Prehrana i epigenetske modifikacije molekule DNA

Banovac, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:166:771507

Rights / Prava: Attribution 4.0 International/Imenovanje 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Science

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Odjel za kemiju

Marija Banovac

PREHRANA I EPIGENETSKE MODIFIKACIJE MOLEKULE DNA

Završni rad

Split, 2016.

Ovaj rad, izrađen na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu pod vodstvom doc. dr. sc. Viljemke Bučević-Popović te pod neposrednim voditeljstvom dr. sc. Matilde Šprung, predan je na ocjenu Odjelu za kemiju radi stjecanja zvanja prvostupnica nutricionizma.

Sadržaj:

1. Uvod 1
2. Opći dio 2
2.1. Nukleinske kiseline 2
2.2. Građa i ekspresija gena 3
2.3. Epigenetika i kromatin 3
2.4. Metilacija DNA 4
2.4.1. Mehanizam metilacije 6
2.4.2. Ciklus transmetilacije 7
2.4.3. Demetilacija 8
2.5. Modifikacije histona 9
2.5.1. Acetilacija histona 9
2.5.2. Metilacija histona 10
2.6. Druge kromatinske promjene 11
2.7. Prehrana i epigenom 12
2.7.1. Utjecaj nutrijenata na metilaciju DNA 12
2.7.2. Utjecaj biološki aktivnih spojeva na metilaciju DNA 20
3. Zaključak: 23
4. Popis literature 24
4.1. Izvori slika: 26

1. Uvod

Za razliku od genetike koja se temelji na proučavanju građe gena, epigenetika se temelji na proučavanju tzv. fiziologije gena, odnosno promjena u njihovoj aktivnosti. Temeljne epigenetske promjene su metilacija deoksiribonukleinske kiseline (DNA) i posttranslacijske promjene histona, procesi koji se međusobno nadopunjuju i stvaraju epigenetički profil kojim se regulira genska aktivnost. Epigenetske promjene su reverzibilne promjene koje se mogu zadržati nekoliko generacija, ali su ipak individualne za svaku osobu. Uspostava određenog tipa epigenetskih promjena, osim o građi gena, ovisi o nizu endogenih čimbenika na koje čovjek određenim obrascima prehrane i životnim navikama može uvelike utjecati. Otkrivanjem molekularnih mehanizama koji prate epigenetske procese omogućen je, ne samo bolji uvid u važnost tih promjena, već i otkrivanje novih putova liječenja i preveniranja bolesti.

Prehrana je važan čimbenik u životu svih organizama te je poznato blagotvorno i štetno djelovanje sastojaka hrane koju unosimo. Niz istraživanja je pokazao da povećan unos određene skupine hrane može smanjiti rizik nastanka bolesti kao što su kardiovaskularne i neurološke bolesti, dijabetes i rak, moguće i zbog toga što pojedini sastojci te hrane mogu izazvati epigenetske promjene kod ljudi. Tako na primjer povećan unos povrća koji sadrži izotiocijanate povisuje razinu acetilacije histona, dok će povećan unos zelenog čaja i soje sa svojim aktivnim sastojcima rezultirati smanjenom metilacijom DNA. Zanimljivo je da epigenetske promijene određenih dijelova molekule DNA mogu rezultirati inaktivacijom tumorskih gena koji sprječavaju prekomjernu diobu malignih stanica, a time i širenje tumora. Stoga je otkrivanje mehanizama kojima prehrana, a posebice njeni pojedini sastojci modificiraju molekulu DNA te time utječu na razvoj bolesti, od velike važnosti za život ljudi.

U ovom radu opisane su najučestalije epigenetske promjene s naglaskom na mehanizme njihovog djelovanja, utjecaja određenih nutrijenata i biološki aktivnih tvari koje unosimo prehranom.

2. Opći dio

2.1. Nukleinske kiseline

Nukleinske kiseline su linearne polimerne makromolekule koje sudjeluju u pohrani, prijenosu i izražaju genske informacije. Razlikujemo dva tipa nukleinskih kiselina – ribonukleinska (RNA) i deoksiribonukleinska kiselina (DNA), a razlikuju se po sastavu, broju lanaca i ulozi u stanici.

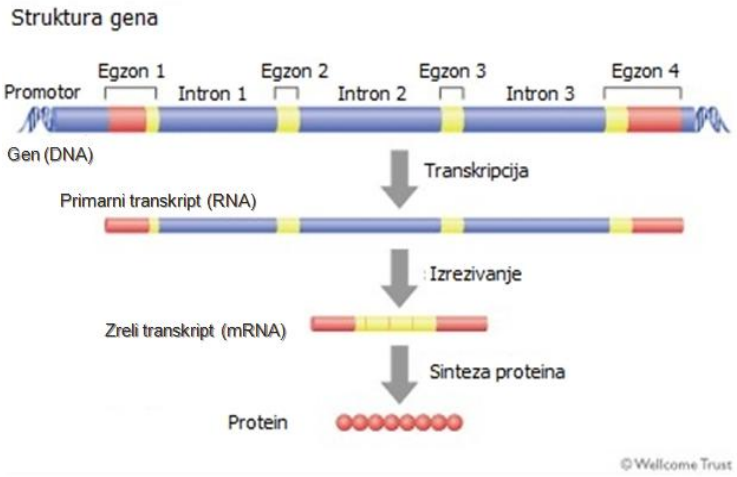
DNA je informacijska molekula najčešće oblika dvostruke spiralne zavojnice. Svaka zavojnica predstavlja polimer nukleotida koji su građeni od šećera deoksiriboze, fosfatne skupine i dušične purinske (adenin, gvanin) ili pirimidinske (citozin, timin) baze. Nukleotidi jednog lanca spajaju se preko fosfatne skupine 3',5' fosfodiesterskom vezom, a dva komplementarna lanca su sparena vodikovim vezama na način da se timin spaja s adeninom, a citozin s gvaninom. Lanci DNA su antiparalelni, a sastoje se od slijedova linearno povezanih nukleotida (1). Funkcionalne jedinice DNA nazivaju se geni, i najčešće su građeni od 5000 – 100 000 nukleotida. Osnovna zadaća gena je pohrana informacije na osnovu koje se sintetiziraju svi organizmu potrebni proteini. Sastoje se od dva dijela – kodirajuće regije sa specifičnim slijedom nukleotida koji određuje slijed aminokiselina u proteinu, i regulatorne regije koja kontrolira izražaj samog gena. Najveći dio DNA eukariotskih stanica pohranjeno je u jezgri u obliku kromosoma, a svaki kromosom čini jedna molekula DNA sa svojim genima. Skup svih gena jednog organizma koji se nalaze na kromosomima nazivamo genomom (2).

Druga vrsta nukleinskih kiselina su RNA - u principu jednostruke linearne molekule slične građe kao i DNA. Razlika u sastavu je ta da umjesto šećera deoksiriboze RNA ima ribozu, a timin zamjenjuje pirimidinska baza uracil. Razlikujemo više vrsta molekula RNA, a najznačajnije su glasnička ili mRNA (*eng.* messenger), prijenosna ili tRNA (*eng.* transfer) i ribosomska ili rRNA (*eng.* ribosomal). Uloga mRNA je prenošenje genske informacije s DNA do ribosoma, gdje se na osnovi kalupa mRNA odvija sinteza proteina (translacija) (3).

Promjene u sintezi DNA i sazrijevanju RNA i proteina mogu dovesti do značajnih promjena genetskog materijala što može rezultirati promjenama širokog raspona: od neznatnih promjena u slijedu nukleotida koje nemaju štetne posljedice, do stvaranja nefunkcionalnih ili štetnih proteina koji mogu dovesti organizam u patološko i po život opasno stanje. Da bi se to izbjeglo, evolucijski su se razvili mehanizmi koji štite molekulu DNA, i stanice od štetnih mutacija (mehanizmi popravka grešaka, apoptoza mutiranih stanica, imunološki sustav koji uništava kancerogene stanice itd.).

2.2. Građa i ekspresija gena

U molekularnom smislu, gen je dio nukleinske kiseline koji je potreban za sintezu funkcionalnog genskog produkta (protein ili RNA). Sastoji se od kodirajućih regija ili egzona koji su odvojeni nekodirajućim regijama ili intronima (4). (Slika 1) Transkripcija je proces sinteze mRNA na osnovu kalupa s molekule DNA. Započinje vezanjem enzima RNA-polimeraze i transkripcijskih faktora na promotor, slijed nukleotida koji predstavlja početno mjesto transkripcije. Nakon vezanja RNA-polimeraze, lanci DNA se odmotavaju i odvajaju što omogućuje pomicanje enzima po molekuli DNA. RNA-polimeraza katalizira stvaranje fosfodiesterske veze između ribonukleotida na 3' kraju novonastale molekule RNA. Takva novonastala molekula RNA naziva se primarni transkript te se, s obzirom da uz kodirajuće sadrži i nekodirajuće regije, prije translacije mora doraditi. Dorada primarnog transkripta (*eng*. RNA splicing) je proces izrezivanja introna iz novonastale molekule RNA prilikom čega se egzoni istog primarnog transkripta mogu kombinirati na više načina. To upućuje da jedan gen može kodirati više mRNA, a time i proteina. Nakon dorade primarnog transkripta nastaje zreli transkript (mRNA) koji potom odlazi na ribosom u proces sinteze proteina (5).

