

lic Julia Anchimowicz<sup>1</sup>,

dr Zbigniew Wyzewski<sup>2</sup>,

dr Weronika Zofia Świtlik<sup>1,3</sup>✉

<sup>1</sup>Katedra Biochemii i Mikrobiologii, Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

<sup>2</sup>Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie

<sup>3</sup>Zakład Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

[https://doi.org/10.18388/pb.2023\\_478](https://doi.org/10.18388/pb.2023_478)

✉ autor korespondujący: weronika\_switlik@sggw.edu.pl

**Słowa kluczowe:** epigenetyka, glukozyzolany, izotiocyjanian fenyloetylu, mikroRNA, nowotwory, sulforafan

**Wykaz skrótów:** DIM – 3,3'-diindolilometan (ang. 3,3'-*Diindolylmethane*); DNMT – metylo-transferazy DNA (ang. *DNA methyltransferase*); GLS – glukozyzolany (ang. *glucosinolates*); HAT – acetylotransferazy histonowe (ang. *histone acetyltransferases*); HDAC – deacetylazy histonowe (ang. *histone deacetylase*); I3C – indolo-3-karbinol (ang. *indol-3-carbinol*); NSCLC – niedrobnokomórkowy rak płuca (ang. *non-small cell lung cancer*); PEITC – izotiocyjanian fenyloetylu (ang. *phenylethyl isothiocyanate*); SFN – sulforafan (ang. *Sulforaphane*); TET – enzymy translokacji dziesięć-jedenaście (ang. *ten-eleven translocation enzymes*)

**Podziękowania:** Artykuł powstał podczas realizacji projektu PRELUDIUM 15: 2018/29/N/NZ5/02587 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki. Streszczenie graficzne oraz ryciny powstały przy użyciu programu BioRender.com

## STRESZCZENIE

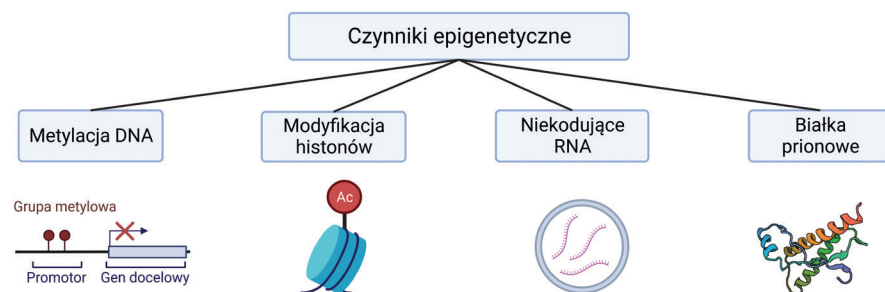
Od lat powszechnie wiadomo, że dieta ma istotny wpływ na ludzkie zdrowie, w tym na ryzyko wystąpienia nowotworów. Właściwy lub nieprzemyślany dobór składników pokarmowych może, odpowiednio, przeciwdziałać lub sprzyjać inicjacji i rozwojowi procesów nowotworowych. Tym samym odpowiednio skomponowana dieta może wydłużyć czas życia oraz poprawić jego jakość. Korzystny wpływ na zdrowie wykazują glukozyzolany (GLS) – grupa wtórnych metabolitów roślinnych występujących w warzywach z rodziny kapustowatych (*Brassicaceae*), takich jak brokuły, kalafior, kapusta i kalarepa. W wyniku hydrolizy GLS powstają m.in. sulforafan (1-izotiocyjaniano-4-(metylosulfinylo)-butan; SFN, ang. *sulforaphane*), izotiocyjanian fenyloetylu (PEITC, ang. *phenylethyl isothiocyanate*) oraz 3,3'-diindolilometan (DIM, ang. 3,3'-*Diindolylmethane*), charakteryzujące się z wszechstronnym działaniem przeciwnowotworowym. W pracy opisano postępy w badaniach wpływu wyselekcjonowanych GLS na wybrane mechanizmy epigenetyczne tj. metylację DNA, acetylację histonów i ekspresję mikroRNA oraz ich znaczenie w terapiach przeciwnowotworowych.

## WSTĘP

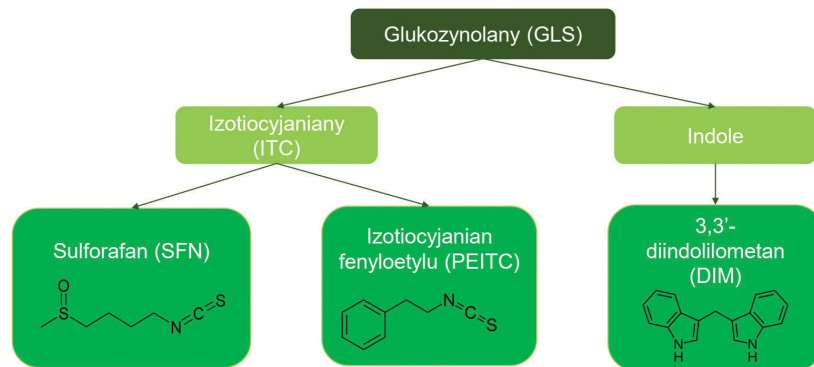
Epigenetyka jest dziedziną nauki zajmującą się zmianami ekspresji genów, mogącymi podlegać dziedziczeniu, jak również wpływom warunków środowiskowych. Są to odwracalne modyfikacje, które skutkują zmianą w ekspresji genów, a równocześnie nie zmieniają sekwencji nukleotydowej DNA [1]. Procesy epigenetyczne obejmują procesy takie jak metylacja DNA, modyfikacje histonów i wpływ niekodujących cząsteczek RNA na ekspresję genów, jak również mniej poznane działanie białek prionowych (Ryc. 1). Zaburzenia w tych procesach mogą prowadzić do inaktywacji supresorów nowotworowych lub aktywacji onkogenów inicjujących nowotworzenie [2-4]. Leki epigenetyczne pozwalają odwrócić te patologiczne procesy [5,6]. Wpływ związków naturalnych na epigenom jest badany pod kątem wzmocnienia przeciwnowotworowej terapii konwencjonalnej, a ich rola w onkomedycynie jest szeroko dyskutowana w literaturze [7-10]. Szczególnym zainteresowaniem badaczy cieszą się produkty hydrolizy glukozyzolanów (GLS), takie jak sulforafan (1-izotiocyjaniano-4-(metylosulfinylo)-butan; SFN, ang. *sulforaphane*), izotiocyjanian fenyloetylu (PEITC, ang. *phenylethyl isothiocyanate*) oraz 3,3'-diindolilometan (DIM, ang. 3,3'-*Diindolylmethane*), z uwagi na ich zdolność do regulacji epigenomu komórek nowotworowych [9,11]. Niniejsza praca przeglądowa opisuje postępy w badaniach nad wpływem wybranych GLS na następujące mechanizmy epigenetyczne: metylację DNA, acetylację histonów oraz ekspresję mikroRNA (miRNA), które mają istotne znaczenie w leczeniu nowotworów.

