

Znaczenie epigenetyki w patogenezie czerniaka

The role of epigenetics in the pathogenesis of melanoma

Ewa Chodurek¹, Karolina Gołąbek¹, Joanna Orchel², Arkadiusz Orchel¹,
Zofia Dzierżewicz¹

STRESZCZENIE

Przez pojęcie epigenetyka należy rozumieć mechanizmy wpływające na regulację i modyfikację ekspresji materiału genetycznego, jednocześnie niezmienniające sekwencji nukleotydów. Mechanizmy te obejmują zarówno metylację DNA, jak i modyfikacje histonów. W artykule dokonano przeglądu aktualnych poglądów dotyczących zaburzeń procesów hiper- i hipometylacji DNA oraz acetylacji histonów w patogenezie czerniaka, związanych z genami kontrolującymi cykl komórkowy, różnicowanie, naprawę DNA, apoptozę, sygnalizację komórkową, angiogenezę, metabolizm ksenobiotyków i powstawanie przerzutów. Ponadto przedstawiono nowe strategie leczenia czerniaka związane z epigenetyką.

SŁOWA KLUCZOWE

epigenetyka, czerniak, metylacja DNA, acetylacja histonów

ABSTRACT

Epigenetics represents the mechanisms that influence the regulation and modification of the expression of genetic material not related to the alterations in DNA sequences. These mechanisms include both DNA methylation and histone modifications. In the present article, we review current views on the role of aberrations of DNA hyper- and hypomethylation processes and the acetylation of histones, associated with genes that control the cell cycle, cell differentiation, DNA repair, apoptosis, cell signaling, angiogenesis, metabolism of xenobiotics and invasion, in the pathogenesis of melanoma. In addition, new strategies for treatment of melanoma associated with epigenetics are presented.

ADRES

DO KORESPONDENCJI:

Dr n. farm. Ewa Chodurek
Katedra i Zakład Biofarmacji
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach
ul. Narcyzów 1
41-200 Sosnowiec
tel. 32 364 10 64
e-mail: echodurek@sum.edu.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2012, 66, 3, 44-56
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
ISSN 0208-5607

KEY WORDS

epigenetics, melanoma, DNA methylation, histone acetylation

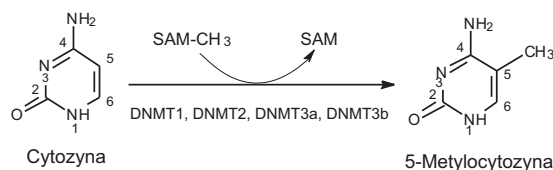
WSTĘP

Przez pojęcie epigenetyka należy rozumieć mechanizmy wpływające na regulację i modyfikację ekspresji materiału genetycznego, ale jednocześnie niezmienną sekwencji nukleotydów. Mechanizmy te obejmują zarówno metylację DNA, jak i modyfikacje histonów [1]. Pierwszym zaobserwowanym zjawiskiem o znaczeniu epigenetycznym było odkrycie przez Müllera w 1930 r. mozaikowego zabarwienia oczu u *Drosophila*. Zjawisko to polegało na spontanicznej i niestałej inaktywacji genu odpowiedzialnego za pigment, bez zmian w sekwencji DNA. Wyciszenie genu było obserwowane również w komórkach potomnych [2].

METYLACJA DNA

Wzór metylacji DNA związany jest z dwoma przeciwstawnymi procesami – metylacją (procesem enzymatycznym) i demetylacją (biernym zjawiskiem wynikającym z braku zachowania wzoru metylacji podczas replikacji bądź powstałym na skutek mechanizmów naprawy DNA). Zjawisko metylacji (ryc. 1) opiera się na kowalencyjnej modyfikacji cytozyn, polegającej na przyłączeniu grupy metylowej z S-adenozynometioniny (SAM) do piątego atomu węgla cytozyny w reakcji katalizowanej przez metylotransferazy DNA (DNMT) [2].

W przypadku ssaków znane są cztery niezależnie kodowane metylotransferazy DNA: DNMT 1, DNMT 2, DNMT 3a i DNMT 3b [2].



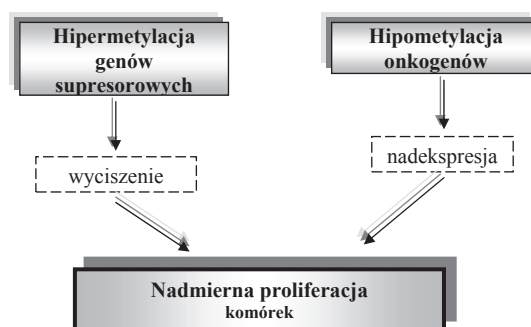
Ryc. 1. Metylacja cytozyny [2].

Fig. 1. The cytosine methylation [2].

Szacuje się, że fizjologicznie 60–90% dinukleotydów GC w genomie człowieka ma zmetylowaną cytozynę, co zdecydowanie rzutuje na strukturę chromatyny poszczególnych genów i decyduje o ich niedostępności dla czynników transkrypcyjnych (w wyniku powstania przestrzennej przeszkody). Dinukleotydy CG w genomie występują w formie powtórzeń,

tworząc miejsca zwane wyspami CpG. Wyspy te, związane z genami o ekspresji tkankowo-swoistej, znajdują się często w pewnej odległości od miejsca startu transkrypcji.

Zaburzenie procesu metylacji DNA może doprowadzić do onkogenezy, która może wiązać się z hipermetylacją wysp CpG genów supresorowych (w zdrowych komórkach somatycznych wyspy te cechują się najczęściej brakiem lub niskim poziomem metylacji) lub ze spadkiem poziomu metylacji (hipometylacją) w obrębie promotorów genów związanych z proliferacją i różnicowaniem się komórek [1].



Ryc. 2. Znaczenie procesu metylacji w onkogenezie [3].

Fig. 2. The role of methylation in the oncogenesis [3].

Udział nieprawidłowych procesów metylacji w onkogenezie obrazuje rycina 2 [3].

Do diagnostyki molekularnej zaburzeń metylacji służą najczęściej metody oparte na chemicznej modyfikacji DNA przez disiarczan sodowy. Związek ten uczestniczy w przekształcaniu niezmetrylowanej cytozyny w uracyl. Następnie zmodyfikowane DNA, zawierające chemicznie zmodyfikowane i niezmodyfikowane wyspy CpG, poddawane jest analizie, z wykorzystaniem jednej z metod, np. MSP (*methylation specific polymerase chain reaction*), Q-MSP (*quantitative methylation specific polymerase chain reaction*), BSSCP (*bisulfite single-strand conformation polymorphism*), Me-DIP (*methylated DNA immunoprecipitation*) lub sekwencjonowaniu [3].

