i promjena povezanih s odgovorima na uvjete u okolišu mogu pružiti uvid u temeljne mehanizme početka bolesti kod odraslih (Preface, Huang i sur. 2016).

## **2. KROMATIN I NUKLEOSOMI**

U eukariotskim stanicama, DNA se nalazi unutar jezgre u visoko zbijenjoj strukturi. DNA je pakirana sa specijanim proteinima nazvanim histoni te skupa tvore komplekse histon/DNA koji se nazivaju kromatinima.

Glavna jedinica kromatina je nukleosom koji se sastoji od oko 146 parova baza DNA namotanih približno 1.65-1.7 puta oko jezgrenog histonskog oktamera sačinjenog od po dvije jedinice svakog histonskog proteina H2A, H2B, H3 i H4. Postoji i histon H1 koji se još naziva i linker histon, koji nije dio srži, ali služi za povezivanje drugih histona i DNA, te sudjeluje u pakiranju kromatina u vrlo organizirane strukture koje uključuju kromosome. Histoni srži su čvrsto pakirani u globularnim regijama, s amino-terminalnim repovima koji se produžuju izvan globularne regije što ih čini dostupnima za djelovanje histon-modificirajućih enzima. Ovisno o stupnju pakiranja odnosno kondenzacije, kromatin dijelimo na tri različita stanja: primarno, sekundarno i terciarno. Primarna struktura prvi je put opisana 1979. i 1980. godine (Blakey i Litt 2016). Sastoji se od ponavljajućih jedinica gole DNA i nukleosoma koji skupa tvore nizove nukleosoma unutar vlakna. Debljina vlakna iznosi 11 nm. Sekundarno stanje uključuje dodatni dodatak linker histona H1 ili H5, i pokazuje veći stupanj kondenzacije 11 nm širokog vlakna, te kroz nukleosomalne interakcije tvori kromatinsko vlakno promjera 30 nm. U terciarnom stupnju kondenzacije, kromatin je presavijen što je rezultiralo stvaranjem inter- i intrakromosomalnih interakcija između vlakana širine 30 nm i 11 nm (Blakey i Litt 2016). Kromatin je dinamična struktura, te mijenja stupanj svoje kondenziranosti i tridimenzionalne značajke kako bi se prilagodila svojim regulatornim funkcijama. Postoje dva okvirna stanja kromatina koja su opsežno proučavana a to su heterokromatin i eukromatin. Heterokromatin je visoko kondenzirani oblik kromatina te je obično transkripcijski neaktivan. Zbijenost je nejednako raspoređena po genomu te se uglavnom nalazi na opsežnim regijama oko telomera,

centromera i pustinjskih regija gena (Blakey i Litt2016). Kod sisavaca na primjer, i mnogih drugih viših eukariota, DNA koja okružuje svaku centromeru sastavljena je od relativno jednostavnih, ponavljajućih nukleotidnih sekvenci. Te sekvence se nazivaju satelitne DNA i sačinjavaju glavni dio heterokromatina kod ovih organizama (Alberts i sur. 2008). Eukromatin s druge strane predstavlja područje gdje je DNA dostupna za transkripciju, odnosno predstavlja otvorenu konformaciju zbog opuštenog stanja nukleosomalnog uređenja.

## **2.1. Modifikacije histona**

Histoni kod eukariota udruženi s DNA tvore nukleosom, koji se kao osnovna jedinica kromatina sastoji od dvije kopije histona H2A, H2B, H3 i H4 još nazvani i histonima srži (Slika 1). Peti histon, histon H1 nije dio nukleosoma već se veže za njega te unaprijeđuje organizaciju nukleosoma u strukturu višeg reda, u 30nm filament (Ramakrishnan 1997). Na početku se smatralo da je visoka kondenzacija genoma jedina uloga histononskih proteina. Međutim, kromatin u većini stanica je mnogo manje kondenziran nego što je naprijmer u jezgri sperme, što je dovelo do zaključka da histoni ne služe samo za kondenzaciju genoma, već da su histoni dio mašinerije koja sudjeluje u represiji gena tako što ograničava pristup transkripcijskih faktora (Ramakrishnan 1997).

Histoni su ostali visoko očuvani kod većine eukariota te gotovo nikakve promjene u aminokiselinskim ostacima nisu uočene između crva, miša i čovjeka (Blakey i Litt2016). Ovako veliki stupanj očuvanosti histona odražava njihovu važnost u regulaciji staničnih funkcija. Histoni srži su osnovni proteini sa globularnim domenama oko kojih je obavijena DNA sa relativno nestrukturiranim, fleksibilnim „repovima“ koji izvire iz nukleosoma. Upravo su repovi su podloženi raznim post-translacijskim modifikacijama, od kojih su najbolje karakterizirane male kovalentne modifikacije kao što su metilacija, acetilacija i fosforilacija (Gibney i Nolan 2010). Postoje i ostale modifikacije kao što su ubikvintinacija, sumoilacija, ADP-ribozilacija, deaminacija i nekovalentna prolin izomerizacija koja se događa na H3 histonu. Lizinski ostaci mogu prihvatiti, jedan, dva ili tri metilna ostatka, dok arginin može biti samo mono- i dimetiliran (Gibney i Nolan 2010). U određenim situacijama neki od histona srži

mogu biti zamijenjeni sa manje obilnom varijantom histona. Tako su poznate varijacije H2A i H3, ali ne i varijacije H2B i H4 (Heinkoff i Smith 2007).

