

Modyfikacje epigenetyczne jako potencjalne cele terapii antynowotworowych

Epigenetic modifications as potential targets of anti-cancer therapy

Anna Kulczycka¹, Ilona Bednarek², Zofia Dzierżewicz¹

STRESZCZENIE

Epigenetyka zajmuje się badaniem cech dziedzicznych, które nie zależą bezpośrednio od sekwencji nukleotydowej w DNA, ale są rezultatem modyfikacji biochemicznych na ekspresję wybranych genów. Początkowo uważano, że ekspresja genów zależy tylko od informacji zapisanej zawartej w sekwencji DNA, z czasem okazało się, że liczne modyfikacje będące rezultatem działania różnych grup enzymów, w tym metylaz, demetylaz, acetylaz czy deacetylaz, wpływają na regulację tego procesu, a zaburzenia regulacji aktywności tych enzymów mogą prowadzić do wystąpienia i rozwoju m.in. nowotworów. Epigenetyczny aspekt rozwoju transformacji nowotworowej wskazuje na obniżenie globalnego poziomu metylacji DNA oraz podwyższenie poziomu metylacji w obrębie promotorów genów supresorowych, co znacząco upośledza represję nowotworzenia. Dodatkowo, modyfikacje białek histonowych, opierające się na dysregulacji procesów acetylacji–deacetylacji i metylacji–demetylacji, prowadzą do nadekspresji genów zaangażowanych w rozwój kancerogenezy. Opisane zostały liczne przykłady zależności wystąpienia nowotworów, m.in. raka sutka, stercza czy okrężnicy od wystąpienia danej modyfikacji reszt aminokwasowych białek histonowych, w tym głównie histonu H3. Z takich też przyczyn podejmowane są próby zastosowania terapii odwracających negatywny skutek wybranych modyfikacji, np. poprzez demetylację DNA (leki demetylujące DNA) czy re-acetylację reszt lizynowych histonów (inhibitory deacetylaz histonów). W niedalekiej przyszłości epigenetyka najprawdopodobniej umożliwi skuteczne leczenie części chorób nowotworowych, aczkolwiek konieczne są dalsze badania wpływu modyfikacji enzymatycznych na mechanizm rozwoju kancerogenezy.

SŁOWA KLUCZOWE

epigenetyka, DNA, histony, metylacja, acetylacja, fosforylacja, terapie antynowotworowe

ABSTRACT

Epigenetics analyses inherited characteristics not directly connected to the DNA nucleotide sequence. It investigates the relationships between biochemical modi-

¹Katedra i Zakład Biofarmacji
oraz ²Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach

ADRES DO KORESPONDENCJI:

Mgr Anna Kulczycka
Katedra i Zakład Biofarmacji
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach
ul. Narczyzów 1
41-206 Sosnowiec
tel. 515 356 486
e-mail: a_kulczycka@wp.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2013, 67, 3, 201–208
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
eISSN 1734-025X

fications and the expression of selected genes. Initially, it was thought that gene expression depends on information encoded in the DNA sequence. However, it was discovered that the activity of many enzymes like methylases, demethylases, acetylases, deacetylases is necessary to regulate this process and its dysregulations may lead to *e.g.* cancer initiation and progression. Epigenetics has an impact on neoplastic transformation by reducing the global level of DNA methylation and increasing the methylation level within tumour suppressor gene promoters, which significantly impairs the repression of carcinogenesis. Additionally, modifications of histone proteins, based on disorders of acetylation-deacetylation and methylation-demethylation processes, may lead to overexpression of genes involved in cancer development. Numerous examples have been described, among others breast, prostate and colon cancers, depending on the modification of histone amino tails, primarily of histone H3. For such reasons, the possibility of using many therapies which can reverse the negative effect of these modifications by *e.g.* DNA demethylation (DNA demethylating drugs) or re-acetylation of histone lysine residues (histone deacetylase inhibitors) is examined. In the near future, epigenetics probably will allow the effective treatment of some cancer diseases, although further research on the impact of enzymatic modifications on the development of carcinogenesis is still needed.

KEY WORDS

epigenetics, DNA, histones, methylation, acetylation, phosphorylation, anti-cancer treatments

WSTĘP

Powstawanie i rozwój nowotworów są skutkiem nieprawidłowej ekspresji genów. Ekspresja genów to przede wszystkim wynik odczytu zapisu informacji zawartej w sekwencji DNA, ale może być też regulowana w następstwie zmian epigenetycznych, obejmujących takie procesy, jak metylacja DNA, modyfikacje białek histonowych czy interferencja RNA. Epigenetyka zakłada istnienie kodu histonowego, który wskazuje, że zmiany w strukturze chromatyny prowadzą do różnic w poziomie ekspresji genów, co reguluje rozmaite procesy komórkowe. Wzory tych chromatynowych modyfikacji są dziedziczone i przekazywane do komórek potomnych [1]. Chromatyna jest interfazową postacią chromosomów, nukleoproteinowym kompleksem zbudowanym z helisy DNA, białek histonowych i niehistonowych. Strukturalnie może przybierać postać rozluźnioną – euchromatynę, umożliwiającą docieranie czynników transkrypcyjnych (umożliwia inicjację transkrypcji wybranych genów), oraz postać skondensowaną – heterochromatynę, nieaktywną transkrypcyjnie. Zmiany epigenetyczne obejmujące dysregulację ekspresji genów, mutacje w obrębie onkogenów, genów supresorowych czy tzw. genów naprawy DNA mogą przyczyniać się do niestabilności genetycznej, transformacji nowotworowej i rozwoju licznych nowotworów. Nowotwór ma zdolność do gromadzenia epimutacji, które umożliwiają utrzymywanie wysokiego tempa proliferacji, zdolności do metastazy oraz właściwości antyapoptotycznych [2,3].

