

AGNIESZKA SZPECHT-POTOCKA
*Zakład Genetyki Medycznej
Instytut Matki i Dziecka
Kasprzaka 17A, 01-211 Warszawa
e-mail: aspotocka@hotmail.com*

ZDROWY I CHORY „GORSET” DNA, CZYLI MEDYCZNE ASPEKTY EPIGENETYKI

WSTĘP

Większość komórek organizmu ssaka zawiera ten sam zestaw genów, a jednak cechy zewnętrzne i funkcje komórek są niekiedy skrajnie różne. Różnicowanie komórkowo-tkankowe jest w zasadzie nieodwracalne, a jednak potencjalnie każda dojrzała komórka może stać się totipotenna. Te indywidualne, specyficzne właściwości komórek i ich niezwykła plastyczność są wynikiem selektywnej ekspresji i represji genów. Ekspresja genów odpowiedzialnych za proces różnicowania, utrzymywania w ciągu życia specyficznych właściwości poszczególnych tkanek i plastyczność komórek stanowią wypadkową bezpośrednich zmian w sekwencji DNA oraz oddziaływań o charakterze epigenetycznym, do których m. in. należą: metylacja DNA, modyfi-

kacje białek histonowych (acetylacja, fosforylacja, metylacja, ubikwitynizacja), rodzicielskie piętno genomowe (GI), oddziaływania białek Polycomb i Trithorax, interferencja RNA. Wzór tych modyfikacji tworzy tzw. epigenotyp, którego dynamicznym wpływem podlega chromatyna, czyli DNA wraz z białkami histonowymi. Poznanie i zrozumienie mechanizmów epigenetycznych, modyfikujących ekspresję genów i biorących udział w rozwoju ssaków ma kluczowe znaczenie dla medycyny. Wiedza ta znajduje zastosowanie w badaniach prowadzonych w kierunku klonowania terapeutycznego, klinicznego zastosowania komórek macierzystych, w terapii nowotworów i chorób genetycznie uwarunkowanych oraz w diagnostyce molekularnej.

EPIGENETYKA A ROZWÓJ

Rozwój organizmu jest procesem niezwykle uporządkowanym – zaczyna się od totipotentnej zygoty i kończy na wykształceniu wielu typów wyspecjalizowanych komórek dorosłego osobnika. Do „zbudowania” ludzkiego organizmu potrzebnych jest około 40000 genów, których prawidłowe działanie prowadzi do wytworzenia około 200 tkanek, które dalej różnicują się w coraz bardziej wyspecjalizowane grupy komórek. Zdolność pozyskania i utrzymania sprawnie działającego wzoru ekspresji genów jest krytyczna dla indywidualnej

komórki, jednocześnie zapewniając poprawne funkcjonowanie organizmu w otoczeniu. Jednak każda dojrzała komórka potencjalnie może stać się znów totipotenna. Mechanizmy zapewniające zróżnicowanej komórce odnowienie „molekularnej pamięci” z poszczególnych etapów jej rozwoju nie są związane ze zmianami w sekwencji DNA, ale mają charakter epigenetyczny, czyli dotyczą dziedziczonych klonalnie, potencjalnie odwracalnych modyfikacji chromatyny (SURANI 2001). Te, choć naturalnie stabilne, mogą ulegać zmianom pod

wpływem różnych czynników, zarówno wewnątrzkomórkowych, jak i środowiskowych. Ssaczy genom dysponuje ponadto dodatkowym, wysoce wyspecjalizowanym poziomem epigenetycznej informacji – molekularną pamięcią dotyczącą rodzicielskiego pochodzenia, tzw. rodzicielskim piętnem genomowym nadawanym w linii rozrodczej (REIK i WALTER 2001). Ten typ modyfikacji prowadzi do strukturalnych i funkcjonalnych różnic między matczynym i ojcowskim genomem – asymetrii (FERGUSON-SMITH i SURANI 2001). Pociąga to za sobą konieczność rozwinęcia przez oocyt wielu właściwości, które są potrzebne do utrzymania tej asymetrii rodzicielskich genomów w zygocie a potem w dojrzałych komórkach organizmu.

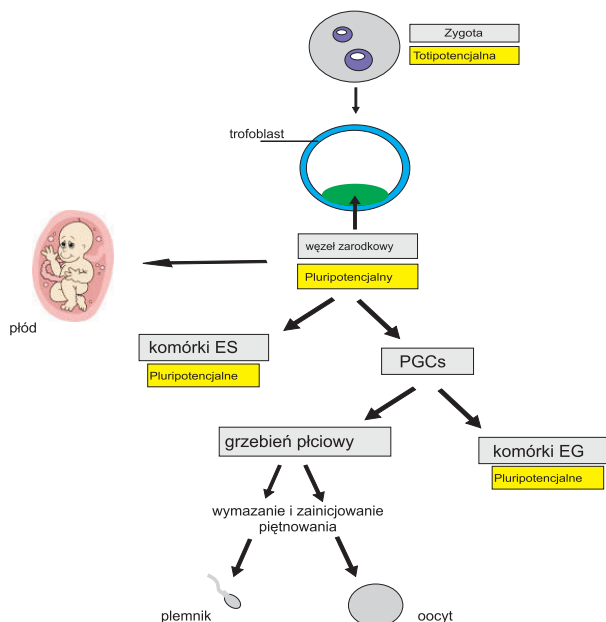
Połączenie plemnika z komórką jajową rozpoczyna proces reprogramowania zygoty. W

czasie pierwszych podziałów dochodzi do całkowitej demetylacji DNA, następstwem czego są procesy metylacji *de novo* występujące po implantacji zarodka. W komórkach zawiązka linii płciowej (PGCs), w czasie gdy zaczynają migrować do grzebienia płciowego, dochodzi do „wymazania” istniejących epigenetycznych modyfikacji – rodzicielskie genomy ulegają m.in. całkowitej demetylacji, nieaktywny chromosom X podlega reaktywacji w zawiązku żeńskiej linii rozrodczej, telomery powracają do optymalnej wielkości, a DNA poddawane jest procesom naprawczym. Usuwane są też ewentualne błędy we wzorach modyfikacji DNA, czyli epimutacje, które w rezultacie są rzadkie.

EPIGENETYKA A KLONOWANIE

Podobne procesy mają miejsce w przypadku transplowania jądra komórki somatycznej do komórki jajowej. Eksperymenty klonowania u ssaków wskazują bowiem, że jądro dojrzałej, zróżnicowanej komórki może zainicjować rozwój embrionalny po transplatacji do pozbawionego jądra oocyta. Zmiany mają przywrócić totipotencję somatycznemu jądro na drodze epigenetycznego reprogramowania i dotyczą prawdopodobnie „wymazania” istniejącego GI i rewersji do embrionalnego wzoru ekspresji genów. Na tym etapie możliwe jest kontynuowanie rozwoju *in vivo* lub różnicowanie *in vitro* pluripotentnych embrionalnych komórek macierzystych (Rys. 1). Znajomość natury i sekwencji mechanizmów epigenetycznych nabiera więc ogromnego znaczenia dla eksperymentów klonowania oraz manipulacji komórkami macierzystymi i określania potencjalnych możliwości ich różnicowania (Rys. 2). Wiadomo na przykład, że sposób w jaki macierzyste komórki ES i EG reprogramują transplantowane somatyczne jądra jest odzwierciedleniem ich właściwości odziedziczonych od prekursorów, czyli odpowiednio komórek węzła zarodkowego i PGCs. Zasadnicza różnica dotyczy unikalnej zdolności komórek EG do „wymazywania” wzoru rodzicielskiego epigenotypu, której nie posiadają ES, oocyty i wczesne zarodki. Dlatego też poznanie specyficznych właściwości i zdolności reprogramowania przez poszczególne

typy embrionalnych komórek macierzystych i wczesne zarodki jest niezwykle ważne do określenia molekularnej i komórkowej natury oraz



Ryc. 1. Wczesny rozwój ssaka i źródła pluripotentnych komórek macierzystych.

sposobu osiągnięcia i utrzymania stanu plurilub totipotencji – właściwości, które niosą ze sobą ogromne możliwości medycznego zastosowania.