HIPERMETYLACJA DNA A CZERNIAK

Do tej pory zidentyfikowano ponad 50 genów, których nieprawidłowa hipermetylacja może mieć znaczenie w niektórych fazach rozwoju czerniaka. Znajdują się wśród nich geny o różnorodnej funkcji – związane z kontrolą cyklu

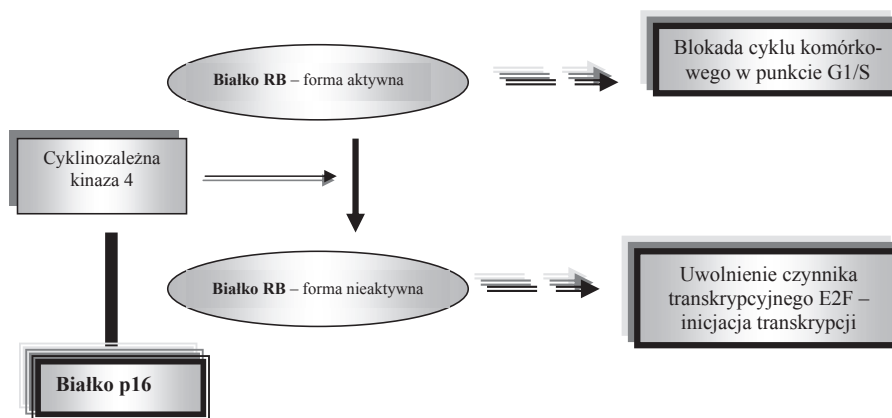
komórkowego, apoptozą, sygnalizacją komórkową, angiogenezą, metabolizmem ksenobiotyków i powstawaniem przerzutów [4].

Do pierwszych genów, w przypadku których częściowo potwierdzono znaczenie zaburzonego wzoru metylacji wysp CpG w patogenezie czerniaka, należy gen supresorowy CDKN2A (zwany też p16, INK4A lub MTS1), kodujący dwa białka: p16 i p14. Białko p16 ogrywa rolę inhibitora kinaz zależnych od cyklin, szczególnie CDK4 i CDK6, biorących udział w fosforylacji białka RB [1,5]. Białko p16 jest więc składową mechanizmu zatrzymującego cykl komórkowy w fazie G1-S (ryc. 3) [5].

czenia dotyczyły badania hipermetylacji w preparatach tkankowych pochodzących od chorych na czerniaka [7,8,9].

Znane są ponadto badania niepotwierdzające takiej zależności – w analizie preparatów tkankowych pochodzących od 80 chorych na czerniaka gałki ocznej i 30 chorych na czerniaka skóry, przeprowadzonej przez Gmyrek i wsp., nie stwierdzono metylacji w odcinkach promotorowych genu CDKN2A w żadnym przypadku [10].

Kolejnym istotnym dla rozwoju czerniaka genem jest gen RASSF1A, którego produkt odgrywa ważną rolę w kontroli procesu apopto-



Ryc. 3. Rola białka p16 w regulacji cyklu komórkowego [5].

Fig. 3. The role of p16 protein in the cell cycle regulation [5].

Przykładem badań częściowo potwierdzających, iż hipermetylacja promotora CDKN2A stanowi powód jego inaktywacji, są badania Gonzalo i wsp. [6], którzy przeanalizowali 30 preparatów tkankowych pochodzących od chorych na czerniaka, 3 preparaty tkankowe otrzymane ze znamion barwnikowych wrodzonych, a także wykorzystali 12 linii komórkowych (SK-MEL 21, SK-MEL 28, SK-MEL 37, SK-MEL 39, SK-MEL 61, SK-MEL 63, SK-MEL 147, SK-MEL 196, SK-MEL 241, A 375, 526, 888). Analiza metylacji techniką MSP wykazała hipermetylację promotora CDKN2A w trzech próbkach pochodzących od chorych na czerniaka oraz w przypadku trzech linii komórkowych – SK-MEL 196, SK-MEL 241, 888 [6]. Hipermetylację promotora CDKN2A wykazano również w badaniach przeprowadzonych przez Freedberg i wsp., Liu i wsp. oraz Straume i wsp., których doświad-

zy. Marini i wsp. [11] wykazali wysoki stopień metylacji tego genu, badając DNA izolowane z surowic 41 pacjentów chorych na czerniaka (18 ze zmianą I°, 10 ze zmianą II°, 13 ze zmianą III°/IV° według klasyfikacji Clarka). Wspomniani badacze poddali też analizie DNA pozyskane z surowic pacjentów z innymi chorobami: 9 z rakiem podstawnkomórkowym, 5 z mięśniakiem Kaposiego, 15 z licznymi znamionami barwnikowymi większymi niż 5 mm, 5 z rakiem piersi, 5 z rakiem okrężnicy i 12 z przewlekłymi chorobami skóry (łuszczyca i egzema). Jako kontrola zostało wykorzystane DNA wyizolowane z surowic 13 zdrowych ochotników. Stopień metylacji genu RASSF1A w przypadku czerniaka w stadium przebiegającym z przerzutami wynosił 62%, a bez przerzutów 64%. W przypadku pozostałych jednostek chorobowych odpowiednio: rak podstawnkomórkowy – 86%,

mięsak Kaposiego – 40%, inne nowotwory – 10%, znamiona barwnikowe – 10%, przewlekłe choroby skóry – 8%. Nie stwierdzono metylacji tego genu w DNA pochodzącym od zdrowych ochotników [11].

Metylację genu RASSF1A stwierdzili również Furuta i wsp., badając 12 nowotworowych linii komórkowych: MeWo, WM-266-4, WM-115, C32TG, MMac, VMRC-MELG, GAK, A2058, SK-MEL-28, HMV-I, G361, TK-Mel-1. W przypadku 6 linii komórkowych wykazano metylację genu RASSF1A, przy czym w przypadku 2 linii (GAK, SK-MEL-28) była to metylacja całkowita. Jako kontrolę wykorzystano hodowle komórkowe niezmienionych nowotworowo melanocytów (HEM1 HEM2), w których nie zaobserwowano metylacji genu RASSF1A [12].

Kolejnym genem ulegającym wyciszeniu za pośrednictwem metylacji wysp CpG w odniesieniu do czerniaka jest gen MGMT. Produkt tego genu – metylotransferaza metyloguaninowa – uczestniczy w naprawie zmodyfikowanych zasad DNA. Enzym ten ma zdolność usuwania grup alkilowych, np. metylowej z pozycji O-6 guaniny. Wyciszenie omawianego genu potwierdzili w swoim doświadczeniu Liu i wsp., wykorzystując 20 linii komórkowych (MCC005, MCC013, MCC070, MCC080A, MCC080B, MCC081, LOX, MCC012A, MCC012F, MCC074, MCC046, MCC066C, MCC069B, MCC072, MCC083, MCC089, A375, MCC063, MCC067, C8161.9). Jako kontrolę zastosowali linię komórkową NHEM (linia komórkowa niezmienionych nowotworowo melanocytów noworodka). W 5 liniach komórkowych: LOX, MCC012A, MCC012F, MCC072, C8161.9 stwierdzono hipermetylację genu MGMT [8].