Modyfikacje epigenetyczne DNA

Zmiany w poziomie ekspresji genów były początkowo opisywane jako wynik metylacji regionów promoto-

rowych. Metylacja należy do najtrwalszych modyfikacji biochemicznych. Prowadzi do wyciszenia ekspresji genów poprzez dwa mechanizmy: blokowanie przyłączenia koaktywatorów transkrypcji oraz przyłączanie białek MBD (*methyl-CpG-binding domain*) wiążących grupy metylowe. Enzymami przenoszącymi grupy metylowe w pozycję 5-cytozyny w regionach CpG (dinukleotyd cytydyna–fosforan–ganozyna) są metylotransferazy DNA – DNMT (*DNA methyltransferase*) [4,5].

Wyróżnia się cztery rodzaje enzymów DNMT: DNMT1, DNMT2, DNMT3A i DNMT3B. Metylotransferaza DNMT1 jest odpowiedzialna za powielanie wzorów metylacji DNA na nowo syntetyzowaną nić podczas replikacji. Charakteryzuje się silną preferencją do hemimetylowanego DNA. Enzym DNMT2 jest zaangażowany w utrzymywanie wzorów metylacji. Znakowanie grupami metylowymi *de novo* jest możliwe dzięki enzymom DNMT3A i DNMT3B. Szczególnym przykładem metylacji jest unieczynnienie jednego z alleli genu podczas gametogenezy, noszące nazwę imprintingu genowego (matczyny lub ojcowski). W przypadku transformacji nowotworowej zauważalne są zaburzenia homeostazy poziomu metylacji poprzez hipometylację globalną genomu oraz hipermetylację specyficzną dla miejsc promotorowych genów supresorowych nowotworów [3,5,6].

Modyfikacje epigenetyczne histonów

Drugą grupą modyfikacji elementów chromatyny są modyfikacje potranslacyjne reszt aminokwasowych histonów. Histony są białkami zasadowymi (ze względu na przewagę argininy i lizyny), zdolnymi do niekowalencyjnego wiązania się z helisą DNA. Ze względu na różnice w składzie aminokwasowym, masie cząsteczkowej i wielkości ładunku wyróżnia się pięć typów histonów: H1, H2A, H2B, H3 i H4. Typy

H2A, H2B, H3 i H4 uznawane są za histony rdzeniowe i współtworzą oktamer histonowy, wokół którego owinięta jest helisa DNA (o długości 146–147 pz), natomiast typ H1 umożliwia formowanie struktur chromatynowych o wyższej rzędowości. W budowie strukturalnej większości histonów wyróżnia się trzy podstawowe elementy: domenę globularną (najbardziej konserwatywną) oraz dwa końce – N-aminowy i C-karboksylovowy, które mogą podlegać różnym modyfikacjom, w tym acetylacji, fosforylacji, ubikwitynacji, metylacji, ADP-rybozylacji, sumoilacji, przez co przyczyniają się do generacji aktywnej bądź nieaktywnej chromatyny [5,7,8].

Do najczęściej opisywanych modyfikacji należy acetylacja. Acetylacja reszt lizyny w N-końcowych domenach histonu obniża ich dodatni ładunek, przez co rozluźnia się wiązanie DNA–histon. Umożliwia to przyłączanie czynników *trans* do wybranych sekwencji DNA, inicjację transkrypcji oraz zaburzenie związania N-końców histonu, co blokuje kondensację chromatyny [2]. Acetylacja jest procesem odwracalnym i przeprowadzanym przez enzym – acetylotransferazę histonów HAT (*histone acetyltransferase*) przy udziale donora grup acetylowych, jakim jest acetylo-CoA. Odwrotny proces jest rezultatem działania deacetylaz histonów nazywanych HDAC (*histone deacetylase*). Powiązanie tych odwracalnych modyfikacji ze zmianami w ekspresji genów przyczyniło się do uznania HAT jako koaktywatorów, a HDAC jako korepresorów transkrypcji. Najlepiej poznaną grupą ludzkich acetylaz jest rodzina GNAT (*Gcn5-related-N-acetyltransferase*). Zalicza się do niej dwa białka: PCAF – acetylowane przez inną rodzinę acetylaz CBP/p300 (*CBP/p300-associated factor*), oraz Gcn5 (*general control non-derepressible 5*). Acetylotransferazy modulują aktywność m.in. białka p53, czynników transkrypcyjnych, w tym TFII β i TFIIIF (*transcription factor IIB i IIF*) oraz białek niehistonowych z rodziny HMG (*high-mobility group*). Acetylazy i deacetylazy są zaangażowane w utrzymanie homeostazy organizmu poprzez stymulowanie wzrostu komórek, różnicowanie miotubul, proliferację adipocytów czy regulację kurczliwości miofilamentów [9,10].

U człowieka zidentyfikowano 18 genów kodujących deacetylazy i podzielono je na cztery podstawowe klasy: HDAC I, II, III i IV, z których I, II i IV, zaliczane są do klasycznych HDAC. Posiadają one domenę katalityczną z jonami Zn²⁺, a ich działanie może być blokowane przez związki chelatujące Zn²⁺. Z kolei klasa III jest szczególnym przypadkiem sirtuinowych enzymów SIRT, które wymagają kofaktora w postaci NAD⁺ (dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego), przez co są niewrażliwe na działanie inhibitorów HDAC (HDACi) [11,12]. Podstawową funkcją klasycznych HDAC jest regulacja transkrypcji przez deacetylację histonów oraz wiązanie białek i czynników transkrypcyjnych. W procesach nowotworowych

enzymy HDAC I i II odpowiadają za proliferację komórek, mobilność, potencjał metastatyczny oraz oporność na chemioterapię. W przypadku klasy III – enzymów SIRT – potwierdzony jest ich udział w procesach związanych ze starzeniem. Dodatkowo wysoki poziom SIRT typu I utrzymuje wzrost guzów litych, a upośledzenie jego aktywności prowadzi do zatrzymania proliferacji, indukuje apoptozę i wzbudza na nowo ekspresję wyciszonych wcześniej genów supresorowych nowotworów [3,13].

