Metylacja mitochondrialnego DNA: istnienie, lokalizacja i funkcja

STRESZCZENIE

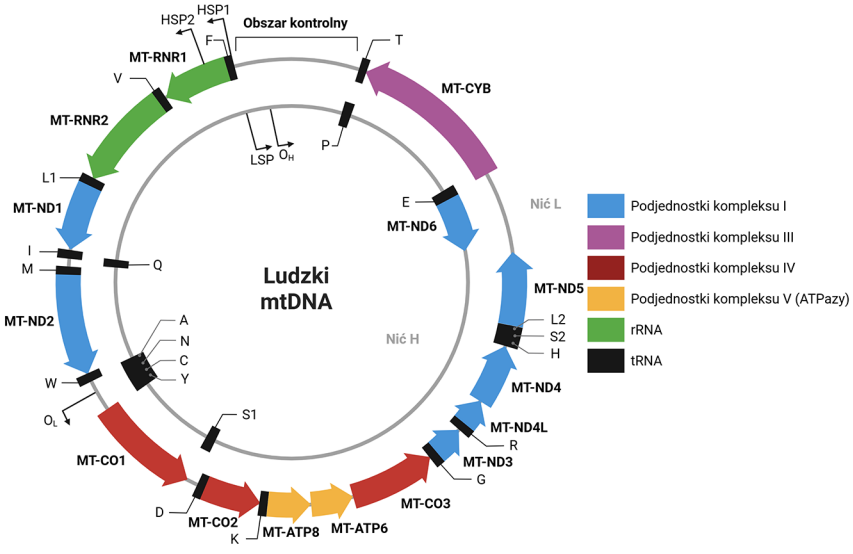
Epigenetyczna regulacja ekspresji genów to intensywnie badany obszar biologii molekularnej. Należy do niej metylacja cytozyn, której mechanizm działania w DNA jądrowym jest stosunkowo dobrze poznany. Za jej powstawanie odpowiadają enzymy z rodziny metylotransferaz DNA. Hydroksymetylacja to forma modyfikacji epigenetycznej wywodząca się z metylacji. Uznaje się ją za etap pośredni w procesie demetylacji cytozyn, a także za możliwy, samodzielny sposób regulowania ekspresji genów. Funkcjonalne znaczenie, a nawet obecność metylacji w obrębie DNA mitochondrialnego (mtDNA) stanowi natomiast kwestię sporną. Zgromadzone dane wskazują na istotną rolę metylacji i hydroksymetylacji w funkcjonowaniu mitochondriów. Choć epigenetyczna regulacja ekspresji genów w mitochondriach nie jest do końca poznana, obecny stan wiedzy sugeruje, że może ona mieć wpływ na prawidłowe funkcjonowanie komórki i patogenezę wielu chorób.

MITOCHONDRIA

Mitochondria to półautonomiczne, u ssaków dziedziczone odmatczynie, organella komórek eukariotycznych, które zgodnie z endosymbiotyczną teorią pochodzenia organelli wywodzą się od bakterii klasy *Alphaproteobacteria*, które weszły w symbiozę z pierwotnymi komórkami eukariotycznymi [1]. Mitochondria potrafią namnażać się niezależnie od cyklu komórkowego. W pojedynczym mitochondrium jest wiele kopii mitochondrialnego DNA (mtDNA), który różni się znacząco od jądrowego DNA (nDNA) [2].

mtDNA

Ludzki mtDNA jest kolistą cząsteczką o długości ok. 16500 par zasad (pz), złożoną z dwóch nici: ciężkiej, bogatej w guaniny (nić H – ang. *heavy strand, H-strand*) oraz lekkiej, bogatej w cytozyny (nić L – ang. *light strand, L-strand*). mtDNA koduje 37 genów, z których 2 kodują rRNA, 22 - tRNA, a pozostałe 13 - białka wchodzące w skład systemu fosforylacji oksydacyjnej (Ryc. 1) [3,4]. W zależności od zapotrzebowania energetycznego komórek, liczba kopii mtDNA może wynosić od 100 do ponad 10000 [4,5]. Pozostała część proteomu mitochondrialnego (m.in.: białka systemu fosforylacji oksydacyjnej, enzymy, czynniki transkrypcyjne) zakodowana jest w jądrze komórkowym. Takie białka posiadają sekwencje kierujące do mitochondriów [1,6].



Rycina1. Mapa ludzkiego mitochondrialnego DNA. Stworzone w programie BioRender, Tońska, K. (2025).

lic. Laura Łuczak,

prof. dr hab. Katarzyna Tońska✉

Instytut Genetyki i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

https://doi.org/10.18388/pb.2021_632

✉Autor korespondencyjny: k.tonska@uw.edu.pl

Słowa kluczowe: mitochondrium, metylacja DNA, mitochondrialny DNA, sekwencjonowanie bisulfitowe

Wykaz skrótów: ALS (ang. *amyotrophic lateral sclerosis*) - stwardnienie zanikowe boczne; DNMT (ang. *DNA methyltransferase*) – metylotransferaza DNA; LHON (ang. *Leber's hereditary optic neuropathy*) – dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego Lebera; MELAS (ang. *myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes*) – miopatia, encefalopatia, kwasica mleczanowa; mtDNA – mitochondrialny DNA; nDNA – jądrowy DNA

Pomimo braku białek histonowych w mitochondriach, genom mitochondrialny utrzymuje strukturę superskrętu dzięki innym, gęsto pokrywającym go białkom wchodzącym w skład mitochondrialnej maszynerii replikacyjnej i transkrypcyjnej (głównie białko TFAM) [7]. Takie kompleksy nukleoproteinowe nazywane są nukleoidami mitochondrialnymi [1].

OBSZAR REGULATOROWY

W mtDNA znajduje się tylko jeden dłuższy odcinek niekodujący obejmujący około 1100 pz (16 024-576), często nazywany pętlą D (ang. *displacement loop, D-loop*), regulujący transkrypcję i replikację mtDNA. W jej obrębie znajdują się wysoce konserwatywne sekwencje: miejsce inicjacji replikacji nici ciężkiej (OH) oraz zwrócone w przeciwnych kierunkach promotory obu nici [1,4,8]. Transkrypcja genów mitochondrialnych skutkuje powstaniem policistronowych transkryptów, które w wyniku enzymatycznej obróbki potranskrypcyjnej przekształcane są do funkcjonalnych cząsteczek mRNA, rRNA i tRNA [1,4].

FUNKCJE MITOCHONDRIUM

Choć najpowszechniej uznawaną za najważniejszą funkcją mitochondriów jest produkcja ATP w procesie fosforylacji oksydacyjnej, biorą one udział w licznych innych kluczowych procesach komórkowych, takich jak: kontrola szlaków apoptozy, utrzymywanie homeostazy i regulacja gospodarki wapniowej, metabolizm kwasów tłuszczowych, produkcja reaktywnych form tlenu, produkcja istotnych metabolitów pośrednich, synteza centrów żelazowo-siarkowych [6,9].

ZABURZENIA FUNKCJONOWANIA MITOCHONDRIÓW A ZDROWIE CZŁOWIEKA

Mitochondria zaangażowane są w liczne procesy metaboliczne, których nieprawidłowości mogą skutkować chorobami człowieka. Pierwotna dysfunkcja systemu fosforylacji oksydacyjnej definiuje choroby mitochondrialne, które mogą być wywołane przez mutacje w DNA jądrowym kodującym białka transportowane do mitochondriów.

Choroby mitochondrialne mogą być również wywołane mutacjami w mitochondrialnym DNA. Na przykład patogenne warianty w genach *MT-ND4*, *MT-ND1* i *MT-ND6*, kodujących białka kompleksu I łańcucha transportu elektronów, powodują wystąpienie dziedzicznej neuropatii nerwu wzrokowego Lebera (LHON - ang. *Leber's hereditary optic neuropathy*) [10]. Mutacja A>G w pozycji 3243 mitochondrialnego DNA najczęściej prowadzi natomiast do zespołu MELAS (ang. *myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes*).

Ze względu na udział mitochondriów w metabolizmie energetycznym komórki, na choroby wywołane zaburzeniami ich funkcjonowania najbardziej podatne są narządy i tkanki zbudowane z komórek o wysokim zapotrzebowaniu energetycznym. Z tego powodu objawy chorób mitochondrialnych obejmują przeważnie układ nerwowy i mięśniowy [10,11].

Nieprawidłowe funkcjonowanie mitochondriów obserwuje się w przypadku wielu chorób neurodegeneracyjnych niemieszczących się w ścisłej definicji choroby mitochondrialnej, takich jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, stwardnienie zanikowe boczne, choroba Huntingtona. Zaburzenia pracy mitochondriów są obecne również w przebiegu niektórych chorób metabolicznych, chorób układu krążenia i serca, chorób autoimmunologicznych i wielu typach nowotworów [11].

Objawy wynikające z nieprawidłowo funkcjonujących mitochondriów mogą się nie ujawniać do momentu przekroczenia progu stosunku mitochondriów prawidłowo do nieprawidłowo funkcjonujących. Wynika to z obecności wielu kopii mtDNA w komórce, posiadających jednakowe sekwencje (homoplazmia) lub różniące się między sobą (heteroplazmia). W heteroplazmatycznych komórkach, czy tkankach nieprawidłowe cząsteczki wpływają na ich fizjologię dopiero po osiągnięciu określonego poziomu – tzw. efektu progowego [2]. Jego wartość jest trudna do zdefiniowania, ponieważ zależy od wpływu mutacji na funkcjonowanie kodowanego białka czy RNA, rodzaju tkanki oraz kontekstu genetycznego – mitochondrialnego i jądrowego.

Zwraca się także uwagę na działanie czynników środowiskowych – tu dobrym przykładem jest udowodniony negatywny wpływ palenia tytoniu na ujawnienie się i postęp dziedzicznej neuropatii nerwu wzrokowego Lebera. Potencjalnym wytłumaczeniem takich sytuacji są modyfikacje epigenetyczne i ich wpływ na ekspresję genów, a w kontekście chorób - na zaburzenia ekspresji [7]giving rise to mitochondrial diseases. Some mitochondrial myopathies, however, present without a known underlying cause. Interestingly, methylation of mtDNA has been associated with various clinical pathologies. The present study set out to assess whether mtDNA methylation could explain impaired mitochondrial function in patients diagnosed with myopathy without known underlying genetic mutations. Enhanced mtDNA methylation was indicated by pyrosequencing for muscle biopsies of 14 myopathy patients compared to four healthy controls, at selected cytosines in the Cytochrome B (CYTB. Niniejsza praca skupia się na modyfikacjach epigenetycznych występujących w genomie mitochondrialnym mogących wpływać na funkcjonowanie mitochondriów [2].

