

## Modyfikacje epigenetyczne a nowotwory

Sylvia Flis<sup>1</sup>, Krzysztof Flis<sup>2</sup>, Jacek Spławiński<sup>1</sup>

*Rozwój zmian nowotworowych podlega kontroli zarówno mechanizmów genetycznych, jak i epigenetycznych. Zmiany we wzorze epigenotypu, wynikające na przykład z metylacji DNA czy modyfikacji histonów, podobnie jak zmiany w nukleotydowej sekwencji DNA, mogą prowadzić do wyciszenia genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego, apoptozę czy naprawę DNA. Z tego względu poznanie procesów modyfikacji epigenetycznych może mieć ogromne znaczenie dla zrozumienia procesów transformacji nowotworowej oraz praktyczne zastosowanie w diagnostyce i terapii przeciwnowotworowej.*

### Epigenetic modification and cancer

*The development of cancer is controlled by both genetic and epigenetic mechanisms. Changes in the epigenetic pattern by DNA methylation or histone modifications as well as in the DNA sequence can lead to the silencing of those genes, which are involved in the regulation of many processes such as cell cycle, apoptosis or DNA repair. Therefore understanding the processes of epigenetic modification can have clinical application in cancer therapy.*

**Słowa kluczowe:** epigenetyka, metylacja DNA, acetylacja histonów, terapia przeciwnowotworowa

**Key words:** epigenetics, DNA methylation, histone acetylation, anticancer therapy

### Wprowadzenie

Przez lata naukowcy interesowali się wyłącznie genami, ponieważ to geny kodują sekwencję aminokwasową (strukturę I-rzędową) białek. Z czasem okazało się, że pewne białka mogą odgrywać istotną rolę w modelowaniu ekspresji genów na poziomie dostępności DNA dla maszyny transkrypcyjnej [1]. Stwierdzenie, że ekspresja genów nie jest determinowana wyłącznie przez sam kod genetyczny zapisany w DNA, zapoczątkowało rozwój nowego kierunku w biologii molekularnej – epigenetyki [1].

Epigenetyka zajmuje się badaniem zmian w ekspresji genów, które wynikają nie ze zmian w nukleotydowej sekwencji DNA (mutacji), ale są efektem przebudowy struktury DNA na danym obszarze i, co za tym idzie, zmian w dostępności poszczególnych genów dla procesu transkrypcji. Te zmiany struktury DNA są wynikiem poreplikacyjnej modyfikacji DNA i/lub potranslacyjnej modyfikacji białek związanych z DNA. Ponieważ, w przeciwieństwie do mutacji, oba typy modyfikacji są odwracalne, mogą być potencjalnym celem działania różnych leków przywracających prawidłową ekspresję genów

istotnych dla właściwego funkcjonowania komórek [2]. Stąd obserwuje się rosnące zainteresowanie badaniami zmian epigenetycznych. Dziedzina ta nabiera znaczenia szczególnie w świetle ostatnich badań, które wykazały, że zmiany epigenetyczne odgrywają istotną rolę w biologii nowotworów, infekcjach wirusowych, a nawet w rozwoju zaburzeń psychicznych.

Aby zrozumieć znaczenie modyfikacji epigenetycznych, a co za tym idzie procesy związane z ekspresją poszczególnych genów, należy uzmysłowić sobie, na czym polega wysoce zorganizowany system pakowania DNA w komórce eukariotycznej.

### Chromatyna

W jądrze komórkowym cząsteczka DNA nie tworzy spontanicznie struktur skondensowanych, gdyż przeciwdziałają temu gęsto rozmieszczone, odpychające się ładunki ujemne grup fosforanowych. Kondensacja genomowego DNA zachodzi dzięki tworzeniu się kompleksów kwasu nukleinowego z białkami, co prowadzi do powstania chromatyny.

Podstawową, powtarzającą się, podjednostką strukturalną chromatyny jest nukleosom, w skład którego wchodzi niewielkie białko zasadowe zwane histonami oraz DNA. Rdzeń nukleosomu zbudowany jest z DNA o długości 146 par zasad (bp) oraz przypominającego walec białkowego oktameru, na którym to DNA jest

<sup>1</sup> Zakład Farmakologii

Narodowy Instytut Leków w Warszawie

<sup>2</sup> Pracownia Mutagenyzy i Reperacji DNA

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie

nawinięte. Oktamer zawiera po dwa histony H2A, H2B, H3 i H4. Dodatkowo DNA, nawinięte na histonowy oktamer, jest przytrzymywane, wraz ze swoim wchodzącym i wychodzącym fragmentem, przez pojedynczy histon łącznikowy H1, który wraz z rdzeniem nukleosomu tworzy tzw. chromatosom. Histon łącznikowy działa jak kłama zapobiegająca oddzieleniu się zwoju DNA od rdzenia nukleosomu. Pomiędzy kolejnymi chromatosomami występuje odcinek wolnego DNA o zmiennej długości. Jest to tzw. DNA łącznikowe [3]. Chromatosom wraz z przyległym DNA łącznikowym stanowi nukleosom i zapewnia 6-7-krotną kondensację DNA (Ryc. 1). Włókna nukleosomowe (włókna chromatynowe 10 nm) w warunkach jonowych jądra ulegają spontanicznej spiralizacji, tworząc włókna o średnicy ok. 30 nm, które stanowią natywną formę dla aktywnej transkrypcyjnie chromatyny (euchromatyny) i zwiększają współczynnik upakowania DNA do około 40. Mogą one jednak ulegać dalszej kondensacji, tworząc nieaktywną transkrypcyjnie heterochromatynę, a najwyższy stopień kondensacji osiągają podczas podziału komórki, tworząc chromosomy metafazowe (wówczas stopień upakowania DNA dochodzi do ok. 10000).

