

Received: 13.01.2016
Accepted: 16.08.2017
Published: 29.11.2017

Modyfikacje epigenetyczne – ważny mechanizm w zaburzeniach cukrzycy

Epigenetic modifications: An important mechanism in diabetic disturbances

Anna Rorbach-Dolata, Adriana Kubis, Agnieszka Piwowar

Katedra i Zakład Toksykologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Streszczenie

W poszukiwaniu wyjaśnienia patomechanizmów cukrzycy, a zwłaszcza podłoża rozwoju jej powikłań naczyniowych (mikro- i makroangiopatii), mimo bieżącego, dobrego wyrównania cukrzycy, zwrócono uwagę na rolę dziedziczenia pozagenowego związanego z modyfikacjami epigenetycznymi białek histonowych i DNA w warunkach hiperglikemii. Wykazano istotną rolę metylacji DNA oraz modyfikacji epigenetycznych białek histonowych, o różnym charakterze i różnego stopnia, w pozagenowym przekazywaniu informacji o przetrwałych zmianach indukowanych hiperglikemią. Zwrócono uwagę na rolę metylacji DNA komórek trzustki w patogenezie cukrzycy typu 1, ale także typu 2. Wskazano zwłaszcza na istotną rolę zmian metylacji DNA w tzw. zespole ograniczonego wzrostu wewnątrzmacicznego płodu (IUGR) jako przyczynę późniejszego rozwoju cukrzycy. W patogenezie cukrzycy typu 2 i jej powikłań, zwłaszcza mikroangiopatii, największy udział mają modyfikacje epigenetyczne dotyczące metylacji mitochondrialnego DNA. Wielokierunkowość i złożoność modyfikacji epigenetycznych białek histonowych wskazuje na ich istotną rolę w rozwoju zaburzeń cukrzycy. Szczególnie ważną rolę przypisuje się metylacji i acetylacji białek histonowych, zwłaszcza dotyczących argininy i lizyny, które występują najczęściej. Ponadto ważne są modyfikacje epigenetyczne enzymów, zwłaszcza metylaz, odpowiedzialnych za te procesy. Wskazuje się, że zidentyfikowane różnice epigenetyczne w obrębie DNA czy białek histonowych mogą się okazać w przyszłości przydatnymi biomarkerami przepowiadającymi podatność na rozwój choroby, a także mogą się stać potencjalnym celem przyszłych działań terapeutycznych zaburzeń klinicznych cukrzycy.

Słowa kluczowe:

cukrzyca • hiperglikemia • zmiany epigenetyczne • modyfikacje histonów • metylacja DNA

Summary

In the search for explanations of diabetes pathomechanisms, especially the development of its vascular complications (micro- and macrovascular), although current, good metabolic control of diabetes, attention was drawn to the role of epigenetic inheritance associated with epigenetic modifications of histone proteins and DNA in hyperglycemia conditions. This study showed the significant role of DNA methylation and histone epigenetic modifications (a different nature and a different degree) in the transmission of information that is not connected with gene inheritance but concerns the persistent changes induced by hyperglycemia. Attention was paid to the role of DNA methylation of pancreatic cells in the pathogenesis of type 1 diabetes, but also type 2. The important role of DNA methylation changes in a so-called intrauterine growth restriction (IUGR) as reason of subsequent development of diabetes was particularly emphasized. In the pathogenesis of type 2 diabetes and its complications, especially microvascular complications, the greatest share and importance of epigenetic modifications on mitochondrial DNA methylation are the most important. The multidirectionality

and complexity of epigenetic modifications of histone proteins indicate their importance in the development of diabetic disturbances. An especially important role is attributed to methylation and acetylation of histone proteins, in particular on arginine and lysine, whose changes occur most frequently. Moreover, epigenetic modifications of the enzymes, especially methylases, responsible for these processes are the underlying. It has been indicated that the identification of epigenetic differences within the DNA or histone proteins may be a useful prognostic biomarker of susceptibility to the disease development in the future. Moreover, they may become a potential target for future therapeutic interventions for clinical disorders in diabetes.

Keywords: diabetes • hyperglycemia • epigenetic changes • histone modification • DNA metylation

GICID: 01.3001.0010.6156
DOI: 10.5604/01.3001.0010.6156
Word count: 9064
Tables: –
Figures: 3
References: 94

Adres autorki: prof. dr hab. Agnieszka Piwowar, Katedra i Zakład Toksykologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. Borowska 211, 50-556 Wrocław; e-mail: agnieszka.piwowar@umed.wroc.pl

WPROWADZENIE

Cukrzyca jest złożoną chorobą metaboliczną, u podłoża której leży niedostateczne wydzielanie i/lub niewystarczające działanie obwodowe insuliny, przejawiające się hiperglikemią. Mechanizmy indukujące te zaburzenia są złożone i wciąż intensywnie badane, mimo długoletniej historii naturalnej zachorowań na cukrzycę. Szczególną uwagę zwraca się na poprawę jej wczesnej diagnostyki i określenie ryzyka jej występowania, co jest utrudnione przez często długotrwałe utajony przebieg cukrzycy. Kładzie się również nacisk na poznanie patomechanizmów powikłań towarzyszących cukrzycy i możliwości zapobiegania ich rozwojowi. Występujące mikro- i makroangiopatie obniżają jakość życia chorych i skrócenie czasu ich przeżycia [5,8,14,34]. W poprzednich dekadach, oprócz udowodnionej roli hiperglikemii, której często towarzyszy dyslipidemia oraz stan zapalny, dowiedziono również udział stresu oksydacyjnego (OS) w rozwoju zaburzeń biochemicznych i klinicznych cukrzycy, co przedstawiano w wielu pracach eksperymentalnych i poglądowych. Wprowadzenie takich określeń jak glukotoksyczność i modyfikacje gliokooksydacyjne w odniesieniu do zmian zachodzących w metabolizmie makrocząstek organizmu oraz struktur komórkowych i tkankowych, w istotny sposób oddają wagę tych procesów w rozwoju cukrzycy [18,27,32].

Ostatnie lata przyniosły natomiast zainteresowanie modyfikacjami epigenetycznymi, jako istotnymi elementami uczestniczącymi w patogenezie różnych chorób, głównie nowotworowych i neurodegeneracyjnych czy przebiegu procesu starzenia się, ale zwrócono również uwagę na rolę modyfikacji epigenetycznych induk-

wanych hiperglikemią w rozwoju cukrzycy [11,36,51,74]. Szczególną uwagę zwrócono na pojawianie się mikro- i makroangiopatii cukrzycowych mimo dobrego, bieżącego wyrównania glikemicznego chorych. Zjawisko to, początkowo o nieznanym podłożu, zostało nazwane „pamięcią metaboliczną” organizmu lub „efektem dziedziczenia”. Mechanizm rozwoju powikłań cukrzycowych indukowanych pamięcią metaboliczną próbowano powiązać z istnieniem modyfikacji epigenetycznych, czyli zmian w obszarze materiału genetycznego niewynikających z zasad teorii dziedziczenia, a indukowanych właśnie przewlekłą hiperglikemią i glukotoksycznością. W ostatnich latach zwrócono także uwagę na rolę modyfikacji epigenetycznych w patogenezie choroby oraz progresji ze stanu przedcukrzycowego w pełnoobjawową chorobę [24,72,74,87]. Ze względu na coraz liczniejsze dane z piśmiennictwa i wzrastające zainteresowanie tym problemem wśród badaczy, przedmiotem tego opracowania stało się przedstawienie aktualnego stanu wiedzy i wyników badań o roli modyfikacji epigenetycznych w patogenezie cukrzycy i rozwoju jej powikłań oraz możliwych nowych – epigenetycznych celów terapeutycznych cukrzycy, w oparciu o najbardziej reprezentatywne wyniki badań w tym zakresie.

PAMIĘĆ METABOLICZNA W CUKRZYCY A MODYFIKACJE EPIGENETYCZNE

Cukrzyca, zwłaszcza typu 2, może długo przebiegać w utajeniu i być niezdiagnozowaną, a hiperglikemia i towarzyszące jej zaburzenia biochemiczne już w tym bezobjawowym okresie mogą indukować zaburzenia metaboliczne i kliniczne, które wpływają negatywnie na stan kliniczny pacjenta. Wyniki długoterminowych, randomizowanych badań: DCCT (Diabetes Control Complica-

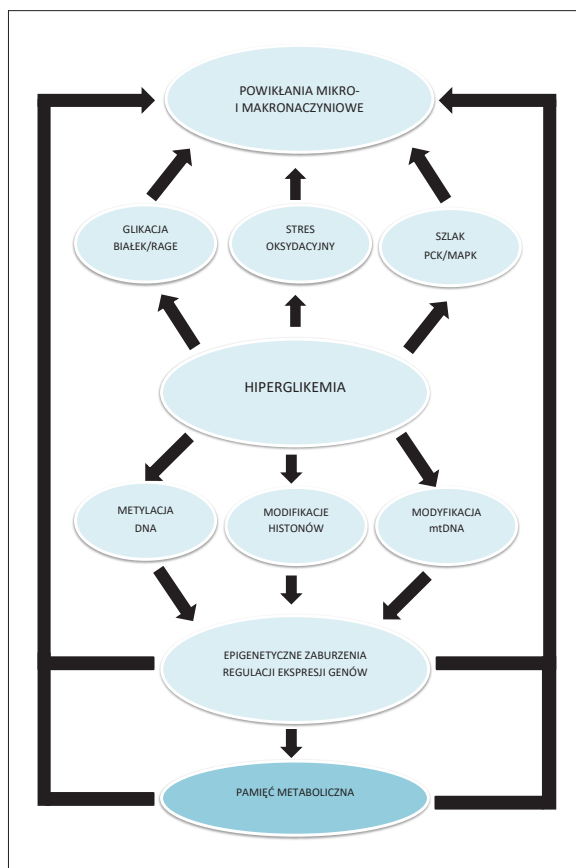
tion Trial), EDIC (Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications) czy UKPDS (UK Prospective Diabetes Study) wskazały pozytywny wpływ kontroli glikemii nie tylko na bieżący stan metaboliczny chorych na cukrzycę, ale co istotne, na odległe zaburzenia kliniczne, zwłaszcza wystąpienie powikłań naczyniowych w przyszłości. W badaniach tych wykazano, że angiopatie cukrzycowe mogą się pojawić nawet długo po uzyskaniu dobrego wyrównania glikemicznego choroby, co wskazuje na istnienie mechanizmów, które perspektywnie indukują procesy leżące u podłoża rozwoju mikro- i makroangiopatii cukrzycowych. Współczesna koncepcja „pamięci metabolicznej” stała się wyzwaniem dla naukowców i klinicyстів oraz obiektem wielu badań eksperymentalnych i opracowań teoretycznych. Wskazano ponadto, nie tylko na istotną rolę hiperglikemii w okresie przed zdiagnozowaniem choroby, ale także na znaczącą rolę wahań glikemii – dysglikemię (wahania hiper- i hipoglikemii - tzw. „huśtawka glikemiczna”), hiperglikemię poposiłkową oraz glukotoksyczność; w perspektywie rozwoju angiopatii cukrzycowych [7,18,24,83,89].