## GLUKOZYZOLANY

Rośliny syntetyzują glukozyzolany jako anionowe metabolity wtórne, które są rozpuszczalne w wodzie. GLS to liczna grupa związków, które posiadają w swojej strukturze związki siarkowe. Zbudowane są z  $\beta$ -D-glukozy, sulfonowa-



Rycina 1. Czynniki epigenetyczne



Rycina 2. Podział glukozytolanów.

nego oksymu oraz węglowego łańcucha bocznego (pochodzenia aminokwasowego). W wyniku katalizy enzymatycznej z GLS powstają izotiocyaniany (ITC) – jak na przykład SFN i PEITC – lub indole, takie jak DIM [12] (Ryc. 2).

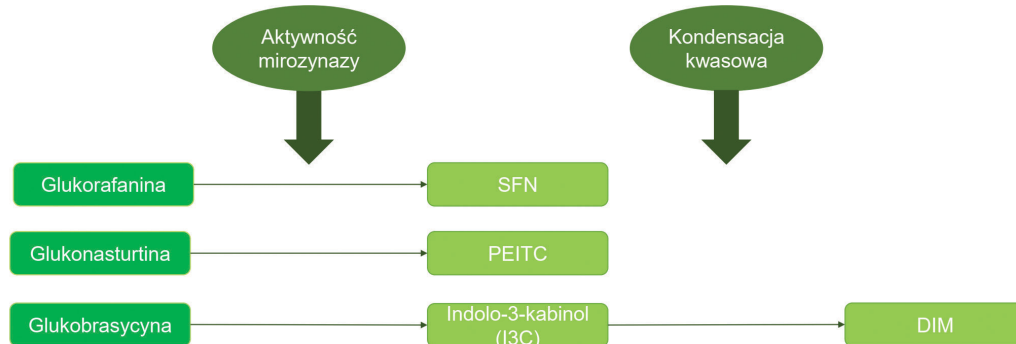
SFN oraz PEITC występują w roślinach jako biologicznie nieaktywne prekursorzy, które dzięki aktywności mirozynazy (glukohydrolazy  $\beta$ -tioglukozydowej, EC 3.2.3.1), wytwarzane są odpowiednio z glukorafaniny i glukonasturtiny [13,14]. Z kolei DIM powstaje w wyniku przekształcenia glukobrasycyny w indolo-3-karbinol (I3C), który następnie ulega kondensacji kwasowej [15] (Ryc. 3). Komórki ssaków nie posiadają ścieżek metabolicznych umożliwiających syntezę mirozynazy. Enzym ten występuje natomiast w tkankach roślinnych i może być wprowadzony do organizmu ludzkiego wraz z pokarmem. Uwalnianie mirozynazy zachodzi w wyniku uszkodzenia tkanek roślinnych podczas procesów technologicznych lub zgniatania i żucia w jamie ustnej. Obróbka termiczna powoduje unieczynnienie tego enzymu, co sprawia, że poddana jej żywność nie stanowi dla ludzi źródła tego aktywnego katalizatora. Natomiast, z uwagi na możliwość syntetyzowania mirozynazy przez niektóre symbiotyczne bakterie jelitowe, możliwe jest powstanie SFN, PEITC i DIM w przewodzie pokarmowym człowieka [16-18].

## METYLACJA DNA

Metylacja DNA katalizowana jest przez enzymy zwane metylotransferazami DNA (DNMT, ang. *DNA methyltransferases*). W reakcji tej grupa metylowa dodawana jest do nukleotydu – cytydynomonofosforanu. Najczęściej ten zmo-

dyfikowany nukleotyd występuje w obrębie wysp CpG. Odwrotnym procesem jest demetylacja DNA, która katalizowana jest przez enzymy translokacji dziesięć-jedenaście (TET, ang. *ten-eleven translocation enzymes*). Równowaga tych dwóch procesów w prawidłowo funkcjonujących komórkach zapewnia odpowiednią ekspresję genów. Wysoki poziom metylacji (hipermetylacja) transkrypcyjnych elementów regulatorowych (np. promotora) skutkuje brakiem ekspresji określonego genu. Jest to związane z powstaniem heterochromatyny, charakteryzującej się bardziej zwartym upakowaniem DNA i histonów. Gęsta struktura chromatyny utrudnia dostęp maszynierii transkrypcyjnej do sekwencji docelowych, co powoduje, że określony gen nie ulega transkrypcji. Natomiast niski poziom metylacji – hipometylacja – zwiększa ekspresję genów [19]. W komórkach nowotworowych hipermetylacja wysp CpG promotora genu supresorowego nowotworu powoduje jego wyciszenie, natomiast hipometylacja promotora onkogenu powoduje jego aktywację, co może przyczynić się do inicjacji procesu nowotworzenia oraz jego dalszej promocji i progresji [20,21].