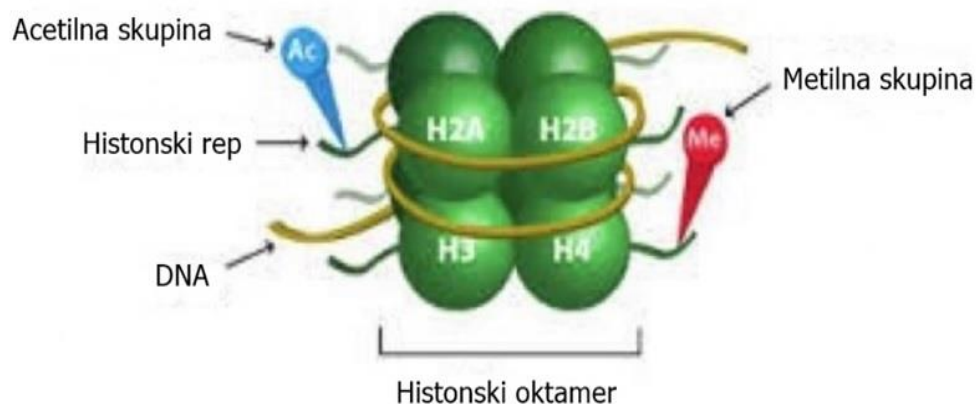
Većina histonskih post-translacijskih modifikacija su regulirani skupinama enzima koji kataliziraju dodavanje ili uklanjanje modifikacija. Na primjer, histonska acetiltransferaza (HAT) i histonska deacetil-transferaza (HDAC) vrše ili uklanjaju acetilaciju, dok histonske metiltransferaze dodaju metilne skupine na argininske (arginin-metiltransferaze, PRMTS) i lizinske (lizin-metiltransferaze, HKMTS) ostatke. Uz kovalentne modifikacije histona, struktura kromatina je također kontrolirana uz pomoću skupine enzima koji koriste energiju hidrolize ATP-a kako bi uzrokovali promijene u rasporedu nukleosoma ili sastavu (Gibney i Nolan 2010). Ovi kompleksi koji remodeliraju kromatin pripadaju dvjema porodicama, porodici SNFH2 ili ISWI i porodici Brahma ili SWI/SNF (Allis i sur. 2007). Kompleksi SNFH2/ISWI djeluju tako što mobiliziraju nukleosome duž DNA, dok kompleksi Brahma/SWI/SNF prolazno mijenjaju strukturu nukleosoma, izlagajući tako DNA-histon kontakte. Neki od remodelirajućih kompleksa promoviraju izmjenu kovalentnih histona srži sa drugim varijantama, služeći tako kao „izmjenjivač kompleksi“ (Gibney i Nolan 2010).

Smatra se da postoje tri opća principa post-translacijskih modifikacija (Gibney i Nolan 2010):

1. Post-translacijske modifikacije direktno utječu na strukturu kromatina, regulirajući njegove visoko uređene konformacije tako djelujući na regulaciju transkripcije (cis učinak)
1. Post-translacijske modifikacije ometaju vezanje proteina koji se udružuju sa kromatinom (trans učinak)
2. Post-translacijske modifikacije privlače određene efektorne proteine na kromatin (trans učinak)

U sažetku, status kovalentnih modifikacija proteina histona, skupa sa sastavom i uređenjem histona sadrži epigenetički sloj informacija koji podržava ili inhibira ekspresiju gena.





Slika 1. Kompleks molekule DNA i proteina histona (H2A, 2A, H2B, 2B, H3 i H4) (Web 1)

### 2.2.1. Acetilacija histona

Acetilacija je prva otkrivena histonska modifikacija. Acetilacija je proces koji uključuje prijenos acetilne skupine s acetila-CoA (koenzima A) na  $\epsilon$ -amino skupinu lizinskog ostatka histona. Nakon otkrića acetilacije, mnoga su istraživanja pokazala vezu između aktivno transkribiranih gena i hiperacetilacije, ukazujući tako na ulogu acetilacije u olakšavanju transkripcije gena (Blakey i Litt 2016). Uz transkripciji i drugi stanični procesi povezani su s acetilacijom lizinskih ostataka histona, kao što su replikacija i popravak DNA.

Kod acetilacije većina modificiranih lizinskih ostataka nalaze se na N-terminalnim krajevima nukleosomalnih histona (Blakey i Litt 2016). Histonski repovi ubrzano podliježu acetilaciji i deacetilaciji, gdje prosječni događaj acetilacije ima poluživot trajanja od samo nekoliko minuta. Ovakav brzi obrat modifikacija posredovan je enzimima HAT, koji dodaju acetilne skupine na repove histona, i enzimima HDAC koji ih uklanjaju (Blakey i Litt 2016). Enzimi HDAC i HAT su često dio velikih proteinskih kompleksa s višestrukim enzimskim aktivnostima. Svaki od tih proteinskih kompleksa ima kordiniranu funkciju da prepozna specifična područja kromatina te da izvrši potrebnu modifikacijsku, odnosno regulacijsku funkciju. Uklanjanje i dodavanje

acetilnih skupina vrlo je dinamičan proces. Kod područja koja podliježu brzim izmjenama dodavanja i uklanjanja, prisutnost acetilnih skupina nije jedini način reguliranja transkripcije, već i brzina izmijenjene modifikacija također utječe na regulaciju transkripcije. Ovo podržavaju podaci koji povezuju acetilaciju i deacetilaciju histona s procesima remodeliranja nukleosoma za vrijeme aktivne transkripcije (Blakey i Litt 2016).

