



Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Τίτλος: «Επιγενετικοί παράγοντες και περιβάλλον»



Ονοματεπώνυμο: Γαλάνη Μαρία

Ιωάννινα 2018

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης:

Τίτλος: «Επιγενετικοί παράγοντες και περιβάλλον»

Ονοματεπώνυμο: Γαλάνη Μαρία

Ιωάννινα 2018

«Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ονοματεπώνυμο : Γαλάνη Μαρία

Τίτλος Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης: «Επιγενετικοί παράγοντες και περιβάλλον»

Ημερομηνία παρουσίασης :

Εξεταστική Επιτροπή :

1. Σύρρου Μαρίκα – Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας /Ιατρικής Γενετικής (επιβλέπουσα)
2. Αγγελίδης Χαράλαμπος – Καθηγητής Γενικής Βιολογίας (μέλος)
3. Βεζυράκη Πατρώνα – Καθηγήτρια Φυσιολογίας (μέλος)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
SUMMARY	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ.....	5
1.1 Ορισμός	5
1.2 Ιστορική αναδρομή.....	6
1.2 Εξέλιξη και ρόλος της επιγενετικής ρύθμισης.....	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ	13
2.1 Γενικά.....	13
2.2 Μεθυλίωση DNA.....	14
2.3 Γενετική αποτύπωση (imprinting).....	17
2.4 Το φαινόμενο της παρεμβολής RNA (RNA interference – RNAi).....	20
2.5 Τροποποιήσεις Ιστονών	23
2.6 Αδρανοποίηση του Χρωμοσώματος X.....	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ.....	27
3.1 Γενικά.....	27
3.2 Επιγενετική και Διατροφή.....	30
3.3 Επιγενετική και Καρκίνος.....	32
3.4 Επιγενετική και Γήρανση.....	37
3.5 Επιγενετική: Μνήμη και Εθισμός.....	40
3.6 Επιγενετική και έκθεση σε περιβαλλοντικές χημικές ουσίες.....	43
3.7 Επιγενετική και χημικές ουσίες που διαταράσσουν την ενδοκρινική λειτουργία και την αναπαραγωγή.....	47
3.8 Επιγενετική και Διαβήτης Τύπου II.....	48
3.9 Επιγενετική και αυτοάνοσα νοσήματα.....	50

3.10 Επιγενετική: Από τη σύλληψη μέχρι την γέννηση.....	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	55
4.1. Γενικά.....	55
4.2. Επιγενετικές τροποποιήσεις και αναστολές.....	56
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

«Επιγενετικοί παράγοντες και περιβάλλον»

Γαλάνη Μαρία

Ο όρος επιγενετική σημαίνει «πάνω από τη γενετική» και αρχικά προτάθηκε από τον C. Waddington για να περιγράψει την ύπαρξη μηχανισμών κληρονομικότητας. Οι επιγενετικές διεργασίες περιλαμβάνουν μιτωτικές και / ή μειωτικές κληρονομικές τροποποιήσεις στην γονιδιακή έκφραση χωρίς αλλαγή στην αλληλουχία του DNA. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, τα επιγενετικά φαινόμενα σχετίζονται με τη δομή της χρωματίνης και τις διαμορφώσεις της. Το DNA οργανώνεται σε χρωματίνη εντός του πυρήνα. Η χρωματίνη είναι ένα σύμπλοκο αποτελούμενο από DNA, ιστόνες και μη ιστόνες το οποίο μπορεί να λάβει δύο λειτουργικές μορφές, την ετεροχρωματίνη και την ευχρωματίνη. Το νουκλεοσώματα είναι το πρώτο επίπεδο της οργάνωσης της χρωματίνης που επιτρέπει τη συσκευασία του DNA ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων και επάγοντας πιθανά επιγενετικά φαινόμενα. Η χρωματίνη επιτρέπει διαφορετικές διαμορφώσεις του ίδιου του γονιδιώματος «δημιουργώντας» διάφορα επιγονιδιώματα και στη συνέχεια διαφορετικούς φαινότυπους. Οι τροποποιήσεις των ιστονών, η μεθυλίωση του DNA και η δραστηριότητα του μη κωδικοποιημένου RNA (ncRNA) είναι οι κύριοι μηχανισμοί της επιγενετικής ρύθμισης των ευκαρυωτικών οργανισμών. Το επιγονιδίωμα αντιπροσωπεύει τη σχέση μεταξύ περιβάλλοντος και γονιδιώματος. Οι περιβαλλοντικές επιδράσεις μπορούν να επηρεάσουν τον προγραμματισμό του γονιδιώματος ενεργοποιώντας συγκεκριμένες οδούς στα κύτταρα μέσω μηχανισμών επιγενετικής ρύθμισης και να προάγουν τη σταθερή αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, αλλάζοντας την έκφραση των γονιδίων και τον φαινότυπο. Μερικές από αυτές τις αλλαγές μπορούν να κληρονομηθούν στους απογόνους ακόμη και όταν δεν υπάρχει περιβαλλοντική επίδραση. Στον άνθρωπο, η περιβαλλοντικά προκαλούμενη τροποποίηση στο επιγονιδίωμα έχει επίσης συνδεθεί με μια ποικιλία παθολογιών, ωστόσο οι μεταβολές του DNA και της χρωματίνης είναι τις περισσότερες φορές αναστρέψιμες και η εφαρμογή επιγενετικών θεραπειών για τη αντιμετώπιση ασθενειών επιγενετικής φύσεως είναι ένας τομέας συνεχούς έρευνας και ανάπτυξης με πολλές υποσχόμενες προοπτικές.

SUMMARY

«Epigenetic factors and environment»

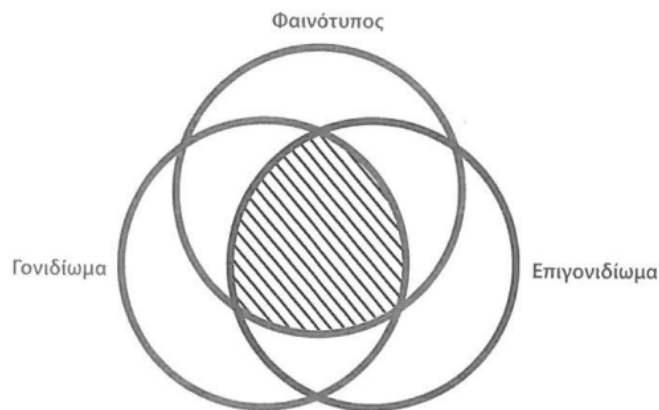
Galani Maria

The term epigenetic means "above genetics" originally proposed by C. Waddington to describe the existence of heredity mechanisms. Epigenetic processes include mitotic and / or meiotic hereditary modifications to gene expression without altering the DNA sequence. In eukaryotes the epigenetic phenomena are related to the structure of chromatin and its configurations. DNA is organized into chromatin within the nucleus. Chromatin is a complex with DNA, histone proteins and non-histone proteins, which have two functional states, heterochromatin and euchromatin. The nucleosome is the first level of chromatin organization that enables DNA packaging, regulating gene expression and making possible epigenetic phenomena. Chromatin allows different configurations of the same genome, causing various epigenomes and then different phenotypes. Histone modifications, DNA methylation and the activity of non-coding RNA, are the major mechanism of epigenetic regulation in eukaryotes. Epigenome represents the connection between environment and genome. Environmental influences can affect the programming of the genome, activating specific pathways in cells that, through the mechanisms of epigenetic regulation, promote the stable remodeling of chromatin changing gene expression and phenotype. Some of these changes can be inherited to the progeny even when the environmental trigger is over. In humans, environmentally induced modification in the epigenome has also been linked to a variety of pathologies, nevertheless, DNA and chromatin alterations are reversible and the implementation of epigenetic therapies for the treatment of epigenetically based diseases is a field of ongoing research and shows amazing perspectives.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ

1.1 Ορισμός

Η επιγενετική (epigenetics) είναι η μελέτη των τρόπων με τους οποίους οι χημικές τροποποιήσεις του DNA και των ιστονών διαμορφώνουν κυτταροειδικά και ιστοειδικά πρότυπα γονιδιακής έκφρασης. Πιο αναλυτικά, οι τροποποιήσεις αυτές είναι αντιστρεπτές και προκαλούν αλλαγές στη δομή του DNA και στη διαμόρφωση της χρωματίνης ως απόκριση σε κάποιο περιβαλλοντικό παράγοντα εμπλέκοντας την αλληλεπίδραση του γονιδιώματος με το περιβάλλον. Αυτό το πρότυπο των επιγενετικών τροποποιήσεων του γενετικού υλικού σε ένα κύτταρο σε μία δεδομένη χρονική στιγμή μπορεί να περιγραφεί με τον όρο «επιγονιδίωμα» (epigenome) (**Εικόνα 1**). Το αξιοσημείωτο με τον αναδυόμενο κλάδο της επιγενετικής είναι ότι παρέχει την μοριακή βάση για την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο κληρονομούμενες αλλαγές στις οποίες δεν εμπλέκονται αλληλουχίες DNA επηρεάζουν την φαινοτυπική ποικιλομορφία προσδίδοντας ένα επιγενετικό χαρακτηριστικό (epigenetic trait) στους απογόνους (Klug, et al, 2014).

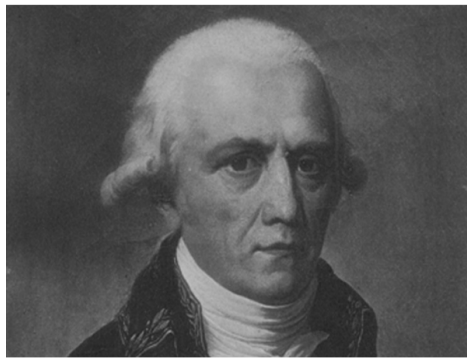


Εικόνα 1: Οι φαινοτυπικές αλλαγές προκύπτουν από την αλληλεπίδραση του γονιδιώματος και του επιγονιδιώματος μέσω επιγενετικού προγραμματισμού της γονιδιακής έκφρασης ως απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Klug, et al, 2014).

1.2 Ιστορική αναδρομή

1809:

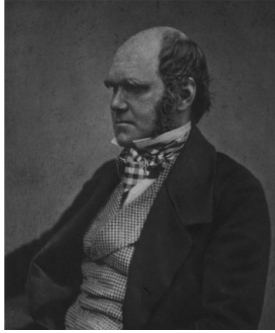
Ο Γάλλος ζωολόγος Jean-Baptist Lamarck (**Εικόνα 2**) το **1809** παρουσίασε στο βιβλίο του «Η φιλοσοφία της Ζωολογίας» για πρώτη φορά την εξελικτική του θεωρία σύμφωνα με την οποία ατελείς μορφές ζωής εξελίσσονται σε πολυπλοκότερες μέσω μιας εσωτερικής δύναμης που στοχεύει στην συνεχή βελτίωσή τους. Απόρροια των παράπανω ήταν ο ίδιος να είναι ο κύριος εκφραστής της θεωρίας της «ήπιας κληρονομικότητας» ή «κληρονομικότητας των επίκτητων χαρακτηριστικών», δηλαδή της δυνατότητας ενός οργανισμού να μπορεί να μεταβιβάσει τους χαρακτήρες που αποκτά κατά τη διάρκεια της ζωής του στους απογόνους του (Lamarck, 1809).



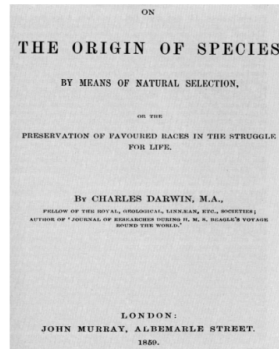
Εικόνα 2: Jean-Baptist Lamarck (1744- 1829)
(Burkhardt, 2013)

1859:

Στις 24 Νοεμβρίου 1859, ο Κάρολος Δαρβίνος (**Εικόνα 3**) δημοσίευσε το βιβλίο του «Σχετικά με την προέλευση των ειδών» (**Εικόνα 4**) στο οποίο πρότεινε τη θεωρία της εξέλιξης μέσω της φυσικής επιλογής. Σύμφωνα με αυτήν την εξελικτική θεωρία, οι οργανισμοί που είναι περισσότερο προσαρμοσμένοι στο περιβάλλον τους (διαθέτουν ευνοικότερα χαρακτηριστικά) επιβιώνουν και αναπαράγονται περισσότερο σε σχέση με τους λιγότερο προσαρμοσμένους, οπότε επικρατεί ένας συνεχής αγώνας επιβίωσης (Kutschera, 2009).



Εικόνα 3: Κάρολος Δαρβίνος (1809- 1882)
(Ayala, 2009)



Εικόνα 4: Το βιβλίο « Η προέλευση των ειδών»
(Ayala, 2009)

1866:

Ο Johann Gregor Mendel (**Εικόνα 5**) ήταν ο «πατέρας» της γενετικής καθώς πρότεινε τους νόμους της κληρονομικότητας. Η ιδιοφυΐα του Mendel έγκειται στο ότι αρχικά συνειδητοποίησε και στη συνέχεια απέδειξε ότι η κληρονομικότητα θα μπορούσε να μελετηθεί μόνη της χωρίς να συμπεριληφθεί η ανάπτυξη των οργανισμών (De Castro, 2016).



Εικόνα 5: Johann Gregor Mendel (1822- 1884)
(<https://www.britannica.com/biography/Gregor-Mendel>)

1940 – 1956:

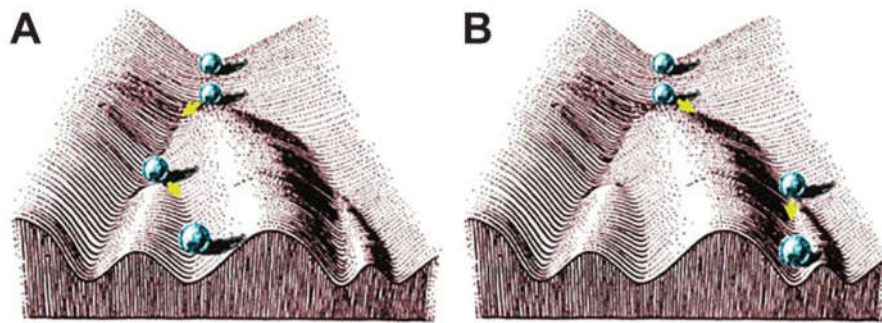
Ο Βρετανός βιολόγος Conrad Waddington (**Εικόνα 6**), κατά τη δεκαετία του 1940, επινόησε τον όρο της **επιγενετικής** βασιζόμενος στην ελληνική λέξη «επιγένεση» η οποία προϋπήρχε και χρησιμοποιούνταν για να περιγράψει μια αναπτυξιακή θεωρία η οποία ανέφερε ότι το πρώιμο έμβρυο είναι αρχικά αδιαφοροποίητο (Waddington, 1939). Ο Waddington παρατήρησε την εμφάνιση διαφορετικών φαινοτύπων γενετικά όμοιων οργανισμών μετά από επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων. Ο ίδιος διεξήγαγε πειράματα στη *Drosophila melanogaster* και ανακάλυψε ότι το ανατομικό πρότυπο των νεύρων των φτερών μπορούσε να τροποποιηθεί μετά από επίδραση θερμικού σοκ κατά την ανάπτυξη των προνυμφών. Η πιο αξιοσημείωτη παρατήρηση που προέκυψε από τα πειράματά του ήταν ότι και οι απόγονοι αυτών των μυγών εμφάνιζαν τον εναλλακτικό φαινότυπο χωρίς να είναι απαραίτητη η επίδραση του περιβαλλοντικού ερεθίσματος κατά την ανάπτυξή τους, ένα φαινόμενο που το ονόμασε “γενετική αφομοίωση” (genetic assimilation) (Klug, et al, 2014). Έτσι, το **1956** ο Conrad Waddington δημοσίευσε ένα άρθρο στο περιοδικό *Evolution* όπου απέδειξε την κληρονομικότητα ενός χαρακτηριστικού που αποκτήθηκε σε έναν πληθυσμό ως απάντηση σε ένα περιβαλλοντικό ερέθισμα (Waddington, 1956 , Noble, 2015). Η επιγενετική ρύθμιση ως μηχανισμός προσαρμογής των οργανισμών στο περιβάλλον συνδέεται με πληθυσμούς με φυσική γενετική ποικιλοότητα (wild type) και για αυτό το λόγο τα πειράματα του Waddington εάν επαναληφθούν σε ένα κλωνοποιημένο εργαστηριακό πληθυσμό πιθανώς θα αποτύχουν. Αυτό συμβαίνει διότι τα άτομα σε έναν πληθυσμό με ποικιλία συνδυασμών αλληλομόρφων γονιδίων θα μπορούσαν να επιλέξουν ένα νέο περιβάλλον και έτσι να αλλάξουν μόνιμα την εξελικτική τους διαδικασία σε αυτό το περιβάλλον (Niemann, 2014, Noble, 2016).



Εικόνα 6: Conrad Hal Waddington (1905 - 1975)

<https://www.nature.com/articles/nrg933>

Ωστόσο, η επιτυχής προσέγγιση του C. Waddington πιθανό να οφείλεται στο γεγονός ότι συνειδητοποίησε ότι για τον έλεγχο της κληρονομικότητας των επίκτητων χαρακτηριστικών είναι σημαντικό πρώτα να ανακαλυφθούν ποιες μορφές αναπτυξιακής πλαστικότητας υπάρχουν ήδη σε έναν πληθυσμό. Η αναπτυξιακή πλαστικότητα περιλαμβάνει την προσαρμογή της γονιδιακής έκφρασης για την παραγωγή ενός φαινοτύπου κατά την εμβρυογένεση που πιθανόν να είναι η καταλληλότερη για το μεταγεννητικό περιβάλλον (Polin, et al, 2017). Έτσι, ο C. Waddington χρησιμοποιούσε τη λέξη «canalised», καθώς αυτή αντιπροσώπευε την αναπτυξιακή διαδικασία ως μια σειρά «αποφάσεων» σε ένα αναπτυξιακό τοπίο (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Το αναπτυξιακό διάγραμμα σε μορφή τοπίου του Waddington όπου απεικονίζονται τα διαφορετικά στάδια και διαδρομές προς την τελική ανάπτυξη (Noble, 2015).

1969:

Η πρώτη πρόταση ότι η μεθυλίωση ή η απομεθυλίωση του DNA μπορεί να έχει σημαντικό βιολογικό ρόλο έγινε από τους Griffith και Mahler, με τον Mahler το 1969, να προτείνει επίσης ότι θα μπορούσε η μεθυλίωση να αποτελεί τη βάση για την μακροχρόνια μνήμη στον εγκέφαλο (Griffith and Mahler, 1969).

1975:

Το 1975 δημοσιεύθηκαν δύο άρθρα που περιγράφουν ένα μοριακό μοντέλο για την αλλαγή της γονιδιακής δραστηριότητας καθώς και για την κληρονομικότητα της γονιδιακής ενεργοποίησης ή αδρανοποίησης. Οι μελέτες βασίστηκαν στην ενζυμική μεθυλίωση της κυτοσίνης στο DNA η οποία αναφέρεται ως τροποποίηση του DNA. Οι μελέτες των Riggs, Holliday και Pugh ήταν πολύ παρόμοιες μεταξύ τους, αλλά έγιναν εντελώς ανεξάρτητα. Οι ερευνητές πρότειναν ότι η μεθυλίωση του DNA θα μπορούσε να έχει ισχυρές επιδράσεις στη γονιδιακή έκφραση και ότι οι αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA θα μπορούσαν επομένως να εξηγήσουν την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση των γονιδίων κατά την διάρκεια της ανάπτυξης. Να σημειωθεί ότι η διαδικασία της μεθυλίωσης ή απομεθυλίωσης πραγματοποιείται από ένζυμο ή τα ένζυμα που μεθυλιώνουν μια συγκεκριμένη περιοχή του DNA ειδικά, ή αλληλεπιδρούν με άλλη πρωτεΐνη που είναι ειδική για την αλληλουχία. Χάρη σε αυτή την ενζυμική ιδιότητα προτάθηκε επίσης ότι το πρότυπο μεθυλίωσης θα μπορούσε να είναι κληρονομικό, εάν υπήρχε ένα ένζυμο που ονομάζεται μεθυλάση διατήρησης (maintenance methylase) που αναγνωρίζει το ημιμεθυλιωμένο DNA αμέσως μετά την αντιγραφή, αλλά δεν δρα στο μη μεθυλιωμένο DNA. Αυτή η υπόθεση παρέχει ένα μηχανισμό για την κληρονομικότητα της μεθυλιωμένης και μη μεθυλιωμένης κατάστασης του DNA και συνεπώς για την κληρονομικότητα ενός δεδομένου σχεδίου γονιδιακής δραστηριότητας (Riggs, 1975, Holliday and Pugh, 1975).

Ο Riggs το 1975 μελέτησε την αδρανοποίηση των χρωμοσωμάτων X και το μηχανισμό που καταλήγει έτσι ώστε μόνο ένα χρωμόσωμα να είναι επισημασμένο. Ακόμη πρότεινε ότι θα πρέπει να υπάρχει και ένας μηχανισμός εξάπλωσης ο οποίος απενεργοποιεί ολόκληρο το χρωμόσωμα. Αυτό το γεγονός τελικά μπορεί να ερμηνεύσει την αδρανοποίηση αυτοσωμικού DNA σε αρκετές περιπτώσεις X-αυτοσωμικών μεταθέσεων (Riggs, 1975).

Μία ενδιαφέρουσα μελέτη σχετικά με τη μεθυλίωση του DNA από τους Sager και Kitchin πραγματοποιήθηκε επίσης το 1975, η οποία πρότεινε ότι υπάρχουν ένζυμα σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς που περιορίζουν το μη τροποποιημένο DNA. Έτσι, διερεύνησαν την πιθανότητα ότι πολλές περιπτώσεις εξάλειψης ή αποσιώπησης χρωμοσωμάτων θα μπορούσαν να εμπλέκουν έναν τέτοιο μηχανισμό (Sager and Kitchin, 1975).

1.3 Εξέλιξη και ρόλο της επιγενετικής ρύθμισης

Τις τελευταίες δεκαετίες, πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι οι επιγενετικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στη ρύθμιση πολλών βιολογικών διεργασιών όπως (Moosavi and Ardekani, 2016):

- Αναδιοργάνωση του γονιδιώματος.
- Πρώιμη εμβρυογένεση και γαμετογένεση.
- Διαφοροποίηση των κυττάρων.
- Εκμάθηση και οργάνωση μνήμης.
- Προδιάθεση σε διάφορους τύπους καρκίνου καθώς και πρόκληση γενετικών ανωμαλιών, ασθενειών παιδικής ηλικίας ή ασθενειών κατά την διάρκεια της ζωής.

Πιο αναλυτικά:

α) Πρώιμη Εμβρυογένεση: Τα γεγονότα που οδηγούν στον προσδιορισμό των διαφόρων κυτταρικών τύπων φαίνεται να ελέγχονται από αναπτυξιακούς χρονομετρητές (developmental clocks) οι οποίοι λειτουργούν εντός μεμονωμένων κυττάρων (Sassone-Corsi, 1998). Είναι πιθανόν αυτοί οι αναπτυξιακοί χρονομετρητές να είναι σημαντικοί για την εκπόνηση του γενετικού προγράμματος ανάπτυξης καθώς θα μπορούσαν να είναι ένας μηχανισμός που θα «μετράει» έναν συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων πριν ενεργοποιηθεί ή αδρανοποιηθεί ένα συγκεκριμένο γονίδιο ή γονίδια (Holliday and Pugh, 1975).

β) Διαφοροποίηση κυττάρων: Εκτός από τη μεθυλίωση του DNA, υπάρχει επίσης και η πιθανότητα να υπάρξουν ειδικές αλλαγές σε βάσεις, για παράδειγμα, ενζυμική απαμίνωση της 5-μεθυλοκυτιδίνης για να σχηματιστεί η θυμιδίνη και έτσι να πραγματοποιηθεί αντικατάσταση ενός ζεύγους βάσεων GC με ένα ζεύγος βάσεων AT (Scarano, 1971). Η ύπαρξη του ενζύμου απαμινάση της κυτιδίνης που μετατρέπει την κυτοσίνη σε ουρακίλη στο DNA είναι τώρα πολύ καλά τεκμηριωμένη στο

ανοσοποιητικό σύστημα και επίσης σε πολυδύναμα κύτταρα (Petersen-Mahrt, et al, 2009, Morgan, et al., 2004).

