

Pod pojęciem epigenetyki kryją się mechanizmy wpływające na ekspresję materiału genetycznego, niezmieniające jednak sekwencji nukleotydów DNA. Obejmują one metylację DNA oraz posttranslacyjne modyfikacje histonów. Metylacja DNA dotyczy cytozyn zlokalizowanych w wyspach CpG. Pociąga za sobą głównie zmiany w oddziaływaniach z czynnikami wiążącymi DNA. Modyfikacje histonów obejmują acetylację, metylację, fosforylację, ubikwitynację i koniugację z cząsteczkami SUMO (ang. *small ubiquitin-like modifier*), a głównym ich efektem są zmiany struktury i konformacji chromatyny. Badania wskazują, że mechanizmy epigenetyczne są kluczowe w kancerogenezie wielu nowotworów, w tym czerniaka. Podłoże genetyczne *melanoma* wciąż kryje wiele tajemnic, a wiedza z zakresu *klasycznej* genetyki pozwala wyjaśnić jedynie część zachorowań na ten nowotwór. Odkrycia na polu epigenetyki rzucają nowe światło na kancerogenezę czerniaka. W pracy przedstawiono przegląd najnowszych doniesień literaturowych na ten temat.

Słowa kluczowe: epigenetyka, czerniak, wyspy CpG, metylacja DNA, histony, modyfikacje posttranslacyjne.

Epigenetyka czerniaka

Epigenetics of melanoma

Łukasz Kwinta

Zakład Immunologii Nowotworów, Katedra Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Pojęcie epigenetyki obejmuje mechanizmy wpływające na regulację i modyfikację ekspresji materiału genetycznego, niewpływające jednak na sekwencję nukleotydów. Mechanizmy te obejmują metylację DNA [1] oraz modyfikacje histonów [2]. Początkowe doniesienia wskazywały, że procesy te wydają się mieć marginalne znaczenie w regulacji ekspresji genów. Obecnie przyjmuje się, że ekspresja przynajmniej 80 genów jest regulowana przez odpowiednie wzorce metylacji DNA [3]. Poznane mechanizmy metylacji DNA pomogły wytłumaczyć takie zjawiska, jak piętnowanie genomowe, inaktywacja chromosomu X u kobiet [4] czy pewne aspekty niestabilności chromosomowych (np. metylacja powtórzeń CCG w zespole łamliwego chromosomu X [3]). Także w kontekście badań mechanizmów kancerogenezy epigenetyka umożliwiła zrozumienie wielu zjawisk, w tym związanych z etiopatogenezą czerniaka. Mimo scharakteryzowania kilku genów silnie związanych z patogenezą tej choroby (np. gen supresorowy CDKN2A czy protoonkogen Ras), opisane mutacje tłumaczą jedynie część przypadków zachorowania na czerniaka. Badania na poziomie epigenomu pozwoliły wyjaśnić część wątpliwości dotyczących molekularnych aspektów transformacji nowotworowej i progresji *melanoma*. Dostarczyły także danych o potencjalnym znaczeniu dla terapii choroby.

