

# Úloha cholínu pri udržiavaní funkcie pečene: nový dôkaz epigenetických mechanizmov

## Abstrakt

*Skúmanie:* U ľudí, ktorí jedia stravu s nízkym obsahom cholínu, sa vyvinie stukovatenie pečene a poškodenie pečene. U hlodavcov kŕmených stravou s deficitom cholínu a metionínu sa nielenže stukovatí pečeň, ale vyvíja sa aj fibróza a hepatokarcinóm. Tento prehľad sa zameriava na úlohu cholínu vo funkcii pečene s osobitným dôrazom na epigenetické mechanizmy účinku.

Diétny príjem darcov metylu, ako je cholín, ovplyvňuje metyláciu DNA a histónov, čím mení epigenetickú reguláciu génovej expresie. Pečeň je hlavným orgánom, v ktorom dochádza k metylačným reakciám, a mnohé z pečenejých génov zapojených do dráh rozvoja stukovatenia pečene, hepatálnej fibrózy a hepatokarcinómov sú epigeneticky regulované.

## Zhrnutie

Príjem cholínu v strave sa mení v trojnásobnom rozsahu a mnohí ľudia majú genetické polymorfizmy, ktoré zvyšujú ich dopyt po cholíne. Cholín je dôležitým donorom metylu potrebným na tvorbu *S*-adenosylmetionínu. Diétny príjem cholínu je dôležitým modifikátorom epigenetických znakov na DNA a histónoch, a tým moduluje génovú expresiu v mnohých dráhach zapojených do funkcie a dysfunkcie pečene.

## Úvod

Ľudia musia jesť stravu obsahujúcu cholín, pretože jeho metabolit fosfatidylcholín tvorí 40–50 % bunkových membrán a 70–95 % fosfolipidov v lipoproteínoch, žlči a povrchovo aktívnych látkach; je potrebný na tvorbu acetylcholínu, dôležitého neurotransmiteru; jeho metabolit betaín je potrebný pre normálnu glomerulárnu funkciu obličiek a možno aj pre mitochondriálnu funkciu; a poskytuje jednouhlíkové jednotky prostredníctvom oxidácie na betaín metionínovému cyklu na metylačné reakcie.

Existuje odporúčaný primeraný príjem cholínu (asi 550 mg/deň) ale príjem cholínu v strave sa odhaduje až trojnásobne – najnižší kvartil a najvyšší kvartil príjmu boli približne 150 mg a 500 mg/deň ekvivalentov cholínu, v tomto poradí, v štúdií Framingham Offspring Study, v štúdií Atherosclerosis Risk In Communities a v štúdií Nurse's Health Study. Príjem cholínu bude pravdepodobne nižší v krajinách s nízkymi príjmami. Pacienti kŕmení roztokmi totálnej parenterálnej výživy (TPN) dostávajú len malé množstvá cholínu (z lipidových emulzií) a mnohí z nich majú cholínový deficit.

## Cholín a funkcia pečene

Veľká časť metabolizmu cholínu prebieha v pečeni a tá patrí medzi prvé orgány, ktoré akumulujú cholín absorbovaný z čreva. Keď ľudia jedia stravu s nízkym obsahom cholínu, stukovatenie pečene je jednou z prvých nežiaducich udalostí a u niektorých ľudí dochádza k významnému poškodeniu pečene (hodnotené uvoľňovaním pečenej enzýmov do krvi). Ľudia s jedným z niekoľkých veľmi častých genetických polymorfizmov (SNP) v génoch metabolizmu cholínu majú väčšiu pravdepodobnosť vzniku hepatálnej dysfunkcie, keď im chýba cholín a títo ľudia majú abnormálne plazmatické metabolické profily, aj keď sú kŕmené normálnou stravou obsahujúcou cholín. U pacientov kŕmených roztokmi TPN sa často rozvinie dysfunkcia pečene a u niektorých sa to vyrieši, keď dostanú zdroj cholínu. Nevieme, či pacienti, ktorí sú citliví na poškodenie pečene spojené s TPN, sú tí, ktorí majú SNP v génoch metabolizmu cholínu.