Dobrze poznane i udokumentowane są szlaki zaburzeń biochemicznych w cukrzycy indukowane hiperglikemią, co przedstawiono w licznych pracach zbiorczych. Najważniejsze to: autooksydacja glukozy i glukotoksyczność; nieenzymatyczna glikacja białek i powstawanie zaawansowanych końcowych produktów glikacji (advanced glycation end products; AGE) oraz reaktywnych intermediatów tego procesu; nasilenie szlaku polioliowego i heksozaminowego oraz nadmierna aktywacja kinazy białkowej C (protein kinase C; PKC). Procesy te, właściwie na każdym etapie ich przebiegu, powodują nadmierne wytwarzanie wolnych rodników (WR) i nasilenie stresu oksydacyjnego, co wynika m.in. z glikacji białek mitochondrialnych upośledzającej ich funkcję, a w połączeniu z nadmiarem substratów energetycznych (glukoza, wolne kwasy tłuszczowe), zwiększa generowanie wolnych rodników w łańcuchu oddechowym. Łączy się również z nasiloną peroksydacją lipidów, a zwłaszcza tworzenia się reaktywnych i miażdżycogennych utlenionych lipoprotein o niskiej gęstości (tzw. oxLDL). Ponadto, poprzez mechanizmy metaboliczne, hemodynamiczne oraz lokalny odczyn immunologiczno-zapalny, wiąże się z uszkodzeniem śródbłonna naczyń. Dochodzi m.in. do zwiększonego wytwarzania naczyniowego czynnika wzrostu (VEGF), transformującego czynnika wzrostu β (transforming growth factor β ; TGF- β), insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (insulin-like growth factor-1; IGF-1), prozakrzepowego czynnika tkankowego (tissue factor; TF), zmian w generowaniu i dostępności tlenu azotu oraz aktywacji szlaków kontrolowanych przez transkrypcyjny czynnik jądrowy kappa B (nuclear factor kappa B; NF- κ B) [1,18,31,45,88,91].

Kumulowanie AGE w tkankach i narządach oraz nasilony OS są wskazywane jako podstawowe czynniki rozwoju powikłań naczyniowych cukrzycy. Jednak coraz większy wkład w zrozumienie i wyjaśnienie mechani-

zmów prospektywnych zaburzeń klinicznych dostarczają badania dotyczące roli hiperglikemii w inicjowaniu i propagowaniu zmian w aktywnościach różnych genów uczestniczących w patomechanizmie cukrzycy i jej powikłań, ale bez zmian w ich strukturze (tj. bez zmian w sekwencji DNA czy strukturze chromatyny). Chodzi o tzw. wpływ epigenetyczny hiperglikemii (np. przez wprowadzenie nowych grup chemicznych do istniejącego materiału jądrowego) w wyniku nawet przemijających, krótkotrwałych, ale powtarzających się, stanów hiperglikemii. Takie zmiany są określane modyfikacją epigenetyczną materiału genetycznego i jak dowiedziono w ostatniej dekadzie, to one są wskazywane jako przyczyna tzw. „pamięci metabolicznej” leżącej u podstaw mechanizmu rozwoju naczyniowych powikłań cukrzycy. W tym świetle bardzo ważne jest utrzymywanie docelowych parametrów wyrównania glikemicznego cukrzycy już we wczesnoobjawowym okresie choroby [12,24,40,90]. Ogólny schemat zależności opisanych elementów przedstawiono na ryc. 1.

Dotychczasowe badania dotyczące podatności czy predyspozycji do rozwoju powikłań naczyniowych w cukrzycy pod wpływem hiperglikemii koncentrowały się głównie na szlakach zaburzeń biochemicznych i polimorfizmie genetycznym. Obecnie kładzie się nacisk



Ryc. 1. Ogólny schemat zależności zaburzeń indukowanych hiperglikemią w patogenezie powikłań cukrzycowych

właśnie na poznanie i wyjaśnienie ich podłoża epigenetycznego oraz interakcji gen-środowisko, co może być szczególnie istotne w patomechanizmie samej choroby. Prowadzone były liczne badania na hodowlach komórkowych i modelach zwierzęcych, mające na celu lepsze zrozumienie związku procesów epigenetycznych z hiperqlikemią i rozwojem powikłań cukrzycy. Wyjaśnienie mechanizmów i roli tych modyfikacji w aspekcie pamięci metabolicznej w cukrzycy pozwoli na lepsze poznanie i zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za „niekontrolowany” rozwój angiopatii może się stać ważnym celem działań terapeutycznych w przyszłości. Niezwykle istotnym staje się opracowanie sposobów zapobiegania rozwojowi powikłań naczyniowych u chorych na cukrzycę, mimo bieżącego satysfakcjonującego leczenia hipoglikemizującego. Może to mieć duże znaczenie dla zmiany powszechnie obowiązujących schematów terapeutycznych, która polegałaby na jak najwcześniejszym wprowadzeniu intensywnego leczenia hipoglikemizującego, zwłaszcza insulinoterapii [3,12,39,47,55]. O ważności i znaczeniu problemu modyfikacji epigenetycznych w cukrzycy świadczy narastająca co roku liczba publikacji dotyczących tego zagadnienia (liczba rekordów odnalezionych w bazie PubMed dla hasła „epigenetics&diabetes” w ostatnich 5 miesiącach wzrosła o ponad 30%).

EPIGENETYKA – ODKRYCIE XX WIEKU

Pierwsze doniesienia dotyczące epigenetyki i mechanizmów modyfikacji epigenetycznych opublikowano w latach 50 ub. w. Liczba badań dotyczących tego zagadnienia jest ogromna i lawinowo rośnie (dane z lipca br. podają prawie 17 tys. i prawie 50 tys. rekordów odnalezionych w bazie PubMed związanych odpowiednio z hasłami „epigenetics/epigenetic”), co wskazuje na ogromne zainteresowanie tym zagadnieniem. Obecnie najlepiej są udokumentowane badania dotyczące podłoża epigenetycznego chorób nowotworowych, neurodegeneracyjnych i psychicznych, natomiast coraz więcej prac dotyczy udziału modyfikacji epigenetycznych w patogenezie otyłości, chorób sercowo-naczyniowych oraz cukrzycy. Wskazuje się, iż różnorodne czynniki środowiskowe, a zwłaszcza dieta, będą w przyszłości w istotny sposób wpływały na nasilenie występowania tych chorób przez indukowanie zmian epigenetycznych i mechanizm pamięci metabolicznej. W przypadku cukrzycy na czoło wysuwa się gluko- i lipotoksyczność w połączeniu ze stresem oksydacyjnym oraz nutri- i metabolomiką. Nie bez znaczenia będzie zapewne wpływ zanieczyszczeń środowiskowych czy narażenia środowiskowego na rozwój tych chorób, co z pewnością stanie się obiektem intensywnych badań w najbliższej przyszłości [9,18,21,39,44,55].

Pojęcie epigenetyki w ogólnym ujęciu dotyczy dziedziczności pozagenowej, czyli dziedziczenia zmian ekspresji genów, które jest niezależne od informacji zakodowanej w DNA (sekwencji nukleotydów w DNA), lecz determinowane jest różnymi czynnikami i modyfikacjami bio-

chemicznymi wpływającymi na ekspresję wybranych genów. Modyfikacja epigenetyczna jest definiowana jako każda zmiana w fenotypie komórki, która nie jest wynikiem zmian w sekwencji DNA. Poznane modyfikacje epigenetyczne, kontrolujące i zmieniające transkrypcję genów dotyczą dwóch głównych składowych kodu genetycznego, a mianowicie DNA, i tu zasadniczym czynnikiem jest metylacja oraz zmiany struktury i funkcji chromatyny przez chemiczną modyfikację histonów (głównie metylacja, acetylacja i fosforylacja). Są z sobą integralnie połączone, nadają nowe cechy dziedziczeniu pozagenowemu i tworzą swoisty kod epigenetyczny pozwalając na dziedziczenie czy też pojawienie się pewnych cech niezależnie od nukleotydowego zapisu w kodzie genetycznym. Modyfikacje DNA i histonów są rezultatem działania różnych grup enzymów (np. metylaz, demetylaz, acetylaz, deacetylaz), które bezpośrednio wpływają na regulację procesu dziedziczenia (mogą być dziedziczone i przekazywane do komórek potomnych). Natomiast zaburzenia w regulacji aktywności tych enzymów mogą doprowadzić do kolejnych zaburzeń, indukując np. wystąpienie i rozwój nowotworów. Wskazuje się również na interferencję z RNA (z udziałem small-IRNA zawierających mikroRNA) jako trzeci z możliwych mechanizmów modyfikacji epigenetycznych. Wyróżniamy modyfikacji epigenetycznych jest także wystąpienie indywidualnych (niepatologicznych) różnic międzyosobniczych, co najlepiej jest widoczne u par bliźniąt jednojajowych, u których mimo niemal identycznego „wzoru genetycznego” ekspresja genów i poziomy „produktów” poszczególnych genów są różne, uwidoczniając różnice fenotypowe [20,51,67,82].

MODYFIKACJE EPIGENETYCZNE W OBRĘBIE DNA

Modyfikacje epigenetyczne DNA dotyczą metylacji tej cząsteczki i są chyba najlepiej poznanym i opisanym procesem, dlatego też w pracy ograniczono się jedynie do przypomnienia najważniejszych faktów dotyczących tych zmian. Podobną zasadę przyjęto w dalszej części pracy do opisu modyfikacji epigenetycznych histonów czy też niekodującego RNA. Metylacja DNA polega na przyłączeniu grupy metylowej głównie do węgla C5 cytozyny (rzadziej do azotu N3 cytozyny lub do węgla C6 adeniny), a reakcja jest katalizowana przez metylotransferazy DNA (deoxyribonucleic acid methyltransferases; DNMTs). Do rodziny metylaz należy kilka metylotransferaz. Aktywne enzymatycznie są DNMT, DNMT3A i DNMT3B, a ponadto DNMT3L i DNMT2. Proces odwrotny jest katalizowany przez demetylazy. Donorem grup metylowych jest najczęściej S-adenozynometionina (S-adenosylmethionine; SAM). Metylacja zachodzi w miejscu występowania dinukleotydów cytozyna-guanina (zwanymi wyspami CpG) i ulegają jej symetrycznie obydwie (przeciwrównoległe) nici DNA. W genomie człowieka występuje około 29 tys. wysp CpG (obszarów o zwiększonej w porównaniu z całym genomem zawartości tych dwóch nukleotydów), które są w 50-60% umiejscowione w promotorach genów (geny metabolizmu podstawowego) i w około 40% genów swo-

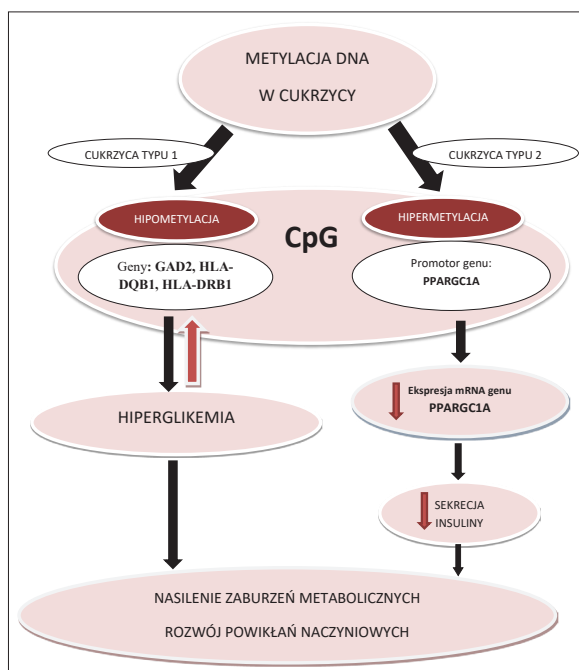
istych tkankowo. Skutkiem metylacji jest przeważnie obniżenie lub wyciszenie ekspresji genów. Metylacja wpływa ponadto na stopień kondensacji chromatyny, co reguluje (najczęściej zmniejsza) dostępność DNA dla różnych czynników transkrypcyjnych. Proces ten jest wykorzystywany w komórce do wyciszania licznych sekwencji powtórzeniowych, decyduje również o prawidłowym przebiegu tzw. procesu piętnowania genomowego (genetics imprinting), nazywanego również rodzicielskim oraz inaktywacji chromosomu X, dzięki czemu aktywna jest tylko jedna kopia genów sprzężonych z płcią. Proces metylacji odgrywa również rolę w rozwoju nowotworów, chorób neurodegeneracyjnych, otyłości, chorób sercowo-naczyniowych i innych [20,36,57,70].