Nie tylko acetylacja, ale również fosforylacja prowadzi do wzmożonej ekspresji genów przez rozluźnienie struktury chromatyny. Fosforylacja jest wynikiem działania kinazy p34cdc2 (homolog MPF), kinaz aktywowanych stresem i mitogenami (MSK1) oraz kinazy Aurora B i obejmuje modyfikacje reszt seryny i treoniny. Proces ten wpływa na stopień kondensacji chromatyny w czasie mitozy. Rozpoczyna się w późniejszej fazie przedpodziałowej – G2 lub profazie podziałowej i obejmuje modyfikacje reszt serynowych (S) w pozycji 10 i 28 histonu H3. Hiperfosforylacja reszt aminokwasowych przez zastosowanie wysokiej temperatury doprowadza do przedwczesnej kondensacji chromatyny PCC (*premature chromatin condensation*), a defosforylacja umożliwia dekonkondensację i rozpoczyna się w anafazie podziałowej [14,15,16].

Na patogenezę różnego typu chorób wpływa metylacja białek histonowych. Wzór metylacji jest bardzo stabilny i utrzymuje się przez kolejne podziały komórkowe dzięki aktywności metylotransferazy histonów HMT (*histone methyltransferase*) przenoszącej grupę metylową z S-adenozynometyliny na resztę lizyny lub argininy. Enzym ten metyluje *de novo* syntetyzowane histony, gdy w ich pobliżu są już zmetylowane histony. Zmetylowane reszty są miejscem rekrutacji różnych białek, w tym HP1 (*heterochromatin protein*) utrzymującego stan chromatyny nieaktywnej transkrypcyjnie czy białek z rodziny ING (*inhibitor of growth family*), które uznawane są za geny supresorowe nowotworów. Reszty lizynowe histonów mogą być mono-, di- oraz trimetylowane. Enzymy HMT zaliczane są do trzech podstawowych grup, tj. metylotransferaz zawierających SET-domenę, lizynowych metylotransferaz Dot1-podobnych i argininowych metylotransferaz [3,8,17]. Metylacja dwóch reszt w różnych pozycjach w tym samym typie histonu niekoniecznie musi dawać ten sam efekt. Przykładowo, metylacja reszty lizyny (K) histonu H3 w pozycji 4 (H3K4) aktywuje transkrypcję, w pozycji 36 (H3K36) utrzymuje elongację transkrypcji, w przeciwieństwie do metylacji lizyny w pozycjach 9 i 27 (H3K9, H3K27), która prowadzi do represji transkrypcji [18].

Pomimo stabilności tych modyfikacji w organizmie odkryto enzymy mogące spełniać częściowe funkcje demetylujące: PADI4 (*peptidyl arginine deiminase 4*), LSD-1 (*lysine-specific demethylase 1*) oraz JMJD

(*JmjC-domain-containing histone demethylase*). Enzym PADI4 jest zależny od jonów wapnia i odpowiada za przemianę argininy do cytruliny. W przypadku przyłączenia się do niego deacetylazy HDAC-1, możliwa jest jednoczesna demetylacja i deacetylacja histonów. Kolejny enzym, LSD-1, ma zdolność usuwania grupy metylowej z mono- i dimetylowanej lizyny przez oksydację aminy przy użyciu kofaktora FAD (dinukleotyd flawinoadeninowy). Początkowo uważano, że niektóre wzory metylacji są nieodwracalne, m.in. trimetylacja H3K4. Jak się jednak okazało, istnieje enzym JMJD zdolny do usuwania grup trimetylowych w wyniku reakcji oksydacji, a kofaktorami tej reakcji są jony żelaza (II) oraz α -ketoglutaran [19, 20, 21].

Podłoże epigenetyczne chorób nowotworowych

Szczegółowa wiedza dotycząca modyfikacji epigenetycznych chromatyny może być przydatna do oceny ryzyka wystąpienia i progresji nowotworów oraz skuteczności podjętego leczenia. Komórki nowotworowe charakteryzują się widocznymi zmianami we wzorze metylacji DNA oraz zmianami w aktywności enzymów odpowiedzialnych za modyfikacje białek histonowych.

Hipermetylacja DNA w *locus DIRAS3* (DIRAS3) wiąże się z ryzykiem raka jajników, sutka i pęcherzykowatego tarczycy, w *locus ZACN* – z rakiem jajników, w *locus MEST* – z glejakiem wielopostaciowym, w *locus IGF2-H19* (H19) – z kostniakomięśakiem, guzem Wilmsa, rakiem okrężnicy, rakiem wątrobowokomórkowym oraz nowotworem jajników, a w *locus KCNQ1* (KVDNR, CDKN1C) – z rakiem okrężnicy i białaczką. Natomiast hipometylacja w *locus IGF2-H19* (DMR0) prowadzi do raka okrężnicy, pęcherza, jajników, sutka, kostniakomięśaka i guza Wilmsa, w *locus IGF2R* – do kostniakomięśaka, a w *locus L3MBTL* – do nowotworów szpiku kostnego [6].