Hlodavcom sa tiež stukovatí pečeň, keď sú kŕmené diétami s nízkym obsahom cholínu a metionínu a tento zvierací model sa bežne používa na štúdium nealkoholického stukovatenia pečene (NAFLD), ktoré postihuje 20 % svetovej populácie, 50 % diabetikov. pacientov a 90 % morbidne obéznych ľudí. Pravdepodobný mechanizmus zodpovedný za rozvoj stukovatenia pečene pri deficite cholínu súvisí so syntézou lipoproteínu s veľmi nízkou hustotou (VLDL), čo je primárny balík, v rámci ktorého sa z pečene vylučujú triglyceridy. Fosfatidylcholín je nevyhnutnou súčasťou obalu VLDL, a keď nie je dostupný, triglyceridy nemôžu byť exportované z pečene, a preto sa hromadia v cytosóle. Fosfatidylcholín vzniká v pečeni metyláciou fosfatidyletanolamínu alebo inkorporáciou vopred pripraveného cholínu (zvyčajne zo stravy). U premenopauzálnych žien je menej pravdepodobné, že sa pri nízkocholesterolovej diéte vyvinie stukovatenie pečene, pretože estrogén indukuje pečenej gén (*PEMT*), ktorý je zodpovedný za *de novo* tvorbu fosfatidylcholínu. U viac ako 20 % premenopauzálnych žien SNP v *PEMT* spôsobuje, že menej reagujú na estrogénovú indukciu tohto génu a musia jesť cholín, aby zabránili vzniku stukovatenia pečene.

U ľudí NAFLD niekedy progreduje do poškodenia pečene a hepatokarcinómu a model hlodavcov s deficitom cholínu a metionínu nám môže pomôcť pochopiť základné dôvody tejto progresie. U potkanov a myši kŕmených stravou s nízkym obsahom cholínu-metionínu sa najskôr vyvinie stukovatenie pečene, potom sa pečeň stane fibrotizovanou, po čom nasleduje vývoj ložísk enzýmovo zmenených hepatocytov, ktoré exprimujú  $\gamma$ -glutamyltranspeptidázu [19] a placentárnu formu glutatiónu S-transferáza podobná tým prekanceróznym bunkám vyvolaným chemickými karcinogénmi. Nakoniec sa u týchto zvierat vyvinú adenómy a hepatocelulárne karcinómy. Pridanie cholínu do tejto nedostatočnej stravy úplne zabraňuje rozvoju rakoviny u pokusných zvierat, čo naznačuje, že cholín samotný má dôležitú úlohu. Je zaujímavé, že hepatocyty v bunkovej kultúre, ktoré sa pomaly presúvajú do rastových médií s nízkou koncentráciou cholínu, sa tiež transformujú na bunky hepatokarcinómu. To naznačuje, že základné mechanizmy pre túto odpoveď na nízku hladinu cholínu sú vlastné hepatocytom. Nedostatok cholínu a metionínu tiež zvyšuje citlivosť hlodavcov na karcinogény pečene, ako je aflatoxín B1. Napríklad dávka aflatoxínu B1 potrebná na vyvolanie hepatokarcinómov bola značne znížená u potkanov kŕmených diétou s nízkym obsahom cholínu a metionínu. Nedostatok cholínu a metionínu teda pôsobí ako iniciátor a promótor karcinogenézy.