Enzimi HAT mogu se podijeliti na dvije glavne skupine ovisno o njihovim katalitičkim domenama: skupina GNAT (od engl. *Gcn5 N-acetiltransferaze*), i skupina MYST (od engl. *Moz, Ybf2[Sas3], Sas2 i Tip60*). Postoji i treća skupina enzima HAT a to je skupina p300/CBP, čije su katalitičke domene manje konzervirane. Supstrati skupine GNAT su histoni H3, supstrati skupine MYST histoni H4, dok su histoni H3 i H4 supstrati kompleksa p300/CBP (Blakey i Litt2016). Enzimi HDAC se dijele na tri različite skupine ovisno o njihovim katalitičkim aktivnostima: Tip 1, Tip 2 i Tip 3. Tip 1 i Tip 2 imaju slične mehanizme deacetilacije koji ne zahtijevaju kofaktore, dok Tip 3 (skupina Sir2/sirtuin) zahtjeva kofaktor  $\text{NAD}^+$  za svoju funkciju. Supstrati deacetilaza Tipa 1 su histoni H3 i H2B, supstrati deacetilaza Tipa 2 su histoni H3 i H4, dok su supstrati Tipa 3 histoni H4K16ac i H3K56 (Blakey i Litt2016). Nekoliko studija navodi kako regulacija transkripcije ne ovisi samo o obujmu acetilacije histona, već ovisi i o acetilaciji specifičnih histonskih ostataka. Zbog toga razumijevanje stanja modifikacija histona, i isto tako uloge enzima HAT i HDAC, ključno je za razumijevanje uloge histonskih modifikacija kromatina u regulaciji staničnih funkcija.

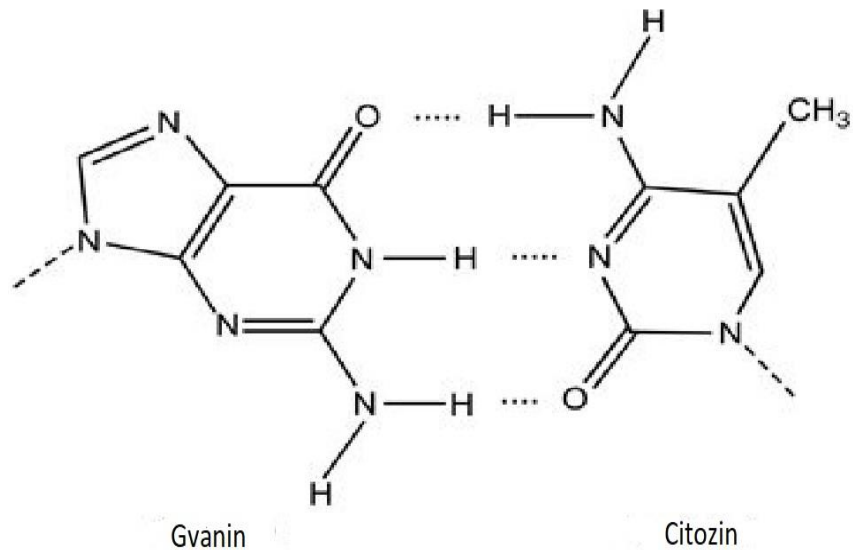
### **2.2.2. Metilacija histona**

Metilacija histona se uglavnom događa na bočnim lancima argininskih i lizinskih ostataka. Za razliku od acetilacije i fosforilacije, metilacija histona ne mijenja naboj histona. Uz to, kod ove modifikacije postoji dodatna razina složenosti kada se uzmu u obzir da lizin može biti mono-, di- i trimetiliran, dok arginin može biti mono-, simetrično ili asimetrično dimetiliran (Bannister i Kouzarides 2011). Iako ove modifikacije ne mijenjaju naboj histona, mijenjaju hidrofobni karakter i cijelokupnu veličinu modificiranih ostataka (Blakey i Litt 2016).

Različita stanja metilacije prepoznaju različiti efektorni proteini, te su povezani sa izrazitim regulatornim funkcijama. Na primjer, analiza metilacije histona H3K36 na razini genoma, pokazala je kako se mono- i dimetilirani H3K36 nalaze blizu 5'-kraja gena, te da se di- i trimetilirani H3K36 primarno nalaze na 3'-kraju gena.

Kod metilacije argininskih ostataka, asimetrična dimetilacija histona H3R2 (H3R2me2) uzrokuje nemogućnost vezanja određenih efektornih proteinskih kompleksa na histon H3K4me3, što je povezano s aktivnom transkripcijom. Obrnuto tomu, simetrična dimetilacija argininskih ostataka povećava učinak vezanja određenih efektoru na H3K4me3 (Blakey i Litt 2016). Prema tome, nije samo tip post-translacijske modifikacije bitan u regulaciji kromatina, već i različita stanja određenih modifikacija određuju odgovarajuće vrijeme navedenih regulatornih učinaka (Blakey i Litt 2016).

Metilacija 5-C atoma citozinskog ostataka je reverzibilna kovalentna modifikacija DNA, koja rezultira stvaranjem 5-metilcitozina. Kod sisavaca je metilacija histona ograničena na onim citozinima koji se nalaze u smjeru 5' u odnosu na gvanozin (često nazvani otoci CpG gdje „p“ predstavlja fosfodietersku vezu koja spaja citozin i gvanozin). Ove metilne skupine omogućavaju normalno povezivanje vodikovim vezama, te su usmjerene prema velikom utoru DNA te tako mijenjaju biofizičke karakteristike DNA (Slika 2). Metilne skupine imaju dva učinka: inhibiraju prepoznavanje DNA od strane nekih proteina, te olakšavaju vezanje drugih proteina. Metilacija DNA se uglavnom povezuje s represijom ekspresije gena, a budući da se uzorak metilacije DNA može održati za vrijeme replikacije DNA i mitoze, i ova genetička modifikacije je također povezana i s nasljeđivanjem (Gibney i Nolan 2010).