W przypadku białek histonowych najczęściej opisywany jest udział zaburzeń procesów acetylacji i metylacji reszt aminokwasowych w rozwoju nowotworów. Poziom acetylacji histonów może być modyfikowany na poziomie aktywności enzymów HAT poprzez wirusowe onkoproteiny E1A pochodzenia adenowirusowego oraz duży T-antygen pochodzący z poliomawirusa SV40. Mutacje w tych genach mogą prowadzić do rozwoju zespołu Rubinstein-Taybiego, nowotworu jelita grubego i żołądka, glejaków, białaczek i zespołów mielodysplastycznych.

W przypadku HDAC bardzo często dochodzi do ich nieprawidłowego łączenia z białkami fuzyjnymi białaczki PML-RAR α (fuzja genu białaczki promielocytarnej z receptorem kwasu retinowego α), PLZF-RAR α (fuzja genu palca cynkowego białaczki promielocytarnej z receptorem kwasu retinowego)

i AML1-ETO (fuzja genu ostrej białaczki mieloidalnej z genem nowotworu mieloidalnego 8), przez co chromatyna utrzymywana jest w postaci nieaktywnej transkrypcyjnie [22, 23, 24].

W odniesieniu do poszczególnych klas HDAC nadekspresja enzymów może prowadzić w przypadku klasy I do rozwoju nowotworów żołądka (HDAC1, HDAC2, HDAC3), trzustki (HDAC1), okrężnicy (HDAC1, HDAC2, HDAC3), stercza (HDAC1, HDAC2, HDAC3), wątrobowo-komórkowego (HDAC1), szyi (HDAC2) i dziecięcej neuroblastomy (HDAC8), a w przypadku klasy II do rozwoju nowotworów sutka (HDAC4), okrężnicy (HDAC5, HDAC7) i raka płaskonabłonkowego jamy ustnej (HDAC6) [13]. Zaburzenia równowagi między aktywnością enzymatyczną HAT i HDAC przyczyniają się także do rozwoju chorób nienowotworowych, m.in. cukrzycy (hiperacetylacja promotorów genów zapalnych – TNF α , COX2), astmy (zwiększona aktywność HAT i zmniejszona aktywność HDAC) [25, 26].

Równoczesne wystąpienie acetylacji i metylacji może zwiększać ryzyko rozwoju złośliwego fenotypu nowotworu, np. w przypadku raka stercza. Wykrycie wysokiego poziomu acetylacji w pozycjach H3K18, H3K9 wraz z dimetylacją w pozycji H3K4 umożliwia rozróżnienie nowotworowej i niezłośliwej tkanki stercza (pozwala rozróżnić grupy ze zwiększonym ryzykiem nawrotu raka stercza po pierwotnym wyleczeniu). Pacjenci z niskim poziomem tych dwóch modyfikacji cechują się gorszym rokowaniem w stosunku do pacjentów z wysokim poziomem modyfikacji. Enzymem metylującym H3K9 jest RIZ1/PRDM2 (*retinoblastoma-interacting zinc-finger protein 1/PR domain zinc finger protein 2*). Metylaza RIZ1/PRDM2 ma zdolność supresji nowotworzenia w nowotworach sutka, raka wątrobowokomórkowego oraz żołądka [8, 27]. Metylacja innej reszty lizyny – H3K4 – jest widoczna jako rezultat obniżenia ekspresji demetylazy DM5B w zaawansowanych stadiach czerniaka skórno-

Zaburzenia metylacji w przypadku czerniaka mogą manifestować się także podwyższeniem poziomu metylacji w pozycji H3K27 w wyniku działania enzymu EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*), co umożliwia supresję białka p16 (szybki wzrost nowotworu), a także supresję E-kadheryny (naciekanie sąsiednich tkanek) [4]. Enzym EZH2 jest metylotransferazą zawierającą domenę SET katalizującą di- i trimetylację H3K27. Jej mutanty zostały wykryte w przypadku chłoniaków pęcherzykowatego i B-komórkowego, a nadekspresja jest widoczna m.in. w chłoniakach, raku stercza, raku okrężnicy, żołądka, pęcherza i sutka, sugerując, że EZH2 może być onkogenem. Wyłączenie EZH2 blokuje wzrost i inwazję komórek szpiczaka oraz komórek raka stercza. Usunięcie EZH2 obniża tempo proliferacji, zapobiega przejściu z fazy G2 do M cyklu oraz prowadzi do ekspresji genu su-

presorowego BRCA1 (*breast cancer 1*), co pozytywnie wpływa na zapobieganie rozwojowi raka sutka [3]. Ocena trimetylacji w pozycji H3K27 może być także użyteczna w prognozowaniu rozwoju raka płaskonabłonkowego przełyku. W przypadku nowotworu przełyku poziom tej modyfikacji w wyniku nadekspresji EZH2 jest większy niż w prawidłowej błonie śluzowej przełyku [28].

W trakcie progresji nowotworów: wątrobowo-komorowego, stercza i płuc wykrywalny jest wzrost poziomu ekspresji metylotransferazy G9a odpowiedzialnej za metylację w pozycji H4K9. Znacząca nadekspresja enzymu SMYD3 (*SET and MYND domain containing 3*) uczestniczącego w metylacji w pozycji H3K4 jest zauważalna w opisywanych przypadkach nowotworów okrężnicy, sutka, wątroby i okrężnicy [29]. Brak równowagi w aktywności enzymów metylujących-demetylujących przyczynia się do wystąpienia zespołu Sotosa, poprzez obniżenie poziomu trimetylacji w pozycjach H4K20 i H3K36 wskutek obniżonej aktywności NSD1 (*nuclear receptor SET domain containing protein-1*), czy choroby Huntingtona – poprzez spadek trimetylacji w pozycji H4K9 i wzrost w pozycji H3K27 wynikający ze zwiększonej aktywności metylotransferazy ESET (*ERG-associated protein with SET domain*) [26].