Ale eksperymenty klonowania stanowią jednocześnie dowód na to, że wiedza na temat przeprogramowywania genomu ssaka jest fragmentaryczna, ponieważ większość klonowanych zarodków ginie wkrótce po implantacji. Te, które przeżywają do urodzenia, często wykazują anomalie rozwojowe i, jak się wydaje, cechuje je też krótsza przeżywalność (WAKAYAMA i współaut. 2000). Reprogramowanie transplantowanych somatycznych jąder komórkowych jest więc niekompletne w porównaniu do tego, które ma miejsce w zapłodnionej w naturalny sposób komórce jajowej (LI 2002). Nasuwa się pytanie, które molekularne mechanizmy przeprogramowywania genomu ulegają zaburzeniu w czasie klonowania? Badania na klonowanych bydłych zarodkach wskazują, że długość telomerów podlegających skracaniu w komórkach somatycznych może zostać przywrócona. Jednak już proces całkowitej demetylacji genomu przed implantacją jest mniej wydajny i do metylacji *de novo* dochodzi na wcześniejszym etapie rozwoju klonowanego zarodka niż w warunkach naturalnych (KANG i współaut. 2001, BOURC'HIS i współaut. 2001). Nieprawidłowe reprogramo-

wanie metylacji DNA może być bardzo poważne w skutkach ponieważ może powodować wadliwą ekspresję kluczowych dla rozwoju embrionalnego genów. W klonowanych mysich blastocystach ekspresja genu *Oct4* jest wyraźnie zredukowana w węzle zarodkowym, w porównaniu do blastocyst powstających w drodze naturalnego zapłodnienia. Produkt *Oct4* jest czynnikiem transkrypcyjnym specyficznie ekspresjonowanym w komórkach ES i PGD_c, warunkując m. in. ich pluripotentność. Podobnie, analiza aktywności transkrypcyjnej genów podlegających piętnowaniu w klonowanych zarodkach myszy wykazuje, że chociaż ich monoalleliczna rodzicielska ekspresja jest zachowana, to poziom ekspresji w łożysku jest niższy (INOUE i współaut. 2002). Biorąc pod uwagę fakt, że piętnowane geny mają zazwyczaj charakter regulatorowy, a ich produkty są ważnymi czynnikami rozwojowymi, zaburzenie ich ekspresji oraz genu *Oct4* może prowadzić do często występujących podczas klonowania defektów łożyska, katastrofalnych w skutkach dla samego zarodka.

KOMÓRKI MACIERZYSTE DLA MEDYCYNY

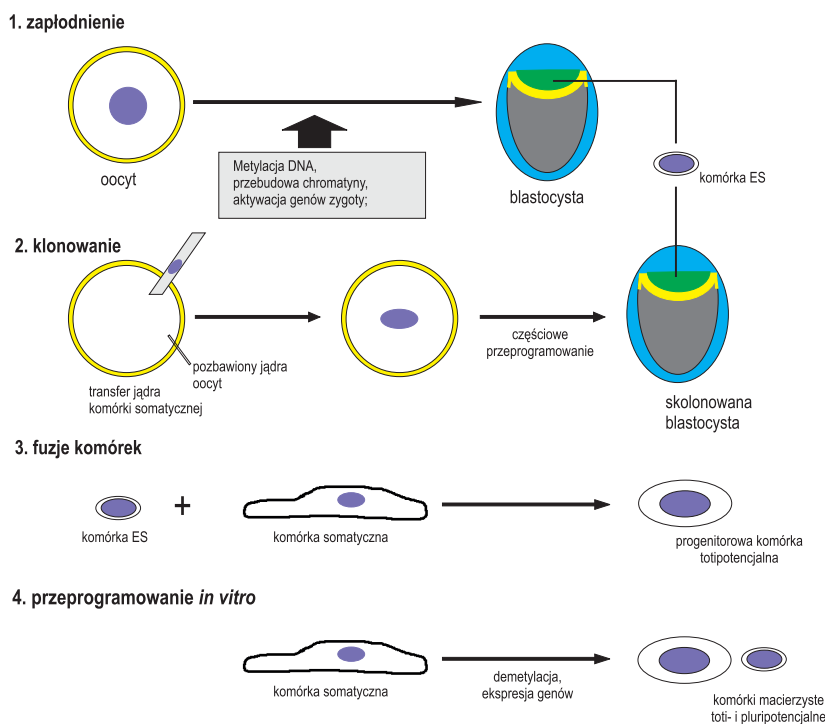
Mimo naszej skromnej wiedzy na temat epigenetycznej kontroli ekspresji genomu w czasie rozwoju ssaka, procedury klonowania znajdują już zastosowanie w medycynie regeneracyjnej i transplantologii (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH 2001). Wiadomo jest bowiem, że z klonowanych zarodków pochodzących ze zróżnicowanych somatycznych jąder, można izolować pluripotentne komórki ES (WAKAYAMA i współaut. 2001). Dowodzi to, że epigenetyczne reprogramowanie transplantowanych somatycznych jąder w oocytach jest wystarczające do odróżnicowania dojrzałej komórki i przekształcenia jej w pluripotentną komórkę macierzystą (WILMUT i współaut. 1997). Jeśli proces odróżnicowania dojrzałej komórki można będzie przeprowadzić *in vitro*, omijając skomplikowane procedury klonowania, to można będzie otrzymywać do celów terapeutycznych pluripotentne komórki macierzyste z dostępnych w Nielimitowanych ilościach tkanek. Reprogramowanie somatycznego jądra *in vitro* można obecnie osiągnąć poprzez fuzję komórki somatycznej (neuronu, limfocyty) z macierzystą komórką

embrionalną. Nie osiągnięto jeszcze etapu, na którym możliwe stałoby się odróżnicowanie dojrzałej komórki somatycznej w pluripotentną somatyczną komórkę macierzystą (Rys. 2).

Somatyczne, nieembrionalne komórki macierzyste występują w dojrzałym organizmie nielicznie, zasiedlając specyficzne nisze pomiędzy wyspecjalizowanymi komórkami tkanki lub narządu, a ich głównym celem jest odnawianie tkanki, w której rezydują (RATAJCZAK i współaut. 2003). Stanowią zwykle heterogenne populacje komórek macierzystych. Występują w mózgu, szpiku, mięśniach szkieletowych, skórze, wątrobie, siatkówce i rogówce. Komórki te są ukierunkowane tkankowo co oznacza, że *in vivo* nie wykazują plastyczności, czyli nie są w stanie różnicować się we wszystkie typy komórek. Obserwowana *in vitro* zdolność transdyferencjacji jest prawdopodobnie w warunkach naturalnych zjawiskiem niezwykle rzadkim. Plastyczność jaką kiedyś przypisywano tym komórkom tłumaczy się obecnie zdolnością do fuzji z komórkami zróżnicowanymi, możliwością indukowania epigene-

tycznych zmian podczas hodowli *in vitro* oraz heterogennością populacji tych komórek. Ich występowanie w różnych tkankach jest najprawdopodobniej efektem krążenia w ustroju i współzawodnictwem o nisze narządowe, które dzięki temu mogą zawierać domieszki somatycznych komórek macierzystych innych tkanek (TADA i współaut. 2001). Nieembrionalne

komórki macierzyste mają również ograniczoną zdolność do podziałów. Mimo to, są źródłem komórek dla procesów regeneracyjnych i mogą służyć do terapii jako komórki własne pacjenta, likwidując problem odpowiedzi immunologicznej.



