

GRAŻYNA KOSTKA, KATARZYNA URBANEK-OLEJNIK, BOŻENA WIADROWSKA, ROBERT BAŃKOWSKI

INDUKOWANA FENOBARBITALEM HIPERMETYLACJA REJONU
PROMOTOROWEGO GENU *P53* W WĄTROBIE
SZCZURÓW SZCZEPU *W1STAR*

PHENOBARBITAL-INDUCED HYPERMETHYLATION OF THE *P53* PROMOTER
REGION IN THE LIVER OF *W1STAR* RATS

Zakład Toksykologii Środowiskowej
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
e-mail: gkostka@pzh.gov.pl
Kierownik: prof. dr hab. *J.K. Ludwicki*

W artykule przedstawiono wyniki badań z zakresu wpływu fenobarbitalu (PB) na stopień metylacji dinukleotydów CpG w rejonie promotorowym genu p53, syntezę DNA i aktywność metylotransferazy DNA (DNMTs).

Słowa kluczowe: *p53*, metylacja DNA, metylotransferaza DNA, synteza DNA, fenobarbital, wątroba

Key words: *p53*, DNA methylation, DNA methyltransferase, DNA synthesis, phenobarbital, liver

WSTĘP

Niezwykle rozwinięte w ostatnich latach badania metylacji DNA wnoszą nowe, istotne elementy w zrozumienie przekształcania się komórki prawidłowej w nowotworową, określane jako transformacja nowotworowa. Jednocześnie wskazują na kierunek badań chemicznych kancerogenów, których działanie rakotwórcze ma podstawy epigenetyczne. Związki te określane jako niegenotoksyczne kancerogeny (NGCs), powodują u gryzoni wzrost częstości występowania nowotworów o różnej lokalizacji, a ich wspólną cechą jest zdolność stymulowania proliferacji komórkowej w docelowych narządach i tkankach oraz hamowania apoptozy [9, 19, 22]. Wywoływanie takich efektów biologicznych, związanych z zaburzeniem równowagi pomiędzy replikacją i śmiercią komórek uważane jest za podstawowy czynnik determinujący zachwianie homeostazy komórkowej, której konsekwencją może być transformacja nowotworowa [22, 25].

Regulacja cyklu komórkowego i apoptozy zachodzi przede wszystkim na poziomie genów i związana jest z regulacyjnym wpływem białek kodowanych przez protoonkogeny i geny su-

presorowe. Przyczynami nieprawidłowego funkcjonowania białek regulatorowych mogą być nie tylko mutacje punktowe, translokacje i amplifikacje genów, ale również zmiany epigenetyczne, które uniemożliwiają ich prawidłową ekspresję przy niezmienionej sekwencji nukleotydowej. W regulacji ekspresji genów istotną rolę przypisuje się metylacji DNA [3, 4, 17].

Metylacja DNA jest poreplikacyjną modyfikacją DNA, polegającą na przyłączaniu grup metylowych do cytozyny, obecnej wewnątrz dinukleotydu CpG (p oznacza grupę fosforanową) i jest katalizowana przez rodzinę metylotransferaz DNA (DNMTs) [2, 10].

Zmiany metylacji DNA rozważane są jako kluczowy mechanizm działania przynajmniej niektórych NGCs [5, 8].

Prezentowana praca stanowi fragment badań realizowanych w Zakładzie Toksykologii Środowiskowej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowym Zakładzie Higieny z zakresu wpływu NGCs na metylację i aktywność transkrypcyjną genów uczestniczących w kontroli cyklu komórkowego i apoptozy.

Zbadano wpływ fenobarbitalu (PB), zaklasyfikowanego przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (IARC) do związków o udowodnionym działaniu nowotworowym dla zwierząt i prawdopodobnie rakotwórczym dla ludzi - grupa 2B [11], na poziom metylacji genu supresorowego *p53*. Wyniki z zakresu zmian metylacji korelowano z syntezą DNA i aktywnością metylotransferaz DNA (DNMTs).

MATERIAŁY I METODY

Odczynniki

Fenobarbital (95%) - Farmaceutyczno-Chemiczna Spółdzielnia Pracy „Galenus”; [³H]-tymidyna, (aktywność 1020 MBq/mol) - Instytut Badań, Produkcji i Stosowania Radioizotopów, Czechy; [³H-methyl] SAM (S-adenozylometionina) o aktywności 362,6 GBq/mmol - Perkin Elmer LAS, Inc.; Kit do izolacji DNA, enzymy restrykcyjne: Hin6I, Bsh1236I oraz phage λ DNA - Fermentas, USA; FastStart Taq Polimeraza - Roche, Niemcy. Wszystkie inne stosowane odczynniki - Sigma Chemical Company, USA o najwyższej czystości i jakości.