Zmiany poziomu enzymów metylujących mogą zmniejszać ryzyko transformacji nowotworowej. W badaniach nad rakiem piersi u kobiet, linie komórkowe MCF-7 i MDA-MB-231, poddane ekspozycji na SFN, wykazały obniżoną ekspresję enzymów odpowiedzialnych za metylację DNA, tj. DNMT1 i DNMT3A. Zmiany te doprowadziły do apoptozy komórek nowotworowych. Ponadto obniżenie ekspresji tych DNMT przyczyniło się do zahamowania aktywności genu odwrotnej transkryptazy ludzkiej telomerazy (hTERT, ang. *human telomerase reverse-transcriptase*), który ulega na-



Rycina 3. Schemat enzymatycznej katalizy glukozytolanów.

**Tabela 1.** Wpływ glukozyzolanów na metylację DNA.

Glukozyzolan	Typ nowotworu	Linia komórkowa	Mechanizm działania	Efekt	Referencje
SFN	Rak piersi	MCF-7 MDA-MB-231	Demetylacja promotorów PTEN i RARbeta2	Apoptoza i zwiększenie wrażliwości komórek na kłofarabinę	[52]
			Zmniejszenie ekspresji DNMT1 i 3A	Apoptoza	[22]
	Rak prostaty	LnCaP PC3			[23]
PEITC	Rak prostaty	LnCaP	Demetylacja promotora RASSF1A	Apoptoza	[24]
			Demetylacja promotora GSTP1	Przywrócenie aktywności GSTP1	[53]
DIM	Rak prostaty	LnCaP	Zmniejszenie ekspresji DNMT1 i 3B	Apoptoza	[25]
	Rak piersi	MCF-7 T47D	Demetylacja KLF4 poprzez zmniejszenie ekspresji DNMT1	Zwiększenie wrażliwości komórek na paklitaksel	[54]

DNMT – metylotransferaza DNA; DIM – 3,3'-diindolilometan; GSTP1 – gen S-transferazy glutationowej; KLF4 – Czynn timer podobny do Krüppela 4; PEITC – izotiocyjanian feniloetylu; PTEN – homolog fosfatazy i tensyny usunięty na chromosomie 10; RASSF1A – Rodzina domen asocjacyjnych Ras 1 izoforma A; RARbeta2 – receptor kwasu retinowego beta2; SFN – sulforafan.

dekspresji w wielu typach nowotworów [22]. W linii komórkowej LnCaP, pochodzącej z raka gruczołu krokowego, SFN również obniżał ekspresję enzymu DNMT1, co powodowało reaktywację poziomu cykliny D2 – znanego supresora nowotworu w tym typie raka [23].

Obniżenie ekspresji DNMT w LnCaP może być również wynikiem aktywności izotiocyjanianu feniloetylu. Badania wykazały, że PEITC może obniżyć poziom metylacji promotora genu izoformy A domeny asocjacyjnej Ras z rodziny 1 (RASSF1A, ang. *Ras association domain-containing protein 1*) – kodującego białko o przeciwnowotworowej aktywności. Tymczasem promotor genu RASSF1A jest często hiperetylowany w wielu typach nowotworów. Mechanizm epigenetyczny zależny od PEITC przeciwdziała zahamowaniu ekspresji genu i przyczynia się do utrzymania RASSF1A na prawidłowym poziomie [24]. Również DIM wpływa na linię komórkową LnCaP poprzez odwrócenie nieprawidłowego wzoru metylacji genów zaangażowanych w progresję raka, w tym receptora typu 1 transformującego czynnika wzrostu  $\beta 1$  (TGFB1, ang. *Transforming Growth Factor Beta Receptor 1*), bogatego w cysteinę induktora angiogenego 61 (CYR61, ang. *Cysteine-rich angiogenic inducer 61*), receptora chemokin C-C typu 4 (CCR4 ang. *C-C chemokine receptor type 4*) oraz receptora chemokin C-X-C typu 4 (CXCR4, ang. *C-X-C chemokine receptor type 4*) [25].

Wpływ glukozyzolanów na metylację DNA podsumowuje Tabela 1.

## ACETYLACJA HISTONÓW

Histony to alkaliczne białka połączone z DNA. Każdy z nich posiada określony łańcuch boczny (ogon), który może ulegać potranslacyjnym modyfikacjom powodującym zmianę ich ładunku elektrycznego i w konsekwencji reorganizację

chromatyny, skutkującą stłumieniem lub zwiększeniem ekspresji genu [26].

Grupa acetylowa dołączana jest do ogona histonu w procesie acetylacji. Powoduje to osłabienie oddziaływań między DNA a histonami. Enzymy odpowiedzialne za acetylację nazywane są acetylotransferazami histonowymi (HAT, ang. *histone acetyltransferases*), a enzymy odpowiedzialne za deacetylację znane są jako deacetylazy histonowe (HDAC, ang. *histone deacetylases*). Acetylacja dotyczy zwykle reszt lizyny w ogonach histonów. Hiperacetylacja protoonkogenów może prowadzić do ich aktywacji, podczas gdy hipocetylacja supresorów nowotworów może powodować ich wyciszenie [27].

Sulforafan użyty *in vitro* wpłynął na komórki niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC, ang. *non-small cell lung cancer*) (linie komórkowe A549 i H1299) obniżając aktywność HDAC, co przyczyniło się do zahamowania rozwoju raka płuca w wyniku indukowanej apoptozy i zatrzymania cyklu komórkowego [28]. W komórkach raka okrężnicy (linie komórkowe RKO i HTC116) po ekspozycji na SFN badacze zaobserwowali obniżony poziom białka HDAC1 oraz jego niższą aktywność enzymatyczną [29].