Metylacja wysp CpG

Metylacja DNA odbywa się poprzez kowalencyjną modyfikację cytozyn i jest katalizowana przez metylotransferazy DNA (DNMT), które przyłączają grupę metylową do węgla 5' pierścienia cytozyny. Modyfikacja ta dotyczy tylko cytozyn poprzedzających w sekwencji guaninę. Sekwencje CpG zgrupowane są w genomie w miejscach zwanych wyspami CpG, gdzie powtórzenia dinukleotydu CG rozciągają się na przestrzeni do kilkuset par zasad. Szacuje się, że w komórkach somatycznych kręgowców 60–90% wysp CpG ulega metylacji [5]. W diploidalnym jądrze człowieka znajduje się średnio 4×10^7 zmetylowanych wysp CpG [6]. Stosunkowo często wyspy te zlokalizowane są w miejscach odgrywających rolę regulującą ekspresję genów [7]. W przypadku genów o zasadniczym znaczeniu dla podstawowych procesów komórki, cechujących się powszechną ekspresją w tkankach, związane z nimi wyspy CpG są prawie zawsze znajdowane po stronie 5' od sekwencji kodujących, zwykle w promotorach tych genów. Wyspy związane z genami, które cechują się ekspresją tkankowo-swoistą, często znajdują się w pewnej odległości poniżej (w stronę 3') w stosunku do miejsca startu transkrypcji. Ogólny mechanizm wyciszenia ekspresji genów zależnego od hipermetylacji DNA ma kilka aspektów. Najistotniejszy z nich polega na uniemożliwianiu, na zasadzie konfliktu sterycznego (przepraszam, prześlizgnięcia), wiązania się czynników transkrypcyjnych do promotorów i sekwencji regulujących transkrypcję. Zidentyfikowano także represory transkrypcji (m.in. MeCP1 i MeCP2), które preferencyjnie wiążą się z metylowanymi odcinkami DNA (promotorami) [8, 9]. Dane te są spójne z obserwacjami, z których wynika, że w zdrowych komórkach somatycznych wyspy CpG genów supresorowych cechują się najczęściej brakiem (lub niskim poziomem) metylacji. W procesie onkogenezy dochodzi często do

Epigenetics describes the mechanisms that lead to changes in expression of genetic material not related to alterations in DNA sequences. Two processes with this association are DNA methylation and post-translational modifications of histones. DNA methylation concerns cytosines localized in CpG islands. This process changes interactions with DNA-binding factors. Histones can undergo post-translational modifications such as acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitination and sumoylation. The main effects of these modifications are alterations in chromatin structure and conformation. Many findings indicate that epigenetic events are crucial for carcinogenesis of various neoplasms, including melanoma.

The genetic background of melanoma is still full of unanswered questions, with classical genetics able to explain only some melanoma cases. Novel advances concerning epigenetics give us new insight into melanoma carcinogenesis. This review focuses on recent reports and results in this field.

Key words: epigenetics, melanoma, CpG islands, DNA methylation, histones, post-translational modifications.

hipermetylacji tych miejsc, co skutkuje wyciszeniem ich ekspresji. Z kolei spadek poziomu metylacji (hipometylacja) w obrębie promotorów genów, które w niezmiennych komórkach cechują się jej wysokim poziomem, może prowadzić do wzrostu ekspresji tych genów, co w kontekście onkogenów stanowi czynnik prowadzący do transformacji nowotworowej. Zaburzenia metylacji nie wpływają na regulację transkrypcji genów jedynie poprzez zmianę powinowactwa czynników białkowych do rejonów promotorowych. W rejonach hipermetylowanych dochodzi także do zmian w strukturze chromatyny. Dzieje się tak m.in. pod wpływem zmiany powinowactwa białek utrzymujących strukturę chromatyny w tych odcinkach DNA [10], jak również dzięki właściwościom niektórych czynników z wspomnianej grupy represorów transkrypcji (np. represor MeCP2 ma domenę odpowiadającą za usuwanie histonu H1 ze struktury chromatyny [11]). Istnieją także doniesienia mówiące o tym, że hipermetylowany DNA wiąże większe ilości histonu H1 [12]. Te – sprzeczne na pozór – obserwacje świadczą jedynie o fragmentarycznym rozumieniu zagadnień epigenetyki, które wymagają jeszcze wielu badań.

Metylacja DNA a czerniak

Hipermetylacja

W odniesieniu do czerniaka scharakteryzowano wiele genów, które w procesie nabywania fenotypu złośliwego ulegają wyciszeniu za pośrednictwem metylacji wysp CpG. Liczbę tych genów określa się na kilkanaście [13] do kilkudziesięciu. Znajdują się wśród nich geny o różnorodnej funkcji – geny supresorowe (m.in. CDKN2A [14] i Apaf-1 [15]), geny kodujące cząsteczki adhezyjne [16] czy związane z modyfikacją reaktywności układu immunologicznego względem komórek czerniaka (np. CIITA – ang. *class II transactivator* [17]).