γ) Προδιάθεση καρκίνου: Έγινε φανερό ότι οι μεταβολές στη μεθυλίωση του DNA μπορεί να είναι σημαντικές στην εξέλιξη ενός όγκου (Vineis, et al, 2010). Υπήρξαν πολλές ενδείξεις ότι οι μεταβολές στην έκφραση γονιδίων σε καρκινικά κύτταρα οφείλονταν σε μετάλλαξη, αλλά αν το μοντέλο μεθυλίωσης ήταν σωστό, η κατανομή της 5-μεθυλοκυτοσίνης σε καρκινικά κύτταρα θα μπορούσε να οδηγήσει επίσης σε αλλαγές στην έκφραση γονιδίων. Αρκετές δεκαετίες αργότερα προτάθηκε ότι η 5-μεθυλοκυτοσίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης και ότι αυτό το πρότυπο μεθυλίωσης είναι κληρονομικό. Αυτές οι προβλέψεις υποστηρίζονται τώρα από ένα μεγάλο αριθμό μελετών που δείχνουν ότι η μεθυλίωση συνδέεται έντονα με τη γονιδιακή αποσιώπηση κάτω από διάφορες βιολογικές συνθήκες. Σήμερα, ο όρος «επιγενετική» αντικατοπτρίζει το γεγονός ότι αν και το DNA είναι ουσιαστικά το ίδιο σε όλα τα σωματικά κύτταρα ενός οργανισμού, τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών τύπων (Riggs, et al, 1996, Nayak, et al, 2016).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

2.1 Γενικά

Κάθε χρόνο περισσότεροι από 13 εκατομμύρια θάνατοι παγκοσμίως οφείλονται στη ρύπανση του περιβάλλοντος και περίπου το 24% των ασθενειών προκαλούνται από περιβαλλοντικές εκθέσεις που θα μπορούσαν να αποφευχθούν με προληπτικά μέτρα. Οι περιβαλλοντικές μολυσματικές και τοξικές ουσίες είναι ευρέως διαδεδομένες σε όλο τον κόσμο και περιλαμβάνουν διάφορα υλικά και χημικές ουσίες, όπως υποπροϊόντα καύσης, μολυσματικά ίχνη μετάλλων και οργανικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στην καθημερινή ζωή. Η έκθεση σε ποικίλες ποσότητες και σε ποικίλους τύπους αυτών των ουσιών συνδέεται με αρνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία και οι τομείς της περιβαλλοντικής υγείας έχουν επικεντρωθεί στην καλύτερη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι εν λόγω μολυσματικές ουσίες επηρεάζουν τις βιολογικές διεργασίες. Μετά από μελέτες σε ζώα από τους Jirtle και Skinner, οι ερευνητές άρχισαν να εξετάζουν την επίδραση της περιβαλλοντικής έκθεσης στους επιγενετικούς μηχανισμούς των ανθρώπινων πληθυσμών (Marsit, 2015).

Πολλές μελέτες έχουν συνδέσει τους ρύπους του περιβάλλοντος με επιγενετικές αλλαγές συμπεριλαμβανομένων της μεθυλίωσης του DNA, των τροποποιήσεων των ιστονών και των microRNAs (Hou, et al, 2012). Το επιγονιδίωμα ενσωματώνει τις πληροφορίες που κωδικοποιούνται στο γονιδίωμα με μοριακά και χημικά σήματα κυτταρικής, εξωκυτταρικής, και περιβαλλοντικής προέλευσης για τον προσδιορισμό της λειτουργικής ταυτότητας κάθε τύπου κυττάρου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του οργανισμού ή την εκδήλωση μίας ασθένειας (Rivera and Ren, 2013). Έτσι, σε αντίθεση με τη σταθερότητα του γονιδιώματος, η πλαστικότητα του επιγονιδιώματος χαρακτηρίζεται από δυναμικές και ευέλικτες αποκρίσεις σε ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά σήματα (Hou, et al, 2012).

2.2 Μεθυλίωση DNA

Περιοχές μεθυλίωσης DNA

Η μεθυλίωση του DNA συμβαίνει στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και είναι η διαδικασία κατά την οποία σχηματίζεται ένας ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ μιας μεθυλομάδας από S-Αδενοσυλο-Μεθειονίνη (S-adenosyl- methionine) στον άνθρακα στη θέση 5' στο δακτύλιο της κυτοσίνης, μπορεί δε να συμβεί και στους δακτυλίους της αδενίνης ή της θυμίνης (Singal and Ginder, 1999) (**Εικόνα 8Α**). Ουσιαστικά με την προσθήκη της μεθυλομάδας μπορεί να προκληθεί αποσιώπηση ενός ή περισσοτέρων γονιδίων, μια διαδικασία η οποία είναι δυναμική και αντιστρεπτή και εξαρτώμενη κάθε φορά από τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα στα οποία εκτίθεται το κύτταρο (Siedlecki and Zielenkiewicz, 2006).

Στο DNA υπάρχουν περιοχές που έχουν υψηλή συγκέντρωση των CpG (> 60%) και ονομάζονται νησίδες (islands) CpG. Η μεθυλίωση του DNA συμβαίνει συνήθως σε δινουκλεοτίδια CpG όπου μια κυτοσίνη ακολουθείται από μια γουανίνη. Οι νησίδες CpG συνίστανται από 300-3000 ζεύγη βάσεων, αποτελούν περίπου το 1-2% του γονιδιώματος και τυπικά βρίσκονται σχεδόν στο 40% των υποκινητών των γονιδίων. Οι περισσότερες νησίδες CpG είναι μη μεθυλιωμένες σε φυσιολογικά κύτταρα (Bird, 2002).

Ένζυμα μεθυλίωσης και λειτουργικότητα

Η διαδικασία μεθυλίωσης διενεργείται από μια DNA μεθυλοτρανσφεράση (DNMT). Οι μεθυλοτρανσφεράσες DNA είναι τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα τόσο για την “εγκατάσταση” όσο και για την διατήρηση της κυτταρικής μεθυλίωσης του DNA. Τα DNMTs διαθέτουν μία ρυθμιστική περιοχή στο N-τελικό άκρο και μια καταλυτική περιοχή στο C-τελικό τους άκρο (Pósfai, et al., 1989). Όλες οι μεθυλοτρανσφεράσες χρησιμοποιούν ένα κοινό καταλυτικό μηχανισμό και χρησιμοποιούν τον συμπαραγόντα AdoMet (S-adenosylmethionine) ως πηγή μεθυλίου, όπως προαναφέρθηκε. Τα DNMTs ταξινομούνται σε εκείνα που γενικά ρυθμίζουν την de novo μεθυλίωση των δινουκλεοτιδίων CpG (DNMT3a/ b) και εκείνων που αφορούν τη διατήρηση της καθιερωμένης κατάστασης της μεθυλίωσης. Οι τρεις DNA

μεθυλοτρανσφεράσες που παρατηρούνται στα θηλαστικά, DNMT1, DNMT3a και DNMT3b κάνουν de novo μεθυλίωση (Bestor, 2000, Burton and Torres-Padilla, 2010).

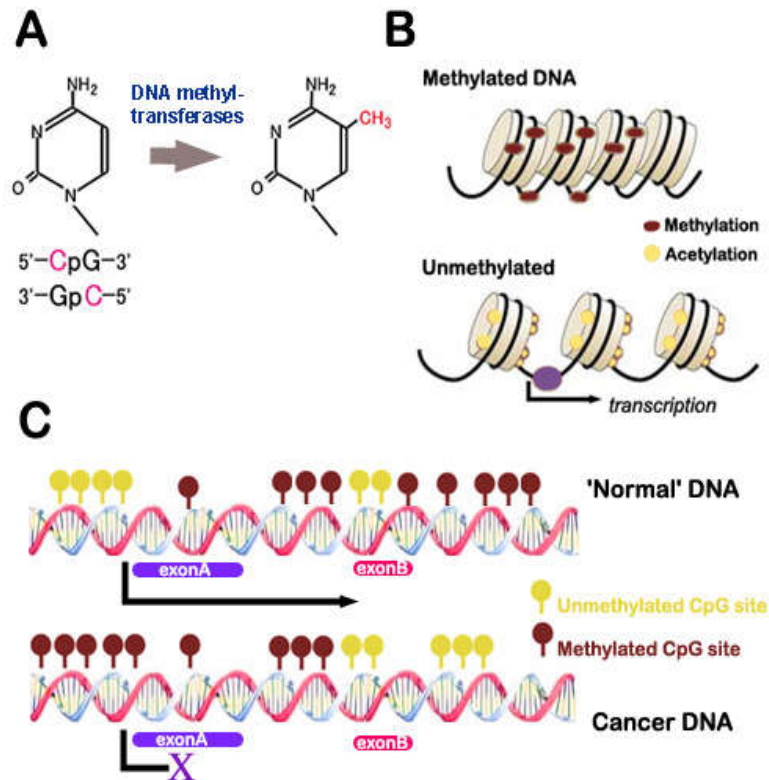
Αυτή η διαδικασία μεθυλίωσης σχετίζεται με την αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή γονιδίων επιδιόρθωσης DNA. Αυτή η αποσιώπηση μπορεί να μεταφερθεί σε πολλές γενιές κυττάρων. Στο γονιδίωμα ενός ενήλικου κυττάρου σπονδυλωτών, το 60-90% των κυτοσινών στα δινουκλεοτίδια CpG είναι μεθυλιωμένα και οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες υφίστανται απαμίνωση με αποτέλεσμα την μετατροπή της κυτοσίνης σε θυμίνη (Kass, et al, 1997). Η υπερμεθυλίωση του DNA παρατηρείται στην ετεροχρωματίνη και σχετίζεται με καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Από την άλλη, τα μη μεθυλιωμένα δινουκλεοτίδια CpG σχηματίζουν ομάδες στην 5' ρυθμιστική περιοχή ενεργών γονιδίων (Mohn, et al, 2008).

Η DNMT1 και αρκετές πρωτεΐνες δέσμευσης με μεθυλ-CpG, όπως οι MeCP2, MBD2 και MBD3, συνδέονται με αποακετυλάση της ιστόνης (HDAC-histone deacetylase). Οι πρωτεΐνες HDAC (histone deacetylase), μια κατηγορία ενζύμων που απομακρύνουν τις ακετυλομάδες, προσελκύονται μέσω πρωτεϊνών που προσδένονται στο μεθυλιωμένο DNA και αποακετυλιώνουν τη λυσίνη 9 στην ιστόνη H3 (H3-K9). Η μεθυλίωση της H3-K9 σχετίζεται με το σχηματισμό της ετεροχρωματίνης και αυτές οι παρατηρήσεις συνδέουν τη μεθυλίωση του DNA με τις τροποποιήσεις της χρωματίνης (**Εικόνα 8B**).

Μεθυλίωση και ογκογένεση

Πρωτεΐνες που αλλάζουν τη στερεοδομή του DNA προσελκύονται μέσω πρωτεϊνών που προσδένονται στο μεθυλιωμένο DNA και προκαλούν συμύκνωση της χρωματίνης και καταστολή της μεταγραφής (Li, et al, 2002). Η υπερμεθυλίωση των υποκινητών αποτελεί μηχανισμό απενεργοποίησης των ογκο-κατασταλτικών γονιδίων. Με άλλα λόγια, η υπερμεθυλίωση στις νησίδες CpG μπορεί να αδρανοποιήσει τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, να επηρεάσει σημαντικά γονίδια του κυτταρικού κύκλου, να επιδράσει στην επιδιόρθωση του DNA και στο μεταβολισμό των καρκινογόνων ουσιών (Ushijima, 2005) (**Εικόνα 8C**). Το προφίλ των υπερμεθυλιωμένων CpG νησιδίων σε ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι ειδικό για

κάθε τύπο καρκίνου (Robertson, 2005). Όλα τα παραπάνω συνοψίζονται στο παρακάτω σχήμα:



Εικόνα 8: Αναπαράσταση **A)** του σχηματισμού ενός ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ μιας μεθυλομάδας από *S*-Αδενοσυλο-Μεθειονίνη στον άνθρακα στη θέση 5' στο δακτύλιο της κυτοσίνης, **B)** της σύνδεσης μεθυλίωσης και τροποποίησης της χρωματίνης **C)** συσχέτισης της μεθυλίωσης του DNA με τον καρκίνο (Korey, 2009).

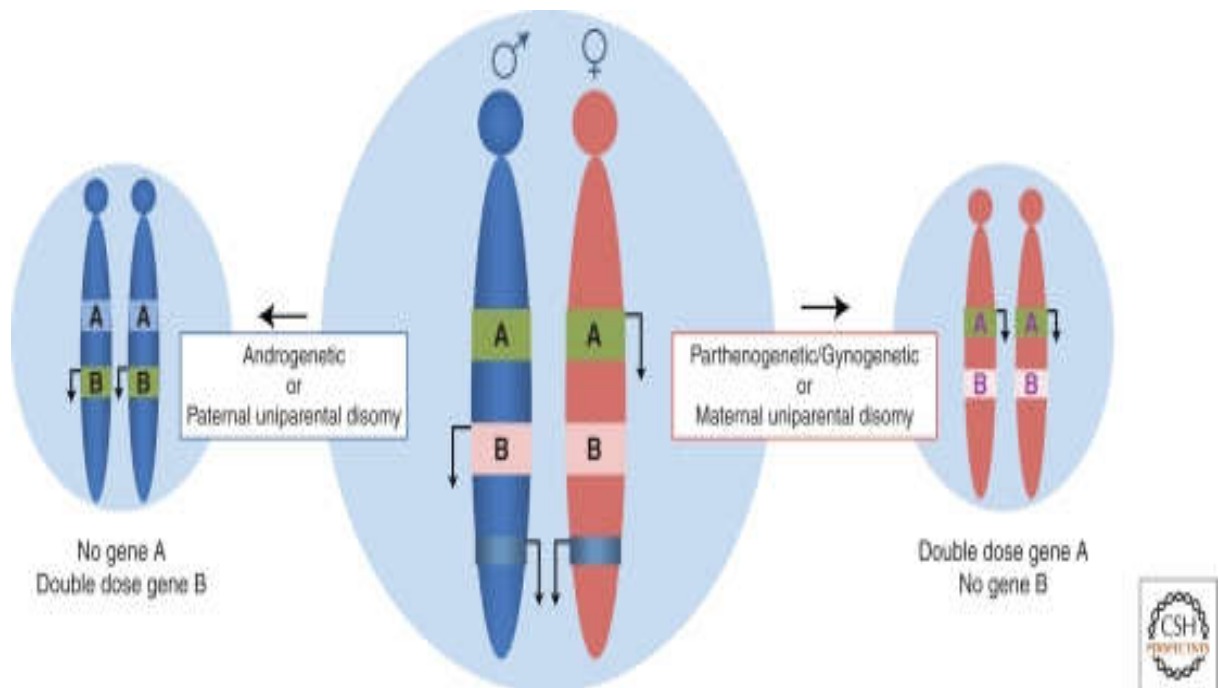
Επιπροσθέτως, η μεθυλίωση του DNA είναι σημαντική για τη γονιδιακή αποσιώπηση, τη γονιδιωματική αποτύπωση, τη διατήρηση της σταθερότητας του γονιδιώματος, την εμβρυϊκή ανάπτυξη, την αδρανοποίηση του X χρωμόσωματος και τον αναπτυξιακό έλεγχο (Moore, et al, 2013). Είναι γνωστό ότι όλοι έχουμε τρισεκατομμύρια κύτταρα, με πανομοιότυπες πληροφορίες DNA στον πυρήνα. Για να «αποσιωπηθεί» ένα γονίδιο, η μεθυλίωση πρέπει να γίνει σε ένα σημαντικό μέρος αυτών των κυττάρων. Η μεθυλίωση του DNA επηρεάζει δύο πλευρές της γενετικής μας κληρονομιάς: τις ιδιότητες που δεν μπορούμε να αλλάξουμε αφού εδραιωθούν (όπως το χρώμα των ματιών, το χρώμα του δέρματος και την ομάδα αίματος) και τις ιδιότητες που μπορούμε να αλλάξουμε (όπως το μεταβολισμό και την ανοσολογική

απόκριση) (Robertson and Wolffe, 2000). Επιπλέον διαταραχές του μηχανισμού μεθυλίωσης έχουν συσχετιστεί με ασθένειες όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (SLE), η ανοσοανεπάρκεια και το σύνδρομο ICF - Immunodeficiency, Centromere instability and Facial anomalies (Bestor, 2000).

2.3 Γενετική αποτύπωση (imprinting)

Ορισμός φαινομένου

Το φαινόμενο της γενετικής αποτύπωσης περιγράφει τη διαφορετική «συμπεριφορά» των αλληλομόρφων που κληρονομούνται από κάθε γονέα σε συγκεκριμένα γονίδια (αποτυπωμένα - imprinted). Το γενετικό αποτύπωμα προτάθηκε σε πειράματα αναπαραγωγής σε μύες που φέρουν αμοιβαίες χρωμοσωμικές μετατοπίσεις και μπορεί να είναι ένα χαρακτηριστικό της ανάπτυξης των θηλαστικών (Lyon and Glenister, 1977). Στις αρχές της δεκαετίας του 1980, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταμόσχευσης προκυρήνων σε ζυγωτό ποντικού τα οποία επιβεβαίωσαν ότι η φυσιολογική ανάπτυξη απαιτεί τη συμβολή των γονιδιωμάτων τόσο της μητέρας όσο και του πατέρα. Η τεράστια πλειοψηφία των εμβρύων ποντικού που προέρχονταν από την παρθενογένεση (παρθενογονιδιώματα με δύο μητρικά γονιδιώματα ή ωαρίων) και την ανδρογένεση (ανδρογονιδιώματα, με δύο πατρικά γονιδιώματα ή γονιδιώματα σπερματοζωαρίων) πεθαίνουν κατά το στάδιο της βλαστοκύστης/εμφύτευσης. Σε σπάνιες περιπτώσεις που εξελίσσονται σε στάδια μετα-εμφυτεύματος, τα έμβρυα με δύο θηλυκούς προκυρήνες εμφανίζουν καλύτερη εμβρυϊκή ανάπτυξη ως προς την ανάπτυξη του πλακούντα, ενώ για τα έμβρυα με δύο αρσενικούς προκυρήνες συμβαίνει το αντίστροφο (Barton, et al, 1984, Mann and Lovell - Badge, 1984, McGrath and Solter, 1984). Στα θηλαστικά, ένας μικρός αριθμός γονιδίων εκφράζονται ανάλογα με την γονική τους προέλευση με αποτέλεσμα να εκφράζεται μόνο ένα γονικό αλληλόμορφο. Αυτά τα γονίδια, τα οποία ονομάζονται “αποτυπωμένα” εξαρτώνται από τον επιγενετικό μηχανισμό για τον αρχικό προσδιορισμό της γονικής ταυτότητας τους καθώς και για την καθιέρωση και διατήρηση της γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου προέλευσής τους (Kalish, et al, 2014) (Εικόνα 9).

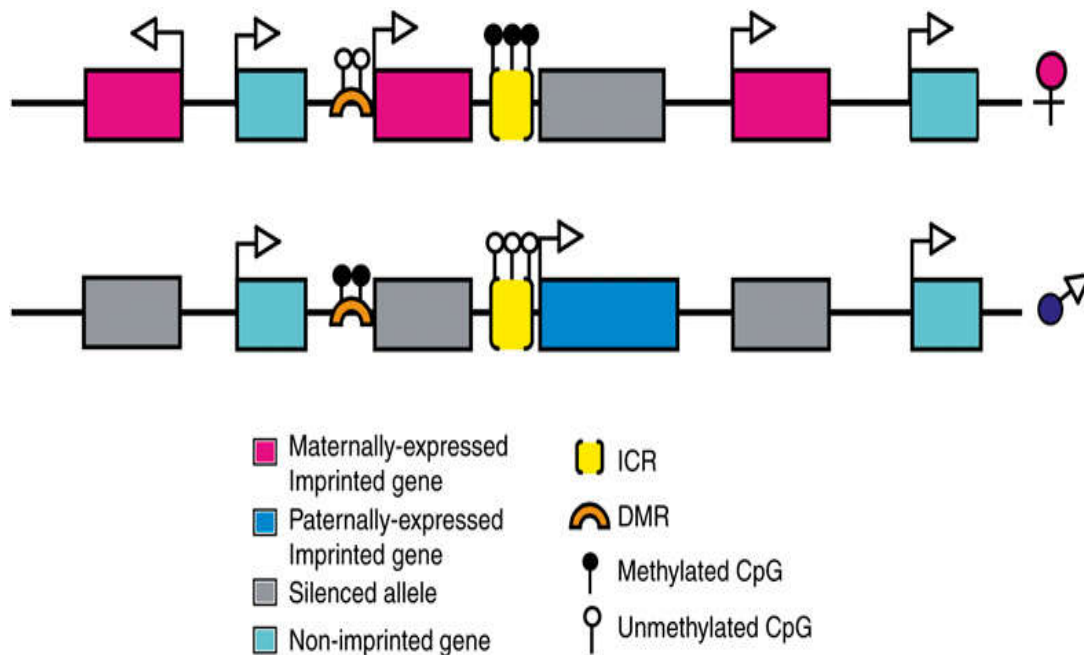


Εικόνα 9: Στο κέντρο, ένα κύτταρο απεικονίζεται με ένα χρωμόσωμα μητρικής (κόκκινο) ή πατρικής (μπλε) προέλευσης και δύο αποτυπωμένα γονίδια. Το γονίδιο A μεταγράφεται από το μητρικό αλληλόμορφο (πράσινο επισημασμένο, το βέλος δείχνει την μεταγραφή) και καταστέλλεται στο πατρικό αλληλόμορφο (γαλάζιο επισημασμένο). Αντίθετα, το γονίδιο B μεταγράφεται από το πατρικό αλληλόμορφο (πράσινο επισημασμένο και βέλος) και καταστέλλεται στο μητρικό αλληλόμορφο (ανοιχτό ροζ επισημασμένο)(Bartolomei and Ferguson-Smith, 2011).

Συστατικά ενός αποτυπωμένου γονιδιακού συμπλέγματος

Περίπου 100 αποτυπωμένα γονίδια έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής στα θηλαστικά. Τα αποτυπωμένα γονίδια ελέγχονται από ρυθμιστικές περιοχές που λειτουργούν με *cis* ισομέρεια, οι οποίες ονομάζονται *περιοχές ελέγχου αποτύπωσης (ICRs- imprinting control regions)*. Οι ICRs περιοχές μεθυλιώνονται με *de novo* DNA μεθυλοτρανσφεράσες κατά την ανάπτυξη της γενετικής γραμμής (Bartolomei and Ferguson-Smith, 2011). Οι περιοχές ελέγχου αποτύπωσης αποτελούνται συχνά από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA που βρίσκονται πλευρικά ή εσωτερικά στα αποτυπωμένα γονίδια και στις περισσότερες περιπτώσεις η απομάκρυνση μιας ICR θα έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια αποτύπωσης. Οι επιγενετικοί τροποποιητές της γονιδιακής έκφρασης όπως η μεθυλίωση του DNA, η τροποποίηση των ιστονών, τα

non-RNA (μη κωδικοποιημένα RNA ή μικρά RNA) και ο σχηματισμός χρωματίνης ενεργούν εντός των ICRs για να καθιερώσουν και να διατηρήσουν την αποτυπωμένη κατάσταση. Οι ICR περιοχές δρουν ως θέσεις πυρήνωσης για αποσιώπηση ή ενεργοποίηση γονιδίων και είναι σε θέση να ρυθμίζουν την έκφραση ενός μόνο γονιδίου ή ενός πλήρους συμπλέγματος γονιδίων (**Εικόνα 10**).



Εικόνα 10: Απεικονίζονται τα μητρικά (επάνω) και τα πατρικά (κάτω) αλληλόμορφα μιας ομάδας γονιδίων με αποτύπωση. Τα γονιδιακά συμπλέγματα με αποτύπωση περιλαμβάνουν γονίδια που εκφράζονται από το μητρικό αλληλόμορφο (ροζ κουτιά), γονίδια που εκφράζονται από το πατρικό αλληλόμορφο (μπλε κουτιά) και διααλληλόμορφα εκφρασμένα γονίδια (δηλ. μη αποτυπωμένα γονίδια, γαλάζια πλαίσια). Αυτά τα μη αποτυπωμένα γονίδια μπορούν να βρεθούν στη μέση ενός συμπλέγματος που περιβάλλεται από αποτυπωμένα γονίδια. Το ICR (κίτρινο) ελέγχει την αποτύπωση πολλαπλών γονιδίων στην περιοχή. Η διαγραφή αυτού του διαφορικά μεθυλιωμένου στοιχείου οδηγεί σε απώλεια αποτύπωσης των συνδεδεμένων γονιδίων. Πολλές αποτυπωμένες συστάδες περιέχουν επίσης επιπλέον DMRs (Differentially Methylated Regions -πορτοκαλί) που αποκτούν μεθυλίωση του DNA μετά το στάδιο προ-εμφύτευσης (Bartolomei, 2009).

Σημασία γονιδιωματικής αποτύπωσης

Δεδομένης της έκφρασης του ενός αλληλομόρφου και της πολυπλοκότητας της ρύθμισής τους, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι πολλά αποτυπωμένα γονίδια είναι σημαντικά για τον έλεγχο της εμβρυικής ανάπτυξης και για τη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου. Η κατανόηση της αποτυπωμένης γονιδιακής λειτουργίας στον άνθρωπο προέρχεται από μελέτες γονότυπου-φαινότυπου σε ασθενείς με

διαταραχές αποτύπωσης. Αυτές περιλαμβάνουν διαταραχές της συμπεριφοράς και του νευροαναπτυξιακού συστήματος, όπως τα σύνδρομα Prader-Willi και Angelman , διαταραχές της ανάπτυξης Syndrome Beckwith-Wiedemann και Silver-Russell καθώς και τα σύνδρομα της μητρικής και/ή πατρικής μονογονικής δισωμίας 14 και τον παροδικό νεογνικό διαβήτη. Έτσι, ατέλειες στη μεθυλίωση του DNA είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε διαταραχές που επηρεάζουν την εμβρυογένεση και τη γονιδιωματική αποτύπωση (Horsthemke and Buiting, 2006, Weksberg, et al, 2005, Abu-Amero, et al, 2008, Ogata, et al, 2008, Temple, 2007).