Ryc. 2. Epigenetyczne reprogramowanie genomu.

1. W czasie naturalnego zapłodnienia – powstaje totipotentna blastocysta, która daje początek ciału zarodka i tkankom pozazarodkowym. Komórki ES, które pochodzą z węzła zarodkowego mogą różnicować się w prawidłowy zarodek, ale nie w tkanki pozazarodkowe. 2. Jądro komórki somatycznej może ulec przeprogramowaniu w pozbawionym swojego jądra oocycie. Ze sklonowanych w ten sposób blastocyst można pozyskiwać pluri-potentne komórki ES. 3. Totipotentne komórki progenitorowe można uzyskać na drodze fuzji komórki ES z komórką somatyczną np. neuronem lub limfocytom. 4. Jak dotąd nie jest możliwe przeprogramowanie komórki somatycznej w pluripotentną komórkę macierzystą.

TERAPIA KOMÓRKOWA

Od wielu lat podejmowane są próby leczenia metodami komórkowej terapii zastępczej chorób neurodegeneracyjnych, takich jak: choroba Parkinsona (PD), Huntingtona (HD), Alzheimer (AD), stwardnienie rozsiane (SM), stwardnienie zanikowe boczne. W chorobach tych dochodzi do zaniku specyficznych populacji komórek nerwowych np.: neuronów dopaminergicznych (w PD), neuronów cholinergicznych (w AD), motoneuronów (stwardnienie zanikowe boczne), oligodendrocytów (w SM). Zanik czynności neuronów obserwuje się także w procesach starzenia się mózgu, w

demencjach związanych z AIDS oraz w udarze mózgu (nagle niedokrwienie części mózgu), który jest jedną z najczęstszych przyczyn śmierci w krajach wysoko rozwiniętych. Stosowane na modelach zwierzęcych transplantacje embrionalnej tkanki nerwowej, choć przynoszą najlepsze efekty terapeutyczne, są jednak ograniczone ze względu na trudności techniczne metody i problemy natury etycznej (RIDEOUT i współaut. 2002). Poszukiwanie innych, łatwo dostępnych źródeł somatycznych komórek macierzystych, np. komórek niekrwiotwórczych podścieliska szpiku kostnego

(MSC), czy komórek krwi pępowinowej lub obwodowej, które w warunkach *in vitro* wykazują plastyczność i różnicują w kierunku określonego typu neuronów, daje szansę na ich wykorzystanie w terapii omawianych chorób. Obiecujące są również próby aktywacji endogennych macierzystych komórek nerwowych, które w naturalnych warunkach proliferują i migrują w tkance nerwowej w odpowiedzi na uszkodzenia mechaniczne i procesy demielinizacji. Egzogenne stymulowanie tych komórek do różnicowania w poszczególne typy neuronów, a także wykorzystanie ich zdolności do migracji, stwarza możliwości zastosowania ich jako nośników substancji, których deficyty są przyczyną chorób neurodegeneracyjnych (np. dopaminy w PD).

Somatyczne komórki macierzyste występują również w mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym i w naturalnych warunkach pełnią funkcje regeneracyjne zarówno w stanach fizjologicznych (apoptoza komórek mięśniowych, odnowa masy mięśni szkieletowych po dużym wysiłku fizycznym, utrzymywanie stałej masy mięśnia sercowego), jak i patologicznych (uszkodzenia mechaniczne mięśni szkieletowych, zawał mięśnia sercowego, dystrofia mięśniowa). Podobnie jak inne, nieembrionalne komórki macierzyste, krążą we krwi i mogą być z niej pozyskiwane i wykorzystywane do celów terapeutycznych tkanki mięśniowej.

W szpiku kostnym, krwi pępowinowej i obwodowej występują progenitory komórek śródbłonkowych, które mogą różnicować się w śródbłonki naczyniowe. Stwarza to możliwość wykorzystania komórek macierzystych w leczeniu chorób wymagających reperacji naczyń krwionośnych (np. zawału mięśnia sercowego). Wykorzystanie hodowli *in vitro* tych komórek do badań podstawowych umożliwiło badanie procesów waskulogenezy i angiogenezy, które występują w takich stanach patologicznych, jak choroba reumatyczna czy nowotwory. Stosowane obecnie postępowanie terapeutyczne w przypadku guzów ma m.in. na celu działanie antyangiogenne.

Niezwykle bogatym źródłem somatycznych komórek macierzystych jest ludzka skóra. Komórki te znajdują zastosowanie w leczeniu oparzeń i owrzodzeń troficznych.

Macierzyste komórki krwiotwórcze (HSC) znalazły szerokie zastosowanie w leczeniu chorób krwi, takich jak anemia, w procesach odnowy komórek hematopoetycznych po chemio-

terapii oraz w leczeniu nowotworów krwi (białaczek i chłoniaków) i chorób autoimmunologicznych (np. liszaja).

Wielkim problemem terapeutycznym są choroby genetycznie uwarunkowane. Z założenia nieuleczalne, zwykle o ciężkim przebiegu, tylko w bardzo nielicznych przypadkach dają możliwość leczenia objawowego, które usuwa skutki defektu molekularnego. Jediną formą leczenia jest terapia genowa, która może przybierać formę bezpośredniego podawania terapeutycznego genu do organizmu pacjenta lub wykorzystywać samoodnawiające się populacje komórek macierzystych transfekowane genem terapeutycznym. Próby takiego podejścia terapeutycznego podejmowane są też w chorobach autoimmunologicznych. Wprowadzenie do macierzystych komórek krwiotwórczych genu kodującego receptor dla interferonu gamma hamuje u modelowych myszy efekt stanu zapalnego i rozwój liszaja.

Wyjątkowe cechy wszystkich typów komórek macierzystych, zarówno embrionalnych jak i somatycznych, jakimi są zdolność do podziałów i samoodnawiania się przez długi czas, brak różnicowania i fakt, że mogą one dawać początek różnym liniom komórkowym zadecydowały o ich szerokim zastosowaniu zarówno w badaniach podstawowych, jak i w próbach terapeutycznych. Komórki macierzyste służą do badania mechanizmów leżących u podstaw różnicowania i reprogramowania genomów, dając możliwość poznania czynników odpowiedzialnych za wiele chorób rozwojowych, genetycznie uwarunkowanych i nowotworowych. Stanowią również nieoceniony biologiczny system do testowania nowych leków, a wraz z rozwojem wiedzy na temat procesów różnicowania znajdują coraz większe zastosowanie w terapiach opartych na komórkach, będąc źródłem dla tworzenia wyspecjalizowanych tkanek. Należy jednak pamiętać, że w warunkach hodowli *in vitro* komórki poddawane są wpływom czynników o zmienionych, w stosunku do naturalnych, parametrach. Mogą więc też podlegać zmianom modyfikacji epigenetycznych, które jak się wydaje, są podobne do tych powstających w warunkach naturalnych w odpowiedzi na czynniki zapalne. Konieczne jest więc monitorowanie „epigenetycznej kondycji” i klasyfikowanie hodowli używanych w celach terapeutycznych nie tylko metodami cytologicznymi, ale również molekularnymi.