Jednym z pierwszych genów, w przypadku którego potwierdzono spadek ekspresji związany z mechanizmem metylacji wysp CpG, był gen CDKN2A. W części badań udowodniono, że hipermetylacja promotora CDKN2A jest czynnikiem sprawczym jego inaktywacji (32% pierwotnych czerniaków błony naczyniowej oka, 19% pierwotnych czerniaków skóry oraz 33% przerzutów czerniaka [14, 18]). Nie wszystkie badania dały jednak wyniki spójne z powyższymi. W badaniu Gmyrka i wsp. w grupie 80 chorych na czerniaka gałki ocznej i 30 chorych na czerniaka skóry nie stwierdzono metylacji w odcinkach promotorowych genu CDKN2A w żadnym przypadku [19]. Bardzo niski procent (6,1%) hipermetylacji promotora tego genu wykazali w badaniu chorych na czerniaka gałki ocznej Merbs i Sindransky [20]. Potwierdza to heterogenność zaburzeń molekularnych leżących u podłoża czerniaka.

Kolejnym, istotnym dla rozwoju czerniaka genem supresorowym jest Apaf-1. Jest on jednym z czynników odpowiedzialnych za egzekucję apoptozy związanej z białkiem p53. Okazało się, że inaktywacja Apaf-1 spowodowana jest utratą heterozygotyczności oraz hipermetylacją jego promotora [15]. Na przykładzie adriamycyny udowodniono, że jednym z czynników odpowiedzialnych za oporność komórek czerniaka na chemioterapeutyki jest brak ekspresji Apaf-1, a co za tym idzie – brak możliwości indukcji apoptozy [15].

Ekspresja genów cząsteczek adhezyjnych także może być regulowana poprzez hipermetylację promotorów. Szczególne znaczenie tych cząsteczek ujawnia się podczas tworzenia przerzutów. Ruchliwość komórek czerniaka oraz zdolność do wiązania się z podścieliskiem danego regionu organizmu lub danej tkanki warunkuje zdolność do tworzenia nowych ognisk choroby. W procesie tym zasadniczą rolę odgrywają cząsteczki adhezyjne, warunkujące oddziaływanie komórka-komórka i komórka-podścielisko. Zmiana profilu ekspresji adhezyn jest zjawiskiem częstym w nowotworach. Udowodniono, że promotory genów E-kadheryn i P-kadheryn ulegają hipermetylacji, co skutkuje spadkiem ich ekspresji i wzrostem inwazyjności komórek czerniaka [16].

Aby nowotwór mógł się rozwijać, musi być zdolny do unikania eliminacji przez układ immunologiczny. Jednym z mechanizmów są zmiany profilu ekspresji antygenów na powierzchni komórek nowotworowych, które są rozpoznawane przez układ immunologiczny. Część antygenów zdolnych do hamowania odpo-