2.4 Το φαινόμενο RNA παρεμβολής (RNA interference- RNAi)

Γενικά

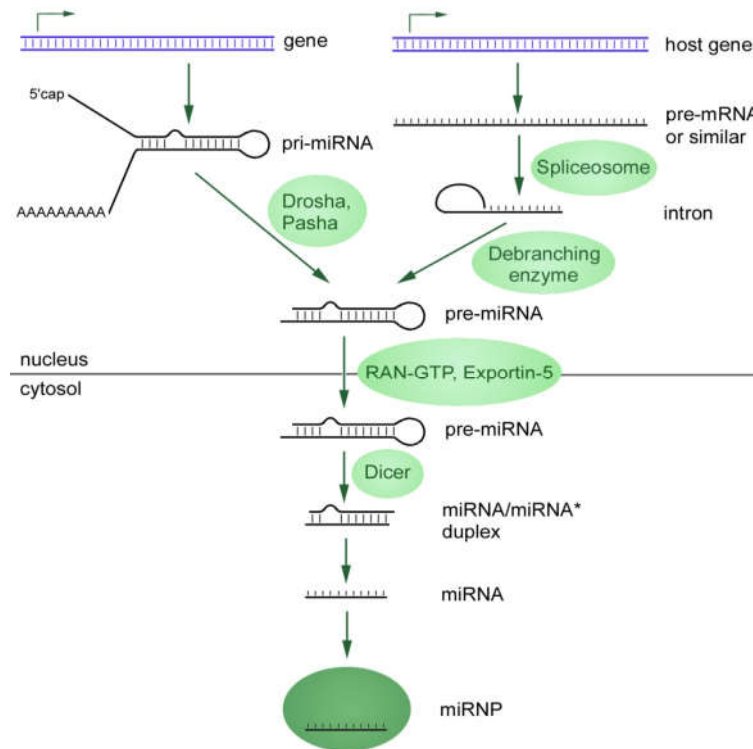
Η μεταμεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων συμβαίνει μέσω ενός επιγενετικού μηχανισμού που λέγεται παρέμβαση RNA. Εκτός από τη σύνδεση της παρέμβασης RNA με τη μεταμεταγραφική αποσιώπηση ενός γονιδίου στο κυτταρόπλασμα, το φαινόμενο αυτό συμβάλλει και σε άλλες λειτουργίες εντός του πυρήνα. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις που κατευθύνονται από μικρά RNA έχουν αποδειχθεί ότι προκαλούν μεταγραφική καταστολή σε φυτά, μύκητες και ζώα (Agrawal, et al, 2003).

Στοιχεία που συμμετέχουν στην RNAi

Πολλές μελέτες δείχνουν ότι η παρέμβαση RNA ρυθμίζει τη μεταγραφή μέσω της αλληλεπίδρασης με μεταγραφικούς μηχανισμούς. Τα είδη μορίων RNA που συμμετέχουν σε αυτήν την διαδικασία είναι:

α) Τα πυρηνικά μικρά RNA που περιλαμβάνουν τα μικρά παρεμβατικά RNA (**siRNAs**) και τα PIWI- αλληλεπιδρώντα RNAs (**piRNAs**- η μεγαλύτερη κατηγορία μικρών μη κωδικοποιούμενων RNAs που εκφράζονται σε ζωικά κύτταρα), τα οποία εμπλέκονται σε πυρηνικές διεργασίες όπως η ρύθμιση των μεταθετών στοιχείων, ο σχηματισμός ετεροχρωματίνης και η ρύθμιση της σταθερότητας του γονιδιώματος κατά την ανάπτυξη (Castel and Martienssen, 2013).

β) Τα microRNAs (**miRNAs**) που είναι μια ομάδα μικρών μη κωδικοποιούμενων RNAs (~21 nucleotides) που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο (Frixia, et al, 2015) (**εικόνα 11**).



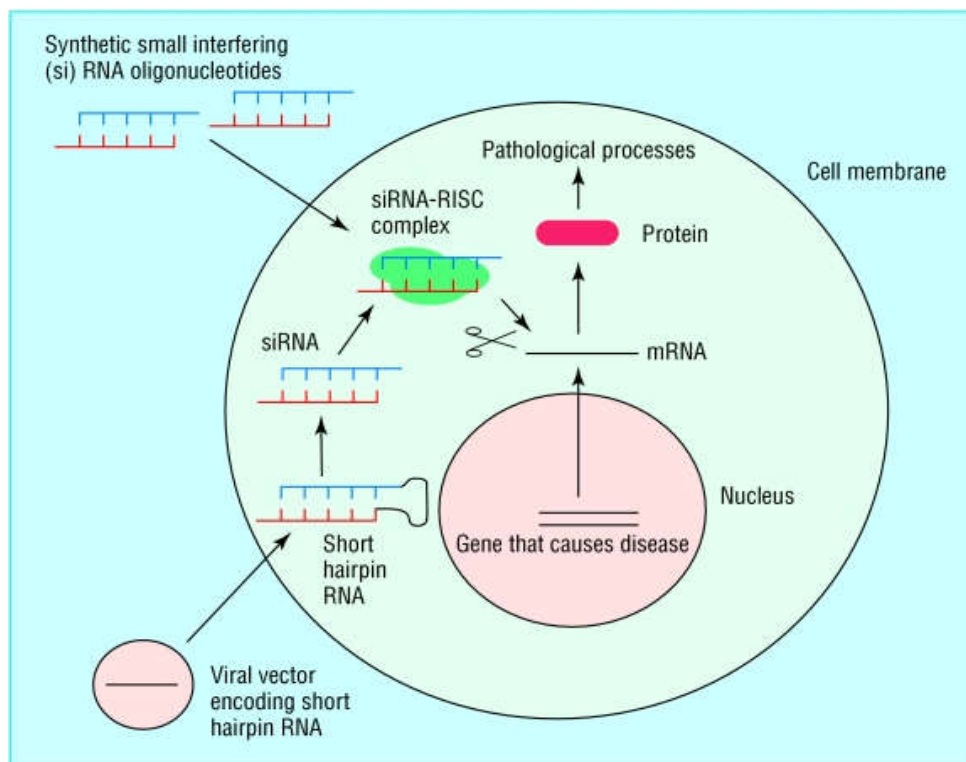
Εικόνα 11: Το miRNA μεταγράφεται από το δικό του γονίδιο ή από ένα γονίδιο ξενιστή ως ένα μακρύ μετά-miRNA (pri-miRNA) αντίγραφο. Αυτό εξελίσσεται σε προ-miRNA (pre-miRNA), το οποίο στη συνέχεια μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα από την Exportin-5, όπου υφίσταται περαιτέρω τροποποίηση από το Dicer και σχηματίζεται το τελικό μόριο miRNA, έτοιμο για τη γονιδιακή σίγαση. **Ran:** Ras-related nuclear protein ή GTP-binding nuclear protein, **Dicer:** ενδοριβονουκλεάση **Drosha:** ριβονουκλεάση III (MacFarlane and Murphy, 2010).

Εφαρμογές RNAi

Η απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs έχει ως αποτέλεσμα επιγενετικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν κατά την ογκογένεση. Όλες οι γνώσεις των τελευταίων ετών έχουν δείξει τη σύνδεση των miRNAs με πολλές βιολογικές διεργασίες που εμπλέκονται στον καρκίνο (π.χ. ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, απόπτωση και διαφοροποίηση). Αρκετές μελέτες έχουν προσδιορίσει το προφίλ έκφρασης ειδικών miRNAs για διαφορετικούς τύπους καρκίνου, γεγονός το οποίο

συσχετίζεται τόσο με την επιβίωση των ασθενών όσο και με την πιθανή αξιοποίηση των miRNAs στην πρόβλεψη, διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου (Lu, et al,2005, Yanaihara, et al, 2006, Sacconi, et al, 2012). Πιο συγκεκριμένα, τα miRNAs μπορούν να δράσουν ως ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια ανάλογα με τον στόχο τους και ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το miR-34a το οποίο βρέθηκε να έχει αντιμεταστατική δράση αναστέλοντας την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάπτωση (epithelial mesenchymal transition, EMT) των σχετιζόμενων πρωτεϊνών σε διάφορα καρκινώματα (Imani,et al,2017).

Δεδομένου ότι οι επιγενετικοί μηχανισμοί μπορούν να ελέγξουν την έκφραση πολλών γονιδίων και ότι τα miRNAs μεταγράφονται επίσης από την RNA πολυμεράση II (Pol II), οι επιγενετικοί μηχανισμοί μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο και στον έλεγχο της έκφρασης του miRNA (**Εικόνα 12**).



Εικόνα 12: Ο θεραπευτικός μηχανισμός της παρεμβολής RNA. (Downward, 2004)

2.5 Τροποποιήσεις Ιστονών

Ορισμός

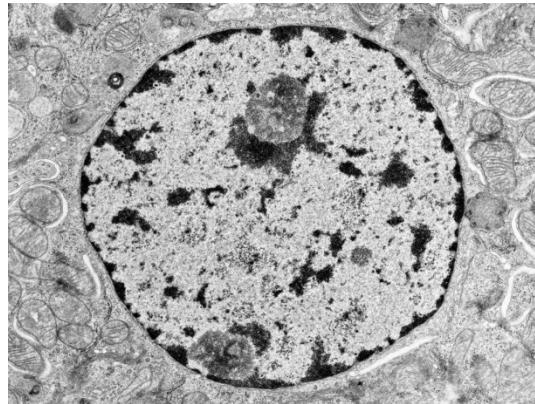
Οι ιστόνες είναι πρωτεΐνες που περιβάλλουν τη διπλή έλικα του DNA σχηματίζοντας δομές που ονομάζονται νουκλεοσώματα. Το νουκλεόσωμα θεωρείται η βασική μονάδα της ευκαρυωτικής χρωματίνης και περιέχει 8 μόρια ιστονών (οκταμερή). Τόσο οι ιστόνες όσο και το DNA μπορούν να τροποποιηθούν ώστε να αποσιωπήσουν ή να ενεργοποιήσουν γονίδια. Η δομή των ιστονών αποτελείται από δύο περιοχές, μια σφαιρική περιοχή και μια «ουρά» που περιέχει NH_2 κατάληξη. Οι τροποποιήσεις τυπικά συμβαίνουν στην περιοχή της αμινοτελικής ουράς σε διαφορετικές θέσεις αμινοξέων.

Μορφές Χρωματίνης

Όσον αφορά τις μορφές που μπορεί να προσλάβει η γενική (global) χρωματίνη αυτές είναι η ευχρωματίνη, η ετεροχρωματίνη και οι διδύναμες (bivalent) περιοχές σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ESCs). Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της κάθε μορφής είναι (Tamaru, 2010):

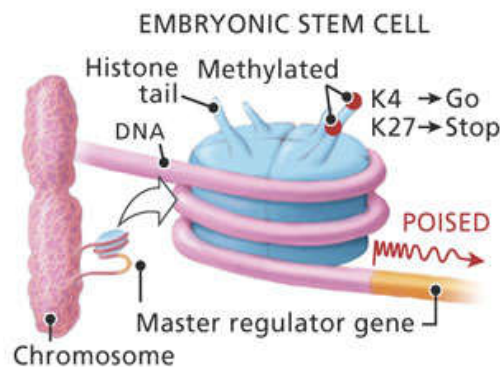
A) Η ετεροχρωματίνη είναι πολύ συμπυκνωμένη, βρίσκεται στα κεντρομερή και τελομερή, περιέχει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, είναι γονιδιακά φτωχή και συνδέεται με κατεσταλμένη μεταγραφή. Ακόμα, είναι δύσκολο να αντιγραφεί κι έτσι επιτυγχάνεται ουσιαστικά η αποσιώπηση των περισσότερων γονιδίων μέσα σε αυτή.

B) Η ευχρωματίνη είναι πιο χαλαρά πακεταρισμένη, είναι πλούσια σε γονίδια, βρίσκεται στους βραχίονες των χρωμοσωμάτων και σχετίζεται με ενεργή μεταγραφή (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Η ευχρωματίνη είναι πιο χαλαρά πακεταρισμένη με έντονη μεταγραφική δραστηριότητα και απεικονίζεται με το ανοιχτό χρώμα ενώ η ετεροχρωματίνη αντιπροσωπεύεται από τις σκουρόχρωμες περιοχές λόγω της συμύκνωσής της (http://medcell.med.yale.edu/histology/cell_lab/euchromatin_and_heterochromatin.php).

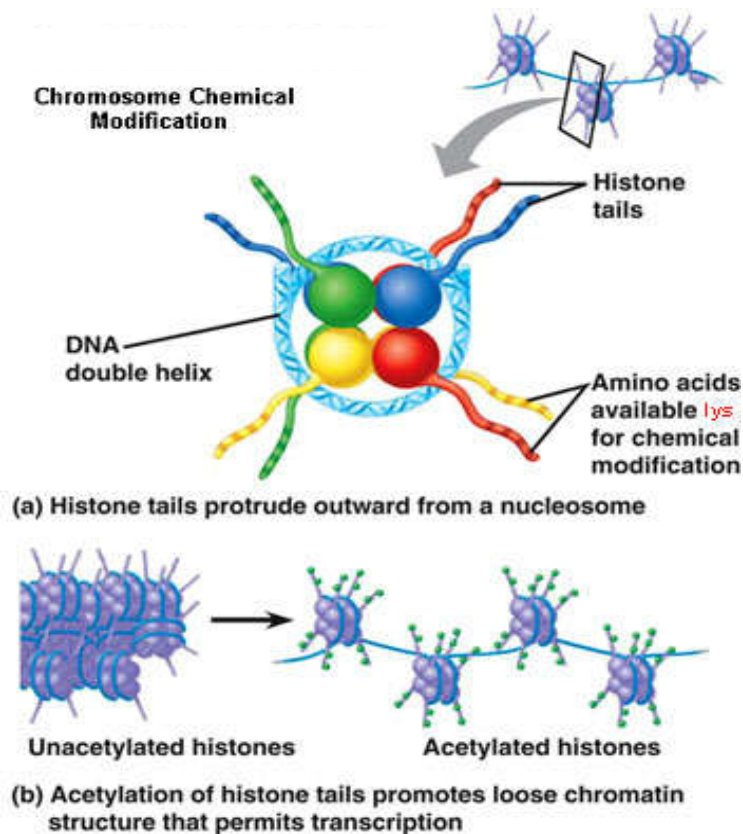
Γ) Η χρωματίνη των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων έχει "διδύναμες" περιοχές που επάγουν τόσο την γονιδιακή ενεργοποίηση όσο και την καταστολή. Σε αυτές τις περιοχές, η ουρά της πρωτεΐνης ιστόνης H3 έχει μία ομάδα μεθυλίου προσαρτημένη στην λυσίνη 4 (K4) που είναι ενεργοποιημένη και μια μεθυλομάδα στη λυσίνη 27 (K27) η οποία είναι κατασταλτική (**Εικόνα 14**). Αυτή η "αντιφατική" κατάσταση μπορεί να διατηρεί τα γονίδια σε μια δυναμική φάση ενεργοποίησης και καταστολής (Harikumar and Meshorer, 2015).



Εικόνα 14: Η χρωματίνη των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων έχει "διδύναμες" περιοχές που επάγουν τόσο την γονιδιακή ενεργοποίηση όσο και την καταστολή (Jin, 2015).

Ιστονικές τροποποιήσεις

Οι τροποποιήσεις των ιστονών περιλαμβάνουν την ακετυλίωση, την μεθυλίωση, την φωσφορυλίωση και την ουβικιτινυλίωση. Πιο συγκεκριμένα, οι ακετυλώσεις των ιστονών διευκολύνουν τη χαλάρωση της δομής της χρωματίνης ενώ οι μεθυλώσεις και φωσφορυλιώσεις παίζουν και αυτές θεμελιώδη ρόλο στην αναδιαμόρφωση της τελευταίας (**Εικόνα 15**). Επιπλέον, η ακετυλίωση ιστονών σχετίζεται με την ενεργοποίηση ενώ η αποακετυλίωση με καταστολή της μεταγραφής όπως παρατηρείται στην ετεροχρωματίνη (Dong and Weng, 2013).



Εικόνα 15: Η ακετυλίωση της ουράς της ιστόνης επάγει το σχηματισμό χαλαρής χρωματίνης (Cui, 2013).

2.6 Αδρανοποίηση του Χρωμοσώματος X

Ορισμός

Η αδρανοποίηση του Χρωμοσώματος X - Lyonization (προέρχεται από το ονομα της Mary Lyon) είναι μια διαδικασία κατά την οποία αδρανοποιείται ένα από τα δύο αντίγραφα του χρωμοσώματος X που υπάρχει στα θηλυκά θηλαστικά. Το ανενεργό χρωμόσωμα X «αποσιωπάται» με πακετάρισμα σε κατασταλτική ετεροχρωματίνη. Η επιλογή ποιό από το χρωμόσωμα X θα αδρανοποιηθεί είναι τυχαία στα ανώτερα θηλαστικά όπως σε ποντίκια και σε ανθρώπους. Μόλις απενεργοποιηθεί ένα χρωμόσωμα X, θα παραμείνει ανενεργό καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του κυττάρου. Αυτό το φαινόμενο είναι ζωτικής σημασίας γιατί εξασφαλίζεται με αυτό τον τρόπο ο σωστός αριθμός γονιδίων που εκφράζονται σε ένα κύτταρο και αποφεύγεται έτσι η ανώμαλη ανάπτυξη (Hoki, et al, 2009).

Διαδικασία

Απαραίτητο για την αδρανοποίηση του Χρωμοσώματος X είναι το κέντρο απενεργοποίησης X (XIC) στο χρωμόσωμα X. Οι μετατοπίσεις χρωμοσωμάτων που τοποθετούν το XIC σε ένα αυτοσωμικό χρωμόσωμα οδηγούν στην απενεργοποίηση του αυτοσωμικού και τα χρωμοσώματα X που στερούνται του XIC δεν απενεργοποιούνται. Αυτό συμβαίνει γιατί το XIC περιέχει τέσσερα μη μεταφραζόμενα γονίδια RNA (Xist, Tsix, Jpx και Ftx) τα οποία εμπλέκονται στην απενεργοποίηση του X Χρωμοσώματος. Το X-ανενεργό ειδικό μετάγραφο (Xist) κωδικοποιεί ένα μεγάλο μη κωδικοποιημένο RNA το οποίο είναι υπεύθυνο για την επαγωγή της σίγασης του χρωμοσώματος X από το οποίο μεταγράφεται (Hoki, et al, 2009). Τα X χρωμοσώματα που δεν έχουν το γονίδιο Xist δεν μπορούν να αδρανοποιηθούν (Penny, et al, 1996). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αδρανοποίησης, το ενεργό X χρωμόσωμα παύει να εκφράζει το Xist, ενώ το ανενεργό X αυξάνει δραματικά την παραγωγή Xist RNA. Στο μελλοντικό ανενεργό X χρωμόσωμα, το Xist RNA καλύπτει προοδευτικά το χρωμόσωμα ενώ το Xist RNA δεν εντοπίζεται στο ενεργό X χρωμόσωμα. Η σίγαση των γονιδίων κατά μήκος του ανενεργού X χρωμοσώματος συμβαίνει αμέσως μετά την επικάλυψη με Xist RNA (Penny, et al, 1996).

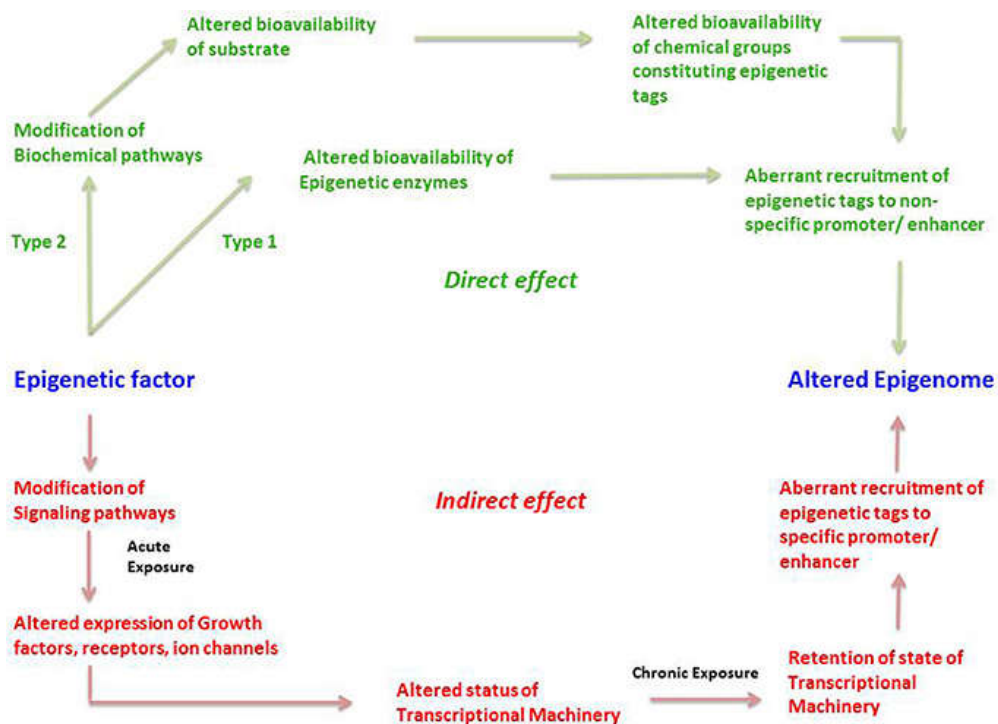
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ

3.1 Γενικά

Α) Άμεση και έμμεση επίδραση των επιγενετικών παραγόντων

Ένας επιγενετικός παράγοντας μπορεί να τροποποιήσει το επιγονιδίωμα επάγοντας αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση. Οι επιγενετικές επιδράσεις που ασκούνται από έναν εξωτερικό παράγοντα ή ένα εγγενές περιβάλλον μπορούν να οδηγήσουν σε άμεσες και έμμεσες επιδράσεις στο επιγονιδίωμα (**Εικόνα 16**). Πιο αναλυτικά, το άμεσο μονοπάτι μπορεί να λειτουργήσει με δύο διαφορετικούς τρόπους (τύπος 1 και τύπος 2). Στην άμεση οδό τύπου 1, ο επιγενετικός παράγοντας ασκεί άμεσα επίδραση στα επιγενετικά ένζυμα (DNMTs, HDACs, HATs, HMTs, HDMs) έτσι ώστε να υπάρχει μια αλλοιωμένη βιοδιαθεσιμότητα αυτών των ενζύμων στο κύτταρο. Ένα άμεσο αποτέλεσμα στην οδό τύπου 2 είναι όταν ένας επιγενετικός παράγοντας παρεμβαίνει σε μια βιοχημική οδό έτσι ώστε να υπάρχει μεταβλητή διαθεσιμότητα ενός μεταβολίτη που απαιτείται για να αποτελέσει επιγενετική ετικέτα (tag). Και οι δύο περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσουν σε μη φυσιολογική ή ανεπαρκή πρόσληψη επιγενετικών σημάτων με τυχαίο τρόπο σε μη συγκεκριμένους υποκινητές, δημιουργώντας τελικά ένα τροποποιημένο επιγενετικό προφίλ (Khanherkar, et al, 2014).

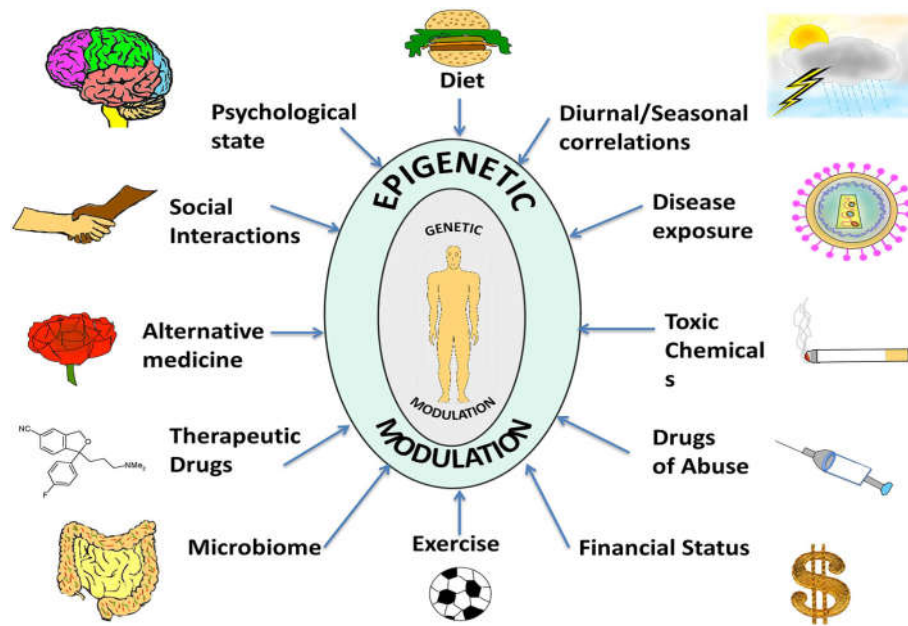
Από την άλλη πλευρά στην έμμεση οδό, ο επιγενετικός παράγοντας ασκεί επίδραση στο επιγονιδίωμα παρεμβαίνοντας σε οποιεσδήποτε οδούς σηματοδότησης του κυττάρου. Μια οξεία έκθεση στον επιγενετικό παράγοντα μπορεί να προκαλέσει μεταβαλλόμενη έκφραση αυξητικών παραγόντων, υποδοχέων, και διαύλων ιόντων προκαλώντας μη ομοιοστατικές κυτταρικές διεργασίες. Αυτό με τη σειρά του μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολή της κατάστασης του μεταγραφικού μηχανισμού (προσδεσμένου ή μη με τον υποκινητή/ενισχυτή) και της βιοδιαθεσιμότητάς του σε ένα κύτταρο. Μια χρόνια έκθεση στον επιγενετικό παράγοντα μπορεί να οδηγήσει στη διατήρηση μιας τέτοιας κατάστασης καθώς και στην ανώμαλη στρατολόγηση επιγενετικών ενζύμων οδηγώντας σε μόνιμη προσθήκη ή αφαίρεση επιγενετικών σημάτων σε ειδικούς υποκινητές/ενισχυτές. Αυτό συνεπώς καθιερώνει ένα τροποποιημένο επιγενετικό προφίλ (Khanherkar, et al, 2014).