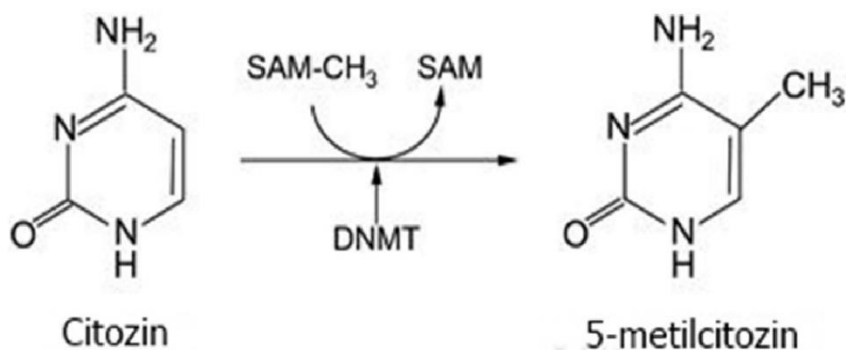


Slika 3. Sparivanje gvanina i citozina (preuzeto iz Huang i sur. 2016).

Sparivanje citozina i gvanina događa se manje učestalo kroz većinu genoma, ali se učestalije javlja u područjima CpG otoka. Otoci CpG nejednako su raspoređeni po genomu, a u početku se smatralo da su koncentrirani u područjima promotora gena. Novija istraživanja pokazuju kako otprilike pola otoka CpG u genomu nisu povezani s promotorima, već su locirani ili unutar gena (intragenski) ili u međugenskim (intergenskim) područjima. Pretpostavlja se kako rubni otoci CpG mogu označavati start pozicije za transkripciju nekodirajućih molekula RNA (ncRNA). U svakom slučaju, otoci CpG imaju važnu ulogu u kontroli genske ekspresije (Gibney i Nolan 2010). Kod kralježnjaka je preko 80% CpG dinukleotida koji se nalaze izvan otoka CpG metilirano, dok su dinukleotidi CpG koji se nalaze unutar otoka CpG su uglavnom nemetilirani ili imaju relativno mali stupanj metilacije (Gibney i Nolan 2010).

DNA-metiltransferaze (DNMT) su grupa enzima koji su odgovorni za metilaciju DNA (Slika 4). Do danas su identificirana četiri enzima DNMT kod sisavaca: DNMT1, DNMT2, DNMT3a i DNMT3b (Gibney i Nolan 2010). DNMT1 održava metilaciju DNA za vrijeme replikacije tako što kopira uzorak metilacije s roditeljskog lanca DNA na novosintetizirani lanac. Enzimi DNMT3a i DNMT3b su odgovorni za *de novo* metilaciju DNA, ciljajući nemetilirane

dinukleotide CpG, te također zajedno s enzimom DNMT1 osiguravaju „kopiranje“ uzorka metilacije tijekom replikacije DNA (Gibney i Nolan 2010). Za razliku od enzima DNMT1, DNMT3a i DNMT3b, enzim DNMT2 ima slabu sposobnost metilacije DNA *in vitro*, te se smatra da je uključen u metilaciju RNA. U slučaju demetilacije, pasivna i relativno spora demetilacija može se dogoditi u slučaju da se metilirani otoci CpG ne uspiju prekopyirati za vrijeme replikacije. Isto tako se i brža demetilacija odvija, ali potpuni mehanizam takvog oblika metilacije još nije u potpunosti razjašnjen (Gibney i Nolan 2010). Ukoliko je metilacija uključena u kontrolu ekspresije gena, onda bi geni koji pokazuju različit stupanj metilacije trebali pokazivati mjerljive i kvantitativne pokazatelje u njihovoj ekspresiji, te bi ekspresija gena mogla biti kvantitativno promjenjena metilacijom i demetilacijom specifičnih CpG unutar specifičnih gena (Gibney i Nolan 2010).



Slika 4. Mehanizam djelovanja DNA-metiltransferaze (DNMT) (preuzeto iz prema Huang i sur. 2016).

### 2.2.3. Fosforilacija

Slično kao i acetilacija histona, fosforilacija histona je dinamičan proces s brzim obratom, s poluživotom trajanja od otprilike trideset minuta do tri sata. Za razliku od fosforilacije histona i acetilacije histona, metilacija histona ima poluživot trajanja od 0.297 do 4.809 dana (Blakey i Litt2016). Mehanički slična acetilaciji, fosforilacija histon može direktno regulirati dinamiku nukleosoma mijenjajući naboj histona. Fosforilacija serinskih, treoninskih i tirozinskih ostataka

na histonima uzrokuje stvaranje negativnog naboja, što može rezultirati u odbijanju naboja između negativno nabijene DNA i negativno nabijenih ostataka. Ranija su istraživanja pokazala da adicija nefosforiliranih histonskih repova u jezgru štiti DNA od djelovanja Dnaze I uspješnije nego adicija fosforiliranih histonskih repova, ukazujući na to da odbijanje naboja na repovima histona učini jezgrinu DNA više dostupnom.