Wyciszenie za pośrednictwem metylacji wysp CpG genu MGMT wykazali również w omówionych wcześniej badaniach Marini i wsp. Stopień metylacji w zależności od zmiany chorobowej wynosił odpowiednio: czerniak z przerzutami – 15%, czerniak w stadium bez przerzutów – 64%, rak podstawnokomórkowy – 29%, przewlekłe choroby skóry – 8%. Nie stwierdzili natomiast hipermetylacji genu MGMT w przypadku mięsaka Kaposiego, znamion barwnikowych i innych nowotworów [11].

Kolejnym zagadnieniem związanym z epigenetyką czerniaka jest modyfikacja reaktywności układu immunologicznego względem komórek melanoma. Modyfikacja ta opiera się na zmia-

nie profilu ekspresji antygenów na powierzchni komórek nowotworowych. W eksperymentach wykazano, iż komórki pochodzące z linii czerniaka błony naczyniowej oka nie są wrażliwe na działanie interferonu γ . Należy zaznaczyć, iż stan ten nie wynika z jakichkolwiek mutacji punktowych, insercji czy delecji w obrębie genów HLA (genów kodujących antygeny zgodności tkankowej). Za opisywaną modyfikację odpowiedzialna jest hipermetylacja rejonu promotorowego lub sekwencji regulatorowych położonych powyżej (w kierunku 5') promotora genu CIITA (*class II transactivator*). Produkt genu CIITA stanowi koaktywator transkrypcji genów MHC II [1].

Zaburzenia procesu metylacji zaobserwowano również w przypadku genów CYP1B1 i DNAJC15, związanych z metabolizmem ksenobiotyków [13]. Produkt genu CYP1B1 jest elementem układu wieloczynnościowej monooksydazy i bierze udział w hydroksylacji estrogenów oraz w metabolizowaniu prokancerogenów [14]. Utrata ekspresji genu DNAJC15 koreluje natomiast ze zwiększoną odpornością na leki przeciwnowotworowe. Muthusamy i wsp. w badaniach przeprowadzonych na nowotworowych liniach komórkowych (MelJuSo, UACC 903, C8161, Neo6/C8161, WM1205, Roth, Carney, WM455, WM35) wykazali brak hipermetylacji genu CYP1B1 tylko w jednej linii komórkowej (UACC 903), a w przypadku genu DNAJC15 w trzech (UACC 903, WM1205 Lu, WM455). W tym samym badaniu poddano również analizie stopień metylacji genów CYP1B1 i DNAJC15 w 20 preparatach tkankowych pozyskanych od chorych na czerniaka. Hipermetylacja genu CYP1B1 miała miejsce we wszystkich badanych próbkach, a hipermetylacja genu DNAJC15 w połowie przypadków [13].

Proces hipermetylacji może wpływać również na tworzenie nowych ognisk czerniaka, czyli powstawanie przerzutów. Szczegółne znaczenie przypisuje się zmianie ekspresji genów związanych z cząsteczkami adhezyjnymi, takimi jak kadheryny. Cząsteczki te są odpowiedzialne za prawidłowy kontakt i adhezję komórek w tkankach. Hipermetylację genu CDH8 kodującego kadherynę 8 zaobserwowali Muthusamy i wsp. w 4 liniach: C8161, Neo6/C8161, WM1205, Carney [13]. Liu i wsp. wykazali natomiast nieprawidłowy stopień metylacji genu kodującego kadherynę 1 w przypadku tylko jednej linii komórkowej – LOX [8].

Wyciszenie za pośrednictwem metylacji wysp CpG zaobserwowano także w przypadku innego genu SERPINB5, również związanego z procesem przerzutowania. Gen ten koduje maspinę należącą do nadrodziny serpin – białek inhibitorów enzymów proteolitycznych. Denk i wsp. wykazali zjawisko hipermetylacji

tego genu w przypadku wszystkich badanych linii komórkowych (Mel Im, Mel Wei, Mel Ju, Mel Ho, SK Mel3, SK Mel28, HTZ19d) [15]. Podsumowanie informacji dotyczących hipermetylacji wybranych genów mających znaczenie w patogenezie czerniaka zawiera tabela I [8,12,13,16,17,18,19,20].

Tabela I. Hipermetylacja wysp CpG wybranych genów związanych z patogenezą czerniaka
Table I. Hypermethylation of CpG islands of genes involved in the pathogenesis of melanoma

Gen	Funkcja	% Metylacji	Badany materiał	Metoda	Źródło
CDKN1B	regulacja cyklu komórkowego	0 (0/12)	nowotworowe linie komórkowe (MeWo, WM-266-4, WM-115, C32TG, MMAc, VMRC-MELG, GAK, A2058, SK-MEL-28, HMV-I, G361, TK-Mel-1)	MSP	[12]
		9 (4/45)	tkanka nowotworowa	MSP	[16]
APC	proliferacja i różnicowanie się komórek	5 (1/20)	nowotworowe linie komórkowe (MCC005*, MCC013, MCC070, MCC080A, MCC080B, MCC081, LOX, MCC012A, MCC012F, MCC074, MCC046, MCC066C, MCC069B, MCC072, MCC083, MCC089, A375, MCC063, MCC067, C8161.9)	Q-MSP	[8]
		15 (6/40)	tkanka nowotworowa	Q-MSP	[8]
HSPB6	apoptoza	100 (8/8)	nowotworowe linie komórkowe (WW165*, YUGEN8*, YULAC*, YUMAC*, YURIF*, YUSAC2*, YUSIT1*, YUSTE*)	MeDIP	[17]
NPM2	remodeling chromatyny	50 (12/24)	tkanka nowotworowa	MeDIP	[17]
MGMT	mechanizmy naprawy DNA	0 (0/12)	nowotworowe linie komórkowe (MeWo, WM-266-4, WM-115, C32TG, MMAc, VMRC-MELG, GAK, A2058, SK-MEL-28, HMV-I, G361, TK-Mel-1)	MSP	[12]
		25 (5/20)	nowotworowe linie komórkowe (MCC005, MCC013, MCC070, MCC080A, MCC080B, MCC081, LOX*, MCC012A*, MCC012F*, MCC074, MCC046, MCC066C, MCC069B, MCC072*, MCC083, MCC089, A375, MCC063, MCC067, C8161.9*)	Q-MSP	[8]
		13 (5/40)	tkanka nowotworowa	Q-MSP	[8]
		31 (26/84)	tkanka nowotworowa	MSP	[18]
		63 (26/41)	surowica	MSP	[11]
RUNX3	transkrypcja	25 (3/12)	nowotworowe linie komórkowe (MeWo, WM-266-4*, WM-115*, C32TG, MMAc, VMRC-MELG, GAK, A2058, SK-MEL-28, HMV-I*, G361, TK-Mel-1)	MSP	[12]
CIITA	hamowanie odpowiedzi układu odpornościowego	10 (2/20)	nowotworowe linie komórkowe (MCC005, MCC013, MCC070, MCC080A, MCC080B, MCC081, LOX*, MCC012A, MCC012F, MCC074, MCC046, MCC066C, MCC069B, MCC072, MCC083, MCC089, A375, MCC063, MCC067, C8161.9*)	Q-MSP	[8]
COL1A2	macierz poza-komórkowa	89 (8/9)	nowotworowe linie komórkowe (MelJuSo*, UACC 903*, C8161*, Neo6/C8161*, WM1205*, Roth*, Carney*, WM455, WM35*)	MSP	[13]
		80 (16/20)	tkanka nowotworowa	MSP	[13]
		63 (45/24)	tkanka nowotworowa	MeDIP	[17]
TIMP1	przerzutowanie	20 (4/20)	nowotworowe linie komórkowe (MCC005, MCC013*, MCC070*, MCC080A, MCC080B, MCC081, LOX*, MCC012A, MCC012F, MCC074, MCC046, MCC066C, MCC069B, MCC072, MCC083, MCC089, A375, MCC063, MCC067, C8161.9)	Q-MSP	[8]
		7,5 (3/40)	tkanka nowotworowa	Q-MSP	[8]
PTEN	ścieżki sygnałowe	23 (3/12)	nowotworowe linie komórkowe (MeWo*, WM-266-4, WM-115, C32TG, MMAc*, VMRC-MELG, GAK, A2058, SK-MEL-28, HMV-I*, G361, TK-Mel-1)	MSP	[12]
		62 (23/37)	surowica	sekwencjonowanie	[19]