MODYFIKACJE EPIGENETYCZNE DNA W CUKRZYCY

Dane o zmianach epigenetycznych indukowanych hiperglikemią w obrębie DNA w związku z patogenezą cukrzycy i jej powikłań, mimo postępu wiedzy, są wciąż stosunkowo nieliczne. Jak wspomniano wcześniej, metylacja DNA jest uważana za jeden z najważniejszych mechanizmów regulujących ekspresję genów ze względu na kowalencyjne wiązanie grup metylowych do wysp CpG w sekwencjach promotorowych, co najczęściej wiąże się z wyciszeniem transkrypcji. U chorych na cukrzycę wykryto około 130 miejsc CpG (zarówno hipo- jak i hipermetylowanych) związanych z rozwojem choroby, np. w genach dekarboksylazy glutaminianowej 2 (glutamic acid decarboxylase; GAD2), genach HLA-DQB1 oraz HLA-DRB1. Okazało się, że u chorych na cukrzycę typu 1 (T1DM) z przeciwciałami przeciw wyspowym (islet cells antibodies; ICA), tego typu zmiany można wykryć na wiele lat przed klinicznymi objawami choroby. Wskazuje się zwłaszcza na zmieniony „wzór” metylacji DNA w komórkach wysp trzustki, mięśniach szkieletowych i tkance tłuszczowej [68,75,79]. U pacjentów z T1DM wykazano obecność hipometylacji 3 wysp CpG (znajdujących się proksymalnie do miejsca startowego transkrypcji genu insuliny) jako mechanizmu epigenetycznego zaangażowanego w patogenezę tego typu cukrzycy, ale co istotne, nie cukrzycy typu 2 (T2DM) [16]. Dowiedziano ponadto, że ekspresja receptorów aktywujących proliferację peroksysomów gamma C1 alfa (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Coactivator 1 Alpha; PPARGC1A), zaangażowanych w metabolizm glukozy, jest zmniejszona w komórkach wysp trzustki u pacjentów z T2DM i odwrotnie proporcjonalna do stopnia jego metylacji. Natomiast metylacja DNA promotora PPARGC1A w tych komórkach (z następującą represją transkrypcji) była dwukrotnie większa u cukrzyków niż u osób bez cukrzycy, co wiązało się ze zmniejszoną sekrecją insuliny z komórek wysp trzustki [54]. Podobnych obserwacji dostarczyła również analiza metylacji genomu promotora w mięśniach szkieletowych pacjentów z T2DM. Zmiany ekspresji tego genu i jego polimorfizm epigenetyczny powiązano z zaburzonym wydzielaniem insuliny i dysfunkcją komórek beta wysp trzustki oraz wzrostem ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 [2]. Wskazuje się ponadto, iż hipermetylacja DNA

może być także indukowana dietą wysokotłuszczową (np. hipermetylacja genu glukokinazy wątrobowej i promotora genu kinazy pirogronianowej typu L), co wykazano na modelu zwierzęcym (szczury z otyłością). Autorzy sugerują, że ocena poziomu hipermetylacji tych enzymów może być w przyszłości użytecznym parametrem do oceny insulinooporności indukowanej otyłością i stłuszczeniem wątroby [42]. Badania ostatnich lat wykazały, iż metylacja DNA genu jednego z transporterów cynku (solute carrier family 30 member 8; SLC30A8), białka biorącego udział w regulacji wydzielania insuliny, w istotny sposób może predysponować do rozwoju cukrzycy i stać się elementem diagnostycznym, przepowiadającym wystąpienie choroby, jak również obiektem działań terapeutycznych [76]. Seman i wsp. [78] w populacji malajskiej wykazali związek zwiększonej metylacji DNA promotora genu SLC30A8 z zapadalnością na cukrzycę typu 2, ale nie z rozwojem nefropatii cukrzycowej. Na ryc. 2 przedstawiono najważniejsze elementy modyfikacji epigenetycznych DNA w warunkach hiperglikemii związanych z rozwojem cukrzycy typu 1 i 2.

Dużo uwagi skoncentrowano na modyfikacjach epigenetycznych DNA u noworodków z małą masą urodzeniową, urodzonych z niedożywionych matek z tzw. zespołem ograniczonego wzrostu wewnątrzmacicznego płodu (intra uterine growth restriction; IUGR) jako przyczyny późniejszego rozwoju cukrzycy. Einstein i wsp. [22] w hematopoetycznych komórkach macierzystych i progenitorowych CD34⁺ pochodzących z krwi pępowinowej noworodków z zespołem IUGR, stwierdzili obecność zmian metylacji cytozyny DNA, zwłaszcza regionu zawie-



Ryc. 2. Schemat najważniejszych elementów modyfikacji epigenetycznych DNA w warunkach hiperglikemii związanych z rozwojem cukrzycy typu 1 i typu 2 (szczegóły w tekście)

rającego gen hepatocytowego czynnika jądrowego 4 alfa (hepatocyte nuclear factor 4-alpha; HNF4A), gdzie wykazano 56 różnych metylacji *loci*. Polimorfizm HNF4A jest łączony ze zwiększoną podatnością na rozwój cukrzycy, zwłaszcza typu MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) i T2DM w wieku późniejszym. Potwierdza to hipotezę, że zaburzenia środowiska wewnątrzmacicznego indukują modyfikacje epigenetyczne i mogą wpłynąć nie tylko na rozwój płodu w czasie krytycznych okresów (plastyczności) jego rozwoju, ale również mogą zwiększać podatność na wiele chorób związanych ze starzeniem się, pojawiających się wiele lat (dekad) później.

U szczurów z indukowanym doświadczalnie wewnątrzmacicznym niedorozwojem płodu, związanym z niedostateczną podażą glukozy w diecie, zaobserwowano zmiany metylacji DNA izolowanego z wysp trzustki (zmiany metylacji cytozyny w około 1400 *loci*). Wskazuje to na bezpośredni udział glikemii w indukowaniu tych modyfikacji i ich związek ze zmianą ekspresji genów odpowiedzialnych właśnie za podatność na rozwój cukrzycy w późniejszym okresie (osobniki dorosłe). Modyfikacje te były odpowiedzialne za unaczynienie, proliferację komórek beta, wydzielanie insuliny i śmierć komórek, związaną z odpowiednimi zmianami w regulacji ekspresji mRNA. Wskazuje się modyfikacje tych miejsc jako potencjalnych kandydatów propagacji pamięci metabolicznej, a więc predysponujących do rozwoju chorób metabolicznych, w tym również cukrzycy. Tego typu epigenetyczna dysregulacja występowała preferencyjnie w konserwatywnych sekwencjach międzygenowych, najczęściej w pobliżu genów regulujących te patologiczne procesy zachodzące właśnie w IUGR. Wskazuje to, iż już nawet bardzo wczesne, wewnątrzmaciczne zaburzenia metaboliczne mogą znajdować odzwierciedlenie w zwiększonej zapadalności na cukrzycę typu 2 w perspektywie czasowej, czyniąc ten problem jeszcze bardziej ważnym, niż wskazywano dotychczas i podkreślając możliwie najwcześniejsze zdiagnozowanie cukrzycy w życiu dorosłym [85]. W progresji ze stanu IUGR do jawnej cukrzycy, co wykazano na modelach zwierzęcych, odgrywa również rolę postępujące wyciszanie (hipermetylacja promotora genu) czynnika transkrypcyjnego trzustki i dwunastnicy odpowiedzialnego za różnicowanie się komórek beta (Pancreatic and Duodenal Homeobox 1; PDX1). Ponadto znaczenie ma hipermetylacja i obniżona ekspresja wątrobowa insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (Insulin-like Growth Factor1; IGF-1) oraz receptora glikokortykoidów hipokampa szczura (rat hippocamp alglucocorticoid receptor; hpGR) [28,46,66]. Niektóre badania u ludzi bezpośrednio łączą metylację DNA w okresie niedożywienia ciążowego z późniejszym rozwojem otyłości i cukrzycy - wskazywana jest zwłaszcza hipometylacja genu IGF-2 (piętnowanie rodzicielskie) czy hipermetylacja genu białka GNAS (guanine nucleotide-binding protein G) [38,86].

Oprócz udziału w patogenezie cukrzycy modyfikacjom epigenetycznym DNA przypisuje się również istotną rolę w rozwoju jej powikłań. Najwięcej danych dotyczy nefropatii (diabetic nephropathy; DN) i retinopatii cukrzycy-

wej, a także związku z rozwojem zmian miażdżycowych (makroangiopatie) u pacjentów cukrzycowych. Poirier i wsp. [69] w krwi chorych na cukrzycę (zarówno typu 1 jak i 2), z nefropatią cukrzycową w różnych jej stadiach, wykazali obniżenie stężenia S-adenozylometioniny, będącej donorem grup metylowych m.in. dla reduktazy metylenotetrafolianów (methylene tetrahydrofolate reductase; MTHFR) obecnej w limfocytach, co obniża jej aktywność w tych komórkach. Autorzy powiązali te zmiany ze stopniem rozwoju DN. Były najbardziej znaczące u chorych w zaawansowanym stadium DN, ale nie było różnic między osobami zdrowymi, a chorymi bez powikłań. Wykazali, iż niedobór SAM prowadzi do niedoboru reszt metylowych, co prawdopodobnie, właśnie poprzez mechanizm epigenetyczny może się przyczynić do wysokiej zachorowalności i śmiertelności chorych z nefropatią cukrzycową. U osób z zaawansowaną DN, charakteryzujących się szczególnie małą aktywnością MTHFR, może to być nasilane uogólnionymi zaburzeniami metabolicznymi, w tym mocznicą i hiperqlikemią. Zaburzenia metylacji DNA (hipermetylację) stwierdzono także w leukocytach krwi obwodowej chorych na cukrzycę z przewlekłą chorobą nerek (chronic kidney disease; CKD), która była związana ze stanem zapalnym, nagromadzeniem toksyn mocznicowych i zwiększoną śmiertelnością tych osób. U pacjentów z hiperhomocysteinemią i otyłością oraz zwiększonym ryzykiem wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych również zaobserwowano występowanie zmian metylacji DNA. Na złożoność mechanizmów tych zaburzeń wskazują dane literaturowe, które mówią zarówno o hiper- jak i hipometylacji DNA u chorych z CKD [23,49,80]. Sapienza i wsp. [77] w ślinie pacjentów cukrzycowych wykazali różnego stopnia zmiany metylacji DNA genów związanych z niewydolnością nerek, o nasileniu zależnym od stopnia niewydolności tego narządu, zwłaszcza z końcową niewydolnością nerek (end stage renal disease; ESRD). Do badań wytypowano 187 genów kandydatów, z czego dla 39 okazała się związana z ESRD, a największe różnice dotyczyły pacjentów dializowanych. Autorzy wskazują, iż indywidualne różnice epigenetyczne w metylacji DNA mogą się okazać przydatnymi biomarkerami przepowiadającymi podatność na rozwój choroby, a łatwość pozyskania materiału biologicznego do badań być może pozwoli na ich wprowadzenie do diagnostyki przesiewowej. Badania Bell i wsp. [4] ujawniły znaczące różnice w metylacji promotorów 19 genów w DNA między pacjentami z T1DM, z obecną i bez nefropatii. Ponadto wskazały na związek hipermetylacji genu UNC13B (nc-13 homolog B) z rozwojem DN u tych chorych.