Εικόνα 16: Το πράσινο χρώμα αντιστοιχεί στα άμεσα αποτελέσματα ενός επιγενετικού παράγοντα και το κόκκινο αντιπροσωπεύει τις έμμεσες επιδράσεις (Kanherkar, et al, 2014).

Β) Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Στους περιβαλλοντικούς παραγόντες περιλαμβάνονται το στρες, οι διατροφικές συνήθειες, το κλίμα, ο τρόπος ζωής, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, τοξικοί παράγοντες (π.χ. κοκαΐνη), το αλκοόλ, τα φυτοφάρμακα, η αφλατοξίνη, τα βακτήρια (π.χ. *Helicobacter pylori*), οι ιοί (π.χ. ιός ηπατίτιδας), η έκθεση σε βαρέα μέταλλα (π.χ. κάδμιο, αρσενικό) και εξωγενείς χημικές ουσίες που ονομάζονται «χημικές ουσίες που διαταράσσουν την ενδοκρινική λειτουργία» (endocrine disrupting chemicals, EDCs) (Perera, et al, 2009, Novikova, et al, 2008, Shukla and Lim, 2013, Jiménez-Chillarón, et al, 2015, Zhang, 2015, Tian, et al, 2013, Ryu, et al, 2015, Khan and Ahmed, 2015) (**Εικόνα 17**).



Εικόνα 17: Το σύνολο των εξωγενών επιδράσεων που επηρεάζουν την επιγενετική ρύθμιση (Kanherkar, et al, 2014).

3.2 Επιγενετική και διατροφή

Ένα από τα χαρακτηριστικά παραδείγματα για το πώς οι διατροφικές συνήθειες μπορούν να επηρεάσουν τους επιγενετικούς παράγοντες είναι η πρόσληψη φολικού οξέος. Το φολικό οξύ (βιταμίνη B9) είναι απαραίτητο για την επαναμεθυλίωση της ομοκυστεΐνης, μια βασική χημική αντίδραση στο μεταβολικό μονοπάτι που ρυθμίζει την S-αδενοσυλμεθειονίνη (SAM), την ομάδα δότη μεθυλίου στην ιστόνη και στις αντιδράσεις μεθυλίωσης και DNA. Η ποσότητα διατροφικής πρόσληψης φολικού οξέος μπορεί να συσχετιστεί με την επιγενετική κατάσταση του οργανισμού και η έλλειψη του μπορεί να οδηγήσει σε πολυάριθμες επιπλοκές της υγείας οι οποίες εμφανίζονται εντονότερα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη (Keyes, et al, 2007, Kotsopoulos, et al, 2008, Poulsen, et al, 2007).

Ένα άλλο διαιτητικό συστατικό είναι η μεθειονίνη η οποία εμπλέκεται στην μεταβολική οδό σύνθεσης της S-αδενοσυλ-μεθειονίνης και συνδέεται με ηπατικές νόσους επιγενετικής αιτιολογίας (Avila, et al, 2002). Το σελήνιο είναι μια ουσία που τροποποιεί τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA και της τροποποίησης των ιστονών. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η πρόληψη του καρκίνου με τη δράση του σεληνίου μπορεί να επάγεται από τις επιγενετικές του επιδράσεις (Xiang, et al, 2008). Ορισμένες διαιτητικές πολυφαινόλες, όπως η επιγαλοκατεχίνη-3-γαλάτη (Epigallocatechin-3-gallate) από το πράσινο τσάι και η γενιστεΐνη (Isoflavones genistein) από τη σόγια, πιστεύεται επίσης ότι προλαμβάνουν τον καρκίνο μέσω των επιγενετικών μηχανισμών (Fang, et al, 2007).

Πρόσφατα, άλλες ουσίες που εμφανίζονται φυσικά σε μερικά τρόφιμα, όπως το βουτυρικό σε τυριά, το διαλλυλ-δισουλφίδιο στο σκόρδο και το σουλφοραφάνιο στο μπρόκολο έχουν αναγνωριστεί ως αναστολείς των απακετυλασών των ιστονών και έχει προταθεί ένας υποτιθέμενος ρόλος για μερικές από αυτές ότι συμβάλλουν στην αναστολή της ανεξέλεγκτης εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου ή της επαγωγής απόπτωσης μέσω της αυξημένης ακετυλίωσης και της άρσης της καταστολής των γονιδίων p21 (αναστολέας CDK-1) και Bax (ρυθμιστής απόπτωσης) (Calvanese et al, 2009, Dashwood and Ho, 2007).

Η επίδραση της δίαιτας στην επιγενετική κατάσταση ενός οργανισμού μπορεί να είναι τόσο σημαντική που έχει ακόμη περιγραφεί ότι μια δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά μπορεί να συσχετιστεί με υπερμεθυλίωση του DNA του υποκινητή συγκεκριμένων κατασταλτικών όγκων (Brait, et al, 2009). Έτσι, ενώσεις

που βρίσκονται σε διαιτητικά φυτικά παρασκευάσματα μπορούν να δρουν ως επιγενετικοί διαμορφωτές που επηρεάζουν όχι μόνο την έναρξη αλλά και την πρόοδο της ογκογένεσης.

3.3 Επιγενετική και καρκίνος

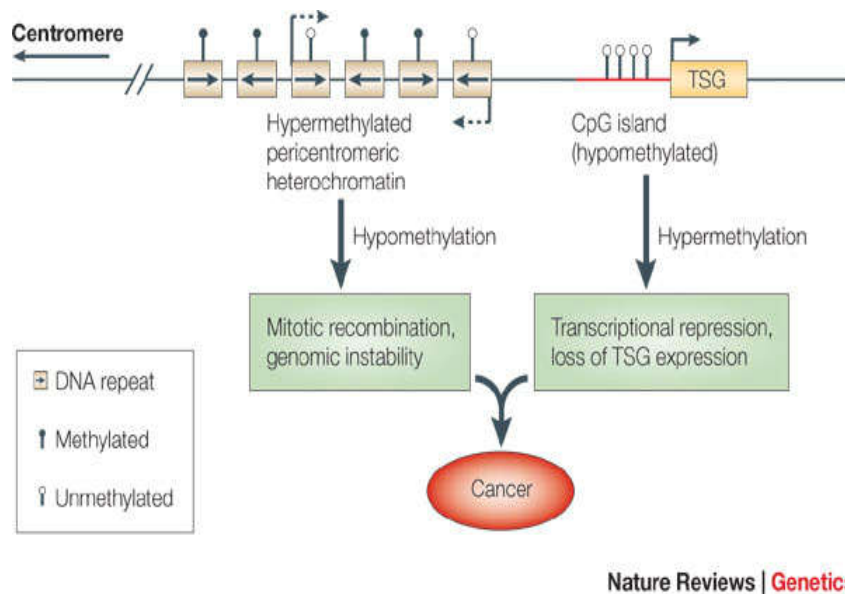
Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η πλειοψηφία των περιβαλλοντικών παραγόντων έχει την ικανότητα να παρεμβαίνει στη μεθυλίωση του DNA μεταβάλλοντας τη διαθεσιμότητα του δότη μεθυλίου ή της δραστηριότητας των DNA μεθυλοτρανσφερασών (Guerrero-Bosagna and Skinner, 2012). Οι ενώσεις που υπάρχουν στο περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένων των χημικών ουσιών που διαταράσσουν την ενδοκρινική λειτουργία (π.χ., διαιθυλοστιλβεστρόλης), του καπνού και της αιθανόλης, μπορούν να προκαλέσουν επιγενετική τροποποίηση (Godfrey, et al, 2015). Έτσι, το επιγονιδίωμα και τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης μπορούν να αλλάξουν μόνιμα και να οδηγήσουν σε αλλοιώσεις φαινοτύπων και σε προδιάθεση για ασθένεια (Jirtle and Skinner, 2007).

Τα στοιχεία από δείγματα ιστών καρκίνου του ήπατος αποκάλυψαν ότι η αιθανόλη άλλαξε την κατάσταση μεθυλίωσης της ιστόνης H3 σε δύο κατάλοιπα λυσίνης (π.χ. lys-4/9) και αύξησε τη φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 σε δύο κατάλοιπα σερίνης (π.χ., ser-10/28) (Shukla and Lim, 2013). Η χρόνια πρόσληψη αιθανόλης μπορεί να οδηγήσει σε υπερέκφραση ορισμένων miRNAs (miR-34a, miR-107 και miR-122) τα οποία μπορούν επίσης να μεταβάλουν το πρότυπο μεθυλίωσης του DNA σε όγκους του ήπατος. Έτσι, η τροποποίηση ιστόνης, η μεθυλίωση του DNA και τα miRNAs μπορεί να παράγουν ένα συνεργατικό αποτέλεσμα σε όγκους που σχετίζονται με την επίδραση αιθανόλης. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη X του ιού της ηπατίτιδας B η οποία έχει ρυθμιστικό ρόλο μπορεί να προκαλέσει παρεκκλίνουσες επιγενετικές τροποποιήσεις στο ανθρώπινο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα προκαλώντας την υπερμεθυλίωση των γονιδίων καταστολής όγκων, την υπομεθυλίωση του DNA που σχετίζεται με την επαγωγή γονιδίων, την ακετυλίωση ή την αποακετυλίωση της ιστόνης και τις μεταβολές των miRNA (Pogribny and Rusyn, 2014, Wei et al, 2013) (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Τροποποιήσεις ιστονών σε διάφορους τύπους καρκίνου (*Abu-Amero, et al, 2008*)

Τύπος καρκίνου	Τύπος τροποποίησης ιστόνης
Πνεύμονα Αδενοκαρκίνωμα (Adenocarcinoma),	Αυξημένη ρύθμιση της α -2 glycoprotein 1 ως συνέπεια της γενικής (Global) ακετυλίωσης ιστόνης
Μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (Non-small cell lung)	Γενική H3 απόακετυλίωση
Στομάχου	Γενική H3K9 τριπλή μεθυλίωσης Σίγαση του RUNX3 ως συνέπεια της αυξημένης H3K9 dimethylation και μειωμένης H3 acetylation
Προστάτη	Γενική H3K9, H3K18, και H4K12 ακετυλίωση και H4K3 και H3K4 διπλή μεθυλίωση. Ενεργοποίηση των PTEN, CYLD, p53, και FOXO3a με ρύθμιση της ιστόνης H3K9 μεθυλίωσης και απόακετυλίωσης
Παχέος εντέρου	Γενική H3K9 απόακετυλίωση
Παγκρέατος	Ακετυλίωση της περιοχής προαγωγού της H3 ιστόνης του C/EPBa

Η υπερμεθυλίωση γονιδίων καταστολής όγκων σε περιοχές του υποκινητή μπορεί να απενεργοποιεί πολλές λειτουργίες καταστολής όγκων (**Εικόνα 18**). Τα επίπεδα μεθυλίωσης παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές διαιρέσεις, την επιδιόρθωση του DNA, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση, την αγγειογένεση, τη μετάσταση καρκινικών κυττάρων, την απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες, την αποτοξίνωση και την αντοχή στα φάρμακα (Kim, 2005). Έχει σημειωθεί τεράστια προόδος στον έγκαιρο εντοπισμό του καρκίνου με τη χρήση των επιπέδων μεθυλίωσης. Για παράδειγμα, η υπερμεθυλίωση των περιοχών υποκινητή στα γονίδια APC (Adenomatous polyposis coli) και RASSF 1A (Ras association domain-containing protein 1) θεωρούνται κοινοί επιγενετικοί δείκτες για την έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου (Coyle et al, 2007). Επίσης, η υπερμεθυλίωση περιοχής του υποκινητή του γονιδίου TP53 ή p53 (transformation-related protein 53) έχει αναφερθεί ως ένας κοινός δείκτης για την αξιολόγηση της ανάπτυξης του καρκίνου (Sanchis-Gomar et al, 2012) (**Εικόνα 19**).



Εικόνα 18: Αντιπροσωπευτική περιοχή γονιδιωματικού DNA σε φυσιολογικό κύτταρο που περιέχει επαναλαμβανόμενη πλούσια υπερμεθυλιωμένη περικεντρομερική ετεροχρωματίνη και ενεργό μεταγραφόμενο γονίδιο καταστολής όγκου (TSG) που σχετίζεται με ένα υπομεθυλιωμένο νησίδιο CpG (με κόκκινο χρώμα). Στα νεοπλασματικά κύτταρα, η ετεροχρωματίνη πλούσια σε επαναλήψεις γίνεται υπομεθυλιωμένη και αυτό συμβάλλει στη γονιδιωματική αστάθεια, χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων, μέσω αυξημένων συμβάντων μιτωτικού ανασυνδυασμού. Η μεθυλίωση de novo των νησιδίων CpG συμβαίνει επίσης σε καρκινικά κύτταρα και μπορεί να οδηγήσει σε μεταγραφική σίγαση ρυθμιστικών γονιδίων ανάπτυξης. Αυτές οι αλλαγές στη μεθυλίωση είναι πρώιμα γεγονότα της ογκογένεσης (Robertson, 2005).



Εικόνα 19: Η γενική υπομεθυλίωση του DNA και η υπερμεθυλίωση του υποκινητή συγκεκριμένων γονιδίων π.χ. πρωτο-ογκογονιδίων ή γονιδίων καταστολής όγκων έχουν βρεθεί στον καρκίνο (Kaneda, et al, 2004).

Επιπροσθέτως, τα τελευταία χρόνια η δυσλειτουργία miRNAs σε διάφορους τύπους καρκίνου (καρκίνος του μαστού, καρκίνος του παχέος εντέρου) μπορεί να αξιοποιηθεί ως διαγνωστικός βιοδείκτης (Naeini and Ardekani, 2009). Η αστάθεια των μικροδορυφορικών DNA (επαναλαμβανόμενα τμήματα DNA) και των χρωμοσωμάτων έχουν αναγνωριστεί ως οι κύριοι μηχανισμοί που επηρεάζουν τη γονιδιακή λειτουργία στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Η αστάθεια των μικροδορυφορικών DNA εμφανίζεται στο 15% των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε φαινότυπο αστάθειας με μεταλλαγμένα ή μεθυλιωμένα γονίδια επιδιόρθωσης (mismatch repair) (Markowitz, 2000). Η παθογένεση του καρκινώματος του παχέος εντέρου ελέγχεται από τα miRNAs, τα οποία μπορούν να λειτουργήσουν ως ρυθμιστές των ογκογόνων και ογκοκατασταλτικών μονοπατιών.

Τα miRNAs παίζουν σημαντικό ρόλο και σε πολλούς άλλους τύπους καρκίνου όπως οξεία μυελοειδή λευχαιμία, οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία, χρόνια μυελογενή λευχαιμία, χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, καρκίνωμα ενδομητρίου, γαστρεντερικό καρκίνο, καρκίνο του πνεύμονα, καρκίνο ουροδόχου κύστης, όγκους θυρεοειδούς και αδеноκαρκινώματα του οισοφάγου (Naeini and Ardekani, 2009) (Πίνακας 2).

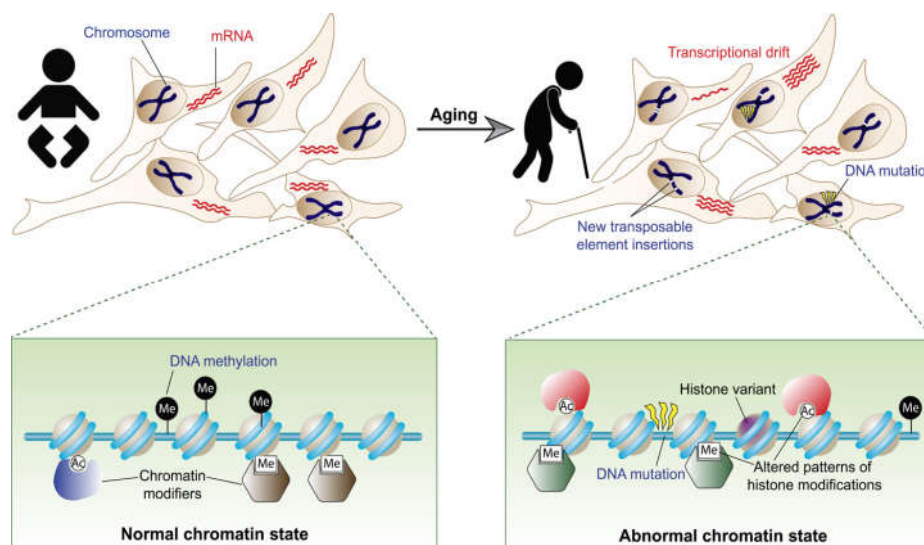
Πίνακας 1: Αλλαγές των miRNAs σε διάφορους τύπους καρκίνου (*Abu-Amero, et al, 2008*).

Τύπος καρκίνου	Τύποι των miRNA [(+)=up-regulation / (-)=down-regulation]
Πλακώδες οισοφαγικό καρκίνωμα	miR-21(+)
Πνεύμονας	miR-17-92 (+)miR-34c, miR-145, and miR-142-5p, let-7(-)
Καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων κεφαλής και αυχένα	miR-1, miR-133a, miR-205, and let-7d(-)bsa-miR-21(+)
Στόμαχος	miR-106a(+)miR-433 and miR-9(-)
Προστάτης	miR-135b and miR-194(+)miR-23b, miR-100, miR-145, miR-221,
Μελάνωμα	miR-182(+)
Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα	miR-18a(-)
Παχέος εντέρου	miR-let 7g, miR-21, miR-20a, miR-17-19 family, miR31, miR 135, miR-181b, and miR 200c (+)miR-34, miR-let7, miR-143, miR-145, miR-133b, and miR-126(-)
Ουροδόχου κύστεως	miR-2 23, miR-26b, miR-221, miR-103-1, miR-185, miR-23 b, miR- 203, miR 17-5p, miR-23, miR-205(+)miR-29c, miR-26a, miR-30c, miR-30e-5p, miR-45, miR-30a-3p, miR-133a, miR-133b, miR-195, miR-125b, and miR-199a (-)
Μαστού	miR-21, miR-155, miR-23, and miR-191(+)miR-205, miR-145, miR-10b, and miR-125b (-)

3.4 Επιγενετική και Γήρανση

Παρόλο που έχει αποδειχθεί ότι τα επιγενετικά σήματα είναι αρκετά σταθερά, υπάρχουν όλο και περισσότερα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι μεταβάλλονται με την πάροδο του χρόνου (Calvanese et al, 2009). Η συσχέτιση μεταξύ της επιγενετικής και της γήρανσης πρωτοεμφανίστηκε σε μια μελέτη που δείχνει ότι η γενική μεθυλίωση του DNA (μετρούμενη ως 5-μεθυλοδεοξυκυτιδίνη) μειώνεται με την ηλικία στο σαλιγκάρι του Ειρηνικού (*Oncorhynchus gorbuscha*) (Le Luyer, et al, 2017). Πολλές μελέτες έδειξαν στη συνέχεια παρόμοια πρότυπα σε αρουραίους και ανθρώπους (Bjornsson, et al, 2008, Mugatroyd, et al, 2010, Yu, 2015). Αυτή η απώλεια της γενικής μεθυλίωσης του DNA θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα της παθητικής απομεθυλίωσης του DNA της ετεροχρωματίνης ως συνέπεια των αποτυχιών στις λειτουργίες του DNMT1 (Casillas, et al, 2003).

Η γενική υπομεθυλίωση του DNA κατά τη διάρκεια της γήρανσης συνήθως συνοδεύεται από υπερμεθυλίωση αρκετών ειδικών περιοχών, συμπεριλαμβανομένων των υποκινητών των νησιδίων CpG συγκεκριμένων γονιδίων ή ομάδων ριβοσωμικών DNA και μπορεί να συσχετιστεί με τη λειτουργική γήρανση (Jung and Pfeifer, 2015). Επιπλέον πολλοί ιστοί θηλαστικών επιδεικνύουν γενική υπομεθυλίωση του DNA και μειωμένη έκφραση μεθυλοτρανσφεράσης (DNMT1 και DNMT3a) με την αύξηση της ηλικίας. Η γενική υπομεθυλίωση του DNA παρατηρείται σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και μπορεί να προάγει γονιδιωματική αστάθεια κατά τη διάρκεια της γήρανσης (Burzynski, 2005) (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Απεικόνιση της επίδρασης των προτύπων μεθυλίωσης DNA στην οργάνωση της δομής της χρωματίνης κατά την διάρκεια της γήρανσης (Pal and Tyler, 2016).

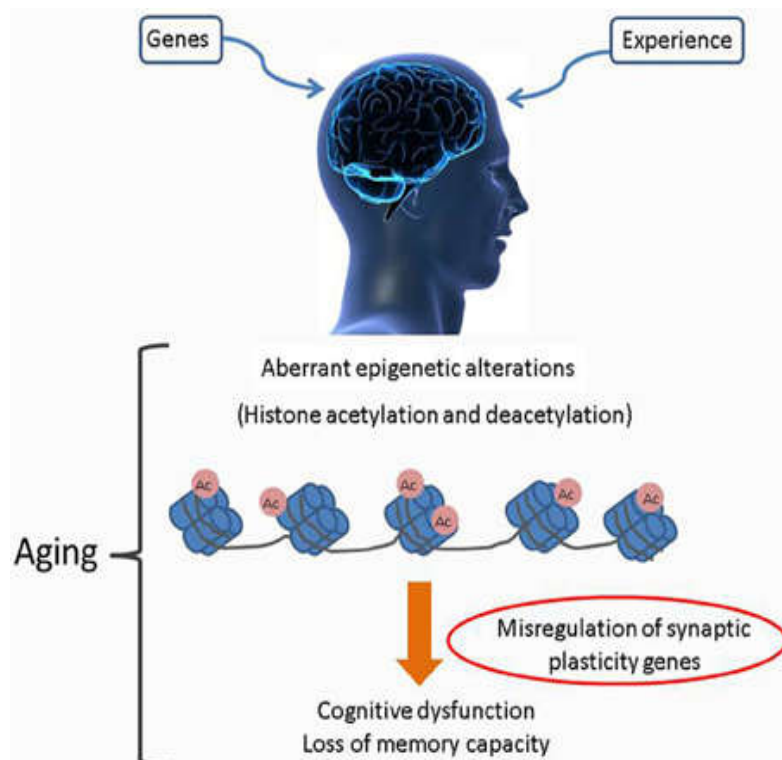
Η ομαδοποίηση των αποτυπωμένων γονιδίων σε συστάδες επιτρέπει σε αυτά να μοιράζονται κοινά ρυθμιστικά στοιχεία, όπως μη κωδικοποιημένα RNAs και συγκεκριμένες μεθυλιωμένες περιοχές. Η εξειδικευμένη έκφραση γονικού αλληλίου των αποτυπωμένων γονιδίων συνδέεται με τις περιοχές ελέγχου αποτύπωσης οι οποίες χαρακτηρίζονται από αποτυπώματα μεθυλίωσης του DNA στο μητρικό ή πατρικό αλληλίο. Αν και η μεθυλίωση του DNA είναι η καλύτερα μελετημένη επιγενετική αλλοίωση στις περιοχές ICRs, έχουν επίσης αναφερθεί η μεθυλίωση και η ακετυλίωση των ιστονών σε περιοχές ICRs (Delaval, et al, 2006).

Κάποιες από αυτές τις τροποποιήσεις της μεθυλίωσης έχουν αναγνωριστεί στα γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της νόσου Alzheimer και της σχιζοφρένειας. Πιο συγκεκριμένα, η μείωση στη μεθυλίωση του DNA έχει αναγνωριστεί σε Alu θέση και σε άλλα επαναλαμβανόμενα στοιχεία του γονιδιώματος (Ptak and Petronis, 2010). Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι για τη φυσιολογική λειτουργία και τα νευροαναπτυξιακά χαρακτηριστικά του εγκεφάλου, η σταθερότητα της μεθυλίωσης του DNA και των τροποποιήσεων των ιστονών είναι απαραίτητη ενώ κάποια δυσλειτουργία των μηχανισμών αυτών μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικούς φαινότυπους (Jakovcevski and Akbarian, 2012).

Η επιγενετική ρύθμιση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου και στην εμφάνιση νευρικών διαταραχών σε παιδιά (αυτισμός και διαταραχές του φάσματος του αυτισμού) και νευροεκφυλιστικών διαταραχών σε ενήλικες λόγω ανώμαλης οργάνωσης της χρωματίνης. Πρόσφατα έχει δημιουργηθεί ένα νέο πεδίο μελετών που ονομάζεται «νευροεπιγενετική» και αφορά τους μηχανισμούς των νευρολογικών ασθενειών που σχετίζονται με τη χρωματίνη (Jia et al, 2015). Επιπλέον, πολλές μελέτες δείχνουν τη συσχέτιση της μεθυλίωσης του DNA με τις νευροεκφυλιστικές νόσους. Η ρύθμιση των πρωτεϊνών μεθυλίωσης της H3K4 θεωρείται ως ένας σημαντικός παράγοντας για την εξέλιξη μιας νευροεκφυλιστικής ασθένειας και η απενεργοποίηση των ενζύμων της απομεθυλάσης της ιστόνης μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες διαταραχές όπως το αυτισμό, το σύνδρομο Rett και το σύνδρομο Εύθραυστου X (Hyman, 2005).