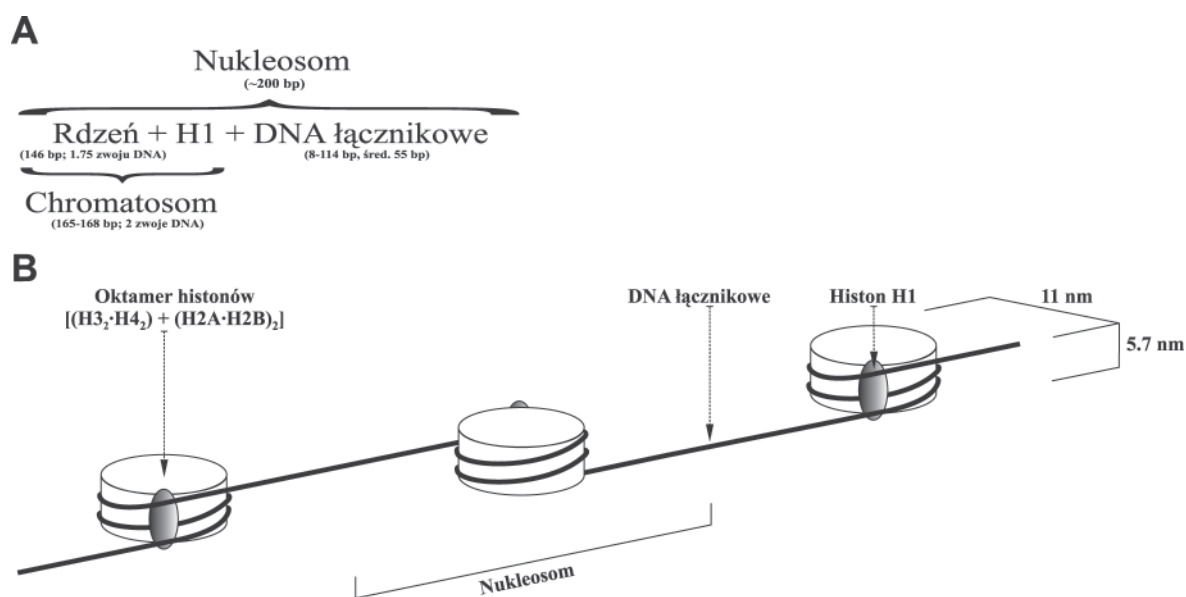
Funkcja histonów nie ogranicza się tylko do bycia składowym elementem chromatyny. Histony, ulegając kilku modyfikacjom posttranslacyjnym, wpływają na ekspresję genów poprzez zmianę struktury chromatyny. Do najważniejszych modyfikacji białek histonowych należą acetylacja oraz metylacja grupy ε-aminowej lizyny [3]. Udział histonów w zmienności epigenetycznej nie zależy wyłącznie od rodzaju modyfikacji i miejsca jej wystąpienia, ale także jej wpływu na proces metylacji samego DNA [4].

## Metylacja DNA i acetylacja histonów – wpływ na regulację ekspresji genów

Najlepiej poznanym zjawiskiem epigenetycznym jest metylacja DNA, która polega na kowalencyjnym wiązaniu grupy metylowej (-CH<sub>3</sub>) do węgla w pozycji piątej cytozyny [5]. Miejsce metylacji nie jest przypadkowe. Dotyczy tylko cytozyny wchodzącej w skład sekwencji 5'-CG-3' (rzadziej 5'-CA-3' czy 5'-CT-3'), czyli dinukleotydów CpG (*cytosine that precede a guanosine*), które są nazywane wyspami CpG.

Początkowo uważano, że wyspy CpG nie ulegają metylacji w komórkach prawidłowych z wyjątkiem tych wysp, które są związane ze zjawiskiem piętnowania genów (*imprinted genes*), czy z genami zlokalizowanymi na nieaktywnym chromosomie X (tzw. ciało Barra – jeden z pary chromosomów X w komórkach samic ssaków). Obecnie wiadomo, że w niektórych komórkach prawidłowych metylacja niepiętnowanych autosomalnych wysp CpG pełni funkcję mechanizmu kontrolującego ekspresję genów [6]. W genach niezbędnych do utrzymania podstawowego metabolizmu komórkowego, których ekspresja nie podlega regulacji (*housekeeping genes*), wyspy CpG nie są metylowane. Natomiast, w przypadku genów, których ekspresja jest tkankowo specyficzna, wyspy CpG często stanowią cel metylacji, z wyjątkiem komórek tej tkanki, dla której produkt danego genu jest charakterystyczny. Ponadto, ze względu na zachowanie wzoru metylacji DNA po podziale komórki, informacja o tym, który gen powinien ulegać ekspresji, jest dziedziczona przez komórkę potomną, gwarantując zachowanie wzoru ekspresji genów w danej tkance [7, 8].

W procesie metylacji DNA biorą udział enzymy zwane metylotransferazami DNA (DNMT) – *DNA methylotransferase*). U kręgowców zidentyfikowano do



**Ryc. 1.** Nukleosom. **A.** Uproszczony schemat budowy z wprowadzoną terminologią elementów składowych. W nawiasach podano długość odcinka DNA, wchodzącego w skład danego elementu oraz liczbę występujących lewoskrętnych oplotów dwuniciowego DNA. **B.** Fragment włókna chromatynowego 10 nm z zaznaczonymi nukleosomami. Dla przejrzystości schematu grubość dwuniciowego DNA została pomniejszona względem pozostałych elementów (w rzeczywistości wynosi 2 nm)

tej pory pięć aktywnych enzymów z tej rodziny: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b i DNMT3L, charakteryzujących się obecnością ponad dziesięciu wysoce konserwowanych regionów, odpowiedzialnych za transfer grupy  $-CH_3$  z S-adenozylometioniny na cytozynę dinukleotydu CpG oraz występowaniem domeny TRD (*target-recognizing domain*), umożliwiającej rozpoznanie specyficznych sekwencji DNA [9].