wiedzi układu odpornościowego, które normalnie nie ulegają ekspresji w danych komórkach, mogą się w nich pojawić. Inne antygeny, ulegające ekspresji w zdrowych komórkach, znikają z błony komórek nowotworowych. Także ten aspekt biologii nowotworów, a w szczególności czerniaka, jest powiązany ze zjawiskiem hipermetylacji promotorów genów. Pod wpływem interferonu γ (IFN- γ) lub czynnika martwicy nowotworu (ang. *tumour necrosis factor* – TNF- α), wiele komórek jest zdolnych do ekspresji cząsteczek MHC II (antygenów zgodności tkankowej klasy II). Zjawisko to dotyczy także melanocytów. Cząsteczki MHC II znajdują się konstytutywnie na komórkach prezentujących antygen (komórkach dendrytycznych, makrofagach, limfocytach B). Poprzez prezentację antygenów limfocytom Th biorą one udział w aktywacji swoistej odpowiedzi immunologicznej. Wiadomo, że komórki pierwotnego czerniaka skóry wykazujące ekspresję MHC II (stymulowaną za pomocą IFN- γ), są zdolne do prezentacji antygenów komórkom Th za pośrednictwem tych cząsteczek [17]. Raosevich i wsp. wykazali w doświadczeniach, że komórki pochodzące z linii czerniaka błony naczyniowej oka nie są podatne na stymulację IFN- γ [17]. Kolejne eksperymenty pokazały, że za ten stan rzeczy nie są odpowiedzialne jakiegokolwiek zmiany w genach HLA (kodujących antygeny zgodności tkankowej), lecz brak ekspresji CIITA, który jest koaktywatorem transkrypcji genów MHC II. Ponadto okazało się, że w komórkach tych, w obrębie genu CIITA nie ma insercji, delecji ani mutacji punktowych, które mogłyby być przyczyną tego braku ekspresji. Przyczyną oporności na IFN- γ jest hipermetylacja rejonu promotorowego lub sekwencji regulatorowych położonych powyżej (w kierunku 5') promotora genu CIITA. Dowodem na związek przyczynowo-skutkowy między metylacją DNA a wyciszeniem genu CIITA jest przywrócenie wrażliwości na interferon i uaktywnienie ekspresji MHC II w komórkach czerniaka po zastosowaniu przez badaczy inhibitora metylotransferazy DNA – 5-aza-2'-deoksytydyny [17]. Podobne wnioski wyciągnięto z wcześniejszych badań tkanek łożyska. Okazało się, że komórki trofoblastu również nie są wrażliwe na IFN- γ . Jest to prawdopodobnie jeden z mechanizmów warunkujących brak odpowiedzi immunologicznej ze strony matki w stosunku do tkanek płodu. Stwierdzono, że w komórkach tych promotor IV genu CIITA jest hipermetylowany, przez co cały szlak ekspresji MHC II pod wpływem IFN- γ jest nieaktywny [17].

Naturalnym następstwem określenia udziału metylacji DNA w nowotworzeniu były próby ingerowania w ten proces. Jak dotąd nie udało się zidentyfikować u człowieka (ani zwierząt) enzymów zdolnych do demetylacji DNA. Skupiono się więc na opracowaniu metody inhibicji metylotransferaz DNA. W przeciwieństwie do mutacji inaktywującej gen, która jest przekazywana komórkom potomnym, epigenetyczne wyciszenie genu na drodze metylacji promotora wymaga ciągłego wprowadzania grup metylowych w tym samym miejscu genomu po każdej replikacji materiału genetycznego [21]. Inhibitory metylotransferazy DNA działają w komórkach dzielących się, gdyż tylko w fazie S cyklu komórkowego enzymy te są aktywne, a oczywistym jest, że większość komórek nowotworowych jest bardzo czynna mitotycznie (choć nie można jednak zapominać o pewnej puli komórek dzielących się). Stworzyło to teoretyczne podstawy do wypróbowania inhibitorów DNTM jako narzędzi

w leczeniu czerniaka i innych nowotworów. Pierwszym zsyntetyzowanym inhibitorem była 5-azacytydina, która wraz z trzema innymi: decytabiną (5-aza-2'-deoksytydina), fazarabiną (1- β -D-arabinofuranozyl-5-azacytozyna) i DHAC (dihydro-5-azacytydina) znajduje się obecnie w fazie badań przedklinicznych i klinicznych. Leki te zostały zastosowane głównie w nowotworach układu krwiotwórczego. Przeprowadzono także badanie decytabiny u chorych na czerniaka. Wyniki nie są jednak jak dotąd zbyt obiecujące. U 22% chorych na czerniaka uzyskano stabilizację choroby, natomiast u jednego z 18 chorych obserwowano częściową odpowiedź kliniczną [22].