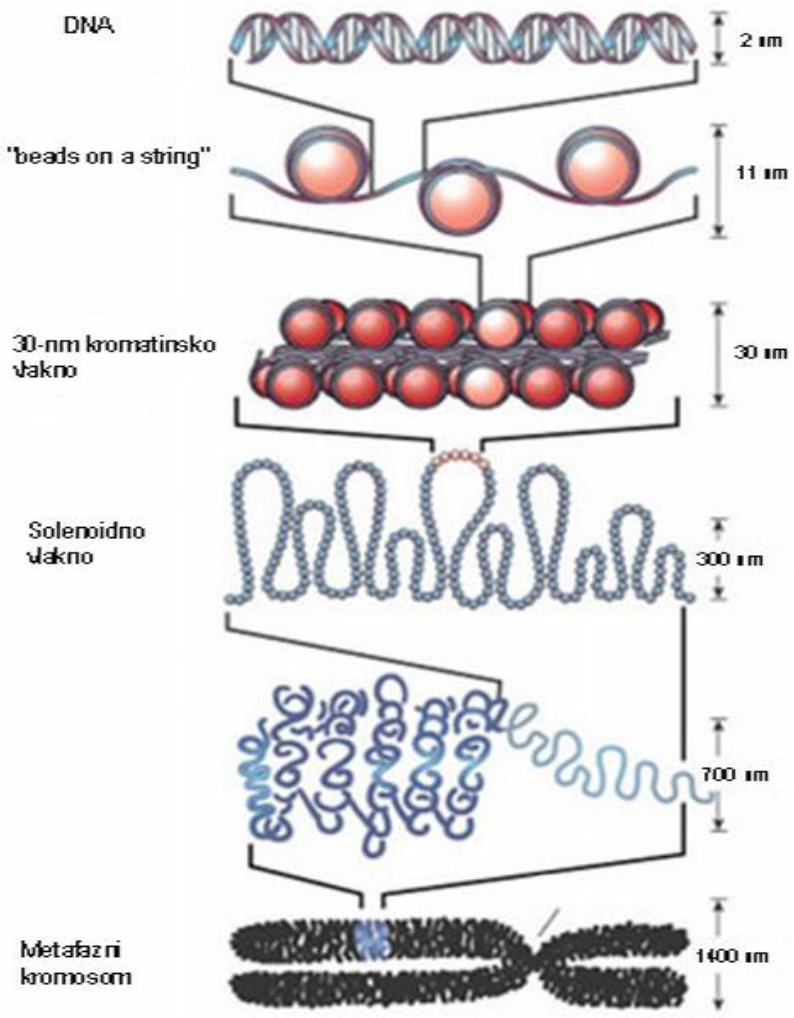


Slika 1: Prijenos genetske informacije iz gena na protein

2.3. Epigenetika i kromatin

Epigenetika je znanost koja se temelji na proučavanju nasljednih promjena u ekspresiji gena i fenotipa izazvanih molekularnim mehanizmima modifikacije DNA i kromatina, prilikom čega ne dolazi do promjene u ishodišnom slijedu DNA. Smatra se da su te promjene uska poveznica između tri faktora – okoliša, prehrane i bolesti. Za razliku od promjena u osnovnoj strukturi molekule DNA, epigenetske promjene mogu biti izrazito dinamične, posebice pod utjecajem vanjskih faktora. Epigenetske promjene uključuju modifikacije histona, metilaciju DNA i nekodirajuće molekule RNA (6).

Kromatin je kompleks histonskih i nehistonskih proteina te molekule DNA koji se nalazi u jezgri eukariotskih stanica (Slika 2). Gledano po masi, jednu polovicu kromatina čine proteini, a drugu polovicu čini sama molekula DNA. U stanici se uglavnom nalazi u kondenziranom inaktivnom obliku heterokromatina, a tijekom metafaze mitoze, ono što vidimo kao metafazne kromosome je zapravo aktivni, odmotani eukromatin. Kromatin nikada nije cijeli u aktivnom odnosno neaktivnom stanju, već prelazi iz jednog oblika u drugi ovisno o potrebama stanice. U aktivnoj fazi kromatin je dostupan za razne stanične procese, kao što su transkripcija, replikacija, popravak i rekombinacija DNA (7).

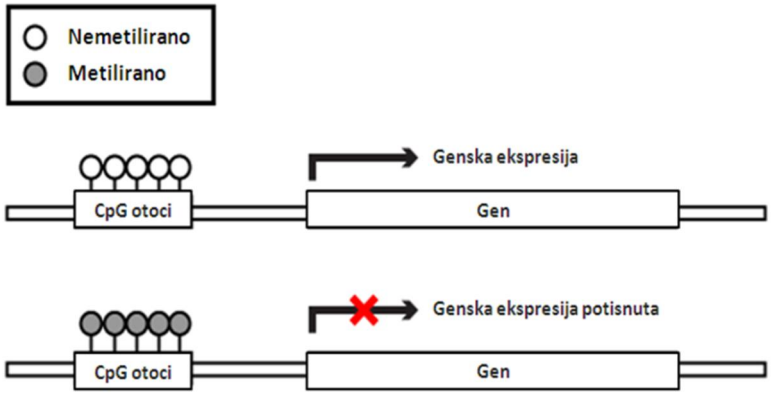


Slika 2: Građa kromatina

2.4. Metilacija DNA

Metilacija DNA je najviše proučavana epigenetska modifikacija. Osnovni mehanizam ovog procesa je dodavanje metilnih skupina na citozinske baze CpG-otoka čime uvelike utječemo na aktivnost gena. CpG-otoci (*eng.* CG Islands, CGIs) su najčešće promotorske i predpromotorske, te u osnovi nemetilirane regije DNA duljine najmanje 200 parova baza, od

kojih je barem 50% citozina i gvanina. S obzirom da je to područje početka transkripcije, promjene u statusu metilacije mogu dovesti do promjena transkripcijske aktivnosti koje se mogu manifestirati na razne načine (8). Pojačana metilacija CpG-otoka je normalni mehanizam koji se koristi prilikom trajnog utišavanja aktivnosti određenih gena kao što su onkogeni, gena na jednom X-kromosomu kod žena te drugih gena koji se pojavljuju u formi monoalela (Slika 3). Hipometilacija inače visokometiliranih CpG-otoka dovodi do pojačane aktivnosti gena koji su u osnovi slabo aktivni ili potpuno neaktivni, što može rezultirati promjenama velikog razmjera – od gotovo bezazlenih fenotipskih promjena, pa sve do pojačanog dijeljenja tumorskih stanica, što posljedično dovodi do pojave malignih oboljenja. Isto tako, ukoliko dođe do hipermetilacije inače nemetiliranih promotorskih regija može doći do smanjene aktivnosti, pa i utišavanja gena, što također može rezultirati nizom promjena. Prilikom embrionalnog razvoja metilacija CpG-otoka prvenstveno služi u svrhu utišavanja genske aktivnosti i izrazito je važna za normalan razvoj.



Slika 3: Utišavanje genske aktivnosti mehanizmom metilacije DNA

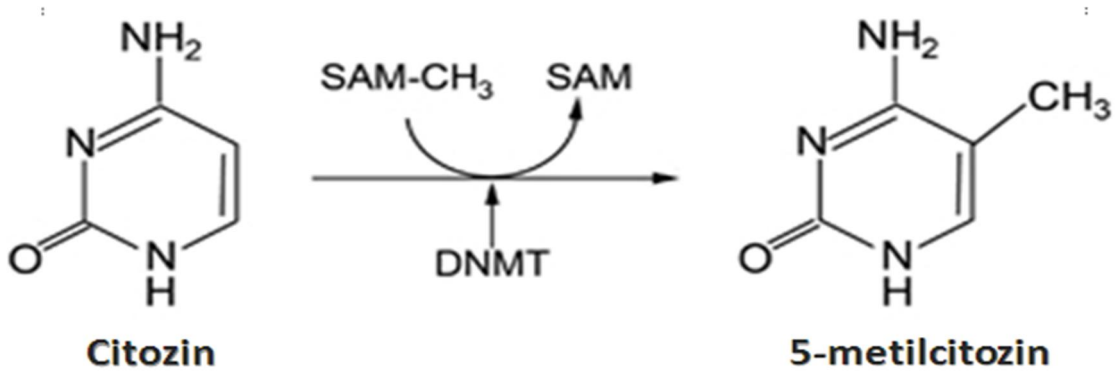
Postoje geni s već predodređenim obrascem metilacije promotorskog područja. To za posljedicu ima trajno utišavanje njihove aktivnosti zbog nemogućnosti vezanja transkripcijskih faktora na promotor. Metilacija takvih gena odvija se tijekom gametogeneze i embrionalnog razvoja, a takav obrazac ostaje za cijeli život. Primjer takvih gena su imprintani geni – mala skupina monoalelnih gena koji „pamte“ od kojeg roditelja su došli i ovisno o tome se metilacijom jedan gen inaktivira, dok drugi ostaje nemetiliran i aktivan. Pogreške u metilaciji imprintanih gena, prilikom čega se utišava ili briše onaj gen koji ne bi trebao biti utišan, najčešće rezultiraju letalno spontanim pobačajem ili, ukoliko fetus preživi, rezultiraju teškim poremećajima u razvoju (9). Drugi primjer metiliranih inaktiviranih gena je Barrovo tijelo, kada se jedan od X-kromosoma ženskog embrija drugim kromatinskim modifikacijama prvo utišava, a potom metilacijom zadržava u tom stanju čineći heterokromatinsku tvorbu.

Zanimljivo je to da se inaktivacija X-kromosoma događa do šesnaestog dana embrionalnog razvoja i da će zbog toga tijelo odrasle žene biti svojevrsni somatski mozaik s nasumično inaktiviranim X-kromosomom. Možda je važno napomenuti i da svi geni na Barrovom tijelu nisu inaktivirani jer je aktivnost određenih gena kao što su *zfx* i gena za steroid-sulfatazu potrebna za normalan fertilni razvoj žene (10).