## ÚLOHA ŽIVIN DOROV METYLU (METIONÍN, CHOLÍN A FOLÁT) PRI UDRŽANÍ METYLAČNEJ KAPACITY

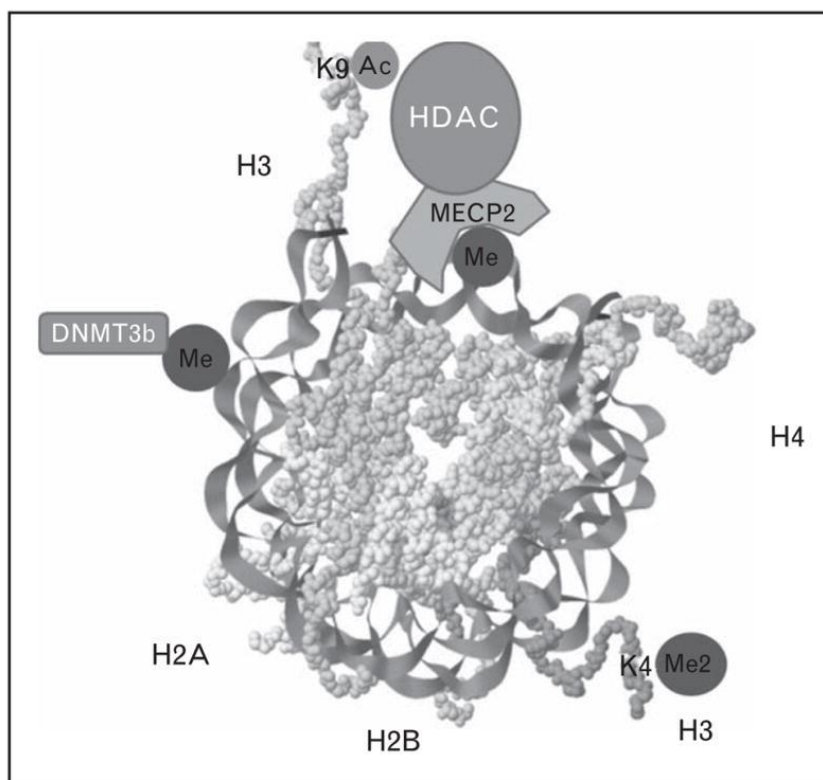
Po použití *S*-adenosylmetionínu (SAM) na metyláciu substrátu sa vytvorí *S*-adenosylhomocysteín a potom homocysteín. Na regeneráciu metionínu musí byť homocysteín (ktorý je toxický pre bunky) metylovaný a výsledný metionín sa potom môže premeniť na SAM. Tento metionínový cyklus v pečeni využíva metylové skupiny z metyl-tetrahydrofolátu alebo z betaínu na premenu homocysteínu na metionín. Cholín je prekursorom tvorby betaínu, a teda aj mnohých metylových skupín darovaných homocysteínu prostredníctvom enzýmu betaín homocysteín metyltransferáza (BHMT). BHMT spracováva významnú časť bunkového homocysteínu, pretože *Bhmt* knockout myši sa stávajú hyperhomocysteinemickými dokonca aj pri adekvátnom prísune dietetického metyl-tetrahydrofolátu.

Ako bude diskutované neskôr, metylácia DNA a histónov predstavuje dôležitý mechanizmus modulácie génovej expresie nazývanej epigenetická regulácia. Nie je prekvapujúce, že zmeny v dodávke alebo využití cholínu v potrave formujú epigenóm.

Bolo preskúmaných niekoľko potenciálnych mechanizmov, ktorými diéty s nízkym obsahom cholínu a metionínu vedú k hepatokarcinogéze. Tieto zahŕňajú nekrozu pečene s následnou regeneráciou; indukcia oxidačného poškodenia DNA a peroxidácie lipidov v dôsledku úniku voľných radikálov z mitochondrií s následnou oxidáciou báz DNA, ktorá vedie k zárezom a deléciám počas opravy báz; zmenená signalizácia proteinkinázy C v dôsledku akumulácie diacylglycerolu; a strata apoptotických odpovedí pečene. Tento prehľad sa zameria na ďalší navrhovaný mechanizmus – zmenu stavu labilných epilokusov vyvolanú diétami bez metylu .

## EPIGENETIKA

Epigenetická regulácia génovej expresie zahŕňa chemickú modifikáciu nukleotidov v DNA na špecifických miestach. DNA zvyčajne nie je v bunkách prítomná v lineárnej forme, ako si ju bežne predstavujeme, ale skôr je DNA pevne ovinutá okolo proteínov (histónov). Pozitívne nabitá DNA je priťahovaná k záporne nabitým histónom, čím sa vytvára kompaktný sférický komplex. Jeden mechanizmus na modifikáciu tejto tesne navinutej štruktúry nastáva, keď sú metylované špecifické cytozínové zvyšky [približne 70 % cytozínových zvyškov susediacich s guaníni (CpG) v génoch je metylovaných, rovnako ako intergénne CpG ostrovy a CpG v transponovateľných elementoch, ktoré sú také bežné v ľudský genóm. Táto CpG metylácia sa dosiahne enzymatickým prenosom metylových skupín zo SAM na cytozín. Keď sú CpG na DNA metylované, priťahujú proteíny viažuce metyl, ktoré potom priťahujú históndeacetylázy. Tieto enzýmy odstraňujú acetylové skupiny na špecifických lyzínových zvyškoch v histónoch a tým zvyšujú negatívny náboj proteínu. Pevný chromatinový komplex tvorený kladne nabitou DNA a záporne nabitými histónmi bráni transkripčným faktorom dostať sa k DNA a aktivovať génovú expresiu. Keď DNA CpG nie sú metylované, interakcia histónu DNA je slabšia, čím sa otvára chromatin a vytvára sa permissívne prostredie pre génovú transkripciu. Jednoducho povedané, metylácia DNA zvyčajne vypne gény.



