ЕПИГЕНЕТИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА РАКОВИ ЗАБОЛЯВАНИЯ И ТЯХНАТА ФАРМАКОТЕРАПИЯ

М. Варадинова, Р. Методиева и Н. Бояджиева
Катедра по фармакология и токсикология, Медицински факултет, Медицински университет – София

EPIGENETICS OF CANCER AND EPIGENETICALLY TARGETED PHARMACOTHERAPY

M. Varadinova, R. Metodieva and N. Boyadjieva
Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine, Medical University – Sofia

Резюме:

Терминът „епигенетика" означава промени в генната експресия, които се унаследяват и не са свързани пряко с мутации в ДНК. Тези промени се отразяват на фенотипа, без да се променя генотипът на човек. Няколко са водещите механизми в епигенетика, както следва: модификация на хистони (метилиране, ацетилиране и фосфорилиране) и ДНК метилиране. Различни фактори предизвикват епигенетични промени, които са посочени в настоящия анализ (фактори на околната среда, лекарства, вредни вещества и др.). През последните години се натрупа значим обем знания, че епигенетични промени имат роля в развитието на ракови заболявания. Направен е анализ на тези резултати и са представени водещите факти, които са потвърдени както експериментално, така и клинично. Ролята на ензимите в епигенетичните механизми на злокачествените заболявания е документирана в обзора. Разработени са и са внедрени клинично лекарства, които инхибират тези ензими и потискат развитието на тумори, включително на различни злокачествени образувания.

Ключови думи: ракови заболявания, епигенетични промени, ензими, лекарства

Адрес за кореспонденция: *Д-р Мирослава Варадинова, дм, Катедра по фармакология и токсикология, Медицински факултет, Медицински университет, ул. „Здраве" № 2, 1431 София, тел. 02 9520539, e-mail: miria@abv.bg*

Summary:

The term "epigenetics" refers to all heritable changes in gene expression that are not coded in the DNA sequence itself, which only alter phenotype without changing genotype. DNA methylation, RNA-associated silencing and histone modifications (methylation, acetylation, and phosphorylation) initiate and sustain epigenetic modulations. The epigenetic changes may result in heritable silencing of genes without changing their coding sequence. They may transfer dynamic environmental experiences on the "fixed" genome, resulting in stable alterations in phenotype and showing parent of origin effects. Epigenetic mechanism plays a role in development of cancer. The review summarizes the data from experimental and clinical studies about epigenetic of tumors. Both histone modifications and DNA methylation are involved in tumorogenesis. The role of enzymes in epigenetic mechanisms are illustrated. The elevation of DNA methyltransferases (DNMTs) was documented in breast cancer, colon cancer, etc. The inhibitors of enzymes were clinically approved by FDA for the treatment of cancers.

Key words: cancers, epigenetic changes, enzymes, drugs

Address for correspondence: *Miroslava Varadinova, MD, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine, Medical University – Sofia, 2, Zdrave Str., Bg – 1431 Sofia, tel. +359 2 9520539, e-mail: miria@abv.bg*

ВЪВЕДЕНИЕ

Епигенетиката изучава промени в генната експресия, които не засягат пряко секвенцията на ДНК и се унаследяват. Два са водещите механизъма на тези промени: ковалентна хистонна модификация и ДНК метилиране. През последните години се натрупаха значими познания за ролята на епигенетичните промени в патогенезата на злокачествени заболявания. На базата на епигенетични изследвания се създадоха но-

ви фармакологични средства, част от тях се разработиха и внедриха като лекарства за лечение на ракови заболявания, друга част са в процес на клинични изпитвания. По-долу се спираме на епигенетичните характеристики на ракови заболявания и фармакотерапията им.

Модификация на хистони и злокачествени заболявания

Известно е, че N-терминалите на опашките на хистоните поддържат стабилността на хроматина и са таргет за различни модификации. Тези модификации са свързани с туморогенеза [2, 13]. Основните посттранслационни модификации на хистоните включват: ацетилиране, метилиране, фосфорилиране, убиквитиниране и др. Тези процеси се осъществяват при участието на съответни ензими и повлияват регулацията на генната експресия.