Tijekom starenja dolazi do postepene opće hipometilacije metiliranih dijelova DNA i hipermetilacije inače nemetiliranih CpG-otoka, što kao rezultat može imati nestabilnost ili supresiju gena. Također, maligna oboljenja su često povezana s hipometiliranim onkogenima, i hipermetiliranim tumor-supresorskim genima (6). Ovakvi poremećaji se najčešće javljaju kao rezultat prehrane i okolišnih čimbenika, a smatra se da pravilan obrazac metilacije molekule DNA vodi homeostazi cjelokupnog organizma. Istraživanja su pokazala da prehrana bogata nutrijentima i biološki aktivnim komponentama koji djeluju kao donori metilne skupine može imati pozitivan učinak na cjelokupno zdravlje (8). Također, važno je napomenuti da metilacija ne sprječava replikaciju gena, već samo njihovu transkripciju, a time i ekspresiju.

2.4.1. Mehanizam metilacije

Cijeli mehanizam metilacije temelji se na pretvorbi citozina u 5-metilcitozin (Slika 4), koju katalizira skupina enzima DNA-metiltransferaze (Dnmt). Danas je poznato pet enzima pripadnika te skupine – Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a, Dnmt3b i DnmtL (8). Dnmt1 je enzim koji kroz stanične diobe održava isti obrazac metilacije na hemimetiliranoj DNA, a aktivan je na genima s unaprijed određenim obrascem. Hemimetilirana DNA je oblik DNA u kojoj samo jedan od dva komplementarna lanca ima metilirane CpG dinukleotide, ali za razliku od genskog utiska, oba lanca DNA dolaze od istog roditelja. Hemimetiliranost DNA je u ovom slučaju važna jer na izravan način otkriva postojanje *de novo* metilacija od metilacija nasljeđenih od roditelja. Možemo ih prepoznati samo u slučaju kada znamo status metilacije roditelja: ako je roditeljska DNA potpuno metilirana, hemimetilacija upućuje na pogrešku u održavanju tog slijeda, a ukoliko je ona nemetilirana ova pojava upućuje na nove obrasce metilacije uspostavljene tijekom embrionalnog razvoja (11).



Slika 4: Pretvorba citozina u 5-metilcitozin, SAM: S-adenozilmononukleotid, DNMT: DNA-metiltransferaza

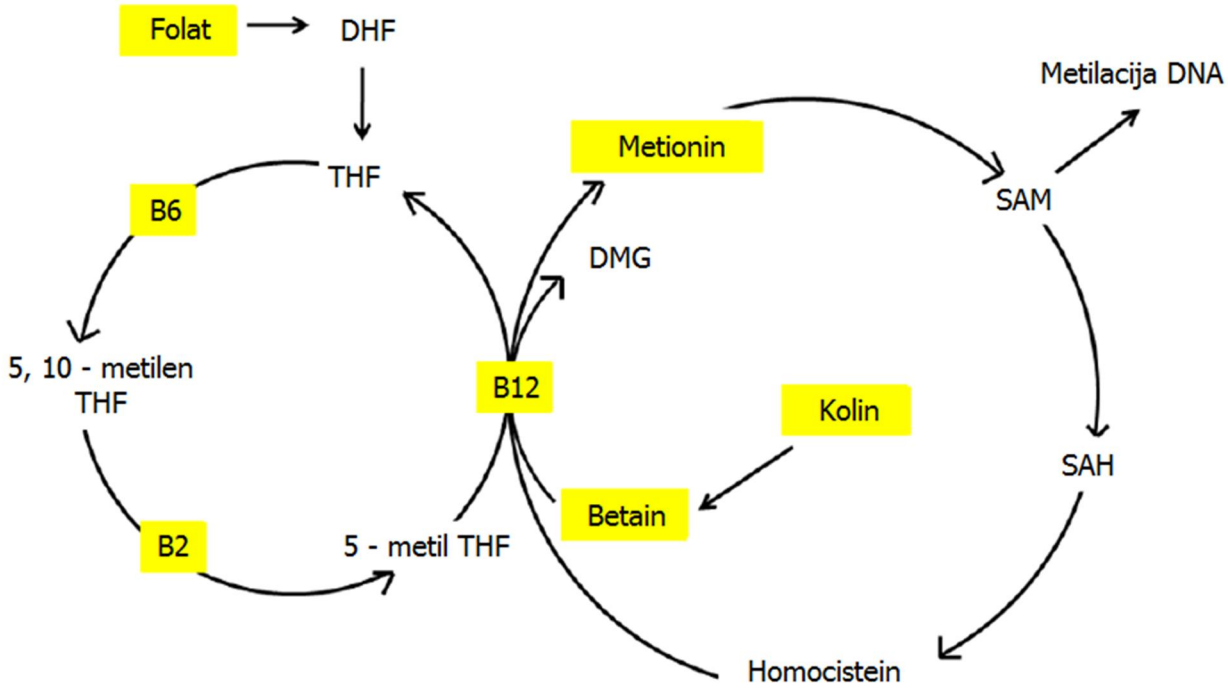
Djelovanje Dnmt2 još nije poznato, dok su Dnmt3a, Dnmt3b i DnmtL enzimi koji postavljaju *de novo* obrasce metilacije (8). *De novo* obrazac metilacije uspostavlja se tijekom gametogeneze i embrionalnog razvoja – stari se utisak briše, a svi kromosomi se nanovo metiliraju obrascem koji se uspostavlja ovisno o spolu jedinke. Nakon fertilizacije oocite i nastanka zigote kombinirani genom (osim imprintanih gena) podvrgnut je demetilaciji i ponovnoj metilaciji, a do stadija blastule metilacija embrionalnih stanica već je kompletna i taj obrazac se mitozom prenosi kroz sve somatske stanice. U kasnijem embrionalnom razvoju u spolnim zametnim stanicama embrija ponavlja se demetilacija i ponovna metilacija i ovisno o njegovom spolu formirati će se određeni obrazac. Ukoliko je fetus muškog spola, javiti će se obrazac pojačane ukupne metilacije genoma, dok će kod ženskih fetusa metilacija biti smanjena, a i obrazac će se formirati kasnije. Takav obrazac prenosi se kroz sve spolne stanice, i različit je od obrasca koji je formiran u somatskim stanicama (12).

2.4.2. Ciklus transmetilacije

Ljudi ne mogu samostalno sintetizirati metilne skupine pa ih unose prehranom bogatom određenim nutrijentima, od kojih je kao donor metilnih skupina najznačajnija folna kiselina. Uz folnu kiselinu (vitamin B_9), vrlo su bitni i drugi vitamini B skupine (B_2, B_6, B_{12}) koji su kofaktori u ciklusu transmetilacije (*eng.* one – carbon metabolism, Slika 5). Prije ulaska u ciklus, folat se reducira u dihidrogenfolat (DHF) koji pretvorbom u tetrahidrogenfolat (THF) ulazi u ciklus. Tetrahidrogenfolat potom enzim serin-hidroksimetiltransferaza pretvara u 5,10-metilen THF, uz vitamin B_6 kao kofaktor. Nakon toga se 5,10-metilenTHF uz enzim metilentetrahidrofolat-reduktazu (MTHFR) i vitamin B_2 i FAD kao kofaktore reducira u 5-metil THF koji onda djeluje kao donor metilne skupine homocisteinu. Potom se homocistein pretvara u metionin, uz B_{12} kao kofaktor, a nakon toga u

S-adenozilmetionin (SAM) koji uz djelovanje enzima Dnmt metilira DNA. Ostatak S-adenozilmetionina pretvara u S-adenzozilhomocistein (SAH), koji se hidrolizira na homocistein i adenozin. Homocistein djeluje i kao inhibitor Dnmt (6).

Sama folna kiselina, a ni tetrahidrofolati ne mogu biti izravni donori metilne skupine, jer njihov potencijal za prijenos te skupine nije dovoljno visok. S-adenozilmetionin je aktivirani donor koji nastaje prijenosom adenozilne skupine iz ATP-a na sumporni atom metionina, prilikom čega sumpor postaje pozitivan, a cijela molekula jako reaktivna. Prilikom sinteze SAM-a se događa još jedna specifična reakcija zbog čega se reaktivnost metilne skupine još povećava. Naime, prilikom prijenosa adenozilne skupine na metionin, dolazi do cijepanja fosfatne skupine ATP-a na pirofosofat i ortofosfat, nakon čega se pirofosfat ireverzibilno hidrolizira, pa to cijepanje anhidridne veze ATP-a povećava reaktivnost molekule, zbog čega će SAM lako donirati metilnu skupinu. Dio ciklusa u kojem dolazi do regeneracije metionina i donacije metilne skupine molekuli DNA nazivamo ciklusom aktivirane metilne skupine Homocistein nastao hidrolizom SAH-a se može metilirati u metionin i drugim putem uz pomoć donora kao što je betain (13).



Slika 5: Ciklus transmetilacije, DHF: Dihidrogenfolat, THF: Tetrahidrogenfolat, DMG: dimetilglicin, SAM: S-adenozilnukleotid, SAH: S-adenozilhomocistein

2.4.3. Demetilacija

Demetilacija može biti pasivna i aktivna. Pasivna demetilacija se najčešće javlja kada prilikom replikacije nedostaje enzim Dnmt zbog čega se novonastala DNA smanjeno, ili gotovo uopće ne metilira. Aktivna demetilacija je enzimatski uzrokovana transformacija 5-

metilcitozina u citozin, 5-hidroksimetilcitozin, 5-formilcitozin i 5-karboksilcitozin čije uloge u epigenetici još nisu objašnjene (6).