EPIGENETYKA A PROCES NOWOTWOROWY

Komórki nowotworowe wykazują niebywałe podobieństwo do komórek embrionalnych – posiadają zdolność implantacji w obce tkanki pomiędzy białka adhezyjne, zdolność enzymatycznej ingerencji tych tkanek, ich waskularyzacji poprzez czynniki angiotropowe i szybkiej proliferacji. Wykorzystują te same mechanizmy molekularne co komórki prawidłowe, z tą tylko różnicą, że reaktywują ekspresję genów kluczowych dla ich rozwoju, a inaktywują geny hamujące ich wzrost (OLIGNY 2001). Onkogeneza jest związana z globalną deregulacją metylacji DNA, aktywacją niektórych onkogenów i inaktywacją genów supresorów nowotworowych (anty-onkogenów). We wczesnych etapach rozwoju nowotworu często obserwuje się wzrost ekspresji demetylaz,

powodujący niespecyficzną demetylację DNA. To reaktywuje ekspresję czynników promotorowo-wzrostowych, takich jak protoonkogeny, telomerazy i geny zaangażowane w migrację komórek. Nieprawidłowa metylacja DNA jest również przyczyną inhibicji czynników adhezyjnych i czynników hamujących angiogenezę. System kontroli epigenetycznej jest niezwykle skomplikowany i stanowi wypadkową wielu mechanizmów (PLASS i SOLOWAY 2002). Jego zaburzenie może prowadzić do zagrożenia rozwojem agresywnych klonów komórkowych. Znajomość epigenetycznej kontroli ekspresji genów w procesach nowotworowych stwarza szansę na ulepszenie metod diagnostycznych, terapeutycznych oraz działań prewencyjnych.

GDY EPIGENOTYP „ZACHORUJE” W CZASIE GAMETOGENEZY LUB ROZWOJU ZARODKOWEGO

Epigenotyp jest komponentem zmienności fenotypowej naturalnych populacji. Może też jednak stać się podmiotem mutacji. Nieprawidłowości w reprogramowaniu genomu (epimutacje) w czasie tworzenia gamet i wczesnego rozwoju zarodkowego mogą być powodowane przez czynniki wewnątrzkomórkowe i środowiskowe. Dlatego też epimutacje są przyczyną zarówno monogenowych i wielogenowych chorób genetycznie uwarunkowanych, chorób nowotworowych, jak i schorzeń wieloczynnikowych (kompleksowych), w których ważny element mutagenny stanowią czynniki środowiskowe (WALTER i PAULSEN 2003). Epimutacje mogą powstawać na skutek np. mutacji genów kodujących metylazy i demetylasy DNA, histonowe acetylazy i deacetylazy i innych enzymów zaangażowanych w reprogramowanie genomu, w wyniku mutacji niektórych regulatorowych sekwencji DNA, w piętnowanych genach lub centrach ich regulacji, uniemożliwiając „wymazywanie” i odnawianie wzoru modyfikacji epigenetycznych w liniach rozrodczych. Potencjalnie mogą dotyczyć wszystkich czynników zaangażowanych w modyfikacje epigenetyczne.

Jednym z najlepiej scharakteryzowanych przykładów chorób genetycznych powstających na skutek zaburzeń epigenetycznych, do których dochodzi w konsekwencji mutacji dynamicznej, jest zespół łamliwego chromosomu X (FraX), najczęstsza przyczyna

dziedzicznego upośledzenia umysłowego. We FraX dochodzi do ekspansji powtórzeń trójnukleotydowej sekwencji CCG na 5' końcu genu FMR1. W konsekwencji dwunukleotydowe powtórzenia CG w obrębie CCG zostają zmetylowane, prowadząc do zahamowania transkrypcji genu. Wyciszenie transkrypcji jest wynikiem zmian struktury chromatyny. Lokalny wzrost kondensacji chromatyny stabilizuje jednocześnie zwielokrotnienie powtórzeń CCG.

Zespół Retta (RS) jest najczęstszą formą dziedzicznego upośledzenia umysłowego u kobiet, w którym dochodzi do mutacji położonego na chromosomie X genu kodującego białko MeCP2. Białko to łączy się z metylovanym DNA i bierze udział w represji transkrypcji. W RS obserwuje się, poza mutacjami punktowymi w genie *MECP2*, znaczący spadek poziomu metylacji jednego z jego alleli.

W zespole ICF, rzadkiej, autosomalnej chorobie o recesywnym toku dziedziczenia objawiającej się brakiem odporności, niestabilnością centromerowych regionów chromosomów i cechami dysmorficznymi twarzy, dochodzi do hipometylacji sekwencji satelitarnych i niestabilności chromatyny na skutek mutacji w genie *DNMT3B* kodującym DNA-metylotransferazę 3B.

Zaburzenia metylacji DNA obserwuje się także w zespole ATR-X (sprzężona z chromosomem X alpha-talasemia i upośledzenie umysłowe). Gen *ATRX* koduje białko działające

jako regulator transkrypcji wiążący się z chromatyną i modyfikujący jej lokalną strukturę, m.in. przez zmiany wzorów metylacji DNA na obszarach niektórych sekwencji powtórzonych.

Rodzicielskie piętno genomowe pełni ważną rolę w prawidłowym rozwoju. Zaburzenia epigenotypu w piętnowanych regionach nie mogą ulec naprawie w czasie życia organizmu, tzn. nie są fizjologicznie odwracalne, ponieważ naprawa może zajść tylko w czasie pasażu przez linię rozrodczą. Poza regulacją wzrostu, GI wpływa także na aspekty behawioralne, dlatego też zaburzenia piętnowania są przyczyną wielu chorób człowieka i innych ssaków, począwszy od licznych nowotworów, a skończywszy na zespołach zaburzeń rozwojowych.

Defekt w zespole Beckwitha-Wiedemanna (BWS) dotyczy piętnowanego zespołu genów *IGF2-H19* na chromosomie 11 (region 11p15.5). *IGF2* koduje insulino-podobny czynnik wzrostu II i jest ekspresowany wyłącznie z kopii ojcowskiej. Produktem genu *H19*, który ulega ekspresji tylko z kopii matczynej, jest RNA o nieznannej funkcji. W czasie rozwoju oba geny ulegają monoallelicznej ekspresji w tych samych tkankach, poza częścią mózgu, gdzie *IGF2* jest ekspresowany z obu rodzicielskich kopii. Zespół *IGF2-H19* jest kontrolowany przez wspólne elementy regulatorowe: m. in. metylację DNA, sekwencje izolatorowe („insulatory”) i wzmacniające („enhancery”), antysensowny transkrypt i liczne białka oddziaływujące z DNA. Ojcowska disomia (pUPD) chromosomu 11 powoduje bialleliczną ekspresję *IGF2* i brak ekspresji *H19*. Konsekwencją są zaburzenia rozwojowe zarówno w okresie pre-, jak i postnatalnym, którym często towarzyszy skłonność do guzów w wieku dziecięcym. Poza pUPD, przyczyną BWS mogą być także translokacje obejmujące chromosom 11 i delecje w obrębie regionu 11p15.5, które zaburzają ekspresję piętnowanych genów *IGF2-H19*. Podobna utrata GI przez geny *IGF2* i *H19* obserwowana jest w guzie Wilmsa (WT).