Schemat doświadczeń

Badania przeprowadzano na dojrzałych samcach szczurów szczepu *Wistar* o masie ciała 200 ± 10 g. Młode szczury o masie 50 - 60g umieszczano w klatkach (po 5 sztuk), w pomieszczeniu o temperaturze 22 ± 1 °C z 12-godzinnym rytmem świetlnym i względnej wilgotności powietrza $50 \pm 10\%$. Zwierzęta w okresie adaptacji (okres 2-tygodniowy) i w trakcie doświadczeń otrzymywały paszę standardową - LSM i wodę *ad libitum*.

Fenobarbital (PB) podawano szczurom sondą do żołądka w oliwie jadalnej w dawce wynoszącej 98,2 mg/kg m.c. x dzień⁻¹ jednorazowo, 3-krotnie i 14-krotnie. Grupy kontrolne szczurów otrzymywały równoważną objętość oliwy jadalnej.

W badaniach syntezy DNA wszystkie grupy zwierząt otrzymywały drogą dootrzewnowej iniekcji (i.p.) 6[³H]-tymidynę (1,2 MBq/szczura) 1 godz. przed dekapitacją. W odpowiednich punktach czasowych wątroby szczurów badanych i kontrolnych izolowano, przemywano i ważono. Wszystkie czynności wykonywano w temp. 4°C. Prawy płąt wątroby stanowił materiał badawczy.

Synteza DNA

Syntezę DNA mierzono wbudowywaniem się $6[{}^3\text{H}]$ -tymidyny do jądrowego DNA, stosując technikę płynnej scyntylicacji zgodnie z procedurą opisaną we wcześniejszej publikacji [14] i wyrażano w dpm/mg DNA. DNA oznaczano metodą *Burtona* [6].

Metylacja rejonu promotorowego genu p53

Stopień metylacji dinukleotydów CpG w rejonie promotorowym genu p53 określano metodą MSRA (Methylation-Sensitive Restriction Analysis). Powyższa technika polega na wykorzystaniu zdolności metylozależnych endonukleaz restrykcyjnych do rozpoznawania i cięcia sekwencji, w których nie występuje metylacja cytozyny w pozycji piątej (5-MeC). W przypadku metylacji tego nukleotydu we wspomnianej pozycji rozpoznawanej sekwencji, enzymy te nie są zdolne do cięcia DNA.

Wyzolowane z wątroby szczurów genomowe DNA trawiono przy użyciu dwóch enzymów restrykcyjnych: Hin6I i Bsh1236I. Pierwszy z enzymów (Hin6I) rozpoznaje sekwencję 5'-G↓CGC-3', a drugi (Bsh1236I) sekwencję 5'-CG↓CG-3'. Kontrolę pozytywną stanowiło niemetylowane (dam⁻, dcm⁻) DNA faga λ, poddawane trawieniu ww. enzymami, w celu potwierdzenia działania endonukleaz. Otrzymane produkty trawienia stanowiły matryce w reakcji PCR.

Do analizy restrykcyjnej rejonu promotorowego genu p53 (fragment 418bp) wykorzystano startery o sekwencji:

5'-TCTGTTTCAAAAAGCAAAAAGATGAC- 3'(forward)

5'-ATAGCAAGGAAAGTCCCAATGAACTG- 3'(reverse).

Do zaprojektowania powyższych starterów posłużono się sekwencjami DNA dostępnymi w bazie danych na stronie www.ncbi.nlm.nih.gov o nr: M26863 oraz ogólnodostępnym programem FastPCR. Otrzymane produkty PCR wielkości 418bp poddawano analizie w 6% żelu akrylamidowym.

Aktywność metylotransferazy DNA (DNMTs)

Aktywność metylotransferazy DNA (DNMTs) oznaczano metodą *Adamsa* i wsp. [1], z modyfikacjami *Tao* i wsp. [24]. Metoda polega na pomiarze znakowanych $[{}^3\text{H}]$ grup metylowych, których donorem jest $[{}^3\text{H}$ -methyl] SAM, przenoszonych do deoksycytydyny w poly(dI-dC)-poly(dI-dC). Aktywność DNMTs wyrażano w cpm/μg białka. Białko oznaczano stosując gotowy zestaw do oznaczania białka, firmy Bio-Rad. Szczegółowy opis stosowanej metody przedstawiono we wcześniejszej publikacji [13].