* linie komórkowe, w których wykazano metylację badanego genu

MODYFIKACJE HISTONÓW

Histony stanowią grupę zasadowych białek odgrywającą zasadniczą rolę w organizacji struktury chromatyny. Białka te mogą ulegać potranslacyjnym modyfikacjom, które polegają na dołączeniu dodatkowych cząsteczek lub grup funkcyjnych, takich jak acetylowa, metylowa, fosforanowa, ubikwityny, SUMO. Modyfikacje te dotyczą dwóch aminokwasów budujących histony – argininy i lizyny. Wpływ takiej modyfikacji na ekspresję genów związany jest z dostępnością chromatyny dla kompleksów transkrypcyjnych.

Aktywacja ekspresji genów zachodzi pod wpływem procesu acetytacji, fosforylacji i metylacji lizyny oraz argininy H3-K4, H3-K36, H3-K79, a ponadto ubikwitynacji H2B-K120.

immunologiczną i tworzenie przerzutów. Sam proces acetytacji katalizowany jest przez acetylazę histonową (*histone acetyltransferase* – HAT). Proces odwrotny – deacetylacja – przebiega przy udziale deacetylaz histonowych (*histone deacetylase activity* – HDAC) [20]. Jak dotąd, w komórkach ssaków zidentyfikowano 18 HDAC, które podzielono na cztery klasy (tab. II) [23,24].

Nieprawidłowy stan acetytacji najlepiej został scharakteryzowany w przypadku genów związanych z aktywacją wewnątrzpochodnego szlaku apoptozy [20]. Szlak ten rozpoczyna się aktywacją białek proapoptotycznych Bax, Bak i ich oligomeryzacją, co powoduje powstanie porów w zewnętrznej błonie mitochondrium i uwolnienie białek wewnątrz-

Tabela II. Charakterystyka HDAC

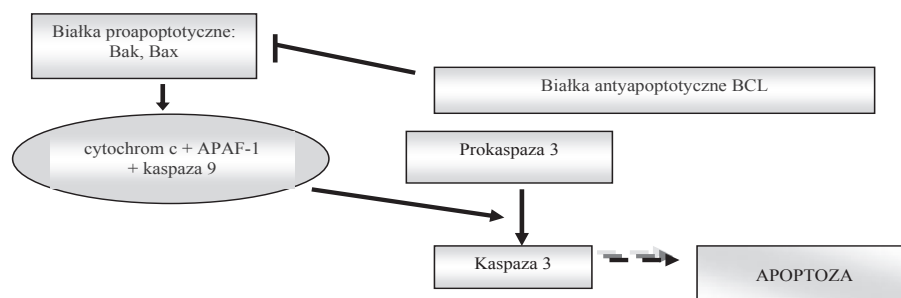
Table II. Characteristics of HDAC

Klasa	Izomer	Lokalizacja
I	Ia	HDAC 1, 2
	Ib	HDAC 3
	Ic	HDAC 8
II	IIc	HDAC 4, 5, 7, 9
	IIb	HDAC 6
		HDAC 10
III	SIRT (1–7)	jądro komórkowe, cytoplazma, mitochondria
IV	HDAC 11	jądro komórkowe, cytoplazma

metylacji H3-K9, H3-K27, H4-K20 oraz ubikwitynacji H2A-K119 działają hamująco na ekspresję [1].

Obecnie wiadomo, że w patogenezie czerniaka odgrywa rolę głównie proces acetytacji, a szczególnie stan hipoacetytacji związany z genami wpływającymi na apoptozę, cykl komórkowy, sygnalizację komórkową, odpowiedź

mitochondrialnych, w tym cytochromu c. W cytoplazmie cytochrom c razem z czynnikiem APAF-1 i prokaspazą 9 tworzą strukturę zwaną apoptosomem. W wyniku powstania apoptosomu dochodzi do aktywacji kaspazy 9, co doprowadza do uruchomienia kaskady kaspaz efektorowych (kaspaza 3, kaspaza 7) i śmierci komórki (ryc. 4) [25].



Ryc. 4. Schemat wewnątrzpochodnego szlaku apoptozy [25].

Fig. 4. Schematic apoptosis pathway [25].

Tabela III. Wybrane geny związane z acetylacją histonów
Table III. Selected genes associated with histone acetylation

Gen	Funkcja	Badana linia komórkowa	Źródło
Bak	proapoptotyczna	Me4405, Me1007, IgR3, Mel-FH, Mel-Rmu, Mel-RM, Mel-CV, MM200	[26]
Bim	proapoptotyczna	Me4405, Me1007, IgR3, Mel-FH, Mel-Rmu, Mel-RM, Mel-CV, MM200	[26]
TRAILR1	proapoptotyczna	WM115, SK-Mel28, WM266, A375	[27]
XIAP	antyapoptotyczna	Me4405, Me1007, IgR3, Mel-FH, Mel-Rmu, Mel-RM, Mel-CV, MM200	[26]
BCL-X	antyapoptotyczna	Me4405, Me1007, IgR3, Mel-FH, Mel-Rmu, Mel-RM, Mel-CV, MM200	[26]
		WM115, SK-Mel28, WM266, A375	[27]
CDKN1A	cykl komórkowy	A2058, HMV-I	[28]
		A375, S91	[29]
KU70	naprawa DNA	A375, MeWo	[30]
		A375, MeWo, A549	[31]
CXCR4	przerzutowanie	MK, MA, MB, MH, ME, MC, MG, MD, MF, MJ, MI	[32]
MMP10	przerzutowanie	A2058	[33]
RARB	ścieżki sygnałowe	A2058, HMV-I	[28]

W tabeli III zawarto informacje dotyczące wybranych genów, których ekspresja regulowana jest przez acetylację histonów [26,27,28,29, 30, 31,32,33].