2.5. Modifikacije histona

Histoni su najčešći nuklearni proteini koji grade nukleosome. Razlikujemo pet glavnih tipova histonskih proteina – H1, H2A, H2B, H3 i H4. Histonski proteini su pozitivno nabijene molekule koje reagiraju sa negativno nabijenim fosfatnim skupinama molekule DNA. Nukleosom čini osam histonskih proteina, i to po dvije molekle svakog histonskog proteina H2A, H2B, H3 i H4. Oktamerna jedinica je dva puta omotana dijelom molekule DNA duljine 147 parova baza, a na mjestu gdje lanac DNA dolazi na nukleosom, odnosno odlazi s nukleosoma vezan je jedan H1 protein. Duljina spojne regije (*eng.* linker DNA) između dva nukleosoma nije uvijek jednaka, a najčešće je to 10-90 parova baza (14). Kao što je već spomenuto, modifikacije histonskih dijelova reguliraju kromatinsku kondenzaciju, a time i njegovu funkciju. Kombinacija specifičnih histonskih modifikacija tvori tzv. histonski kod. Za razliku od lanca DNA koji se može modificirati samo metilacijom, histoni se mogu modificirati na više različitih načina – metilacija, acetilacija, fosforilacija, biotinilacija, ubikvitinacija, ADP-ribolizacija itd. Histoni se modificiraju na području tzv. histonskih repova koji sadrže 15 – 38 aminokiselinskih ostataka, a najčešće se modificira lizin koji se metilira ili acetilira, te arginin koji se samo metilira (8).

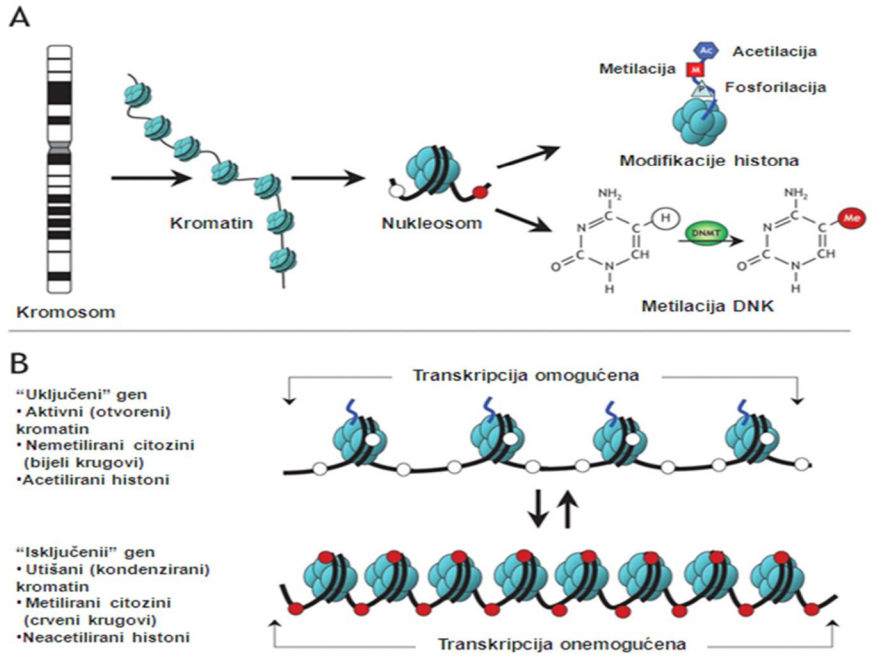
2.5.1. Acetilacija histona

Acetilacija histona je najbolje proučena histonska modifikacija pri čemu dolazi do reverzibilne acetilacije aminokiselina koje se nalaze na N-terminalnim krajevima histona. Procesi acetilacije i deacetilacije regulirani su enzimima histonske acetil-transferaze (HAT), odnosno histonske-deacetilaze (HDAC). Nakon acetilacije pozitivo nabijeni lizin postaje neutralan te se narušava veza između histona i molekule DNA. Tada kondenzirani heterokromatin prelazi u nenkondenzirani aktivni eukromatin, te TATA sekvenca (*eng.* TATA box, dio promotora na koji se vežu transkripcijski faktori) postaje dostupna transkripcijskim faktorima i transkripcija je omogućena (Slika 6). Lizin na histonu može primiti samo jednu acetilnu skupinu. Brojna istraživanja su pokazala da biološki aktivne komponente hrane kao što su polifenoli mogu djelovati aktivirajuće ili inhibirajuće na enzime acetilacije. Tako će npr. sulforafan i izotiocijanat iz brokule kao i sumporne komponente iz kupusa djelovati inhibirajuće na enzim HDAC. *In vitro* istraživanja na kulturi stanica pokazala su da bioaktivne komponente kao inhibitori HDAC priječe rast i napredak kancerogenih stanica. Također, acetilacija histona je visokopovezana s upalnim procesima.

HDAC regulira aktivnost proinflamatornih gena kao što su geni koji kodiraju interleukine i ciklooksigenaze (COX), stoga će odgovor na upalne procese u organizmu ovisiti o aktivnosti HDAC. Druga istraživanja su pokazala kako nedavno otkriveni polifenol iz koštica crnog grožđa reservatrol ima protuupalno djelovane kod kolitisa tako što inhibira COX-2, te da ima i pozitivan učinak na rak debelog crijeva (8).

2.5.2. Metilacija histona

Pri metilaciji histona dolazi do kovalentnog vezanja metilnih skupina na aminokiselinske ostatke lizina i arginina, što može imati i aktivirajuće i inaktivirajuće djelovanje na kromatin (Slika 6). Za razliku od acetilacije, u metilaciji lizin može biti metiliran s tri metilne skupine. Donor metilne skupine je S-adenozilmetionin, a reakcija je katalizirana histonskim metiltransferazama koje inhibira S-adenozilhomocistein. Utjecaj metilacije histona na aktivnost gena je relativno slabo istražen, ali smatra se da pozitivno utječe na utišavanje onkogena. Neke studije na životinjama su pokazale vrlo zanimljive rezultate utjecaja prehrane na metilaciju histona. Na primjer, kod kancerogenih stanja primjenom vanjskog SAM-a u svrhu inaktivacije onkogena, egzogeni SAM se spontano prevodi u metiltioadenozin i SAH, koji su inhibitori histonske metilacije. Također, u organizmu postoje enzimi S-adenozilhomocistein-hidrolaze koji reverzibilno hidrolizira SAH u homocistein i adenozin, što potencijalno može biti meta djelovanja na epigenetske poremećaje. Jedno od najinteresantnijih, možda i najznačajnijih istraživanja je poveznica stanja metilacije histona i pretilosti, što je predmet daljnjih istraživanja (8).



Slika 6: Utjecaj kromatinskih modifikacija na aktivnost gena

2.6. Druge kromatinske promjene

Druge kromatinske promjene obuhvaćaju represijski polikomb-kompleks (*eng*. polycomb repressive complex, PRC) te mikroRNA (miRNA). Ovaj oblik modifiacije kromatina je zbog jakog inaktivirajućeg djelovanja izrazito bitno otkriće za regulaciju aktivnosti onkogena (8).

Represijski polikomb-kompleks je multimerni proteinski kompleks koji mijenja kromatin na području histona i na taj način utišava aktivnost gena. Razlikujemo dvije vrste ovog kompleksa – PRC1 i PRC2, a izrazito su važni u vrijeme diferencijacije stanica tijekom embrionalnog razvoja. PRC2 ima metiltransferaznu aktivnost te trimetilacijom histonske H2A podjedinice utišava gensku aktivnost (8). PRC1 ubikvitinira istu histonsku podjedinicu i tako stabilizira utišani gen. Na ovaj način PRC imaju ključnu ulogu u regulaciji genomskog programiranja i diferencijacije, a nedavna istraživanja su pokazala da polifenoli zelenog čaja smanjuju vjerojatnost obolijevanja od raka kože tako što pospješuju djelovanje PRC-a na utišavanje onkogena (15).

miRNA je mala, endogena i nekodirajuća molekula RNA duljine do 26 nukleotida koja regulira ekspresiju gena represijom translacije čime predstavlja novu skupinu regulatornih molekula. Ljudski organizam djelovanjem enzima RNA-polimeraze 2 još od začeća stvara oko tisuću različitih vrsta moekula miRNA (16). Temelj ovakve regulacije je posttranskripcijsko utišavanje djelovanjem malih siRNA (*eng*. Small interfering RNA) kao što je microRNA na molekule mRNA prilikom čega ih miRNA u kombinaciji s RISC kompleksom (*eng.* RNA-induced silencing complex) cijepa i tako inaktivira njihovu aktivnost (12).

miRNA ima vrlo važnu ulogu u kontroli metilacije DNA i modifikacije histona, jer čini visokokontrolirani mehanizam povratne sprege, ali zanimljivo je i to da metilacija DNA i acetilacija histona mogu regulirati ekspresiju miRNA. Određena istraživanja na životinjama su pokazala da prehrana sa smanjenim unosom donora metilnih skupina rezultira promjenom u ekspresiji miRNA što rezultira kancerogenim stanjima, najčešće tumorom jetre. Slično, nedostatak folata u prehrani je rezultirao općim povećanjem ekspresije miRNA u humanim limfoblastima, što kao posljedicu nema pojavu patogenih stanja, ali je dobar biomarker nutritivnog statusa organizma, što je potencijalno primjenjivo u medicini.

Određeni bioaktivni spojevi preko miRNA mogu djelovati kao represori kancerogenih stanja, pa će tako genistein djelovati represivno na melanom i limfotičnu leukemiju, kurkumin

na tumor gušterače i limfom B – limfocita, a pokazao je i inducirajuće djelovanje na apoptozu stanica tumora dojke (8).