Analiza statystyczna

Wyniki z zakresu syntezy DNA, aktywności DNMTs i RLW przedstawiono jako średnie wyniki z 5 zwierząt ± SEM stosując test t-*Studenta*. Częstość występowania zmian metylacji w rejonach promotorowych badanego genu w odniesieniu do kontroli oceniano stosując test Fischera. Przyjęte kryterium znamienności, $p < 0,05$.

WYNIKI

Badany związek nie wpływał na masę ciała zwierząt oraz na spożycie paszy i wody. W tabeli I przedstawiono wyniki z zakresu wpływu PB na masę wątroby, wyrażoną jako względny przyrost masy wątroby (RLW).

Tabela I. Wpływ fenobarbitalu (PB) na względną masę wątroby (RLW) szczurów otrzymujących związek w dawce 92,8 mg/kg m.c. x dzień⁻¹ jednorazowo, przez 3 i 14 dni
The effect of phenobarbital (PB) on relative liver weight (RLW) of rats received compound for 1, 3 or 14 days at a dose of 92,8 mg /kg b.w. x day⁻¹

Liczba dawek	RLW; g / 100 g m.c.	
	PB	Kontrola
1	4,68±0,18	4,38±0,22
3	5,88±0,51 *	4,29±0,26
14	5,38±0,38 *	3,94±0,29

Wartości średnie ± SEM z 5 zwierząt; różnice statystycznie istotne w stosunku do kontroli (*) p< 0,05. Results are mean ± SEM for groups of five animals; values significantly different from control (*) p< 0,05.

Jednorazowe podawanie PB nie wywoływało zmian w RLW. Względna masa wątroby (RLW) wzrastała po wielokrotnym podawaniu szczurom związku. Narażenie zwierząt na 3 i 14 dawek PB, powodowało wzrost względnej masy wątroby odpowiednio o 30% i 38% w porównaniu do kontroli.

Wyniki badań wpływu PB na syntezę DNA (faza-S) przedstawiono w tabeli II. Związek stymulował syntezę DNA już po jednorazowym podawaniu związku. Wykazano 2,5-krotny wzrost syntezy w grupie zwierząt badanych w porównaniu do grupy zwierząt kontrolnych. Przy przedłużonym oddziaływaniu PB (3 dawki), odnotowano nieznaczny, dalszy wzrost syntezy DNA, która 2,7-krotnie przewyższała wartości uzyskiwane w grupie zwierząt kontrolnych. Dalsze kontynuowanie narażenia zwierząt (14 dawek) na PB nie wywoływało zmian w syntezie DNA i jej poziom był porównywalny z wyznaczonym dla grupy zwierząt kontrolnych.

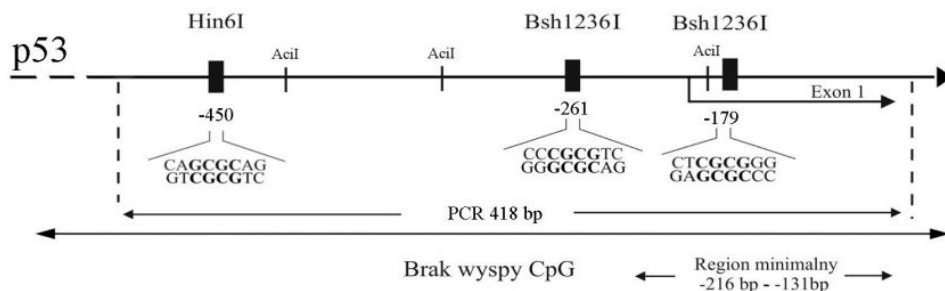
Tabela II. Wpływ fenobarbitalu (PB) na ilość wbudowanej [³H] tymidyny do jądrowego DNA (synteza DNA) wątroby szczurów narażonych na PB w dawce 92,8 mg/kg m.c. x dzień⁻¹, przez 1, 3 i 14 dni
The effect of fenobarbital (PB) on the rate of [³H] thymidine utilization for liver DNA synthesis in rats following PB administration for 1, 3 and 14 days at the dose of 92,8 mg/kg b.w. x day⁻¹

Liczba dawek	Ilość wbudowanej [³ H] tymidyny do jądrowego DNA; dpm/mg DNA	
	PB	Kontrola
1	10153±3076 *	4049±914
3	12509±4096 *	4916±996
14	3122±1040	3188±369

Wartości średnie ± SEM z 5 zwierząt; różnice statystycznie istotne w stosunku do kontroli (*) p<0,05. Results are mean ± SEM for groups of five animals; values significantly different from control (*) p< 0,05.