Fosforilacija histona H3 na mjestu T118, mjestu lociranom u sučelju DNA i histona, smanjuje DNA-histon vezujuću slobodnu energiju za 2kcal/mol i povećava mobilnost nukleosoma za 28-puta. Supstitucija aminokiseline T118 s glutamatom, s ciljem dodjeljivanja negativnog naboja istoj lokaciji nije rezultirala u promijeni DNA-histon vezujuće slobodne energije ili nukleosomalne mobilnosti, što ukazuje na to da je osim naboja i tip prisutnog pola bitan za mehanizam (Blakey i Litt2016).

### **2.3. Uloga RNA kod epigenetičke regulacije ekspresije gena**

Dolazak masivno paralelnog sekvenciranja DNA i njegova adaptacija na sekvenciranje RNA preko knjižnica cDNA, otkrilo je iznenađujuću činjenicu da je velika većina ljudskog genoma transkribirana u transkripte RNA od kojih većina ne kodiraju proteine. Većina novo otkrivenih molekula RNA nemaju ni jedan identificirajući otvoreni okvir čitanja, nisu povezane sa ribosomima, i mnogo ih je lokalizirano unutar jezgre. Navedene molekule RNA predstavljaju molekule ncRNA (Giles i sur. 2016). Molekule ncRNA pojavljuju se u rasponu veličina od vrlo kratkih do ekstremno velikih transkripta, te su obično klasificirane prema njihovoj dužini, substaničnom smještaju, orijentaciji u odnosu na najbliži protein-kodirajući gen i/ili funkciju, (Gibney i Nolan 2010).

Mehanizmi epigenetičke regulacije temeljeni na molekulama RNA znatno su manje poznati u odnosu na mehanizme metilacije DNA i modifikacije histona. Nekodirajuće molekule RNA poznate su već dugo vremena (Alberts i sur. 2008) i uključuju tRNA, rRNA, snRNA (od engl. *small nuclear RNA*) i snoRNA (od engl. *small nucleolar RNA*). Ove RNA molekule su uključene u translaciju, doradu RNA, u prepoznavanju supstrata RNA na temelju specifičnih sekvenci, te u katalizi. Uz navedene uloge, neke od njih imaju također i regulacijske uloge, kao na primjer snRNA U1 koja je uključena u regulaciju inicijacije transkripcije uz pomoć RNA-polimeraze II

preko interakcije sa transkripcijskim iniciacijskim faktorom TFIID (Gibney i Nolan 2010). Unatoč novim generacijama sekvenciranja koje bi omogućile identifikaciju novih molekula, molekule ncRNA koje su najbolje proučene i koje utječu na kromatin, otkrivene su bez pomoći sekvenciranja, a to su dvije vrlo različite molekule ncRNA, molekule Xist i siRNA. Molekula Xist je izvorno otkrivena u ranim 90-im, a potrebna je za održavanje utišanog X kromosoma kod sisavaca. Ova duga ncRNA (17kb kod ljudi i 15kb kod miševa) funkcionira tako što prekriva utišani kromosom X, te regrutira faktore koji stvaraju heterokromatin (Giles i sur. 2016). Druga dobro proučena ncRNA otkrivena je u modelnim organizmima, uočnjaku (*Arabidopsis thaliana*) i obliću (*Caenorhabditis elegans*). Koristeći ove genetičke modele uočeno je da su transgeni koji imaju veliku razinu homologije s endogenom transkripcijski utišani. Zanimljivo je da je transkripcijski utišan bio i odgovarajući endogen. U konačnici je otkriveno da se mehanizmi koji uzrokuju utišavanje ovih gena odvijaju zbog djelovanja malih molekula RNA dužine 21-24 nukleotida. Ove RNA su nazvane malim interferirajućim molekulama RNA (siRNA, od engl. *small interfering RNAs*), a mehanizam pomoću kojih je utišan transgen i njegov odgovarajući endogen kod oblića *C. elegans* nazvan je RNA interferencija (RNAi). Na početku se smatralo da ovi mehanizmi djeluju tako što post-transkripcijski degradiraju mRNA odgovarajućeg gena, no u kasnijim istraživanjima na drugom modelnom organizmu (*Schizosaccharomyces pombe*) dokazano je da je RNAi mašinerija, također, kritična i za uspostavljanje i održavanje heterokromatina kod centromere i drugih područja (Giles i sur. 2016).

### **2.3.1. Male molekule ncRNA**

Male molekule ncRNA su uglavnom izvedene iz većih prekurzorskih molekula RNA, cijepanjem uz pomoć obitelji enzima RNaza III (Drosha i Dicer), te obuhvaćaju miRNA (od engl. *micro RNA*), siRNA, molekule RNA u interakciji s PIWI (piRNA) i rasiRNA (od engl. *repeat-associated RNA*), uz ostale slabije objašnjene oblike (Gibney i Nolan 2010).

Molekule miRNA (dužine ~22 nukleotida) izvedene su iz nesavršenih struktura oblika ukosnice prisutnih u dugim prekursorima ncRNA, te su doručene u dva uzastopna koraka cijepanja uz pomoć kompleksa Dicer i Drosha. Baze zrelih molekula miRNA se sparuju s ciljnim molekulama mRNA kako bi inhibirale translaciju ili usmjeravale razgradnju molekule mRNA

preko kompleksa RISC. Nedavno je demonstrirana regulacija metilacije DNA *de novo* pomoću molekula miRNA u embrionalnim stanicama miša (Gibney i Nolan 2010).