Cennym głosem w dyskusji o znaczeniu hipermetylacji promotorów w patogenezie czerniaka jest doniesienie Furuta i wsp. [23], którzy zidentyfikowali sześć genów nieaktywnych w komórkach *melanoma* (w odróżnieniu od linii komórkowych prawidłowych melanocytów). Po zastosowaniu w hodowlach linii czerniakowych 5-aza-2'-deoksytydyny, tylko jeden z nich (gen peroksyredoksyny 2 – PRDX2) odzyskał swoją aktywność. Zastępowano, że transkrypcja pozostałych 5 genów (DERL3, FAM78A, PTPRG, SLC27A3 i UNC5C) uległa zablokowaniu na drodze innego mechanizmu, a metylacja promotorów nastąpiła później. Według autorów udział w rozwoju czerniaka zaburzeń dotyczących tych pięciu genów jest mało prawdopodobny, a ich metylacja jest spowodowana tym, że były one *świadkami* procesu kancerogenezy, nie mając wpływu na ten proces. Należy więc być ostrożnym w ocenie mechanizmów transformacji nowotworowej wyłącznie na podstawie analizy wzoru metylacji w rejonach promotorowych i regulatorowych. Ponadto geny, których upośledzona aktywność nie zostaje przywrócona po zastosowaniu czynników wpływających na metylację, nie powinny być wykluczone z grupy genów odpowiedzialnych za kancerogenezę czerniaka. Metylacja może być procesem wtórnym, dotyczącym wcześniej inaktywowanych genów, ale także ta wcześniejsza utrata funkcji, dokonująca się w innym mechanizmie, może być jednym z elementów transformacji nowotworowej.

Hipometylacja

Jak już wspomniano, w kancerogenezie istotną rolę odgrywa także niski poziom metylacji. Hipometylacja wysp CpG zlokalizowanych w regionach promotorowych i regulatorowych onkogenów aktywuje ekspresję genów, które w prawidłowych melanocytach są nieaktywne lub zwiększa podstawowy poziom ich ekspresji, a przez to promuje onkogenezę czerniaka. Obok hipermetylacji i hipometylacji promotorów poszczególnych genów na uwagę zasługuje fakt, że w skali genomu komórki nowotworowe cechują się uogólnionym spadkiem poziomu metylacji [4, 24]. Znajduje to odzwierciedlenie w obserwacjach dotyczących wpływu metylacji DNA na utrzymanie struktury chromosomów. Hipometylacja niekodujących powtarzalnych sekwencji w rejonach otaczających centromery jest odpowiedzialna za zaburzenia architektury chromosomów. Na skutek spadku poziomu ich metylacji dochodzi do niestabilności chromosomowych i zaburzeń replikacji komórek [25, 26], a zaburzenia chromosomowe (struktury i liczby) są jedną z podstawowych cech komórek nowotworowych.

Przykładem wpływu utraty metylacji poszczególnych genów na transformację nowotworową melanocytów są geny z rodziny MAGE (ang. *melanoma-testis antigen*). W prawidłowych warunkach ulegają one ekspresji jedynie w komórkach męskiej linii rozrodczej, natomiast komórki somatyczne są pozbawione ich obecności na skutek metylacji wysp CpG rejonów promotorowych. W komórkach czerniaka dochodzi do obniżenia poziomu metylacji ich promotorów, czego efektem jest ekspresja genów MAGE. Ponadto udowodniono, że po leczeniu 5-aza-2'-deoksycytyną może dojść do indukcji aktywności MAGE [27, 28], co dowodzi słuszności tej tezy.

Hipometylację DNA powiązano także z opornością na temozolomid. Fontijn i wsp. udowodnili, że zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *basic fibroblast growth factor* – bFGF), jeden z czynników istotnych dla wzrostu czerniaka, odpowiada za wytworzenie stanu tej oporności poprzez indukcję hipometylacji genu MGMT [29]. Koduje on enzym naprawczy ograniczający efekty komórkowe działania temozolomidu, który jako czynnik alkilujący metyluje guaninę kwasów nukleinowych. Hipometylacja promotora MGMT, skutkująca wzrostem poziomu jego ekspresji, pozwala komórkom czerniaka przełamać skutki działania temozolomidu.