Zastosowana metoda (MSRA) do oceny zmian metylacji rejonów promotorowych genów sprowadza się do wykorzystania metylowrażliwych enzymów restrykcyjnych, które tną wy-

łącznie niezmetylowane fragmenty DNA. Schemat rejonu promotorowego genu *p53* przedstawiono na ryc. 1.



Ryc. 1 Schemat rejonu promotorowego genu *p53*.
Scheme of the *p53* gene promoter region

Charakterystyczną cechą rejonu promotorowego genu *p53* [20] jest brak wyspy CpG, jak również miejsca TATA BOX. W obrębie badanej sekwencji genu *p53* zlokalizowane są dwa miejsca rozpoznawane przez endonukleazę Bsh1236I (-261bp i -179bp) oraz jedno miejsce rozpoznawane przez Hin6I w pozycji -450bp. W obrębie tych sekwencji następuje przyłączenie czynników transkrypcyjnych.

Analiza restrykcyjna DNA izolowanego z wątroby 4 szczurów narażonych na PB w dawce 98,2 mg/kg m.c. x dzień⁻¹ przeprowadzana była w dwóch niezależnych powtórzeniach, a każda poddana analizie restrykcyjnej próba DNA była następnie użyta do dwóch niezależnych reakcji PCR. Identyczny schemat zastosowano dla DNA izolowanego z wątroby szczu-

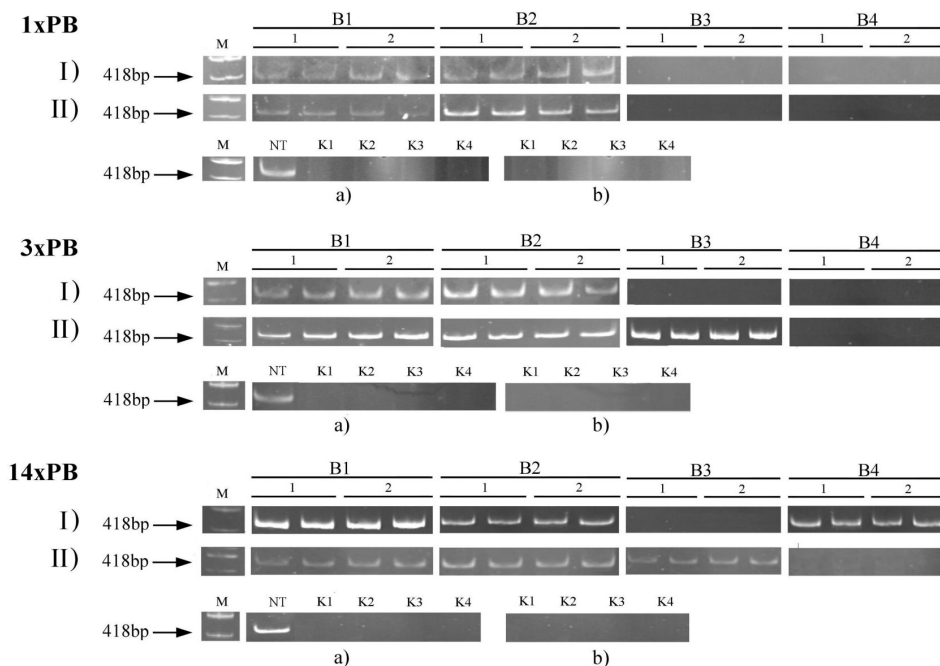
Tabela III. Sumaryczne wyniki trawienia metylowrażliwymi endonukleazami Bsh1236I i Hin6I DNA izolowanego z wątroby szczurów narażonych na PB w dawce 92,8 mg/kg b.w. x dzień⁻¹, przez 1, 3 i 14 dni
Summary of methylation-sensitive digestion with Bsh1236I and Hin6I of DNA isolated from the liver of rats treatment with phenobarbital (PB) for 1, 3 or 14 days

Grupa szczurów		Liczba dawek		
		1	3	14
PB	(Bsh1236I)	8/16**	8/16**	12/16**
Kontrola		0/8	0/8	0/8
p*		<0,05	<0,05	<0,05
PB	(Hin6I)	8/16**	12/16**	12/16**
Kontrola		0/8	0/8	0/8
p*		<0,05	<0,05	<0,05

Objaśnienie:

** Stosunek liczby prób DNA w których badane sekwencje były metylowane do ogólnej liczby analizowanych prób DNA; Ogólna liczba prób DNA (16) stanowiła 100%; Różnice statystycznie istotne w stosunku do kontroli, * p < 0,05. ** The proportion of DNA samples in which investigated sequences of *p53* gene were methylated to the number of DNA sample analyzed. The total number (16) of DNA samples was taken as 100%; Values significantly different from control, * p < 0,05.