Molekule siRNA su slične miRNA što se tiče veličine (dužine ~21 nukleotid), ali se razlikuju po tome što su izvedene iz dvolančanih prekursora RNA te ih cijepa enzim Dicer. Uglavnom se baze sparuju s komplementarnim bazama njihovih ciljnih molekula mRNA te ih usmjeravaju na razgradnju, ali isto siRNA tako mogu i potisnuti translaciju ako se baze sparuju s manjim stupnjem komplementarnosti. Molekule siRNA sudjeluju u utišavanju gena na razini transkripcije, a naročito u utišavanju transpozabilnih elemenata. Ova funkcija je dobro opisana kod biljaka, gdje molekula siRNA usmjerava metilaciju DNA na područje genoma homologno sekvenci siRNA. Kod kvasca *Saccharomyces pombe* i vjerojatno kod životinja, utišavanje gena usmjereno molekulama siRNA obuhvaća regrutiranje enzima HMT i stvaranje heterokromatina (Gibney i Nolan 2010).

Molekule piRNA duge su od 28 do 33 nukleotida, a udružuju se s porodicom proteina PIWI, kod muških spolnih stanica i u oocitama. Nastaju iz jednolančanih prekursora RNA uz pomoć enzima DICER. Molekule rasiRNA vinske mušice i molekule „21U“RNA oblića odgovaraju piRNA molekulama. Ove molekule RNA uključene su u kontrolu aktivnosti transpozabilnih elemenata kod spolnih stanica vinske mušice, oblića, riba i sisavaca te su ključne za vijabilnost stanica geminativne linije (Gibney i Nolan 2010).

### **2.3.2. Duge molekule ncRNA**

Duge molekule ncRNA (lncRNA) uglavnom su definirane kao molekule duže od 200 nukleotida. Molekule lncRNA se dijele na 5 kategorija: 1. *sense* ili 2. *antisense*, kada se preklapanju jedan ili više eksona drugog transkripta na istom odnosno suprotnom lancu; 3. dvosmjerne, kada su ekspresija lncRNA i ekspresija susjednog kodirajućeg transkripta na suprotnom lancu inicirane u genomskoj blizini; 4. intronske, kada je u cijelosti dobivena iz introna drugog transkripta; 5. međugenska, kada se nalazi u genomskom intervalu između dva gena.

Uloga molekula lncRNA nije u potpunosti razjašnjena. Neke predstavljaju transkripcijsku buku (engl. transcriptional noise), dok druge mogu služiti kao prekursori za male RNA molekule. U



većini slučajeva smatra se da molekule lncRNA reguliraju ekspresiju gena na svoj vlastiti način (Gibney i Nolan 2010). U nekim slučajevima, transkripcija molekule lncRNA može povećati ili smanjiti transkripciju nizvodno od promotora, tako što mijenja regrutiranje RNA-polimeraze II ili tako što mijenja konfiguraciju kromatina. U drugim slučajevima hibridizacija transkripta *antisense* s transkriptom *sense* može rezultirati promijenjenom doradom transkripta *sense*, ili može dovesti do stvaranja endogenih molekula siRNA uz pomoć djelovanja enzima Dicer. Molekule lncRNA mogu ući u interakciju s proteinskim partnerima modulirajući aktivnost ili lokalizaciju tih proteina unutar stanice, ili RNA može biti doradena uslijed čega nastaju različiti tipovi malih regulirajućih molekula RNA (Gibney i Nolan 2010). Jedna od glavnih tema današnjih istraživanja molekula lncRNA su njihove interakcije s kromatin modificirajućim enzimima. HOTAIR, lncRNA molekula transkribirana sa HOXC grupe, veže se za polycomb represijski kompleks PRC2 i cilja HOXD grupu gdje je nekoliko gena potisnuto (Rinn i sur. 2007).

Na sličan način uočeno je da lncRNA Xist, koja igra važnu ulogu u x- kromosom inaktivaciji kod stanica sisavaca, kao i kraći interni transkript, RepA reagiraju s PRC2 kompleksima (posebno sa Ezh2 podjedinicom), te ih regrutiraju na inaktivirani x-kromosom gdje zatim služe za trimetilaciju H3K27 (Zhao i sur. 2008). Nedavna su istraživanja, na nekoliko tipova ljudskih stanica, pokazala da se veliki broj molekula lncRNA udružuju s kompleksima koji dodaju represivne kromatinske oznake, koristeći siRNA mehanizam, te je dokazano da ova udruženja funkcioniraju na temelju ciljne specifičnosti (Khalil i sur. 2009). Interakcije lncRNA sa kromatin-modificirajućim kompleksima mogu služiti i za aktiviranje modifikacije specifičnih lokusa. Zbog toga kod *vinke mušice*, tri molekule lncRNA regrutiraju trithorax protein Ash1 na Ultrathorax lokus održavajući Ubx transkripciju (Sanchez-Elsner i sur. 2006).

### **3. UTJECAJ OKOLINE I PREHRANE NA EPIGENETIČKE MEHANIZME**

Eukariotske stanice, tkiva i organizmi konstantno odgovaraju na vanjske utjecaje okoline kako bi povećali fitness i šansu preživljavanja. Ovakvi odgovori na okolinu se tipično ne događaju direktno u genomu, već na razini epigenoma. Dokazi pokazuju da se mehanizmi koji

posreduju u odgovoru i adaptaciji na uvjete okoline temelje na epigenetičkim procesima. Epigenetičke promjene i adaptacije koje se javljaju kao odgovor na uvjete u ranim stadijima razvoja, naročito u maternici, mogu utjecati na rizik obolijevanja i osjetljivost kasnije u životu. Zbog toga razumijevanje epigenetičkih promjena i mehanizama povezanih s odgovorom na okolinu mogu pružiti uvid u osnovne mehanizme početka bolesti kod odraslih. Ovi epigenetički regulatorni mehanizmi uključuju metilaciju DNA, modifikaciju histona, remodeliranje kromatina i molekule ncRNA (Brant i Yang 2016).