Ze względu na sposób metylacji DNA enzymy DNMT można podzielić na dwie grupy. Do pierwszej należy DNMT1, odpowiedzialny za metylację zachowawczą, polegającą na przyłączaniu grup  $-CH_3$  do nowo zsyntetyzowanej nici DNA w miejscach komplementarnych do miejsc metylowanych na nici matczynej. Druga grupa to enzymy DNMT3a i DNMT3b, odgrywające kluczową rolę w metylacji *de novo*, czyli przyłączaniu grup metylowych do dinukleotydów CpG w zupełnie nowych miejscach. Ten typ metylacji powoduje zatem zmianę wzoru metylacji konkretnych fragmentów genomu i występuje przede wszystkim na wczesnych etapach rozwoju embrionalnego [10]. DNMT3L, podobnie jak DNMT3a i DNMT3b, „działa” *de novo* z tym, że jest odpowiedzialny za występowanie matczynego piętnowania genomowego [11, 12]. Natomiast funkcja DNMT2 nie jest do końca wyjaśniona, ale w świetle ostatnich badań wydaje się, że DNMT2 jest odpowiedzialny raczej za metylację tRNA niż DNA [13].

Tak więc, metylotransferazy DNA są zaangażowane w proces piętnowania genomowego oraz w regulację transkrypcji genów. Tym samym wywierają istotny wpływ na procesy embriogenezy oraz różnicowania się komórek.

Na podstawie przedstawionych danych można by przypuszczać, że enzymy te poprzez metylację DNA bezpośrednio blokują ekspresję genów, ale jest to zbyt duże uproszczenie. Metylacja DNA wpływa bowiem na interakcje białko – DNA, prowadząc do zmian w strukturze chromatyny oraz dostępności DNA dla czynników i maszynerii transkrypcyjnej. Tym samym przyczynia się do spadku lub wzrostu tempa transkrypcji w zależności od tego jakie, pozytywne czy negatywne, elementy regulatorowe genów są w te procesy zaangażowane. Metylacja wysp CpG w promotorach genów jest rozpoznawana przez białka MBP (*methyl-CpG-binding proteins*): MBD1, 2 i 3, MeCP2 oraz Kaiso. Białka te zawierają na N-końcu domenę MBD (*methyl-CpG-binding domain*), a w części środkowej domenę TRD (*transcription repression domain*). Po rozpoznaniu zmetylowanego DNA białka MBP mogą aktywować enzym deacetylazę histonów (HDAC, *histone deacetylase*) i/lub korepresory transkrypcji tj.: RP58 czy Sin3a, co prowadzi do silnej kondensacji chromatyny i blokowania sekwencji promotora danego genu, uniemożliwiając dostęp czynnikom transkrypcyjnym (TF) [1, 14-16]. Odkrycie białek wiążących się do metylowanych sekwencji CpG i „mobilizujących” w tych regionach deacetylazy histonów miało niebagatelne znaczenie w poznaniu roli metylacji DNA. Co więcej okazało się, że procesy metylacji DNA i deacetylacji histonów są

prawdopodobnie silnie powiązane w generowaniu struktury nieaktywnej transkrypcyjnie chromatyny [9].

Początkowo uważano, że procesy modyfikacji DNA są nadrzędne w stosunku do modyfikacji histonów, ale najnowsze badania wykazały, że modyfikacja histonów również może zapoczątkowywać proces metylacji DNA [17]. Tym samym, w epigenetycznych zjawiskach regulacji ekspresji genów niemniej ważną rolę od metylacji DNA odgrywają reakcje acetylacji i deacetylacji histonów, katalizowane przez enzymy należące do acetylotransferaz (HAT – *histone acetyltransferase*) i deacetylaz (HDAC) histonów [1]. Badania ostatnich lat wykazały, że pierwsze z nich pełnią funkcję koaktywatorów transkrypcji, podczas gdy drugie są jej korepresorami. Tym samym udało się potwierdzić związek modyfikacji kowalencyjnej białek chromosomalnych (acetylacja/deacetylacja histonów rdzeniowych) z ekspresją genów.

Acetylotransferazy histonów podzielono na cztery główne grupy. W skład pierwszej grupy nazwanej GNAT (*GCN5-related-N-acetyltransferases*) wchodzi białka zaangażowane lub związane z inicjacją transkrypcji (GCN5, PCAF), elongacją (Elp3) oraz usuwaniem histonów i wyciszaniem telomerów (HAT1). Grupa druga to acetylazy MYST (nazwa złożona z pierwszych liter acetylaz, wchodzących w skład tej grupy: MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 i Tip60), które uczestniczą m.in. w regulacji apoptozy i odpowiedzi na uszkodzenia DNA (Tip60), jak również wchodzi w skład kompleksów białkowych, wiążących się z DNA w miejscach *origin* replikacji (HBO1). Kolejna grupa acetylaz składa się ze ściśle związanych ze sobą białek p300 i CBP (*p300/cyclic-AMP-response-element binding protein*), będących koaktywatorami transkrypcji, posiadającymi sekwencje homologiczne do acetylaz grupy GNAT. Ostatnią grupę białek o aktywności HAT tworzą czynniki transkrypcyjne (TAFII250 – składnik kompleksu TFIID), czy kofaktory receptorów jądrowych (ACTR, SRC1) [18, 19] (Tab. I). Acetylazy modyfikują kilka – kilkanaście reszt lizyny w N-końcowym fragmencie histonów poprzez przyłączenie do nich grup  $-CH_2-CH_3$ . Wymagają również określonej sekwencji otaczających lizynę aminokwasów, co świadczy o dużej swoistości tych enzymów. W połączeniu z innymi białkami acetylazy tworzą kompleksy enzymatyczne, np. kompleks STAGA: SPT3, TAF i acetylaza GCN5, które rozpoznają i acetylują różne reszty lizyny poszczególnych histonów [20, 21].

Chociaż histony stanowią główny biologiczny substrat dla acetylotransferaz (poszczególne enzymy wykazują preferencje względem konkretnych histonów, Tab. I), to enzymy te mogą acetylować również białka niehistonowe, takie jak czynniki transkrypcyjne (p53, MyoD, GATA-1, E2F, TFIIE oraz TFIIF), czy białka biorące udział w regulacji cyklu komórkowego [22, 23].