rów kontrolnych. Przeprowadzona analiza restrykcyjna z wykorzystaniem endonukleazy restrykcyjnej Bsh1236I i Hin6I wykazała, że związek wywoływał wzrost poziomu metylacji rejonu promotorowego genu *p53* (Tabela III). Obecność zmetylowanej cytozyny (5-MeC), w sekwencji rozpoznawanej przez enzym Bsh1236I, wykazano w 8 spośród 16 badanych prób DNA (50%), zarówno po 1 jak i 3 dawkach PB. Dalsze kontynuowanie narażenia zwierząt na PB (14 dawek) zwiększało częstość metylacji w sekwencji rozpoznawanej przez enzym Bsh1236I. Metylację cytozyny (5-MeC) odnotowano w 12 próbach DNA spośród 16



Ryc. 2 Reprezentatywne żele przedstawiające wpływ fenobarbitalu (PB) na poziom metylacji rejonu promotorowego genu *p53* w wątrobie szczurów.

Representative gels showing effect of phenobarbital (PB) on the methylation of the *p53* promoter region in rat liver.

Objaśnienie:

Genomowe DNA trawiono enzymami restrykcyjnymi: Bsh1236I (I) albo Hin6I (II). Obecność produktu 418bp dla prób DNA izolowanego z wątroby szczurów narażonych na PB (B1-B4), w dwóch powtórzeniach (1 i 2) odzwierciedla wzrost metylacji rejonu promotorowego genu *p53*.

K1-K4; DNA izolowane z wątroby szczurów kontrolnych.

NT – DNA nie trawione

M – marker wielkości

Genomic DNA was restricted with Bsh1236I (I) or Hin6I (II). The present of the 418bp product for DNA isolated from the livers of rats administered with PB (B1-B4), in two independent repetitions, represented the increase of methylation of the *p53* gene promoter region.

K1-K4; DNA isolated from the liver of control rats

NT – not digested DNA

M - size of marker

badanych (75%). Analiza tych samych prób DNA z wykorzystaniem endonukleazy Hin6I wykazała również obecność zmetylowanej cytozyny w pozycji -450bp; w 8 próbach DNA na 16 (50%) po 1 dawce związku i w 12 spośród 16 analizowanych prób DNA, zarówno po 3 i 14 dawkach PB (75%).

We wszystkich próbach DNA izolowanego z wątroby zwierząt kontrolnych nie otrzymano produktu PCR (418bp), co świadczyło o braku metylacji cytozyny w badanych sekwencjach.

Reprezentatywne wyniki dla przeprowadzonych badań, odzwierciedlające zmiany poziomu metylacji w czasie, jako funkcji liczby dawek PB, na które narażone były zwierzęta przedstawia rycina 2.

Po 1 dawce PB dla czterech niezależnych prób DNA (B1-B4) traktowanych endonukleazą Bsh1236I (I), produkt wielkości 418bp otrzymano w dwóch próbach (B1 i B2). Wynik był potwierdzony w 2 niezależnie przeprowadzonych trawieniach (1, 2). Identyczne wyniki uzyskano przy trawieniu prób enzymem Hin6I (II). W żadnej z prób DNA szczurów kontrolnych (K1-K4) nie otrzymano produktu 418bp; wewnętrzna cytozyna w badanych sekwencjach nie była metylowana. Ze względu na brak prążka 418bp we wszystkich powtórzeniach, wyniki dla każdej próby DNA zwierząt kontrolnych zilustrowano tylko dla jednej reakcji PCR.

Po 3 dawkach związku, produkt 418bp otrzymano w dwóch niezależnych próbach, po trawieniu DNA enzymem Bsh1236I (I) i w trzech próbach po trawieniu DNA Hin6I (II). Przy dalszym kontynuowaniu narażenia zwierząt (14 dawek), spośród 4 niezależnych prób DNA, które trawione były Bsh1236I (I) lub Hin6I (II), w trzech otrzymano produkt 418bp (odpowiednio B1, B2, B4 i B1, B2, B3).

Badany związek stymulował przejściowy wzrost aktywności DNMTs (Tabela IV). Po jednorazowym i 3-krotnym podawaniu zwierzętom PB w odstępach dobowych dawki wynoszącej 92,8 mg/kg m.c x dzień⁻¹, aktywność DNMTs przewyższała odpowiednio o 40 i 52% wartości uzyskiwane w grupie zwierząt kontrolnych. Kontynuowanie narażenia zwierząt na PB (14 dawek), nie wywoływało statystycznie istotnych zmian w aktywności DNMTs w odniesieniu do kontroli.