Waterland i Garza (1999) su pokazali kako se epigenetičke promjene mogu pojaviti u ograničenom periodu za vrijeme razvoja u maternici, te da ove promijene odolijevaju i u odraslom stadiju. Ova hipoteza je nazvana metabolički utisak (engl. *metabolic imprinting*). No mehanizmi uz pomoć kojih okolišni i metabolički čimbenici vode do povećanja osjetljivosti na bolesti i promijenjen metabolizam u odraslom stadiju života nisu dovoljno razjašnjeni. Jedna je pretpostavka da se epigenetičke promjene u placenti i/ili fetusu događaju zbog majčine pothranjenosti za vrijeme razvoja fetusa, što može prouzročiti stabilne, nasljedne i abnormalne promjene u regulaciji gena važnih za ispravan razvoj placentu i fetusa. Metilacija dinukleotida CpG dobro je istražena epigenetička modifikacija, tipično povezana s transkripcijski neaktivnim kromatinom. Budući da su uzorci metilacije DNA, na razini genoma, reprogramirani za vrijeme prenatalnog i ranog postnatalnog razvoja, te kao takvi održavani kroz odrasli stadij, moguće je da abnormalni nutritivni uvjeti, okolišni toksini i izlaganje stresu za vrijeme epigenetičkog reprogramiranja, mijenjaju postavljanje normalnih uzoraka metilacije DNA (Brant i sur. 2016).

Jedni od okolišnih čimbenika koji utječu na promjenu u epigenetičkom programiranju su zagađivala kao što su vinklozilin, metiloksiklor, herbicidi i insekticid, arsen, nanočestice, izlaganje fetusa alkoholu, pušenje, pasivno pušenje cigareta i dr. (Brant i sur. 2016). Godine 2005. objavljen je znanstveni rad o okolišnoj epigenetici gdje je dokazano da izlaganje štakora disruptoru endokrinog sustava fungicidu vinklozolinu, u maternici rezultira u smanjivanju spermatogenog kapaciteta kod odraslih životinja, što je povezano s izmijenjenim uzorcima metilacije DNA u stanicama zametka. Nadalje, fenotip zametka, kao i promijene u uzorku metilacije DNA održavani su kroz generaciju F3 iako se izlaganje dogodilo samo kod majke generacije F0. Istrživani su i otencijalni transgeneracijski učinci drugih okolišnih toksina kao što

su dioksin, permetrin insekticid DEET, BPA i ftalata i mlazno gorivo. Svi navedeni spojevi pokazali su toksikološke učinke kod štakora. Nadalje, ovi su spojevi povezani s transgeneracijskim preuranjenim pubertetom, povećanom apoptozom sperme i/ili redukcijom broja folikula u jajniku (Brant i sur. 2016). Analiza na razini cijelog genoma sperme kod generacije F3 pokazala je promijenjen uzorak metilacije DNA kod svih kontaminiranih jedinki (Brant i sur. 2016).

Etanol i duhan dvije su supstance koje ljudi često unose u svoje organizme. Izlaganje ijednoj od ovih supstanci pokazalo je povezanost s epigenetičkim promjenama. Etanol je molekula koja se često unosi u organizam čovjeka te je dokazano da ima teratogeni učinak na embrij kada je izložen etanolu u maternici. Teratogene posljedice prenatalnog izlaganja etanolu vode do poremećaja koji se skupa nazivaju fetalni alkoholni spektar poremećaja - FASD (od engl. *fetal alcohol spectrum disorders*), od kojih je najozbiljniji fetalni alkoholni sindrom (FAS). FAS je karakteriziran pre- i postnatalnim poremećajima rasta, kraniofacialnim abnormalnostima i disfunkcijom središnjeg živčanog sustava.

Drugi česti proizvod koji potrošači konzumiraju je duhan pušenjem cigareta. Učinci majčinog pušenja za vrijeme trudnoće na pomotak djeluju tako što dolazi do smanjenja metilacije područja CpG kod ljudskog receptora 4 aktiviranog proteazama (F2RL3) gena u plućnom i krvnom tkivu kod pušača u odnosu na nepušače. To je samo jedan od učinaka duhana na fetus za vrijeme prenatalnog razvoja, iako su zabilježeni i mnogi drugi. Novija istraživanja dolaze do sve više dokaza koja navode da kronične bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, respiratorne bolesti i rak mogu potjecati kao odgovor na nutritivne i/ili okolišne negativne faktore za vrijeme razvoja u maternici. Na primjer u humanim i animalnim istraživanjima oboje epidemološki i eksperimentalni dokazi navode kako siromašna prehrana u maternici ima štetne dugoročne učinke na metaboličko i fiziološko stanje potomka (Brant i Yang 2016). Epidemološka istraživanja pokazuju da mala masa prilikom rođenja su povezana sa učestalom hipertenzijom (Law i sur. 1991), diabetesom neovisnom o inzulinu (Philips i sur. 1994), i kronični bronhitis i CHD (Barker i sur. 1990). Nažalost ovakve vrste istraživanja ne mogu odrediti unutar materničke uvijete koji su doveli do ovih rezultata, uz to mnogo čimbenika može biti razlog male mase prilikom rođenja.