Štruktúra nukleozómov DNA je pevne zvinutá v opakujúcich sa jednotkách nukleozómov (vykresľovanie zachytené pomocou open-source java appletu j/mol zložených zo 147 párov báz DNA obalených okolo histónového oktaméru vyrobeného z dvoch kópií štyroch jadrových histónov H2a, H2b, H3 a H4. Transkripcia génov je modulovaná tým, ako pevne je chromatín zbalený, a epigenetické značky na histónoch (na špecifických lyzínach, ako sú K9 a K4) a na DNA môžu modifikovať túto chromatínovú štruktúru. Znáznomená je aj de novo metylácia jadrovej nukleozómovej jednotky DNA metyltransferázou 3b (DNMT3b) a mechanizmus deacetylácie histónu komplexom metyl-CpG-väzbového proteínu 2-histón deacetylázy (MECP2-HDAC).

Ako bolo uvedené vyššie, acetylácia histónov je dôležitá pre udržanie štruktúry chromatínu, ale metylácia histónov je tiež dôležitým epigenetickým signálom (mono-metyl a di-metyl lyzín 9 na históne H3), ktorý potláča génovú transkripciu, zatiaľ čo di -metyl a trimetyllyzín 4 na históne H3 sú v oblastiach obohatené o transkripčne aktívny chromatín. Použitím SAM ako donoru metylu je monometyl a dimetyllyzín 9 na históne H3 tvorený histónmetylázou G9a, zatiaľ čo trimetyllyzín 9 na históne H3 je tvorený metylázou SUV39. Mechanizmy metylácie DNA a metylácie histónov vykazujú presluchy, čím sa vytvára posilňujúci signálny systém kontrolujúci génovú expresiu.

Zmeny v epigenóme sú častejšie počas citlivých období vývoja, keď sa progenitorové bunky delia a ešte nie sú diferencované. Počas vývoja prebiehajú hlboké epigenetické transformácie, vrátane metylácie DNA katalyzovanej DNMT3. Po vytvorení si epigenóm udržiava relatívne stabilný stav transkripcie v zreloch somatických bunkách. Počas mitózy je tento vzor metylácie verne kopírovaný do sesterských reťazcov DNA pomocou génov udržiavania a dozrievania chromatínu DNMT1, HDAC1 a SMARCA1. Vybrané lokusy na génoch však vykazujú určitý stupeň epigenetickej plasticity a zostávajú citlivé na hladiny živín neskôr v živote.

Prečo je epigenetická flexibilita dôležitá? Ako v každej inej živej bunke, genetická informácia kódovaná v genóme hepatocytov je fixná, ale epigenetický regulačný mechanizmus je superponovaný, aby sa dosiahla flexibilita pri spracovaní genetickej informácie. Epigenetické znaky určujú, prečo bunky s rovnakým genetickým kódom môžu mať rôzne diferencované fenotypy (somatickú individualitu): hepatocyty exprimujú iné gény ako Kupfferove bunky, hviezdicové bunky, endotelové bunky alebo fibroblasty v pečeni. Epigenetické znaky môžu umožniť metabolickú flexibilitu (prispôsobenie metabolických dráh v reakcii na signály prostredia). Epigeneticky je regulovaných niekoľko génov, ktoré sú ústredné pre metabolizmus v pečeni, vrátane receptora  $\gamma$  aktivovaného peroxizómovým proliferátorom (PPAR $\gamma$ ), proteínu 1-c viažuceho nukleárny sterol (SREBP-1c), alkoholdehydrogenázy, glutatión-S-transferáza, serindehydráza, CYP450 2c11, glukokináza, pyruvátkináza, metabolizmus fosfoenolpyruvátu prostredníctvom regulácie cholesterolu a epigenetická karboxykináza [cholesterol] pečeneového X receptora. Funkcia pečene je teda čiastočne závislá od toho, ako dobre sú vytvorené epigenetické regulačné mechanizmy. Pečeň je zároveň pravdepodobne najdôležitejším orgánom, ktorý kontroluje dostupnosť SAM potrebného na vytvorenie epigenetických znakov.