EPIGENETYKA

Modyfikacje epigenetyczne to odwracalne, tkankowo-specyficzne zmiany, które regulują ekspresję genów bez ingerowania w sekwencję nukleotydową DNA. W czasie życia komórki, jej wzór epigenetyczny ulega dynamicznym zmianom, co umożliwia kontrolę aktywności genów podczas różnicowania i starzenia komórek oraz w odpowiedzi na czynniki środowiskowe. Ponadto, wzór ten jest odtwarzany w komórkach potomnych po podziale mitotycznym, a w ograniczonym stopniu także po zajściu mejozy, co umożliwia jego międzypokoleniowe dziedziczenie i wpływa na prawidłowy rozwój zarodkowy [12]. Najlepiej poznane zostały mechanizmy epigenetyczne występujące

w jądrze komórkowym, m.in. kowalencyjne modyfikacje DNA (np.: metylacja i hydroksymetylacja), potranslacyjne modyfikacje białek kontrolujących strukturę DNA (np.: białek histonowych, białek TFAM), potranskrypcyjne modyfikacje rRNA, tRNA i mRNA oraz potranskrypcyjna regulacja ekspresji genów z użyciem niekodujących RNA. Dużo słabiej zbadana jest natomiast regulacja epigenetyczna w organellach eukariotycznych posiadających własny DNA: mitochondriach i plastydach [11,13].

METYLACJA DNA

Metylacja DNA to termin, którym często określa się metylację cytozyn, ze względu na dużo większą częstość występowania tej modyfikacji w porównaniu z metylacją pozostałych zasad azotowych budujących podstawowe nukleotydy [14]. Polega ona na przeniesieniu grupy metylowej z S-adenozylo-L-metioniny na atom węgla w pozycji 5 pierścienia pirymidynowego cytozyny, z utworzeniem 5-metylocytozyny (5-mC) oraz S-adenozylo-L-homocysteiny [18] (Ryc. 2).

Reakcję tę katalizują enzymy z grupy metylotransferaz (DNMTs – ang. *DNA methyltransferases*). W komórkach ssaczych obecnych jest pięć metylotransferaz pełniących różne funkcje: DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L, DNMT1 i DNMT2 [15].

METYLOTRANSFERAZY DNA

Metylotransferazy z rodziny DNMT3 odpowiadają za metylację *de novo* podczas rozwoju embrionalnego, a usunięcie genu kodującego DNMT3A lub DNMT3B jest letalne w przypadku myszy. U ludzi mutacje nawet w jednym z nich prowadzą do poważnych chorób, co wskazuje na odrębne funkcje biologiczne tych enzymów. DNMT3L jest natomiast nieaktywnym katalitycznie czynnikiem regulatorowym, który wzmacnia aktywność enzymów DNMT3A i DNMT3B [15, 16].

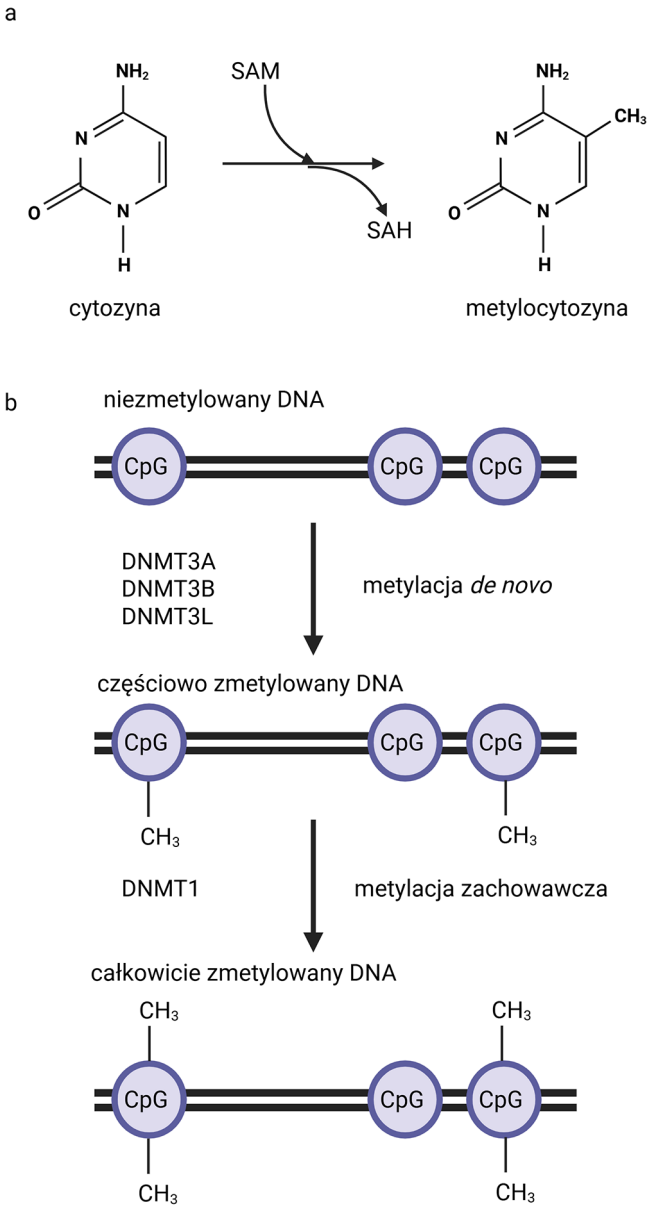
Metylotransferazy DNMT1 utrzymują istniejący wzór metylacji podczas replikacji i naprawy DNA w komórkach somatycznych [16], więc odpowiadają za tak zwaną metylację zachowawczą (ang. *maintenance methylation*). DNMT1 wykazują największe powinowactwo do hemimetylowanego DNA, czyli DNA w którym metylowana jest tylko jedna nić. Brak genu kodującego DNMT1 u myszy skutkuje śmiercią na wczesnym etapie rozwoju, a u ludzi mutacje w tym genie są przyczyną poważnych chorób neurodegeneracyjnych [15].

DNMT2, obecnie nazywana TRDMT1 (ang. *tRNA (cytosine-5-)-methyltransferase*), wykazuje strukturalne podobieństwo do pozostałych DNMTs, choć katalizuje reakcję metylacji RNA, a nie DNA [15].

Pomimo odrębnych funkcji DNMT3A, DNMT3B i DNMT1, zarówno metylacja *de novo* jak i metylacja zachowawcza zależą od współpracy wszystkich tych enzymów [15].

METYLACJA DNA JĄDROWEGO

Zanim przyjrzymy się metylacji mtDNA, warto w zarysie poznać zasady rządzące metylacją nDNA i jej znaczenie. W jądrze komórkowym cytozyny ulegają metylacji głównie w motywach dinukleotydowych CpG, gdzie „p" oznacza grupę fosforanową, z których większość występuje w skupiskach, tzw. wyspach CpG. Umożliwia to utworzenie symetrycznego wzoru metylacji, odtwarzanego na nowo syntetyzowanych niciach po kolejnych podziałach komórkowych [14,17]. Wyspy CpG znajdują się najczęściej w obrębie regionów regulatorowych (np.: promotorach), satelitach DNA, sekwencjach powtórzonych (w tym transpozonach), ale także w eksonach i intronach genów [13,14]. W DNA jądrowym (nDNA - ang. *nuclear DNA*) około 70% sekwencji CpG jest zmetylowanych [14]. Hipermetylacja regionów regulatorowych zwykle charakteryzuje nieaktyw-



Rycina 2. Metylacja DNA. Przeniesienie grupy metylowej z S-adenozylo-L-metioniny (SAM) na atom węgla w pozycji 5 pierścienia pirymidynowego cytozyny, z utworzeniem 5 metylocytozyny oraz S adenozylo-L-homocysteiny (SAH) (a). Udział metylaz DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L w metylacji DNA (b). Na podstawie [18], stworzone w programie BioRender. Tońska, K. (2025)

ne transkrypcyjnie rejony genomu, natomiast metylacja w eksonach i intronach genów może stymulować ich ekspresję [13,15]. Wynika to z powstania zawady sterycznej w postaci 5-mC, która blokuje dostęp czynników transkrypcyjnych do sekwencji, ale umożliwia przyłączenie białek wiążących zmetylowane DNA (MBP - ang. *methyl-CpG binding protein*). Metylacja DNA pełni wiele funkcji związanych z regulacją ekspresji nDNA, takich jak piętnowanie rodzicielskie, inaktywacja drugiego chromosomu X w komórkach żeńskich, rozwój układu immunologicznego i różnicowanie komórek, a także wyciszanie retrowirusów i transpozonów [14,15].

Niesymetryczna metylacja nDNA (nie-CpG) występuje w komórkach zwierzęcych stosunkowo rzadko, a jej rola nie jest dokładnie poznana [17].

Zaburzenia metylacji nDNA (wywołane czynnikami wewnętrznymi lub środowiskowymi) wpływają na patogenezę wielu chorób, a ze względu na odwracalny charakter modyfikacji epigenetycznych, są one rozważane w kontekście terapii epigenetycznych [14].

METYLACJA mtDNA

Biorąc pod uwagę wpływ metylacji nDNA na wiele kluczowych procesów biologicznych oraz znaczenie mitochondriów w utrzymaniu homeostazy komórkowej, można przypuszczać, że metylacja mtDNA może również odgrywać istotną rolę w funkcjonowaniu komórki.

Na przestrzeni kilku ostatnich dekad pełnienie istotnej funkcji biologicznej, a nawet sama obecność metylacji mtDNA, pozostawały kwestią sporną. Wczesne badania na ten temat wskazują na poziom metylacji w mitochondriach poniżej 5%. Współcześnie prowadzone badania wykorzystujące nowoczesne techniki nie dostarczają spójnych wyników opisujących mitochondrialny metylom, czyli całościowy wzór metylacji mtDNA [18].

ZALEŻNIE OD METODY I ZAKRESU BADANIA OBSERWUJE SIĘ RÓŻNE POZIOMY METYLACJI

Metodą immunoprecypitacji wykazano wysoką zawartość 5-mC w mtDNA komórek z linii HCT116 [16]. W tych samych regionach genów mitochondrialnych *MT-RNR1*, *MT--RNR2*, *MT-COII* i *MT-ATP6,* w tych samych komórkach, za pomocą sekwencjonowania bisulfitowego (BS – ang. *bisulfite sequencing*) zaobserwowano natomiast metylację na poziomie poniżej 1%, co sugeruje, że wysokie wartości metylacji uzyskane uprzednio są wynikiem ograniczeń technicznych i niewystarczającej czułości wykorzystanej metody analitycznej. Za pomocą pirosekwencjonowania, po reakcji z wodorosiarczynem, wykazano bardzo niski, lecz stały poziom metylacji mtDNA w różnych regionach mózgu osób zdrowych [19]. Podobnie niski poziom metylacji mtDNA wykryto w korze przedczołowej (0,37±0,04%), niezależnie od nici ani typu dinukleotydu (CG/CHG/CHH), z wyjątkiem kilku cytozyn w dinukleotydach CpG, szczególnie w pozycji m.545 w obrębie HSP1 w regionie pętli D (5,49±0,97%). Do tych badań zastosowano autorską strategię wykorzystującą sekwencjonowanie całego genomu po reakcji z wodorosiarczynem (WGBS – ang. *whole genome bisulfite sequencing*), a także niezależne techniki analityczne [20].