Innym, ale jednak niezwykle ważnym i ściśle powiązanym z zaburzeniami epigenetycznymi zagadnieniem, jest modyfikacja DNA mitochondrialnego (mtDNA). Wiadomo, iż hiperqlikemia, wraz z nasilonym powstawaniem wolnych rodników i stresem oksydacyjnym oraz dyslipidemią, stanowią triadę czynników indukujących zaburzenia biochemiczne na poziomie komórkowym i narządowym. Wskazuje się, iż glukolipotoksyczność oraz glikooksydacyjne modyfikacje makrocząstek orga-

nizmu, do których dołącza się przewlekły stan zapalny, są głównymi czynnikami uszkodzenia śródbłonka naczyń, co leży u podstawy rozwoju przewlekłych powikłań naczyniowych cukrzycy [1,74]. Proces przebiega za pośrednictwem mechanizmów metabolicznych i hemodynamicznych przedstawionych wcześniej, jednak najistotniejszym jest właśnie glikooksydacyjne uszkodzenie białek mitochondrialnych wynikające ze zwiększonego wytwarzania WR w mitochondriach komórek pacjentów cukrzycowych, przeładowanych nadmiarem substratów energetycznych, tj. glukozą i wolnymi kwasami tłuszczowymi (WKT). Hiperglikemia i nadmiar WKT indukują modyfikacje białek komórkowych, zwłaszcza powodując mutacje w mtDNA. Proces przebiega intensywnie i stosunkowo łatwo, gdyż mitochondrialne DNA nie jest chronione przez białka histonowe, ponadto słabiej są wykształcone mechanizmy naprawcze, niż w jądrowym DNA oraz mniej wydolne są systemy antyoksydacyjne. Powoduje to, iż powstające w wyniku tych procesów mutacje prowadzą do trwałego uszkodzenia komórek, co wzmacnia „odpowiedź” wewnątrzkomórkową na warunki hiperglikemii, wtórnie przejawiając się zwiększonym wytwarzaniem czynników nasilających proliferację komórek ściany naczyń. Wzmacnia to i przyspiesza postęp uszkodzenia tkanek, bezpośrednio przyczyniając się do rozwoju późnych powikłań naczyniowych cukrzycy [18,30,48,89]. W kontekście metabolicznych zaburzeń cukrzycy i patogenezy jej powikłań naczyniowych, dla ważności związku między tymi komponentami najbardziej adekwatnym wydaje się łączne uwzględnienie tych wszystkich składowych. Można by je określić np. jako „kwartet patogenetyczny” lub „gluko-lipo-oksydacyjno-zapalny” mechanizm zaburzeń cukrzycowych. Każdy z tych czynników jest ważnym elementem samonapędzającego się układu tych zaburzeń, co jak wynika z intensywnych badań ostatnich lat, ma bezpośredni związek ze zjawiskiem pamięci metabolicznej i gorszym rokowaniem przebiegu choroby.

Najwięcej dowodów dotyczących roli epigenetycznych modyfikacji mtDNA zgromadzono dla retinopatii cukrzycowej, większość publikowanych wyników dotyczy badań na zwierzętach. U szczurów z cukrzycą, patogeneza i rozwój retinopatii był indukowany modyfikacjami epigenetycznymi genów kodujących białka łańcucha oddechowego i następowym uszkodzeniem DNA mitochondrialnego nasilanym dodatkowo stresem oksydacyjnym. Niekorzystne zmiany w siatkówce oka pojawiały się nawet po upływie 3 miesięcy od uzyskania stanu wyrównania glikemicznego u badanych zwierząt [58]. W siatkówce oka oraz w śródbłonku naczyń szczurów z cukrzycą trwającą ponad 6 miesięcy wykazano hipermetylację miejsc CpG w rejonie regulacyjnym polimerazy gamma 1 (Polymerase gamma 1; POLG1) oraz podjednostki katalitycznej mitochondrialnego enzymu replikacji DNA, co spowodowało utratę aktywności transkrypcyjnej. Co istotne, proces utrzymywał się także gdy okres trzymiesięcznego dobrego wyrównania glikemii był poprzedzony trzymiesięcznym utrzymywaniem się hiperglikemii. Wykazano również upośledzenie

systemów naprawczych tego regionu (MLH1 lub MSH2 związanych odpowiednio z polimerazą gamma mtDNA lub z jądrową polimerazą beta). Potwierdza to hipotezę epigenetycznego podłoża pamięci metabolicznej w cukrzycy [62,84]. Jedynie pojedyncze dane odnoszą się do powikłań makroangiopatycznych. Wykazano, iż rozwój zmian miażdżycowych jest związany z hipometylacją DNA komórek mięśni gładkich tętnic (smooth muscle cells; SMC), których migracja i proliferacja jest podstawowym czynnikiem sprawczym zmian miażdżycowych. Hipometylacja DNA była obecna zarówno we wczesnym jak i zaawansowanym stadium miażdżycy w komórkach SMC tętnic, natomiast nie zaobserwowano tego typu zmian w komórkach krwi. Ekspresja DNMT1 była istotnie zmniejszona w płytce miażdżycowej w stosunku do kontroli [35].

MODYFIKACJE EPIGENETYCZNE HISTONÓW

Modyfikacje epigenetyczne histonów są złożone i mogą obejmować acetylację, metylację (jedno-, dwu- lub trójcząsteczkową), fosforylację, ubikwitynację lub koniugację z cząsteczkami SUMO (small ubiquitin-like modifier), tzw. sumoilację. Polegają na przyłączeniu do cząsteczek histonów odpowiednio grup: acetylowych, metyloowych, fosforanowych, ubikwityny lub białka SUMO. Histony są białkami zasadowymi, które wraz z DNA tworzą strukturę chromatyny. Jej podstawową jednostką strukturalną jest nukleosom składający się z rdzenia białkowego, zbudowanego właśnie z histonów oraz nawiniętej na niego nici DNA (odcinki o długości 146 par zasad). Rdzeń (o kształcie walca) jest oktamerem składającym się z ośmiu cząsteczek histonów (po dwa histony typu H2A, H2B, H3 i H4). Oprócz histonów rdzenia nukleonom tworzy także histon łącznikowy H1, który stabilizuje nić DNA na oktamerze oraz uczestniczy w dalszej kondensacji chromatyny. Miejscami, w których dochodzi do modyfikacji epigenetycznych histonów, są najczęściej odcinki położone na N-końcach ich cząsteczek (określane jako ogony histonów - przestrzennie wystają poza oktamer). Największą podatnością i różnorodnością w stosunku do przyłączanych cząsteczek i grup chemicznych spośród aminokwasów białek histonowych charakteryzują się reszty lizyn, w następnej kolejności arginin, a potem seryn i treonin. Reakcje te są katalizowane przez odpowiednie enzymy i mogą być również odwracalne (w wyniku działania odpowiednich enzymów przeciwnych). Potranslacyjne modyfikacje histonów regulują ekspresję genów na trzy sposoby, a najważniejszym jest zmiana struktury i konformacji chromatyny, która moduluje dostępność *loci* genowych w transkrypcji, a pośrednio może również wpływać na metylację dwunukleotydów CpG w DNA. Drugim jest rola sygnałowa (udział i modulacja biochemicznej kaskady sygnalizacji wewnątrzkomórkowej), a trzecim modulacja ekspresji genów wpływających na funkcje komórek w wyniku działania różnych czynników środowiskowych, jak np. hiperglikemia w cukrzycy [19,20,36].

Najczęstszym rodzajem modyfikacji, którym podlegają

histony jest acetylacja zachodząca z udziałem acetylotransferaz histonowych (histone acetyltransferases; HATs), powodująca rozluźnienie struktury chromatyny. Ponadto HATs mogą wchodzić w interakcje z wieloma czynnikami transkrypcyjnymi uczestnicząc również w integracji wielu kaskad sygnałowych. Donorem grup acetylowych jest acetylo-CoA. Proces odwrotny jest prowadzony przez deacetylazę histonową (histone deacetylase; HDAC), która usuwa grupy acetylowe z lizyny/argininy powodując kondensację chromatyny i wyciszenie ekspresji genu. Istnieje kilka klas tego enzymu ulegających ekspresji swoistej tkankowo. Acetylacji przypisywany jest udział w aktywacji transkrypcji, wyciszaniu telomerów i naprawie DNA. Drugi z procesów, metylacja histonów jest prowadzona przez metylotransferazy histonów (histone methyltransferases; HMTs), a proces odwrotny przez demetylasy histonów (histone demethyltransferases; HDMTs). Metylotransferazy argininy/lizyny należą do trzech podstawowych grup białek, są to: metylotransferazy argininowe, metylotransferazy zawierające tzw. domenę SET i metylotransferazy niezawierającej tej domeny (tzw. NON-SET). Metylacja reszt argininy i lizyny w białkach histonowych może być związana z aktywacją jak i z represją transkrypcji, przy czym ten ostatni proces przeważa. Metylacja argininy powoduje tylko aktywację ekspresji, natomiast metylacja lizyny może powodować zarówno aktywację jak i represję transkrypcji. Największe znaczenie dla aktywacji ma metylacja lizyn histonu 3 (H3Lys4, H3Lys36, H3Lys79), a dla represji zarówno metylacja tego histonu (H3Lys9, H3Lys27), jak i histonu 4 (H4Lys20). Inny proces - fosforylacja histonów jest prowadzona przez fosforylasy, a reakcje przeciwstawne przez defosforylasy i jest związany z aktywacją transkrypcji, naprawą DNA i udziałem w mitozie. Intensywność fosforylacji jest zazwyczaj skorelowana z cyklem komórkowym - największa właśnie podczas mitozy (przyłączanie 6-25 reszt fosforanowych do jednej cząsteczki białka histonowego). Najlepiej scharakteryzowanym miejscem fosforylacji jest seryna 10 histonu 3 (H3S10). Ubikwitynylacja, podobnie jak koniugacja z cząsteczkami SUMO, są stosunkowo najslabiej poznanymi modyfikacjami potranslacyjnymi histonów. Polegają na przyłączeniu wiązaniem kowalencyjnym odpowiednio: cząsteczki ubikwityny (małe globularne białko zbudowane z 76 aminokwasów) lub pokrewnej, tzw. ubikwitynopodobnej cząsteczki SUMO. Ubikwitynylacji ulegają lizyny na C-końcach histonu H2A i H2B, a sumoilacji podlega histon H4. Modyfikacjom tym przypisywany jest przeciwstawny efekt: ubikwitynacja aktywuje transkrypcję, sumoilacja wycisza. Zwraca się również uwagę na ADP-rybozylację białek histonowych jako prawdopodobnego czynnika w mechanizmie modyfikacji epigenetycznych aktywującego transkrypcję [6,20,41,55].

Modyfikacje białek histonowych są bardziej złożone niż metylacja DNA ponieważ wiążą się z większą liczbą możliwych modyfikacji potranslacyjnych histonów, które zależą nie tylko od rodzaju modyfikacji, ale także od miejsca wystąpienia takiej modyfikacji na białku

histonowym oraz przyłączaniu różnej liczby i różnych dodatkowych cząsteczek lub grup funkcyjnych. Daje to ogromną liczbę możliwych „kombinacji” wpływających na strukturę chromatyny i ekspresję genów, co wywołuje różnorodne skutki, a potencjał i ważność tego zjawiska odzwierciedla, stosowane coraz częściej pojęcie kodu histonowego (histonecode) i sprzęgania histonów (histone cross-talk) [36,43].