## 4. ZAKLJUČAK

Svaka stanica sadrži isti genom, ali skupine stanica obavljaju različite funkcije. Kod određenih stanica dolazi do ekspresije određenih gena, dok kod drugih dolazi do represije tih istih gena. Za to su zaslužni epigenetički mehanizmi koji služe za prijenos informacija koje nisu dio genoma već takozvanog epigenoma. Za razliku od genoma, epigenom je plastičan te je podložan promjenama tokom vremena i prilikom izlaganja raznim spojevima iz okoline. Uz to što epigenom omogućava razlikovanje jednog tipa stanice od drugog, isto tako služi i za prijenos informacija na potomke. Većina tipova ekspresije i represije gena su pod utjecajem epigenetičkih mehanizama koji utječu na dostupnost određenih gena u kromosomu, djeluju na gene na razini transkripcije, post-transkripcije i translacije uz pomoć RNA-posredovanih mehanizama itd. Uz novija istraživanja o ulozi okoline i metabolizma na epigenetičke mehanizme i represiju gena saznajemo kako vanjski utjecaji za vrijeme ranog razvoja utječu ne samo na odrasli stadij te jedinke već i na njezine potomke, uzrokujući tako razne probleme i osjetljivosti na bolesti zbog represije određenih gena. Iako je epigenetika brzorastuća grana biologije gdje svakim danom dolaze nova saznanja o epigenetičkim mehanizmima i njihovim utjecajima na ekspresiju odnosno represiju gena, još uvijek postoji mnogo toga što nam nije poznato. Uz nekoliko osnovnih mehanizama koji su relativno dobro poznati kao što su metilacija histona, fosforilacija, metilacija dinukleotida CpG, itd. Postoji mnogo više mehanizama čiji su putevi djelovanja u represiji gena nepoznati. Zasad nova istraživanja koja su izvršena donijela su iznenađujuće i zanimljive rezultate koji su otvorili put na nove načine gledanja već davno poznatih ali i novih problema kojima se treba baviti još u budućnosti jer će donijeti velika saznanja.

## 5. LITERATURA

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (ur.) (2008) *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. Garland Science, New York.

Allis, C.D., Jenuwein, T., Reinberg, D. (2007) Overview and concepts. U: Allis, C. D., Jenuwein, T., Reinberg, D. (ur). Epigenetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, str. 23–61.

Barker, D. J., Bull, A. R., Osmond, C., Simmonds, S. J. (1990) Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *British Medical Journal* 6746:301-259.

Blakey, C.A., Litt, M.D. Histone modifications-models and mechanisms. U: Huang, S., Litt, M. D., Blakey, C. A. (ur.) (2016) Epigenetic gene Expression and Regulation. Elsevier Inc, Academic Press is an imprint of Elsevier, New York, str. 21-38.

Brant, J.O. Yang T.P., Epigenetics effects of environment and diet, U: Huang, S., Litt, M. D., Blakey, C. A. (ur.) (2016) Epigenetic gene Expression and Regulation. Elsevier Inc, Academic Press is an imprint of Elsevier, New York, Str. 339-359.

Feng, J., Bi, C., Clark, B.S., Mady, R., Shah ,P., Kohtz, J.D. (2006). The Evf-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved regions and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator. *Genes & Development* 20: 1470–1484.

Gibney, E. R., Nolan, C. M. (2010) Epigenetics and gene expression, *Heredity*, The Genetics Society. 105: 4-13.

Henikoff, S., Smith, M.M. (2007) Histone variants and epigenetics. U: Allis, C.D., Jenuwein, T., Reinberg, D. (ur.) Epigenetics. Centre for Health Law and Society, New York, str. 249-264.

Giles, K. E., Woolnough, J.L., Atwood, B. ncRNA function in chromatin organisation. U: Huang, S., Litt, M. D., Blakey, C. A. (ur.) (2016) Epigenetic gene Expression and Regulation. Elsevier Inc, Academic Press is an imprint of Elsevier, New York, str. 117-142.

Huang, S., Litt, M. D., Blakey, C. A. (ur.) (2016) Epigenetic gene Expression and Regulation. Elsevier, New York.

Khalil, A. M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., Raj, A., Rivea Morales, D., Thomas, K., Presser, A., Brenstein, B., E., van Oudenaarden, A., Regev, A., Lander, E., S., Rinn, J., L. (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 11667–11672.

Law, C. M., Barker, D. J., Bull, A. R., Osmond, C. (1991) Maternal and fetal influences on blood pressure. *Archives of Disease in Childhood*. 66:1291–5.

Phillips, D. I., Barker, D. J., Hales, C., N., Hrist, S., Osmond, C. (1994) Thinness at birth and insulin resistance in adult life. *Diabetologia*. 37:150–4.

Ramakrishnan, V. (1997) Histone Structure and the organisation of the Nucleosome. *Annual reviews Department of Biochemistry*. 26: 83-112.

Rinn, J.,L., Kertesz, M., Wang, J.,K., Squazzo, S.,L., Xu, X., Bruggmann, S. A., Goodnough, L. H., Helms, J. A., Farnham, P. J., Segal, E., Chang, H. Y. (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 129: 1311–1323.

Waterland, R. A., Garza, C. (1999) Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 69:179–97.

Zhao, J., Sun, B. K., Erwin, J. A., Song, J. J., Lee, J.T. (2008). Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science*. 322: 750–756.

## **WEB IZVORI**

Web 1. <https://www.youtube.com/watch?v=LN81xo9IW4w>

Web 2. <https://www.nature.com/articles/hdy201054/figures/1>

Web 3. <https://www.nature.com/articles/hdy201054/figures/2>