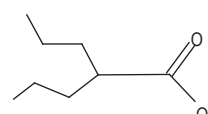
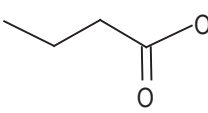
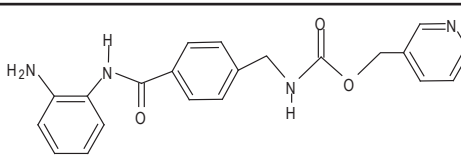
NOWE STRATEGIE LECZENIA CZERNIAKA ZWIĄZANE Z EPIGENETYKĄ

Leki wpływające na nieprawidłowe zjawiska epigenetyczne są nadzieją na skuteczniejszą walkę z nowotworami. Obecnie prowadzi się

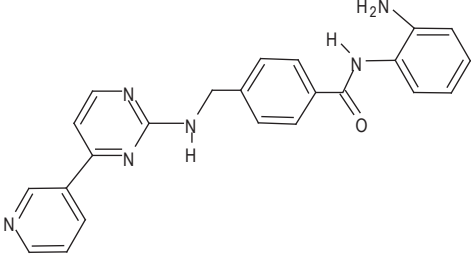
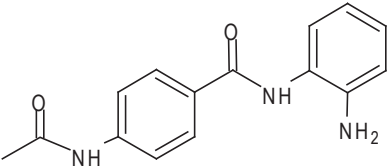
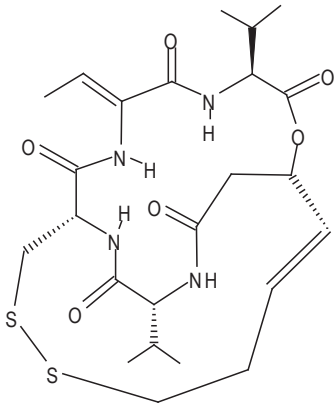
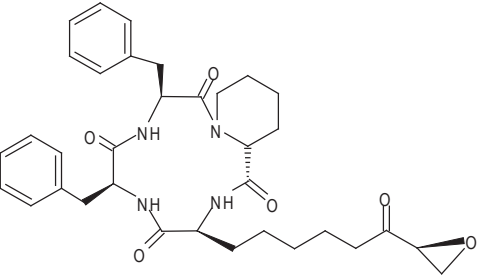
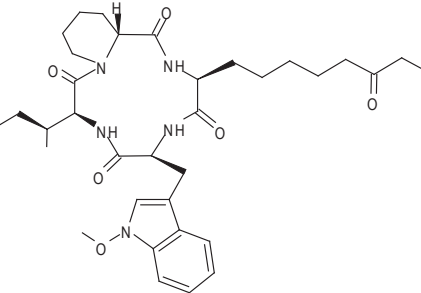
badania nad kilkoma strategiami związanymi z terapią epigenetyczną. Pierwsza strategia polega na wykorzystaniu inhibitorów deacetylazy histonowej (*histone deacetylase activity inhi-*

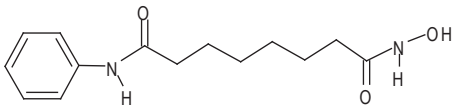
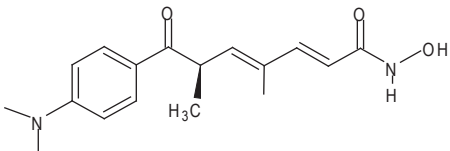
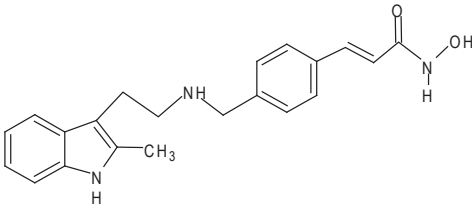
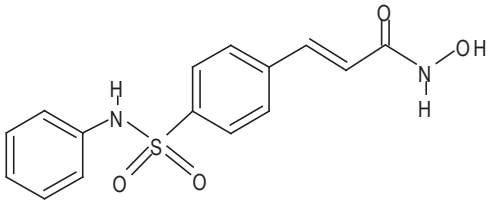
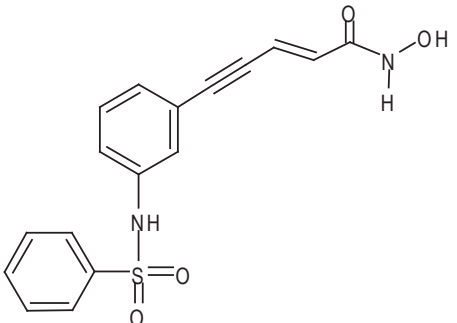
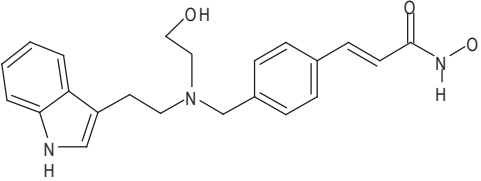
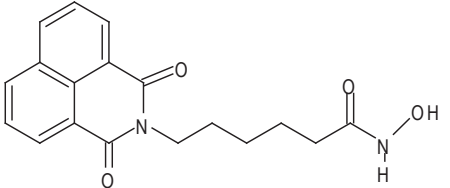
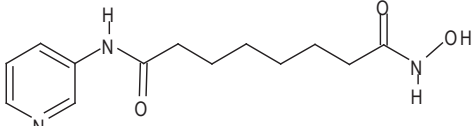
bitors – HDACi). Związki te należą do odmiennych grup chemicznych i posiadają aktywność względem różnych klas HDAC (tab. IV) [24,34,35,36,37].

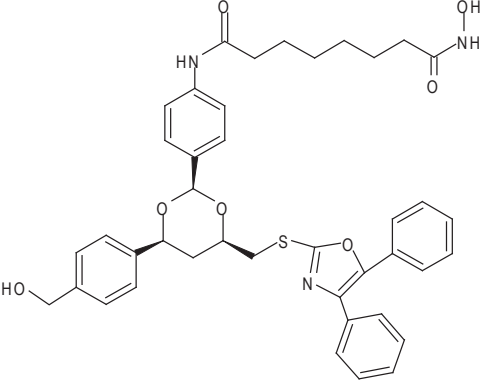
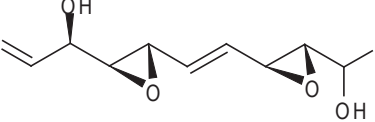
Tabela IV. Charakterystyka wybranych HDACi
Table IV. Characteristics of selected HDACi

Grupa	Związek	Synonim	Cel działania (klasa – HDAC)	Wzór strukturalny	Źródło
Pochodne kwasów alifatycznych o krótkich łańcuchach	kwas walproinowy	Depakene, Depakote, Depakote ER, Depakote Sprinkle	I, IIa		[24,34]
	maślan sodu	–	I, IIa		[24,34]
Amidy kwasu benzoowego	entinostat	MS-27-275, MS-275, SNDX-275	I		[24,34]