Za pomocą sekwencjonowania bisulfitowego mtDNA z krwi obwodowej zaobserwowano natomiast metylację na poziomie 2,59%±0,75% u zdrowych kobiet oraz 3,72%±1,83% u zdrowych mężczyzn [21]. W pracy badającej wpływ zanieczyszczeń powietrza na metylację mtDNA, u osób nienarażonych na cząstki stałe wykazano metylację genów *MT-TF* i *MT-RNR1* na poziomie 5,06±0,30% w kożuszku leukocytarno-płytkowym, za pomocą wysoce ilościowego pirosekwencjonowania PCR po reakcji z wodorosiarczynem (ang. *highly quantitative bisulfite-PCR pyrosequencing)* [22]. Wykorzystując pirosekwencjonowanie po reakcji z wodorosiarczynem, metylację wykazano w genie *MT-RNR2* oraz w pętli D mysiego i ludzkiego mtDNA [23]. Za pomocą sekwencjonowania nowej generacji, po reakcji z wodorosiarczynem (Illumina MiSeq), zidentyfikowano ponadto 54 ze 133 badanych miejsc CpG w mtDNA w krwi kobiet w wieku 18-91 lat, które wykazywały metylację na poziomie średnio 2-6%, ale jednocześnie charakteryzowały się silną specyficzną zmiennością osobniczą i zmiennością zależną od obszaru cząsteczki [24].

METYLACJA MTDNA MOŻE BYĆ WYŻSZA W DINUKLEOTYDACH NIE-CPG

Stosując metodę sekwencjonowania bisulfitowego wykazano wysoki poziom metylacji w pętli D mtDNA pochodzącego z krwi obwodowej oraz ludzkich kultur komórkowych. Co najważniejsze, zaobserwowano dwukrotnie wyższy poziom metylacji w dinukleotydach nie-CpG (35%) w porównaniu z dinukleotydami CpG (17%), przy czym metylacja ta była obecna wyłącznie na nici lekkiej mtDNA. Wyniki te podważają wiarygodność badań, w których globalny poziom metylacji mtDNA oceniano wyłącznie na podstawie poszczególnych pozycji CpG, ponieważ pomijanie metylacji w dinukleotydach nie-CpG mogło prowadzić do zaniżenia uzyskiwanych wartości [17].

Niesymetryczną metylację nie-CpG zaobserwowano również w genie *MT-COI* i pętli D mtDNA komórek śródbłonka, gdzie metylowane cytozyny formowały skupiska z najczęściej zmetylowanymi dinukleotydami CpA i CpG, a najrzadziej CpC [25].

Powyższe wyniki pokazują złożoność wiarygodnej oceny poziomu metylacji mtDNA. Dostępne dane wskazują jednak, że poziom metylacji CpG wynosi maksymalnie kilka procent, za to metylacja jest wyższa w innych rodzajach dinukleotydów. Jednym z istotnych elementów mogących wpływać na uzyskiwane poziomy metylacji i ich wiarygodność wydaje się być wybór techniki analitycznej.

FUNKCJONALNE ZNACZENIE METYLACJI MTDNA

Na podstawie powyższych wyników badań prowadzonych na różnych rodzajach komórek na przestrzeni wielu lat można założyć, że w mitochondriach metylacja zachodzi, choć w mniejszym stopniu i w innych regionach niż w nDNA. Fakt występowania metylacji nie stanowi sam w sobie dowodu na jej znaczenie biologiczne. W celu poznania

potencjalnej funkcji metylacji mtDNA wielokrotnie badano zależności między poziomem metylacji w różnych rejonach mtDNA a ekspresją genów mitochondrialnych (wpływ na transkrypcję) oraz liczbą kopii mtDNA (wpływ na replikację). Przedmiotem badań stał się również mechanizm metylacji mtDNA oraz potencjalny udział w niej metylotransferaz DNA, które ulegają ekspresji w jądrze komórkowym i odpowiadają za metylację nDNA. Istnienie specyficznego mechanizmu odpowiedzialnego za metylację mtDNA wskazywałoby na jej funkcjonalne znaczenie.

OBECNOŚĆ METYLOTRANSFERAZ DNA W MITOCHONDRIACH

DNMT1 była wielokrotnie wykrywana w obrębie mitochondrium, natomiast obecność DNMT3A i DNMT3B w tym organellum nie jest jednoznacznie określona. W komórkach z linii HCT116 nie wykryto w mitochondriach ani DNMT3A, ani DNMT3B [1,16,17,26]. W komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych zaobserwowano niski poziom DNMT3A [26], natomiast w komórkach HeLa oraz w mysich fibroblastach wykryto niskie poziomy DNMT3B [17]. Wskazuje to na tkankowo specyficzną obecność tych metylotransferaz DNA w mitochondriach. Potwierdza to m.in. analiza wykonana za pomocą immunoblottingu, w której wykazano tkankowo specyficzną obecność DNMT3A ze szczególnym wzbogaceniem w tkankach pobudliwych (mięśnie szkieletowe, neurony) [23]. DNMT3B również wykrywana była w mitochondriach tkankowo specyficznie [1].

Na funkcjonalne znaczenie DNMT1 w mitochondriach wskazuje wykrycie jej w interakcji z obszarem pętli D, a także obszarami kodującymi rRNA i białka, proporcjonalnie do obecności dinukleotydów CpG. Ponadto, zidentyfikowana została specyficzna mitochondrialna izoforma tego enzymu, posiadająca domenę kierującą do mitochondrium na jego N-końcu. Sekwencja kodująca tę domenę obecna jest w rejonie 5′ od miejsca startu transkrypcji genu kodującego DNMT1, a podwyższonej ekspresji ulega w warunkach stresu oksydacyjnego [16].

Usunięcie metylotransferazy DNMT1, DNMT3A lub DNMT3B z komórek powoduje zmniejszenie stopnia metylacji mtDNA w pozycjach CpG [17]. Ponadto obecność DNMT3A i DNMT3B mogłaby wyjaśnić przewagę metylacji nie-CpG w mitochondriach. Ich aktywność enzymatyczna może bowiem ulec zmianie, promując metylację CpH (gdzie H odpowiada A, T lub C) przy nieobecności DNMT3L, co obserwowano dotychczas w jądrze komórkowym [27].

Metylacja CpG nie jest jednak całkowicie eliminowana, a poziom metylacji CpH nie ulega istotnym zmianom, nawet w przypadku usunięcia wszystkich trzech metylotransferaz DNA. Sugeruje to obecność odrębnego mechanizmu metylacji w mitochondriach, oprócz tego opartego na metylotransferazach DNA znanych z jądra komórkowego [1,17].

WPŁYW METYLACJI MTDNA NA EKSPRESJĘ GENÓW MITOCHONDRIALNYCH

Wielokrotnie dowodzono negatywnej korelacji między stopniem metylacji mtDNA a poziomem ekspresji genów mitochondrialnych oraz liczbą kopii mtDNA [3]. Nadekspresja mtDNMT1 nasila jego wiązanie z mtDNA, w szczególności z obszarem regulatorowym, co skutkuje wzrostem poziomu jego metylacji. W efekcie zahamowaniu ulega ekspresja genów mitochondrialnych [28], jak również replikacja mtDNA, objawiająca się zmniejszoną liczbą kopii mtDNA. Zaburzona ekspresja metylotransferaz DNA wywołuje natomiast odwrotne efekty w postaci zwiększonego poziomu ekspresji genów mitochondrialnych i liczby kopii mtDNA [29].

Zależności te potwierdzono traktując komórki inhibitorami DNMT1: 5-Aza-2′-deoksycytydyną i adenowirusowym shRNA (ang. *short hairpin RNA*) skierowanym przeciwko DNMT1. Wywołało to spadek poziomu metylacji mtDNA. Wprowadzenie do komórek DNMT1 z sekwencją kierującą do mitochondriów wywołało obniżenie poziomu ekspresji wielu genów mitochondrialnych, m.in.: MT-ND4, MT-ND5, MT-ND6, MT-ATP6, MT-COI, MT-COIII. Spadł również poziom ATP w komórce w wyniku obniżenia aktywności oddychania komórkowego oraz zmniejszyła się liczba kopii mtDNA [26]. Potwierdza to dodatkowo funkcjonalne znaczenie DNMT1 w mitochondriach.

Z tych obserwacji nasuwa się wniosek, że mtDNMT1 odpowiada za metylację mtDNA, szczególnie w obrębie obszaru regulatorowego, co skutkuje obniżeniem efektywności transkrypcji i replikacji mtDNA. Regulacja ekspresji genów jest jednak procesem wysoce skomplikowanym i zależy od wielu różnych czynników. Z tego względu metylacja może wpływać zarówno hamująco jak i stymulująco na ekspresję genów i replikację DNA. Kontroluje ona dostępność do DNA czynników transkrypcyjnych, polimeraz RNA, topoizomeraz i inhibitorów białkowych wiążących do DNA, jak również bierze udział w kontroli replikacji DNA [4]. Przykładowo, wzrost efektywności metylacji cytozyny w pozycji m.545 znajdującej się w obrębie pierwszego miejsca inicjacji transkrypcji nici ciężkiej wewnątrz pętli D zwiększa powinowactwo białka TFAM do tego regionu, co z kolei skutkuje wzrostem ekspresji genów kontrolowanych zarówno przez HSP1, HSP2 oraz LSP [20]. Ponadto, w warunkach podwyższonej ekspresji mtDNMT1, wraz ze zmniejszeniem ekspresji genu *MT-ND1*, zaobserwowano wzrost ekspresji genu *MT-ND6* [16].

Wygląda więc, że zasadniczo metylacja mtDNA wpływa negatywnie na poziom ekspresji, jednak w poszczególnych pozycjach może mieć działanie odwrotne, prawdopodobnie pośrednio, przez wpływ na replikację. Dodatkowo efekt metylacji mtDNA na transkrypcję genów mitochondrialnych może być genowo specyficzny i potencjalnie tkankowo specyficzny.