2.7. Prehrana i epigenom

Sve do nedavno epigenetska istraživanja bazirana na utjecaju prehrane i određenih nutrijenata na kromatinske promjene, posebice metilaciju DNA, temeljila su se na proučavanju malih regija s ograničenom količinom genoma podložnog metilaciji. Usto, taj genom je najčešće bio životinjskog podrijetla, a rezultati se sa sigurnošću nisu mogli primijeniti na ljude.

Napredovanje u tehnologiji epigenetskog istraživanja dovelo je do mogućnosti identifikacije epigenetskog statusa točno određenog lokusa. Na taj način kojeg još nazivamo i konstelacijskom identifikacijom, omogućeno je određivanje epigenetskog učinka određenih nutrijenata na točno one gene koje želimo promotriti. To je također dovelo i do većeg korištenja kultura humanih stanica u istraživanju, pa takva istraživanja daju relevantnije rezultate. U širem pogledu, takav se način određivanja epigenoma može koristiti kao svojevrsni epigenetski biomarker rizika za pojavu određenih bolesti, što bi uvelike doprinijelo medicini u vidu određivanja profilakse. Na taj način pacijente s povećanim rizikom nastanka neke bolesti bi se moglo adekvatno savjetovati o daljnjim životnim navikama, prehrani, dodacima prehrani itd. što bi znatno olakšalo liječenje (6).

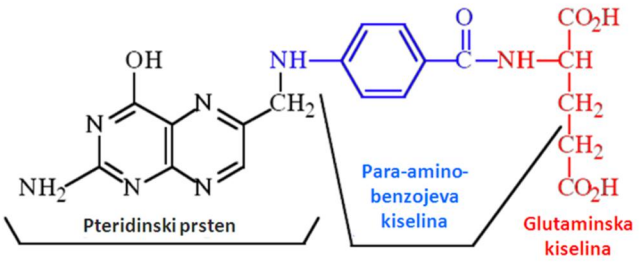
Nutrijenti su spojevi koje prehranom unosimo iz okoline, a esencijalni su za funkcioniranje cjelokupnog organizma. Bilo u svrhu dobivanja energije, sintezu metabolički važnih molekula ili novih gradivnih komponenti, unos nutrijenata je izrazito bitan. U njih ubrajamo ugljikohidrate, masti,, proteine (ili njihove građevne jedinice aminokiseline), minerale, vitamine, vodu i kisik (17).

2.7.1. Utjecaj nutrijenata na metilaciju DNA

U metilaciji DNA najvažniji nutrijenti su već spomenuti vitamini B skupine folna kiselina, vitamin B_6 i B_{12}, kao i spojevi kao što su betain, homocistein i metionin koji sudjeluju u ciklusu transmetilacije.

Najbolje istražena i najvažnija među njima je **folna kiselina** poznata kao vitamin B_9, B_C, vitamin M, folacin te pteroilmonoglutaminska kiselina. Pterimonoglutaminska kiselina se još naziva i roditeljska molekula folata, a sastoji se od tri komponente (Slika 7): 2-amino-4-hidroksipteridinske jezgre, p-amino-benzojeve kiseline (PABA) i L-(+)-glutaminske kiseline. Pteridinski prsten u jezgri je metilenskim mostom povezan s PABA-om, koja je s druge strane amidnom vezom povezana s glutaminskom kiselinom. Međutim, ovaj oblik nije uobičajeni

kakvog nalazimo u prirodi, te nije metabolički aktivan. Biološki aktivni oblici su reducirani metaboliti – tetrahidrofolati koji u organizmu djeluju kao koenzimi za prijenos C_1 jedinica (uglavnom je to metilna skupina koju THF donosi u ciklus transmetilacije, a osim metilne mogu prenositi formilne i metilenske skupine potrebne za normalnu sintezu i popravak DNA, kao i sintezu RNA). Svi spojevi folata uglavnom su poliglutamati i obično sadrže pet do sedam jedinica glutamata vezanih gama – peptidnom vezom (18).



Slika 7: Struktura pteroilmonoglutaminske kiseline

Najveći dio folata unosimo hranom vezane na niz aminokiselina, uglavnom glutamata, koji tvore poliglutamate. Budući da crijeva mogu apsorbirati folat samo u obliku monoglutamata, u četkastoj prevlaci sluznice jejunuma se pod utjecajem folat-reduktaze poliglutamati razgrađuju u monoglutamate i kao takvi se apsorbiraju. Hranom u manjoj mjeri unosimo i folnu kiselinu koja se iako nije biološki aktivna apsorbira dvostruko bolje od folata. Kao što je već rečeno, folat/folna kiselina koju unesemo hranom nije biološki aktivna te se u organizmu mora pretvoriti u aktivni oblik. Pretvorba se odvija u jetri tako što se monoglutamat ili sama folna kiselina uz enzim dihidrofolat-sintazu pretvori u dihidrofolat, koji se potom uz djelovanje enzima dihidrofolat-reduktaze pretvara u tetrahidrofolat. Zatim se uz posredstvo serin-hidroksimetiltransferaze THF pretvara u 5,10-metil THF što predstavlja biološki aktivni oblik folata (19).

Ulaskom u krvotok folati slobodno cirkuliraju u krvi ili se vežu na proteine seruma i kao takvi se prenose. Najveći postotak vezan je za proteine seruma koji imaju niski afinitet za vezanje folata, posebice za albumine, i u takvom obliku se nalazi gotovo 50% ukupno vezanih folata. Uz njih, u krvi imamo i proteine s visokim afinitetom vezanja koji vežu manje od 5% folata. Fiziološka uloga spomenutih proteina još nije sasvim razjašnjena, ali smatra se da imaju važnu ulogu u kontroliranju distribucije i ekskrecije folata u vrijeme njegove deficijencije u organizmu.

Folat iz krvi ulazi u stanice posredstvom dva membranska transportna sustava: reduciranim proteinskim nosačem folata i membranskim receptorom folata. U stanici se nalazi

u neaktivnom obliku, a za aktivaciju je potreban vitamin B_{12} koji cijepa i veže metilnu skupinu pri čemu se sam aktivira. Na taj način i folat i vitamin B_{12} postaju dostupni za metaboličke procese u stanici.

Folati se prvenstveno skladište u hepatocitima, a potom i u drugim tjelesnim stanicama u obliku poliglutamata. U stanjima suviška, folat se iz jetre luči u žučni mjehur odakle se urinom i stolicom izlučuje iz organizma (18). Preporučeni i maksimalni dnevni unos folne kiseline navedeni su u Tablici 1 (20).

Tablica 1: Preporučeni i maksimalni* dnevni unos folne kiseline

Dob	µg/dan
0 – 6 mj	65(-**)
7 – 12 mj	80(-**)
1 – 3 god	150 (300)
4 – 8 god	200 (400)
9 – 13 god	300 (600)
14 – 18 god	400 (800)
>19 god	400 (1000)
Trudnice	600
Dojilje	500

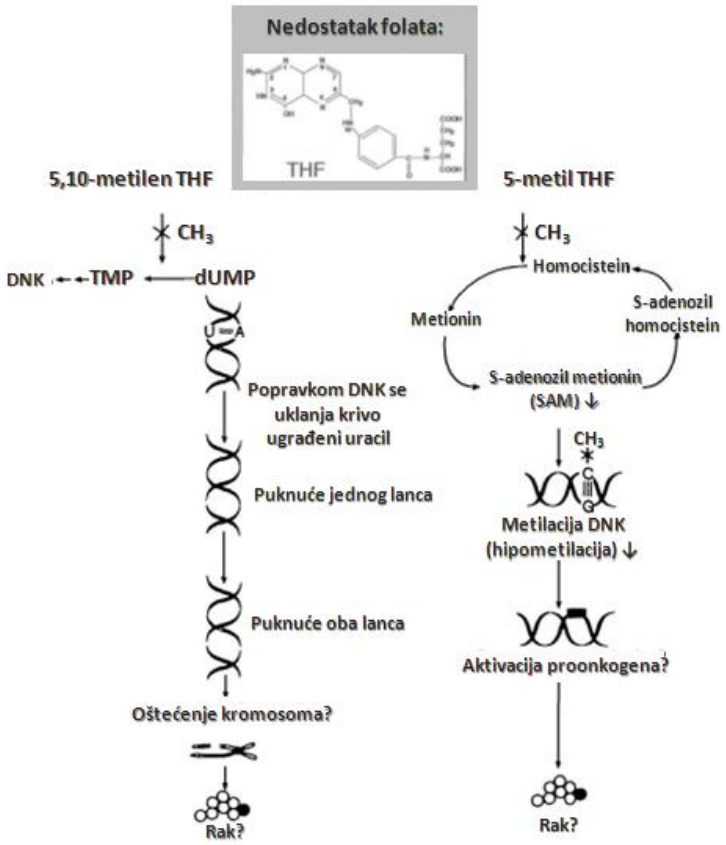
*Maksimalni dnevni unos upisan je u zagradama
**Maksimalni dnevni unos za dojenčad nije poznat

Nedostatak folata može biti uzrokovan raznim faktorima – kroničnim alkoholizmom, smanjenim unosom, gastrointestinalnim poremećajima (Chronova bolest, celijakija...), primjenom oralnih kontraceptiva i lijekova koji smanjuju apsorpciju ili djeluju kao inhibitori enzima koji sudjeluju u metabolizmu folata, genetskim poremećajima koji uzrokuju deficite u mehanizmu apsorpcije te nedostatak ili nepravilan rad spomenutih enzima koji sudjeluju u metabolizmu folata. Manifestira kliničkim simptomima na tkivima građenima od stanica kratkog životnog vijeka – eritrociti, enterociti, epidermalne stanice... (18).