EPIGENETYKA W PATOGENEZIE CZERNIAKA

Grupa	Związek	Synonim	Cel działania (klasa -HDAC)	Wzór strukturalny	Źródło
Amidy kwasu benzoosowego	mocetinostat	MGCD0103	-		[24,34]
	tacedinaline	CI-994	-		[34]
Cykliczne tetrapeptydy	romidepsin	Depsipeptide, Istodax, FK228, FR901228	I		[24,34]
	trapoxin A	-	I, IIa		[34]
	apicidin	-	I		[34]

Grupa	Związek	Synonim	Cel działania (klasa - HDAC)	Wzór strukturalny	Źródło
Pochodne kwasu hydroksamowego	suberoylanilide hydroxamic acid	Vorinostat Suberoylanilide hydroxamic acid, (SAHA), Zolinza	I, II		[24,34]
	trichostatyna A	-	I, II		[24,34]
	LBH589	panobinostat	I, II		[24,34]
	belinostat	PXD101	I, II		[24,34]
	oxamflatin	-	-		[34,35]
	dacinostat	LAQ824, NVP-LAQ824	I, II		[34,36]
	scriptaid	GCK1026 LAQ824	-		[24,34]
	Pyroxamide	-	I		[34]

Grupa	Związek	Synonim	Cel działania (klasa – HDAC)	Wzór strukturalny	Źródło
Pochodne kwasu hydroksamowego	tubacin	-	IIb		[34]
Epoksydy	depudecin	-	I		[34,37]

Jeden z mechanizmów działania przeciwnowotworowego inhibitorów HDACi polega na selektywnej inicjacji w komórkach nowotworowych procesu apoptozy na drodze mitochondrialnej oraz aktywacji receptorów śmierci. Dokładny mechanizm tego procesu nie został jeszcze całkowicie poznany, ale przypuszcza się, iż HDACi mogą wpływać na aktywację receptorów dla TNF (*tumor necrosis factor* – czynnik martwicy nowotworów) oraz znosić nadekspresję genów kodujących białka antyapoptyczne: BCL-X i BCL2 [34, 38].

Ponadto pod wpływem HDACi w komórkach zmienionych nowotworowo dochodzi do akumulacji reaktywnych form tlenu [39]. HDACi wpływają również na regulację cyklu komórkowego przez blokowanie tego procesu w punkcie G1/S. Wynika to z oddziaływania tej grupy leków na geny kodujące: białko p21 oraz cykliny CDK2 i CDK4 [34,38]. Przypuszcza się, iż HDACi mogą działać antyangiogenne i hamująco na powstawanie przerzutów przez modulowanie ekspresji genów kodujących: VEGF (*vascular endothelial growth factor* – czynnik wzrostu śródbłonnka naczyniowego), bFGF (*basic fibroblast growth factor* – czynnik wzrostu fibroblastów), czynnik indukowany niedotlenieniem HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor-1 α*), angiopoetyny, śródbłonnkową syntazę tlenu azotu, metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej i tkankowe inhibitory metaloproteinaz [23,34,40,41].

Istnieje coraz więcej dowodów, iż HDACi mogą zwiększyć immunogenność komórek nowotworowych przez wpływ na ekspresję cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej (*major histocompatibility complex* – MHC), cząsteczek CD40, CD80 i CD86 oraz białek adhezyjnych (*intracellular adhesion molecule* – ICAM) [34,42].

Związkami z grupy HDACi, które próbowano zastosować w badaniach klinicznych w terapii epigenetycznej czerniaka, są np. kwas walproinowy, FR901228, MS-275 i SAHA [20]. W badaniach klinicznych I i II fazy wykonanych przez Daud i wsp. na pacjentach z diagnozowanym czerniakiem w stadium IV (według AJCC – *American Joint Committee on Cancer*) w przedziale wiekowym 29–89 lat, z wykorzystaniem różnych kombinacji kwasu walproinowego (w dawkach 3–90 mg/kg/dobę) z karenitecin (KTN, związek z grupy inhibitorów topoizomazy I, w dawce 0,8 oraz 1 mg/m²/dobę) wykazano, iż maksymalna tolerowana dawka kwasu walproinowego wynosiła 75 mg/kg/dobę w kombinacji z 1 mg/m²/dobę KTN. Stabilizację choroby obserwowano u 39% (13 z 33) badanych pacjentów [43].

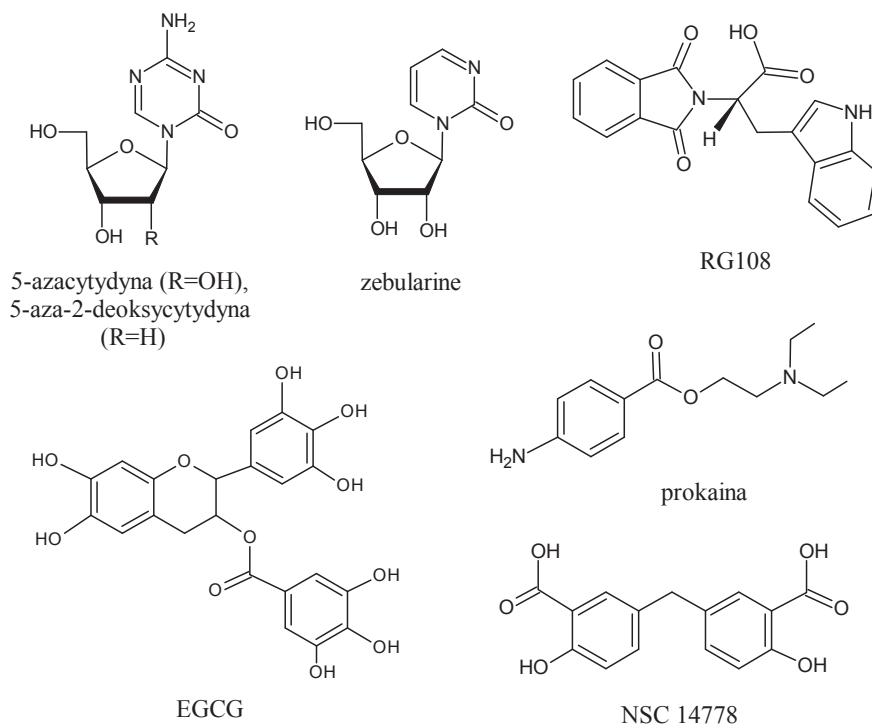
Innym przykładem badania klinicznego z wykorzystaniem HDACi w terapii nowotworów jest praca Munster i wsp., którzy w badaniach I fazy zastosowali kombinację vorinostat (w dawkach: 400, 600, 800 i 1000 mg) z doksorubicyną (w stałej dawce 20 mgm⁻²) u 32 pacjentów cierpiących na różnego typu nowo-

twory (m.in. raka płuc, piersi, okrężnicy, prostaty, trzustki, mięsaka, czerniaka). U 2 na 6 pacjentów chorych na czerniaka obserwowano stabilizację choroby [44].