Συνεπώς, ο ρόλος της επιγενετικής στην εμφάνιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών οφείλεται τόσο στην επιγενετική πλαστικότητα κατά τη διάρκεια των περιόδων ανάπτυξης και γήρανσης του εγκεφάλου, επιτρέποντας έτσι την περιβαλλοντική έκθεση να διαμορφώσει τη μελλοντική γονιδιακή έκφραση, όσο και

στην «ανώμαλη» διαμόρφωση της χρωματίνης στις νευροεκφυλιστικές διαταραχές τόσο της πρώιμης παιδικής ηλικίας όσο και των ενηλίκων (**Εικόνα 21**).



Εικόνα 21: Η συσχέτιση της επιγενετικής ρύθμισης με την εξέλιξη μιας νευροεκφυλιστικής νόσου μέσω της καθιέρωσης αλλοιωμένων μεταγραφικών προφίλ. (Pirooznia and Elephant, 2013)

3.5 Επιγενετική: Μνήμη και Εθισμός

Γενικά

Η μεθυλίωση του DNA έχει αναδειχθεί ως ένας βασικός μηχανισμός που διέπει τη νευρωνική συναπτική πλαστικότητα η οποία προκαλείται από την κατάχρηση ναρκωτικών ουσιών, όπως η κοκαΐνη. Η δημιουργία της μνήμης και η ανάπτυξη του εθισμού στα ναρκωτικά μοιράζονται κοινούς υποκείμενους επιγενετικούς μηχανισμούς έτσι ώστε αυτές οι δύο διαδικασίες να είναι στενά συνδεδεμένες (Robbins and Everitt, 2002, Miller and Sweatt, 2007).

Μνήμη

Οι Miller και Sweatt διαπίστωσαν ότι οι επίμυες που εκτέθηκαν σε ένα περιβάλλον στο οποίο είχαν προηγουμένως υποβληθεί σε αποσπασματικές ηλεκτρικές κρούσεις στα πόδια, έδειξαν σημαντική αύξηση στην έκφραση του DNMT3a/b αλλά όχι του DNMT1 στον ιππόκαμπο μετά την εκ νέου έκθεση (Levenson, et al, 2006). Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, η άμεση έγχυση των αναστολέων των ενζύμων DNMTs της 5-αζα-δεοξυκυτιδίνης (5-Aza) ή της ζελευκίνης στον ιππόκαμπο μετά από έκθεση σε κραδασμούς μπορεί να καταστείλει την έκφραση της μνήμης που σχετίζεται με το φόβο. Αυτό το εύρημα υποδηλώνει ότι η de novo μεθυλίωση του DNA στοχευμένων γονιδίων θα μπορούσε να διαδραματίσει κάποιο ρόλο στην επαγωγή και στην εδραίωση της μνήμης που σχετίζεται με το φόβο. Περαιτέρω στοιχεία που αποδεικνύουν τον ρόλο των ενζύμων DNMTs στη συναπτική πλαστικότητα που συνδέεται με τη μνήμη είναι το γεγονός ότι η έκφρασή της είναι εντόνότερη σε τομές ιππόκαμπου από ποντίκια που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με εστέρα φορβόλης ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί τη πρωτεϊνική κινάση C (PKC), μια σημαντική κινάση που συνδέεται με τον σχηματισμό της μνήμης (Miller, et al, 2010).

Εκτός από τον ιππόκαμπο που ελέγχει τη μνήμη, σε μία άλλη πρωτοποριακή μελέτη οι Miller et al. έδειξαν ότι η μεθυλίωση του DNA διαδραματίζει επίσης βασικό ρόλο στην αποθήκευση μακροχρόνιων αναμνήσεων σε περιοχές του φλοιού του εγκεφάλου (Malin and McGaugh, 2006, Lesburguères, et al, 2011). Αυτό υποδηλώνει ότι η επιγενετική ρύθμιση σε απομακρυσμένες περιοχές του εγκεφαλικού

φλοιού μπορεί να κατευθύνεται από μνήμες που σχετίζονται με την πλαστικότητα στον υπόκαμπο και είναι απαραίτητη για τη μακροπρόθεσμη αποθήκευση της μνήμης (Nelson, et al, 2008). Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι η απομεθυλίωση του DNA μπορεί να ρυθμίζει τη πλαστικότητα των συνάψεων που εμπλέκονται στο σχηματισμό μνήμης. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η πρωτεΐνη MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2) η οποία είναι ένας βασικός μεταγωγέας της κατάστασης μεθυλίωσης του DNA που επηρεάζει τη συναπτική πλαστικότητα και το σχηματισμό μνήμης. Συμπερασματικά, η επιγενετική σήμανση του γενωμικού DNA λαμβάνει χώρα κατά την διαδικασία του σχηματισμού της μνήμης και η χειραγώγηση των επιγενετικών διαδικασιών είναι ένας πιθανός μηχανισμός αλλαγής της χωρητικότητας της μνήμης (Sharma,et al, 2010, Bogdanović and Veenstra, 2009).

Εθισμός

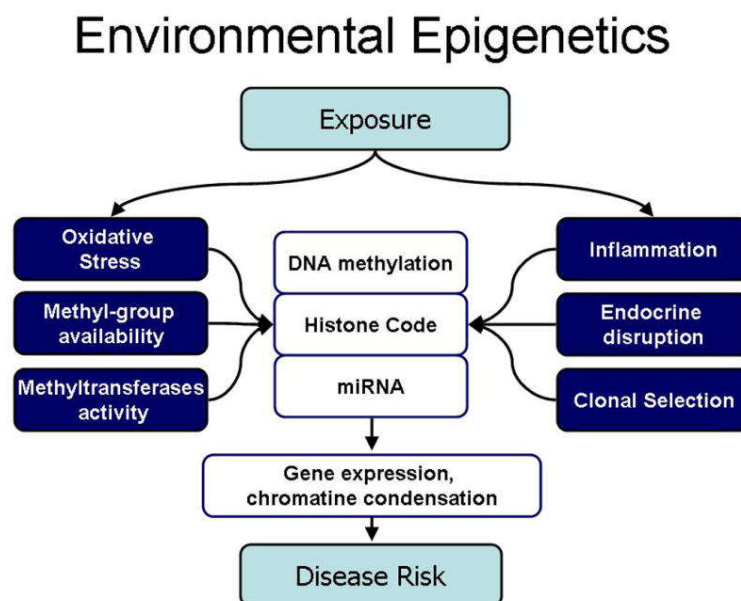
Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν το ρόλο της μεθυλίωσης του DNA στη ρύθμιση της ευαισθησίας στον εθισμό. Η κατάσταση μεθυλίωσης του DNA ελέγχει τη νευρωνική πλαστικότητα που προκαλείται από την κατάχρηση φαρμάκων και μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη του εθισμού στα φάρμακα (Kinoshita, et al,2004, Xu, et al, 2010). Ένας κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής στο κεντρικό νευρικό σύστημα που συμμετέχει σε αυτήν την νευροπλαστικότητα είναι το γλουταμινικό οξύ το οποίο ασκεί την δράση του μέσω των **υποδοχέων του N-μεθυλο-D-ασπαρτικού οξέος (NMDA)**. Μεταφραστικές και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, καθώς και ρύθμιση των υποδοχέων NMDA παίζουν ενεργό ρόλο στον μηχανισμό πλαστικότητας της γλουταμινεργικής σύναψης. Ένας από τους βασικούς μηχανισμούς ρύθμισης των υποδοχέων NMDA είναι η φωσφορυλίωση που συμβάλλει στην ενδοκυττάρια διακίνηση του υποδοχέα. Για παράδειγμα, η έκφραση της υπομονάδας NR2B του υποδοχέα N-μεθυλο-δ-ασπαρτικού (NMDA) αυξάνεται κατά τη διάρκεια της αποχής σε αλκοόλη όπως μετράται στα κυκλοφορούντα λευκά αιμοσφαίρια ενός αλκοολικού, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι υποδοχείς NMDA που περιέχουν NR2B υπομονάδα μπορεί να συνεισφέρουν στην έκφραση αυτής της αποσπασματικής συμπεριφοράς. Ακόμη, τα επίπεδα εξάρτησης από το αλκοόλ συσχετίζονται αρνητικά με τον βαθμό μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου της υπομονάδας NR2B του υποδοχέα NMDA (Kinoshita, et al,2004).

Επιπροσθέτως, η **προ-οπιομελανοκορτίνη (POMC)** είναι ένα πολυπεπτίδιο το οποίο συντίθεται στην υπόφυση και είναι γνωστό για το καθορισμό συμπεριφοράς σε σχέση με την κατανάλωση αλκοόλ (Philibert, et al, 2008). Η POMC διασπάται για να παράξει πολλαπλές πεπτιδικές ορμόνες όπως την α -MSH (α -Melanocyte-stimulating hormone - ρύθμιση της όρεξης, της σεξουαλικής συμπεριφοράς και της παραγωγής μελανίνης) την ACTH (Adrenocorticotrophic hormone- ρύθμιση έκκρισης γλυκοκορτικοειδών) την β -ενδορφίνη και την εγκεφαλίνη (ενδογενή οπιοειδή πεπτίδια). Έχει αποδειχθεί ότι τα εξαρτώμενα από το αλκοόλ άτομα που χρειάζονται φαρμακολογική θεραπεία με κλομεθιαζόλη για την ελάττωση της επιθυμίας τους κατά τη διάρκεια της αποχής, έχουν υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης CpG σε ένα διακριτό τμήμα του γονιδιακού υποκινητή για την προ-οπιομελανοκορτίνη (Xu, et al, 2010).

Επιπλέον, πρόσφατες ενδείξεις υποδεικνύουν ότι η κατάσταση μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων μονοαμινοξειδάση-A (MAOA) και Catechol-O-methyltransferase (COMT) (ένζυμα για τον μεταβολισμό των κατεχολαμινών) μπορεί επίσης να επηρεάσουν την ευπάθεια στην ανάπτυξη της εξάρτησης από την αλκοόλη ή τον καπνό (Satta, et al, 2008). Οι LaPlant et al. απέδειξαν ότι εγχύσεις κοκαΐνης σε ποντικούς ή η ενδοφλέβια χορήγηση κοκαΐνης σε αρουραίους οδήγησε σε μειωμένη έκφραση των DNMT1 και DNMT3a στο πυρήνα του εγκεφάλου δίπλα στο διάφραγμα (nucleus accumbens), μια περιοχή του εγκεφάλου που διαδραματίζει βασικό ρόλο στην ικανοποίηση από τα ναρκωτικά, 24 ώρες μετά την τελευταία χορήγηση κοκαΐνης (LaPlant, et al, 2010). Αντίστροφα, η αποχή από την κοκαΐνη μετά από μια περίοδο χρόνιας θεραπείας είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης της DNMT3a στο πυρήνα του εγκεφάλου (Im, et al, 2010). Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι στις μελέτες τους οι Anier et al. είχαν αντικρουόμενα ευρήματα, στα οποία παρατηρούσαν αυξημένη DNMT3a και DNMT3b στο πυρήνα του εγκεφάλου δίπλα στο διάφραγμα (nucleus accumbens) 24 ώρες μετά την οξεία χορήγηση κοκαΐνης ή σε χρόνιες χορηγήσεις κοκαΐνης, χωρίς επιπτώσεις στην έκφραση DNMT3b (Robinson, et al, 2001). Τέλος, η MeCP2 διαδραματίζει βασικό ρόλο στον εθισμό στα ναρκωτικά καθώς η έκφραση της αυξάνεται στις περιοχές του ραβδωτού σώματος του εγκεφάλου, του ιπποκάμπου και του φλοιού του εγκεφάλου των τρωκτικών σε απόκριση στη χορήγηση κοκαΐνης ή νικοτίνης ενώ η δράση της τροποποιείται από τη φωσφορυλίωση με τρόπο εξαρτώμενο από την αμφεταμίνη (Cassel, et al, 2006, Deng, et al, 2010).

3.6 Επιγενετική και έκθεση σε περιβαλλοντικές χημικές ουσίες

Αρκετοί περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν συνδεθεί με αλλαγές στους επιγενετικούς μηχανισμούς τόσο σε *in vitro* μελέτες σε ζώα και ανθρώπους όσο και σε επιδημιολογικές μελέτες (Σχήμα 1). Αυτές οι μελέτες έχουν προτείνει μία συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας των μετάλλων και της μεθυλίωσης του DNA, συμπεριλαμβανομένων του νικελίου, του καδμίου, του μολύβδου και του αρσενικού (Valko, et al, 2005, Fowler, et al, 2004). Είναι γνωστό ότι τα μέταλλα προκαλούν οξειδωτικό στρες και αυξάνουν την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) με συνέπεια μία οξειδωτική βλάβη στο DNA να επηρεάζει την αλληλεπίδραση των μεθυλοτρανσφερασών με το DNA και να προκαλείται μία αλλοιωμένη μεθυλίωση καταλοίπων κυτοσίνης στις θέσεις CpG (Valinluck, et al, 2004, Turk, et al, 1995, Huang, et al, 2008).



Σχήμα 1 : Πιθανοί μηχανισμοί που συνδέουν την περιβαλλοντική έκθεση με τις επιγενετικές επιδράσεις (Baccarelli and Bollati, 2009).

Πιο αναλυτικά:

- 1) Το **κάδμιο** είναι ένας καρκινογόνος παράγοντας ο οποίος συμβάλλει στην ογκογένεση μέσω της παραγωγής ROS και αλλοίωσης της μεθυλίωσης του DNA. Οι Takiguchi και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι το κάδμιο μειώνει τη

μεθυλίωση του γονιδιώματος, αναστέλλοντας τις μεθυλοτρανσφεράσες DNA. Αυτό το εύρημα υποδηλώνει παρεμπόδιση στην αλληλεπίδραση ενζύμου-DNA, πιθανώς μέσω αλληλεπίδρασης του καδμίου με την περιοχή δέσμευσης της DNA μεθυλοτρανσφεράσης. Το κάδμιο μπορεί επίσης να αναστείλει τη μεθυλίωση του DNA σε πρωτοογκογονίδια τα οποία επάγουν έκφραση ογκογονιδίων και προκαλούν τον πολλαπλασιασμό κυττάρων (Takiguchi, et al, 2003).

- 2) Το **αρσενικό** είναι επίσης ένας καρκινογόνος παράγοντας. Το ανόργανο αρσενικό μεθυλιώνεται ενζυμικά για αποτοξίνωση, χρησιμοποιώντας στη συνέχεια την S- αδενοσυλμεθειονίνη (SAM). Το SAM είναι ένα συνηθισμένο συν-υπόστρωμα που εμπλέκεται στη μεταφορά ομάδας μεθυλίου. Σε επιθηλιακές ηπατικές κυτταρικές σειρές αρουραίου που υποβλήθηκαν σε χορήγηση με χρόνιες χαμηλές δόσεις αρσενικού, οι Zhao και οι συνεργάτες του παρατήρησαν κακοήγη μετασχηματισμό που σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα SAM, γενική υπομεθυλίωση DNA και μειωμένη δραστηριότητα της μεθυλοτρανσφεράσης του DNA (Zhao, et al, 1997). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι το αρσενικό συνδέεται με γονιδιακή ειδική υπερμεθυλίωση καθώς και γενική υπομεθυλίωση του DNA (Zhong and Mass, 2001, Reichard, et al, 2007, Sciandrello, et al, 2004). Ένα απροσδόκητο εύρημα αναφέρθηκε πρόσφατα in vivo, καθώς παρατηρήθηκε δοσο-εξαρτώμενη υπερμεθυλίωση του DNA σε αίμα ενηλίκων του Μπαγκλαντές με χρόνια έκθεση σε αρσενικό. Το φαινόμενο αυτό τροποποιήθηκε με το φολικό οξύ, υποδηλώνοντας ότι οι αυξήσεις που προκαλούνται από το αρσενικό στη μεθυλίωση του DNA εξαρτιόταν από τη διαθεσιμότητα του μεθυλίου (Pilsner, et al, 2007). Σε μια μελέτη σε ανθρώπους από την Ινδία, παρατηρήθηκε σημαντική υπερμεθυλίωση των υποκινητών p53 και p16 στο DNA του αίματος των ατόμων που εκτέθηκαν σε τοξικά επίπεδα αρσενικού σε σχέση με τους μάρτυρες (Chanda, et al, 2006). Τέλος, η τοξικότητα του αρσενικού σχετίστηκε πρόσφατα και με μεταβολές στην έκφραση των miRNAs καθώς οι Marsit et al. έδειξαν μεταβολές στο προφίλ των miRNAs ανθρώπινων λεμφοβλαστικών κυττάρων που τους χορηγήθηκε αρσενικό νάτριο (Marsit, et al, 2006).

- 3) Το **νικέλιο** μπορεί να αντικαταστήσει το μαγνήσιο με αλληλεπιδράσεις στο DNA, να ενισχύσει τη συμπύκνωση της χρωματίνης και να προκαλέσει de novo μεθυλίωση του DNA. Σε μία μελέτη, οι Lee et al. σε κύτταρα G12 κινέζικου χάμστερ επιμολυσμένα με το γονίδιο gpt (guanine phosphoribosyl transferase) απέδειξαν ότι το νικέλιο προκαλεί υπερμεθυλίωση και αδρανοποίηση του επιμολυσμένου γονιδίου (Lee, et al, 1995). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι το νικέλιο επηρεάζει και τις ιστονικές τροποποιήσεις. Η έκθεση σε διαλυτό NiCl_2 έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την ακετυλίωση της ιστόνης, αυξάνει την απομεθυλίωση της ιστόνης H3K9 και αυξάνει την μονο-ουβικιτινίωση των ιστονών H2A και H2B in vitro (Ke, et al, 2006). Οι Broday et al. μελέτησαν τις επιδράσεις του νικελίου, σε μη τοξικά επίπεδα, σε κύτταρα ζύμης και σε κύτταρα θηλαστικών και διαπίστωσαν μείωση της ακετυλίωσης της ιστόνης H4, επηρεάζοντας μόνο τη λυσίνη 12 σε κύτταρα θηλαστικών και όλες τις τέσσερις λυσίνες της ιστόνης H4 σε ζυμομύκητες (Broday, et al, 2000). Επιπλέον, η έκθεση σε νικέλιο έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την μονο- και διμεθυλίωση της ιστόνης H3K9 (μεθυλίώσεις που έχουν συσχετιστεί με μακρόχρονη αποσιώπηση γονιδίων). Τέλος, σε ανθρώπινα πνευμονικά κύτταρα εκτεθειμένα σε διαλυτές ενώσεις νικελίου, παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στις τροποποιήσεις ιστονών όπως, απώλεια ακετυλίωσης των ιστονών H2A, H2B, H3 και H4, αυξημένη διμεθυλίωση της ιστόνης H3K9 και αυξημένη ουβικιτινυλίωση των ιστονών H2A και H2B (Chen, et al, 2006).
- 4) Άλλοι περιβαλλοντικοί ρύποι που επιδρούν στην επιγενετική ρύθμιση και επάγουν καρκινογένεση στο ήπαρ ποντικών είναι το **τριχλωροαιθυλένιο (TCE)**, το **διχλωροξικό οξύ (DCA)** και το **τριχλωροξικό οξύ (TCA)**. Η μειωμένη μεθυλίωση στις περιοχές υποκινητών των γονιδίων c-jun και c-myc και τα αυξημένα επίπεδα των mRNAs και των πρωτεϊνών τους βρέθηκαν στο ήπαρ ποντικών που εκτέθηκαν σε TCE, DCA και TCA (Tao, et al, 1999).

- 5) Η έκθεση σε **αιωρούμενα σωματίδια** μέσω ατμοσφαιρικής ρύπανσης έχει συσχετιστεί με αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα από καρδιοαναπνευστικές ασθένειες καθώς και με κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα (Brook, et al, 2004). Πρόσφατα μελετήθηκαν οι επιπτώσεις της έκθεσης σε σωματίδια βάση των επαναλαμβανόμενων στοιχείων Alu και LINE-1. Η μακροχρόνια έκθεση σε αιωρούμενα σωματίδια συσχετίστηκε αρνητικά με μεθυλίωση τόσο σε Alu όσο και σε στοιχεία LINE-1. Σε μια πρόσφατη έρευνα, προτάθηκε ότι η έκθεση στον μαύρο άνθρακα (BC) συσχετίστηκε επίσης με μειωμένη μεθυλίωση στο LINE-1 (Tarantini, et al, 2009). Σε μια άλλη μελέτη, οι Yauk et al. έδειξαν ότι το DNA σπέρματος ποντικών που εκτέθηκαν σε αέρα μολυσμένο με χάλυβα υπερμεθυλιώθηκε σε σύγκριση με το control και η μεταβολή αυτή διατηρήθηκε μετά την απομάκρυνση από την έκθεση στο περιβάλλον, γεγονός το οποίο αποδεικνύει πιθανόν ότι οι ατμοσφαιρικοί ρύποι επιφέρουν αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA που μεταδίδονται διαγονιδιακά (Yauk, et al, 2008).

3.7 Επιγενετική και χημικές ουσίες που διαταράσσουν την ενδοκρινική λειτουργία και την αναπαραγωγή

Οι αναπτυσσόμενοι οργανισμοί είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι σε χημικές ουσίες που προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές. Στα γεννητικά κύτταρα των θηλαστικών και στα έμβρυα προ-εμφύτευσης, η μεθυλίωση του DNA υφίσταται δύο διαφορετικούς κύκλους απομεθυλίωσης/επαναμεθυλίωσης στους οποίους τα πρότυπα μεθυλίωσης επαναπρογραμματίζονται σε όλο το εύρος του γονιδιώματος και παράγονται κύτταρα με ευρύ αναπτυξιακό δυναμικό. Τα διαθέσιμα στοιχεία από ζωικά μοντέλα δείχνουν ότι η έκθεση σε ξеноβιοτικά (χημικές ενώσεις που δεν παράγονται από έναν οργανισμό αλλά τις προσλαμβάνει μέσω του περιβάλλοντος) κατά τη διάρκεια κρίσιμων περιόδων ανάπτυξης θηλαστικών μπορεί να προκαλέσει επίμονες και κληρονομικές επιγενετικές αλλαγές (Reik, et al, 2001).

Η **διαιθυλοστιλβεστρόλη (DES)** είναι ένα μη-γονοτοξικό καρκινογόνο που επιδρά σε αναπτυξιακό στάδιο και χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν για την αποτροπή αποβολών σε εγκύους (Kamiya, et al, 1996). Σε μοντέλα ποντικών, η προ-/νεογνική έκθεση σε DES προκαλεί ένα ευρύ φάσμα αλλαγών γονιδιακής έκφρασης. Η θεραπεία με οιστρογόνα έχει ως αποτέλεσμα την επίμονη έκφραση ορισμένων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένης της λακτοφερίνης, του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και των πρωτοογκογονιδίων όπως το c-fos, c-jun και c-myc (Yamasita, et al, 2001). Οι Xie et al. υποστηρίζουν μια έμμεση σχέση μεταξύ μεταβολών του εξωγενούς οιστρογόνου και της μεθυλίωσης, δείχνοντας ότι το οιστρογόνο αναστέλλει τη μεταγραφή γονιδίου κατεχολ-Ο-μεθυλτρανσφεράσης. Η αναστολή αυτού του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της διεργασίας της μεθυλίωσης (Xie, et al, 1999).

Μία επιπλέον μελέτη από τους Rusiecki et al. αξιολόγησε τη σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων των ανθεκτικών οργανικών ρύπων (POPs) του πλάσματος και της γενικής μεθυλίωσης στο αίμα, υπολογιζόμενη στα επαναλαμβανόμενα στοιχεία Alu, σε πληθυσμούς από την Γροιλανδία που παρουσιάζουν μερικά από τα υψηλότερα επίπεδα των POPs παγκοσμίως και αποδείχθηκε τελικά η ύπαρξη μιας γραμμικής ανάστροφης συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων μεθυλίωσης και μερικών POPs στο αίμα (Rusiecki, et al, 2008).