Aktywność i poziom ekspresji HDAC2 były istotnie niższe w komórkach raka prostaty (linie komórkowe PC-3 i LnCaP) po zastosowaniu DIM. Związek ten przyczynił się do zahamowania proliferacji komórek [30]. Z kolei komórki LnCaP, po traktowaniu PEITC, charakteryzowały się obniżoną ekspresją białek HDAC1, HDAC2, HDAC4 oraz HDAC6 [24].

Wpływ glukozyzolanów na acetylację histonów przedstawia Tabela 2.

Tabela 2. Wpływ glukozynolanów na acetylację histonów.

Glukozynolan	Typ nowotworu	Linia komórkowa	Mechanizm działania	Efekt	Referencje
SFN	Rak jelita grubego	HTC116	Zmniejszenie ekspresji HDAC3 i 6	Zatrzymanie cyklu komórkowego i apoptoza	[55]
	Niedrobnokomórkowy rak płuca	A549 H1299	Zmniejszenie aktywności HDAC	Zatrzymanie cyklu komórkowego komórek nowotworowych w fazie S	[28]
	Rak jelita grubego	RKO HCT116		Apoptoza	[29]
DIM	Rak prostaty	PC-3 LnCaP	Zmniejszenie ekspresji HDAC2	Zahamowanie proliferacji	[30]
	Rak jelita grubego	HT-29 SW620 RKO LS174T HCT116	Zmniejszenie ekspresji HDAC klasy I	Zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2 i apoptoza	[56]
PEITC	Rak prostaty	LnCaP	Zmniejszenie ekspresji HDAC1, 2, 4 i 6	Apoptoza	[24]
			Zmniejszenie aktywności HDAC1		[53]
	Rak piersi	MCF-7 MDA-MB-231	Zmniejszenie ekspresji HDAC1 i 2	Zatrzymanie cyklu komórkowego i apoptoza	[57]

DIM – 3,3'-diindolilometan; HDAC – deacetylazy histonowe; PEITC – izotiocyjanian fenyletylu; SFN – sulforafan.

#### MikroRNA

Mikro RNA należą do rodziny niekodujących RNA, które mogą potranskrypcyjnie hamować ekspresję pojedynczych genów. Dojrzałe cząsteczki miRNA są jednociowe i składają się z 17-25 nukleotydów. Po włączeniu do RISC (indukowanego przez RNA kompleksu wyciszającego, ang. *RNA-induced silencing complex*), miRNA kieruje go do genu docelowego poprzez rozpoznanie regionu 3' nieulegającego translacji (3'UTR, ang. *3' untranslated region*) danego genu, aby ostatecznie spowodować represję translacji [31]. MiRNA są zaangażowane we wszystkie znane procesy biologiczne, takie jak rozwój, różnicowanie, regulacja cyklu komórkowego, sygnalizacja komórkowa, odpowiedź immunologiczna, angiogeneza czy apoptoza [32]. W komórkach nowotworowych miRNA mogą ulegać nadekspresji (oncomiRNA), co prowadzi do rozwoju nowotworu i jego progresji (np. miRNA-155, miRNA-215). Ponadto synteza niektórych miRNA, które działają jak supresory nowotworów i obniżają poziom onkogenów, ulega zmniejszeniu. Na przykład, w NSCLC poziomy miRNA-34a, miRNA-30a-5p i miR-9-3 są znacząco obniżone [33-35].

SFN, PEITC i DIM to związki, które silnie wpływają na poziom mikroRNA i mogą przywracać prawidłowy wzorzec ekspresji kodujących je genów w komórkach nowotworowych. Proces ten może zachodzić poprzez zmiany w metylacji DNA i acetylacji histonów [36-38].

W komórkach NSCLC linii komórkowej A549, synteza miR-9-3 ulega obniżeniu z powodu hipermetylacji regionu promotora genu miR-9-3, co koreluje ze złym rokowaniem

dla pacjentów z NSCLC. Gao i współpracownicy wykazali, że SFN stosowany *in vitro* spowodował demetylację wysp CpG promotora miR-9-3, co przywróciło ekspresję miR-9-3 [37]. Natomiast miR-616-5p jest jednym z miRNA, które w NSCLC występuje na podwyższonym poziomie. Ta deregulacja przyczynia się do progresji nowotworu i tworzenia przerzutów. Wang i współpracownicy wykazali, że sulforafan zmniejszał ekspresję miR-616-5p i ograniczał wzrost i migrację komórek nowotworowych [38]. W ostrej białaczce szpikowej poziom ekspresji miR-181a wpływa na patogenezę tego nowotworu. Zastosowanie SFN przez Koolivand i współpracowników spowodowało zmniejszenie poziomu tego miRNA i zahamowanie proliferacji komórek (linie komórkowe KG-1, U-937, NB-4, HL60) [39]. Komórki raka piersi charakteryzują się podwyższonym poziomem miR-23b i miR-92b, miR-381 i miR-382. Powyższe cząsteczki działają jako czynniki proonkogenne. W badaniach przeprowadzonych na komórkach raka piersi przez Lewińską i współpracowników po zastosowaniu SFN, komórki linii komórkowej MCF-7, MDA-MB-231 i SK-BR-3 wykazywały obniżony poziom tych miRNA i zahamowany wzrost [40]. W komórkach gruczolakoraka przewodowego trzustki ekspresja miR-135b-5p jest znikoma. To miRNA zwiększa poziom ekspresji genu supresorowego RASAL2 (kodującego aktywator białka RAS typu 2, ang. *RAS protein activator like 2*). Natomiast, po inkubacji komórek z SFN, Yin i współpracownicy zaobserwowali zwiększoną ekspresję miR-135b-5p i jednocześnie podniesiony poziom białka RASAL2. Zmiany te poskutkowały zahamowaniem rozwoju raka w przypadku linii komórkowych BxPC-3, Panc-1 i AsPC-1 [41].