Potranslacyjne modyfikacje histonów

Drugim z zasadniczych procesów związanym z pojęciem epigenetyki jest potranslacyjna modyfikacja histonów. Polega ona na przyłączaniu do cząsteczek histonów grup acetylowych, metylowych, fosforanowych, ubikwityny i białka SUMO (ang. *small ubiquitin-like modifier*) [2, 30]. Histonu są zasadowymi białkami, tworzącymi z DNA strukturę chromatyny. Są one zaangażowane w organizację struktur, dzięki którym możliwa jest uporządkowana kondensacja DNA w jądrze komórkowym. Podstawową jednostką strukturalną chromatyny jest nukleosom, na który składa się rdzeń białkowy zbudowany z histonów oraz nawiniętej na niego nici DNA. Rdzeń ma kształt walca i stanowi go oktamer, składający się z ośmiu cząsteczek histonów (po dwa histony typu H2A, H2B, H3 i H4). Na każdy oktamer nawinięty jest odcinek DNA długości 146 par zasad. Poza histonami rdzenia w skład nukleosomu wchodzi histon łącznikowy H1, który stabilizuje nić DNA na oktamerze i bierze udział w formowaniu struktur wyższego rzędu pozwalających na dalszą kondensację chromatyny. Miejscami, w których dochodzi do chemicznych modyfikacji histonów, są najczęściej odcinki położone na N-końcach ich cząsteczek (przestrzennie wystają one poza oktamer, stąd określane są jako ogony histonów), choć procesom tym podlegają także miejsca o innej lokalizacji w ich obrębie [31]. Spośród aminokwasów, które podlegają modyfikacjom, największa różnorodność przyłączanych cząsteczek i grup chemicznych dotyczy lizyn. Mogą one ulegać acetylacji, metylacji (w tym jedno-, dwu- i trójmetylacji), ubikwitynacji, jak również koniugacji z SUMO. Także argininy podlegają procesowi metylacji (jednometylacji), jak również symetrycznej i asymetrycznej dwumetylacji, natomiast seryny i treoniny – fosforylacji [2, 32].

Ubikwityna została poznana dużo wcześniej jako czynnik kierujący białka komórkowe na drogę proteolizy odbywającej się w proteasomach. Podkreślić należy, że w przy-

padku ubikwitynacji histonów nie są one kierowane do proteasomów i poddawane rozkładowi. Prawdopodobnie jedną z przyczyn tego stanu rzeczy jest fakt, że do białek przeznaczonych do proteolizy przyłączanych jest kilka cząsteczek ubikwityny [33], natomiast histony mają tylko jedno miejsce wiązania tego czynnika i ulegają one wyłącznie mono-ubikwitynacji [32].

Zasadniczy mechanizm wpływu modyfikacji histonów na regulację transkrypcji genów tłumaczony jest w dwojaki sposób, przy czym obie teorie nie wykluczają się wzajemnie. Jedna z nich mówi o wpływie modyfikacji na stopień kondensacji chromatyny, przez co struktura chromatyny staje się bardziej otwarta (dostępna dla czynników transkrypcyjnych) lub zamknięta (uniemożliwiając dostęp czynników regulujących ekspresję genów do DNA). Modyfikacje wpływające aktywnie na ekspresję genów to acetylacja, fosforylacja, metylacja arginin i lizyn H3-K4, H3-K36, H3-K79 oraz ubikwitynacja H2B-K120, natomiast modyfikacje działające blokująco to koniugacja z SUMO, metylacja H3-K9, H3-K27, H4-K20 oraz ubikwitynacja H2A-K119. Przypuszcza się, że odwracalne modyfikacje stopnia kondensacji chromatyny mogą zachodzić poprzez wpływ na dystrybucję ładunków elektrostatycznych (np. neutralizacja dodatnich ładunków histonów przez ujemne grupy acetylowe i fosforanowe) lub na zasadzie modulacji oddziaływań pomiędzy nukleosomami [32]. Drugi prawdopodobny mechanizm wpływu kowalencyjnych modyfikacji histonów na ekspresję genów polega na rozpoznawaniu przez czynniki wiążące chromatynę miejsc o określonej konfiguracji podstawników związanych z histonami oraz nukleosomów o określonej konformacji przestrzennej (o której decydują te podstawniki). Wśród cząsteczek wiążących chromatynę mogą znajdować się zarówno czynniki transkrypcyjne, jak i czynniki odpowiedzialne za lokalne oraz globalne (w kontekście całego chromosomu) zmiany strukturalne chromatyny [32, 34, 35].