Brojna istraživanja na životinjama su ukazala, a kasnija istraživanja na ljudima i potvrdila povezanost između zastupljenosti donora metilne skupine u prehrani i raznih stanja uzrokovanih poremećenim statusom metilacije i poremećajima u popravnku DNA (Slika 8).

5,10-metilTHF je kao donor metilne skupine esencijalan u sintezi pirimidinske baze timina na način da donira metilnu skupinu enzimu timidilat-sintazi koji katalizira prijelaz deoksiuridil monofosfata (dUMP) u timidin monofosfat (TMP) koji se kao timin ugrađuje u

DNA. Pri deficitu folata u organizmu ne će doći do prijelaza dUMP u TMP, što kao rezultat može imati ugrađivanje dUMP na mjesto timina u DNA molekuli. S obzirom da DNA-polimeraza ne može prepoznati dUMP, nizom mehanizama dolazi do izrezivanja baze što kao rezultat stvara pukotinu u lancu molekule DNA koju u normalnim uvjetima popravlja enzim ligaza. Ukoliko postoji kontinuirano ugrađivanje dUMP u DNA, tada bez obzira na djelovanje ligaze lanac DNA puca što destabilizira DNA i posljedično tome dovodi do kromosomskih odstupanja, malignih promjena i u nekim slučajevima do brisanja gena (21).



Slika 8: Nedostatak folata i nestabilnost DNA

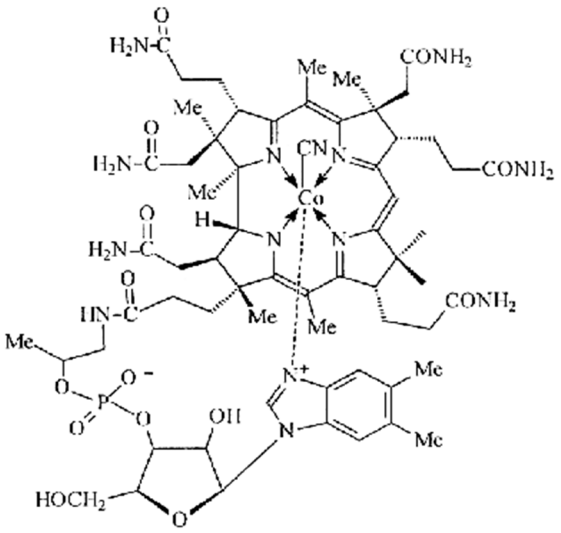
U vidu metilacije DNA, manjak folata uzrokuje manjak 5-metil THF u ciklusu transmetilacije što kao posljedicu ima i manjak SAM-a, a rezultat toga smanjen stupanj metilacije DNA. Ukoliko takvo stanje potraje dolazi do hipometilacije CpG otoka gena kao što je p53 tumor supresorski gen, ali i gena koji kodiraju biološki važnije proteine (6). Takva stanja mogu rezultirati kancerogenim stanjima i drugim poremećajima u organizmu kao što su anemije, mentalna retardacija te nezarastanje neuralne cijevi novorođenčeta, a može se manifestirati i gingivitisom, paradontitisom, seboroičnim dermatitisom, vitiligom, kao i mnoštvom problema živčanog sustava kao što su mentalni umor, demencija, depresija, razdražljivost, zbunjenost, nesanica itd. Budući da su potrebe organizma za folatima velike, a

zalihe male, nedostaci će se manifestirati već nakon 1-6 mjeseci nakon prestanka uzimanja folata (18).

Primarni i najčešći oblik deficita manifestira se megaloblastičnom anemijom. Zbog nedostatka THF-a u eritrocitima dolazi do pogreške u sintezi DNA, a time i do nejednakog sazrijevanja eritrocita pri čemu se citoplazma razvija brže od jezgre, što rezultira povećanim volumenom eritrocita u odnosu na količinu hemoglobina. Takvi eritrociti imaju smanjenu sposobnost prijenosa kisika do perifernih tkiva pa dolazi do hipoksije tkiva, smanjene mentalne i fizičke sposobnosti, vrtoglavice, mučnine, blijedila itd. Ovaj oblik anemije može nastati zbog smanjenog unosa bilo kojeg donora metilne skupine, pa se liječi povećanim unosom onog nutrijenta koji je u deficitu. Kao što je već spomenuto, jako je važna metilacija DNA u ranom embrionalnom razvoju. S obzirom da esencijalnu ulogu u ciklusu transmetilacije ima THF, deficijencija folata i poremećaji u sintezi i popravku DNA u tom razdoblju kao posljedicu imaju nepravilno zatvaranje neuralne cijevi fetusa, a to uzrokuje paralizu i u težim slučajevima i mentalnu retardaciju djeteta. Do zatvaranja neuralne cijevi dolazi 28. dana embrionalnog razvoja i da bi se izbjeglo nepravilno zatvaranje bitno je osigurati dovoljne količine folata. Budući da su potrebe za folatima u tom periodu povećane i ne mogu se zadovoljiti uobičajenom prehranom, preporučljivo ih je unositi suplementima za vrijeme trudnoće, ali i prije samog začeća (18). Istraživanja koja su pratila povezanost uzimanja suplemenata folne kiseline prije i za vrijeme same trudnoće kao i tijekom dojenja su pokazala razlike u statusu metilacije djece ovisno o tome jesu li njihove majke koristile folnu kiselinu u tom preiodu. Tako su proučavanjem metilacije imprintanih gena kao što je *Igf2* (*eng.* Insulin-like growth factor 2 gene) u krvi pupkovine primijetili hipometilaciju tog gena kod djece čije majke nisu unosile dovoljnu količinu folne kiseline na dan. Poremećaji u metilaciji tog gena kasnije su rezultirali češćim poremećajima u ranom razvoju, poremećajima u radu bubrega i jetre, ali i povećanim rizikom za nastanak raka u odrasloj dobi. Niska razina serumskog folata i nizak status metilacije gena koji djeluju supresorski ili poticajno na razvoj tumora su direktno povezani s tumorima dojke i pluća, što je posebice izraženo kod pušaća (6).

Vitamin B_{12} poznat i kao cijanokobalamin, metilkobalamin i adenozinkobalamin je molekula s najvećom poznatom strukturom među vitaminima. Jezgru vitamina čini korinska jezgra koja se sastoji od četiri međusobno povezana pirolna prstena u čijem se središtu nalazi kobalt. Osim s atomima dušika iz korinskog prstena, kobalt se može koordinacijski vezati i s drugim dijelovima molekule. Posebnom koordinacijskom vezom se na kobalt veže skupina

koja određuje vrstu spoja. Ukoliko je vezana metilna skupina govorimo o metilkobalaminu, 5-deoksiadenozin na tom mjestu čini adenozilkobalamin, dok je za cijanokobalamin karakteristična cijanidna skupina (Slika 9) (22).



Slika 9: Struktura cijankobalamina

Vitamin B_{12} u organizam unosimo u obliku cijanokobalamina. Najveći dio ovog vitamina unosimo vezanog za proteine životinjskog porijekla iz kojih se da bi se apsorbirao mora prvo osloboditi. To se odvija u želucu prilikom razgradnje proteina pod utjecajem klorovodične kiseline i pepsina, nakon čega se veže za jedan od tri vitamin B_{12}-vezujuća proteina koje nazivamo heptokorinima. U tom obliku odlazi u dvanaesnik gdje se pod utjecajem enzima gušterače heptokorini razgrade, a B_{12} odlazi u ileum gdje se apsorbira. U sluznici distalnog dijela ileuma receptori prepoznaju B_{12} vitamin koji ulazi u enterocite vezan za haptokorin (70-80%) ili transkobalamin (holotranskobalamin, aktivni-B_{12}) te odlazi u krvotok.

U stanicama se aktivira primajući metilnu skupinu u ciklusu transmetilacije gdje djeluje kao kofaktor prilikom demetilacije homocisteina u metionin, odnosno metilTHF u THF. Aktivni oblik vitamina B_{12} sudjeluje u metabolizmu masti i aminokiselina tako da djeluje kao kofaktor u pretvorbi L-metilmalonil-CoA nastalog iz propionil-CoA u sukcinil-CoA koji potom odlazi u ciklus limunske kiseline.

Nedostatak ovog vitamina dovode do poremećaja u sintezi i metilaciji DNA te metabolizmu masnih i aminokiselina. Do nedostatka može doći zbog raznih faktora kao što su smanjeni unos ili poremećaji u apsorpciji koji najčešće nastaju zbog manjka klorovodične

kiseline ili enzima gušterače, te kao posljedica fizičkih oštećenja sluznice koji onemogućuju apsorpciju. Snižena serumska koncentracija vitamina B_{12} može rezultirati poremećajima koji mogu biti posljedica nepravilnosti na razini DNA ili povišenjem razine homocisteina i metabolita koji nastaju prilikom razgradnje masnih kiselina i aminokiselina. Najčešći simptom nedostatka vitamina B_{12} je megaloblastična perniciozna anemija sa simptomima sličnim anemiji uzrokovanoj zbog nedostatka folne kiseline. Iako mehanizam u potpunosti nije poznat, nedostatak B_{12} uzrokuje promjene živčanog sustava uključujući oštećenja mijelinske ovojnice mozga, leđne moždine i perifernih živaca, što se manifestira utrnulošću udova, gubitkom pamćenja, dezorijentiranošću te mogućim promjenama raspoloženja. Iako nije u potpunosti dokazano, moguć je razvitak i gastrointestinalnih tegoba kao što su oteknuće jezika, gubitak apetita i konstipacija (24). Kao i kod folne kiseline potrebe u trudnoći i prilikom dojenja su povećane zbog mogućnosti nepotpunog razvijanja fetusa i novorođenog djeteta, a istraživanja su pokazala povezanost između razine serumskog B_{12} u krvi pupkovine prilikom rođenja i statusa metilacije djetetove DNA, što može rezultirati poremećajima u razvoju i izmijenjenu aktivnost onkogena i tumor supresorskih gena (6). Preporučeni dnevni unos vitamina B_{12} naveden je u Tablici 2 (24).