Metody wykrywania modyfikacji epigenetycznych

Ze względu na opisany znaczący wpływ modyfikacji epigenetycznych na zaburzenia prawidłowego funkcjonowania organizmu, niezbędne stało się opracowanie metod diagnostycznych umożliwiających wykrywanie tego typu zmian. Najwięcej technik umożliwia ocenę zmian w metylacji DNA. Techniki te wykorzystują m.in. trawienie restrykcyjne, reakcję łańcuchowej polimerazy, rozdział elektroforetyczny, hybrydizację z mikromacierzami bądź dodatek dwusiarczanu sodowego.

Jednostopniowy metylacyjno-specyficzny PCR (*one-step methylation-specific PCR* – OS-MSP) wykrywa zmetylowane DNA w obrębie miejsc promotorowych genów, np. GSTP1, RASSF1A i RAR β 2 w surowicy pacjentów z inwazyjnym rakiem sutka [30]. Połączenie technik analizy restrykcyjnej oraz amplifikacji jest podstawą technik MS-AP-PCR (*methylation-sensitive arbitrarily primed PCR*) czy REP (*restriction enzyme PCR*). Do trawienia restrykcyjnego mogą zostać wykorzystane m.in. restryktazy HpaI, MspI czy RsaI. Pierwszy enzym umożliwia cięcie DNA w miejscach metylacji, drugi – w miejscach niemetylowanych, trzeci zaś zapobiega powstawaniu artefaktów podczas amplifikacji. Uwidocznienie na elektroforegramie produktu po trawieniu z udziałem pierwszego enzymu lub brak produktu po trawieniu drugim enzymem świadczy o metylacji fragmentu DNA. Metoda ta umożliwia wykrycie fragmentów DNA o zmienionym

wzorze metylacji. Metylowrażliwe restryktazy są także stosowane w przypadku analizy metylacji genomu techniką mikromacierzy DMH (*differential methylation hybridisation*). Na płytki do oznaczania nanosi się kilka tysięcy jednoniciowych fragmentów CpG. Badane próbki DNA poddaje się trawieniu, amplifikacji i znakowaniu barwnikami fluorescencyjnymi (w celu rozróżnienia produktów pochodzących z tkanki prawidłowej bądź nowotworowej), a następnie nanosi na mikromacierze wysp CpG. Ze względu na zastosowanie różnych barwników sygnał żółty widoczny jest w zmetylowanych sekwencjach (występowanie w obu tkankach), natomiast czerwony w tkance nowotworowej [31]. Do technik wykorzystujących dwusiarczan sodowy oraz amplifikację PCR do oceny metylacji DNA zaliczać można MSP (*methylation-specific PCR*) i BSSCP (*bisulfite single-strand conformation polymorphism*). Dwusiarczan sodowy przekształca niemetylowane cytozyny w reszty uracylowe. Wyniki świadczą o obecności grup metylowych związanych z cytozyną [32].

W przypadku konieczności odnalezienia określonych wzorów modyfikacji epigenetycznych dla białek histonowych najbardziej użyteczna jest technika immunoprecypitacji chromatyny (*chromatin immunoprecipitation* – ChIP), umożliwiająca wysokorozdzielczą analizę białek związanych z chromatyną oraz wykrywanie modyfikacji histonów, tj. trimetylację w pozycji H3K4 lub H4K9. Immunoprecypitacja może być połączona z sekwencjonowaniem (ChIP-seq), pozwalając oceniać zmiany epigenetyczne globalnie lub z mikromacierzami (ChIP-chip), a następnie porównać wzory metylacji pochodzących z materiału prawidłowego i nowotworowego [33,34].

Strategie leczenia chorób epigenetycznych

Jedną z pierwszych strategii leczenia chorób nowotworowych o podłożu zmodyfikowanym epigenetycznie była synteza związków naśladujących działanie enzymów DNMT, czyli demetylujących DNA. W przypadku nowotworów geny supresorowe są „wyłączone” metylacją. Leczenie odwracające ten efekt jest możliwe dzięki zastosowaniu inhibitorów metylotransferazy DNA: 5-azacytydyny (5-aza-CR) oraz 5-aza-2'-deoksycytydyny (5-aza-CdR, Decitabine). Mechanizm działania zakłada, że lek naśladujący budową cytozynę wbudowywany podczas replikacji do DNA wyłapuje i tym samym blokuje działanie DNMT. Ważną kwestią było dobranie odpowiedniej dawki tych leków, aby uniknąć nasilonego efektu cytotoksycznego w stosunku do prawidłowych komórek. Ostatecznie zezwolenie na wykorzystanie tych leków do leczenia MDS – syndromu mielodysplastycznego – zostało wydane przez FDA (Food and Drug Administration, USA) w 2004 r. dla azacytydyny i w 2006 r. dla decitabiny [35].

Odmianą grupą inhibitorów DNMT są inhibitory nienukleozydowe blokujące bezpośrednio DNMT, bez konieczności wbudowywania w DNA. W tym przypadku badany jest potencjał wykorzystania związków, tj. prokaina i prokainamid (zaburzają łączenie DNMT z DNA), RG108 (wiąże i blokuje miejsce katalityczne DNMT), oraz oligonukleotydów antysensowych MG98 (pobudzają degradację mRNA DNMT) [4].