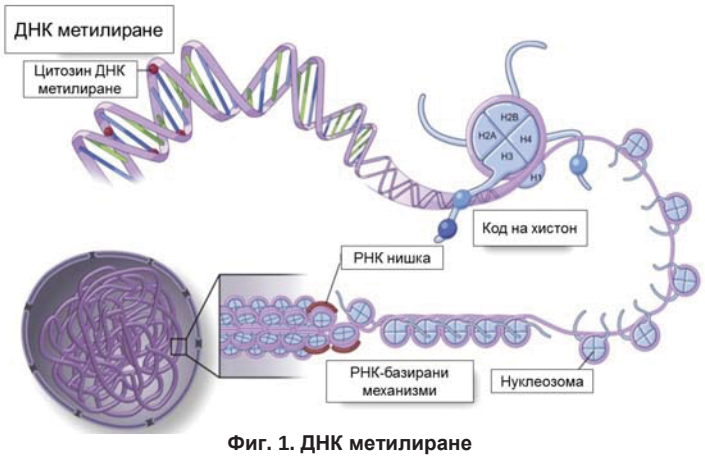
• **Метилиране на хистоните.** Метилтрансферазите са ензими, които повлияват N-терминалите на хистонните опашки. Те съдържат определен домен (SET) с роля в механизмите на туморогенезата [8, 14, 17]. Опити върху трансгенни мишки демонстрират висока степен на развитие на експериментален рак и роля на посочените ензими. Епигенетично метилиране е документирано и при В-клетъчни лимфоми. През последните години се изолираха и група ензими (хистон-деметилази) с роля в туморогенезата.

• **Ацетилиране на хистоните.** Това е процес, който води до релаксиране на нуклеозомната структура и се регулира с участието на ензими – хистонови ацетил трансферази (HATs), които са транскрипционни активатори [6, 7]. Втората група документирани ензими, свързани с епигенетика на хистоните, са хистонови деацетилази (HDACs), които имат потискаща роля. Примерите са различни: документирано е, че p300 HAT ген е мутирал при много от туморите на стомашно-чревния тракт. Таргет за създаване на нова група противоракови лекарства са ензимите HDACs. Инхибитори на тези ензими преминаха клинични изпитвания и се прилагат като противоракови лекарства (виж по-долу).

• **Фосфорилиране на хистоните**. Този механизъм се осъществява по време на митоза, съответно в ключов етап от клетъчния цикъл. Фосфорилирани хистони като H3S10 и H3S28 имат роля в генните промени, свързани с ракови заболявания. Известните ензими Aurora kinases участват в H3 фосфорилиране при ракови процеси. Механизмите на фосфорилиране и тяхното ранно диагностициране на позиция на хистони-H2AX може да се утвърди като диагностичен маркер.

ДНК метилиране

ДНК метилиране при хората се диагностицира на ниво на CpG нуклеотиди и на повечето CpG секвенции в генома [2]. И при този процес на епигенетични изменения участват катализиращи ензими, които са от семейството на ДНК метилтрансферазните ензими (DNMTs). Модификацията е потискаща за транскрипцията и има роля в поддържането на генома, участвайки във важни процеси като геномния импринтинг, Х-хромозомното инактивиране, както и в процесите на карциногенеза. Съществуват и т.нар. CpG острови, свързани с генни промотори, в които не се наблюдава ДНК метилиране (фиг. 1).



Фиг. 1. ДНК метилиране

Свързани с канцерогенезата са различни фактори в епигенетичните модификации. Например:

• Възраст и стареене: някои CpG острови стават хипометилирани в хода на стареенето. Други се хиперметилират и се създават условия за развитие на различни видове ракови клетки [10]. Това обяснява и неочакваните рискове за проява на раков процес при хора от третата възраст, както и потвърждава ролята на епигенетичните модификации в механизмите на стареене.

• Съществуват убедителни доказателства за влияние на вещества от околната среда върху

процесите на ДНК метилиране. Например: а) арсенът предизвиква хипометилиране на RAS ген, който е с роля в онкогенезата; б) кадмият индуцира хипометилиране чрез инактивиране на посочените по-горе ензими DNMT1.

• Фармакологични средства могат да повлияват различни епигенетични механизми. Ние подробно описахме ефектите на лекарства за лечение на психични заболявания върху ДНК метилиране и епигенетично моделиране на хистони [1]. Публикуваме също и анализ на епигенетични механизми на алкохол и бета-ендорфин и лечение с фармакологични средства [15].

• Хранителни вещества. Доставка на метилни групи за ДНК метилиране се осъществява основно чрез фолати и метионин. Отчитайки, че повечето бозайници не могат да синтезират фолат или метионин, то диети, които съдържат недостатъчни концентрации на посочените вещества, водят до епигенетични промени, като повлияват процесите на ДНК метилиране. Тези промени се свързват с ракови заболявания [11]. Посоченото определя решението на много здравни системи в Европа и света, включително у нас, да се включват фолати в диетите на различни популации от населението. Това е от особено значение при бременни жени, при които потребностите от фолиева киселина обикновено са увеличени двойно.