TKANKOWO SPECYFICZNA METYLACJA mtDNA

Zawartość mitochondriów w komórkach różni się m.in. z powodu na różnic w zapotrzebowaniu energetycznym poszczególnych tkanek. Ze względu na udział mitoepigenetyki w regulacji ekspresji genów mitochondrialnych, wzór epigenetyczny z dużym prawdopodobieństwem również różni się w zależności od typu komórki. Wskazują na to

chociażby zidentyfikowane w mitochondriach tkankowo specyficzne metylotransferazy DNA [23,30].

Mimo względnie stałego rozłożenia metylacji cytozyn, w genomie mitochondrialnym obecne są konkretne *loci* (szczególnie w obrębie obszaru regulatorowego, ale również wewnątrz genów odpowiedzialnych za funkcje oddechowe mitochondriów), charakteryzujące się różnicami we wzorze metylacji w zależności od typu tkanki i etapu jej rozwoju. Mimo niewielkich zakresów zmienności, wystarczają one, aby skutecznie rozróżnić poszczególne tkanki. Co ciekawe, wzory metylacji konkretnych tkanek u różnych osób są do siebie bardziej podobne niż wzory metylacji różnych tkanek u jednej osoby. Świadczy to o wysoko tkankowo specyficznej naturze metylacji mtDNA [31,32].

WPŁYW STARZENIA NA METYLACJĘ mtDNA

W mtDNA wykazano korelację między poziomem metylacji a wiekiem [7], mającą zwykle charakter negatywny [24,29]. W grupie kobiet w wieku 18-91 lat, model predykcji łączący wiek z poziomem metylacji dwóch pozycji genomu mitochondrialnego wyjaśnił 50% zmienności metylacji. Trafność przewidywań była największa w grupach poniżej 59 roku życia. Wskazuje to na istnienie innych czynników mających istotny wpływ na poziom metylacji, których udział rośnie wraz z wiekiem. Możliwe, że jest to wynik akumulacji działania czynników środowiskowych i osobniczych wraz z upływem czasu [24].

Zmiana poziomu metylacji zachodzi również w mtDNA starzejących się komórek śródbłonka. W stosunku do komórek proliferujących zidentyfikowano u nich 25 pozycji hipometylowanych i 8 pozycji hipermetylowanych. Większość z nich znajdowała się w obrębie miejsca inicjacji replikacji nici ciężkiej wewnątrz pętli D. Zmianom tym towarzyszył wzrost ekspresji genu *MT-ND5* oraz wzrost liczby kopii mtDNA [25]. Stopniowy spadek metylacji regionów startowych genów (GSS - ang. *gene start sites*) *MT-ND6* i *MT-ATP6* zaobserwowano również w komórkach nerwowych mózgu wraz z jego rozwojem [31].

Wydaje się zatem, że poziom metylacji mtDNA zmienia się wraz z wiekiem, co ma wpływ na poziom ekspresji genów mitochondrialnych. Nie można stwierdzić czy zmiana taka jest niezależnym markerem starzenia, czy też jedynie wynikiem innych procesów zachodzących wraz z wiekiem.

PŁEĆ A METYLACJA mtDNA

U mężczyzn stwierdzono wyższy poziom metylacji mtDNA niż u kobiet, czemu odpowiadała mniejsza liczba kopii mtDNA. Różnice te mogą być wynikiem kontroli metabolizmu mitochondrialnego przez żeńskie hormony płciowe estrogeny, ponieważ wpływają one na system obrony antyoksydacyjnej [29]. W przypadku kobiet metylacja obszaru regulatorowego wyjaśnia większy procent zmienności liczby kopii mtDNA niż u mężczyzn, co sugeruje, że zmiany metylacji mtDNA u kobiet mają większy wpływ na funkcjonowanie mitochondriów [21].

Nie stwierdzono natomiast korelacji między stopniem metylacji cytozyny w pozycji m.545 w korze przedczołowej a płcią mimo, że jest to jedna z nielicznych pozycji w mtDNA, w których zaobserwowano istotny poziom metylacji [20]. W komórkach nowotworowych pacjentów z rakiem jelita grubego nie zaobserwowano podobnej zależności. Przypuszczać można, że na wzór i poziom metylacji mtDNA w pierwszej kolejności wpływa proces nowotworzenia, a w drugiej dopiero płeć [5,33].

Wydaje się zatem, że różnice w poziomie metylacji wynikające z różnic płciowych nie mają charakteru uniwersalnego i mogą być tkankowo specyficzne.

METYLACJA mtDNA A ZABURZENIA FUNKCJONOWANIA MITOCHONDRIÓW

Skoro metylacja cytozyn występuje w mtDNA i wpływa na ekspresję genów mitochondrialnych, to z dużym prawdopodobieństwem wpływa ona na prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów. Zmiana wzoru epigenetycznego mogłaby potencjalnie przyczyniać się do zaburzeń pracy tego organellum i prowadzić do rozwoju wielu chorób. W celu poznania tych zależności prowadzone są badania nad wpływem zmian wzoru metylacji mtDNA na występowanie zaburzeń różnego typu, szczególnie tych powiązanych z nieprawidłowym funkcjonowaniem mitochondriów.

CHOROBY NEURODEGENERACYJNE

Choroby neurodegeneracyjne charakteryzują się postępującą w czasie utratą komórek nerwowych, co w większości przypadków prowadzi do śmierci. Metody ich leczenia ograniczają się do łagodzenia objawów i spowalniania ich progresji [34]. Poznanie molekularnych mechanizmów stojących za ich rozwojem jest szczególnie istotne, ponieważ mogłoby przyczynić się do opracowania skutecznych terapii i działań prewencyjnych.

Najpowszechniej występującymi chorobami neurodegeneracyjnymi są choroba Alzheimera i choroba Parkinsona [34]. Obie powiązane są z zaburzeniami funkcjonowania mitochondriów spowodowanymi warunkami stresu oksydacyjnego. W komórkach nerwowych kory śródwęchowej pacjentów z chorobą Alzheimera zaobserwowano wyższy poziom metylacji w regionie pętli D oraz obniżony poziom w obrębie genu *MT-ND1*. W późniejszych stadiach choroby występuje również podwyższona ekspresja genu *MT-ND1*, co może być efektem zmian metylacji mtDNA na wcześniejszych etapach oraz warunków stresu oksydacyjnego [19]. Wyniki badań nie wskazują na jednoznaczną korelację poziomu metylacji mtDNA z występowaniem choroby Parkinsona. W istocie czarnej mózgu zaobserwowano zmniejszony poziom metylacji pętli D [19], ale w korze przedczołowej, gdzie ogólny poziom metylacji mtDNA był bardzo niski, nie wykazano jego korelacji z występowaniem choroby Parkinsona [20].

Stwardnienie zanikowe boczne (ALS, ang. *amyotrophic lateral sclerosis*) to choroba neurodegeneracyjna, której przy-

czyny są złożone i obejmują zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe. Dziedziczne formy ALS stanowią jedynie 10% wszystkich przypadków, z czego ponad 50% jest związanych z mutacjami w genach *C9orf72* lub *SOD1*. ALS, podobnie do chorób Alzheimera i Parkinsona, powiązane jest z zaburzeniami funkcjonowania mitochondriów i wysokim stresem oksydacyjnym. W limfocytach krwi pacjentów z ALS, wywołanym mutacjami w genie *SOD1*, wykryto obniżony poziom metylacji pętli D, który korelował ze zwiększoną liczbą kopii mtDNA. Zmiany w metylacji oraz wzrost intensywności replikacji mtDNA mogą być w tym przypadku efektem warunków stresu oksydacyjnego, ponieważ *SOD1* koduje dysmutazę ponadtlenkową biorącą udział w odpowiedzi antyoksydacyjnej. Podobne zależności zaobserwowano w przypadkach nierodzinnych, w przeciwieństwie do zdrowych kontroli i pacjentów z ALS wywołanym mutacjami w genie *C9orf72* [29]. Dalsze badania w tym zakresie mogłyby przybliżyć nieznane dotąd mechanizmy odpowiedzialne za rozwój sporadycznych przypadków ALS.

Związek ALS ze zmianami metylacji mtDNA wykazano również na transgenicznych myszach z mutacją *SOD1*. W komórkach mięśni szkieletowych i neuronach zaobserwowano podwyższony poziom DNMT3A w mitochondriach oraz obniżony poziom metylacji genu mitochondrialnego kodującego 16S rRNA już na wczesnych i przedobjawowych etapach choroby. Mechanizm odpowiedzialny za spadek metylacji przy wzroście poziomu DNMT3A jest nieznany, ale podejrzewa się, że może być to spowodowane nabyciem przez DNMT3A aktywności demetylazy w warunkach wysokiego stężenia Ca^{2+}. Co najważniejsze, w mysich modelach ALS wykazano, że zmiany we wzorze metylacji mtDNA mogą stymulować apoptozę neuronów motorycznych [23]. Z tego względu jest to istotny kierunek przyszłych badań na temat mechanizmów sprawczych ALS.

Zaburzeniami funkcjonowania mitochondriów charakteryzuje się również mózgowa, autosomalna dominująca arteriopatia z podkorowymi zawałami i leukoencefalopatią (CADASIL - ang. *Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leucoencephalopathy*). W komórkach z krwi obwodowej pacjentów z CADASIL zaobserwowano wyższą, w porównaniu do zdrowych kontroli, liczbę kopii mtDNA, korelującą z obniżonym poziomem metylacji obszaru regulatorowego [21].

Powyższe wyniki wskazują, że metylacja mtDNA może być kolejnym elementem stanowiącym podłoże molekularne wielu chorób neurodegeneracyjnych, wpływającym na metabolizm mitochondrialny pacjentów z tymi chorobami.

CHOROBY UKŁADU KRĄŻENIA

W płytkach krwi pacjentów z chorobami układu krążenia wykryto zwiększony, w porównaniu do zdrowych kontroli, poziom metylacji genów kodujących białka wchodzących w skład oksydazy cytochromu c (*MT-COI*, *MT-COII* i *MT-COIII*), a także genu kodującego mitochondrialny tRNA leucynowy (*MT-TL1*). Poziom metylacji genów kodujących białka wchodzące w skład syntazy ATP (*MT-ATP6* i *MT-ATP8*) oraz dehydrogenazy NADH (*MT-ND5*) nie uległ zmianie. Wskazuje to na specyficzność genową regulacji metylacji genów mitochondrialnych w płytkach krwi u osób z chorobami układu krążenia [30].

Komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych u osób z niedrożnością tętnic charakteryzują się zmniejszeniem intensywności oddychania mitochondrialnego oraz utratą zdolności do skurczu. Zaobserwowano, że u pacjentów DNMT1 kierowana jest do mitochondriów, gdzie wywołuje hipermetylację pętli D i w efekcie hamuje ekspresję genów mitochondrialnych. U pacjentów wykazano zmniejszoną aktywność kompleksów I i IV łańcucha transportu elektronów, natomiast nie stwierdzono zmiany aktywności kompleksu II, który jako jedyny z kompleksów łańcucha oddechowego kodowany jest w całości w genomie jądrowym [26].