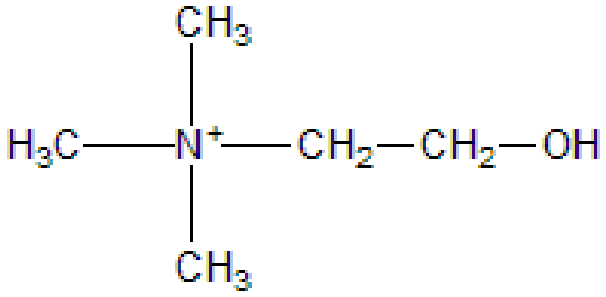
Tablica 2: Preporučeni dnevni unos vitamina B_{12}

Dob	µg/dan
0 – 6 mj	0,4
7 – 12 mj	0,5
1 – 3 god	0,9
4 – 8 god	1,2
9 – 13 god	1,8
14 – 18 god	2,4
19-50 god	2,4
Trudnice	2,6
Dojilje	2,8

Kolin ili N,N,N-trimetiletanolamonjev kation (Slika 10) je zasićeni kvarterni amin kojeg unatoč tome što nije vitamin nerijetko ubrajamo u vitamine B kompleksa. Zbog tri metilne skupine vezane na atom dušika u organizmu neposredno djeluje kao donor istih. Osim

u metilaciji DNA, kolin sudjeluje u nizu metaboličkih funkcija uključujući transport lipida i metionina kao i sintezu neurotransmitera.

U hrani je vrlo malo prisutan slobodan, i uglavnom se nalazi u obliku fosfatidilkolina (lecitin) i nešto manje sfingomijelina s kojeg se djelovanjem pankreasnih enzima oslobađa u crijevima. Zbog prisutnosti crijevnih bakterija koje ga metaboliziraju, u jejunumu i ileumu se apsorbira oko 30% unesenog slobodnog kolina ili kolina u obliku lecitina. Iz enterocita se vezan za kilomikrone lecitin izlučuje u limfu i kao takav odlazi u periferna tkiva gdje se uz enzim fosfolipazu C pretvara u slobodan oblik. U organizmu kolin najčešće nalazimo u obliku fosfatidilkolina i sfingomijelina, te manje u obliku lizofosfatidilkolina, fosfokolina, glicerofosfokolina te vrlo malo u slobodnom obliku.



Slika 10: Struktura kolina

Dio kolina se u matriksu mitohondrija jetre i bubrega uz pomoć FAD-ovisne kolin dehidrogenaze ireverzibilno oksidira u betain aldehid koji se potom u matriksu ili citosolu uz NAD-ovisnu betain aldehid dehidrogenazu pretvara u betain. Preko betaina kolin zapravo djeluje kao donor metilnih skupina u ciklusu transmetilacije. Vrlo mali dio kolina se acetilira koenzimom A čime nastaje neuroprijenosnik acetilkolin (26).

Pošto sudjeluje u nizu metaboličkih putova, deficit kolina može uzrokovati brojne posljedice. S obzirom da je fosfatidilkolin potreban u sintezi VLDL-čestica koje prenose triacilglicerole i kolesterol iz jetre u periferna tkiva, nedostatak kolina se primarno manifestira nakupljanjem masti u jetri, što je poznato i kao tzv. nealkoholna bolest masne jetre (*eng.* nonalcoholic fatty liver disease – NAFLD) koja se povlači ponovnim adekvatnim unosom kolina ili fosfatidilkolina. Nealkoholna bolest jetre za sobom nerijetko povlači i druge metaboličke poremećaje uključujući pretilost, hipertenziju, dislipidemiju i inzulinsku rezistenciju, a nefunkcionalna jetra uzrokuje poremećaje u metabolizmu drugih nutrijenata. Neliječena nealkoholna masna jetra progresira u nealkoholni steatohepatitis, a potom u cirozu ili rak (27).

Rezultati istraživanja koja su proučavala utjecaj količine kolina i betaina u prehrani prilikom trudnoće na stupanj metilacije DNA djeteta su pokazala pozitivnu korelaciju između te dvije stavke. Smanjenim unosom tih nutrijenata tijekom embrionalnog razvoja se mijenja obrazac metilacije i time se može utjecati na razvoj mozga fetusa (8). Preporučeni i maksimalni dnevni unos kolina naveden je u Tablici 3 (27).

Tablica 3: Preporučeni i maksimalni* unos kolina

Dob	mg/dan
0 – 6 mj	125 (-**)
7 – 12 mj	150(-**)
1 – 3 god	200 (1000)
4 – 8 god	250 (2000)
9 – 13 god	375 (3000)
14 – 18 god	Muškarci: 550 (3500), Žene: 400 (3500)
>19 god	Muškarci: 550 (3500), Žene: 425 (3500)
Trudnice	450
Dojilje	550

*Maksimalni dnevni unos upisan je u zagradama
** Maksimalni dnevni unos za dojenčad nije poznat

2.7.2. Utjecaj biološki aktivnih spojeva na metilaciju DNA

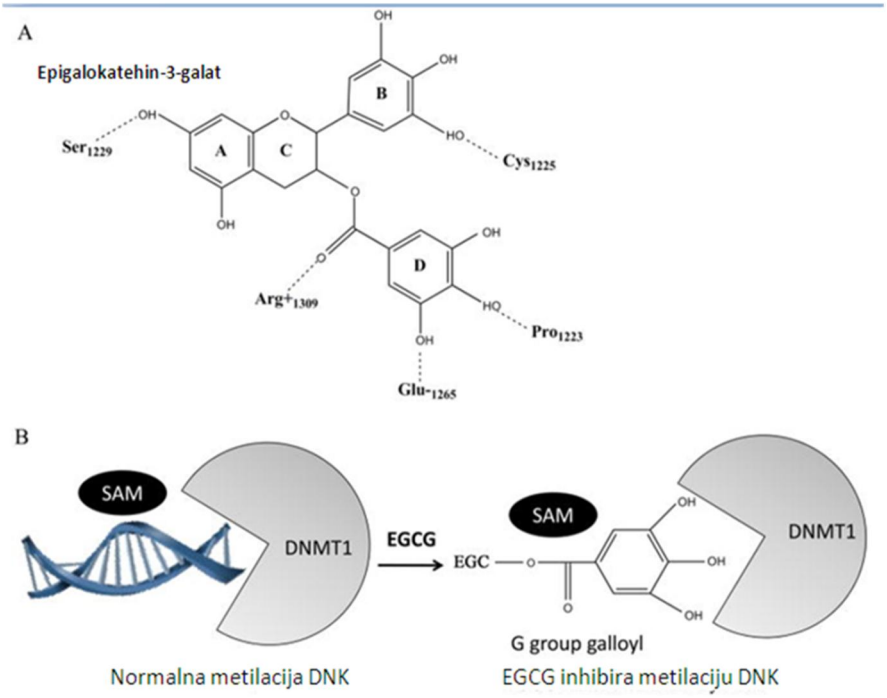
Biološki aktivni spojevi poput polifenola i izotiocijanata su prirodni spojevi koji mogu različito djelovati na tkivo. Nalazimo ih u hrani biljnog porijekla, posebice u svježem voću i povrću. U ovom pogledu najznačajniji spojevi su već spomenute skupine spojeva koji djelujući na razini DNA mogu prevenirati aktivaciju onkogena ili potaknuti proizvodnju tumor supresorskih proteina (8).

Polifenoli su raznolika skupina kemijskih spojeva koje na temelju njihove strukture možemo svrstati u nekoliko grupa kao što su fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni, lignani i drugi koji se potom dijele u manje skupine. Zajednički prekursor u sintezi svih polifenola je aminokiselina fenilalanin.

Već dugo vremena poznato je da zeleni čaj ima blagotvoran učinak na ljudsko zdravlje. Fenolne komponente kojim obiluje su mahom katehini od kojih su najznačajniji epikatehin (EC), epikatehin-3-galat (ECG), epigalokatehin (EGC) i epigalokatehin-3-galat (EGCG). Mnogim istraživanjima posljednjih godina uočeno je antikancerogeno i kemopreventivno djelovanje, kao i pozitivna korelacija između konzumiranja zelenog čaja i niže učestalosti karcinoma želuca, jednjaka, dojke, jajnika, gušterače, debelog crijeva i kože. Vjeruje se da je EGCG, kao najzastupljeniji sastojak, ključan u djelovanju zelenog čaja, a mogući mehanizmi antitumorskog djelovanja uključuju inhibiciju staničnog oksidativnog stresa, smanjenje proliferacije stanica raka, inhibiciju angiogeneze i regulaciju prijenosa signala, a odnedavno se spominje i modulacija metilacije genoma direktnom interakcjom s Dnmt (Slika 11). Istraživanja pokazuju da EGCG inhibira djelovanje Dnmt što dovodi do demetilacije i reaktivacije utišanih gena poput tumor supresor $p16^{INK4a}$ gena (*eng.* tumor suppressor $p16^{INK4a}$) ili inaktivacije aktivnih gena poput humane telomerazne reverzne transkriptaze *hTERT* (*eng.* human telomerase reverse transcriptase). U tumorskim stanicama promotorske regije ovog gena su hipermetilirane te se hipometilacijom i utišavanjem telomerazne aktivnosti može inhibirati ekspresija onkogena.