Известно е, че в механизмите на туморогенезата се включва и генен импринтинг. Това е процес, при който алелите на някои гени се експресират само от майчиния геном, а други само от бащиния, в зависимост от родителския оригинал. Доказа се, че ДНК метилирането е водещ епигенетичен фактор, регулиращ импринтиране на алелите, което определя нарушаване на правилното унаследяване от майката или бащата на коректния ген. ДНК метилирането е част от процеса на „запомняне" и води до загуба на импринтирането, с което се свързва риск от развитие на раков процес. В резултат на ДНК метилиране се развива епигенетичен процес [5], който може да инициира туморогенеза. В превенция на ракови заболявания е важно да се потисне или рано да се диагностицира началото му. Това може да се осъществи чрез епигенетични изследвания. В историческа светлина ДНК метилирането е първата епигенетична промяна, която се установява в ракови клетки [3, 4]. Хиперметилиране на CpG региони към туморни супресорни гени изключва тези гени и това води до активиране на другите гени и туморогенеза. Обратно: хипометилирането води до геномна нестабилност и неочаквана активация на онкогени и други елементи, които имат роля в туморогенезата [2]. Анализът на изследванията показва, че нивата на геномно ДНК метилиране се балансират в клетките чрез експресия на посочените DNMT ензими: заключението е, че повишената експресия на DNMT е свързана с развитие на рак при хората [3, 11]. Опитите върху животни обаче, при които са отстранени посочените ензими, водят до летален изход.

За разлика от генетичните промени (например мутациите), където няма обратно връщане към нормално/физиологично състояние на ДНК, при епигенетичните промени съществува възможност те да не достигнат до степен на увреждане на ДНК функцията. Именно този факт беше важен при разработка на идеите и създаване на молекули, които да спрат (обърнат) процеса на епигенетика (тези нови молекули инхибират посочените по-горе ензими при епигенетични промени на хистони и ДНК метилиране и с това спират по-нататъшното развитие на епигенетичния механизъм на туморния процес. Именно чрез създаване на противораковите средства като azacytidine се постигна успехът на HDAC инхибитори и ДНК деметилиращи средства.

Инхибитори на хистон Д-ацетилази са нови противоракови средства

На базата на значими факти за епигенетични механизми в туморогенезата се разви направление във фармакологията и фармакотерапията „епигенетични фармакологични средства" и се създадоха нов клас цитостатични средства, чийто таргет са посочените по-горе ензими „хистонови деацетилази". Тези противоракови лекарства имат способността да инхибират пролиферацията на туморните клетки от клетъчни култури и в жив организъм, като предизвикват блокиране на клетъчния цикъл, диференциацията и повлияват механизмите на апоптоза [16]. В неопластичните клетки епигенетично деацетилирани хистони се свързват често с ДНК хиперметилация и повлияване на съответни гени. Новата група инхибитори на хистон деацетилазите (HDAC) бяха успешно представени в клинични изпитвания и някои се утвърждават като антитуморни средства. Те се класифицираха на база на химичната структура с тяхната специфичност и афинитет към отделните класове на HDAC ензимите, съответно на клас 1, клас 2 и клас 4 [12]. Сред всичките HDAC инхибитори най-активни са дериватите на хидроксамова киселина (hydroxamic acid) като SAHA. Производните на тази група потискат растежа на тумори при експериментални животни и почти не проявяват токсичност. Тези фармакологични средства влияят избирателно върху гени, участващи в транскрипцията на около 2% от експресираните гени в туморни клетки [9]. Инхибиторите се включват в каталитичното място на ензима хистон деацетилаза, който