Na mysich modelach niedrożności tętnic wykazano, że prawidłowa kurczliwość komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych mogła być przywrócona poprzez transplantację do nich *ex vivo* mitochondriów pozbawionych DNMT1. Wprowadzenie do komórek DNMT1 z sekwencją kierującą do mitochondrium powodowało natomiast zahamowanie ekspresji wielu genów mitochondrialnych odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie tego organellum. Wywoływało to zmniejszenie aktywności oddychania komórkowego, zmniejszenie poziomu ATP w komórce, zmniejszenie stężenia Ca^{2+} i zmniejszenie liczby kopii mtDNA, a w efekcie zmniejszenie kurczliwości komórek [26].

Obserwacje te wskazują, że metylacja pętli D przez DNMT1 jest przyczyną zmniejszenia poziomu ATP w komórce, a w efekcie zaburzeń kurczliwości tych komórek. Odwracalność tego procesu, wykazana na mysich modelach, mogłaby zostać wykorzystana w potencjalnych terapiach osób z niedrożnością tętnic.

CHOROBY METABOLICZNE I OTYŁOŚĆ

Otyłość związana jest ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na cukrzycę typu II oraz choroby układu krążenia, a także z występowaniem zaburzeń metabolizmu glukozy i tłuszczów, które w dużym stopniu zachodzą w mitochondriach [35]. Cukrzycy typu II często towarzyszą powikłania, a jednym z nich jest retinopatia cukrzycowa [28].

We krwi osób otyłych z niewrażliwością na insulinę oraz w komórkach naczyń krwionośnych siatkówki oka osób z retinopatią cukrzycową występuje wyższy poziom metylacji pętli D mtDNA w porównaniu do osób zdrowych. Prawdopodobnie spowodowane jest to hiperglikemią prowadzącą do zaburzeń funkcjonowania mitochondriów i produkcji ROS uszkadzających łańcuch oddechowy. W wyniku obniżonej aktywności łańcucha oddechowego spada poziom NAD^+. SIRT1 to zależna od NAD^+ deacetylaza hamująca aktywność DNMT1. Warunki stresu oksydacyjnego prowadzą więc do obniżenia aktywności SIRT1, a tym samym podwyższenia aktywności DNMT1. Skutkuje to zwiększonym poziomem metylacji mtDNA, a w konsekwencji zahamowaniem transkrypcji i replikacji mtDNA, pogłębieniem dysfunkcji mitochondriów i zaburzeniem sygnalizacji insulinowej [28,35]. Metylacja mtDNA uczestniczy zatem w

inicjowaniu zaburzeń metabolicznych, które sprzyja rozwojowi cukrzycy typu 2.

Zmiany wzoru metylacji mtDNA zaobserwowano również u pacjentów z niealkoholowym stłuszczeniowym zapaleniem wątroby, charakteryzującym się zaburzonym metabolizmem tłuszczów w mitochondriach wywołanym stresem oksydacyjnym. U pacjentów wykazano podwyższony poziom metylacji genu mitochondrialnego *MT-ND6*, co skutkowało obniżeniem jego ekspresji [7].

Dane sugerują, że przynajmniej częściowo za dysfunkcję miotochondriów obserwowaną w niektórych chorobach metabolicznych może odpowiadać zaburzenie metylacji mtDNA.

CHOROBY NOWOTWOROWE

Komórki nowotworowe charakteryzują się podwyższonym poziomem metylacji jądrowego DNA, co wiąże się ze zmianami w ekspresji wielu genów [33]. Hipermetylacja wysp CpG w regionach promotorowych może np. prowadzić do wyciszania genów supresorowych i w efekcie zaburzać takie procesy jak cykl komórkowy czy apoptoza. Z nowotworzeniem wiążą się zmiany w funkcjonowaniu mitochondriów, które objawiają się m.in. zmianami w metabolizmie glukozy [4,33]. Ponieważ mitoepigenetyka wpływa na prawidłową pracę mitochondriów, jej rola w procesie nowotworzenia jest przedmiotem licznych badań.

W komórkach nowotworowych osób z rakiem jelita grubego, kostniakomięsakami lub glejakami wielopostaciowymi wielokrotnie wykazywano hipometylację mtDNA w obrębie pętli D w porównaniu do tkanek nienowotworowych. Zauważono także jej korelację ze zwiększoną liczbą kopii mtDNA i podwyższoną ekspresją genu mitochondrialnego *MT-ND2* [4,5,33].

Gen mitochondrialny *MT-ND2* koduje białko wchodzące w skład kompleksu I łańcucha oddechowego będącego enzymem limitującym fosforylacji oksydacyjnej. Wzrost jego ekspresji może skutkować wydajniejszym procesem syntezy ATP. Jest to szczególnie istotne w przypadku komórek nowotworowych, ze względu na ich bardzo wysokie zapotrzebowanie energetyczne [5,33].

Z drugiej strony istnieją badania wskazujące brak wpływu metylacji mtDNA na ekspresję genów w kontekście nowotworzenia [4]. Może to być spowodowane m.in. specyficznością komórkową regulacji epigenetycznej, co potwierdza wywołanie stymulacji proliferacji, hamowania apoptozy oraz wzrostu liczby kopii mtDNA przez czynnik hipometylacji 5-aza-2′-deoksycytydynę (5-AZA) tylko w dwóch z sześciu badanych linii komórkowych raka jelita grubego [36].

Można wnioskować, że jednoznaczne określenie udziału zmienności epigenetycznej mtDNA w nowotworzeniu jest równie trudne jak ocena wpływu zmienności genetycznej tego genomu.

Lepsze zrozumienie zależności pomiędzy metylacją mtDNA a procesami nowotworzenia mogłoby przyczynić się do wykorzystania jej jako potencjalnego markera diagnostycznego do wczesnego wykrywania nowotworów [4].

POTENCJAŁ TERAPII EPIGENETYCZNYCH

Ze względu na zależności między występowaniem różnych typów chorób a stopniem metylacji mtDNA, jest ona rozważana jako potencjalny biomarker diagnostyczny wielu schorzeń [13]. Wykazano, że m.in. wzór metylacji wybranych genów mitochondrialnych w płytkach krwi charakteryzuje się wysoką wartością predykcyjną w kontekście chorób układu krążenia, w tym nadciśnienia tętniczego [30].

Istotną cechą modyfikacji epigenetycznych jest ich odwracalny charakter, stwarzający możliwość modulacji epigenetycznej regulacji ekspresji genów mitochondrialnych, a tym samym szansę na przywrócenie prawidłowego funkcjonowania mitochondriów przez ukierunkowane interwencje terapeutyczne [7,13]. Takie podejście byłoby jednak uzasadnione jedynie w przypadku gdyby zmiany metylacji mtDNA stanowiły przyczynę zaburzeń mitochondrialnych, podczas gdy w wielu sytuacjach związek przyczynowo-skutkowy między tymi zjawiskami nie został jednoznacznie określony [19]. Istnieją przesłanki sugerujące przyczynową rolę modyfikacji epigenetycznych w rozwoju tych zaburzeń.

Jedną z nich jest fakt, że w wielu przypadkach zmiany w metylacji mtDNA występują w bardzo wczesnych, często przedobjawowych etapach chorób. Sytuację taką wykazano m.in. w przypadku choroby Alzheimera [29], a także transgenicznych myszy z mutacją w genie *SOD1*, będących modelami ALS [23]. Podobnie w komórkach nowotworowych, zaburzenia we wzorze metylacji występują zarówno na zaawansowanych jak i wczesnych etapach rozwoju raka jelita grubego, a także w komórkach, które nie wykazują jeszcze objawów nowotworzenia [5]. Istnieją jednak hipotezy twierdzące, że zwiększenie liczby kopii mtDNA oraz poziomu ekspresji genów mitochondrialnych wynikające z obniżenia stopnia metylacji, jest mechanizmem rekompensującym zaburzenia mitochondriów wynikające z warunków stresu oksydacyjnego oraz zwiększonego zapotrzebowania energetycznego w przypadku wielu chorób metabolicznych lub nowotworów [29]. W takiej sytuacji zmiany epigenetyczne stanowiłyby skutek, a nie przyczynę wystąpienia zaburzeń pracy mitochondriów.

Bydlęce komórki śródbłonka siatkówki oka hodowane w warunkach podwyższonego stężenia glukozy, stanowiące model *in vitro* retinopatii cukrzycowej, charakteryzują się zwiększonym poziomem transkrypcji DNMT1, zwiększoną metylacją w obrębie pętli D, zmniejszoną ekspresją niektórych genów mitochondrialnych, a także zwiększonym stopniem zachodzenia apoptozy w stosunku do komórek hodowanych w warunkach kontrolnych (bez podwyższonego stężenia glukozy). Zahamowanie aktywności DNMT1 spowodowało zanik ww. zmian, co sugeruje że podwyższony poziom metylacji wywołany aktywnością DNMT1 przy-

czyniał się do intensyfikacji programowanej śmierci tych komórek [28].

Zwiększona ekspresja mitochondrialnej formy DNMT1 powoduje również hipermetylację mtDNA i zahamowanie ekspresji wielu genów mitochondrialnych, a w efekcie obniżenie syntezy ATP i ograniczenie zdolności do skurczu komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Potwierdza to przywrócenie prawidłowej kurczliwości komórek w przypadku dostarczenia do komórek mitochondriów pozbawionych DNMT1 [26].

Te dwie sytuacje wskazują na rzeczywistą rolę zaburzeń wzoru metylacji mtDNA na rozwój zaburzeń funkcjonowania mitochondriów. Sugerują także, że metylację tę można kontrolować przez regulację aktywności DNMT1, co może w przyszłości stać się punktem wyjścia do terapii epigenetycznych.

SPOSOBY WPŁYWANIA NA MODYFIKACJE EPIGENETYCZNE

Jednym z inhibitorów metylotransferaz jest 5-aza-2′-deoksycytydyna (5-AZA), - analog cytydyny trwale blokujący aktywność tych enzymów, a w efekcie przyczyniający się do pasywnej demetylacji [36]. Jest ona wykorzystywana w kontekście nDNA w terapiach osób z nowotworami, wykazano bowiem, że 5-AZA wywołuje spadek żywotności komórek linii nowotworowych, stymuluje apoptozę i zatrzymuje cykl komórkowy [36]. Ponadto, związek ten zwiększa podatność komórek nowotworowych na leki oraz stymuluje odpowiedź immunologiczną [37,38]. Wykazano, że stosowanie 5-AZA hamuje aktywność DNMT1 również w mitochondriach, co skutkuje demetylacją pętli D [26], ale na ten moment nie wydaje się, żeby związek ten miał znaczenie terapeutyczne w kontekście mitochondriów. 5-AZA oraz związki pochodne, np.: 5-azacytydyna, wykazują niską stabilność, a w wysokich dawkach mogą być toksyczne, co ogranicza możliwość wykorzystywania ich w terapiach.