Inna grupa piętnowanych genów zlokalizowana jest na chromosomie 15 człowieka (region 15q11-13), a jej zaburzenia są przyczyną dwóch klinicznie odrębnych jednostek chorobowych – zespołu Pradera-Williego (PWS) i zespołu Angelmana (AS). PWS objawia się przede wszystkim otyłością, obniżeniem napięcia mięśniowego, upośledzeniem rozwoju psychoru-

chowego oraz hipogonadyzmem. W AS dominuje głębokie upośledzenie umysłowe z brakiem rozwoju mowy i cechy dysmorficzne.

Region PWS-AS wykazuje hipermetylację na matczym allele i monoalleliczną ekspresję genów związanych z PWS z ojcowskiego allele. Związany z AS gen *UBE3A*, kodujący ligazę ubikwityna-białko, ekspresowany jest w mózgu wyłącznie z kopii matczynej, a jego monoalleliczna ekspresja uwarunkowana jest powstawaniem antysensownego transkryptu. Domena PWS-AS regulowana jest przez region IC, który składa się z dwóch elementów regulatorowych: regionu PWS-SRO na ojcowskim allele oraz regionu AS-SRO zlokalizowanego na allele matczym. Funkcją aktywnego PWS-SRO na ojcowskim allele jest ekspresja genów związanych z PWS, która ma miejsce tylko w sytuacji kiedy PWS-SRO przyjmuje aktywną konformację. Rola aktywnego AS-SRO polega natomiast na stworzeniu warunków do inaktywacji (m. in. przez metylację) docelowego PWS-SRO na matczym allele i utworzeniu w tym regionie nieaktywnej struktury chromatyny. AS-SRO na matczym allele działa jako represor powodując metylację sąsiadującego regionu PWS-SRO. Model ten tłumaczy dlaczego mikrodelecje w PWS-SRO (regulatorowe mutacje „imprintingowe”) są przyczyną represji genów na ojcowskim allele u chorych z PWS, a mikrodelecje w obrębie AS-SRO u chorych z AS znoszą normalnie nałożoną represję na matczym allele (Rys. 3).

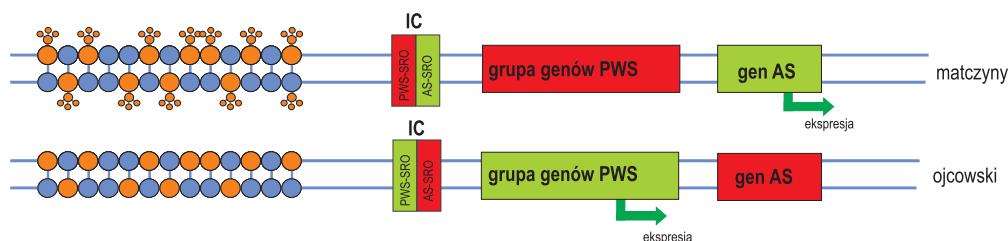
Defekty rodzicielskiego piętna genomowego są również często związane z nowotworami takimi jak nerwiak zarodkowy (matczyny chromosom 1 i ojcowski chromosom 2), ostra białaczka mioblastyczna (ojcowski chromosom 7), guz Wilmsa (matczyny chromosom 11). Ponieważ niektóre piętnowane geny to geny supresory nowotworzenia, to brak aktywnej kopii lub brak ekspresji niepiętnowanego aktywnego allele może stać się przyczyną rozwoju nowotworu. Utrata piętnowania lub utrata heterozygotyczności genu *IGF2* jest obserwowana w wielu nowotworach, podobnie jak mutacje piętnowanego genu *IGF2R*, kodującego receptor insulino-podobnego czynnika wzrostu II (PLASS i SOLOWAY 2002).

Prawdopodobnie część epimutacji nie pociąga za sobą żadnych zmian w sekwencji DNA, poza zmianami na poziomie epigenotypu. Stanowią one ogromny problem diagnostyczny. Opisano już przypadki BWS, AS, w któ-

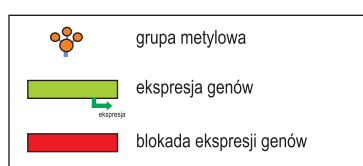
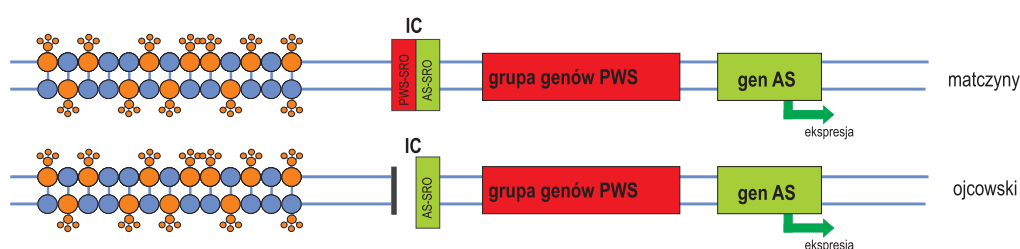
rych nie stwierdzono mutacji na poziomie DNA, natomiast obserwowano zaburzenia modyfikacji epigenetycznych, takie jak zmiany wzorów metylacji DNA. Identyfikacja takich

epimutacji stanowi wyzwanie dla diagnostyki molekularnej.

FENOTYP PRAWIDŁOWY



FENOTYP PWS



Ryc. 3. Efekt epimutacji w zespole Pradera-Williego.

GDY EPIGENOTYP „ZACHORUJE” W CIĄGU ŻYCIA ORGANIZMU

Stabilność epigenomu w dorosłych komórkach jest tak samo ważna jak zmiany genetyczne na poziomie DNA. Dojrzałe, zróżnicowane komórki, w szczególności komórki nabłonkowe, cechuje tendencja do wyciszania w czasie życia wielu uprzednio aktywnych genów (obserwuje się wzrost metylacji DNA), w odpowiedzi na czynniki otaczającego środowiska i styl życia. Wyrazem tego jest wzrost wraz z wiekiem komórkowej epigenetycznej mozaikowości, leżącej u podstaw chorób naczyniowych i neurodegeneracyjnych. Zaburzenia różnicowania małych frakcji komórek mięśni gładkich na skutek zmian epigenetycznych oraz w wyniku represji genu receptora estrogenowego alfa (*ER*) poprzez metylację DNA wykazano w wielu chorobach naczyniowych, łącznie z arteriosklerozą. Podobne lokalne zmiany epigenotypu powstające z wiekiem i odpowiedzialne za inaktywację promotorów różnych genów, obserwowane są w ta-

kich chorobach wieloczynnikowych, jak starcza demencja, czy cukrzyca insulino-oporna, a także w stanach zapalnych, np. zapaleniu jelit i przewlekłym zapaleniu wątroby. W szczególności, zmiany epigenetyczne obserwowane w dorosłych komórkach, predysponują małe frakcje komórek nabłonkowych do neoplazji. Ustalanie parametrów epigenetycznej mozaikowości mogłoby więc stać się niezwykle pomocne w określaniu indywidualnych predyspozycji do chorób związanych z wiekiem, poprzez determinowanie tzw. „molekularnego wieku”. Jeszcze większe znaczenie miałyby umiejętność modulowania procesów epigenetycznych. Dawałaby bowiem szansę na podjęcie działań mających na celu zabezpieczenie przed zaburzeniami epigenotypu powstającymi wraz z wiekiem, promowanie zdrowszego i potencjalnie dłuższego życia, wczesną diagnostykę i skuteczną terapię.