Badania nad działaniem PEITC na linię komórkową LnCaP raka prostaty przeprowadzone przez Zhanga i

Tabela 3. Wpływ glukozynolanów na miRNA.

Glukozynolany	Typ nowotworu	Linia komórkowa	Mechanizm działania	Efekt	Referencje
SFN	Rak piersi	MCF-7 MDA-MB-231 SK-BR-3	Zmniejszenie ekspresji miR-23b i miR-27b	Zahamowanie wzrostu	[40]
	Niedrobnokomórkowy rak płuca	A549	Demetylacja wysp CpG promotora miR-9-3	Przywrócenie poziomu miR-9-3	[37]
		H1299 95C 95D	Zmniejszenie ekspresji miR-616-5p poprzez modyfikacje histonów	Ograniczenie wzrostu i migracji	[38]
	Gruczolakorak przewodowy trzustki	AsPC-1 BxPC-3 PANC-1	Zwiększenie ekspresji RASAL2 poprzez indukcję ekspresji miR-135b-5p	Hamowanie sygnalizacji ERK1/2, żywotności, zdolności do samoodnawiania i wzrostu guza	[41]
	Rak żołądka	AGS MKN45	Zmiany ekspresji miR-9 i miR-326	Hamowanie proliferacji i supresja guza	[47]
	Rak trzustki	PANC-1	Hamowanie miR-30a-3p	Zwiększona wrażliwość na chemioterapię	[48]
	Ostra białaczka szpikowa	U937 KG-1 HL-60 NB-4	Zmniejszenie ekspresji miR-155	Hamowanie proliferacji	[49]
		U937 KG-1 HL-60 NB-4	Zmniejszenie ekspresji miR-181a		[39]
	Glejak wielopostaciowy	U251	Zmniejszenie ekspresji miR-15b-5p	Indukcja apoptozy przez synergistyczne działanie SFN i syntetycznego peptydu kwasu nukleinowego	[50]
		H4 SNB19 LN229 U251	Zmniejszenie ekspresji miR-21 poprzez hamowanie szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina/TCF4	Wzmocnienie efektów chemioterapii za pośrednictwem apoptozy zależnej od temozolomidu	[51]
PEITC	Rak prostaty	PC3	Zwiększenie ekspresji miR-194	Zmniejszenie ekspresji MMP2 i MMP9 oraz zahamowanie inwazji komórek	[42]
	Rak trzustki	Panc-1 Panc28 L3.6pL	Zmniejszenie ekspresji miR-27a, miR-17-5p i miR-20a	Apoptoza	[43]
	Rak prostaty	LnCaP	Zmniejszenie ekspresji miR-141	Zahamowanie proliferacji	[58]
			Zwiększenie ekspresji miR-17		[59]
Glejak wielopostaciowy	U87 U251 T98G	Zwiększenie ekspresji miR-135a	Apoptoza	[44]	
DIM	Rak trzustki	MiaPaCa-2 Panc-1	Zmniejszenie ekspresji miR-221	Zahamowanie proliferacji i migracji komórek	[45]
		Colo357 Panc-1	Zwiększenie ekspresji miR-146a	Zahamowanie inwazji komórek	[46]
	Rak żołądka	BGC-823	Zmniejszenie ekspresji miR-30e	Zahamowanie proliferacji	[60]
	Rak piersi	MCF-7	Zwiększenie ekspresji miR-21		[61]

DIM – 3,3'-diindolilometan, ERK1/2 – kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym  $\frac{1}{2}$ ; miRNA – mikroRNA; PEITC – izotiocyjanian fenyloetylu; RASAL2 – aktywator białka RAS typu 2; SFN – sulforafan; TCF4 – czynnik wzrostu komórek T

współpracowników wykazały, że związek ten zwiększa poziom miR-194, co przyczynia się do zmniejszenia poziomu mRNA i białek onkogennych, takich jak MMP2 (metaloproteinaza macierzy 2, ang. *matrix metalloproteinase-2*) i MMP9 (ang. *matrix metalloproteinase-9*) [42]. Jutooru i współpracownicy

wykazali, że izotiocyjanian fenyloetylu powoduje obniżenie ekspresji miR-27a, miR-17-5p i miR-20a w komórkach raka trzustki (linie komórkowe Panc-1, Panc28 i L3.6pL), co przyczyniło się do zależnego od reaktywnych form tlenu (RFT) obniżenia poziomu białek specyficzności

Sp1, Sp3 i Sp4 (ang. *specificity protein*), będących czynnikami transkrypcyjnymi, i ostatecznie poprowadziło do apoptozy komórek nowotworowych [43]. Przeprowadzona przez Zhanga i współpracowników inkubacja komórek glejaka (linie komórkowe U87, U251 i T98G) z PEITC spowodowała zwiększenie ekspresji miR-135a. Przypuszczalnie ta modulacja doprowadza do aktywacji szlaków apoptozy zależnych od RFT, miR-135a i mitochondriów [44].

Badania nad 3,3'-diindolimetanem przeprowadzone przez grupę Sarkar na komórkach raka trzustki (linie komórkowe MiaPaCa-2, Panc-1 i BxPC-3) wskazały zmniejszenie ekspresji onkogenego miR-221 pod wpływem DIM, co prowadziło do zahamowania proliferacji i migracji komórek [45]. Natomiast obniżony poziom miR-146a w komórkach raka trzustki (linie komórkowe Colo357 i Panc-1), który jest skorelowany z przerzutami, po zastosowaniu DIM ulegał zwiększeniu i hamował inwazję komórek [46].

Wpływ glukozynolanów na mikroRNA przedstawia Tabela 3.