Drugą grupą enzymów, odpowiedzialnych za kowalencyjne modyfikacje reszt lizyny w histonach, stanowią deacetylazy. Do tej pory zidentyfikowano 18 enzymów tej grupy, które podzielono na cztery klasy ze względu na podobieństwa w strukturze pierwszorzędowej. Klasę pierwszą tworzą występujące jedynie w jądrze deace-

Tab. I. Charakterystyka acetylotransferaz histonów (HAT) [20]

| Grupy HAT  | HAT (i towarzyszące im kompleksy) | Histony acetylowane przez kompleksy HAT |
|--|-----------------------------------|---|
| GNAT   | GCN5 (STAGA, ADA, A2)             | H3, H2B                                 |
|  | PCAF (PCAF)                       | H3, H4                                  |
|  | HAT1 (HATB)                       | H3, H2A                                 |
|  | ELP3 (elongator)                  |   |
|  | HPA2                              |   |
| MYST   | ESA1 (NUA4)                       | H2A, H4                                 |
|  | MOF (MSL)                         | H4                                      |
|  | SAS2                              |   |
|  | SAS3 (NUA3)                       | H3                                      |
|  | MORF                              |   |
|  | TIP60                             |   |
|  | HBO1 (ORC)                        | H3, H4                                  |
| p300/CBP   | p300<br>CBP                       |   |
| Podstawowe czynniki transkrypcyjne oraz kofaktory receptorów jądrowych | TAFII250 (TFIID)                  |   |
|  | TFIIIC <sup>a)</sup>              | H3, H4 > H2A                            |
|  | NUT1 (mediator)                   | H3 >> H4                                |
|  | ACTR <sup>b)</sup><br>SRC1        |   |

<sup>a)</sup> TFIIIC może zawierać do trzech polipeptydów o aktywności HAT

<sup>b)</sup> również znane jako RAC3, AIB1, PCIP i TRAM

Tab. II Charakterystyka deacetylaz histonów (HDAC) [23]

| Klasy HDAC | HDAC   | Substraty dla HDAC              |                           |
|------------|--------|---------------------------------|---------------------------|
|            |        | Histony rdzeniowe <sup>a)</sup> | Inne białka <sup>b)</sup> |
| Klasa I    | HDAC1  | +                               | AR, ER, YY1               |
|            | HDAC2  | +                               | GR, YY1                   |
|            | HDAC3  | +                               | GR, GATA1                 |
|            | HDAC8  | +                               | YY1                       |
| Klasa II   | HDAC4  | +                               | GATA1                     |
|            | HDAC5  | +                               | GATA1                     |
|            | HDAC6  | +                               | SHP, tubulina             |
|            | HDAC7  | +                               |                           |
|            | HDAC9  | +                               |                           |
|            | HDAC10 | +                               |                           |
| Klasa III  | SIRT1  | -                               | } tubulina, p65, p53      |
|            | SIRT2  | -                               |                           |
|            | SIRT3  | -                               |                           |
|            | SIRT4  | -                               |                           |
|            | SIRT5  | -                               |                           |
|            | SIRT6  | -                               |                           |
|            | SIRT7  | -                               |                           |
| Klasa IV   | HDAC11 | +                               |                           |

<sup>a)</sup> „+” deacetylacja H2A, H2B, H3 i H4; „-” brak aktywności wobec histonów

<sup>b)</sup> AR, androgen receptor; ER, estrogen receptor; GR, glucocorticoids receptor; YY1, GATA1, p53, p65 czynniki transkrypcyjne; SHP, orphan nuclear receptor small heterodimer partner

tylży: HDAC1, 2, 3 i 8. Klasa druga zawiera enzymy, mogące przemieszczać się między cytoplazmą a jądrem komórkowym: HDAC4 do 7, 9 i 10. Do trzeciej klasy HDAC zaliczono enzymy SIRT (Sirt1 do 7), a do czwartej HDAC11 [24] (Tab. II).

W przeciwieństwie do acetylacji, deacetylacja histonów prowadzi do kondensacji struktur chromatynowych poprzez zmniejszanie przestrzeni pomiędzy chromatosomalami. Ciśniejsze zwinienie DNA utrudnia dostęp czynników transkrypcyjnych, prowadząc do zahamowania transkrypcji [25].

Najważniejszym sygnałem zaangażowanym w inicjację procesów wyciszania genów przez HDAC jest metylacja wysp CpG DNA, która bezpośrednio przyczynia się do włączania kompleksów HDAC przez białka rodziny MBP (np. MeCP2), czy same metylotransferazy (DNMT) [25, 26]. Kompleksy deacetylaz wykazują aktywność nie tylko względem histonów czy białek rozpoznających metylowane wyspy CpG, ale również w stosunku do takich białek, jak p53, E2F, pRb, MyoD czy  $\alpha$ -tubulina, które uczestniczą w licznych fizjologicznych i patologicznych procesach [25].

### Modyfikacje epigenetyczne w komórkach nowotworowych

Zaobserwowane „wzory” epigenetyczne, występujące w ludzkich komórkach nowotworowych, różnią się od tych, jakie występują w tkankach prawidłowych. Kiedy po raz pierwszy odkryto to zjawisko, rozpoczęto badania na szeroką skalę, których celem było wyjaśnienie roli hipo- i hipermetylacji DNA w rozwoju tkanki nowotwo-

rowej [27]. Dzięki nim wiemy, że w komórkach nowotworowych występuje hipometylacja, polegająca na całkowitej utracie zawartości 5-metylocytozyny, w miejscach dużych skupisk normalnie hipermetylowanych sekwencji genomu – głównie w sekwencjach repetytywnych i „pasozżytnicznych”, mających związek z generowaniem niestabilności genetycznej; natomiast hipermetylacja dotyczy wysp CpG w sekwencjach promotorowych określonych genów, kodujących supresory nowotworowe, tj: *p16<sup>INK4a</sup>*, *BRCA1* czy *hMLH1*, prowadząc do ich wyciszenia [28].