Specifični flavonoidi u sojinim sjemenkama, poglavito genistein u nizu istraživanja su pokazali antikancerogeno djelovanje kod nekoliko tipova tumora uključujući karcinom prostate, jednjaka i debelog crijeva. Mogući mehanizmi djelovanja su prevencija mutacije DNA, smanjenje proliferacije tumorskih stanica, inhibicija angiogeneze, indukcija diferencijacije i modulacija epigenetskih promjena na DNA poput metilacije i/ili kromatinskih promjena. Inhibirajući djelovanje Dnmt genistein hipometilacijom reaktivira tumor supresorske gene poput $p16^{INK4a}$. Ipak, genistein posjeduje svojstva nalik estrogenu što se može suprotstaviti njegovim antitumorskim svojstvima kod žena s visokim rizikom za razvoj raka dojke, i pacijentica s tumorima osjetljivima na estrogen. U usporedbi s EGCG, genistein ima slabije inhibirajuće djelovanje na Dnmt s izraženijom demetilacijom i posljedičnom reaktivacijom utišanih gena, dok EGCG djeluje i aktivirajuću utišane i inhibirajući aktivne gene.

Proučavanjem drugih polifenola kao što su kvercetin, hesperetin, naringenin, apigenin, kurkumin itd. u usporedbi s genisteinom i EGCG uočeno je slabije inhibitorsko djelovanje na Dnmt zbog slabog vezanja polifenola na katalitički centar Dnmt, ali i moguće jako posredno inhibirajuće djelovanje preko međuprodukata ciklusa transmetilacije (28).



Slika 11: Molekularni mehanizam inhibicije DNA-metiltransferaze polifenolom epigalokatehin-3-galatom, SAM: S-adenozilmetionin, EGCG: Epigalokatehin-3-galat, DNMT: DNA-metiltransferaza

3. Zaključak:

Epigenetske modifikacije molekule DNA su esencijalne za ljudski organizam, a temelje se na promjeni ekspresije gena bez utjecaja na strukturu ishodišne DNA. Te promjene uključuju metilaciju DNA, histonske modifikacije i druge kromatinske promjene kao temeljne procese koji dovode do značajnih promjena u genskoj ekspresiji. Obrazac po kojem se epigenom mijenja je dijelom nasljedan, a dijelom se samostalno formira tijekom embrionalnog razvoja i života pojedinca. Promjene u tom obrascu nastaju pod utjecajem okolišnih čimbenika i dovode do poremećene aktivnosti gena i genske ekspresije. To može rezultirati širokim spektrom promjena – od bezazlenih promjena fenotipa, do onih u vidu razvoja malignih stanica. Poznato je blagotvorno, ali i štetno djelovanje sasatojaka hrane koju svakodnevno unosimo prehranom. Iako je vrlo teško precizno odrediti utjecaj određenog nutrijenta ili bioaktivne komponente na svaku epigenetsku promjenu, istraživanja su pokazala kako neki od njih imaju opći blagotvorni utjecaj na epigenom. Zbog sudjelovanja u ciklusu transmetilacije, posebno su istaknuti folna kiselina, vitamin B_{12} i kolin, ali i polifenoli zelenog čaja i soje koji utječući na epigenetske promjene imaju blagotvoran učinak. S obzirom da je epigenetika relativno mlada znanost, a obuhvaća proučavanje širokog spektra promjena i noviteta, možemo zaključiti da je otvoreno novo područje genetike koje će rezultirati zanimljivim i korisnim saznanjima koja će značajno utjecati na kvalitetu života.

4. Popis literature

1. Wikipedia, DNA, https://en.wikipedia.org/wiki/DNA (pristupljeno 11.7.2016.)
2. Lodish H. i drugi: *Molecular cell biology*, 6. izd, W. H. Freeman and Company, New , New York, 2008, str. 11-12
3. Lodish H. i drugi: *Molecular cell biology*, 6. izd, W. H. Freeman and Company, New , New York, 2008, str. 112
4. Lodish H. i drugi: *Molecular cell biology*, 6. izd, W. H. Freeman and Company, New , New York, 2008, str. 217
5. NCBI, From DNA to RNA, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26887/ (pristupljeno 11.7.2016.)
6. O. S. Anderson, K. E. Sant, D. C. Dolinoy, Nutrition and epigenetic: An interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism, and DNA methylation. *J Nutr Biochem* (2013)
7. Wikipedia, Cpg site, https://en.wikipedia.org/wiki/CpG_site (pristupljeno 11.7.2016.)
8. Choi S.W, Friso S., Advances in Nutrition An International Review Journal: Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Helath, http://advances.nutrition.org/content/1/1/8.full (pristupljeno 15. Veljače 2016)
9. Lodish H. i drugi: *Molecular cell biology*, 6. izd, W. H. Freeman and Company, New , New York, 2008, str. 958
10. Pavlica M., Mrežni udžbenik iz genetike, http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl9.html (24.6.2016)
11. Sheffild N., Computational biology, What is hemimethylated DNA? http://nathansheffield.com/wordpress/what-is-hemimethylated-dna/ (pristupljeno 26.5.2016.)
12. Puizina J, Epigenetika, http://neuron.mefst.hr/docs/katedre/imunologija/2015-16/Farmacija/Molekularna%20biologija%20s%20genetikom/F_2015_Epigenetika.pdf (pristupljeno 26.5.2016.)
13. Stryer L.: *Biochemistry*, 2. izd, W. H. Freeman and Company, San Francisco 1891, str. 432-433
14. Lodish H. i drugi: *Molecular cell biology*, 6. izd, W. H. Freeman and Company, New , New York, 2008, str. 249-250
15. Wikipedia, PRC2, https://en.wikipedia.org/wiki/PRC2 (pristupljeno 26.5.2016.)

16. Lodish H. i drugi: *Molecular cell biology*, 6. izd, W. H. Freeman and Company, New , New York, 2008, str. 347-348
17. Wikipedia, Nutrijent, https://hr.wikipedia.org/wiki/Nutrijent (pristupljeno 11.7.2016.)
18. Ježina F., inPharma, Folna kiselina (Acidum folicum), http://www.inpharma.hr/index.php?mact=News,cntnt01,detail,0&cntnt01articleid=341&cntnt01returnid=21 (pristupljeno 19.3.2016.)
19. Milrnan N., NCBI, Intestinal absorption of folic acid – new physiologic & molecular aspects. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3573592/ (pristupljeno 25.5.2016.)
20. Linus Pauling Institute Micronutrient Information Center, Higdon J., Folate, http://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/folate (pristupljeno 15.6.2016.)
21. Duthie S. J., Oxford journals, Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability, http://bmb.oxfordjouRNAls.org/content/55/3/578.full.pdf (pristupljeno 12.6.2016.)
22. Structural details for vitamin B_{12}, http://www.chm.bris.ac.uk/motm/vitaminb12/structure.html (pristupljeno 13.6.2016.)
23. Axis-Shield Diagnostics Ltd., Active B_{12}, Vitamin B_{12} absorption, http://www.active-b12.com/vitamin-b12-absorption/ (pristupljeno 13.6.2016.)
24. Linus Pauling Institute Micronutrient Information Center, Higdon J.: Vitamin B_{12}, http://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/vitamin-B12 (pristupljeno 13.6.2016.)
25. Wikipedia, Choline, https://en.wikipedia.org/wiki/Choline (pristupljeno 16.6.2016.)
26. Internetska nutricionistička enciklopedija, Definicija hrane, Kolin, ,http://definicijahrane.hr/definicija/hranjive-tvari/bioloski-aktivne-tvari/kolin/ (pristupljeno 13.6.2016.)
27. Linus Pauling Institute Micronutrient Information Center, Higdon J.: Choline, http://lpi.oregonstate.edu/mic/other-nutrients/choline (pristupljeno 13.6.2016.)
28. Li Y., Tollefsbol T.O., NCBI, Impact on DNA methylation in cancer prevent and therapy by bioactive dietary components, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2904405/ (Posjećeno 14.6.2016.

4.1. Izvori slika:

1. Slika 1:
   http://www.supporting-cdkl5.co.uk/the-genetics-of-cdkl5.php (pristupljeno 26.5.2016)
2. Slika 2:
   http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl15.html (pristupljeno 26.5.2016)
3. Slika 3:
   http://missinglink.ucsf.edu/lm/genes_and_genomes/methylation.html (pristupljeno 14.6.2016)
4. Slika 4:
   http://www.nature.com/hdy/journal/v105/n1/fig_tab/hdy201054f2.html (pristupljeno 14.6.2016)
5. Slika 5:
   http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3405985/ (pristupljeno 26.5.2016)
6. Slika 6:
   https://voer.edu.vn/c/basic-principles-of-genetics/3ac58449/16798649 (pristupljeno 14.6.2016)
7. Slika 7:
   http://www.chm.bris.ac.uk/motm/folic-acid/folich.htm (pristupljeno 14.6.2016)
8. Slika 8:
   http://bmb.oxfordjouRNAls.org/content/55/3/578.full.pdf (pristupljeno 12.6.2016)
9. Slika 9:
   http://www.mineravita.com/vit/b12/b12_osobine.html (pristupljeno 15.6.2016)
10. Slika 10:
    http://www.wikiwand.com/fr/Cha%C3%AEne_carbon%C3%A9e (pristupljeno 15.6.2016)
11. Slika 11:
    http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2904405/ (pristupljeno 15.6.2016)