## PODSUMOWANIE

Aktywne biocząsteczki pozyskiwane z roślin są źródłem silnych związków przeciwnowotworowych. Glukozynolany to naturalne substancje, które poprzez wpływ na epigenom mogą wspomagać konwencjonalne terapie przeciwnowotworowe. Ich działanie na poziomie epigenetycznym nie jest do końca poznane, dlatego wymaga dalszych badań. Jednakże niewątpliwie jest ono znaczące i sugeruje możliwość wykorzystania naturalnych związków w zapobieganiu i leczeniu nowotworów również w zaawansowanych stadiach.

## PIŚMIENNICTWO

1. Nebbioso A, Tambaro FP, Dell'Aversana C, Altucci L (2018) Cancer epigenetics: Moving forward. *PLoS Genet* 14(6): e1007362
2. Lu Y, Chan YT, Tan H, Li S, Wang N, Feng Y (2020) Epigenetic regulation in human cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy. *Mol Cancer* 19: 79
3. Antony H, Wiegman AP, Wei MQ, Chernoff YO, Khanna KK, Munn AL (2012) Potential roles for prions and protein-only inheritance in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 31(1-2): 1-19
4. Chakravarty AK, Jarosz DF (2018) More than Just a Phase: Prions at the Crossroads of Epigenetic Inheritance and Evolutionary Change. *J Mol Biol* 430(23): 4607- 4618
5. Kulczycka A, Bednarek I, Dzierżewicz Z (2013) Modyfikacje epigenetyczne jako potencjalne cele terapii antynowotworowych. *Ann Acad Med Siles* 67(3): 201-208
6. Majchrzak-Celińska A, Warych A, Szoszkiewicz M (2021) Novel Approaches to Epigenetic Therapies: From Drug Combinations to Epigenetic Editing. *Genes (Basel)* 12(2): 208
7. Bouyahya A, Mechchate H, Oumeslakht L, Zeouk I, Aboulaghras S, Balahbib A, Zengin G, Kamal MA, Gallo M, Montesano D, El Omari N (2022) The Role of Epigenetic Modifications in Human Cancers and the Use of Natural Compounds as Epidrugs: Mechanistic Pathways and Pharmacodynamic Actions. *Biomolecules* 12(3): 367
8. Montalvo-Casimiro M, González-Barríos R, Meraz-Rodríguez MA, Juárez-González VT, Arriaga-Canon C, Herrera LA (2020) Epidrug Repurposing: Discovering New Faces of Old Acquaintances in Cancer Therapy. *Front Oncol* 10: 605386.
9. El Omari N, Bakrim S, Bakha M, Lorenzo JM, Rebezov M, Shariati MA, Aboulaghras S, Balahbib A, Khayrullin M, Bouyahya A (2021) Natu-

- ral Bioactive Compounds Targeting Epigenetic Pathways in Cancer: A Review on Alkaloids, Terpenoids, Quinones, and Isothiocyanates. *Nutrients* 13(11): 3714
10. Hudlikar R, Wang L, Wu R, Li S, Peter R, Shannar A, Chou PJ, Liu X, Liu Z, Kuo HD, Kong AN (2021) Epigenetics/Epigenomics and Prevention of Early Stages of Cancer by Isothiocyanates. *Cancer Prev Res (Phila)* 14(2): 151-164
11. Williams DE (2021) Indoles Derived From Glucobrassicin: Cancer Chemoprevention by Indole-3-Carbinol and 3,3'-Diindolylmethane. *Front Nutr* 8: 734334
12. Barba FJ, Nikmaram N, Roohinejad S, Khelfa A, Zhu Z, Koubaa M, (2016) Bioavailability of Glucosinolates and Their Breakdown Products: Impact of Processing. *Front Nutr* 3: 24
13. Vanduchova A, Anzenbacher P, Anzenbacherova E (2019) Isothiocyanate from Broccoli, Sulforaphane, and Its Properties. *J Med Food* 22(2):121-126
14. Gupta P, Wright SE, Kim SH, Srivastava SK (2014) Phenethyl isothiocyanate: a comprehensive review of anti-cancer mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1846(2): 405-424
15. Gao X, Liu J, Cho KB, Kedika S, Guo B (2020) Chemopreventive Agent 3,3'-Diindolylmethane Inhibits MDM2 in Colorectal Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 21(13): 4642
16. Yagishita Y, Fahey JW, Dinkova-Kostova AT, Kensler TW (2019) Broccoli or Sulforaphane: Is It the Source or Dose That Matters? *Molecules* 24(19): 3593
17. Sikorska-Zimny K, Beneduce L (2021) The glucosinolates and their bioactive derivatives in Brassica: a review on classification, biosynthesis and content in plant tissues, fate during and after processing, effect on the human organism and interaction with the gut microbiota. *Crit Rev Food Sci Nutr* 61(15): 2544-2571
18. Yang L, Palliyaguru DL, Kensler TW (2016) Frugal chemoprevention: targeting Nrf2 with foods rich in sulforaphane. *Semin Oncol* 43(1):1 46-153
19. McMahon KW, Karunasena E, Ahuja N (2017) The Roles of DNA Methylation in the Stages of Cancer. *Cancer J* 23(5): 257-261
20. Wilson AS, Power BE, Molloy PL (2007) DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1775(1): 138-162
21. Van Tongelen A, Loriot A, De Smet C (2017) Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes. *Cancer Lett* 396: 130-137
22. Meeran SM, Patel SN, Tollefsbol TO (2010) Sulforaphane causes epigenetic repression of hTERT expression in human breast cancer cell lines. *PLoS One* 5(7): e11457
23. Hsu A, Wong CP, Yu Z, Williams DE, Dashwood RH, Ho E (2011) Promoter de-methylation of cyclin D2 by sulforaphane in prostate cancer cells. *Clin Epigenetics* 3(1): 3
24. Boyanapalli SS, LW, Fuentes F, Guo Y, Ramirez CN, Gonzalez XP, Pung D, Kong AN (2016). Epigenetic reactivation of RASSF1A by phenethyl isothiocyanate (PEITC) and promotion of apoptosis in LNCaP cells. *Pharmacological research* 114: 175-184
25. Wong CP, Hsu A, Buchanan A, Palomera-Sanchez Z, Beaver LM, Houseman EA, Williams DE, Dashwood RH, Ho E (2014) Effects of sulforaphane and 3,3'-diindolylmethane on genome-wide promoter methylation in normal prostate epithelial cells and prostate cancer cells. *PLoS One* 9(1): e86787
26. Zhang Y, Sun Z, Jia J, Du T, Zhang N, Tang Y, Fang Y, Fang D (2021) Overview of Histone Modification. *Adv Exp Med Biol* 1283: 1-16
27. Audia JE, Campbell RM (2016) Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8(4): a019521
28. Jiang LL, Zhou SJ, Zhang XM, Chen HQ, Liu W (2016) Sulforaphane suppresses in vitro and in vivo lung tumorigenesis through downregulation of HDAC activity. *Biomed Pharmacother* 78: 74-80
29. Martin SL, Kala R, Tollefsbol TO (2018) Mechanisms for the Inhibition of Colon Cancer Cells by Sulforaphane through Epigenetic Modulation of MicroRNA-21 and Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Down-regulation. *Curr Cancer Drug Targets* 18(1): 97-106