Drugą grupą leków mających potencjalne znaczenie dla przyszłości terapii epigenetycznej czerniaka są inhibitory metylotransferaz DNA (DNMTi). Należą do nich związki będące analogami nukleozydu pirymidynowego (np. 5-azacytydyna i jej pochodna 5-aza-2-deoksycytydyna zebularine-(1-(β-D-ribofura-

W terapii epigenetycznej czerniaka z zastosowaniem DNMTi w badaniach klinicznych próbuje się wykorzystać połączenie tej grupy związków z interferonem α-2b (rekombinowanym lub pegylowanym), temozolomide lub panobinostatem – inhibitorem proteosomów [20].

Przykłady leków związanych z terapią epigenetyczną czerniaka wykorzystywanych w badaniach klinicznych zawarto w tabeli V [20,48,49,50,52,52,53,54,55,56,57,58,59].



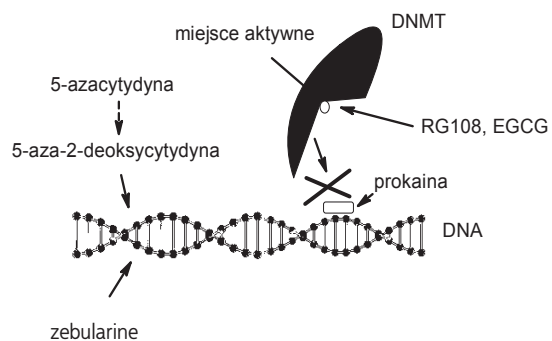
Ryc. 5. Wzory strukturalne wybranych DNMTi [45,46].

Fig. 5. Structural formulas of selected DNMTi [45,46].

nosyl)-2(1H)-pyrimidinone) oraz związki niebędące analogami nukleozydów, np. prokaina, RG108, NSC14778, EGCG (ryc. 5) [45,46].

Mechanizm działania DNMTi będących analogami nukleozydu pirymidynowego polega na wbudowaniu się w miejsce cytydyny, co uniemożliwia tym samym metylację DNA (5-azacytydyna i 5-aza-2-deoksycytydyna zawiera atom azotu w pozycji 5', zamiast atomu węgla).

Związki niebędące analogami nukleozydów działają według odmiennych mechanizmów: RG108 i EGCG blokują miejsce aktywne DNMT, natomiast prokaina maskuje sekwencję docelową w łańcuchu DNA, chroniąc ją w ten sposób przed metylacją (ryc. 6) [47].



Ryc. 6. Mechanizmy działania DNMTi [47].

Fig. 6. Mechanisms of DNMTi action [47].

Tabela V. Przykłady leków epigenetycznych w terapii czerniaka wykorzystywanych w badaniach klinicznych
Table V. Examples of epigenetic drugs in the treatment of melanoma used in clinical trials

	Molekuła	Typ nowotworu	Faza badania	Kombinacja z inną substancją leczniczą	Źródło
Inhibitory DNMT	5-azacytydyna (Vidaza)	czerniak	I	rekombinowany interferon α -2b	[20,48]
		czerniak (III lub IV stopień według AJCC), rak nerki (IV stopień według AJCC)	I	rekombinowany interferon α -2b	[20,49]
	5-azacytydyna (Dacogen, Decitabine)	czerniak	I, II	pegylowany interferon α -2b	[20,50,51]
		czerniak	I, II	temozolomide	[20,52]
		czerniak z przerzutami	I, II	temozolomide, panobinostat	[20,53]
Inhibitory HDAC	kwas walproinowy (Depakote, Depakote ER, Depakene, Depacon, Stavzor)	czerniak	I, II	karenitecin	[20,54]
	FR901228 (Romidepsin)	czerniak (III lub IV stopień według AJCC)	II	–	[20,55]
	MS-275 (Entinostat, SNDX-275, BAY86-5274)	czerniak z przerzutami	II	–	[20,56]
	SAHA – Suberoylanilide hydroxamic acid (Vorinostat, Zolinza)	czerniak, rak niedrobnokomórkowy płuca, rak trzustki, chłoniak	I	NPI-0052	[20,57]
		czerniak, rak płuc, rak piersi, rak okrężnicy, rak prostaty, rak trzustki, mięsak	I	doksorubicyna	[58]
		czerniak z przerzutami	I, II	–	[20,59]

PODSUMOWANIE

Trzeba zaznaczyć, iż problemem pozostają jednak skutki uboczne wynikające z toksyczności inhibitorów HDAC i DNMT oraz ich brak

oddziaływania na konkretne geny. Oczekuje się, że połączenie leczenia inhibitorami HDAC i DNMT ze standardową chemio- i radioterapią przyniesie sukces w terapii nowotworów, szczególnie w stadiach ze znacznym zaawansowaniem choroby [20].

PIŚMIENNICTWO

- Kwinta Ł. Epigenetyka czerniaka. Współcz. Onkol. 2008; 2: 45–50.
- Płachetka A., Wiczkowski A., Zalewska-Ziob M. i wsp. Rola epigenetycznych zmian DNA w powstawaniu nowotworów. Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice: 2010.
- Jabłońska J., Jesionek-Kupnicka D. Zmiany epigenetyczne w nowotworach. Onkol. Pol. 2004; 7: 181–185.
- Howell P.M. Jr, Liu S., Ren S., Behlen C., Fodstad O., Riker A.I. Epigenetics in human melanoma. Cancer Control 2009; 16: 200–218.
- Brudnik U., Wojas-Pelc A., Branicki W. Genetyczne uwarunkowania czerniaka. Post. Dermatol. Alergol. 2006; 1: 21–25.
- Gonzalgo M.L. i wsp. Low frequency of p16/CDKN2A methylation in sporadic melanoma: comparative approaches for methylation analysis of primary tumors. Cancer Res. 1997; 23: 5336–5347.
- Freedberg D.E. i wsp. Frequent p16-independent inactivation of p14ARF in human melanoma. J. Natl. Cancer Inst. 2008; 100: 784–795.
- Liu S., Ren S., Howell P., Fodstad O., Riker A.I. Identification of novel epigenetically modified genes in human melanoma via promoter methylation gene profiling. Pigment Cell Melanoma Res. 2008; 21: 545–558.
- Straume O., Smeds J., Kumar R., Hemminki K., Akslen L.A. Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C > T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. Am. J. Pathol. 2002; 161: 229–237.
- Gmyrek G., Kwiatkowska E., Lamperska K., Mackiewicz A. Analiza metylacji wysp CpG w odcinkach promotorowych genów p16 i p15 w czerniaku złośliwym skóry i gałki ocznej. Współcz. Onkol. 2001; 1: 10–12.
- Marini A., Mirmohammadsadegh A., Nambiar S., Gustrau A., Ruzicka T., Hengge U.R. Epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in serum of patients with cutaneous melanoma. J. Invest. Dermatol. 2006; 126: 422–431.
- Furuta J., Umehayashi Y., Miyamoto K. i wsp. Promoter methylation profiling of 30 genes in human malignant melanoma. Cancer Sci. 2004; 95: 962–968.
- Muthusamy V. Epigenetic silencing of novel tumor suppressors in malignant melanoma. Cancer Res. 2006; 66: 11187–11193.
- Wójtczak W., Skrzętkowicz J. Kliniczne znaczenie polimorfizmu wybranych genów cytochromu P-450: rodziny CYP1, podrodziny CYP2A, CYP2B oraz CYP2C. Pol. Merkuriusz Lek. 2009; 153: 248–252.