W porównaniu z metylacją DNA, nasza wiedza dotycząca roli modyfikacji histonów w komórkach nowotworowych jest znacznie bardziej ograniczona. Wiadomo, że pewne modyfikacje uczestniczą w wyciszeniu genów supresorowych. Dzieje się to w połączeniu z hiperme-

tylacją wysp CpG lub, tak jak w przypadku *p21<sup>WAF1/CIP</sup>*, bez tego połączenia. Wykazano również całkowity brak monoacetylacji lizyny 16 i trimetylacji lizyny 20 w histonie H4 w wielu ludzkich nowotworach. Uważa się, że te dwie histonowe zmiany epigenetyczne mogą być potencjalnymi markerami transformacji nowotworowej [29, 30].

### Hipermetylacja DNA w komórkach nowotworowych

W komórkach prawidłowych występują systemy zabezpieczające wyspy CpG przed nadmierną metylacją, do których należą: aktywna transkrypcja, demetylacja DNA, regulacja replikacji czy tworzenie odpowiedniej lokalnej struktury chromatyny, utrudniającej dostęp metylotransferaz do DNA.

Tab. III Najczęściej metylowane geny w komórkach nowotworowych [17]

| Gen <sup>a)</sup>                      | Skutki zaburzenia ekspresji   | Miejsce zmiany nowotworowej lub typ nowotworu  |
|--|---|--|
| <i>APC</i>                             | Zaburzenia w regulacji proliferacji komórek, ich migracji, adhezji oraz reorganizacji cytoszkieletu       | Piersi<br>Płuca<br>Przełyk   |
| <i>BRCA1</i>                           | Zaburzenia naprawy DNA i inicjacji transkrypcji   | Piersi<br>Jajniki  |
| <i>CDKN2A/<br/>p16<sup>INK4a</sup></i> | Zaburzenia przebiegu cyklu komórkowego i proliferacji   | Przewód pokarmowy<br>Chłoniak nieziarnicy (NHL)<br>Głowa i szyja   |
| <i>E-kadheryna</i>                     | Wzrost proliferacji i inwazyjności komórek  | Piersi<br>Tarczycyca<br>Żołądek  |
| <i>ER</i>                              | Oporność hormonalna   | Piersi<br>Prostata   |
| <i>GSTP1</i>                           | Utrata zdolności detoksyfikacji niektórych aktywnych metabolitów kancerogennych                           | Prostata<br>Piersi<br>Nerki  |
| <i>hMLH1</i>                           | Zaburzenia w poreplikacyjnej naprawie błędnie sparowanych zasad azotowych ( <i>mismatch repair</i> , MMR) | Jelito grube<br>Żołądek<br>Endometrium<br>Jajniki  |
| <i>MGMT</i>                            | Zaburzenia naprawy DNA  | Płuca<br>Mózg  |
| <i>p15<sup>INK4a</sup></i>             | Zaburzenia przebiegu cyklu komórkowego i proliferacji   | Choroby hematologiczne (leukemia, chłoniaki)<br>Płuca  |
| <i>RASSF1A</i>                         | Zaburzenia przebiegu cyklu komórkowego i proliferacji   | Płuca<br>Piersi<br>Jajniki<br>Nerki  |
| <i>Rb</i>                              | Zaburzenia przebiegu cyklu komórkowego i proliferacji   | Gałka oczna np. siatkówczak ( <i>retinoblastoma</i> )<br>Mózg – komory boczne np. skąpodrzewiak ( <i>oligodendroglioma</i> ) |
| <i>VHL</i>                             | Zaburzenia degradacji białek i stabilności RNA  | Nerki<br>Gałka oczna np. naczyniaki zarodkowe siatkówki  |

<sup>a)</sup> *APC*, adenomatous polyposis coli; *BRCA1*, breast cancer 1; *CDKN2A*, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; *ER*, estrogen receptor; *hMLH1*, *mutL* homologue 1; *MGMT*, O-6-methylguanine-DNA methyltransferase; *RASSF1A*, Ras association domain family member 1; *Rb*, retinoblastoma; *VHL*, von Hippel-Lindau; *NHL*, non-Hodgkin's lymphoma

W porównaniu do komórek prawidłowych, regulacja procesu metylacji DNA w komórkach nowotworowych jest poważnie zaburzona pomimo istnienia ww. mechanizmów kontrolujących. W nowotworach dochodzi bowiem do „obchodzenia” tych zabezpieczeń, czego efektem jest najczęściej hipermetylacja wysp CpG sekwencji repetytywnych DNA, takich jak elementy LINE (*long interspersed nuclear elements*), czy genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego (*p16<sup>INK4a</sup>*, *p15<sup>INK4a</sup>*, *Rb*, *p14<sup>ARF</sup>*), reperację uszkodzeń DNA (*BRCA1*, *MGMT*), apoptozę (*DAPK*, *TMS1*), oporność lekową, detoksyfikację, różnicowanie komórek, angiogenezę czy przerzuty [17].

W zależności od typu zmiany nowotworowej metylacji mogą ulegać ściśle określone geny. Na przykład gen *GSTP1* ulega metylacji w 90% przypadków raka prostaty, podczas gdy w ostrej białaczce mielocytarnej gen ten pozostaje niezmienny. Zdarza się jednak, że metylacja pewnych genów, jak np. *RASSF1A* czy *p16<sup>INK4a</sup>*, jest niezależna od typu nowotworu [31]. Nierzadko też, w określonych typach nowotworów mamy do czynienia z hipermetylacją nie jednego, ale kilku charakterystycznych genów. Nie wiadomo, jakie mechanizmy są odpowiedzialne za taką „celowaną” metylację genów, ale przypuszcza się, że ma to związek z białkami, które mają zdolność angażowania metylotransferaz do metylacji dinukleotydów CpG w promotorach określonych genów, tak jak ma to miejsce w przypadku hybrydowego białka PML-RAR, będącego wynikiem fuzji genów *PML* (*promyelocytic leukemia protein*) i *RAR $\alpha$*  (*retinoid acid receptor  $\alpha$* ) [32].