BEFSZTYK CZY SZPARAGI, CZYLI JAK CHRONIĆ EPIGENOTYP W CZASIE ŻYCIA?

Witaminy (B12, kwas foliowy), cholina i metionina pełnią kluczową rolę w utrzymaniu stabilności DNA poprzez dostarczanie atomów węgla albo grup metylowych zarówno do syntezy DNA (replikacji i reperacji), jak i do zachowania wzoru metylacji DNA, determinującego ekspresję genów. Optymalizacja i prawidłowy przebieg tych procesów zależą więc też od diety, która jest źródłem tych związków (FENECH 2001).

W sytuacji deficytu kwasu foliowego, akumulowany jest uracyl, który w konsekwencji inkorporowany jest do DNA w miejsce tyminy. To nieprawidłowe podstawienie ma charakter mutageny: zaburza nie tylko samą sekwencję kodu genetycznego, ale powoduje także reorganizację DNA, obserwowane nawet pod mikroskopem jako np. złamania chromosomów (w preparatach z hodowli limfocytów prowadzonych w warunkach niedoboru kwasu foliowego i tyminy).

Kwas foliowy i witamina B12 są niezbędne do syntezy metioniny z S-adenozynometioniny, będącej głównym donorem grupy metylowej

do procesów metylacji DNA. Zbyt niskie stężenie witaminy B12 powoduje, że kwas foliowy nie jest wykorzystywany do syntezy tyminy z uracylu albo do syntezy metioniny z homocysteiny. Dochodzi do wzrostu uszkodzeń DNA i do hipometylacji, które stanowią czynnik ryzyka dla rozwoju chorób nowotworowych (BLOUNT 1997). Wzrost poziomu homocysteiny zwiększa ryzyko wystąpienia chorób naczyniowych i ogranicza podziały komórkowe, co może prowadzić do anemii. Zaburzenia te mogą być również przyczyną nieprawidłowości rozwojowych i neurologicznych i prowadzić do wad cewy nerwowej. Sugeruje się, że ważnym elementem ochrony przed zmianami metylacji i uszkodzeniami chromosomów jest odpowiednia podaż witamin i aminokwasów. Dlatego też dieta bogata w te składniki jest wskazana nie tylko ze względu na prewencję chorób wynikających bezpośrednio z samego ich niedoboru, ale także (a może przede wszystkim) jako czynnik zmniejszający ryzyko anomalii rozwojowych, chorób degeneracyjnych i nowotworowych.

TERAŻNIEJSZOŚĆ I PRZYSZŁOŚĆ W ZASTOSOWANIU MOLEKULARNYCH TECHNOLOGII EPIGENETYCZNYCH

Genetyczny fenomen za jaki jeszcze do niedawna uważano epigenetykę stał się rzeczywistością. DNA musi być postrzegane i badane w kompleksie z białkami jako chromatyna. Czynniki epigenetyczne, obok *sensu stricto* genetycznych, mogą być potencjalnie wykorzystane jako narzędzia diagnostyczne i terapeutyczne.

Obecnie w diagnostyce stosuje się paradygmat pojedynczego markera i etapy badania dotyczące tylko wybranych aspektów stanu chorobowego. Przyszła diagnostyka będzie z pewnością wieloparametrowa, tzn. analizowanych będzie jednocześnie wiele markerów molekularnych, biochemicznych i klinicznych, ponieważ tylko kompleksowa ocena może dać odpowiedź na skomplikowane pytania diagnostyczne. Po drugie, markery diagnostyczne będą coraz częściej oparte o badanie kwasów nukleinowych. Po trzecie, diagnostyka będzie wykorzystywana do kierowania procesami chorobowymi, przyniesie bowiem odpowiedzi na pytania powstające w toku obserwacji i leczenia indywidualnego pacjenta.

Metylacja DNA jest idealnym parametrem do kompleksowej diagnostyki wielu chorób (REIK i współaut., 2002). Wzory metylacji są nieocenionym źródłem informacji dotyczących: aktualnego stanu aktywności genów, potencjalnych sposobów ich aktywacji lub inhibicji (stymulacji za pomocą leków), „molekularnego wieku”, wpływu czynników środowiskowych (toksyny mogą powodować zaburzenia stabilności genomu objawiające się m.in. zmianami wzorów metylacji) oraz zmienności osobniczej (osobnicza zmienność wzorów metylacji ważna zarówno ze względów diagnostycznych, jak i terapeutycznych). Istnieje również wiele zalet natury technologicznej, które sprawiają, że metylacja DNA jest znakomitym markerem do rutynowej diagnostyki. Metylacja dotyczy DNA, który jest molekułą bardzo stabilną (w przeciwieństwie do RNA czy białek), co ułatwia zarówno samą pracę laboratoryjną, jak i umożliwia transport preparatów DNA między ośrodkami terapeutycznymi i diagnostycznymi. Używając do analizy cząsteczkę DNA można dokonywać „pomiaru”

kilku różnych parametrów, np. analizować wzory metylacji i zmiany pojedynczych nukleotydów. Analiza metylacji jest obecnie jedyną metodą, która umożliwi badanie ekspresji genomu w oparciu o DNA. Jest to metoda czuła i jednoznaczna [cyfrowy zapis 1 0: cytozyna może być albo metylowana (1) albo niemetylowana (0)]. Możliwe jest obecnie zastosowanie techniki PCR do analizy metylacji DNA, co pozwala badać zarówno nisko-, jak i wysoko-kopijowe sekwencje DNA z jednoczesną możliwością realnej oceny intensywności sygnału (profile ekspresyjne). W badaniach metylacji źródłem DNA mogą być zarówno tkankowe preparaty parafinowe, formalinowe, utrwalane alkoholem, jak i tkanki mrożone. I wreszcie, do badania wzorów metylacji DNA można wykorzystać z takim samym dobrym skutkiem różne techniki molekularne: np. technikę MS-PCR z różnymi modyfikacjami, mikromacierze DNA, spektrofotometrię masową, trawienie enzymami wrażliwymi na metylację, hybrydyzację DNA-DNA.

Ogromne nadzieje wiąże się z zastosowaniem technologii opartych na metylacji DNA w kompleksowych działaniach walki z nowotworami, począwszy od wykrywania stadiów asymptomatycznych, molekularnej klasyfikacji nowotworu, monitorowania przebiegu choroby, diagnozowania przypadków opornych na pewne typy leczenia i testach mających na celu ustalenie optymalnej terapii dla indywidualnego pacjenta (farmakogenetyka) (OLEK i współaut. 2003, PLASS i SOLOWAY 2002). Dla farmakogenetycznej i diagnostycznej klasyfikacji pacjentów potrzebne są informacje dotyczące zmian polimorficznych i aktywności genu ponieważ na zdolność enzymu do metabolizowania leku może mieć wpływ nie tylko sekwencja białka (zmiany pojedynczych nukleotydów), ale i poziom jego ekspresji (zmiany metylacji DNA), lub oba parametry. Najczęściej zmiany polimorficzne są kompensowane przez wzrost ekspresji, dlatego też konieczna jest kompleksowa analiza molekularna indywidualnych przypadków. Podobnie, niezwykle istotne z punktu widzenia toku postępowania terapeutycznego, jest monitorowanie przebiegu choroby i leczenia, np. informacja kiedy nowotwór staje się oporny na chemioterapię. Analiza metylacji umożliwia śledzenie parametrów na poziomie molekularnym zanim jeszcze dojdzie do jakichkolwiek widocznych zmian makroskopowych w obrębie chorej tkanki. Stosowane w terapii białaczek cytotoksyczne

analogi adenozyne (cladribina, fludarabina) powodują spadek aktywności metylotransferaz, co przekłada się na obniżenie poziomu ogólnej metylacji (obydwa leki powodują redukcję metylacji cytozyny odpowiednio w obrębie wysp CpG lub sekwencji CCGG). Wydaje się, że leki te mogą mieć zastosowanie w terapii również innych nowotworów związanych z wyciszaniem genów poprzez hipermetylację ich regionów promotorowych.