W kontekście mitochondrium można by stosować metylotransferazy, które nakierowane byłyby na konkretne regiony mtDNA dzięki specyficznym domenom wiążącym DNA. W tym przypadku zagrożeniem mogłaby być niespecyficzna aktywność tych enzymów, którą można jednak ograniczyć stosując metylotransferazy o obniżonej aktywności lub systemy dwuskładnikowe. Kolejnym sposobem regulacji jest wykorzystanie antysensowych oligonukleotydów skierowanych przeciwko mRNA kodujących metylotransferazy działające w mitochondriach [39].

Innym podejściem jest regulacja wzoru metylacji poprzez aktywną demetylację z wykorzystaniem enzymów TET przekształcających 5-mC do 5-hmC lub innych związków będących demetylazami DNA np.: glikozylaza DNA tyminy [39,40].

CHARAKTERYSTYKA TERAPII EPIGENETYCZNYCH

Wykorzystywanie modyfikacji epigenetycznych w terapiach jest szczególnie atrakcyjne ze względu na trwałość efektu ich działania. Zmiany ekspresji genów wywołane modyfikacją wzoru metylacji mogą być przekazywane przez podziały komórkowe, zapewniając trwałą zmianę nawet po usunięciu czynnika modulującego np.: metylotransferazy [39].

Ze względu na tkankowo-specyficzny charakter modyfikacji epigenetycznych, niezbędne byłoby jednak opracowanie systemu umożliwiającego dostarczanie ich do wybranych tkanek lub typów komórek, co stanowi istotne wyzwanie technologiczne. Ponadto, ekspresja genów podlega wielopoziomowej i złożonej regulacji, w związku z czym, wprowadzenie pojedynczej zmiany we wzorze epigenetycznym może prowadzić do efektów odmiennych od założonego celu. Z tego względu szczególnie istotne jest dogłębne poznanie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw regulacji epigenetycznej, zanim możliwe będzie bezpieczne i skuteczne wykorzystanie modyfikacji epigenetycznych w zastosowaniach klinicznych. Dotyczy to zwłaszcza mitoepigenetyki, która pozostaje obszarem słabo poznanym, wymagającym dalszych badań podstawowych [39].

HYDROKSYMETYLACJA MITOCHONDRIALNEGO DNA – OBECNOŚĆ I ROLA

W genomie mitochondrialnym na istotnym poziomie występuje również hydroksymetylacja DNA [16,17,41] i – w przeciwieństwie do DNA jądrowego - obecna jest równie często w dinukleotydach CpH, co dinukleotydach CpG. Sugeruje to występowanie w mitochondriach oddzielnego mechanizmu odpowiedzialnego za powstawanie tej modyfikacji epigenetycznej, choć we frakcji mitochondrialnej wielokrotnie wykrywano obecność enzymów z rodziny TET, odpowiedzialnych za enzymatyczne utlenienie 5-mC do 5-hmC w jądrze komórkowym [42]. Na przykład w mitochondriach komórek HeLa wykazano obecność białek TET1 i TET2, a w mitochondriach mysich fibroblastów - TET1 [17,41]. Na związek enzymów TET z hydroksymetylacją mtDNA wskazuje m.in. wzrost poziomu hydroksymetylacji mtDNA korelujący ze wzrostem ekspresji genu kodującego białko TET2 po urazie niedokrwienno reperfuzyjnym, w którego przebiegu obserwuje się spadek ekspresji wielu genów mitochondrialnych i obniżenie produkcji ATP w komórkach. Zastosowanie inhibitora enzymów TET wyeliminowało zmiany epigenetyczne i transkrypcyjne w mitochondriach, w wyniku czego zmniejszył się efekt obniżenia produkcji ATP. Te obserwacje stawiają enzym TET2 jako potencjalny cel terapeutyczny podczas leczenia pacjentów po urazie niedokrwiennym [43].

Funkcje hydroksymetylacji DNA są dużo słabiej poznane niż jego metylacji, szczególnie w mitochondriach. Ze względu na jej stosunkowo powszechne i odmienne od nDNA rozłożenie w mtDNA podejrzewa się jednak, że pełni ona istotną rolę w regulacji ekspresji genów, a nie stanowi jedynie produktu pośredniego procesu demetylacji [42]. Potwierdza to obserwacja spadku poziomu hydroksymetylacji mtDNA w korze mózgu myszy starych (24 miesiące) w porównaniu do myszy dorosłych (4 miesiące), korelującego ze wzrostem transkrypcji genów mitochondrialnych kodujących białka będące podjednostkami dehydrogenazy NADH. Jednocześnie u myszy starszych nie wykryto zmian

w poziomie metylacji w stosunku do myszy młodszych. Ze względu na niewystarczający stan obecnej wiedzy, nie można jednoznacznie powiązać ww. zmian epigenetycznych ze wzrostem ekspresji tych genów [41].

TECHNIKI ANALITYCZNE WYKORZYSTYWANE DO BADANIA METYLACJI mtDNA

Rozbieżności w wynikach badań nad metylacją mtDNA mogą być efektem ograniczeń poszczególnych z nich, ponieważ każda metoda analityczna charakteryzuje się zestawem własnych zalet i wad [20]. Genom mitochondrialny różni się strukturalnie od genomu jądrowego, dlatego podczas jego analizy należy zwrócić szczególną uwagę na niektóre aspekty mogące wpływać na wiarygodność uzyskanych wyników. Są to m.in. kolistość cząsteczki mtDNA, czy obecność wysoce podobnych do mitochondrialnego DNA sekwencji jądrowego DNA (NUMTs - ang. *nuclear mitochondrial DNA sequences*). Z tego względu wymagane mogą okazać się linearyzacja mtDNA, izolacja i oczyszczenie mtDNA z badanego materiału lub inne działania zależne od wykorzystywanej techniki [3,11].

SEKWENCJONOWANIE BISULFITOWE

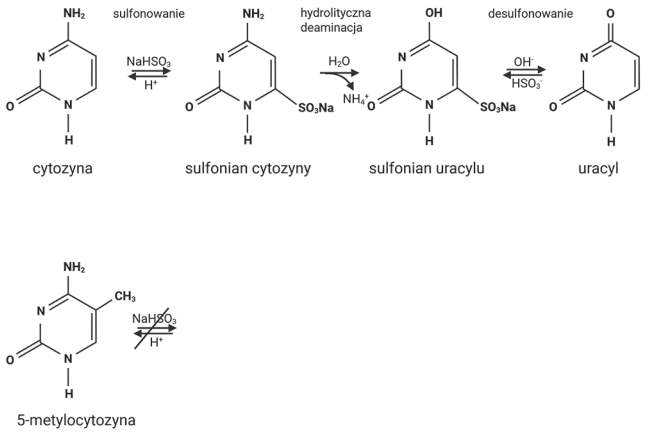
Najpowszechniej wykorzystywaną i dobrze poznaną metodą detekcji metylacji DNA jest sekwencjonowanie DNA po reakcji z wodorosiarczynem sodu. Pod jego wpływem niezmetylowane cytozyny przekształcane są do uracylu, natomiast 5-metylocytozyny nie ulegają modyfikacji (Ryc. 3). Cząsteczki DNA poddane działaniu wodorosiarczynu wykorzystywane są następnie jako matryca w reakcji PCR, której produkty posiadają tyminę w miejscu niezmetylowanych cytozyn. Otrzymane fragmenty sekwencjonuje się i porównuje do pierwotnej, niezmodyfikowanej cząsteczki DNA, by określić, które tyminy są przekształconymi cytozynami [13,44]. Dzięki tej technice można wykryć metylację DNA na obu niciach cząsteczki z rozdzielczością do pojedynczych zasad, co jest istotne w kontekście analizy wpływu położenia metylacji na ekspresję genów [3,27].

Wpływ tła i fałszywie pozytywnych wyników jest tym większy im niższa jest rzeczywista zawartość zmetylowanych cytozyn. Warto za każdym razem przeprowadzać kontrolę negatywną z użyciem cząsteczki pozbawionej metylacji w celu określenia czułości metody, tym bardziej, że błędy mogą pojawiać się również na etapach poprzedzających sekwencjonowanie. Jest to szczególnie istotne w kontekście mitochondrialnego DNA, w którym stwierdzane poziomy metylacji były do tej pory niskie [18] .

W celu zajścia pełnej konwersji cytozyn do uracylu pod wpływem wodorosiarczynu sodu cząsteczka DNA musi występować w formie jednoniciowej, dlatego przed reakcją poddaje się ją denaturacji. mtDNA ma kolistą, superskręconą strukturę, co zwiększa jego skłonność do renaturacji. Obecność dwuniciowego mtDNA w mieszaninie reakcyjnej obniża wydajność konwersji C→A, prowadząc do wyników fałszywie pozytywnych [45,46]. Linearyzacja cząsteczki mtDNA zmniejsza ryzyko niepełnej konwersji, jednak nie eliminuje go całkowicie, ponieważ mtDNA może nie ulec całkowitemu przekształceniu do formy liniowej lub renaturować, odtwarzając kolistą strukturę [3,18]. Ograniczenie wpływu fałszywie pozytywnych wyników jest możliwe również poprzez zaprojektowanie odpowiednich starterów do reakcji PCR, komplementarnych do hipotetycznie całkowicie przekonwertowanej cząsteczki [18]. Jednak nawet w przypadku zastosowania wszystkich wyżej wymienionych środków ostrożności konieczne może okazać się wykonanie kontroli pozytywnej z użyciem cząsteczki o znanym poziomie metylacji w celu ustalenia rzeczywistego stopnia niepełnej konwersji.

W wyniku traktowania cząsteczki DNA wodorosiarczynem obecne w niej 5-hydroksymetylocytozyny (5-hmC) przekształcane są do 5-metylenosulfonianów cytozyny, które tak samo jak niezmodyfikowane 5-metylocytozyny rozpoznawane są jako cytozyna w reakcji PCR [47]. Sekwencjonowanie bisulfitowe nie jest więc odpowiednie do rozpoznawania tych dwóch modyfikacji epigenetycznych między sobą [48]. W tym celu należałoby wykonać kolejne analizy takie jak glikozylacja (grupa glikozylowa przyłącza się wyłącznie do 5-hmC), a następnie glukozo-wrażliwe cięcie [27] lub immunoprecypitacja z zastosowaniem przeciwciał anty-5mC i anty-5hmC [2]. Ponadto 5-metylenosulfoniany cytozyny hamują polimerazy w reakcji PCR, co sprawia, że regiony bogate w 5-hmC mogą dawać zaniżone wartości w ilościowych analizach metylacji [27,47].