## **Pečeň – dôležitý orgán riadiaci metyláciu**

Polovica metionínu pochádzajúceho zo stravy sa využíva v pečeni na tvorbu SAM, ktorý je potrebný na metylačné reakcie a viac ako 85 % metylačných reakcií prebieha v pečeni. Je zaujímavé, že kritické gény na kontrolu metabolizmu metylu a kapacity metylácie DNA sú samotné regulované metyláciou. Napríklad *MAT1A* (formy SAM) je nedostatočne exprimovaný, keď je hypermetylovaný a expresia metyltransferáz DNA DNMT1 a DNMT3A je kontrolovaná metyláciou špecifických miest CpG. Expresia *G9a* histónmetylázy je tiež znížená, keď sú CpG na špecifických miestach v géne metylované. Hlodavce kŕmené potravou s nízkym obsahom cholínu a metionínu teda nedostatočne metylujú tieto gény metyltransferázy, a preto nadmerne exprimujú tieto metyltransferázy. To vysvetľuje, prečo sú niektoré gény paradoxne premetylované napriek nedostatku metyl-donorov. Rozptýlené prvky obsahujúce opakujúce sa sekvencie DNA predstavujú 30 % genómu cicavcov a metylačný stav týchto prvkov je modifikovaný dostupnosťou cholínu v potrave u hlodavcov. Ďalší potenciálny mechanizmus modulácie aktivity DNA metyltransferázy v pečeni s nedostatkom metylu je zameraný na mitochondrie. Abnormálne zloženie membrány spôsobuje uvoľňovanie voľných radikálov a oxiduje nukleotidy za vzniku 8-hydroxydeoxyguanozínu, ktorý inhibuje metyláciu cytozínu. Mechanicky akumulácia intracelulárneho tuku, zápal, fibróza a prípadne karcinogenéza sú multifaktoriálne a epigenetické mechanizmy zohrávajú v tomto scenári ústrednú úlohu.

## **Epigenetické mechanizmy zapojené v nealkoholickej tumorigenéze pečene, nealkoholickej steatohepatitíde a progresii k tumorigenéze pečene**

Niektoré z hlavných signálov a mechanizmov zapojených do NAFLD, nealkoholickej steatohepatitídy (NASH) a progresie smerom k karcinogenéze pečene sú signalizácia prostredníctvom cytokínov/chemokínov (TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL - 6, a IL-10), CCL2/MCP1 zacielený na PPAR $\alpha$  (dochádza k zvýšeniu metylácie promotora antifibrotického receptorového proteínu PPAR $\alpha$  v pečeni s deficitom cholínu, CCL5 sa zvyšuje akumuláciou

hepatocelulárnych lipidov a CXCL8/IL-8; zvýšená *de novo* syntéza triglyceridov; znížená syntéza a export VLDL; a znížená oxidácia mastných kyselín s dlhým reťazcom.

Ako už bolo spomenuté vyššie, mnohé z pečenejých génov zapojených do ciest rozvoja stukovatenia pečene sú epigeneticky regulované, vrátane PPARy, SREBP-1c, glukokinázy, pyruvátkinázy, fosfoenolpyruvát karboxylovej kyseliny a enzýmy metabolizmu cholesterolu. Tuková pečeň môže progredovať do poškodenia pečene, ktoré je sprevádzané fibrózou [jazvovité tkanivo syntetizované aktivovanými pečenejými hviezdicovými bunkami (aHSC, tj myofibroblasty)]. Nedávne štúdie vysvetľujú, ako sa zvyšuje fibróza pečene v prostredí s nízkym obsahom metyl-donorov. Nízke hladiny zápalových signálov v kombinácii s epigenetickými mechanizmami normálne udržiavajú hepatické hviezdicové bunky (HSC) v kľude. Signalizácia TGF- $\beta$ 1 sprostredkuje aktiváciu HSC znížením expresie homológu fosfatázy a tenzínu (PTEN), represora fosfatidylinozitol 3,4,5 trifosfátkinázy/serín-treonínkinázy Akt (PI3K/AKT) a extracelulárneho signálu -regulované kinázové (ERK) signálne dráhy. aHSC získavajú nový súbor epigenetických znakov, ktoré kontrolujú génovú expresiu tak, aby sa zachoval aHSC bunkový fenotyp. Po dosiahnutí epigenómu aHSC vedie k zvýšenej expresii *DNMT1* a zvýšeným hladinám MECP2 s náborom modifikátorov histónov. Tieto zmeny stabilizujú chromátin aHSC a udržiavajú nízku expresiu PTEN, čím zabezpečujú progresiu fibrózy. Stručne povedané, proces fibrózy sa iniciuje aktiváciou HSC prostredníctvom cytokínov a rastových faktorov a získa sa nový súbor epigenetických znakov, ktoré si zachovávajú ich nový bunkový fenotyp. Znížená dostupnosť metylových donorov tak môže iniciovať a udržiavať pečenejú fibrózu. Je zaujímavé, že tieto modifikované epigenetické mechanizmy podporujúce opravu pečene sú dedičné. Novšie generácie menej reagujú na fibrózu, pretože generujú znížený počet HSC, zvýšenú expresiu antifibrogénneho PPAR- $\gamma$  a znížený TGF-p. Tieto adaptácie boli epigeneticky prenášané cez mužskú zárodočnú líniu prostredníctvom histónových modifikácií. To môže vysvetliť prítomnosť hypometylovaného PPAR-y u ľudí s miernymi formami fibrózy v prostredí s ťažkým nedostatkom metylu.