Wiele chorób, o których mówi się, że są wywoływane przez czynniki środowiskowe lub są związane z wiekiem, jest powodowanych bezpośrednio przez zmiany wzorów metylacji DNA w poszczególnych tkankach, powstające na etapie różnicowania komórkowego i rozwoju (akumulowane w wyniku błędów podczas klonalnego przekazywania wzorów metylacji do komórek potomnych). Te zaburzenia mogą powodować nadekspresję niektórych genów bądź jej całkowity brak w pewnych okresach życia i predysponować indywidualne osoby do chorób w późniejszych dekadach życia. Wzory metylacji DNA są też narażone na zmiany powstające w czasie życia osobnika. Metabolizm grup metylowych może ulec zmianie w odpowiedzi na sytuację głodu lub przeciwnie, w przypadku nadmiaru pokarmu i nadwagi. U otyłych pacjentów obserwuje się generalną hipometylację DNA. Styl życia i czynniki środowiskowe mają ogromny wpływ na rozwój takich chorób jak arterioskleroza czy insulino-oporna cukrzyca typu II. W obydwu przypadkach chorobowych stwierdza się specyficzną hipermetylację genów zaangażowanych odpowiednio w metabolizm glukozy i genów ekspresyjnych w śródbłonku naczyniowym.

Część defektów epigenetycznych ma charakter odwracalny, np. metylacja DNA. Można wydedukować więc epigenetyczną interwencję terapeutyczną. Technologie terapeutyczne mogą wykorzystywać trzy poziomy oddziaływań epigenetycznych, w które zaangażowana jest metylacja DNA: działanie metylotransferaz DNA i ich inhibitorów, modyfikacje histonów oraz celowaną kontrolę ekspresji genów, w której wykorzystywane są czynniki specyficznym wiążące się do pewnych domen w DNA (technologia Sangamo Biosciences).

Inhibitory DNA metylotransferaz: 5-azacytydina i jej pochodna 5-aza-2-deoksytydina, jako analogi pirymidyn są inkorporowane do genomowego DNA i tworzą kompleksy z metylotransferazą 1, przyczyniając się do inak-

tywacji enzymu. Ponieważ enzym ten jest związany z maszyną replikacyjną, jego inhibicja powoduje, że nowosyntetyzowana nić DNA jest niemetylowana. Pozytywne kliniczne próby z preparatami farmakologicznymi zawierającymi inhibitory metylotransferazy 1 przeprowadzono w przypadku chorób układu krwiotwórczego. Inne podejście polegające na zastosowaniu antysensownego oligonukleotydu, zmniejsza poziom metylotransferazy i powoduje reekspresję wielu inaktywowanych w guzach genów, m.in. *p16* - genu supresora nowotworowego.

Jeszcze bardziej obiecujące wydają się być badania nad łącznym zastosowaniem w terapii (szczególnie nowotworów) inhibitorów mety-

lotransferaz i inhibitorów histonowych deacetylaz. Problem stanowią jednak nadal skutki uboczne wynikające z toksyczności tych związków i brak wysokiej specyfiki oddziaływania na konkretne geny.

Technologia Sangamo w pewnym sensie omija problem niespesyfikowanej aktywacji genów, wykorzystując naturalne domeny w DNA do konstrukcji czynników łączących się specyficznie tylko z tymi sekwencjami. W zależności od tego czy terapeutyczne działanie ma na celu aktywację czy inhibicję genu, domeny te mogą działać jako aktywatory lub represory przyłączając odpowiednie regiony sztucznych peptydów.

PROGNOZY

Zaprezentowane przykłady zastosowania w praktyce medycznej wiedzy o epigenomie stanowią zaledwie fragment potencjalnych możliwości jej wykorzystania. Szczególne praktyczne zastosowanie epigenetyki upatruje się w przypadku pojedynczych genów, które ulegają deregulacji na skutek zaburzenia wzoru epigenotypu, np. w reaktywacji wyciszonych przez metylację genów supresorów nowotworzenia, czy genów kodujących inhibitory DNA-metylotransferaz albo czynniki transkrypcyjne. Część z przedstawionych aplikacji,

szczególnie opartych na metylacji DNA oraz dotyczących zastosowania embrionalnych komórek macierzystych, nie wyszła jeszcze poza progi laboratoriów. Jednak miliony dolarów przeznaczane na całym świecie na rozwój tych badań dają nadzieję na szybkie wprowadzenie technologii epigenetycznych jako produktów komercyjnych do diagnostyki i terapii. Technologicznie te bowiem niosą ze sobą ogromny potencjał, na wykorzystanie którego czekają chorzy i lekarze.

SŁOWNICZEK TERMINÓW I SKRÓTÓW

angiogeneza – wieloetapowy proces tworzenia się nowych naczyń poprzez proliferację i migrację komórek śródbłonna istniejących naczyń

blastocysta (blastula) – zarodek przed implantacją, którego charakterystyczną cechą jest posiadanie jamy zw. blastocelą, otoczonej pojedynczą epitelialną warstwą komórek trofektodermy (po implantacji tworzy trofoblast, czyli łożysko); blastocysta na biegunie twórczym posiada wewnętrzną masę komórkową (ang. inner cell mass, ICM), określaną jako węzeł zarodkowy

dziedziczenie klonalne – przekazywanie informacji epigenetycznej z komórki macierzystej (pierwotnej) do komórek potomnych

epigenotyp – wzór epigenetycznych modyfikacji chromatyny, do których m. in. należą: metylacja DNA, modyfikacje białek histono-

wych (acetylacja, fosforyzacja, metylacja, ubikwitynizacja), rodzicielskie piętno genomowe, oddziaływania białek Polycomb i Trithorax, RNAi

epimutacje – zmiany modyfikacji epigenetycznych genomu, prowadzące do zaburzeń ekspresji genów

IC – centrum regulatorowe rodzicielskiego piętna genomowego (ang. imprinting center)

HSC – macierzyste komórki krwiotwórcze występujące w szpiku (ang. haematopoietic stem cells)

komórki EG – embrionalne komórki płciowe (ang. embryonic germ cells, EGc)

komórki ES – embrionalne komórki macierzyste (ang. embryonic stem cells, ESC)

komórki zawiązka linii płciowej (ang. primordial germ cells, PGCs) pluripotentne pre-

kursory komórek rozrodczych i pluripotentnych embrionalnych komórek płciowych (EG)

MSC – niekrwiotwórcze komórki podścieliska wywodzące się ze szpiku kostnego; mogą różnicować się w wiele typów komórek mezenchymalnych; w warunkach *in vitro* uzyskano różnicowanie MSC w komórki o cechach fenotypowych komórek nerwowych (ang. marrow stromal cells)