MODYFIKACJE EPIGENETYCZNE HISTONÓW W CUKRZYCY

Dane odnoszące się do zmian epigenetycznych indukowanych hiperglikemią w obrębie histonów w związku z patogenezą cukrzycy i jej powikłań, wraz z postępem wiedzy i badań, są coraz liczniejsze, ale też coraz bardziej złożone, ze względu na możliwość różnorodnych ich kombinacji, odkrywania wciąż nowych zależności i rozwoju nowych technik badawczych. Uważa się, że największe znaczenie, w etiopatogenezie cukrzycy i jej powikłań, prawdopodobnie ze względu na najczęstsze występowanie, ma metylacja białek histonowych oraz acetylacja. Wskazuje się, iż w przyszłości, właśnie dzięki rutynowemu wdrożeniu nowych technik badawczych, np. rozwijającej się wciąż metody immunoprecypitacji chromatyny (chromatin immunoprecipitation sequencing; ChIP), ocena stopnia metylacji (zwłaszcza argininy i lizyny) białek histonowych będzie mogła być zastosowana nie tylko w celu odzwierciedlenia stopnia modyfikacji epigenetycznych w cukrzycy, ale też stanie się prawdopodobnie markerem tych modyfikacji. Przełoży się to na ich wykorzystanie, jako wczesnego i wiarygodnego parametru prognostycznego i/lub diagnostycznego powikłań cukrzycowych [19,24,55].

Najwięcej danych o roli modyfikacji epigenetycznych w przetrwałych zaburzeniach biochemicznych i klinicznych cukrzycy dotyczy metylacji białek histonowych. W badaniach prowadzonych na różnych komórkach (komórki śródbłonna, wyizolowane monocyty) zaobserwowano, że na zwiększone stężenie glukozy szczególnie podatna jest domena SET7 metylotransferazy. Przewlekła hiperglikemia aktywując enzym, nasilała metylację H3Lys4 i zmiany ekspresji genów w testowanych komórkach. Szczególnie istotna jest aktywacja podjednostki p65 promotora genu jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B, co wiąże się z pobudzeniem wewnątrzkomórkowej kaskady sygnalizacyjnej i indukowania zależnej od NF- κ B syntezy cytokin prozapalnych m.in. czynnika martwicy nowotworu α (tumor necrosis factor alpha; TNF- α) i interleukiny 1 β (interleukin 1 beta; IL-1 β) w tych komórkach. Ponadto wywoływała przetrwałą epigenetycznie ekspresję MPC-1 (monocyte chemoattractant protein 1) i VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1). W warunkach hiperglikemii w monocytach i komórkach śródbłonna nasiloną metylacją aktywowała nie tylko szlaki prozapalne i nasilała stan zapalny, współodpowiedzialny za rozwój zaburzeń cukrzycowych, ale także procesy miażdżycowe, związane z makroangiopatią cukrzycową. Natomiast delecja genu SET7 lub SET9 powodowała wyciszenie tego szlaku i zapobiegała uszko-

dzeniu śródbłonna [9,24,53,61,64]. Paneni i wsp. [65] na ludzkich komórkach śródbłonna aorty (human aortic endothelial cells; HAECs) stwierdzili aktywację mitochondrialnego białka p66 (Shc) przez izoformę β IIPKC w wyniku ekspozycji na wysokie stężenie glukozy, nawet po przywróceniu normoglikemii. Jako czynnik sprawczy autorzy wskazują hipometylację CpG i niekontrolowaną aktywację histonu 3 przez acetylację histonu 5 oraz fosforylację treoniny (Thr-495) genu endotelialnej syntazy tlenu azotu. U myszy z indukowaną cukrzycą typu 1 także potwierdzono ważną rolę metylacji (H3K4me1) czynnika NF- κ B, a zwłaszcza jednego z białek tej rodziny - RelA, oraz trimetylacji (H3K4me3) Serpiny 1 w indukowaniu zaburzeń śródbłonna [81]. W izolowanych kardiomiocytach narażonych na wysokie stężenie glukozy proces trimetylacji H3K9me3 promotora IL-6 przez histonową H3 metylotransferazę lizyny (Suv39h1) był odwrócony i nie ulegał normalizacji po zmianie środowiska hodowli na warunki normoglikemii, co odpowiada za nasilanie zaburzeń sercowo-naczyniowych w cukrzycy [92].

Badania *in vitro* (izolowane komórki śródbłonna tętnic) oraz *in vivo* (myszy) potwierdziły, że przewlekła hiperglikemia jest czynnikiem indukującym modyfikacje epigenetyczne histonów (przede wszystkim przez wpływ na aktywność SET7 i metylację histonów H3K4 jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B, ale wykluczyły metylację H3K9), a zmiany utrzymywały się niezależnie od stężenia hemoglobiny glikowanej (okresy normoglikemii poprzedzone hiperglikemią). Jako główny czynnik modyfikacji epigenetycznych, oprócz hiperglikemii *per se*, wskazano również na reaktywne intermediały przemian glukozy - metyloglikosol oraz nadmierną generację rodników tlenowych w mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów. Wykazano ponadto, że domena SET7 metylotransferazy może regulować zmiany chromatyny i ekspresję genów indukowane glikemią nie tylko w sposób zależny od metylacji H3K4m1, ale również w sposób niezależny. Obserwacje te potwierdzają istotną rolę modyfikacji epigenetycznych metylaz w dysfunkcji śródbłonna i rozwoju naczyniowych powikłań cukrzycy oraz wskazują na metylotransferazy, a zwłaszcza SET7, jako potencjalny cel przyszłych działań terapeutycznych [9,24].

Przytoczone wyniki badań wskazują na główną rolę domeny SET7 metylotransferaz w epigenetycznym mechanizmie modyfikacji histonów do powstawania i przetrwania zaburzeń indukowanych hiperglikemią oraz rozwoju powikłań naczyniowych cukrzycy. Należy zwrócić również uwagę, iż SET7/9 uczestniczy także w metylacji innych, niehistonowych białek (m.in. białka p53, p65 czy ERa) wpływając na intensywność i przebieg odczynu immunologicznego i reakcji zapalnej. Ponadto jako nowy mechanizm epigenetyczny regulacji genów wskazuje się metylację DNMT1 przez SET7/9, co może prowadzić do regulowanej przez proteasom degradacji białek, a „zabezpieczeniem” jest swoista demetylaza lizynowa 1A (lysine specific histone demethylase 1A;

LSD1A) odwracająca indukowane hiperglikemią zmiany (demetylacja lizyn H3Lys4 i H3Lys9). Równowaga między SET7/9 i LSD1A jest ważnym mechanizmem regulatorem modyfikacji epigenetycznych w komórkach. Ponadto wykazano zależność między monometylacją DNMT1 Lys142 przez SET7 i fosforylacją DNMT1 Ser143 przez kinazę AKT1 (serine/threonine-protein kinase1). Modyfikacje te wpływały na siebie wzajemnie - fosforylacja Ser143 zakłócała monometylację Lys142 i była bardziej trwała, ale sprzężanie histonów wpływało na komórkowy poziom DNMT1, co przekładało się na pobudzenie lub wyciszenie szlaków wewnątrzkomórkowych w warunkach przewlekłej lub ostrej hiperglikemii [9,25,71].

Niezwykle istotny, oprócz przedstawionych wyżej szlaków modyfikacji epigenetycznych, jest również ich bezpośredni wpływ na ekspresję genów odpowiedzialnych za stymulowane glukozą wydzielanie insuliny z komórek beta trzustki (geny *Ins1*, *Ins2*, *Slc2a2*). W badaniach na myszach wykazano, iż wyciszenie genu SET7/9 (knock-out) powoduje obniżenie stopnia dimetylacji H3Lys4m2, co zmienia ich ekspresję, wpływając na komórkowy wyrzut insuliny. Ze stwierdzonych obserwacji wynika istotna rola procesów metylacji, które w tym przypadku są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórek beta, przede wszystkim transportera GLUT2 kodowanego przez *Slc2a2* i normalizacji glikemii. Ich zaburzenie, zwłaszcza przez hamowanie aktywności SET7/9, powoduje defekt wydzielania insuliny z komórek beta trzustki w wyniku stymulowanego glukozą wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia, nasilając wtórnie hiperglikemię. Ponadto regulowała ekspresję indukowalnej izoformy cyklooksygenazy (cyclooxygenase-2; COX-2) przez metylację H3Lys4 w tych komórkach. Wykazano również jej udział w regulacji aktywności czynnika transkrypcyjnego swoistego dla trzustki i komórek β (pancreatic and duodenal homeobox1; Pdx1) i utrzymaniu funkcji komórek beta przez regulację metylacji (Lys131, ale nie Lys123) tego czynnika [17,29,59].

Udział modyfikacji epigenetycznych w rozwoju zaburzeń biochemicznych i klinicznych cukrzycy jest więc bezsporny, a niedawne badania wskazują szczególnie istotną rolę metylacji chromatyny w efekcie pamięci metabolicznej i rozwoju retinopatii cukrzycowej. Łączą się także z nabierającymi ostatnio coraz większego znaczenia, modyfikacjami z udziałem mikroRNA. Wiadomo, iż w cukrzycy mitochondria są źródłem zwiększonej generacji wolnych rodników tlenowych, a mechanizmy antyoksydacyjne są osłabione. W badaniach siatkówki szczurów z indukowaną cukrzycą wykazano istotną rolę metylacji histonów genu *Sod2* kodującego mitochondrialną dysmutazę ponadtlenkową manganozależną (Manganese Super Oxide Dismutase; MnSOD), a zmiany były trwałe, mimo następowego okresu dobrego wyrównania glikemii. Hiperglikemia zmniejszała mono- i dimetylację H3K4, a zwiększała wiązanie LSD1 i Sp1 do *Sod2*. Regulacja LSD1 przez LSD1-siRNA osłabiała indukowany