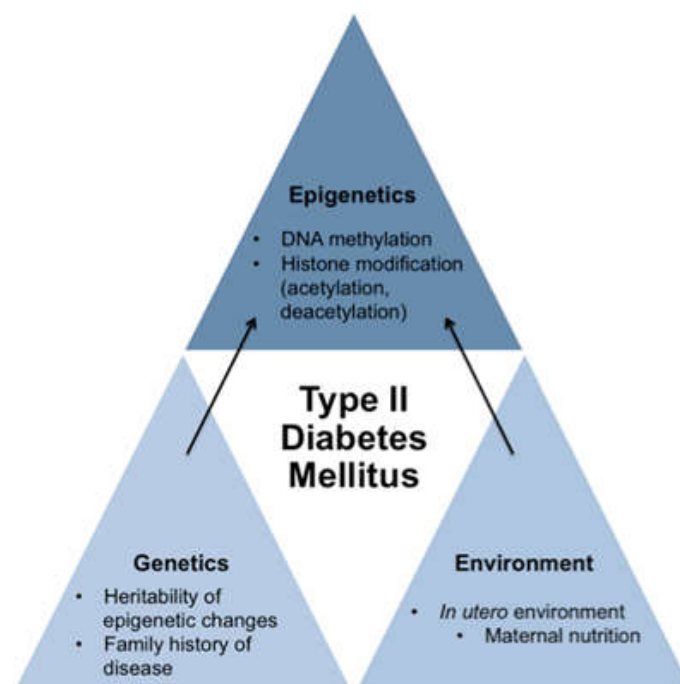
3.8 Επιγενετική και Διαβήτης τύπου II

Η γήρανση σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου II καθώς και με φθίνουσα οξειδωτική ικανότητα και μιτοχονδριακή λειτουργία (Petersen, et al, 2004). Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες διαμορφώνουν ένα επιγενετικό πρότυπο το οποίο μπορεί να αλλάζει κατά τη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου επηρεάζοντας βασικά γονίδια στην αναπνευστική αλυσίδα και στην διαδικασία πρόσληψης γλυκόζης (Rönn, et al, 2009, Fraga, et al, 2005, Vaxillaire and Froguel, 2008) (**Σχήμα 2**). Για παράδειγμα, η μιτοχονδριακή πρωτεΐνη COX7A1 (μέρος του συμπλέγματος IV της αναπνευστικής αλυσίδας) παρουσιάζει μειωμένη έκφραση στους μύες διαβητικών και αποτελεί στόχο μεθυλίωσης του DNA που σχετίζεται με την ηλικία. Ενώ η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου COX7A1 αυξάνεται στους σκελετικούς μύες των ηλικιωμένων σε σχέση με τα νεαρά δίδυμα, το αντίθετο πρότυπο εμφανίζεται για την έκφραση του γονιδίου COX7A1. Επιπροσθέτως, το επίπεδο μεταγραφής του COX7A1 στον σκελετικό μυ συνδέεται με αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης *in vivo* και αυξημένη πρόσληψη οξυγόνου (VO₂max). Αυτά τα δεδομένα δείχνουν πώς η ηλικία μπορεί να επηρεάσει τη μεθυλίωση του DNA, την έκφραση γονιδίων και γενικότερα τον *in vivo* μεταβολισμό. Πολλές μελέτες ακόμη, υποστηρίζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ του γενετικού πολυμορφισμού και της μεθυλίωσης του DNA. Πράγματι, ένας πολυμορφισμός που εισάγει μια πιθανή θέση μεθυλίωσης του DNA, ένα δινουκλεοτίδιο CG και μια υποθετική θέση δέσμευσης του παράγοντα μεταγραφής στον υποκινητή του γονιδίου NDUFB6 (NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex subunit 6) συνδέεται με αυξημένη μεθυλίωση του DNA, μειωμένη γονιδιακή έκφραση και μειωμένο *in vivo* μεταβολισμό με την αύξηση της ηλικίας (Rönn, et al, 2009).

Η ανοχή στην ηπατική ινσουλίνη είναι ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό τόσο της γήρανσης όσο και του διαβήτη τύπου II. Η γλυκοκινάση είναι ένα βασικό ένζυμο για την αξιοποίηση της ηπατικής γλυκόζης και η δραστηριότητα της μειώνεται στο ήπαρ των διαβητικών. Αυτό το γεγονός συμβαίνει παράλληλα με αυξημένη μεθυλίωση του υποκινητή της γλυκοκινάσης σε ηλικιωμένους αρουραίους σε σχέση με νεαρούς αρουραίους. Όταν τα ηπατοκύτταρα ηλικιωμένων αρουραίων καλλιεργήθηκαν *in vitro* και το DNA απομακρύνθηκε χημικώς, υπήρξε μια

σημαντική αύξηση στην έκφραση της γλυκοκινάσης, υποδηλώνοντας ένα σημαντικό ρόλο για τη μεθυλίωση του DNA στη εξαρτώμενη με την ηλικία ρύθμιση αυτού του γονιδίου (Mutskov, et al, 2007).

Προσφάτως, έχουν γίνει κάποιες προσπάθειες να κατανοηθεί και η επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου ινσουλίνης στα παγκρεατικά β-κύτταρα. Στα β-κύτταρα, το γονίδιο της ινσουλίνης εμφανίζει υπερακετυλίωση της ιστόνης H4 και υπερμεθυλίωση της ιστόνης H3 στην λυσίνη 4. Ωστόσο, αυτά τα επιγενετικά σήματα δεν παρατηρούνται στο γονίδιο ινσουλίνης σε άλλους κυτταρικούς τύπους, π.χ. κύτταρα HeLa (Haumaitre, et al, 2008). Επιπλέον, σε μία κυτταρική σειρά β-κυττάρων, το ένζυμο HAT p300 (Histone AcetylTransferases) και η μεθυλοτρανσφεράση SET7/9 (histone H3-lysine 4 methyltransferase), «προσελκύονται» στον υποκινητή της ινσουλίνης για να ενεργοποιήσουν την μεταγραφή του γονιδίου (Chakrabarti, et al, 2003). Έχει προταθεί τέλος, ότι οι HDACs επηρεάζουν την ανάπτυξη του παγκρέατος σε τρωκτικά καθώς η θεραπεία με αναστολείς των HDAC κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης ενισχύει την ανάπτυξη των β-κυττάρων (Haumaitre, et al, 2008).



Σχήμα 2 : Σχηματική αναπαράσταση των επιγενετικών, γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων που συμβάλλουν στην ανάπτυξη του διαβήτη τύπου II (Sterns et, al, 2014).

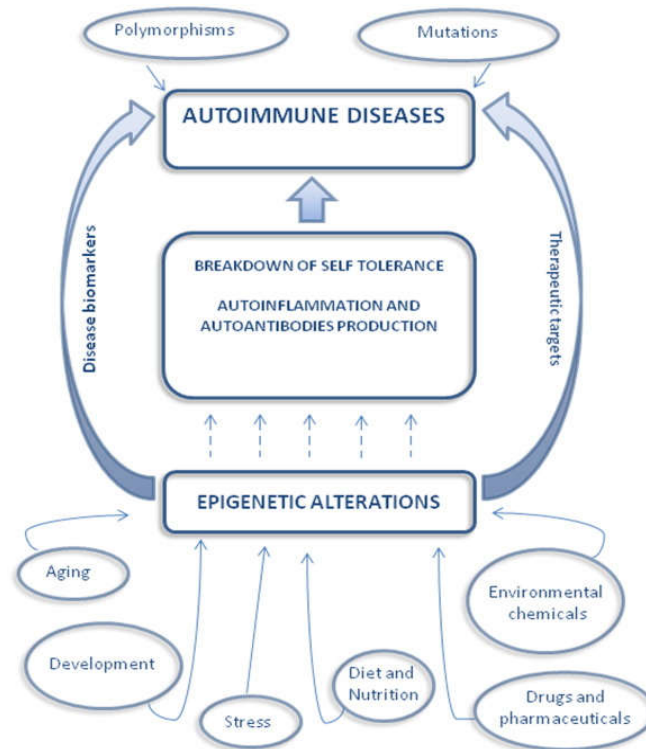
3.9 Επιγενετική και αυτοάνοσα νοσήματα

Η φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος εξαρτάται από το επίπεδο επάρκειας της αυτό-ανοχής (self-tolerance). Οι μελέτες σχετικά με τα αυτοάνοσα νοσήματα τόσο σε μονοζυγωτικά όσο και σε διζυγωτικά δίδυμα έχουν προτείνει ότι στα αυτοάνοσα νοσήματα ρόλο παίζουν οι επιγενετικοί παράγοντες. Η αποτυχία της επιγενετικής ομοιόστασης, ως απάντηση στην επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων επάγει την γονιδιακή έκφραση σε συγκεκριμένα διαφοροποιημένα κύτταρα που οδηγούν σε μη ρυθμισμένη αυτο-ανοχή. Πολλές λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος όπως η αναδιάταξη του υποδοχέα του αντιγόνου και οι επαγόμενες ανοσοαποκρίσεις έναντι των παθογόνων ελέγχονται επιγενετικά. Οι μεταβολές των επιγενετικών μηχανισμών που ρυθμίζουν την ανοσολογική ανάπτυξη θα μπορούσαν να επιφέρουν το αυτοάνοσο νόσημα (Hewagama and Richardson, 2009, Greer and McCombe, 2012) (**Εικόνα 22**).

Η συχνότητα εμφάνισης των αυτοάνοσων νοσημάτων είναι ιδιαίτερα μεγαλύτερη στις γυναίκες. Μηχανισμοί όπως, η συμμετοχή του δεύτερου χρωμοσώματος X στην ανοσοαπόκριση και η γενετική προδιάθεση συμμετέχουν στην αυτοανοσία. Επιπλέον, υπάρχουν παραδείγματα συσχετισμού των επιγενετικών τροποποιήσεων και των αυτοάνοσων νοσημάτων. Για παράδειγμα, σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, παρατηρήθηκε υπομεθυλίωση του DNA στα επίπεδα των ιστονών HDAC1 και HDAC2, υπερακετυλίωση των ιστονών H3 και H4 και υπομεθυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη 9 στους αρθρικούς ιστούς. Σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας, υπομεθυλίωση του DNA έχει ανιχνευθεί στη λευκή ουσία του κεντρικού νευρικού συστήματος σε σχέση με υγιή άτομα. Στον συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, οι κύριοι στόχοι των αυτοαντισωμάτων είναι το υπομεθυλιωμένο αποπτωτικό DNA και οι τροποποιημένες ιστόνες (Hewagama and Richardson, 2009).

Αρκετές μελέτες επιβεβαίωσαν το ρόλο της επιγενετικής σε αλλεργικές παθήσεις και το άσθμα θεωρείται μία από τις πιο περίπλοκες ασθένειες αυτής της κατηγορίας. Τα στοιχεία υποδηλώνουν ότι τόσο τα άσθμα όσο και οι επιγενετικοί μηχανισμοί είναι κληρονομικοί και το 36-79% των κληρονομικών οικογενειακών περιπτώσεων άσθματος έχουν μη-Μεντελικό μοντέλο κληρονομικότητας σε

περισσότερα από 100 γονίδια τα οποία καλύπτουν μόνο ένα μικρό τμήμα της αιτιολογίας της νόσου. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι το άσθμα και οι επιγενετικές τροποποιήσεις έχουν αποδειχθεί ότι μεταφέρονται από την προσβεβλημένη μητέρα περισσότερο από ότι από τον προσβεβλημένο πατέρα, ως αποτέλεσμα των ανοσολογικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ εμβρύου και μητέρας (March, et al, 2011, Barrett, 2008).



Εικόνα 22: Ένα αυτοάνοσο νόσημα μπορεί είναι αποτέλεσμα επίδρασης επιγενετικών τροποποιήσεων (ηλικία, ανάπτυξη, στρες, διατροφή, φάρμακα, χημικές ουσίες) οι οποίες προκαλούν «κατάρρευση» της αυτοανοχής, γεγονός που οδηγεί στην παραγωγή αυτό-αντισωμάτων και στην εγκαθίδρυση μιας φλεγμονώδους κατάστασης έναντι του ίδιου του οργανισμού. (Picascia, et al, 2015)

3.10 Επιγενετική: Από τη σύλληψη μέχρι την γέννηση

Αμέσως μετά την σύλληψη πραγματοποιείται επαναπρογραμματισμός των κυττάρων μέσω της επιγενετικής διαδικασίας ώστε τα κύτταρα να αποκτήσουν ένα συγκεκριμένο προφίλ γονιδιακής έκφρασης και μία καθορισμένη πορεία διαφοροποίησης. Πιο αναλυτικά, στο γονιμοποιημένο ωάριο, η γενική απομεθυλίωση του DNA ακολουθείται από την επαναμεθυλίωση για να επαναπρογραμματιστεί το γονιδίωμα της μητέρας και του πατέρα με σκοπό την αποτελεσματική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Δεδομένου ότι ένα γονιμοποιημένο ωάριο αναπτύσσεται σε ένα ανθρώπινο ον, τα επιγενετικά σήματα προκαλούν σταθερές αλλαγές στα πρότυπα της γονιδιακής έκφρασης. Κάθε τέτοιο σήμα ενεργοποιεί μερικά γονίδια και απενεργοποιεί άλλα καθώς το κύτταρο αναπτύσσεται προς την τελική του μορφή. Αρχικά, τα περισσότερα σήματα προέρχονται είτε από τα ίδια κύτταρα είτε από γειτονικά κύτταρα. Το επιγενετικό προφίλ κάθε τύπου κυττάρου γίνεται όλο και πιο διαφορετικό με την πάροδο του χρόνου. Τελικά, σχηματίζονται εκατοντάδες τύποι κυττάρων, το καθένα με ξεχωριστή ταυτότητα και εξειδικευμένη λειτουργία. Ειδικά γονίδια ενεργοποιούνται και απενεργοποιούνται σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και οποιαδήποτε παραβίαση αυτού του κανονισμού ρύθμισης της μεθυλίωσης του DNA μπορεί να μεταβάλλει διαρκώς τη γονιδιακή έκφραση (Khanherkar, et al, 2014).

Το εμβρυϊκό επιγονιδίωμα είναι πιο ευαίσθητο κατά τη διάρκεια αυτής της αναπτυξιακής περιόδου. Ένα σφάλμα κατά τη διάρκεια ενός τόσο κρίσιμου σταδίου μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικό φαινότυπο στους απογόνους. Η κατάσταση της υγείας της μητέρας μπορεί να επηρεάσει την παιδική ανάπτυξη και την ενδεχόμενη εμφάνιση νόσου. Το περιβάλλον της μήτρας επηρεάζει την ανάπτυξη του εμβρύου μέσω της επιγενετικής αναδιαμόρφωσης. Πιο συγκεκριμένα, ο επαναπρογραμματισμός του αναπτυσσόμενου ζυγώτη περιλαμβάνει τη μετατροπή της 5-μεθυλοκυτοσίνης σε 5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνη (Wossidlo, et al, 2011). Η δίαιτα και το άγχος της μητέρας, επίσης, επηρεάζουν το έμβρυο και μπορεί να προκαλέσουν επιγενετικές αλλαγές. Μια μελέτη βασισμένη στη χορήγηση συμπληρώματος φολικού οξέος έδειξε ότι οι απόγονοι των ποντικών που τράφηκαν με φολικό οξύ είχαν διαφορετικό γενικό πρότυπο μεθυλίωσης του DNA σε σχέση με εκείνους τους απογόνους των ποντικών που έλαβαν χαμηλή δοσολογία φολικού οξέος και

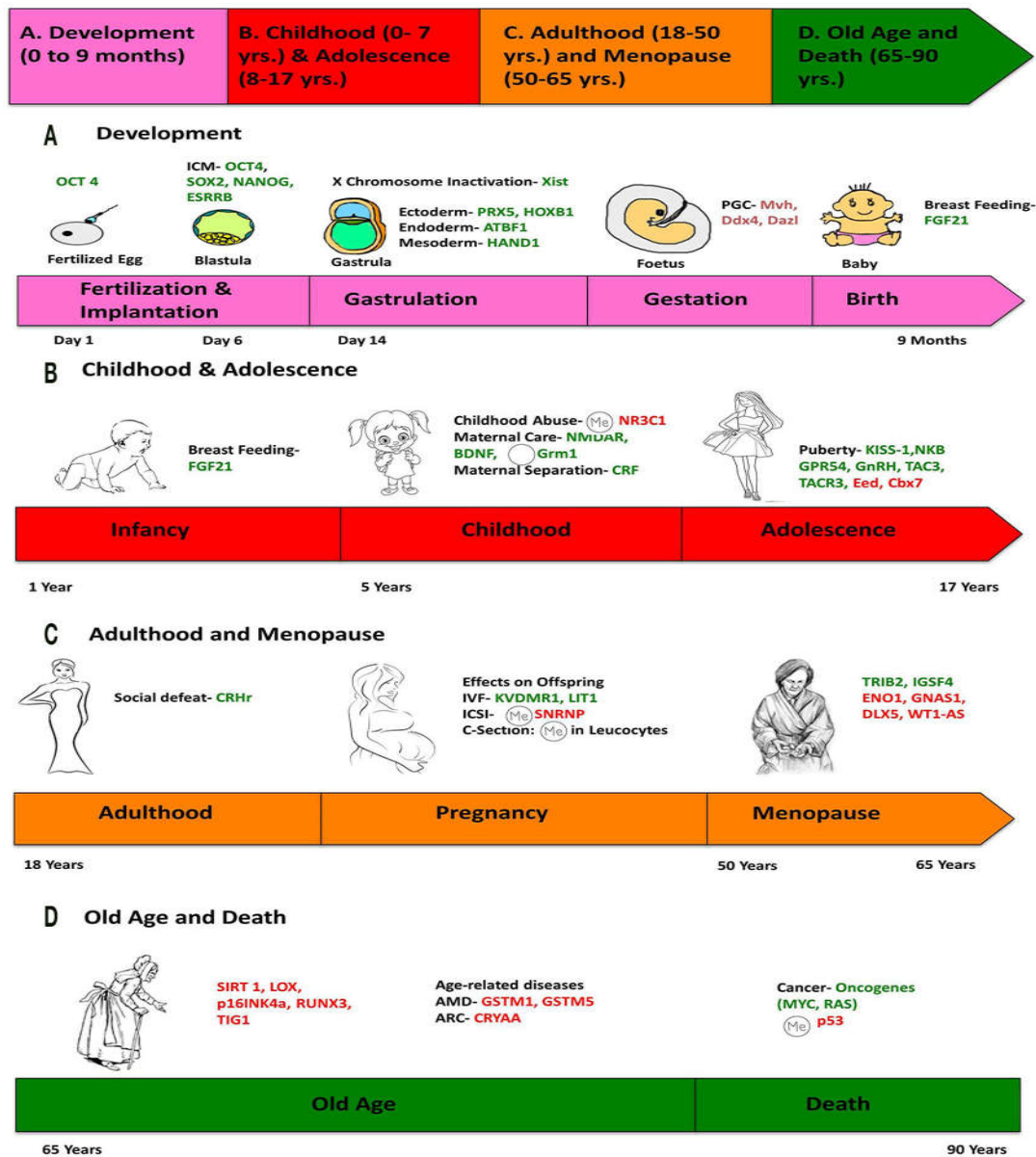
αφορούσαν τα γονίδια που σχετίζονται με διαταραχές στο φάσμα του αυτισμού (Barua, et al, 2014). Σε πειράματα όπου η τροποποίηση της μητρικής διατροφής ήταν η μόνη μεταβλητή, αυτή η αλλαγή ήταν ικανή να βελτιώσει την έκβαση της υγείας και να αυξήσει τη μακροζωία στους απογόνους (Dolinoy, et al, 2006).

Σε άλλες μητρικές επιδράσεις περιλαμβάνεται το κάπνισμα, το οποίο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να προκαλέσει αλλοιωμένη μεθυλίωση του DNA και έκφραση των mi-RNAs (Knorik, et al, 2012) καθώς και η ψυχολογική υγεία της μητέρας η οποία επιδρά στο επιγενετικό αποτέλεσμα στους απογόνους. Σε αρουραίους, το προγεννητικό στρες κατά τη διάρκεια της κύησης έχει αποδειχθεί ότι τροποποιεί επιγενετικά σήματα που συνδέονται με νευροψυχιατρικές ασθένειες κατά την κρίσιμη περίοδο της ανάπτυξης του εγκεφάλου του εμβρύου (Zucchi, et al, 2013).

Η επιγενετική απόκλιση που προκαλείται από το περιβάλλον καθοδηγείται επίσης και από πατρικούς παράγοντες οι οποίοι είναι εξίσου σημαντικοί με τους αντίστοιχους της μητέρας και επηρεάζουν την επιγενετική έκβαση στους απογόνους (Carone, et al, 2010). Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και της ανάπτυξης του εμβρύου, το γονίδιο IGF2 (insulin-like growth factor) ρυθμίζεται με μεθυλίωση του DNA. Τα αποτυπωμένα σήματα εξαλείφονται στα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα κατά την έναρξη της διαδικασίας και δημιουργούνται νέα πρότυπα μεθυλίωσης. Μόνο ο πατρικός παράγοντας IGF2 μεταγράφεται στους φυσιολογικούς ιστούς. Νέα δεδομένα δείχνουν ότι η πατρική παχυσαρκία σχετίζεται με τη μείωση της μεθυλίωσης του DNA στο γονίδιο IGF2 (De Chiara, et al, 1991, Soubry, et al, 2013). Επίσης, η μεθυλίωση του DNA στο σπέρμα μπορεί να επηρεαστεί από την κατανάλωση αλκοόλ του πατέρα, και η πατρική έκθεση σε τοξικές χημικές ουσίες όπως η βινκλοζολίνη και το χλωριούχο χρώμιο μεταβάλλουν ομοίως την βλαστική σειρά του επιγονιδιώματος (Ouko, et al, 2009). Η ανεπάρκεια φολικού οξέος στα αρσενικά ποντίκια επηρεάζει τη λειτουργία του σπέρματος με αποτέλεσμα την διαφορετική μεθυλίωση του DNA σε σχέση με τα κοντρόλ και οι αρσενικοί απόγονοι τέτοιων ποντικών παρουσιάζουν τροποποιημένη έκφραση γονιδίων σε σχέση με τα ποντίκια αναφοράς (Lambrot, et al, 2013).

Συμπερασματικά, καθώς ένα γονιμοποιημένο ωάριο αναπτύσσεται, πολλά σήματα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης σε έμβρυο προκαλούν αυξανόμενες αλλαγές στην έκφραση του γενετικού προφίλ. Ακόμη και σε διαφοροποιημένα κύτταρα, τα σήματα θα τελειοποιήσουν την κυτταρική λειτουργία μεταβάλλοντας την έκφραση

γονιδίων, αναδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο την εγγενή ευελιξία που διακρίνει το επιγονιδίωμα (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Η επιγενετική κατά τη διάρκεια της ζωής μιας γυναίκας.

Τα γονίδια με πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύουν εκείνα που εκφράζονται/επάγονται και αυτά με κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύουν τα γονίδια ειδικού φαινοτύπου. Η γήρανση σχετίζεται με την αποσιώπηση ή με την υπορρύθμιση (down-regulation) της έκφρασης του γονιδίου *SIRT1* (Sirtuin 1, επίσης γνωστό ως NAD-dependent deacetylase sirtuin-1). Η πρωτεΐνη Sirtuin 1 (ρύθμιση επιγενετικής σίγασης γονιδίων) είναι ρυθμισμένη καθοδικά σε κύτταρα που έχουν υψηλή αντίσταση στην ινσουλίνη και επαγωγή της έκφρασής της αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη, υποδηλώνοντας ότι το μόριο σχετίζεται με τη βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη (Kanherkar, et al, 2014).

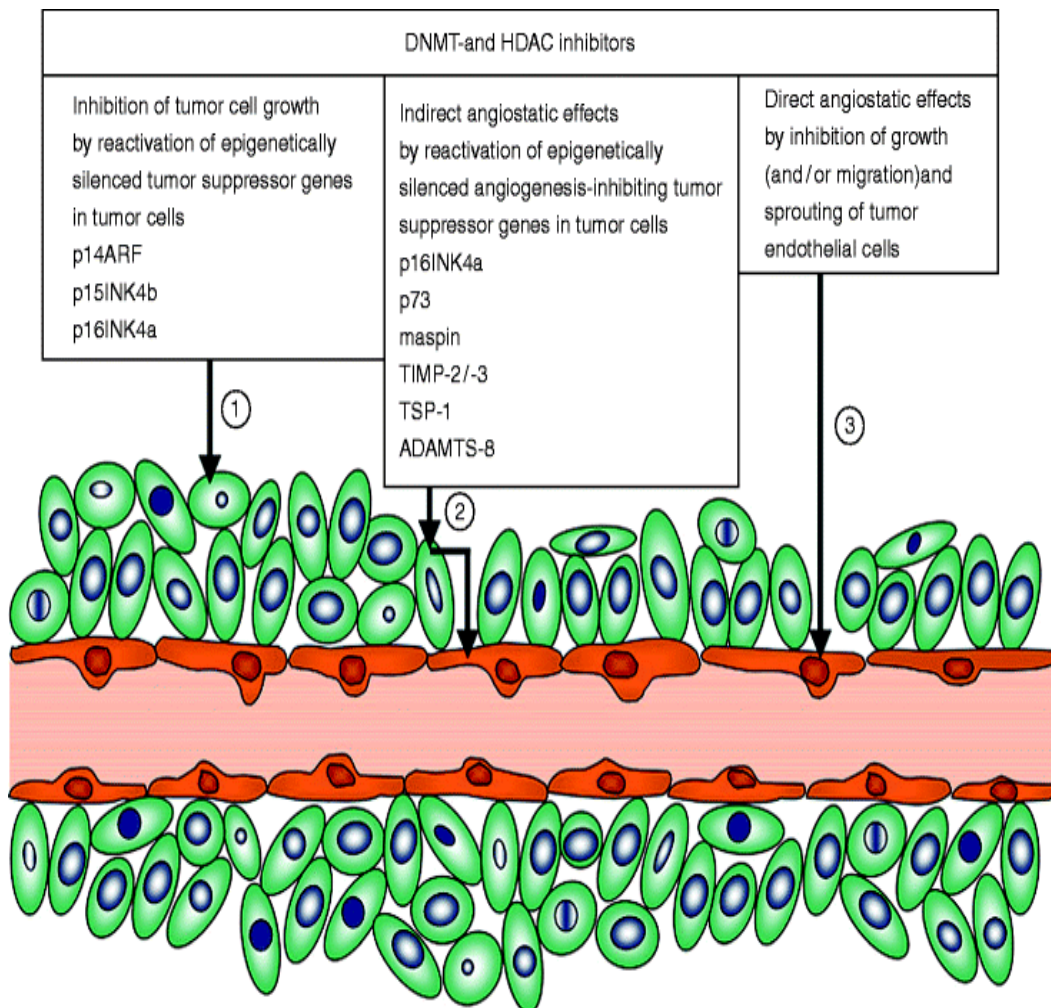
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

4.1 Γενικά

Η μελέτη των νόσων του ανθρώπου μπορεί να έχει επικεντρωθεί κυρίως στους γενετικούς μηχανισμούς, αλλά είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί ότι η διακοπή της ισορροπίας των επιγενετικών δικτύων μπορεί να είναι υπεύθυνη για αρκετές σοβαρές παθολογίες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου και των συνδρόμων που συνεπάγονται χρωμοσωμικές αστάθειες και διανοητική υστέρηση. Μερικά επιγενετικά σήματα μπορεί να είναι αναστρέψιμα και αυτό το γεγονός ενθάρρυνε πολλούς ερευνητές να επικεντρωθούν στην επιγενετική θεραπεία. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό που καθιστά την επιγενετική θεραπεία διαφορετική από την γονιδιακή είναι ότι στην πρώτη περίπτωση προκαλούνται αλλαγές στην έκφραση γονιδίων και όχι στην κωδικοποιημένη αλληλουχία DNA όπως πραγματοποιούνται στο δεύτερο τύπο θεραπείας. Οι επιγενετικοί θεραπευτικοί μηχανισμοί θα μπορούσαν να φανούν χρήσιμοι σε πολύπλοκες ασθένειες που σχετίζονται με τη λειτουργία της μνήμης, τις ψυχολογικές συμπεριφορές, τον εθισμό, την ανάπτυξη του καρκίνου και άλλες ασθένειες που δεν μπορούν να ερμηνευθούν μόνο με τους γενετικούς παράγοντες ή με το περιβάλλον. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις έχειδειχθεί ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην πρόοδο του καρκίνου και ότι η επιγενετική θεραπεία θα μπορούσε να είναι μια αποτελεσματική και ασφαλής λύση ως μια δεύτερη γραμμή θεραπείας για τον καρκίνο με μειωμένη τοξικότητα σε σχέση με τις συμβατικές θεραπευτικές μεθόδους. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η διερεύνηση των υποκείμενων μηχανισμών θα μπορούσε να βοηθήσει στην ανάπτυξη ειδικών θεραπευτικών στόχων και εξατομικευμένων επιγενετικών φαρμάκων (Lu, et al, 2006).