30. Beaver LM, Yu TW, Sokolowski EI, Williams DE, Dashwood RH, Ho E (2012) 3,3'-Diindolylmethane, but not indole-3-carbinol, inhibits histone deacetylase activity in prostate cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 263(3): 345-351
31. Mohr AM, Mott JL (2015) Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis* 35(1): 3-11
32. Tüfekci KU, Meuwissen RL, Genç S (2014) The role of microRNAs in biological processes. *Methods Mol Biol* 1107: 15-31
33. Świtlik W, Karbownik MS, Suwalski M, Kozak J, Szemraj J (2018) miR-30a-5p together with miR-210-3p as a promising biomarker for non-small cell lung cancer: A preliminary study. *Cancer Biomark* 21(2):479-488
34. Yan H, Bu P (2021) Non-coding RNA in cancer. *Essays Biochem* 65(4): 625-639
35. Yuan Y, Zheng S, Li Q, Xiang X, Gao T, Ran P, Sun L, Huang Q, Xie F, Du J, Xiao C (2016) Overexpression of miR-30a in lung adenocarcinoma A549 cell line inhibits migration and invasion via targeting EYA2. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 48(3): 220-228
36. Rafiei H, Ashrafzadeh M, Ahmadi Z (2020) MicroRNAs as novel targets of sulforaphane in cancer therapy: The beginning of a new tale? *Phyther Res* 34: 721-728
37. Gao L, Cheng D, Yang J, Wu R, Li W, Kong AN (2018) Sulforaphane epigenetically demethylates the CpG sites of the miR-9-3 promoter and reactivates miR-9-3 expression in human lung cancer A549 cells. *J Nutr Biochem* 56: 109-115
38. Wang DX, Zou YJ, Zhuang XB, Chen SX, Lin Y, Li WL, Lin JJ, Lin ZQ (2017) Sulforaphane suppresses EMT and metastasis in human lung cancer through miR-616-5p-mediated GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signalling pathways. *Acta Pharmacol Sin* 38(2): 241-251
39. Koolivand M, Ansari M, Moein S, Afza M, Malekzadeh K (2020) The Inhibitory Effect of Sulforaphane on The Proliferation of Acute Myeloid Leukemia Cell Lines through Controlling miR-181a. *Cell J* 24(1): 44-50
40. Lewinska A, Adamczyk-Grochala J, Deręgowska A, Wnuk M (2017) Sulforaphane-Induced Cell Cycle Arrest and Senescence are accompanied by DNA Hypomethylation and Changes in microRNA Profile in Breast Cancer Cells. *Theranostics* 7(14): 3461-3477
41. Yin L, Xiao X, Georgikou C, Luo Y, Liu L, Gladkich J, Gross W, Herr I (2019) Sulforaphane Induces miR135b-5p and Its Target Gene, RAS-AL2, thereby Inhibiting the Progression of Pancreatic Cancer. *Mol Ther Oncolytics* 14: 74-81
42. Zhang C, Shu L, Kim H, Khor TO, Wu R, Li W, Kong AN (2016) Phenethyl isothiocyanate (PEITC) suppresses prostate cancer cell invasion epigenetically through regulating microRNA-194. *Mol Nutr Food Res* 60(6): 1427-36
43. Jutooru I, Guthrie AS, Chadalapaka G, Pathi S, Kim K, Burghardt R, Jin UH, Safe S (2014) Mechanism of action of phenethylisothiocyanate and other reactive oxygen species-inducing anticancer agents. *Mol Cell Biol* 34(13): 2382-95
44. Zhang T, Shao Y, Chu TY, Huang HS, Liou YL, Li Q, Zhou H (2016) MiR-135a and MRP1 play pivotal roles in the selective lethality of phenethyl isothiocyanate to malignant glioma cells. *Am J Cancer Res* 6(5): 957-72
45. Sarkar S, Dubaybo H, Ali S, Goncalves P, Kollepara SL, Sethi S, Philip PA, Li Y (2013) Down-regulation of miR-221 inhibits proliferation of pancreatic cancer cells through up-regulation of PTEN, p27(kip1), p57(kip2), and PUMA. *Am J Cancer Res* 3(5): 465-77
46. Li Y, Vandenboom TG 2nd, Wang Z, Kong D, Ali S, Philip PA, Sarkar FH (2010) miR-146a suppresses invasion of pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 70(4): 1486-95
47. Kiani S, Akhavan-Niaki H, Fattahi S, Kavosian S, Babaian Jelodar N, Bagheri N, Najafi Zarrini H (2018) Purified sulforaphane from broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) leads to alterations of CDX1 and CDX2 expression and changes in miR-9 and miR-326 levels in human gastric cancer cells. *Gene* 678: 115-123
48. Georgikou C, Yin L, Gladkich J, Xiao X, Sticht C, Torre C, Gretz N, Gross W, Schäfer M, Karakhanova S, Herr I (2020) Inhibition of miR-30a-3p by sulforaphane enhances gap junction intercellular communication in pancreatic cancer. *Cancer Lett* 469: 238-245
49. Koolivand M, Ansari M, Piroozian F, Moein S, Malekzadeh K (2018) Alleviating the progression of acute myeloid leukemia (AML) by sulforaphane through controlling miR-155 levels. *Mol Biol Rep* 45: 2491-2499
50. Gasparello J, Papi C, Zurlo M, Gambari L, Rozzi A, Manicardi A, Corradini R, Gambari R, Finotti A (2022) Treatment of Human Glioblastoma U251 Cells with Sulforaphane and a Peptide Nucleic Acid (PNA) Targeting miR-15b-5p: Synergistic Effects on Induction of Apoptosis. *Molecules* 27(4): 1299
51. Lan F, Pan Q, Yu H, Yue X (2015) Sulforaphane enhances temozolomide-induced apoptosis because of down-regulation of miR-21 via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in glioblastoma. *J Neurochem* 134(5): 811-8
52. Lubecka-Pietruszewska K, Kaufman-Szymczyk A, Stefanska B, Cebula-Obrzut B, Smolewski P, Fabianowska-Majewska K (2015) Sulforaphane Alone and in Combination with Clofarabine Epigenetically Regulates the Expression of DNA Methylation-Silenced Tumour Suppressor Genes in Human Breast Cancer Cells. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 8(2): 91-101
53. Wang LG, Beklemisheva A, Liu XM, Ferrari AC, Feng J, Chiao JW (2007) Dual action on promoter demethylation and chromatin by an isothiocyanate restored GSTP1 silenced in prostate cancer. *Mol Carcinog* 46(1): 24-31
54. Xiang F, Zhu Z, Zhang M, Wang J, Chen Z, Li X, Zhang T, Gu Q, Wu R, Kang X (2021) 3,3'-Diindolylmethane Enhances Paclitaxel Sensitivity by Suppressing DNMT1-Mediated KLF4 Methylation in Breast Cancer. *Front Oncol* 3(11): 627856
55. Rajendran P, Kidane AI, Yu TW, Dashwood WM, Bisson WH, Löhr CV, Ho E, Williams DE, Dashwood RH (2013) HDAC turnover, CtIP acetylation and dysregulated DNA damage signaling in colon cancer cells treated with sulforaphane and related dietary isothiocyanates. *Epigenetics* 8(6): 612-23
56. Li Y, Li X, Guo B (2010) Chemopreventive agent 3,3'-diindolylmethane selectively induces proteasomal degradation of class I histone deacetylases. *Cancer Res* 70(2): 646-54
57. Roy M, Sutapa M, Biswas J (2012) Inhibition of an epigenetic modulator, histone deacetylase in breast cancer - a detailed mechanistic approach. *Int J Ther Appl* 5: 1-13
58. Xiao J, Gong AY, Eischeid AN, Chen D, Deng C, Young CY, Chen XM (2012) miR-141 modulates androgen receptor transcriptional activity in human prostate cancer cells through targeting the small heterodimer partner protein. *Prostate* 72(14): 1514-22
59. Yu C, Gong AY, Chen D, Solelo Leon D, Young CY, Chen XM (2013) Phenethyl isothiocyanate inhibits androgen receptor-regulated transcriptional activity in prostate cancer cells through suppressing PCAF. *Mol Nutr Food Res* 57(10): 1825-33
60. Ye Y, Fang Y, Xu W, Wang Q, Zhou J, Lu R (2016) 3,3'-Diindolylmethane induces anti-human gastric cancer cells by the miR-30e-ATG5 modulating autophagy. *Biochem Pharmacol* 115: 77-84
61. Jin Y (2011) 3,3'-Diindolylmethane inhibits breast cancer cell growth via miR-21-mediated Cdc25A degradation. *Mol Cell Biochem* 358(1-2): 345-54