MS-PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy wrażliwa na metylację (ang. methylation-sensitive PCR)

mozaikowość – występowanie u dorosłego osobnika 2 lub więcej linii komórkowych o różnej konstytucji genetycznej lub chromosomowej, ale wywodzących się z tej samej zygoty (w przeciwieństwie do chimery)

mutacja dynamiczna – zwiększanie z pokolenia na pokolenie liczby kopii krótkiego motywu nukleotydowego, np. CCG ponad pewną liczbę krytyczną, dające objawy fenotypowe

neoplazja – proces przednowotworowy

pluripotencja (pluripotencjalność) – zdolność komórki do przekształcania się niektóre tkanki w czasie rozwoju organizmu.

pUPD – ojcowska jednorodzielska disomia; zaburzenie w segregacji chromosomów polegające na dziedziczenie obu chromosomów

danej pary od ojca; disomia jest jednym z wariantów aneuploidii (stan, kiedy liczba chromosomów w komórkach osobnika danego gatunku nie jest dokładną wielokrotnością zestawu haploidalnego) (ang. paternal uniparental disomy)

rodzicielskie piętno genomowe – nadawany w czasie gametogenezy wzór epigenetycznych modyfikacji chromatyny zależny od rodzicielskiego pochodzenia, którego efektem jest monoalleliczna ekspresja genu; to „pamięć” genu dotycząca jego rodzicielskiego pochodzenia (ang. genomic imprinting, GI)

SRO – najmniejszy region ulegający delecji (ang. the smallest region of deletion overlap)

totipotencja (totipotencjalność) – zdolność komórki do różnicowania się we wszystkie tkanki dorosłego organizmu

waskulogeneza – formowanie nowych naczyń krwionośnych z komórek progenitorowych (angioblastów) na drodze różnicowania się komórki progenitorowej w komórkę śródbłonka i jej namnożeniu

węzeł zarodkowy – małe skupienie nieróżnicowanych komórek w blastocyste, które dają początek ciału nowego organizmu (tarcza zarodkowa) i dwóm listkom zarodkowym (endodermie i ektodermie)

HEALTHY AND SICK DNA “CORSET”, OR MEDICAL ASPECTS OF EPIGENETICS

S u m m a r y

There is now generally accepted that the program for development and normal gene expression and repression during life are under epigenetic control. Epigenetic modifications are very important and critical for gene regulation processes. Several distinct syndromes, numerous complex diseases such degenerative and age-related diseases and cancers are caused by local epigenetic alterations of the chromatin structure. Understanding of the process of epigenetic reprogramming in development is important for studies of therapeutic cloning and the clinical application of stem cells. Mechanisms that regulate genomic plasticity and the state of totipotency are being unravelled and the gained knowledge will enhance our ability to manipulate stem cells for therapeutic purposes in

many human diseases. Similarities between embryonal and cancer cells suggest new potential therapies for the treatment of cancer based on epigenetic strategies. In the future, personalized medicine provided as the result of epigenetic profiling of critical genes may be a more effective method of treating patients than the current generic approach. The methylation of DNA has the general characteristics needed for an ideal diagnostic testing technology, applicable to most common diseases. Particularly, the methylation-based strategy would be the perfect tool for creating a comprehensive cancer-management system concerning early detection (asymptomatic people), as well as molecular classification, cancer resistance, pharmacogenetic testing and monitoring.

LITERATURA

- BLOUNT B. C., MACK M. M., WEHR C. M., MACGREGOR J. T., HIATT R. A., WANG G., WICKRAMASINGHE S. N., EVERSON R. B., AMES B. N. 1997. *Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implication for cancer and neuronal damage*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 3290–3295.
- BOURCHIS D., LE BOURCHIS D., PATIN D., NIVELEAU A., COMIZZOLI P., RENARD J. P., VIEGAS-PEQUIGNOT E., 2001. *Delayed and incomplete reprogramming of*

- chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos.* Curr. Biol. 11, 154-1546.
- FENECH M., 2001. *Recommended dietary allowances for genomic stability.* Mutation Res. 480-481, 51-54.
- FERGUSON-SMITH A, SURANI M. A., 2001. *Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes.* Science 293, 1086-1089.
- INOUE K., KOHDA T., LEE J., OGONUKI N., MOCHIDA K., NOGUCHI Y., TANEMURA K., KANEKO-ISHINO T., ISHINO F., OGURA A., 2002. *Faithful expression of imprint-ed genes in cloned mice.* Science 295, 297.
- KANG Y.K., KOO D. B., PARK J. S., CHOI Y. H., CHUNG A. S., LEE K. K., HAN Y. M., 2001. *Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos.* Nature Genet. 28, 173-177.
- LI E., 2002. *Chromatin modification and epigenetic re-programming in mammalian development.* Nature 3, 662-673.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2001. *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions.* Department of Health and Human Services.
- OLEK S., MAIER S., OLEK K., OLEK A., 2003. *Digitizing Molecular Diagnostics: Current and Future Applications of Epigenome Technology.* [W:] *The Epigenome. Molecular Hide and Seek.* BECK S., OLEK A. (red.). WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA, Germany, 153-173.
- OLIGNY L. L., 2001. *Cancer and epigenesis - an overview.* Ann. Diagn. Paediatr. Pathol. 5, 27-30.
- PLASS C., SOLOWAY P. D., 2002. *DNA methylation, imprinting and cancer.* Eur. J. Hum. Genet. 10, 6-16.
- RATAJCZAK M., OSUCHOWSKA Z., KAWIAK J., 2003. *Komórki macierzyste.* Post. Biol. Kom. 30, Supplement 21.
- REIK W., WALTER J., 2001. *Genomic imprinting: parental influence of the genome.* Nature Rev. Genet. 2, 21-32.
- REIK A., GREGORY P. D., URNOV F. D., 2002. *Biotechnologies and therapeutics: chromatin as a target.* Curr. Opin. Genet. Dev. 12,233-242.
- RIDEOUT W. M. 3rd, HOCHEDLINGER K., KYBA M., DALEY G. Q., JAENISCH R. M., 2002. *Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy.* Cell 109, 17-27.
- SURANI M. A. 2001. *Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance.* Nature 414, 122-128.
- TADA M., TAKAHAMA Y., ABE K., NAKATSUJI N., TADA T., 2001. *Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells.* Curr. Biol. 11, 1553-1558.
- WAKAYAMA T., SHINAKAI Y., TAMASHIRO K. L., NIIDA H., BLANCHARD D. C., BLANCHARD R. J., OGURA A., TANEMURA K., TACHIBANA M., PERRY A. C., COLGAN D. F., MOMBAERTS P., YANAGIMACHI R., 2000. *Cloning of mice to six generation.* Nature 407, 318-319.
- WAKAYAMA T., TABAR V., RODRIGUEZ I., PERRY A. C., STUDER L., MOMBAERTS P., 2001. *Differentiation of embryonic stem cells lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer.* Science 292, 740-743.
- WALTER J., PAULSEN M., 2003. *Genetic Trouble: Human diseases Caused by Epimutations.* [W:] *The Epigenome. Molecular Hide and Seek.* BECK S., OLEK A. (red.). WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA, Germany, 153-173.
- WILMUT I., SCHNIEKE A. E., MCWHIR J., KIND A. J., CAMPBELL K. H., 1997. *Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells.* Nature 385, 810-813.