W badaniach klinicznych dotyczących terapii przeciwnowotworowej wykorzystuje się możliwość pobudzenia ekspresji wcześniej wyciszonych deacetylaz genów supresorowych. Uważa się, że HDAC spełniają funkcje onkogenów i niewłaściwe ich funkcjonowanie przyczynia się do nieprawidłowego wzrostu komórek i tym samym do rozwoju nowotworu. Stwierdzono, że inhibicja HDAC aktywuje różne antynowotworowe szlaki, w tym zatrzymanie wzrostu, aktywację szlaków proapoptotycznych i supresję angiogenezy. Związkami znoszącymi działanie HDAC są tzw. inhibitory deacetylaz histonów (HDACi), do których należą m.in. krótkie łańcuchy kwasów tłuszczowych (pochodne kwasu masłowego, kwas walproinowy), kwasy hydroksamowe (vorinostat, belinostat), cykliczne tetrapeptydy (trapoksyna A, apicydyna, depsi-peptyd) i benzamidy (entinostat) [36].

Przykładem jednego z najłatwiej dostępnych związków HDACi jest maślan sodu. Wpływa on wybiórczo na aktywację genów kodujących białka blokujące cykl komórkowy, takie jak białko p21^{WAF1}, co w rezultacie prowadzi do apoptozy komórek. Jakkolwiek hiperacetylacja przy użyciu tego związku jest zauważalna zarówno w komórkach prawidłowych, jak i nowotworowych, to działanie antyproliferacyjne i proapoptotyczne jest nasilone w przypadku linii nowotworowych. Mechanizm działania opiera się na blokowaniu kinazy cdk2 wskutek pobudzenia ekspresji białka p21^{WAF1}. Dodatkowo hamowana jest ekspresja cyklin D, E i A, co wpływa na zatrzymanie komórek w fazie wzrostowej G1 i blokuje podział komórki [37].

Ze względu na liczne skutki uboczne związków reacytylujących (kariotoksyczność, zaburzenia hematopoezy) konieczne jest poszukiwanie coraz bardziej specyficznych cząsteczek HDACi. Jak dotąd, odkryto m.in. inhibitory specyficzne dla HDAC6 (klasa II) oraz HDAC8 (klasa I), których wysoką specyficzność potwierdza m.in. działanie inhibitora PCI-34051 blokującego HDAC8 i indukującego apoptozę chłoniaka T-komórkowego (bez wpływu na komórki prawidłowe). Z kolei MGCD0103 (mocetinostat) przez blokowanie izoform HDAC 1, 2 i 3 (klasa I) oraz 11 (klasa IV) w badaniach klinicznych prowadzi do zablokowania acetylacji histonów u pacjentów z zaawansowanymi guzami litymi [26]. Związkiem HDACi dopuszczonym do użytku przez FDA jest romidepsyna (Romdepsin) – inhibitor specyficzny dla HDAC klas I oraz II, stosowany w leczeniu chłoniaka skórno-

T-komórkowego, choć aktualnie bada się możliwość zastosowania go w innych chorobach nowotworowych [38].

Równocześnie pracuje się nad wykorzystaniem inhibicji SIRT1 w regulacji stanów zapalnych, zaburzeń metabolicznych i zatrzymaniu procesów nowotworowych. Zaprojektowano cząsteczkę o nazwie JGB1741, strukturalnie zbliżoną do sirtinolu, która umożliwia zatrzymanie proliferacji i indukcję apoptozy w komórkach raka sutka linii MDA-MB [12].

W przypadku nowotworu trzustki konieczne jest poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych, gdyż nowotwór ten cechuje się wysokim odsetkiem śmiertelności, a efektywność chemioterapii nie jest wystarczająca. Standardowo wykorzystuje się gemcitabinę (Gemcitabine) chociaż mniej niż 25% stosujących ją pacjentów doświadcza klinicznych korzyści, z nieznacznym polepszeniem mediany przeżycia w stosunku do użycia klasycznego 5-fluorouracylu. Sorafenib, multitargetowy inhibitor kinazy tyrozynowej, stosowany w zaawansowanych przypadkach również nieznacznie wydłuża medianę przeżycia.

Z takich powodów w trakcie badań klinicznych jest wiele nowych związków HDACi, w tym belinostat, który blokuje proliferację komórek nowotworowych przy podaniu w niskich mikromolekularnych stężeniach. Badany był synergizm jego działania z dipeptydowym inhibitorem proteasomu 26S – bortezomibem. Inhibicja proteosomu powoduje zmniejszenie proliferacji i migracji oraz indukcję apoptozy poprzez obniżenie poziomu ekspresji czynnika NFκB. W badaniach *in vitro* dotyczących nowotworów: okrężnicy, wątroby i trzustki zauważalna była inhibicja proliferacji i indukcja szlaków proapoptotycznych, wraz ze zwiększeniem ekspresji białek regulatorowych p21^{WAF1} i p27^{WAF1}. Sam belinostat poprzez ponowną acetylację w komórkach nowotworowych wpływał na supresję także innych nowotworów: pęcherza, stercza i jajników [39].

Oprócz metylacji i acetylacji na kancerogenezę wpływa wysoki poziom fosforylacji seryny w pozycji 10 (H3S10). Jest to wynik zwiększenia ekspresji kinaz: Aurory B i MSK-1. Czynnikiem terapeutycznym przeciwdziałającym zwiększeniu ekspresji tych enzymów jest squamocyna – związek pochodzenia roślinnego (*Annonaceae*, Flaszowcowate), ograniczający ekspresję kinaz i w rezultacie obniżający poziom fosforylacji w pozycjach H3S10 oraz H3S28. Dodatkowo wpływa na aktywację pINK i kaspaz: 3, 8, 9, przez co blokuje cykl komórkowy w fazie G1 oraz pobudza zewnątrz- i wewnątrzpochodne szlaki apoptotyczne. Squamocyna doświadczalnie powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego i apoptozę w liniach nowotworowych: GBM8401, Huh-7 i SW620 pochodzenia mózgowego, wątrobowego i jelitowego [16].