Zjawisko hipermetylacji DNA i wynikająca z niego utrata ekspresji różnych genów może przyczynić się do rozwoju nowotworów w takich narządach, jak: piersi, płuca, jelito grube czy mózg (Tab. III), ale może mieć również potencjalne zastosowania kliniczne, szczególnie w diagnostyce.

Wczesna diagnoza ma ogromne znaczenie w pomyślnym leczeniu różnego typu nowotworów. Tradycyjne metody diagnostyczne, takie jak cytologia, histopatologia, czy immunohistochemia są niezwykle przydatne, ale charakterystyka markerów molekularnych umożliwia lepszą, bardziej dokładną klasyfikację zmian nowotworowych. I tak ocena profilu metylacji genów markerowych pozwala na rozróżnienie typów i podtypów nowotworów, a także, co ma jeszcze większe znaczenie, umożliwia wczesną diagnozę nowotworów, gdyż zmiany we wzorze metylacji możliwe są do wykrycia znacznie wcześniej aniżeli pierwsze patologiczne zmiany w obrębie tkanek. Co więcej, w wielu przypadkach obecność komórek nowotworowych można wykryć nie tylko w surowicy krwi, ale również w innych, często łatwo dostępnych, płynach ustrojowych (Tab. IV) [17].

Najważniejszy cel, jaki przyświeca badaniom mechanizmu hipermetylacji DNA, to odkrycie skutecznej metody do walki z nowotworami. Obecnie znanych jest kilka obiecujących pod względem klinicznym, choć wcale nie nowych, związków hamujących aktywność metylotransferaz DNA. Są to zmodyfikowane w pozycji 5 pierścienia pirymidynowego analogi cytydyny, zapobiegające metylacji DNA: 5-azacytydina (Vidaza), 5-aza-2-deoksytydina (Decytabina), 1- $\beta$ -D-arabino-furanosylo-5-azacytozyna (Fazarabina) oraz dihydro-5-azacytydina (DHAC). Związki te ulegają inkorporacji do DNA (i RNA, tak jak w przypadku azacytydyny). Mogą również wiązać się kowalencyjnie z DNMT, co prowadzi do zaburzeń procesów replikacyjnych i indukcji śmierci komórki [33]. Inhibitory DNMT mogą również prowadzić do uszkodzeń DNA poprzez wywołanie niestabilności strukturalnej w miejscach inkorporacji. Wiązanie inhibitorów do metylotransferaz powoduje ich inaktywację i utratę zdolności metylacji co sprawia, że nowosyntetyzowana nić DNA nie jest metylowana. Wykazano na przykład,

Tab. IV Wykrywanie zmian nowotworowych poprzez ocenę stopnia metylacji DNA [17]

| Rodzaj nowotworu                    | Gen <sup>a)</sup>   | Rodzaj lub źródło próbki               | Metylacja (%) |
|-------------------------------------|---|--|---------------|
| Rak prostaty                        | <i>GSTP1</i>  | Osocze                                 | 72            |
|                                     |   | Mocz                                   | 36            |
|                                     |   | Sperma                                 | 50            |
| Niedrobnokomórkowy rak płuc (NSCLC) | <i>APC</i><br><i>CDKN2A/p16<sup>INK4a</sup></i><br><i>DAPK, MGMT, GSTP1</i> | Osocze                                 | 47            |
|                                     |   | Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL) | 50            |
|                                     |   | Osocze                                 | 73            |
| Rak piersi                          | <i>p16<sup>INK4a</sup></i><br><i>CCND2, RAR<math>\beta</math></i>           | Osocze                                 | 23            |
|                                     |   | Płukanie kanalików                     | 85            |
| Rak pęcherza moczowego              | <i>p14<sup>ARF</sup></i>  | Osocze                                 | 40            |
| Rak jelita grubego                  | <i>p16<sup>INK4a</sup></i>  | Osocze                                 | 38            |
| Rak przetyku                        | <i>APC</i>  | Osocze                                 | 27            |
| Rak wątroby                         | <i>p15<sup>INK4a</sup></i>  | Osocze                                 | 81            |
| Nowotwory głowy i szyi              | <i>p16, DAPK, GSTP1 i MGMT</i>  | Osocze                                 | 42            |

<sup>a)</sup> *GSTP1*, glutathione S-transferase Pi 1; *APC*, adenomatous polyposis coli; *CDKN2A/p16*, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; *DAPK1*, death associated protein kinase 1; *MGMT*, O-6 methylguanine-DNA methyltransferase; *CCND2*, cyclin D2

że podanie decytabiny prowadzi do demetylacji DNA, reaktywacji wcześniej wyciszonych genów i różnicowania komórkowego. Z kolei inkorporacja analogów cytozyny do RNA sprzyja rozpadowi poliribosomów, nieprawidłowemu funkcjonowaniu tRNA i zahamowaniu syntezy białek [34].

Alternatywnym mechanizmem zahamowania aktywności DNMT może być zastosowanie skierowanych przeciwko mRNA dla DNMT antysensownych oligonukleotydów, czyli krótkich syntetycznych fragmentów kwasu nukleinowego, wybiórczo wiążących się do określonej sekwencji w mRNA. Wywołana wprowadzeniem antysensu hybrydyzacja dwóch komplementarnych cząsteczek kwasów nukleinowych (antysensu i mRNA) może blokować translację i prowadzić do degradacji mRNA dla DNMT, zmniejszając tym samym poziom metylotransferazy i w konsekwencji reekspresję wielu inaktywowanych w nowotworach genów, m.in. *p16<sup>INK4a</sup>* [7].