Sekwencjonowanie bisulfitowe nie wymaga izolacji i oczyszczania mtDNA z mieszaniny całkowitego DNA komórkowego, ale wiąże się to z ryzykiem błędnego przypisania produktów sekwencjonowania podczas analizy uzyskanych sekwencji, ze względu na obecność NUMTs [11,27]. Sekwencje jądrowe mogą zostać uznane za mitochondrialne, co skutkuje fałszywie pozytywnymi wynikami, ponieważ nDNA charakteryzuje się wyższą zawartością metylacji niż mtDNA. Zawyżenie poziomu metylacji może być również efektem błędnego przypisania fragmentów mtDNA do DNA jądrowego. Dzieje się tak głównie w przypadku fragmentów, w których niezmetylowane cytozyny uległy konwersji do tymin, co zmniejsza ich powinowactwo do mtDNA i zwiększa ryzyko przypisania do nDNA. W konsekwencji dochodzi do sztucznego wzrostu stosunku



Rycina 3. Przebieg konwersji wodorosiarczynem.Cytozyna ulega konwersji do uracylu, 5-metylocytozyna nie ulega konwersji. Stworzone w programie BioRender, Tońska, K. (2025)

cytozyn metylowanych do niezmetylowanych w mtDNA [20].

Najlepszą strategią mapowania metylacji ograniczającą wpływ NUMTs na wyniki jest przyrównywanie uzyskanych danych do referencyjnego mtDNA, a nie całego genomu człowieka. Nie eliminuje to jednak całkowicie zagrożenia związanego z NUMTs, dlatego zaleca się potwierdzenie uzyskanych wyników innymi metodami lub izolować i oczyszczać mtDNA przed wykonaniem analiz w celu usunięcia zanieczyszczeń nDNA z próbek [20,24].

METYLO-WRAŻLIWE TRAWIENIE ENZYMATYCZNE

Metodą powszechnie wykorzystywaną we wczesnych badaniach nad metylacją mtDNA było trawienie restrykcyjne z zastosowaniem metylo-zależnych endonukleaz. Umożliwia ona uzyskanie informacji na temat wzoru metylacji z dokładnością do pojedynczych nukleotydów [27]. Dokładność wyników zmniejsza natomiast ryzyko niepełnego trawienia cząsteczek DNA [48] oraz potencjalne zanieczyszczenia nDNA. Zaleca się izolować i oczyszczać mtDNA, a także ustalać wysokość tła przed dokonaniem analiz [27]. Co istotne, wykorzystywane w przeszłości enzymy kierowane były wyłącznie na miejsca CpG, z pominięciem pozostałych cytozyn w ułożeniu nie-CpG. W związku z nowszymi badaniami wskazującymi na powszechność metylacji poza miejscami CpG w genomie mitochondrialnym człowieka, badania wykonywane z wykorzystaniem tej techniki nie stanowią wiarygodnego źródła informacji na temat poziomu metylacji w mtDNA [17].

IMMUNOPRECYPITACJA

Immunoprecypitacja DNA z użyciem przeciwciał anty-5mC jest techniką pozwalającą na analizę metylacji DNA z odróżnieniem 5-mC od 5-hmC (przeciwciała anty-5hmC), co sprawia, że jest stosunkowo często wykorzystywana w badaniach epigenetycznych [3,16,17]. Metoda ta posiada jednak istotne ograniczenia techniczne, które zmniejszają jej atrakcyjność. Głównym z nich jest niska wiarygodność wyników dla fragmentów DNA z małą zawartością zmetylowanych cytozyn, która może prowadzić do znacznego zawyżenia poziomu metylacji [24,48]. Jest to szczególnie istotne w przypadku mtDNA, w którym metylacja występuje na bardzo niskim poziomie. Wymagane jest również ustalanie wysokości tła, tzn. aktywności przeciwciał w niezmetylowanych regionach. Ponadto, rozdzielczość tej techniki ograniczona jest do określania średniego poziomu metylacji, a nie metylacji konkretnych pozycji w cząsteczce. Dodatkowo, podobnie jak w przypadku sekwencjonowania bisulfidowego, należy zwracać uwagę na zanieczyszczenia nDNA [27].

INNE TECHNIKI ANALIZY METYLACJI

Inne metody są dużo rzadziej wykorzystywane. Jedną z nich jest spektrometria mas, której rozdzielczość ogranicza się do średniego poziomu metylacji dla danej cząsteczki DNA [27,48]. Wymaga ona oczyszczonego mtDNA, a wyniki mogą być zaburzone, jeśli dojdzie do niekompletnej hydrolizy DNA [3,27].

Inną wykorzystywaną techniką jest ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*), która do detekcji metylacji wykorzystuje specyficzne przeciwciała anty-5mC oraz anty-5hmC [3]. Metoda ta wymaga wyizolowanego i oczyszczonego mtDNA, a także każdorazowego ustalania wysokości tła (aktywność przeciwciał na obszarach niezmetylowanych). ELISA informuje jedynie o średnim poziomie metylacji danej cząsteczki DNA [27], a jeśli wyniki normalizowane są względem standardu z zestawów komercyjnych o nieznanych sekwencjach, nie daje informacji o rzeczywistym poziomie metylacji w cząsteczce [48]. Techniczne ograniczenia ELISA mogą być przyczyną trudności w wykrywaniu niskich poziomów metylacji i w efekcie niewiarygodnych wyników w przypadku mtDNA [24].

JAKĄ METODĘ BADANIA METYLACJI WYBRAĆ?

Jak zawsze, wybór metody analitycznej jest uzależniony od celu i zakresu badania. Powyższe metody różnią się czułością, zdolnością do odróżnienia metylacji od hydroksymetylacji oraz rozdzielczością. Najczulszą metodą jest sekwencjonowanie następnej generacji po konwersji wodorosiarczynem. Przy pokryciu rzędu 1000 odczytów pozwala na zaobserwowanie różnic nawet 1% [49], podczas gdy metylo-wrażliwe trawienie enzymatyczne czy immunoprecypitacja w najlepszych przypadkach pozwalają na zaobserwowanie różnic kilkuprocentowych. Biorąc pod uwagę fakt, że do wiarygodnej analizy wielokopiowego genomu jakim jest mtDNA zwykle wykorzystuje się nawet wyższe pokrycie, sekwencjonowanie bisulfitowe może służyć do wykrycia różnic w metylacji poniżej 1%.

Metylację od hydroksymetylacji najłatwiej można rozróżnić przy zastosowaniu immunoprecypitacji, która ma niewielką rozdzielczość i nie pozwala na określenie, które dokładnie pozycje są metylowane. Niewątpliwie zaś metylo-wrażliwe trawienie enzymatyczne jest metodą najtańszą. Pozwala jednak na bardzo ograniczoną analizę wybranych miejsc restrykcyjnych.

Gwarancją uzyskania wiarygodnych i obejmujących wiele aspektów metylacji wyników mogłoby zatem być wykorzystanie dwóch metod – wysokoprzepustowego sekwencjonowania bisulfitowego i immunoprecypitacji. Jednocześnie warunkiem sukcesu jest zastosowanie odpowiednich kontroli o znanym poziomie metylacji.

PODSUMOWANIE

Pomimo kontrowersji związanych z występowaniem metylacji cytozyn w genomie mitochondrialnym, wiele badań wskazuje nie tylko na jej obecność [21,22,24], ale również na pełnienie przez nią istotnych funkcji biologicznych związanych z regulacją ekspresji genów mitochondrialnych [4,26,29]. Analizy te wskazują jednocześnie na istnienie wspólnych mechanizmów epigenetycznych działających we wszystkich tkankach jak i wysoce tkankowo specyficznych. Na poziom metylacji wpływ może mieć także wiek czy płeć. Z drugiej strony, nie można przeceniać wpływu metylacji mtDNA, np.: wpływ samego procesu nowotwo-

rzenia maskuje zmiany w poziomie metylacji mtDNA związane z wiekiem [5,33].

Istotnym zagadnieniem w badaniach metylomu mitochondrialnego jest dobór właściwej metody badawczej. Mimo intensyfikacji badań nie istnieje na ten moment idealna metoda detekcji metylacji mtDNA. Aby wyeliminować wynikające z nich błędy należy zastosować odpowiednie działania i środki ostrożności np.: przeprowadzić linearyzację cząsteczki mtDNA oraz dostosować strategię mapowania metylacji [20]. Optymalna może okazać się izolacja mtDNA z całkowitego DNA komórkowego i jego dokładne oczyszczenie. Ogranicza to bowiem wpływ zanieczyszczeń nDNA oraz zwiększa wiarygodność wyników [32]. Warto stosować kontrole zarówno pozytywne jak i negatywne, ponieważ pozwoli to ustalić czułość metody oraz uniknąć błędów wynikających z wieloetapowej analizy. Jest to szczególnie istotne w przypadku mtDNA, gdzie poziom metylacji zdaje się być bardzo niski i wszelkie błędy techniczne mogą mieć istotne znaczenie podczas interpretacji wyników [18]. Istotne jest również analizowanie metylacji na poziomie pojedynczych nukleotydów, co daje możliwość określenia wzoru metylacji oraz stopnia metylacji poszczególnych pozycji w genomie mitochondrialnym człowieka. Optymalną strategią jest wykorzystywanie jednocześnie kilku metod potwierdzających obecność metylacji mtDNA [21].