W ostatnim czasie odkryto całą grupę oligoaminowych analogów będących inhibitorami enzymu deme-

tylującego LSD1. Leczenie raka okrężnicy za pomocą inhibitora LSD1 (SL11144) zwiększa poziom metylacji w pozycji H3K4 i obniża poziom dimetylacji w pozycji H3K9. W badaniach nad nerwiakiem niedojrzałym inhibitory LSD1 hamują proliferację *in vitro*, zaobserwowano ponadto, że znoszą one działanie DNMT1, co skutkuje zmianami we wzorze metylacji DNA. Ze względu na obie właściwości zastosowanie tych inhibitorów budzi duże nadzieje.

W dotychczasowych badaniach przedklinicznych najbardziej obiecujące rezultaty przynosi wykorzystanie związku DZNep (3-deazaneplanocyna A), który m.in. obniża poziom trimetylacji w pozycji H3K27 i indukuje apoptozę komórek raka sutka (brak wpływu na prawidłowe komórki). Efekt jest zbliżony do wyciszenia EZH2 za pomocą interferencji RNA, co sugeruje, że związek ten jest najskuteczniejszy w przypadku nowotworów sutka i stercza, które cechuje znaczna nadekspresja poziomu EZH2. Co więcej, dowiedziono, że DZNep zmniejsza także trimetylację w pozycji H4K20 [26]. Aktywność EZH2 może być także regulowana przy udziale PI3K/Akt (*phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt*), która fosforyluje resztę seryny w pozycji 21 (H3S21) zmniejsza aktywność tej metylotransferazy i tym samym obniża poziom trimetylacji H3K27. Trimetylacja może być przywrócona przez użycie Ly294002, inhibitora kompleksu PI3K/Akt [40].

Jednym z ostatnich przedmiotów badań był kompleks metylotransferaz G9a/białko G9a-podobne (GLP), odpowiedzialny za mono- i dimetylację histonu H3 w pozycjach H3K9 i H3K27. Jego nadekspresja jest widoczna w komórkach linii nowotworowych stercza, sutka, płuc i okrężnicy. Pierwszym odkrytym inhibitorem była chaetocyna (tiodioksopperazyna – metabolit z *Chaetomium minutum*). Najbardziej skutecznym inhibitorem jest obecnie BIX-01294 – pochodna diazepino-kinazolino-aminowa, obniżająca poziom metylacji w pozycji H3K9 przez łączenie białka GLP

z domeną SET, co blokuje dostęp do reszt lizynowych [3,26].

PODSUMOWANIE

Badania mające na celu opisanie wszystkich wzorów modyfikacji regulujących ekspresję genów są niezwykle ważne, gdyż wszelkie dysregulacje tych procesów przyczyniają się do powstawania i rozwoju rozmaitych chorób, w tym nowotworowych. Transformacja nowotworowa jest wynikiem zaburzenia homeostazy w aktywności enzymów metylujących DNA, prowadzących do niestabilności genomu (hipometylacja globalna) i hipermetylacji miejsc promotorowych dla genów supresorowych nowotworów, a także enzymów odpowiedzialnych za modyfikacje potranslacyjne białek histonowych, co uaktywnia geny zwiększające tempo proliferacji komórek nowotworowych oraz powoduje wzrost potencjału metastatycznego i antyapoptotycznego.

Opisano wiele przypadków zaburzenia modyfikacji chromatyny jako źródła kancerogenezy. W odpowiedzi na dziedziczne zmiany w poziomach m.in. metylacji i acetylacji prowadzi się badania nad syntezą związków znoszących ich niekorzystne działanie poprzez stymulację procesów odwrotnych – demetylacji albo deacetylacji. Niestety, ze względu na ich złożoność i możliwość istnienia kilku przeciwstawnych modyfikacji wpływających na patogenezę choroby, konieczne jest poszukiwanie związków o bardzo specyficznym działaniu, z ograniczeniem ich efektu cytotoksycznego dla komórek prawidłowych. Najprawdopodobniej rozwój epigenetyki pozwoli poznać mechanizmy powstawania konkretnych nowotworów i wprowadzić innowacyjne procedury terapeutyczne działające na poziomie epigenomu, co przyczyni się do skuteczniejszego leczenia nowotworów.

Praca była finansowana ze środków umowy KNW-1-036/D/2/0.

PIŚMIENNICTWO

1. Herceg Z. Epigenetic information in chromatin and cancer. *Eur. J. Cancer* 2009; 45(1): 442–444.
2. Davis C., Ross S. Dietary components impact histone modifications and cancer risk. *Nutr. Rev.* 2007; 65(2): 88–94.
3. Mund C., Lyko F. Epigenetic cancer therapy: Proof of concept and remaining challenges. *Bioassays* 2010; 32(11): 949–957.
4. 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.
5. Zheng Y., Wu J., Chen Z., Goodman M. Chemical regulation of epigenetic modifications: opportunities for new cancer therapy. *Med. Res. Rev.* 2008; 28(5): 645–687.
6. Uribe-Lewis S., Woodfine K., Stojic L., Murrell A. Molecular mechanisms of genomic imprinting and clinical implications for cancer. *Expert Rev. Mol. Med.* 2011; 13: e2.
7. Doenecke D., Albig W., Bode C. i wsp. Histones: genetic diversity and tissue-specific gene expression. *Histochem. Cell Biol.* 1997; 107(1): 1–10.
8. Wang G., Allis C., Chi P. Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends Mol. Med.* 2007; 13(9): 363–372.
9. Biel M., Wascholowski V., Giannis A. Epigenetics – an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 2005; 44(21): 3186–3216.
10. Peserico A., Simone C. Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011; 2011: 371–382.
11. Ellis L., Pili R. Histone deacetylase inhibitors: advancing therapeutic strategies in hematological and solid malignancies. *Pharmaceuticals (Basel)* 2010; 3(8): 2411–2469.
12. Kalle A., Mallika A., Badiger J., Alinakhi, Talukdar P., Sachchidanand. Inhibition of SIRT1 by a small molecule induces apoptosis in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; 401(1): 13–19.
13. Witt O., Deubzer H., Milde T., Oehme I. HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett* 2009; 277(1): 8–21.
14. Van Hooser A., Goodrich D., Allis C., Brinkley B., Mancini M. Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of