Tabela IV. Wpływ fenobarbitalu (PB) na aktywność metylotransferazy DNA (DNMTs) w wątrobie szczurów narażonych na PB w dawce 92,8 mg/kg m.c. x dzień⁻¹ przez 1, 3 i 14 dni
The effect of phenobarbital (PB) on DNA methyltransferase (DNMTs) activity in liver of rats administered PB for 1, 3 and 14 days at the dose of 92,8 mg/kg b.w. x day⁻¹

Liczba dawek	Aktywność DNMTs; cpm/μg białk	
	PB	Kontrola
1	43,41±5,33 *	31,07±1,72
3	44,63±1,77 *	29,29±1,00
14	32,08±0,77	30,79±2,14

Wartości średnie ± SEM z 5 zwierząt; różnice statystycznie istotne w stosunku do kontroli (*) p< 0,05. Results are mean ± SEM for groups of five animals; values significantly different from control (*) p< 0,05.

DYSKUSJA

Mechanizmy działania niegenotoksycznych kancerogenów (NGCs) są bardzo zróżnicowane i wszechstronne [21, 22]. Ta różnorodność mechanizmów działania, które nie są całko-

wicie wyjaśnione, stwarza szereg problemów związanych zarówno z wczesną identyfikacją NGCs, jak i oceną ryzyka wynikającego z oddziaływania tej kategorii czynników rakotwórczych. Z drugiej strony, wiedza na temat NGCs jest już na tyle obszerna, że pozwala przynajmniej częściowo zdefiniować wczesne zmiany w docelowych tkankach wywołwane ich oddziaływaniem. Należą do nich między innymi, powiększenie docelowych narządów, hamowanie komunikacji międzykomórkowej, stymulacja syntezy DNA i proliferacji komórkowej, indukowanie i/lub hamowanie aktywności określonych układów enzymatycznych, hamowanie apoptozy [12, 22].

Wyniki dostępnych badań przeprowadzonych w warunkach *in vivo* wskazują, że szereg związków zaliczanych do NGCs powoduje hipometylację i/lub hipermetylację rejonów promotorowych genów biorących udział w regulacji cyklu komórkowego i apoptozy [2, 18, 23]. Zmiany metylacji genów zaangażowanych ww. procesy, definiowane jako hipermetylacja (zwiększenie poziomu metylacji) lub hipometylacja (obniżenie poziomu metylacji) prowadzić mogą do zmiany ich funkcji i ekspresji.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że PB wywoływał wzrost poziomu metylacji rejonu promotorowego genu *p53*, w pozycji -450bp oraz w pozycji -261 i -179bp, który utrzymywał się przez cały okres doświadczalny. Wykazana hipermetylacja oznacza metylację cytozyny w uprzednio niemetylowanych sekwencjach. Można, więc sugerować, że PB stymulował metylację *de novo*. Jednocześnie stwierdzono, że PB indukował przejściowy wzrost syntezy DNA, który poprzedzał wzrost masy wątroby (RLW). PB stymulował również indukcję aktywności DNMTs, która ograniczona była, podobnie jak synteza DNA, tylko do pierwszych dni podawania zwierzętom związku (po 1 i 3 dawkach PB).

Wykazany w badaniach wzrost aktywności DNMTs, dotyczyć może różnych izoform metylotransferazy DNA. Za zachowanie prawidłowego wzoru metylacji w okresie kolejnych rund replikacji DNA, poprzedzających podziały komórkowe odpowiedzialna jest DNMT1 [2]. Jednakże, metylacja regulowana jest również przez metylotransferazy *de novo* (DNMT3a i 3b) i demetylazy [2, 7, 10].

Wykazany wzrost metylacji genu *p53* po 14 dawkach związku, przy jednoczesnym braku replikacyjnej syntezy DNA i braku stymulacji aktywności DNMTs, sugerować może udział w hipermetylacji genu mechanizmów nie związanych z aktywnością DNMTs.

DNMT1 jest niezbędna dla replikacji DNA i jej synteza jest indukowana przy wejściu komórek w fazę S [15, 16]. Jeżeli więc prawdą jest, że wzrost aktywności DNMT1 skorelowany jest z replikacją DNA, wówczas w nie proliferujących komórkach (brak stymulacji syntezy DNA), zaburzenia aktywności demetylaz i *de novo* metylaz (DNMT3a i 3b) indukować mogą hipo- i hipermetylację.