Mechanizmy zodpovedné za udalosti iniciujúce nádor alebo progresiu nádoru sú tiež čiastočne epigenetické. Mnohé tumor supresorové gény sú epigeneticky regulované, vrátane génov pre reguláciu bunkového cyklu (p15 a p16), apoptózu (DAPK a APAF-1), bunkovú adhérenciu (CDH1 a CDH3) a opravu DNA (BRCA1 a hMLH). Hepatocelulárne karcinómy majú epigenóm, ktorý je úplne odlišný od normálnych hepatocytov, s nadmernou alebo nedostatočnou metyláciou DNA špecifickou pre gén, zmenenými epigenetickými znakmi histónu a abnormálnou expresiou génov pre metyltransferázy DNA a enzýmy modifikujúce histón. Diéty s nedostatkom metylu, ktoré spôsobili rakovinu pečene, boli spojené s globálnymi a génovo špecifickými epigenetickými zmenami, vrátane hypometylácie *c-myc*, *c-fos* a *c-Ha-ras*. Tieto zmeny vo vzorcoch metylácie cytozínu sa vyskytujú po krátkodobom kŕmení diétami s deficitom cholínu a predtým, ako sa vyvinú hepatokarcinómy, čo naznačuje skôr kauzálnu než následnú úlohu. Zaujímavé je, že myšacie modely, v ktorých bol metylmetabolizmus narušený genetickou manipuláciou, ako sú napríklad myši *Mat1a*<sup>-/-</sup> [v ktorých je metionín adenozytransferáza (tvorí SAM) vymazaná a myši *Bhmt*<sup>-/-</sup> (v ktorých je potrebný BHMT na prenos metylovej skupiny z betaínu na homocysteín, je deletovaný, vzniká steatóza pečene a hepatokarcinómy).

Ďalšie produkty metabolizmu cholínu ovplyvňujú karcinogézu a podieľajú sa na epigenetických mechanizmoch. Kyselina lyzofosfatidová (LPA) prostredníctvom transmembránových receptorov spojených s G-proteínom reguluje bunkovú proliferáciu,

diferenciáciu, morfogenézu a ochranu pred apoptózou. Fosfatidylcholín je prekursorom tvorby LPA. Gény kódujúce receptory pre signál LPA sú regulované epigenetickými mechanizmami. Hlodavce kŕmené stravou s deficitom cholínu a metionínu mali aberantnú metyláciu génu pre LPA1 receptor podobným spôsobom ako metylačné abnormality opísané pri hepatocelulárnych karcinómoch.

## Záver

Pečeň je orgán, kde sú metabolické dráhy cholínu, metylfolátu, metionínu a SAM najaktívnejšie, a je to orgán, v ktorom dochádza k väčšine metylačných reakcií. Pečeň je veľmi citlivá na dostupnosť donorov metylu v strave, vrátane cholínu. Pri nedostatku týchto živín pečeň stuhne, hepatocyty odumierajú, vzniká fibróza a nakoniec sa objavia ložiská karcinómov. K tejto progresii dochádza nielen preto, že tieto živiny sú potrebné na produkciu dôležitých štruktúrnych komponentov (membrán) a signálnych molekúl (napr. LPA a acetylcholínu), ale aj preto, že tieto živiny ovplyvňujú epigenetickú reguláciu génovej expresie.

*Zdroj: Steven H. Zeisel, MD, PhD, UNC-Chapel Hill Nutrition Research Institute, Department of Nutrition, Nutrition Research Institute at Kannapolis, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA, **Choline's role in maintaining liver function: new evidence for epigenetic mechanisms***  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3729018/>