### Modyfikacje histonów w nowotworach

Zmiany acetylacji histonów mają ogromne znaczenie w procesach rozwoju i różnicowania komórek. Dlatego mutacje w genach acetylotransferaz (jak również deacetylaz) mogą wywoływać u ludzi poważne choroby genetyczne (np. zespół Rubinsteina-Taybigiego) i przyczyniać się do powstawania nowotworów.

Geny kodujące acetylotransferazy (HAT) mogą ulegać translokacji, amplifikacji, nadekspresji czy mutacji, przyczyniając się do rozwoju różnych typów nowotworów, szczególnie pochodzenia nabłonkowego, jak i wywodzących się z układu hematopoetycznego. Mutacje punktowe genu *p300* typu zmiany sensu lub powodujące powstanie skróconej wersji białka *p300* mają miejsce m.in. w pierwotnych guzach jelita grubego i żołądka. Natomiast translokacje genów *CBP* i *p300* stwierdzono m.in. w ostrej białaczce szpikowej, gdzie w wyniku fuzji (zespoleń) otwartych ramek odczytu następuje połączenie kilku genów. I tak geny kodujące białka typu MOZ (*monocytic-leukaemia zinc-finger protein*) lub MLL (*mixed-lineage leukaemia DNA binding protein*) ulegają połączeniu z genem *CBP*, co może powodować wyłączenie funkcji poszczególnych acetylotransferaz lub też zmiany w aktywacji transkrypcji wielu genów, nieaktywnych w warunkach prawidłowych [35].

Wprawdzie nie ma doniesień o specyficznych zmianach genów kodujących deacetylazy (HDAC), to jednak zaburzenia aktywności tych enzymów mogą być zaangażowane w rozwój nowotworów poprzez związki z onkogenami czy genami supresorów nowotworowych [1]. Na przykład, mutacje w genie kodującym białko Rb (retinoblastoma), które w warunkach prawidłowych hamują transkrypcję genów przy udziale HDAC1, znoszą oddziaływanie Rb z HDAC, przyczyniając się do rozwoju raka. Podobnie sytuacja przedstawia się z kolejnym supresorem nowotworowym, białkiem p53, które w wyniku mutacji może utracić zdolność do oddziaływania z kompleksem białkowym Sin3-HDAC, a tym samym traci właściwości korepresora transkrypcji genów odpowiedzialnych za

regulację procesów apoptozy, jak np. *survivina*. W konsekwencji dochodzi do nadmiernej ekspresji genu dla *surviviny*, powodującej zahamowanie indukcji apoptozy oraz niekontrolowaną proliferację komórek.

Zaburzenia aktywności deacetylaz histonów odgrywają również istotną rolę w powstawaniu ostrej białaczki promielocytarnej, wynikającej z translokacji chromosomalnej genu receptora kwasu retinowego (*RAR $\alpha$* ), powodującej powstanie fuzji *RAR $\alpha$*  z genem *PML*, *PLZF* (*promyelocytic zinc finger protein*), *NPM* (*nucleophosmin*) lub *NuMA* (*nuclear mitotic apparatus*). Hybrydowe białka onkogenne – produkty połączonych genów (np. *RAR-PML*, *RAR-PLZF*) – wiążą się z HDAC za pomocą swoistych białek jądrowych NCoR (*nuclear-receptor-corepressor*) i SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*), prowadząc w konsekwencji do utrzymania (przez HDAC) skondensowanej postaci chromatyny i hamowania ekspresji genów, niezbędnych do różnicowania się promielocyta [21], z tego względu duże nadzieje pokłada się w inhibitorach deacetylaz histonów jako nowej terapii przeciwnowotworowej, ukierunkowanej na epigenetyczne modyfikacje.

Inhibitory HDAC (HDACI), takie jak SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*) czy TSA (trichostatyna A), wiążąc się z deacetylotransferazami HDAC hamują ich aktywność. W ten sposób dochodzi do nasilenia acetylacji histonów, a w konsekwencji do zahamowania proliferacji, indukcji różnicowania lub apoptozy komórek nowotworowych, co wynika między innymi z reaktywacji genów supresorowych. Co więcej, niemal wszystkie HDACI aktywują transkrypcję genu kodującego białko p21<sup>WAF1</sup>, przy jednoczesnym hamowaniu ekspresji genów dla cyklin D1, A i E. W efekcie dochodzi do zahamowania cyklu komórkowego komórek nowotworowych w fazie G1 lub G2/M [21, 36]. Zaobserwowano również, że niektóre inhibitory HDAC mogą prowadzić do podwyższenia ekspresji genów *p53*, *Fas/CD95* i *TRAIL/DR5* powodując w ten sposób aktywację zewnątrz- i wewnątrzkomórkowego szlaku apoptozy. Uruchomienie poszczególnych szlaków apoptotycznych charakteryzuje się z kolei zmianami w ekspresji i aktywności białek z rodziny BCL-2 (Bax, Bak, Bad, Bid, Bcl-2 czy Bcl-xl), a także wzrostem aktywności kaspaz 9, 8 i 3, co prowadzi do proteolizy białek i programowanej śmierci komórek nowotworowych [37, 38]. Pojawiły się również doniesienia, że inhibitory deacetylaz mogą odgrywać znaczącą rolę w hamowaniu procesów angiogenezy. W trakcie badań *in vivo* i *in vitro* stwierdzono, że trichostatyna A obniża poziom indukowanego niedotlenieniem czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF). Podobnie, kwas walproinowy obniża znacząco w komórkach raka jelita grubego poziom transkryptu (mRNA) dla VEGF, a w konsekwencji samego białka [39, 40].