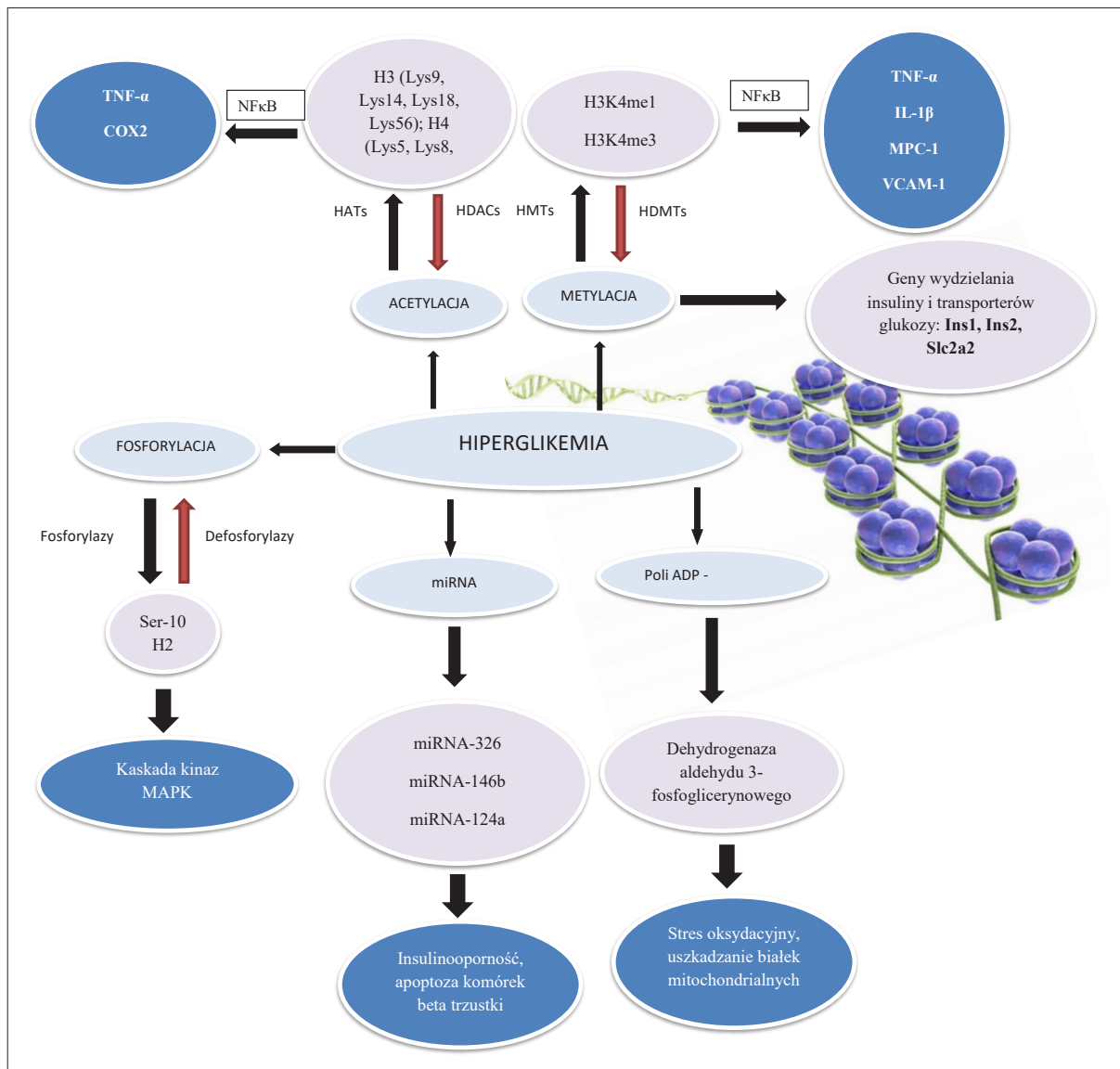
glukozą wzrost metylacji H3K4 Sod2 i zapobiegała spadkowi ekspresji tego genu. Obserwacje potwierdziły się również u ludzi z retinopatią cukrzycową, a enzymy ważne w metylacji histonów w siatkówce oka mogą się stać potencjalnym celem działań terapeutycznych do zahamowania rozwoju tego powikłania. Zaobserwowano również zmiany epigenetyczne czynnika transkrypcyjnego Nrf2 (nuclear factor-2), niezależnie od powrotu do normoglikemii. Wiązało się to z osłabieniem systemu obrony antyoksydacyjnej w układzie Nrf2-Gclc-GSH przez sekwencję ARE (składowa odpowiedzi antyoksydacyjnej) i przetrwałe nasilenie wytwarzania reaktywnych form tlenu. Nrf2 reguluje ekspresję Gclc - enzymu uczestniczącego w biosyntezie GSH. W cukrzycy wiązanie Nrf2 do ARE jest osłabione, a zaburzenie to jest właśnie pogłębiane przez modyfikacje epigenetyczne (zwiększenie H3K4me2 w Gclc-ARE4, zmniejszenie H3K4me3 i H3K4me1). Wykazano również udział modyfikacji epigenetycznych genu metaloproteinazy 9 (metaloproteinase-9; MMP-9) i mikroRNA odpowiedzialnego za nadmierną transkrypcję VEDF w rozwoju retinopatii cukrzycowej [50,63,94].

Drugim mechanizmem modyfikacji epigenetycznych białek histonowych rozpatrywanym w związku z przetrwałym rozwojem powikłań cukrzycowych jest acetylacja. W tego typu modyfikacji, w warunkach hiperglikemii, przeważają procesy aktywacji ekspresji acetylowanych białek histonowych. Wykazano nadmierną acetylację lizyn histonów H3 (pozycja: Lys9, Lys14, Lys18, Lys56) oraz H4 (pozycja: Lys5, Lys8, Lys14 i Lys16) w monocytach wyizolowanych od chorych na cukrzycę, zarówno typu 1 i 2. Hiperacetylacja w tych obszarach, przez wpływ na NF- κ B, indukowała ekspresję genów cytokin prozapalnych TNF- α i COX2. Ten sam zespół, w oparciu o dane z badań DCTT i EDIC, ocenił profil acetylacji H3 Lys9 (H3K9Ac), metylacji H3 Lys44 (H3K4Me3) i H3K9Me2 w monocytach i limfocytach pochodzących od 30 chorych leczonych konwencjonalnie, ze stwierdzonym rozwojem retinopatii lub nefropatii w ciągu 10 lat obserwacji oraz od 30 chorych poddanych intensywnemu leczeniu hipoglikemicznemu i bez tych powikłań. Wykazano istotnie zwiększoną acetylację H3K9Ac regionu promotorowego w monocytach od chorych poddanych jedynie konwencjonalnemu leczeniu, związaną z poziomem hemoglobiny glikowanej. Spowodowało to aktywację ponad 15 genów związanych z rozwojem powikłań cukrzycowych zależną od NF- κ B aktywacji szlaku reakcji zapalnych, co jest kolejnym potwierdzeniem roli modyfikacji epigenetycznych i zjawiska pamięci metabolicznej w cukrzycy [60,93]. Chen i wsp. [13], inkubując komórki śródbłonna ludzkiego (linia HUVEC) z wysokim stężeniem glukozy (25 mmol/l) w medium hodowlanym, zaobserwowali zwiększony poziom białka p300 (transkrypcyjny koaktywator o aktywności transferazy acetylowej histonów), co powodowało aktywację promotora genów endoteliny 1 i fibronektyny (zwiększona acetylacja), odpowiedzialnych za lokalną reakcję zapalną w śródbłonie naczyń. Ponadto zaobserwowali zwiększoną fosforylację histonu

H2AX i ekspresję mRNA, czynników wazoaktywnych i białek macierzy zewnątrzkomórkowej; intensywność reakcji zależała od stężenia glukozy. Autorzy wskazują, iż jest to jeden z mechanizmów rozwoju powikłań naczyniowych cukrzycy o epigenetycznym podłożu zapalnym i może być kolejnym, potencjalnym celem działań terapeutycznych w zapobieganiu powikłań naczyniowych cukrzycy.

Inne badania wskazują również na udział i znaczenie deacetylacji w rozwoju cukrzycy. Haberland i wsp. [37] w oparciu o wyniki analizy ludzkiego genomu (Genom Wide-Association Study; GWA), które to badania identyfikują czynniki ryzyka powszechnie występujących chorób cywilizacyjnych, m.in. cukrzycy, wykazali związek określonych loci na chromosomach (regiony 6q21 i 19q13) z rozwojem choroby, gdyż w regionach tych jest zakodowany właśnie gen deacetylazy histonów - HDAC2 oraz gen Sirtuiny 2 (silent information regulator 2; Sir2), należącej do rodziny deacetylaz histonowych, a proces deacetylacji łączy się z wyciszeniem ekspresji genów i różnicowaniem komórek. Ważnym aspektem przyszłych badań są sirtuiny, określane jako tzw. „geny długowieczności” (zarówno w cukrzycy jak i w populacji ogólnej) - wskazuje się na możliwość modyfikacji ich aktywności, jako poszukiwanie nowego szlaku działania dla leków przeciwcukrzycowych [19].

Jak wspomniano wcześniej, tylko pojedyncze dane odnoszą się do roli modyfikacji fosforylacyjnych w epigenetycznej hipotezie rozwoju cukrzycy i jej powikłań. Jedynie Chen i wsp. [13] wykazali fosforylację Ser-10 histonu H2, która zachodzi podczas aktywacji kaskady kinaz MAPK (mitogen-activated protein kinase) uczestniczących w aktywacji wielu szlaków przekazywania wewnątrzkomórkowego, m.in. w aktywacji odpowiedzi immunologicznej oraz reakcjach procesu zapalnego. Natomiast coraz więcej badań wskazuje na rolę niekodującego RNA (non-coding RNA; ncRNA) w przetrwałych modyfikacjach epigenetycznych w cukrzycy. Mechanizm epigenetycznej regulacji ekspresji genów (modyfikacje epigenetyczne w obrębie ncRNA), opisano dopiero pod koniec dwudziestego wieku. Do niekodującego RNA zalicza się m.in. mikroRNA (miRNA), tRNA, rRNA i krótkie nukleolarnie RNA (small nucleolar RNA; snoRNA). Oddziałują rozpoznając swoiste miejsca bądź sekwencje w DNA, RNA, kompleksach DNA z RNA, a także przez interakcje z białkami wiążącymi RNA (RNA-binding proteins; RBP). Część ncRNA aktywuje geny białek regulatorowych wpływających na strukturę chromatyny, np. białko HP1 (heterochromatin protein 1). Najlepiej poznanym mikroRNA i cieszącym się największym zainteresowaniem badaczy w ostatnich latach jest siRNA (small interfering RNA). Fragmenty niekodującego RNA są aktywnie transkrybowane z obu nici DNA i odgrywają istotną rolę w licznych procesach fizjologicznych i patologicznych, takich jak: różnicowanie komórek macierzystych układu krwiotwórczego, apoptoza, regulacja metabolizmu ksenobiotyków, odporność i stany zapalne, infekcje wirusowe i bakteryjne, cho-



Ryc. 3. Schemat głównych szlaków modyfikacji epigenetycznych histonów zachodzących w warunkach hiperglikemii związanych z rozwojem powikłań cukrzycowych (szczegóły w tekście)

roby nowotworowe, neurologiczne, a także cukrzyca [15,20,36,56]. W cukrzycy zaobserwowano, że w limfocytach występuje zwiększona ekspresja miRNA-326, co jest związane ze zwiększoną śmiertelnością komórek beta trzustki i rozwojem zaburzeń cukrzycowych. Zmiany w ekspresji miR-29 wiązały się z rozwojem insulinooporności, miR-146B ze zwiększoną apoptozą komórek beta wysp trzustkowych, a miR-124a uczestniczyły w procesie egzocytozy insuliny. Zmiany miRNA występowały nie tylko w komórkach trzustki, ale także w adipocytach, hepatocytach i kardiomiocytach, co wskazuje na ich istotną rolę w wielopłaszczyznowych zaburzeniach metabolicznych cukrzycy i chorób jej towarzyszących. Ponadto zaobserwowano wyciszenie genu SET7/9 w oddziaływaniu małych interferujących RNA w monocytach, co znacząco hamowało indukowanie genu pro-

zapalnego czynnika TNF-α i metylację Lys-4 histonu H3 jego promotora oraz adhezję monocytów do komórek śródbłonna lub komórek mięśni gładkich, wpływając na osłabienie i opóźnienie rozwoju powikłań naczyniowych cukrzycy. Wyciszenie monocytarnych genów SET7/9 za pomocą siRNA wyraźnie wpłynęło na zahamowanie genów prozapalnych indukowanych TNF-α, na metylację histonu H3-lizyna 4 występujących na promotorach tych genów jak i na proces adhezji monocytów do komórek endotelium lub mięśni gładkich. Inne badania wykazały indukowany hiperglikemią regulatorowy udział miR-146 w syntezie białek macierzy zewnątrzkomórkowej, a także miR-98 w komórkach śródbłonna, co w istotny sposób wpływa zarówno na rozwój mikro- jak i makroangiopatii cukrzycowych [26,33,52,53,55]. Najnowsze

badania przeprowadzone u transgenicznycy myszy z cukrzycą wskazały na istotną rolę nadekspresji miR-483-3p w nasilaniu apoptozy kardiomiocytów i rozwoju powikłań sercowo-naczyniowych przez tłumienie ekspresji insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (insulin growth factor 1; IGF1). Autorzy wskazują, iż może to być istotny szlak sygnalizacyjny indukowany hiperglikemią oraz potencjalny cel działań terapeutycznych w zapobieganiu rozwojowi makroangiopatii cukrzycowych [73]. Ważnym elementem modyfikacji epigenetycznych, dotyczącym pamięci metabolicznej i rozwoju powikłań naczyniowych cukrzycy uznano niedawno poli(ADP)-rybozylację. Badania wskazują na nasilanie stresu oksydacyjnego i uszkodzanie białek mitochondrialnych przez ADP-rybozylację dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH), głównego enzymu glikolizy, z udziałem polimerazy poli(ADP)-rybozy (PARP), która jest aktywowana w wyniku pojawiania się uszkodzeń DNA przez reaktywne formy tlenu, nasilając mechanizm błędnego koła tych zaburzeń [10]. Na ryc. 3 przedstawiono ogólny schemat głównych szlaków modyfikacji epigenetycznych histonów zachodzących w warunkach hiperglikemii związanych z rozwojem powikłań cukrzycowych.