15. Denk A.E., Bettstetter M., Wild P.J. i wsp. Loss of maspin expression contributes to a more invasive potential in malignant melanoma. *Pigment Cell Res.* 2007; 20: 112–119.
16. Worm J., Bartkova J., Kirkin A.F. i wsp. Aberrant p27Kip1 promoter methylation in malignant melanoma. *Oncogene* 2000, 19: 5111–5115.
17. Koga Y., Pelizzola M., Cheng E. i wsp. Genome-wide screen of promoter methylation identifies novel markers in melanoma. *Genome Res.* 2009; 19: 1462–1470.
18. Kohonen-Corish M.R., Cooper W.A., Saab J., Thompson J.F., Trent R.J., Millward M.J. Promoter hypermethylation of the O(6)-methylguanine DNA methyltransferase gene and microsatellite instability in metastatic melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 2006; 126: 167–171.
19. Mirmohammadsadegh A., Marini A., Nambiar S. i wsp. Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. *Cancer Res.* 2006; 1: 6546–6552.
20. Sigalotti L., Covre A., Fratta E. i wsp. Epigenetics of human cutaneous melanoma: setting the stage for new therapeutic strategies. *J. Transl. Med.* 2010; 8: 56–78.
21. Sigalotti L. i wsp. Promoter methylation controls the expression of MAGE2, 3 and 4 genes in human cutaneous melanoma. *J. Immunother.* 2002; 25: 16–26.
22. De Smet C., De Backer O., Faraoni I., Lurquin C., Brasseur F., Boon T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 7149–7153.
23. Chen S., Sang N. Histone deacetylase inhibitors: the epigenetic therapeutics that repress hypoxia-inducible factors. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011; 2011: 197946–197960.
24. Federico M., Bagella L. Histone deacetylase inhibitors in the treatment of hematological malignancies and solid tumors. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011; 2011: 475641–475653.
25. Del Gaizo Moore V., Brown J.R., Certo M., Love T.M., Novina C.D., Letai A. Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J. Clin. Invest.* 2007; 117: 112–121.
26. Zhang X.D., Gillespie S.K., Borrow J.M., Hersey P. The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate regulates the expression of multiple apoptotic mediators and induces mitochondria-dependent apoptosis of melanoma cells. *Mol. Cancer Ther.* 2004; 3: 425–435.
27. Facchetti F., Previdi S., Ballarini M., Minucci S., Perego P., La Porta C.A. Modulation of pro- and anti-apoptotic factors in human melanoma cells exposed to histone deacetylase inhibitors. *Apoptosis* 2004; 9: 573–582.
28. Kato Y., Salumbides B.C., Wang X.F. i wsp. Antitumor effect of the histone deacetylase inhibitor LAQ824 in combination with 13-cis-retinoic acid in human malignant melanoma. *Mol. Cancer Ther.* 2007; 6: 70–81.
29. Demary K., Wong L., Spanjaard R.A. Effects of retinoic acid and sodium butyrate on gene expression, histone acetylation and inhibition of proliferation of melanoma cells. *Cancer Lett.* 2001; 163: 103–107.
30. Munshi A., Kurland J.F., Nishikawa T. i wsp. Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 4912–4922.
31. Munshi A., Tanaka T., Hobbs M.L., Tucker S.L., Richon V.M., Meyn R.E. Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, enhances the response of human tumor cells to ionizing radiation through prolongation of gamma-H2AX foci. *Mol. Cancer Ther.* 2006; 5: 1967–1974.
32. Mori T., Kim J., Yamano T. i wsp. Epigenetic up-regulation of C-C chemokine receptor 7 and C-X-C chemokine receptor 4 expression in melanoma cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 1800–1807.
33. Kim S.H., Ahn S., Han J.W. i wsp. Apicidin is a histone deacetylase inhibitor with anti-invasive and anti-angiogenic potentials. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 315: 964–970.
34. Bolden J.E., Peart M.J., Johnstone R.W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2006; 5: 769–784.
35. Kim Y.B., Lee K.H., Sugita K. i wsp. Oxamflatin is a novel antitumor compound that inhibits mammalian histone deacetylase. *Oncogene* 1999; 18: 2461–2470.
36. Zelent A., Petrie K., Lotan R., Waxman S., Gore S.D. Clinical translation of epigenetics in cancer: eN-CORE—a report on the second workshop. *Mol. Cancer Ther.* 2005; 4: 1810–1819.
37. Kwon H.J., Owa T., Hassig C.A., Shimada J., Schreiber S.L. Depudecin induces morphological reversion of transformed fibroblasts via the inhibition of histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 3356–3361.
38. Boyle G.M., Martyn A.C., Parsons P.G. Histone deacetylase inhibitors and malignant melanoma. *Pigment Cell. Res.* 2005; 18: 160–166.
39. Rosato R.R., Almenara J.A., Grant S. The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF11. *Cancer Res.* 2003; 63: 3637–3645.
40. Michaelis M., Michaelis U.R., Fleming I. i wsp. Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Mol. Pharmacol.* 2004; 65: 520–527.
41. Deroanne C.F. i wsp. Histone deacetylase inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene* 2002; 21: 427–436.
42. Magner W.J., Kazim A.L., Stewart C. i wsp. Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors. *J. Immunol.* 2000; 165: 7017–7024.
43. Daud A.I., Dawson J., De Conti R.C. i wsp. Potentiation of a topoisomerase I inhibitor, karenitecin, by the histone deacetylase inhibitor valproic acid in melanoma: translational and phase I/II clinical trial. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15: 2479–2487.
44. Munster P.N., Marchion D., Thomas S. i wsp. Phase I trial of vorinostat and doxorubicin in solid tumours: histone deacetylase 2 expression as a predictive marker. *Br. J. Cancer* 2009; 101: 1044–1050.
45. Ren J., Singh B.N., Huang Q. i wsp. DNA hypermethylation as a chemotherapy target. *Cell Signal* 2011.
46. Medina-Franco J.L., Caulfield T. Advances in the computational development of DNA methyltransferase inhibitors. *Drug. Discov. Today* 2011; 16: 418–425.
47. Lyko F., Brown R. DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. *J. Natl. Cancer. Inst.* 2005; 97:1498–1506.
48. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00398450?term=NCT00398450&rank=1>
49. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT0217542?term=NCT0217542&rank=1>
50. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00791271?term=NCT00791271&rank=1>
51. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00791271?term=NCT00791271&rank=1>
52. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00715793?term=NCT00715793&rank=1>
53. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00925132?term=NCT00925132&rank=1>
54. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00358319?term=NCT00358319&rank=1>
55. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT0104884?term=NCT0104884&rank=1>
56. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00185302?term=NCT00185302&rank=1>
57. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00667082?term=NCT00667082&rank=1>
58. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00121225?term=NCT00121225&rank=1>
59. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00331955?term=NCT00331955&rank=1>