4.2 Επιγενετικές τροποποιήσεις και αναστολές

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι τροποποιήσεις των ιστονών μαζί με τη μεθυλίωση του DNA συνιστούν έναν επιγενετικό κώδικα, ο οποίος ρυθμίζει την κατάσταση της μεταγραφής. Αυτές οι παρεκκλίνουσες μεταβολές στον επιγενετικό κώδικα μπορούν να ενεργοποιήσουν την έκφραση των ογκογονιδίων, συμπεριλαμβανομένου του c-Myc, το οποίο επάγει την ανάπτυξη ειδικών τροποποιητικών μικρών μορίων πρωτεϊνών δέσμευσης με την ιστόνη και των DNMT1, DNMT3A και DNMT3B που καταλύουν τον μετασχηματισμό της ομάδας μεθυλίου από την S-αδενοσυλο-μεθειονίνη στο C-5 της κυτοσίνης στο DNA. Στα κακοήγη κύτταρα, η υπερμεθυλίωση στις νησίδες CpGs επάγει την καταστολή πολυάριθμων γονιδίων καταστολής όγκων (π.χ p16) (Enjuanes, et al, 2013). Έτσι, τα μικρά μόρια που στοχεύουν τα ένζυμα DNMTs μπορεί δυνητικά να αντιστρέψουν την επιγενετική σίγαση γονιδίων καταστολής του καρκίνου σε έναν αριθμό διαφορετικών τύπων καρκίνου. Οι αναστολές των ενζύμων DNMT χρησιμοποιήθηκαν σε κλινικές μελέτες για τη θεραπεία όγκων, συμπεριλαμβανομένης της αζακιτιδίνης, της δεσιταβίνης και του SGI-110 (DNA Methyltransferase Inhibitor Oncolytic). Το SGI-110 είναι ένα προ-φάρμακο της υπομεθυλίωσης δεύτερης γενιάς του οποίου ο ενεργός μεταβολίτης είναι το καλά χαρακτηρισμένο φάρμακο δεσιταβίνη. Αυτές οι ενώσεις έδειξαν αντι-πολλαπλασιαστικές δράσεις σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένων του μαστού, του προστάτη, του πνεύμονα, του παγκρέατος, του ήπατος και της λευχαιμίας. Το MG98 επίσης που αναστέλλει την παραγωγή της DNA μεθυλτρανσφεράσης είναι ένας τύπος μη κωδικοποιού ολιγονουκλεοτιδίου (antisense), το οποίο αποδείχτηκε ότι είναι αποτελεσματικό για τη θεραπεία συμπαγών όγκων και καρκίνων του νεφρού με μείωση της ρύθμισης της DNMT1 (Amato, et al, 2012, Gnyszka, et al, 2013, Griffiths, et al, 2013) (**Εικόνα 24**).



Εικόνα 24: Αντιογκογόνες επιδράσεις της DNA μεθυλοτρανσφεράσης και των αναστολέων της αποακετυλάσης ιστόνης *in vivo*.

(1) Οι αναστολείς των DNMT και των HDAC μειώνουν την ανάπτυξη των κυττάρων του όγκου με την επανενεργοποίηση των επιγενετικά αποσιωπώμενων ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε κύτταρα όγκου.

(2) Η ενεργοποίηση των επιγενετικά αποσιωπώμενων ογκοκατασταλτικών γονιδίων που ανέστειλαν την αγγειογένεση σε καρκινικά κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε έμμεσες αγγειοστατικές δράσεις των αναστολέων DNMT και HDAC.

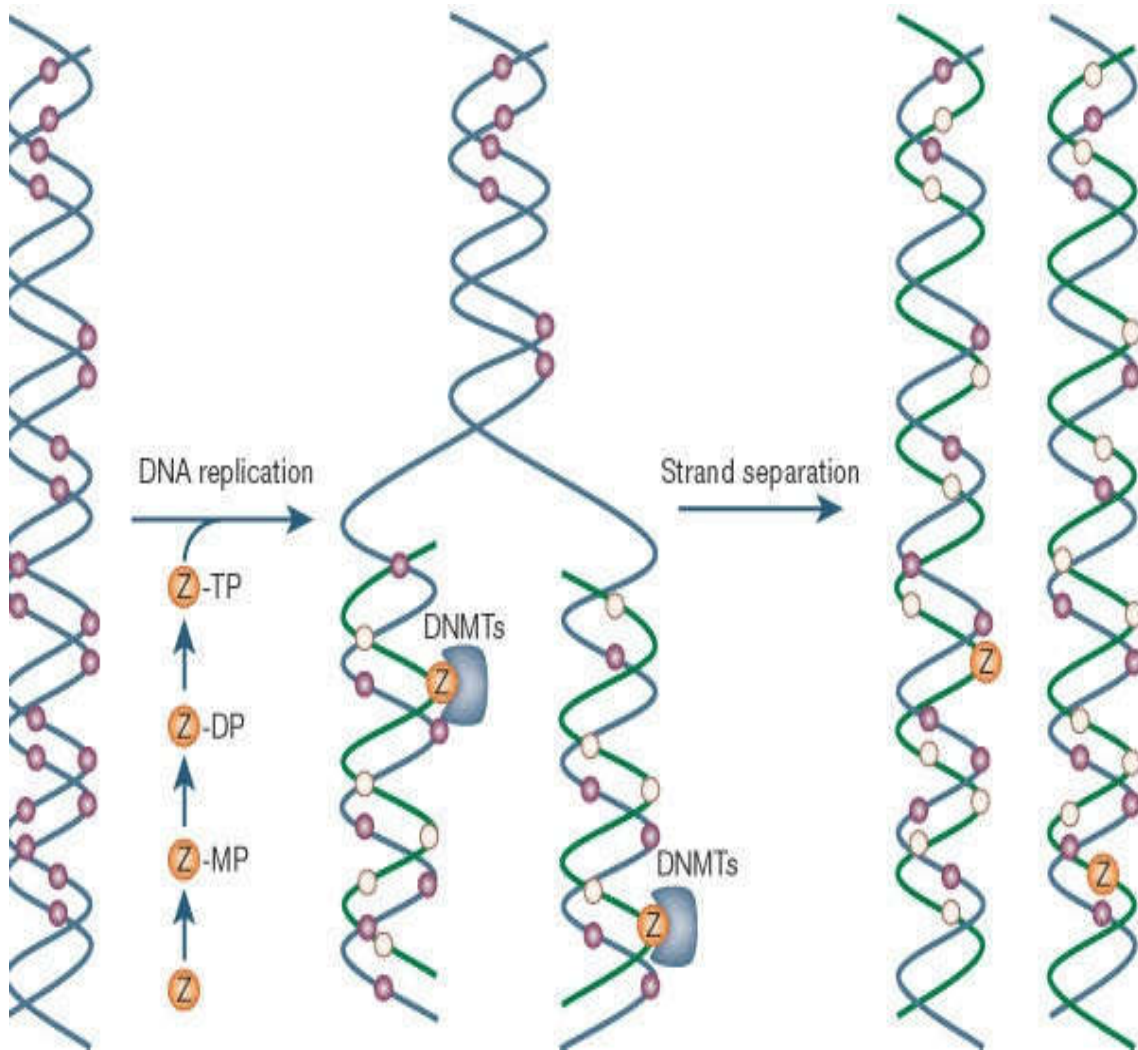
(3) Οι αναστολείς DNMT και HDAC μειώνουν άμεσα την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση, επιδεικνύοντας έτσι άμεσες αγγειοστατικές δράσεις (Hellebrekers and Van Engeland, 2011).

Επιπλέον, η EGCG (Epigallocatechin-3-gallate) είναι η κύρια πολυφαινόλη που βρίσκεται στο πράσινο τσάι. Το EGCG αναστέλλει τη δραστηριότητα των DNMTs, προκαλώντας CpG απομεθυλίωση και επανενεργοποίηση των γονιδίων που σίγαζαν με μεθυλίωση. Η πολυφαινόλη EGCG αναστέλλει ανταγωνιστικά την δραστηριότητα των DNMTs με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Η επανενεργοποίηση ορισμένων γονιδίων που έχουν υποστεί σίγαση με μεθυλίωση από την πολυφαινόλη EGCG δείχθηκε επίσης σε καρκινικά κύτταρα HT-29 ανθρώπινα κόλου, σε καρκινικά

κύτταρα KYSE 150 οισοφάγου και κύτταρα PC3 (ανεξάρτητα από ανδρογόνα) καρκίνου του προστάτη. Ωστόσο, η πρακτική χρησιμότητα στην κλινική πράξη περιορίστηκε από τη συστηματική τοξικότητα και τις επιπτώσεις της όπως είναι ορισμένες κακοήθειες του αίματος (Chakrabarty, et al, 2015).

Οι αναστολείς της μεθυλίωσης του DNA ενεργοποιούν ταχέως την έκφραση των γονιδίων που έχουν υποβληθεί σε επιγενετική αποσιώπηση, ιδιαίτερα αν αυτή η αποσιώπηση έχει συμβεί σε μια παθολογική κατάσταση. Οι αρχικοί αναστολείς, η 5-αζακυτιδίνη (5-αζα-CR) και η 5-αζα-2α-δεοξυκυτιδίνη (5-αζα-CdR), αναπτύχθηκαν αρχικά ως κυτταροτοξικοί παράγοντες, αλλά ανακαλύφθηκαν στη συνέχεια ότι είναι ισχυροί αναστολείς της μεθυλίωσης του DNA και επάγουν τη γονιδιακή έκφραση και τη διαφοροποίηση σε καλλιεργημένα κύτταρα. Και τα δύο νουκλεοσιδικά ανάλογα μετατρέπονται σε τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια και στη συνέχεια ενσωματώνονται στη θέση της κυτοσίνης στο αντιγραφόμενο DNA (Braiteh, et al, 2008).

Μία άλλη κύρια κατηγορία επιγενετικής θεραπείας είναι οι αναστολείς της αποακετυλάσης ιστόνης (HDAC) οι οποίοι χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου, στην καρδιακή υπερτροφία και στην καρδιακή ανεπάρκεια και έχουν δείξει ότι διαθέτουν νευροπροστατευτικά αποτελέσματα σε κυτταρικά και ζωικά μοντέλα της νόσου του Parkinson. Ο αναστολέας της αποακετυλάσης της ιστόνης καθιστά δυνατή την υδρόλυση καταλοίπων N-ακετυλίου σε ιστόνες και την ενεργοποίηση των ακετυλοτρανσφεράσεων της ιστόνης (**Εικόνα 25**). Μια προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι οι HDACs διαδραματίζουν ρόλο ως κρίσιμοι μεσολαβητές στην επιβίωση και την εξέλιξη του όγκου (Minami, et al, 2014).



Εικόνα 25: Τα νουκλεοσίδια όπως η 5-αζα-2'-δεοξυκυτιδίνη (απεικονίζεται με Z) μετατρέπονται σε τριφωσφορικό εντός των κυττάρων στη φάση S του κυτταρικού κύκλου και ενσωματώνονται στη θέση της κυτοσίνης στο DNA. Τα νουκλεοσίδια όπως η 5-αζακυτιδίνη ή η ζελευκίνη μειώνονται στο επίπεδο διφωσφορικού με αναγωγή του νουκλεοτιδίου για ενσωμάτωση (δεν φαίνεται). Στο DNA, οι βάσεις σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με τις μεθυλοτρανσφεράσες του DNA με αποτέλεσμα την μείωση των ενεργών ενζύμων και την απομεθυλίωση του DNA. Ροζ χρώμα κύκλοι: μεθυλιωμένο CpG. Κρεμ χρώμα κύκλοι: μη μεθυλιωμένο CpG (Egger, et al, 2004).

Μετά την ανάπτυξη των επιγενετικών φαρμάκων, εμφανίστηκαν επιγενετικοί αναστολείς δεύτερης γενιάς, συμπεριλαμβανομένων των αναστολέων της ιστόνης μεθυλοτρανσφεράσης, των αναστολέων της ευχρωματικής ιστονικής λυσίνης μεθυλοτρανσφεράσης 2 (G9a), του ενισχυτή του zeste 2 (EZH2) και των αναστολέων της απομεθυλάσης της ιστόνης που ονομάζονται Jumonji C (JmjC). Αυτοί οι επιγενετικοί κλινικοί παράγοντες έχουν εγγενώς μεγαλύτερη εξειδίκευση δέσμευσης στους μοριακούς τους στόχους και μπορούν να αναπτυχθούν ως φάρμακα για κακοήγη νοσήματα (Wang and Patel, 2013).

Ο θεραπευτικός μηχανισμός δράσης της μεθυλίωσης DNA και των αναστολέων HDAC δεν είναι καθόλου εύκολος. Προφανώς, και οι δύο μηχανισμοί μπορούν να ενεργοποιήσουν γονίδια. Οι αναστολείς των HDAC και οι αναστολείς μεθυλίωσης του DNA είναι κυτταροτοξικοί παράγοντες και προκαλούν διακοπή του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση με ρύθμιση προς τα πάνω μέσω της πρωτεΐνης p21 (εναλλακτικά p21Waf1, επίσης γνωστή ως cyclin-dependent kinase inhibitor 1 ή CDK-interacting protein 1), και / ή μέσω του p53. Η απώλεια της γονιδιωματικής μεθυλίωσης προκαλεί εξαρτώμενη από την p53 απόπτωση και η p53 καταστέλλει την δράση της DNMT1, υποδεικνύοντας έναν βρόχο ανατροφοδότησης μεταξύ των δύο πρωτεϊνών (Karpf, et al, 2001). Επιπλέον, η δέσμευση των πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των DNA μεθυλοτρανσφερασών, στο DNA των κυττάρων που έχουν υποστεί αγωγή με αζανουκλεοζίτες μπορεί να οδηγήσει σε κυτταροτοξικότητα (Juttermann et al, 1994).

Συμπερασματικά, πολλές μελέτες επικεντρώνονται στην ανάπτυξη νέων «επιγενετικών θεραπειών» όπως η χρήση αναστολέων των ενζύμων που ελέγχουν τις επιγενετικές τροποποιήσεις και έχουν δείξει αντικαρκινικά αποτελέσματα για κάποιες κακοήθειες και θετικά αποτελέσματα για άλλες νόσους.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Κάθε κύτταρο του ανθρώπινου οργανισμού φέρει όμοιο γονιδίωμα, ωστόσο, παρά τη σταθερότητα αυτή, ο τελικός φαινότυπος ενός οργανισμού δεν είναι σταθερός και η απόκλιση προκαλείται από μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης ως απόκριση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Οι γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν αλλά δεν καθορίζουν την ανθρώπινη συμπεριφορά και το αποτέλεσμα τους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το περιβάλλον στο οποίο ζουν τα άτομα. Όπως δείχνουν μελέτες σε πειραματόζωα και ανθρώπους, οι αλλαγές στις περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση των γονιδίων και κατά συνέπεια την διαμόρφωση διαφόρων φαινοτύπων.

Η μεθυλίωση του DNA, η τροποποιήσεις των ιστονών και το φαινόμενο της παρεμβολής του RNA είναι οι κύριοι μηχανισμοί που συνιστούν τον πυρήνα των επιγενετικών αλλαγών. Αυτοί οι μηχανισμοί επηρεάζουν τον ρυθμό και το επίπεδο της μεταγραφής γονιδίων τόσο κατά την αναπτυξιακή περίοδο (εμβρυική) όσο και κατά την ενήλικη ζωή ενώ παράλληλα εμπλέκονται και στην παθογένεση πολλών ασθενειών. Διαφορετικοί τύποι κυττάρων εκτελούν ξεχωριστά προγράμματα έκφρασης των γονιδίων καθώς ανταποκρίνονται σε μεγάλο βαθμό σε ποικίλα αναπτυξιακά, φυσιολογικά, παθολογικά και περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Πιο συγκεκριμένα, στους περιβαλλοντικούς παραγόντες περιλαμβάνονται το στρες, οι διατροφικές συνήθειες, ο τρόπος ζωής, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και τοξικοί παράγοντες π.χ. κοκαΐνη, αλκοόλ. Αυτή η συσχέτιση μεταξύ λειτουργίας του γονιδιώματος και των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων οδήγησε στο να εδραιωθεί ένας αναδυόμενος κλάδος της βιολογίας καλούμενος Περιβαλλοντική Επιγενετική, οι εξελίξεις του οποίου μπορεί να προσφέρουν ενδείξεις για τις επιδράσεις του περιβάλλοντος στην ανθρώπινη υγεία. Βέβαια, κάθε περιβαλλοντική έκθεση μπορεί να προκαλεί επιγενετικές τροποποιήσεις που ποικίλλουν από ιστό σε ιστό και γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να διεξαχθούν μελλοντικές μελέτες που να εξετάζουν τις επιγενετικές επιδράσεις των ίδιων περιβαλλοντικών παραγόντων σε διαφορετικούς ιστούς.

Τα σύνθετα ανθρώπινα χαρακτηριστικά είναι πιθανό να επηρεαστούν τόσο από περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες όσο και από την μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι κρίσιμες για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, την ανάπτυξη, τη

διαφοροποίηση και την απόκριση σε περιβαλλοντικές επιδράσεις αφού αποτελούν τους βασικούς ρυθμιστές της διατήρησης της πολυδυναμίας και της προδιαγραφής της κυτταρικής τύχης.

Τέλος, καθώς οι επιγενετικές πληροφορίες ρυθμίζουν την προσβασιμότητα των παραγόντων μεταγραφής στη χρωματίνη, αναδιοργανώνοντας τη δομή και την οργάνωση της, συντονίζουν την γονιδιακή έκφραση και κατά συνέπεια επηρεάζουν διάφορες βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της γήρανσης και του καρκίνου. Αφού παρέχεται αυτή η δυνατότητα από τους επιγενετικούς μηχανισμούς, όλο και περισσότερες μελέτες πλέον επικεντρώνονται στην επιγενετική θεραπεία με την αξιοποίηση αναστολέων των ενζύμων που ελέγχουν τις επιγενετικές τροποποιήσεις (DNA μεθυλτρανσφεράσες και οι αποακετυλάσες των ιστονών), επιφέροντας έτσι πολλά υποσχόμενα και ενθαρρυντικά θεραπευτικά αποτελέσματα για διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abu-Amero, S., et al. (2008) The genetic aetiology of Silver-Russell syndrome. *J Med Genet*, 45(4): 193-9.
2. Agrawal N., Dasaradhi P.V.N., Mohmmmed A., Malhotra P., Bhatnagar R.K., & Mukherjee S.K. (2003) RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications *Microbiol Mol Biol Rev* 67(4): 657–685.
3. Amato R.J., et al (2012) MG98, a second – generation DNMT1 inhibitor, in the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Cancer Invest.* 30(5): 415-21.
4. Avila, M.a.A., et al. (2002) S-Adenosylmethionine revisited: its essential role in the regulation of liver function. *Alcohol*, 27(3): 163-167.
5. Ayala, F.J. (2009) Darwin and the scientific method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.106(Supplement_1):10033-10039.
6. Baccarelli, A., & Bollati V. (2009) Epigenetics and environmental chemicals. *Current opinion in pediatrics*, 21(2):243-251.
7. Barrett G.E. (2008) Maternal influence in the transmission of asthma susceptibility. *Pulm Pharmacol Ther.* 21(3):474-84.
8. Bartolomei, M.S., & Ferguson-Smith A.C. (2011) Mammalian Genomic Imprinting. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7): a002592.
9. Bartolomei, M.S., (2009) Genomic imprinting: employing and avoiding epigenetic processes. *Genes & Development*, 23(18): 2124-2133.
10. Barton, S.C., Surani M.A., & Norris M.L. (1984) Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature*, 311(5984): 374-6.
11. Barua, S., et al. (2014) Single-base resolution of mouse offspring brain methylome reveals epigenome modifications caused by gestational folic acid. *Epigenetics Chromatin*, 7(1):3.
12. Bestor, T.H. (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, 9(16): 2395-402.
13. Bird, A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16(1): 6-21.
14. Bjornsson, H.T., et al. (2008) Intra-individual change in DNA methylation over time with familial clustering. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 299(24): 2877-2883.
15. Bogdanović, O., & Veenstra, G.J.C. (2009) DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*, 118(5): 549-565.
16. Brait, M., et al. (2009) Association between Lifestyle Factors and CpG Island Methylation in a Cancer-Free Population. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 18(11): 2984-2991.
17. Braithe, F., Soriano, A. O., Garcia-Manero, G., Hong, D., Johnson, M. M., Silva, L., Yang, H., Alexander, S., Wolff, J., Kurzrock, R. (2008). Phase I study of epigenetic modulation with 5-azacytidine and valproic acid in patients with advanced cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(19): 6296-301.

18. Broday, L., et al. (2000) Nickel Compounds Are Novel Inhibitors of Histone H4 Acetylation. *Cancer Research*, 60(2): 238-241.
19. Brook, R.D., et al. (2004) Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation*, 109(21):2655-71.
20. Burkhardt R.W. (2013) Lamarck, Evolution, and the Inheritance of Acquired Characters. *Genetics* 194(4):793-805.
21. Burton, A., & Torres-Padilla M.E. (2010) Epigenetic reprogramming and development: a unique heterochromatin organization in the preimplantation mouse embryo. *Briefings in Functional Genomics*, 9 (5-6): 444-454.
22. Burzynski, S.R. (2005) Aging: gene silencing or gene activation? *Med Hypotheses*, 64(1):201-8.
23. Calvanese, V., et al. (2009) The role of epigenetics in aging and age-related diseases. *Ageing Research Reviews*, 8(4):268-276.
24. Carone, B.R., et al. (2010) Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell*, 143(7):1084-96.
25. Casillas MA Jr1, L.N., Andrews L.G., Tollefsbol T.O. (2003) Transcriptional control of the DNA methyltransferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts. *Mol Cell Biochem*, 252:33-43.
26. Cassel, S., et al. (2006) Fluoxetine and Cocaine Induce the Epigenetic Factors MeCP2 and MBD1 in Adult Rat Brain. *Molecular Pharmacology*, 70(2):487-492.
27. Castel, S.E., & Martienssen, R.A. (2013) RNA interference (RNAi) in the Nucleus: roles for small RNA in transcription, epigenetics and beyond. *Nature reviews. Genetics*, 14(2): 100-112.
28. Chakrabarti, S.K., et al. (2003) Covalent Histone Modifications Underlie the Developmental Regulation of Insulin Gene Transcription in Pancreatic β Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(26):23617-23623.
29. Chakrabarty, S., et al. (2015) Epigallocatechin-3-gallate shows anti-proliferative activity in HeLa cells targeting tubulin-microtubule equilibrium. *Chem Biol Interact*, 242:380-9.
30. Chanda, S., et al. (2006) DNA Hypermethylation of Promoter of Gene p53 and p16 in Arsenic-Exposed People with and without Malignancy. *Toxicological Sciences*, 89(2):431-437.
31. Chen, H., et al. (2006) Nickel Ions Increase Histone H3 Lysine 9 Dimethylation and Induce Transgene Silencing. *Molecular and Cellular Biology*, 26(10):3728-3737.
32. Coyle, Y.M., et al. (2007) Role of Physical Activity in Modulating Breast Cancer Risk as Defined by *APC* and *RASSF1A* Promoter Hypermethylation in Nonmalignant Breast Tissue. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 16(2): 192-196.
33. Cui, X. (2013) Introduction to Epigenetics/Epigenomics.
34. Dashwood, R.H., & Ho, E. (2007) Dietary histone deacetylase inhibitors: From cells to mice to man. *Seminars in cancer biology*, 17(5):363-369.
35. De Castro M. (2016) Johann Gregor Mendel: paragon of experimental science. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 4(1):3-8.