W naszych wcześniejszych badaniach [13] przeprowadzonych w identycznych warunkach doświadczalnych wykazano, że PB stymulował wzrost metylacji genu *p16*. Jednak w przeciwieństwie do aktualnie prezentowanych wyników, hipermetylacja genu *p16* miała charakter odwracalny i korelowała z aktywnością DNMTs i synteżą DNA.

WNIOSKI

1. Wczesną odpowiedzią docelowego narządu dla działania PB, jakim jest wątroba była stymulacja syntezy DNA, która poprzedzała wzrost masy wątroby.

2. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że PB indukował metylację *de novo* w analizowanych sekwencjach rejonu promotorowego genu *p53*.
3. Indukowane PB zmiany metylacji genu *p53*, prawdopodobnie nie były związane z aktywnością DNMTs.

G. Kostka, K. Urbanek-Olejnik, B. Wiadrowska, R. Bańkowski

INDUKOWANA FENOBARBITALEM HIPERMETYLACJA REJONU PROMOTOROWEGO
GENU *P53* W WĄTROBIE SZCZURÓW SZCZEPU *WISTAR*

STRESZCZENIE

Indukowane niegenotoksycznymi kancerogenami (NGCs) zmiany metylacji DNA rozpatrywane są jako mechanizm ich toksycznego, w tym rakotwórczego działania. Zbadano wpływ fenobarbitalu (PB), na poziom metylacji regionu promotorowego genu *p53* w wątrobie szczurów szczepu *Wistar*. Zmiany metylacji genu *p53* korelowano z syntezą DNA, aktywnością metylotransferaz DNA (DNMTs) oraz z masą wątroby. Samce szczurów szczepu *Wistar* otrzymywały PB w dawce wynoszącej 98,2 mg/kg m.c. x dzień⁻¹ jednorazowo, 3-krotnie i 14-krotnie. Wykazano, że PB wywoływał hipermetylację w badanych sekwencjach rejonu promotorowego genu *p53*. Indukowana PB hipermetylacja genu występowała w przebiegu całego okresu doświadczalnego. Stymulację syntezy DNA, która poprzedzała wzrost masy wątroby oraz indukcję DNMTs, wykazano tylko po 1 i 3 dawkach związku. Kontynuowanie narażenia zwierząt na PB (14 dawek) nie wywoływało zmian w syntezie DNA i aktywności DNMTs w porównaniu do kontroli. Przypuszcza się, że indukowana PB *de novo* metylacja rejonu promotorowego genu *p53*, nie była związana z aktywnością DNMTs.

G. Kostka, K. Urbanek-Olejnik, B. Wiadrowska, R. Bańkowski

PHENOBARBITAL-INDUCED HYPERMETHYLATION OF THE *P53* PROMOTER REGION IN
THE LIVER OF *WISTAR* RATS

SUMMARY

Non-genotoxic carcinogens (NGCs)-induced changes of DNA methylation has been proposed as a mechanism of their toxicity, including carcinogenic action. The effect of phenobarbital (PB), a rodent liver carcinogen on the methylation level of the *p53* promoter region in rat liver was studied. Changes in the methylation status of the *p53* gene were correlated with changes in DNA synthesis, DNA methyltransferase (DNMTs) activity and liver weight. Male *Wistar* rats received PB in one, three or fourteen daily oral doses of 92.8 mg/kg b.w. x day⁻¹. We have demonstrated that PB increased the methylation of the *p53* gene. Cytosine hypermethylation in the analyzed CpG sites of the *p53* gene promoter occurred during the whole period of study. However, an increase in DNA synthesis was only observed after 1 and 3 days of treatment with PB and it preceded liver growth. Treatment of rats with PB for 1 and 3 days also produced an increase in nuclear DNMTs activity. After prolonged administration (14 days), no changes in DNMTs activity nor DNA synthesis were observed. It is proposed that PB-induced *de novo* methylation of the *p53* gene was not associated with DNMTs activity.