PODSUMOWANIE

Z przedstawionych danych wynika, iż modyfikacje epigenetyczne to istotny, dotychczas niezbyt dokładnie

poznany, ale coraz bardziej doceniany element w patomechanizmie cukrzycy i patogenezie jej późnych powikłań naczyniowych uczestniczący w tzw. zjawisku pamięci metabolicznej. Obecnie można już z pewnością stwierdzić, iż jest to niezwykle ważne ogniwo łączące rozwój różnych chorób, nie tylko cukrzycy, ale również choroby nowotworowe czy neurodegeneracyjne, z predyspozycjami genetycznymi i czynnikami środowiskowymi. Przedstawione dane pozwalają na zrozumienie mechanizmu przetrwałej zmiany ekspresji genów (zmiany epigenetyczne materiału jądrowego na różnych poziomach) indukowanych hiperglikemią, mimo osiągnięcia zadowalających celów terapeutycznych (warunki normoglikemii). Wskazują na ich ważność w przebiegu choroby, ale także na potencjalną rolę pewnych modyfikowanych epigenetycznie składowych chromatyny w diagnostyce i leczeniu chorych na cukrzycę. Dokonujący się rozwój nowoczesnych technik badawczych pozwoli w przyszłości nie tylko na identyfikację i ilościowe oszacowanie stopnia określonych modyfikacji epigenetycznych, ich zastosowanie w diagnozowaniu i/lub prognozowaniu towarzyszących cukrzycy zaburzeń biochemicznych i klinicznych, ale także staną się prawdopodobnie nowym celem działań terapeutycznych w cukrzycy.

PIŚMIENICTWO

- [1] Aronson D.: Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Adv. Cardiol.*, 2008; 45: 1-16
- [2] Barrès R., Osler M.E., Yan J., Rune A., Fritz T., Caidahl K., Krook A., Zierath J.R.: Non-CpG methylation of the PGC-1 α promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. *Cell. Metab.*, 2009; 10: 189-198
- [3] Barrès R., Zierath J.R.: The role of diet and exercise in the transgenerational epigenetic landscape of T2DM. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2016; 12: 441-451
- [4] Bell C.G., Teschendorff A.E., Rakyan V.K., Maxwell A.P., Beck S., Savage D.A.: Genome-wide DNA methylation analysis for diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus. *BMC Med. Genomics*, 2010; 3: 33-42
- [5] Berry D., Melkus G.D.: Epidemiologic perspectives of risk for developing diabetes and diabetes complications. *Nurs. Clin. North Am.*, 2006; 41: 487-498
- [6] Bhaumik S.R., Smith E., Shilatifard A.: Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2007; 14: 1008-1016
- [7] Blaak E.E., Antoine J.M., Benton D., Björck I., Bozzetto L., Brouns F., Diamant M., Dye L., Hulshof T., Holst J.J., Lampert D.J., Laville M., Lawton C.L., Meheust A., Nilson A. i wsp.: Impact of postprandial glycaemia on health and prevention of disease. *Obes. Rev.*, 2012; 13: 923-984
- [8] Bloomgarden Z.T.: The future of diabetes. *Can. J. Diabetes*, 2015; 39: 204-205
- [9] Brasacchio D., Okabe J., Tikellis C., Balcerczyk A., George P., Baker E.K., Calkin A.C., Brownlee M., Cooper M.E., El-Osta A.: Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that coexist on the lysine tail. *Diabetes*, 2009; 58: 1229-1236
- [10] Brownlee M.: The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, 2005; 54: 1615-1625
- [11] Brunet A., Berger S.L.: Epigenetics of aging and aging-related disease. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 2014; 69: S17-S20
- [12] Ceriello A.: The emerging challenge in diabetes: the «metabolic memory». *Vascul. Pharmacol.*, 2012; 57: 133-138
- [13] Chen S., Feng B., George B., Chakrabarti R., Chen M., Chakrabarti S.: Transcriptional coactivator p300 regulates glucose-induced gene expression in the endothelial cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2010; 298: E127-E137
- [14] Colagiuri R.: Diabetes: a pandemic, a development issue or both? *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.*, 2010; 8: 305-309
- [15] Costa F.F.: Non-coding RNA-s, epigenetics and complexity. *Gene*, 2008; 410: 9-17
- [16] Dang M.N., Buzzetti R., Pozzilli P.: Epigenetics in autoimmune diseases with focus on type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2013; 29: 8-18
- [17] Deering T.G., Ogihara T., Trace A.P., Maier B., Mirmira R.G.: Methyltransferase Set 7/9 maintains transcription and euchromatin structure at islet-enriched genes. *Diabetes*, 2009; 58: 185-193

- [18] DeFronzo R.A.: Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*, 2009; 58: 773-795
- [19] Dembińska-Kieć A.: „Pamięć metaboliczna” – epigenetyczne modyfikacje materiału jądrowego jako przyczyna powikłań cukrzycy. *Diagnostyka Lab.*, 2011; 47: 263-268
- [20] Dmitrzak-Węglarz M., Hauser J.: Mechanizmy epigenetyczne w chorobach psychicznych i zaburzeniach funkcji poznawczych. *Psychiatria*, 2009; 6: 51-60
- [21] Drong A.W., Lindgren C.M., McCarthy M.I.: The genetic and epigenetic basis of type 2 diabetes and obesity. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2012; 92: 707-715
- [22] Einstein F., Thompson R.F., Bhagat T.D., Fazzari M.J., Verma A., Barzilai N., Grealley J.M.: Cytosine methylation dysregulation in neonates following intrauterine growth restriction. *PLoS One*, 2010; 5: e8887
- [23] Ekström T.J., Stenvinkel P.: The epigenetic conductor: a genomic orchestrator in chronic kidney disease complications? *J. Nephrol.*, 2009; 22: 442-449
- [24] El-Osta A., Brasacchio D., Yao D., Pocai A., Jones P.L., Roeder R.G., Cooper M.E., Brownlee M.: Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J. Exp. Med.*, 2008; 205: 2409-2417
- [25] Estève P.O., Chang Y., Samaranyake M., Upadhyay A.K., Horton J.R., Feehery G.R., Cheng X., Pradhan S.: A methylation and phosphorylation switch between an adjacent lysine and serine determines human DNMT1 stability. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2011; 18: 42-48
- [26] Feng B., Chen S., McArthur K., Wu Y., Sen S., Ding Q., Feldman R.D., Chakrabarti S.: miR-146a-Mediated extracellular matrix protein production in chronic diabetes complications. *Diabetes*, 2011; 60: 2975-2984
- [27] Fernández-García J.C., Cardona F., Tinahones F.J.: Inflammation, oxidative stress and metabolic syndrome: dietary modulation. *Curr. Vasc. Pharmacol.*, 2013; 11: 906-919
- [28] Fu Q., Yu X., Callaway C.W., Lane R.H., McKnight R.A.: Epigenetics: intrauterine growth retardation (IUGR) modifies the histone code along the rat hepatic IGF-1 gene. *FASEB J.*, 2009; 23: 2438-2449
- [29] Fujimaki K., Ogihara T., Morris D.L., Oda H., Iida H., Fujitani Y., Mirmira R.G., Evans-Molina C., Watada H.: SET7/9 enzyme regulates cytokine-induced expression of inducible nitric-oxide synthase through methylation of lysine 4 at histone 3 in the islet β cell. *J. Biol. Chem.*, 2015; 290: 16607-16618
- [30] Gao D., Bailey C.J., Griffiths H.R.: Metabolic memory effect of the saturated fatty acid, palmitate, in monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009; 388: 278-282
- [31] Giaccari A., Soric G., Muscogiuri G.: Glucose toxicity: the leading actor in the pathogenesis and clinical history of type 2 diabetes – mechanisms and potentials for treatment. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 2009; 19: 365-377
- [32] Giacco F., Brownlee M.: Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.*, 2010; 107: 1058-1070
- [33] Gilbert E.R., Liu D.: Epigenetics: the missing link to understanding β -cell dysfunction in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Epigenetics*, 2012; 7: 841-852
- [34] Gregg E.W., Ali M.K., Moore B.A., Pavkov M., Devlin H.M., Garfield S., Mangione C.M.: The importance of natural experiments in diabetes prevention and control and the need for better health policy research. *Prev. Chronic Dis.*, 2013; 10: E14
- [35] Greißel A., Culmes M., Napieralski R., Wagner E., Gebhard H., Schmitt M., Zimmermann A., Eckstein H.H., Zerneck A., Pelisek J.: Alternation of histone and DNA methylation in human atherosclerotic carotid plaques. *Thromb. Haemost.*, 2015; 114: 390-402
- [36] Gruber B.M.: Epigenetyka a etiologia chorób neurodegeneracyjnych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 542-551
- [37] Haberland M., Montgomery T.L., Olson E.N.: The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.*, 2009; 10: 32-42
- [38] Heijmans B.T., Tobi E.W., Stein A.D., Putter H., Blauw G.J., Susser E.S., Slagboom P.E., Lumey L.H.: Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 17046-17049
- [39] Hu F.B.: Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes Care*, 2011; 34: 1249-1257
- [40] Ihnat M.A., Thorpe J.E., Kamat C.D., Szabó C., Green D.E., Warnke L.A., Lacza Z., Cselenyák A., Ross K., Shakir S., Piconi L., Kaltreider R.C., Ceriello A.: Reactive oxygen species mediate a cellular ‘memory’ of high glucose stress signaling. *Diabetologia*, 2007; 50: 1523-1531
- [41] Jagielski A.K., Piesiewicz A.: Cukrzyca wyzwaniem dla medycyny XXI wieku - wnioski z badań klinicznych i biochemicznych. *Postępy Biochemii*, 2011; 57: 191-199
- [42] Jiang M., Zhang Y., Liu M., Lan M.S., Fei J., Fan W., Gao X., Lu D.: Hypermethylation of hepatic glucokinase and L-type pyruvate kinase promoters in high-fat diet induced obese rats. *Endocrinology*, 2011; 152: 1284-1289
- [43] Josselyn S., Frankland P.W.: Another twist in the histone memory code. *Cell Res.*, 2015; 25: 151-152
- [44] Kalozoumi G., Tzimas C., Sanoudou D.: The expanding role of epigenetics. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.*, 2012; 2012: 7
- [45] Kaneto H.: Pancreatic β -cell glucose toxicity in type 2 diabetes mellitus. *Curr. Diabetes Rev.*, 2015; 11: 2-6
- [46] Ke X., Schober M.E., McKnight R.A., O’Grady S., Caprau D., Yu X., Callaway C.W., Lane R.H.: Intrauterine growth retardation affects expression and epigenetic characteristics of the rat hippocampal glucocorticoid receptor gene. *Physiol. Genomics*, 2010; 42: 177-189
- [47] Keating S.T., El-Osta A.: Epigenetic changes in diabetes. *Clin. Genet.*, 2013; 84: 1-10
- [48] Kieć-Klimczak M., Kieć-Wilk B., Polus A., Siedlecka D., Jamrozik P., Chudy A., Stępień E., Wybrańska I., Malczewska-Malec M.: Hiper-glikemia, „pamięć metaboliczna” i rozwój naczyniowych powikłań cukrzycy. *Czynniki Ryzyka*, 2011; 2: 47-51
- [49] Kim M., Long T.I., Arakawa K., Wang R., Yu M.C., Laird P.W.: DNA methylation as a biomarker for cardiovascular disease risk. *PLoS One*, 2010; 5: e9692
- [50] Kowluru R.A., Santos J.M., Mishra M.: Epigenetic modifications and diabetic retinopathy. *Biomed. Res. Int.*, 2013; 2013: 635284
- [51] Kulczycka A., Bednarek I., Dzierżewicz Z.: Modyfikacje epigenetyczne jako potencjalne cele terapii antynowotworowych. *Ann. Acad. Med. Siles.*, 2013; 67: 201-208
- [52] Li X.X., Liu Y.M., Li Y.J., Xie N., Yan Y.F., Chi Y.L., Zhou L., Xie S.Y., Wang P.Y.: High glucose concentration induces endothelial cell proliferation by regulating cyclin-D2-related miR-98. *J. Cell. Mol. Med.*, 2016; 20: 1159-1169
- [53] Li Y., Reddy M.A., Miao F., Shanmugam N., Yee J.K., Hawkins D., Ren B., Natarajan R.: Role of the histone H3 lysine 4 methyltransferase, SET 7/9, in the regulation of NF κ B – dependent inflammatory genes. Relevance to diabetes and inflammation. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 26771-26781
- [54] Ling C., Del Guerra S., Lupi R., Rönn T., Granhall C., Luthman H., Masiello P., Marchetti P., Groop L., Del Prato S.: Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion. *Diabetologia*, 2008; 51: 615-622
- [55] Ling C., Groop L.: Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes*, 2009; 58: 2718-2725