- mammalian chromosome condensation. *J. Cell Sci.* 1998; 111(23): 3497–3506.
15. Nishitani H., Ohtsubo M., Yamashita K. i wsp. Loss of RCC1, a nuclear DNA-binding protein, uncouples the completion of DNA replication from the activation of cdc2 protein kinase and mitosis. *EMBO J* 1991; 10(6): 1555–1564.
 16. Lee C., Lin Y., Chang W., Lin P., Wu Y., Chang J. Squamocin modulates histone H3 phosphorylation levels and induces G1 phase arrest and apoptosis in cancer cells. *BMC Cancer* 2011; 11: 58.
 17. Varier R., Timmers H. Histone lysine methylation and demethylation pathways in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 2011; 1815(1): 75–89.
 18. Paluszczak J., Baer-Dubowska W. Zjawiska epigenetyczne w patogenezie nowotworów. Nowe możliwości profilaktyki i terapii? *Post. Bioch.* 2005; 51(3): 244–250.
 19. Denis H., Deplus R., Putmans P., Yamada M., Metivier R., Fuks F. Functional connection between deamination and deacetylation of histones. *Mol. Cell Biol.* 2009; 29(18): 4982–4993.
 20. Chen Y., Yang Y., Wang F. i wsp. Crystal structure of human histone lysine-specific demethylase 1 (LSD1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103(38): 13956–13961.
 21. Klose R., Yamane K., Bae Y. i wsp. The transcriptional repressor JHD3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature* 2006; 442(7100): 312–316.
 22. Chan H., La Thangue N. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J. Cell Sci.* 2001; 114(13): 2363–2373.
 23. Ishikawa K., Yamakawa M., Semba S. i wsp. Expression of HDAC1 and CBP/p300 in human colorectal carcinomas. *J. Clin. Pathol.* 2007; 60(11): 1205–1210.
 24. Masetti R., Serravalle S., Biagi C., Pession A. The role of HDACs inhibitors in childhood and adolescence acute leukemias. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011; 2011: 148046.
 25. Christensen D., Dahllöf M., Lundh M. i wsp. Histone deacetylase (HDAC) inhibition as a novel treatment for diabetes mellitus. *Mol. Med.* 2011; 17(5–6): 378–390.
 26. Kelly T., De Carvalho D., Jones P. Epigenetic modifications as a therapeutic targets. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28(10): 1069–1078.
 27. Halusková J. Epigenetic studies in human diseases. *Folia Biol. (Praha)* 2010; 56(3): 83–96.
 28. He L., Liu M., Li B. i wsp. Prognostic impact of H3K27me3 expression on locoregional progression after chemoradiotherapy in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2009; 9: 461.
 29. Copeland R., Solomon M., Richon V. Protein methyltransferases as a target class for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2009; 8(9): 724–732.
 30. Fujita N., Nakayama T., Yamamoto N. i wsp. Methylated DNA and total DNA in serum detected by One-Step Methylation-Specific PCR is predictive of poor prognosis for breast cancer patients. *Oncology* 2012; 83(5): 273–282.
 31. Plass CH. Cancer epigenomics. *Hum. Mol. Genet.* 2002; 11: 2479–2488.
 32. Jabłońska J., Jesionek-Kupnicka D. Zmiany epigenetyczne w nowotworach. *Onkol. Pol.* 2004; 7(4): 181–185.
 33. Steiner L., Hopp L., Wirth H i wsp. A global genome segmentation method for exploration of epigenetic patterns. *PLoS One* 2012; 7(10): e46811.
 34. Żmieńko A., Handshuh L., Góralski M., Figlerowicz M. Zastosowanie mikromacierzy DNA w genomice strukturalnej i funkcjonalnej. *Biotechnologia* 2008; 4(83): 39–53.
 35. Kaiser J. Epigenetic drugs take on cancer. *Science* 2010; 330(6004): 576–578.
 36. Lin H., Chen C., Lin S., Weng J., Chen C. Targeting histone deacetylase in cancer therapy. *Med. Res. Rev.* 2006; 26(4): 397–413.
 37. Stepulak A., Stryjecka-Zimmer M., Kupisz K., Polberg K. Inhibitory deacetylaz histonów jako potencjalne cytostatyki nowej generacji. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2005; 59: 68–74.
 38. Poligone B., Lin J., Chung C. Romidepsin: evidence for its potential use to manage previously treated cutaneous T cell lymphoma. *Core Evid* 2011; 6: 1–12.
 39. Spratlin J., Pitts T., Kulikowski G. i wsp. Synergistic activity of histone deacetylase and proteasome inhibition against pancreatic and hepatocellular cancer cell lines. *Anticancer Res.* 2011; 31(4): 1093–1103.
 40. Cha T., Zhou B., Xia W. i wsp. Akt-mediated phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of lysine 27 in histone H3. *Science* 2005; 310(5746): 306–310.