36. DeChiara, T.M., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1991) Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*, 64(4):849-59.
37. Delaval, K., Wagschal A., & Feil R. (2006) Epigenetic deregulation of imprinting in congenital diseases of aberrant growth. *BioEssays*, 28(5): 453-459.
38. Deng, J.V., et al. (2010) MeCP2 in the Nucleus Accumbens Contributes to Neural and Behavioral Responses to Psychostimulants. *Nature neuroscience*, 13(9):1128-1136.
39. Dolinoy, D.C., et al. (2006) Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environ Health Perspect*, 114(4):567-72.
40. Dong, X. & Weng, Z. (2013) The correlation between histone modifications and gene expression. *Epigenomics*, 5(2): 113-116.
41. Downward J. (2004) RNA interference. *BMJ* 328(7450): 1245–1248.
42. Egger, G., et al. (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429(6990):457-63.
43. Enjuanes, A., et al. (2013) Genome-wide methylation analyses identify a subset of mantle cell lymphoma with a high number of methylated CpGs and aggressive clinicopathological features. *Int J Cancer*, 133(12):2852-63.
44. Fang, M., Chen D., & Yang C.S. (2007), Dietary Polyphenols May Affect DNA Methylation. *The Journal of Nutrition*, 137(1): 223S-228S.
45. Fowler, B.A., et al. (2004) Oxidative stress induced by lead, cadmium and arsenic mixtures: 30-day, 90-day, and 180-day drinking water studies in rats: an overview. *Biomaterials*, 17(5):567-8.
46. Fraga, M.F., et al. (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30):10604-10609.
47. Frixa, T., Donzelli S., & Blandino G. (2015) Oncogenic MicroRNAs: Key Players in Malignant Transformation. *Cancers*, 7(4): 2466-2485.
48. Gnyszka A., Jastrzebski Z., and Flis S. (2013) DNA methyltransferase inhibitors and their emerging role in epigenetic therapy of cancer. *Anticancer Res.* 33(8):2989-96.
49. Godfrey, K.M., Costello P.M., & Lillycrop, K.A. (2015) The Developmental Environment, Epigenetic Biomarkers and Long-Term Health. *Journal of developmental origins of health and disease*, 6(5): 399-406.
50. Greer, J.M., and McCombe P.A. (2012) The role of epigenetic mechanisms and processes in autoimmune disorders. *Biologics : Targets & Therapy*, 6: 307-327.
51. Griffith, J.S., & Mahler H.R. (1969) DNA ticketing theory of memory. *Nature* 223(5206): 580-2.
52. Griffiths E.A., et al (2013) SGI-110: DNA Methyltransferase Inhibitor Oncolytic. *Drugs Future*.38 (8):535-543.
53. Guerrero-Bosagna, C., & Skinner M.K. (2012) Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of phenotype and disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012. 354(1-2):3-8.

54. Harikumar, A., & Meshorer, E. (2015) Chromatin remodeling and bivalent histone modifications in embryonic stem cells. *EMBO Reports*, 16(12): 1609-1619.
55. Haumaitre, C., Lenoir O., and Scharfmann R. (2008) Histone Deacetylase Inhibitors Modify Pancreatic Cell Fate Determination and Amplify Endocrine Progenitors. *Molecular and Cellular Biology*, 28(20):6373-6383.
56. Hellebrekers, D. and Van Engeland M. (2011) Epigenetic Therapy, in *Encyclopedia of Cancer*, M. Schwab, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. 1287-1290.
57. Hewagama, A., and Richardson B. (2009) The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity*, 33(1):3.
58. Hoki, Y., et al. (2009) A proximal conserved repeat in the *Xist* gene is essential as a genomic element for X-inactivation in mouse. *Development*, 136(1): 139-146.
59. Holliday, R., & Pugh J.E. (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187(4173): 226-32.
60. Horsthemke, B., & Buiting K. (2006) Imprinting defects on human chromosome 15. *Cytogenet Genome Res*, 113(1-4): 292-9.
61. Hou, L., et al. (2012) Environmental chemical exposures and human epigenetics. *Int J Epidemiol*, 41(1): 79-105.
62. Huang, D., et al. (2008) Global DNA hypomethylation, rather than reactive oxygen species (ROS), a potential facilitator of cadmium-stimulated K562 cell proliferation. *Toxicology letters*, 179(1): 43-47.
63. Hyman S.E. (2005) Addiction: A Disease of Learning and Memory. *American Journal of Psychiatry*, 162(8):1414-1422.
64. Im, H.I., et al. (2010) MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nature neuroscience*, 13(9):1120-1127.
65. Imani, S., et al. (2017) MicroRNA-34a targets epithelial to mesenchymal transition-inducing transcription factors (EMT-TFs) and inhibits breast cancer cell migration and invasion. *Oncotarget*, 8(13): 21362-21379.
66. Jakovcevski, M., & Akbarian S. (2012) Epigenetic mechanisms in neurodevelopmental and neurodegenerative disease. *Nature medicine*, 18(8):1194-1204.
67. Jia, H., et al. (2015) HDAC inhibition imparts beneficial transgenerational effects in Huntington's disease mice via altered DNA and histone methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(1): E56-E64.
68. Jiménez-Chillarón, J.C., et al. (2015) Back to the future: transgenerational transmission of xenobiotic-induced epigenetic remodeling. *Epigenetics*, 10(4): 259-273.
69. Jin, V. (2015) *Chromatin Structure & Dynamics* Victor Jin Department of Biomedical Informatics The Ohio State University., K. Lover, Editor.
70. Jirtle, R.L., & Skinner, M.K. (2007) Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature reviews. Genetics*, 8(4):253-262.
71. Jung, M., & Pfeifer, G.P. (2015) Aging and DNA methylation. *BMC Biology*, 13(1):7.
72. Juttermann, R., Li E., and Jaenisch R. (1994) Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(25):11797-801.

73. Kalish, J.M., Jiang C., & Bartolomei M.S. (2014) Epigenetics and imprinting in human disease. *Int J Dev Biol*, 58(2-4): 291-8.
74. Kamiya, K., et al. (1996) Expression of estrogen receptor and proto-oncogene messenger ribonucleic acids in reproductive tracts of neonatally diethylstilbestrol-exposed female mice with or without postpuberal estrogen administration. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 104(02):111-122.
75. Kanherkar, R.R., Bhatia-Dey N., & Csoka A.B. (2014) Epigenetics across the human lifespan. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2:49.
76. Karpf, A.R., et al. (2001) Activation of the p53 DNA damage response pathway after inhibition of DNA methyltransferase by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Mol Pharmacol*, 59(4):751-7.
77. Kass, S.U., Pruss D., & Wolffe A.P. (1997) How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet*, 13(11): 444-9.
78. Ke, Q., et al. (2006) Alterations of histone modifications and transgene silencing by nickel chloride. *Carcinogenesis*, 27(7):1481-1488.
79. Keyes, M.K., et al. (2007) Older Age and Dietary Folate Are Determinants of Genomic and p16-Specific DNA Methylation in Mouse Colon. *The Journal of Nutrition*, 137(7): 1713-1717.
80. Khan, D., & Ahmed S.A. (2015) Epigenetic Regulation of Non-Lymphoid Cells by Bisphenol A, a Model Endocrine Disrupter: Potential Implications for Immunoregulation. *Frontiers in Endocrinology*, 6: 91.
81. Kim, Y.I. (2005) Nutritional Epigenetics: Impact of Folate Deficiency on DNA Methylation and Colon Cancer Susceptibility. *The Journal of Nutrition*, 135(11):2703-2709.
82. Kinoshita, H., et al. (2004) HIGH ALCOHOL PREFERRING (HAP) AND LOW ALCOHOL PREFERRING (LAP) RATS SHOW ALTERED PROOPIOMELANOCORTIN (POMC) MESSENGER RNA EXPRESSION IN THE ARCUATE NUCLEUS. *Alcohol and Alcoholism*, 39(5): 406-409.
83. Klug W.S., Cummings M.R., Spencer C.A., Palla M.A. (2014) Βασικές Αρχές Γενετικής, 11^η Έκδοση, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, Ειδικό Κεφάλαιο Σύγχρονης Γενετικής 1 ,σελ. 841-842.
84. Knopik, V.S., et al. (2012) The epigenetics of maternal cigarette smoking during pregnancy and effects on child development. *Dev Psychopathol*, 2012. 24(4):1377-90.
85. Korey, C. (2009) DNA Methylation.
86. Kotsopoulos, J., Sohn K.J., & Kim Y.I. (2008) Postweaning Dietary Folate Deficiency Provided through Childhood to Puberty Permanently Increases Genomic DNA Methylation in Adult Rat Liver. *The Journal of Nutrition*, 138(4): 703-709.
87. Kutschera U. (2009) Charles Darwin's Origin of Species, directional selection, and the evolutionary sciences today. *Naturwissenschaften* 96(11):1247-63.
88. Lamarck, J.B. (1809) *Philosophie zoologique, ou exposition des considérations relatives à l'histoire naturelle des animaux; à la diversité de leur organisation et des facultés qu'ils en obtiennent; aux causes physiques qui maintiennent en eux la vie et donnent lieu aux mouvements qu'ils exécutent; enfin, à celles qui produisent les unes le sentiment, et les autres l'intelligence de ceux qui en sont doués* Baillière, Paris.
89. Lambrot, R., et al. (2013) Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes. *Nat Commun*, 4:2889.
90. LaPlant, Q., et al. (2010) Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nature neuroscience*, 13(9): 1137-1143.

91. Le Luyer, J., et al. (2017) Parallel epigenetic modifications induced by hatchery rearing in a Pacific salmon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(49): 12964-12969.
92. Lee, Y.W., et al. (1995) Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: a new model for epigenetic carcinogens. *Molecular and Cellular Biology*, 15(5):2547-2557.
93. Lesburguères E., Gobbo O.L., Alaux-Cantin S., Hambucken A., Trifilieff P., Bontempi B. (2011) Early tagging of cortical networks is required for the formation of enduring associative memory. *Science*, 331(6019): 924-8.
94. Levenson, J.M., et al. (2006) Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem*, 281(23):15763-73.
95. Li, J., et al. (2002) Specific targeting and constitutive association of histone deacetylase complexes during transcriptional repression. *Genes Dev*, 16(6): 687-92.
96. Lu, J., et al. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435 (7043): 834-8.
97. Lu, Q., et al. (2006) Epigenetics, disease, and therapeutic interventions. *Ageing Res Rev*, 5(4):449-67.
98. Lyon, M.F., & Glenister P.H. (1977) Factors affecting the observed number of young resulting from adjacent-2 disjunction in mice carrying a translocation. *Genetical Research*, 29(1): 83-92.
99. MacFarlane, L.A., & Murphy, P.R. (2010) MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*, 11(7): 537-561.
100. Malin, E.L., & McGaugh, J.L. (2006) Differential involvement of the hippocampus, anterior cingulate cortex, and basolateral amygdala in memory for context and footshock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(6): 1959-1963.
101. Mann J.R., Lovell-Badge R.H. (1984) Inviability of parthenogenones is determined by pronuclei, not egg cytoplasm. *Nature*, 3120: 66-67.
102. March, M.E., Sleiman P.M., and Hakonarson H. (2011) The genetics of asthma and allergic disorders. *Discov Med*, 11(56):35-45.
103. Markowitz, S. (2000) DNA repair defects inactivate tumor suppressor genes and induce hereditary and sporadic colon cancers. *J Clin Oncol*, 18(21 Suppl): 75S-80S.
104. Marsit, C.J. (2015) Influence of environmental exposure on human epigenetic regulation. *The Journal of Experimental Biology*, 218(1): 71-79.
105. Marsit, C.J., Eddy K., & Kelsey K.T. (2006) MicroRNA Responses to Cellular Stress. *Cancer Research*, 66(22):10843-10848.
106. McGrath J., Solter D. (1984) Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, 37: 179-83.
107. Miller, C.A., & Sweatt J.D. (2007) Covalent Modification of DNA Regulates Memory Formation. *Neuron*, 53(6): 857-869.
108. Miller, C.A., et al. (2010) Cortical DNA methylation maintains remote memory. *Nature neuroscience*, 13(6): 664-666.

- 109.Minami, J., et al. (2014) Histone deacetylase 3 as a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Leukemia*,28(3):680-9.
- 110.Mohn, F., et al. (2008) Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell*, 30(6): 755-66.
- 111.Moore, L.D., Le T., & Fan G. (2013) DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1): 23-38.
- 112.Moosavi, A., & Ardekani A.M. (2016) Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases. *Iranian Biomedical Journal* 20(5): 246-258.
- 113.Morgan, H.D., et al. (2004) Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem*, 279(50): 52353-60.
- 114.Mugatroyd, C., et al. (2010) The Janus face of DNA methylation in aging. *Aging (Albany NY)*, 2(2):107-110.
- 115.Mutskov, V., et al. (2007) The Human Insulin Gene Displays Transcriptionally Active Epigenetic Marks in Islet-Derived Mesenchymal Precursor Cells in the Absence of Insulin Expression. *STEM CELLS*, 25(12):3223-3233.
- 116.Naeini, M.M., & Ardekani, A.M. (2009) Noncoding RNAs and Cancer. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 1(2):55-70.
- 117.Nayak, N., et al., (2016) Role of epigenetic modifications in improving the thermo-tolerance, growth and immuno-competence in poultry: current status and future applications. (51):1.
- 118.Nelson, E.D., Kavalali, E.T., & Monteggia L.M. (2008) Activity-Dependent Suppression of Miniature Neurotransmission through the Regulation of DNA Methylation. *The Journal of Neuroscience*, 28(2): 395-406.
- 119.Niemann, H.J. (2014) Karl Popper and the Two New Secrets of Life: Including Karl Popper's Medawar Lecture 1986 and Three Related Texts: Mohr Siebeck.
- 120.Noble, D. (2015) Conrad Waddington and the origin of epigenetics. *The Journal of Experimental Biology* 218(6): 816-818.
- 121.Noble, D. (2016) *Dance to the Tune of Life: Biological Relativity*: Cambridge University Press.
- 122.Novikova, S.I., et al. (2008) Maternal Cocaine Administration in Mice Alters DNA Methylation and Gene Expression in Hippocampal Neurons of Neonatal and Prepubertal Offspring. *PLoS ONE*, 3(4): e1919.
- 123.Ogata, T., Kagami M., & Ferguson-Smith A.C. (2008) Molecular mechanisms regulating phenotypic outcome in paternal and maternal uniparental disomy for chromosome 14. *Epigenetics*, 2008. 3(4): 181-7.
- 124.Ouko, L.A., et al. (2009) Effect of alcohol consumption on CpG methylation in the differentially methylated regions of H19 and IG-DMR in male gametes: implications for fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol Clin Exp Res*, 33(9):1615-27.
- 125.Pal, S., & Tyler, J. K. (2016). Epigenetics and aging. *Science advances* 2(7):e1600584.
- 126.Penny, G.D., et al. (1996) Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature*, 379(6561): 131-7.

127. Perera, F., et al. (2009) Relation of DNA Methylation of 5'-CpG Island of ACSL3 to Transplacental Exposure to Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Childhood Asthma. *PLoS ONE*, 4(2): e4488.
128. Petersen, K.F., et al. (2004) Impaired Mitochondrial Activity in the Insulin-Resistant Offspring of Patients with Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine*, 2004. 350(7): 664-671.
129. Petersen-Mahrt, S.K., Coker H.A., & Pauklin S. (2009) DNA deaminases: AIDing hormones in immunity and cancer. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 87(9): 893-897.
130. Philibert, R.A., et al. (2008) MAOA Methylation is Associated with Nicotine and Alcohol Dependence in Women. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 0(5): 565-570.
131. Picascia A., Grimaldi V., Pignalosa O., De Pascale M.R., Schiano C., Napoli C. (2015) Epigenetic control of autoimmune diseases: from bench to bedside. *Clin Immunol.* 157(1):1-15.
132. Pilsner, J.R., et al. (2007) Genomic methylation of peripheral blood leukocyte DNA: influences of arsenic and folate in Bangladeshi adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86(4): p. 1179-1186.
133. Pirooznia, S.K., & Elefant, F. (2013) Targeting specific HATs for neurodegenerative disease treatment: translating basic biology to therapeutic possibilities, *Front. Cell. Neurosci* 28(7): 30.
134. Pogribny, I.P., & Rusyn, I. (2014) Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma. *Cancer letters*, 342(2):223-230.
135. Polin, R.A., et al. (2017) Fetal and neonatal physiology.
136. Pósfai, J., et al. (1989) Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucleic Acids Research*, 17(7): 2421-2435.
137. Poulsen, P., et al. (2007) The epigenetic basis of twin discordance in age-related diseases. *Pediatr Res*, 61(5 Pt 2): 38R-42R.
138. Ptak, C., & Petronis A. (2010) Epigenetic approaches to psychiatric disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 12(1): 25-35.
139. Reichard, J.F., Schnekenburger, M., & Puga A., (2007) Long term low-dose arsenic exposure induces loss of DNA methylation. *Biochemical and biophysical research communications*, 352(1):188-192.
140. Reik, W., Dean, W., & Walter, J. (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 293(5532):1089-93.
141. Riggs, A.D. (1975) X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 14(1): 9-25.
142. Riggs, A.D., Martienssen R.A., & Russo, V.E.A. (1996) Introduction.
143. Rivera, C.M., & Ren B. (2013) Mapping human epigenomes. *Cell*, 155(1): 39-55.

144. Robbins, T.W., & Everitt B.J. (2002) Limbic-Striatal Memory Systems and Drug Addiction. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(3): 625-636.
145. Robertson, K.D., & Wolffe A.P. (2000) DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet*, 1(1): 11-9.
146. Robertson, K.D., (2005) DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*, 6(8): 597-610.
147. Robinson, T.E., et al. (2001) Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. *Synapse*, 39(3):257-66.
148. Rönn, T., et al. (2009) Genetic Variation in ATP5O Is Associated with Skeletal Muscle ATP5O mRNA Expression and Glucose Uptake in Young Twins. *PLoS ONE*, 4(3): e4793.
149. Rusiecki, J.A., et al. (2008) Global DNA Hypomethylation Is Associated with High Serum-Persistent Organic Pollutants in Greenlandic Inuit. *Environmental Health Perspectives*, 116(11):1547-1552.
150. Ryu, H.-W., et al. (2015) Influence of Toxicologically Relevant Metals on Human Epigenetic Regulation. *Toxicological Research*, 31(1): 1-9.
151. Sacconi, A., et al. (2012) miR-204 targets Bcl-2 expression and enhances responsiveness of gastric cancer. *Cell Death Dis*, 3: e423.
152. Sager, R., & Kitchin R. (1975) Selective silencing of eukaryotic DNA. *Science*, 189(4201): 426-433.
153. Sanchis-Gomar, F., et al. (2012) Physical exercise as an epigenetic modulator: Eustress, the "positive stress" as an effector of gene expression. *J Strength Cond Res*, 26(12): 3469-72.
154. Sassone-Corsi, P. (1998) Molecular clocks in development. *Nature* 392: 872.
155. Satta, R., et al. (2008) Nicotine decreases DNA methyltransferase 1 expression and glutamic acid decarboxylase 67 promoter methylation in GABAergic interneurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(42): 16356-16361.
156. Scarano, E. (1971) The control of gene function in cell differentiation and in embryogenesis. *Adv Cytopharmacol* 1: 13-24.
157. Sciandrello, G., et al. (2004) Arsenic-induced DNA hypomethylation affects chromosomal instability in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 25(3): 413-417.
158. Sharma, R.P., Gavin D.P., & Grayson D.R. (2010) CpG Methylation in Neurons: Message, Memory, or Mask? *Neuropsychopharmacology*, 35(10):2009-2020.
159. Shukla, S.D., & Lim, R.W. (2013) Epigenetic Effects of Ethanol on the Liver and Gastrointestinal System. *Alcohol Research : Current Reviews*, 35(1): 47-55.
160. Siedlecki, P. & Zielenkiewicz, P. (2006) Mammalian DNA methyltransferases. *Acta Biochim Pol*, 53(2): 245-56.
161. Singal, R., & Ginder, G.D. (1999) DNA methylation. *Blood*, 93(12): 4059-70.
162. Soubry, A., et al. (2013) Paternal obesity is associated with IGF2 hypomethylation in newborns: results from a Newborn Epigenetics Study (NEST) cohort. *BMC Med*, 11:29.

163. Sterns, J. D., Smith, C. B., Steele, J. R., Stevenson, K. L., & Gallicano, G. I. (2014). Epigenetics and type II diabetes mellitus: underlying mechanisms of prenatal predisposition. *Frontiers in cell and developmental biology* 2:15.
164. Takiguchi, M., et al. (2003) Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Experimental Cell Research*, 286(2):355-365.
165. Tamaru, H. (2010) Confining euchromatin/heterochromatin territory: jumonji crosses the line. *Genes Dev* 24(14):1465–1478.
166. Tao, L., et al. (1999) Effect of trichloroethylene on DNA methylation and expression of early-intermediate protooncogenes in the liver of B6C3F1 mice. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 13(5):231-237.
167. Tarantini, L., et al. (2009) Effects of Particulate Matter on Genomic DNA Methylation Content and iNOS Promoter Methylation. *Environmental Health Perspectives*, 117(2):217-222.
168. Temple, I.K. (2007) Imprinting in human disease with special reference to transient neonatal diabetes and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Endocr Dev*, 12: 113-23.
169. Tian, Y., et al. (2013) Hepatitis B Virus X Protein-Induced Aberrant Epigenetic Modifications Contributing to Human Hepatocellular Carcinoma Pathogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 33(15):2810-2816.
170. Turk, P.W., et al. (1995) DNA adduct 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine (8-hydroxyguanine) affects function of human DNA methyltransferase. *Carcinogenesis*, 16(5):1253-5.
171. Ushijima, T., (2005) Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat Rev Cancer*, 5(3): 223-31.
172. Valinluck, V., et al. (2004) Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Research*, 32(14): 4100-4108.
173. Valko, M., Morris H., & Cronin M.T.D. (2005) Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10): 1161-1208.
174. Vaxillaire, M. and Froguel P. (2008) Monogenic Diabetes in the Young, Pharmacogenetics and Relevance to Multifactorial Forms of Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews*, 29(3):254-264.
175. Vineis, P., Schatzkin A., & Potter J.D. (2010) Models of carcinogenesis: an overview. *Carcinogenesis*, 31(10): 1703-1709.
176. Waddington, C.H. (1939) *An introduction to modern genetics* / by C.H. Waddington, London: George Allen & Unwin.
177. Waddington, C.H. (1956) Genetic Assimilation of the Bithorax Phenotype. *Evolution* 10(1): 1-13.
178. Wang, Z. and Patel D.J. (2013) Small molecule epigenetic inhibitors targeted to histone lysine methyltransferases and demethylases. *Q Rev Biophys*, 46(4):349-73.
179. Wei, X., et al. (2013) miR-101 is down-regulated by the hepatitis B virus x protein and induces aberrant DNA methylation by targeting DNA methyltransferase 3A. *Cellular Signalling*, 25(2): 439-446.
180. Weksberg, R., Shuman C., & Smith A.C. (2005) Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 137C(1): 12-23.

181. Wossidlo, M., et al. (2011) 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat Commun*, 2:241.
182. Xiang, N., et al. (2008) Selenite reactivates silenced genes by modifying DNA methylation and histones in prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 29(11): 2175-2181.
183. Xie, S., et al. (1999) Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene*, 236(1):87-95.
184. Xu, Q., et al. (2010) Determination of Methylated CpG Sites in the Promoter Region of Catechol-O-Methyltransferase (COMT) and their Involvement in the Etiology of Tobacco Smoking. *Frontiers in Psychiatry*, 1:16.
185. Yamashita, S., Takayanagi A., & Shimizu, N. (2001) Effects of neonatal diethylstilbestrol exposure on c-fos and c-jun protooncogene expression in the mouse uterus. *Histol Histopathol*, 16(1):131-40.
186. Yanaihara, N., et al. (2006) Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 9(3): 189-98.
187. Yauk, C., et al. (2008) Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2):605-610.
188. Yu, B.P. (2015) *Nutrition, Exercise and Epigenetics: Ageing Interventions 2015*: Springer International Publishing.
189. Zhang, Y. (2015) Detection of epigenetic aberrations in the development of hepatocellular carcinoma. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1238:709-731.
190. Zhao, C.Q., et al. (1997) Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20):10907-10912.
191. Zhong, C.X., & Mass M.J. (2001) Both hypomethylation and hypermethylation of DNA associated with arsenite exposure in cultures of human cells identified by methylation-sensitive arbitrarily-primed PCR. *Toxicology Letters*, 122(3):223-234.
192. Zucchi, F.C., et al. (2013) Maternal stress induces epigenetic signatures of psychiatric and neurological diseases in the offspring. *PLoS One*, 8(2):e56967.