има тубуларна структура с цинков атом в неговата база. Именно тази способност на дериватите на хидроксамова киселина ги прави убедителни инхибитори, свързващи се с цинка. Тези инхибитори, разработени като лекарства, са утвърдени като терапия за кожни Т-клетъчни лимфоми. Останалите класове на HDAC инхибиторите са следните: късоканални мастни киселини (SCFA), benzamides, epoxyketone и non-epoxyketone, съдържащ циклични тетрапептиди и хибрид молекули. SCFA се използват широко и ефективно в клиниката, напр. валпроева киселина, но тя има по-слабо изразена инхибиция върху HDAC. Интересно е да допълним, че инхибиторите на ензимите от група HDAC сензитизират тумора към ефективна радиация, което определя тяхно бъдеще при комбиниране с лъчетерапия [12]. Отчетената ниска до липсваща токсичност на различни фармакологични средства от групата на инхибитори на HDAC при експерименталните изследвания е важен елемент за тяхното бъдещо утвърждаване като лекарства за лечение на ракови заболявания, съответно солидни тумори и различни видове онкологични кръвни заболявания. Те могат да се приемат самостоятелно, но трябва да се знае, че не всички имат достатъчно силно изразена активност за лечение на отделни видове рак. Понастоящем има успех при тяхното комбиниране в химиотерапия с цитотоксични агенти или средства, повлияващи диференциацията на тумора. Инхибиторите на HDAC индуцират акумулиране на хиперацитилирани нуклеозом-корови хистони в повечето региони на хроматина, но повлияват експресията само на малка подгрупа от гени, което води до транскрипционна активация на някои гени и в същото време потискане на близък брой други гени. Документирано е, че ацетилирането увеличава активността на някои транскрипционни фактори като на туморносупресорен p53 и на erythroid differentiation factor GATA-1, но може да потисне транскрипционната активност на други като Т-клетъчен фактор или на коактиватора ACTR. Изследвания на колектива Vigushin и Coombes (2004) показват, че естрогенният рецептор-алфа (ERalpha) може да бъде хиперацетилиран в отговор на инхибиция на ензимите HDAC, което води до потискане на лигандната сензитивност и регулиране на транскрипционната активация от фармакологични средства, които са инхибитори на HDAC. Запазването на ацетилирания ERalpha в други популации на нуклеарни рецептори дава основание да допуснем, че механизмите на ацетилиране имат важна регулаторна роля в различни нуклеарно-рецепторни сигнални функции. Доказателствата за ефективност на първите разрешени средства в онкологията доведоха до разработка на различни други, които са във фаза 1 или 2 на клинични проучвания. От тях над 8 компонента преминаха през цялостни предклинични изследвания за лечение на рак на белия дроб, рак на гърдата и злокачествени тумори на хемопоетичната система, и понастоящем са в различни фази на клинични изследвания. Настоящият ни анализ дава основание да подчертаем, че ефективност на инхибиторите на хистон деацетилазни ензими, които са в групата на епигенетични лекарства, може да се очаква повече при тяхното комбиниране с други средства за лечение на ракови заболявания или при комбинирането им с лъчетерапия. По-малко са публикуваните данни за ефективно самостоятелно приложение на лекарства от тази група за лечение на злокачествени заболявания на хора.

Библиография

1. Boyadjieva, N. et M. Varadinova. Epigenetics of psychoactive drugs. – J. Pharmacol. Pharm., 2012 (online) DOI: 10.1111/j.2042-7158.2012.01475.
2. Egger, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. – Nature, 429, 2004, 457-463
3. Feinberg, A. P. et B. Tycko. The history of cancer epigenetics. – Nat. Rev. Cancer, 4, 2004, 143-153.
4. Feinberg, A. P. The epigenetics of cancer etiology. – Sem. Cancer Biol., 14, 2004, 427-432.
5. Fuks, F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. – Curr. Opin. Genet. Dev., 15, 2005, 490-495.
6. Fraga, M. F. et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. – Nat. Genet., 37, 2005, 391-340.
7. Levenson, J. M. et al. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. – J. Biol. Chem., 279, 2004, 40545-40559.
8. Lund, A. H. et M. van Lohuizen. Epigenetics and cancer. – Genes. Dev., 18, 2004, 2315-2335.
9. Marks, P. A. et al. Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. – Curr. Opin. Oncol., 13, 2001, № 6, 477-483.
10. Richardson, B. Impact of aging on DNA methylation. – Ageing Res. Rev., 2, 2003, 245-261.
11. Rodenhiser, D. et M. Mann. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. – C. M. A. J., 174, 2006, 341-348.
12. Santini, V., A. Gozzini et G. Ferrari. Histone deacetylase inhibitors: molecular and biological activity as a premise to clinical application. – Curr. Drug Metab., 8, 2007, № 4, 383-393.
13. Santos-Rosa, H. et C. Caldas. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. – Eur. J. Cancer, 41, 2005, 2381-2402.
14. Schneider, R., A. J. Bannister et T. Kouzarides. Unsafe SETs: histone lysine methyltransferases and cancer. – Trends Biochem. Sci., 27, 2002, 396-402.
15. Varadinova, M. et N. Boyadjieva. Epigenetics of autism: role of alcohol and opioid system 2014 (in press).
16. Vigushin, D. M. et R. C. Coombes. Targeted histone deacetylase inhibition for cancer therapy. – Curr. Cancer Drug Targets, 4, 2004, № 2, 205-218.
17. Zhang, K. et S. Y. Dent. Histone modifying enzymes and cancer: going beyond histones. – J. Cell. Biochem., 96, 2005, 1137-1144.

Постъпил за печат на 11 август 2014 г.