### Podsumowanie

Przedstawione – w znacznym skrócie – dane pokazują, jakie potencjalne możliwości kryją się w modyfikacji procesów kontrolujących zmiany epigenetyczne. Szczegół-

ne, praktyczne wykorzystanie epigenetyki w diagnostyce i terapii chorób nowotworowych upatruje się w przypadku pojedynczych genów (zwłaszcza supresorów nowotworowych), które, pozostając niezmutowane, ulegają deregulacji lub wyciszeniu na skutek zaburzenia wzoru epigenotypu, wynikającego z hipermetylacji DNA i/lub modyfikacji histonów. Niewykluczone, że nowotwory są wynikiem zaburzeń epigenetycznych, a obserwowane w komórkach nowotworowych liczne mutacje w obrębie genów i rearanżacje chromosomowe tylko ich konsekwencją. Niezależnie od pierwotnej przyczyny różnych typów chorób nowotworowych, poznanie mechanizmów rządzących zmianami epigenetycznymi może być źródłem nowych metod terapeutycznych (np. łączne zastosowanie w terapii inhibitorów metylotransferaz i inhibitorów deacetylaz histonów), które w połączeniu z tradycyjnymi sposobami leczenia powinny przynieść dalszy postęp w leczeniu nowotworów.

**Dr n. med. Sylwia Flis**

Narodowy Instytut Leków  
Zakład Farmakologii  
ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa  
e-mail: sylwia.flis@yahoo.pl

## Piśmiennictwo

- Mai A, Massa S, Rotili D i wsp. Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Medicinal Research Reviews* 2005; 25: 261-309.
- Mukesh V, Sudhir S. Epigenetics in cancer: Implications for early detection and prevention. *Lancet Oncol* 2002; 3: 755-63.
- Węgleński P (red). *Genetyka Molekularna*. Wyd. 3. Warszawa: PWN; 1998, 118-130.
- Fraga MF, Esteller M. Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications. *Cell Cycle* 2005; 4: 144-8.
- Xu XL, Yu J, Zhang HY i wsp. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3441-54.
- Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 253-66.
- Szpecht-Potocka. Zdrowy i chory „gorset” DNA, czyli medyczne aspekty epigenetyki. *Kosmos* 2004; 53: 281-93.
- Santos KF, Mazzola TN, Carvalho HF. The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 1531-41.
- Buryanov YI, Shevchuk TV. DNA Methyltransferases and Structural Functional Specificity of Eukaryotic DNA Modification. *Biochemistry (Moscow)*. 2005; 70: 730-42.
- Margot JB, Ehrenhofer-Murray AE, Leonhardt H. Interactions within the mammalian DNA methyltransferase family. *BMC Molecular Biology* 2003, 4: 1-9.
- Bourc'his D, Xu GL, Lin CS i wsp. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 2001, 294: 2536-9.
- Hsieh ChL. The de novo methylation activity of Dnmt3a is distinctly different than that of Dnmt1. *BMC Biochem* 2005; 6: 1-12.
- Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA i wsp. Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* 2006; 311: 395-8.
- Jones PA, Takai D. The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. *Science* 2001; 293: 1068-70.
- Nan X. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; 393: 386-9.
- Fuks F, Burgers WA, Godin N i wsp. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J*. 2001; 20: 2536-44.
- Das PM, Singal R. DNA Methylation and Cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4632-42.
- Kim DH, Kim M, Kwon HJ. Histone Deacetylase in Carcinogenesis and Its Inhibitors as Anti-cancer Agents. *J Biochem Mol Biol* 2003; 36: 110-9.
- Grant PA. A tale of histone modifications. *Genome Biology* 2001, 2: 1-6.
- Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferase. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 81-120.
- Stepulak A, Stryjecka-Zimmer M, Kupisz K i wsp. Histone deacetylase inhibitors as a new generation of anti-cancer agents. *Postępy Hig Med Dosw* 2005; 59: 68-74.
- Nakatani Y. Histone acetylases versatile players. *Genes to Cells* 2001; 6: 79-86.
- Adcock IM, Ford P, Ito K i wsp. Epigenetics and airways disease. *Resp Res* 2006; 7: 21: 1-19.
- Yang XJ, Grégoire J. Class II Histone Deacetylases: from Sequence to Function, Regulation, and Clinical Implication. *Molecul Cell Biol* 2005; 25: 2873-84.
- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN i wsp. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003; 370: 737-49.
- Thiel G, Lietz M, Hohl M. How mammalian transcriptional repressors work. *Eur J Biochem* 2004; 271: 2855-62.
- Kerbel RS, Frost P, Liteplo R i wsp. Possible epigenetic mechanisms of tumor progression: induction of high-frequency heritable but phenotypically unstable changes in the tumorigenic and metastatic properties of tumor cell populations by 5-azacytidine treatment. *J Cell Physiol Suppl* 1984; 3: 87-97.
- Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 629-56.
- Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *B J Cancer* 2006; 94, 179-83.
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A i wsp. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 2005; 37: 391-400.
- Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 1999; 59: 3730-40.
- Di Croce L i wsp. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* 2002; 295: 1079-82.
- Goffin J, Eisenhauer E. DNA methyltransferase inhibitors – state of the art. *Annals of Oncology* 2002; 13: 1699-1716.
- Santini V, Kantarjian HM, Issa JP. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann Intern Med* 2001; 134: 573-86.
- Rowley JD i wsp. Patients with the t(11;16)(q23;p13. 3) that involves MLL and CBP have treatment-related hematologic disorders. *Blood* 1997; 90, 535-41.
- Hirsch CL, Bonham K. Histone deacetylase inhibitors regulate p21WAF1 gene expression at the post-transcriptional level in HepG2 cells. *FEBS Lett* 2004; 570: 37-40.
- Petack I, Houghton JA. Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy. *Pathol Oncol Res* 2001; 7: 95-106.
- Pearl MJ i wsp. Novel Mechanisms of Apoptosis Induced by Histone Deacetylase Inhibitors. *Cancer Res*. 2003; 63: 4460-71.
- Kim MS i wsp. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med* 2001; 7: 437-43.
- Zgouras D, Becker U, Loitsch S, Stein J. Modulation of angiogenesis-related protein synthesis by valproic acid. *BBRC* 2004; 316: 693-7.

Otrzymano: 20 listopada 2006 r.  
Przyjęto do druku: 15 lutego 2007 r.