PIŚMIENNICTWO

1. Adams R.L.P., Rinaldi A. and Seivwright C.: Microassay for DNA methyltransferase. *J.Biochem. Biophys. Methods* 1991, 22, 19-22.
2. Bachman A.N., Phillips J.M., Goodman J.I.: Phenobarbital induces progressive patterns of GC-rich and gene-specific altered DNA methylation in the liver of tumor-prone B6C3F1 mice. *Toxicol. Sci.* 2006, 91, 393-405.
3. Ballestar E. and Esteller M.: The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing. *Carcinogenesis* 2002, 23, 1103-1109.
4. Belinsky S.A.: Silencing of genes by promoter hypermethylation: key event in rodent and human lung cancer. *Carcinogenesis* 2005, 26, 1481-1487.
5. Bombail V., Moggs J.G., Orphanides G.: Perturbation of epigenetic status by toxicants. *Toxicol. Lett.* 2004, 149, 51-58.
6. Burton K.A.: A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 1956, 62, 315-323.
7. Fatemi H., Hermann A., Gowher H., Jeltsch A.: Dnmt 3a and Dnmt 1 functionally cooperate during *de novo* methylation of DNA. *Europ. J. Biochem.* 2002, 269, 4981-4984.
8. Goodman J.I. and Watson R.F.: Altered DNA methylation: A secondary mechanism involved in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2002, 42, 501-525.
9. Grasl-Kraupp B., Luebeck G., Wagner A., Löw-Baselli A., de Gunst M., Waldhör T., Moolgavkar S., Schulte-Hermann R.: Quantitative analysis of tumor initiation in rat liver: role of cell replication and cell death (apoptosis). *Carcinogenesis* 2000, 21, 1411-1421.
10. Hsieh C.L.: The *de novo* methylation activity of Dnmt 3a is distinctly different than that of Dnmt 1. *BMC Biochem.*, 2005, 6, 1-12.
11. IARC: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: some thyrotropic agents, 2001, 79, 161-289.
12. Kolaja K.L., Engelken D.S.T. and Klaassen C.D.: Inhibition of gap-junctional communication in intact rat liver by nongenotoxic hepatocarcinogens. *Toxicology* 2000, 146, 15-22.
13. Kostka G., Urbanek K., Ludwicki J.K.: The effect of phenobarbital on the methylation level of the *p16* promoter region in rat liver. *Toxicology* 2007, 239, 127-135.
14. Kostka G., Kopeć-Szłęzak J., Palut D.: Early hepatic changes induced by nuarimol in rats. *J. Appl. Toxicol.* 1994, 14, 337-342.
15. Knox J.D., Araujos F.D., Bigeyt P., Slack A.D., Price G.B., Zannis-Hadjopoulos M., and Szyf M.: Inhibition of DNA methyltransferase inhibits DNA replication. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 17986-17990.
16. Liang G., Chan M.F., Tomigahana Y., Tsai Y.C., Gonzales F.A., Li E., Laird P.W., Jones P.A.: Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of replicative elements. *Mol. Cell Biol.* 2002, 22, 480-491.
17. Novik K.L., Nimrich I., Genc B., Maier S., Piepenbrock C., Olek A., Beck S.: Epigenomics: Genome-Wide study of methylation phenomena. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2002, 4, 111-128.
18. Pereira M.A., Wang W., Kramer P.M. and Tao L.: Prevention by methionine of dichloroacetic acid-induced liver cancer and DNA hypomethylation in mice. *Toxicol. Sci.* 2004, 77, 243-248.
19. Plant N.J., Horley N.J., Dickins M., Hasmall S., Elcombe C.R., Bell D.R.: The coordinate regulation of DNA synthesis and suppression of apoptosis is differentially regulated by the liver growth agents, phenobarbital and methylclofenapate. *Carcinogenesis* 1998, 19, 1521-1527.
20. Pogribny I.P., Pogribna M., Christian J.K., James S.J.: Single-site methylation within the p53 promoter region reduces gene expression in a reporter gene construct: possible *in vivo* relevance during tumorigenesis. *Cancer Res.* 2000, 60, 588-594.

21. Roberts R.A., Michel C., Coyle B., Freathy C., Cain K., Boitier E.: Regulation of apoptosis by peroxisome proliferators. *Toxicol. Lett.* 2004, 149, 37-41.
22. Schulte-Hermann R., Bursch W., Marian B., Grasl-Kraupp B.: Active cell death (apoptosis) and cellular proliferation as indicators of exposure to carcinogens. *IARC Sci. Publ.*, Lyon, 1999, 146, 273-285.
23. Tao L., Wang W., Li L., Krammer P.M. and Pereira M.A.: Effect of dibromoacetic acid on DNA methylation, glycogen accumulation and peroxisome proliferation in mouse and rat liver. *Toxicol. Sci.* 2004, 82, 62-69.
24. Tao L., Yang S., Xie M., Kramer M.P., Pereira M.A.: Hypomethylation and overexpression of *c-jun* and *c-myc* protooncogenes and increased DNA methyltransferase activity in dichloroacetic and trichloroacetic acid-promoted mouse liver tumors. *Cancer Lett.* 2000, 158, 185-193.
25. Weinstein I.B.: Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis. *Carcinogenesis* 2000, 21, 857-864.

Otrzymano: 15.04.2008 r.

Akceptowano: 13.06.2008 r.