- [56] Liu X., Fortin K., Mourelatos Z.: MicroRNAs: biogenesis and molecular functions. *Brain Pathol.*, 2008; 18: 113-121
- [57] Łukasik M., Karmalska J., Szutowski M.M., Łukaszkiwicz J.: Wpływ metylacji DNA na funkcjonowanie genomu. *Biul. Wydz. Farm. WUM*, 2009; 2: 13-18
- [58] Madsen-Bouterse S.A., Mohammad G., Kanwar M., Kowluru R.A.: Role of mitochondrial DNA damage in the development of diabetic retinopathy, and the metabolic memory phenomenon associated with its progression. *Antioxid. Redox Signal.*, 2010; 13: 797-805
- [59] Maganti A.V., Maier B., Tersey S.A., Sampley M.L., Mosley A.L., Özcan S., Pachaiyappan B., Woster P.M., Hunter C.S., Stein R., Mirmira R.G.: Transcriptional activity of the islet β cell factor Pdx1 is augmented by lysine methylation catalyzed by the methyltransferase Set7/9. *J. Biol. Chem.*, 2015; 290: 9812-9822
- [60] Miao F., Gonzalo I.G., Lanting L., Natarajan R.: *In vivo* chromatin remodeling events leading to inflammatory gene transcription under diabetic conditions. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 18091-18097
- [61] Miao F., Wu X., Zhang L., Yuan Y.C., Riggs A.D., Natarajan R.: Genome-wide analysis of histone lysine methylation variations caused by diabetic conditions in human monocytes. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 13854-13863
- [62] Mishra M., Kowluru R.A.: Retinal mitochondrial DNA mismatch repair in the development of diabetic retinopathy, and its continued progression after termination of hyperglycemia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2014; 55: 6960-6967
- [63] Mishra M., Zhong Q., Kowluru R.A.: Epigenetic modifications of Nrf2-mediated glutamate-cysteine ligase: implications for the development of diabetic retinopathy and the metabolic memory phenomenon associated with its continued progression. *Free Radic. Biol. Med.*, 2014; 75: 129-139
- [64] Okabe J., Orłowski C., Balcerczyk A., Tikellis C., Thomas M.C., Cooper M.E., El-Osta A.: Distinguishing hyperglycemic changes by Set7 in vascular endothelial cells. *Circ. Res.*, 2012; 110: 1067-1076
- [65] Paneni F., Mocharla P., Akhmedov A., Costantino S., Osto E., Volpe M., Lüscher T.F., Cosentino F.: Gene silencing of the mitochondrial adaptor p66(Shc) suppresses vascular hyperglycemic memory in diabetes. *Circ. Res.*, 2012; 111: 278-289
- [66] Park J.H., Stoffers D.A., Nicholls R.D., Simmons R.A.: Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J. Clin. Invest.*, 2008; 118: 2316-2324
- [67] Petronis A., Gottesman I.I., Kan P., Kennedy J.L., Basile V.S., Patterson A.D., Pependikyte V.: Monozygotic twins exhibit numerous epigenetic differences: clues to twin discordance? *Schizophr. Bull.*, 2003; 29: 169-178
- [68] Picascia A., Grimaldi V., Pignalosa O., De Pascale M.R., Schiano C., Napoli C.: Epigenetic control of autoimmune diseases: from bench to bedside. *Clin. Immunol.*, 2015; 157: 1-15
- [69] Poirier L.A., Brown A.T., Fink L.M., Wise C.K., Randolph C.J., Delongchamp R.R., Fonseca V.A.: Blood S-adenosylmethionine concentrations and lymphocyte methylenetetrahydrofolate reductase activity in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Metabolism*, 2001; 50: 1014-1018
- [70] Pokrywka M., Kieć-Wilk B., Polus A., Wybrańska I.: Metylacja DNA a otyłość prosta. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 1383-1391
- [71] Pradhan S., Chin H.G., Estève P.O., Jacobsen S.E.: SET7/9 mediated methylation of nonhistone proteins in mammalian cells. *Epigenetics*, 2009; 4: 383-387
- [72] Prattichizzo F., Giuliani A., Ceka A., Rippon M.R., Bonfigli A.R., Testa R., Procopio A.D., Olivieri F.: Epigenetic mechanisms of endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Clin. Epigenetics*, 2015; 7: 56
- [73] Qiao Y., Zhao Y., Liu Y., Ma N., Wang C., Zou J., Liu Z., Zhou Z., Han D., He J., Sun Q., Liu Y., Xu C., Du Z., Huang H.: miR-483-3p regulates hyperglycaemia-induced cardiomyocyte apoptosis in transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2016; 477: 541-547
- [74] Reddy M.A., Zhang E., Natarajan R.: Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory. *Diabetologia*, 2015; 58: 443-455
- [75] Rönn T., Ling C.: DNA methylation as a diagnostic and therapeutic target in the battle against type 2 diabetes. *Epigenomics*, 2015; 7: 451-460
- [76] Salem S.D., Saif-Ali R., Ismail I.S., Al-Hamodi Z., Muniandy S.: Contribution of SLC30A8 variants to the risk of type 2 diabetes in a multi-ethnic population: a case control study. *BMC Endocr. Disord.*, 2014; 14: 2
- [77] Sapienza C., Lee J., Powell J., Erinle O., Yafai F., Reichert J., Siraj E.S., Madaio M.: DNA methylation profiling identifies epigenetic differences between diabetes patients with ESRD and diabetes patients without nephropathy. *Epigenetics*, 2011; 6: 20-28
- [78] Seman N.A., Mohamud W.N., Östenson C.G., Brismar K., Gu H.F.: Increased DNA methylation of the SLC30A8 gene promoter is associated with type 2 diabetes in a Malay population. *Clin. Epigenetics*, 2015; 7: 30
- [79] Stankov K., Benc D., Draskovic D.: Genetic and epigenetic factors in etiology of diabetes mellitus type 1. *Pediatrics*, 2013; 132: 1112-1122
- [80] Stenvinkel P., Karimi M., Johansson S., Axelsson J., Suliman M., Lindholm B., Heimbürger O., Barany P., Alvestrand A., Nordfors L., Qureshi A.R., Ekström T.J., Schalling M.: Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation - a novel risk factor for cardiovascular disease? *J. Intern. Med.*, 2007; 261: 488-499
- [81] Takizawa F., Mizutani S., Ogawa Y., Sawada N.: Glucose-independent persistence of PAI-1 gene expression and H3K4 tri-methylation in type 1 diabetic mouse endothelium: implication in metabolic memory. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013; 433: 66-72
- [82] Tan Q., Christiansen L., von Bornemann Hjelmberg J., Christensen K.: Twin methodology in epigenetic studies. *J. Exp. Biol.*, 2015; 218: 134-139
- [83] Tang Z.H., Fang Z., Zhou L.: Human genetics of diabetic vascular complications. *J. Genet.*, 2013; 92: 677-694
- [84] Tewari S., Zhong Q., Santos J.M., Kowluru R.A.: Mitochondria DNA replication and DNA methylation in the metabolic memory associated with continued progression of diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2012; 53: 4881-4888
- [85] Thompson R.F., Fazzari M.J., Niu H., Barzilai N., Simmons R.A., Grealley J.M.: Experimental intrauterine growth restriction induces alterations in DNA methylation and gene expression in pancreatic islets of rats. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 15111-15118
- [86] Tobi E.W., Lumey L.H., Talens R.P., Kremer D., Putter H., Stein A.D., Slagboom P.E., Heijmans B.T.: DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum. Mol. Genet.*, 2009; 18: 4046-4053
- [87] VanderJagt T.A., Neugebauer M.H., Morgan M., Bowden D.W., Shah V.O.: Epigenetic profiles of pre-diabetes transitioning to type 2 diabetes and nephropathy. *World J. Diabetes*, 2015; 6: 1113-1121
- [88] Varga Z.V., Gircz Z., Liaudet L., Haskó G., Ferdinandy P., Pacher P.: Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy. *Biochim. Biophys. Acta*, 2015; 1852: 232-242
- [89] Villeneuve L.M., Reddy M.A., Natarajan R.: Epigenetics: deciphering its role in diabetes and its chronic complications. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2011; 38: 451-459
- [90] Wegner M., Pioruńska-Stolzmann M., Jagodziński P.P.: Wpływ modyfikacji struktury chromatyny na rozwój przewlekłych powikłań cukrzycowych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015; 69: 964-968

[91] Wright E. Jr., Scism-Bacon J.L., Glass L.C. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *Int. J. Clin. Pract.*, 2006; 60: 308-314

[92] Yu X.Y., Geng Y.J., Liang J.L., Zhang S., Lei H.P., Zhong S.L., Lin Q.X., Shan Z.X., Lin S.G., Li Y.: High levels of glucose induce „metabolic memory” in cardiomyocyte via epigenetic histone H3 lysine 9 methylation. *Mol. Biol. Rep.*, 2012; 39: 8891-8898

[93] Yun J.M., Jialal I., Devaraj S.: Epigenetic regulation of high glucose-induced proinflammatory cytokine production in monocytes by curcumin. *J. Nutr. Biochem.*, 2011; 22: 450-458

[94] Zhong Q., Kowluru R.A.: Epigenetic modification of Sod2 in the development of diabetic retinopathy and in the metabolic memory: role of histone methylation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2013; 54: 244-250

Autorki deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.