# Role of the glucosinolates in cancer epigenetics

Julia Anchimowicz<sup>1</sup>, Zbigniew Wyzewski<sup>2</sup>, Weronika Zofia Świtlik<sup>1,3</sup>✉

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Biology, University of Life Sciences-SGGW, Warsaw

<sup>2</sup>Institute of Biological Sciences, Cardinal Stefan Wyszyński University in Warsaw

<sup>3</sup>Department of Medical Biochemistry, Medical University of Lodz

✉Corresponding author: weronika\_switlik@sggw.edu.pl

**Key words:** cancer, epigenetics, glucosinolates, microRNA, *phenylethyl isothiocyanate*, sulforaphane

## ABSTRACT

It has been known for years that diet impacts human health, including the risk of cancer development. Food components can both increase and reduce the risk of carcinogenesis. Thereby, a wisely composed diet can extend life span and improve life quality. The favourable effect on health exert glucosinolates (GSLs), a group of secondary plant metabolites found in vegetables of the *Brassicaceae* family, such as broccoli, cauliflower, cabbage, and kohlrabi. Hydrolysis of GSLs results in the formation of compounds, like sulforaphane (SFN), phenylethyl isothiocyanate (PEITC) and 3,3'-Diindolylmethane (DIM), which are known for versatile anti-cancer activity. This review highlights advances on the role of the chosen GSLs on selected epigenetic mechanisms, i.e. DNA methylation, histone acetylation and microRNAs expression in cancer treatment.