PIŚMIENNICTWO

1. Bellizzi D (2017) Mitochondrial genome and epigenome two sides of the same coin. *Front Biosci* 22: 888–908
2. Chinnery PF, Elliott HR, Hudson G, Samuels DC, Relton CL (2012) Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases. *Int J Epidemiol* 41: 177–187
3. Coppedè F, Stoccoro A (2019) Mitoepigenetics and neurodegenerative diseases. *Front Endocrinol* 10: 86
4. Dong Z, Pu L, Cui H (2020) Mitoepigenetics and its emerging roles in cancer. *Front Cell Dev Biol* 8: 4
5. Gao J, Wen S, Zhou H, Feng S (2015) De-methylation of displacement loop of mitochondrial DNA is associated with increased mitochondrial copy number and nicotinamide adenine dinucleotide subunit 2 expression in colorectal cancer. *Mol Med Rep* 12: 7033–7038
6. Matilainen O, Quirós PM, Auwerx J (2017) Mitochondria and epigenetics – crosstalk in homeostasis and stress. *Trends Cell Biol* 27: 453–463
7. Mposhi A, Liang L, Mennega KP, Yildiz D, Kampert C, Hof IH, Jellema PG, de Koning TJ, Faber KN, Ruiters MHJ, Niezen-Koning KE, Rots MG (2022) The mitochondrial epigenome: an unexplored avenue to explain unexplained myopathies? *Int J Mol Sci* 23: 2197
8. Basu U, Bostwick AM, Das K, Dittenhafer-Reed KE, Patel SS (2020) Structure, mechanism, and regulation of mitochondrial DNA transcription initiation. *J Biol Chem* 295: 18406–18425
9. Shaughnessy DT, McAllister K, Worth L, Haugen AC, Meyer JN, Domann FE, Van Houten B, Mostoslavsky R, Bultman SJ, Baccarelli AA, Begley TJ, Sobol RW, Hirschey MD, Ideker T, Santos JH, Copeland WC, Tice RR, Balshaw DM, Tyson FL (2014) Mitochondria, energetics, epigenetics, and cellular responses to stress. *Environ Health Perspect* 122: 1271–1278
10. Pinto M, Moraes CT (2014) Mitochondrial genome changes and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1842: 1198–1207
11. Byun H-M, Baccarelli AA (2014) Environmental exposure and mitochondrial epigenetics: study design and analytical challenges. *Hum Genet* 133: 247–257
12. Lacal I, Ventura R (2018) Epigenetic inheritance: concepts, mechanisms and perspectives. *Front Mol Neurosci* 11: 292
13. Stoccoro A, Coppedè F (2021) Mitochondrial DNA methylation and human diseases. *Int J Mol Sci* 22: 4594
14. Li E, Zhang Y (2014) DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6: a019133
15. Maresca A (2015) DNA methyltransferase 1 mutations and mitochondrial pathology: is mtDNA methylated? *Front Genet* 6: 90
16. Shock LS, Thakkar PV, Peterson EJ, Moran RG, Taylor SM (2011) DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 3630–3635
17. Bellizzi D, D'Aquila P, Scafone T, Giordano M, Riso V, Riccio A, Passarino G (2013) The control region of mitochondrial DNA shows an unusual CpG and non-CpG methylation pattern. *DNA Res* 20: 537–547
18. Owa C, Poulin M, Yan L, Shioda T (2018) Technical adequacy of bisulfite sequencing and pyrosequencing for detection of mitochondrial DNA methylation: sources and avoidance of false-positive detection. *PLoS ONE* 13: e0192722
19. Blanch M, Mosquera JL, Ansoleaga B, Ferrer I, Barrachina M (2016) Altered mitochondrial DNA methylation pattern in Alzheimer disease–related pathology and in Parkinson disease. *Am J Pathol* 186: 385–397
20. Guitton R, Dölle C, Alves G, Ole-Bjørn T, Nido GS, Tzoulis C (2022) Ultra-deep whole genome bisulfite sequencing reveals a single methylation hotspot in human brain mitochondrial DNA. *Epigenetics* 17: 906–921
21. Zhang J, Shang J, Wang F, Huo X, Sun R, Ren Z, Wang W, Yang M, Li G, Gao D, Liu R, Bai P, Wang S, Wang Y, Yan X (2022) Decreased mitochondrial D-loop region methylation mediates an increase in mitochondrial DNA copy number in CADASIL. *Clin Epigenetics* 14: 2
22. Byun HM, Panni T, Motta V, Hou L, Nordio F, Apostoli P, Bertazzi PA, Baccarelli AA (2013) Effects of airborne pollutants on mitochondrial DNA methylation. *Part Fibre Toxicol* 10: 18
23. Wong M, Gertz B, Chestnut BA, Martin LJ (2013) Mitochondrial DNMT3A and DNA methylation in skeletal muscle and CNS of transgenic mouse models of ALS. *Front Cell Neurosci* 7: 279
24. Mawlood SK, Dennany L, Watson N, Dempster J, Pickard BS (2016) Quantification of global mitochondrial DNA methylation levels and inverse correlation with age at two CpG sites. *Aging* 8: 636–641
25. Bianchessi V, Vinci MC, Nigro P, Rizzi V, Farina F, Capogrossi MC, Pompilio G, Gualdi V, Lauri A (2016) Methylation profiling by bisulfite sequencing analysis of the mtDNA non-coding region in replicative and senescent endothelial cells. *Mitochondrion* 27: 40–47
26. Liu YF, Zhu JJ, Yu Tian X, Liu H, Zhang T, Zhang YP, Xie SA, Zheng M, Kong W, Yao WJ, Pang W, Zhao CR, Tang YJ, Zhou J (2020) Hypermethylation of mitochondrial DNA in vascular smooth muscle cells impairs cell contractility. *Cell Death Dis* 11: 35
27. Van Der Wijst MGP, Rots MG (2015) Mitochondrial epigenetics: an overlooked layer of regulation? *Trends Genet* 31: 353–356
28. Mishra M, Kowluru RA (2015) Epigenetic modification of mitochondrial DNA in the development of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56: 5133
29. Stoccoro A, Smith AR, Mosca L, Marocchi A, Gerardi F, Lunetta C, Cereda C, Gagliardi S, Lunnon K, Migliore L, Coppedè F (2020) Reduced mitochondrial D-loop methylation levels in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Epigenetics* 12: 137
30. Baccarelli AA, Byun H-M (2015) Platelet mitochondrial DNA methylation: a potential new marker of cardiovascular disease. *Clin Epigenetics* 7: 44
31. Ghosh S, Sengupta S, Scaria V (2014) Comparative analysis of human mitochondrial methylomes shows distinct patterns of epigenetic regulation in mitochondria. *Mitochondrion* 18: 58–62
32. Devall M, Smith RG, Jeffries A, Hannon E, Davies MN, Schalkwyk L, Mill J, Weedon M, Lunnon K (2017) Regional differences in mi-

tochondrial DNA methylation in human post-mortem brain tissue. *Clin Epigenetics* 9: 47

33. Yang H (2012) Correlation between increased ND2 expression and demethylated displacement loop of mtDNA in colorectal cancer. *Mol Med Rep* 5: 870
34. Gadhave DG, Sugandhi VV, Jha SK, Nangare SN, Gupta G, Singh SK, Dua K, Cho H, Hansbro PM, Paudel KR (2024) Neurodegenerative disorders: mechanisms of degeneration and therapeutic approaches with their clinical relevance. *Ageing Res Rev* 99: 102357
35. Zheng LD, Linarelli LE, Liu L, Wall SS, Greenawald MH, Seidel RW, Estabrooks PA, Almeida FA, Cheng Z (2015) Insulin resistance is associated with epigenetic and genetic regulation of mitochondrial DNA in obese humans. *Clin Epigenetics* 7: 60
36. Tong H, Zhang L, Gao J, Wen S, Zhou H, Feng S (2017) Methylation of mitochondrial DNA displacement loop region regulates mitochondrial copy number in colorectal cancer. *Mol Med Rep* 16: 5347–5353
37. Achinger-Kawecka J, Stirzaker C, Portman N, Campbell E, Chia KM, Du Q, Laven-Law G, Nair SS, Yong A, Wilkinson A, Clifton S, Milioli HH, Alexandrou S, Caldon CE, Song J, Khoury A, Meyer B, Chen W, Pidsley R, Qu W, Gee JMW, Schmitt A, Wong ES, Hickey TE, Lim E, Clark SJ (2024) The potential of epigenetic therapy to target the 3D epigenome in endocrine-resistant breast cancer. *Nat Struct Mol Biol* 31: 498–512
38. Nie J, Liu L, Li X, Han W (2014) Decitabine, a new star in epigenetic therapy: the clinical application and biological mechanism in solid tumors. *Cancer Lett* 354: 12–20
39. De Groote ML, Verschure PJ, Rots MG (2012) Epigenetic editing: targeted rewriting of epigenetic marks to modulate expression of selected target genes. *Nucleic Acids Res* 40: 10596–10613
40. Zhang L, Lu X, Lu J, Liang H, Dai Q, Xu GL, Luo C, Jiang H, He C (2012) Thymine DNA glycosylase specifically recognizes 5-carboxylcytosine-modified DNA. Nat Chem Biol 8: 328–330
41. Dzitoyeva S, Chen H, Manev H (2012) Effect of aging on 5-hydroxymethylcytosine in brain mitochondria. *Neurobiol Aging* 33: 2881–2891
42. Manev H, Dzitoyeva S (2013) Progress in mitochondrial epigenetics. *Biomol Concepts* 4: 381–389
43. Ji F, Zhao C, Wang B, Tang Y, Miao Z, Wang Y (2018) The role of 5-hydroxymethylcytosine in mitochondria after ischemic stroke. *J Neurosci Res* 96: 1717–1726
44. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1827–1831
45. Mechta M, Ingerslev LR, Fabe O, Picard M, Barrès R (2017) Evidence suggesting absence of mitochondrial DNA methylation. *Front Genet* 8: 166
46. Zhang Y, Mao R, Guo H, Zhang J (2017) Detection of HBV cccDNA methylation from clinical samples by bisulfite sequencing and methylation-specific PCR. In: *Hepatitis B Virus* (Guo H, Cuconati A, eds), *Methods Mol Biol* 1540: 73–84. Springer, New York
47. Huang Y, Pastor WA, Shen Y, Tahiliani M, Liu DR, Rao A (2010) The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. *PLoS ONE* 5: e8888
48. Hong EE, Okitsu CY, Smith AD, Hsieh C-L (2013) Regionally specific and genome-wide analyses conclusively demonstrate the absence of CpG methylation in human mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol* 33: 2683–2690
49. Lam D, Luu PL, Song JZ, Qu W, Risbridger GP, Lawrence MG, Lu J, Trau M, Korbie D, Clark SJ, Pidsley R, Stirzaker C (2020) Comprehensive evaluation of targeted multiplex bisulphite PCR sequencing for validation of DNA methylation biomarker panels. *Clin Epigenetics* 12: 90

Mitochondrial DNA Methylation: Existence, Localization, and Function

Laura Łuczak, Katarzyna Tońska✉

✉Corresponding author: k.tonska@uw.edu.pl

Institute of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Warsaw

Keywords: mitochondrion, DNA methylation, mitochondrial DNA, bisulfite sequencing

Epigenetic regulation of gene expression is an intensively studied area of molecular biology. It includes cytosine methylation, whose mechanism of action in nuclear DNA is relatively well understood. This process is mediated by enzymes from the DNA methyltransferase family. Hydroxymethylation is, considered both an intermediate step in cytosine demethylation and a potentially independent mechanism of regulation of gene expression. Functional significance - and even the presence - of methylation within mitochondrial DNA (mtDNA) remains a matter of debate.

Accumulated evidence indicates that methylation and hydroxymethylation may play important role in mitochondria. Although epigenetic regulation of gene expression in mitochondria is not yet fully understood, the current state of knowledge suggests that it may influence proper cellular function and the pathogenesis of numerous diseases.