Obecnie wiadomo, że poza wpływem na regulację ekspresji genów, modyfikacje histonów odgrywają istotną rolę w procesach naprawy uszkodzeń DNA (monoubikwitynacja histonu H2A [36] i fosforylacja histonu H2AX – wariantu histonu H2A [37]). Możliwe jest zatem, że zaburzenia obserwowane w zakresie potranslacyjnych modyfikacji histonów w komórkach nowotworowych, w tym czerniaka, mogą wpływać także na te procesy, stając się jedną z przyczyn niestabilności genetycznej nowotworów.

Badania wskazują, że w obrębie danej cząsteczki histonu może dochodzić jednocześnie do modyfikacji polegających na przyłączaniu różnych podstawników, np. acetylacji i fosforylacji histonu H3 [38]. W połączeniu z faktem, że wszystkie potranslacyjne modyfikacje histonów są odwracalne (przez przeciwstawne układy enzymatyczne, np. acetylotransferazy/deacetylazy) [32], z ilością czynników wiązanych z histonami i liczbą miejsc na cząsteczkach histonów, które podlegają tym procesom, daje to ogromne możliwości wpływania na strukturę chromatyny i ekspresję genów. Wyrazem tego jest coraz częściej używane pojęcie *kodu histonów* (ang. *histone code*) [39]. Różnorodność efektów modyfikacji histonów potęgują obserwacje zarówno zależności między podstawnikami w obrębie jednej cząsteczki histonu, jak i oddziaływania uzależnione od podstawników zlokalizo-

wanych na różnych cząsteczkach. Przykładem tych pierwszych, określanymi jako oddziaływania w układzie *cis*, jest zjawisko blokowania metylacji lizyny w pozycji 9 histonu H3 (H3-K9) oraz indukowania acetylacji H3 przez wcześniejszą metylację H3-K4 [40]. Zależność *trans* zachodzi pomiędzy modyfikacjami w obrębie różnych cząsteczek histonów, np. ubikwitynacja histonu H2B promuje metylację histonu H3 w pozycjach K4 i K79 [41]. Zależności te określane są w literaturze anglojęzycznej jako *histone cross-talk* [2].

Modyfikacje histonów w czerniaku

Zaburzenia dotyczące potranslacyjnych modyfikacji histonów leżą u podłoża zaburzeń molekularnych w kancerogenezie wielu nowotworów [4]. W odniesieniu do czerniaka w literaturze nie ma wielu pozycji na ten temat, chociaż także w tym kontekście udowodniono ich istotną rolę. Obecnie wiarygodne dowody dotyczą głównie procesu acetylacji. Bandyopadhyay i wsp. wykazali, że inhibicja deacetylazy histonów 1 (HDAC1), DHAC2 i HDAC3 przełamuje oporność komórek czerniaka na apoptozę [42]. Jak wspomniano, acetylacja histonów jest czynnikiem wpływającym aktywującym na transkrypcję DNA, a co za tym idzie – ich deacetylacja (za pośrednictwem HDAC) hamuje ten proces. Autorzy udowodnili, że zablokowanie deacetylacji wpływa na zwiększenie ekspresji proapoptotycznego białka Bax (na drodze zależnej od p53), zaznaczając, że wzrost acetylacji jest powiązany ze wzrostem aktywności promotora genu Bax. Zahamowanie aktywności deacetylaz uzyskano w tym badaniu z użyciem maślanu sodu oraz technologii siRNA (co ciekawe, maślan sodu jest substancją, która powstaje w jelicie grubym człowieka z włókien pokarmowych). Spośród trzech wspomnianych podtypów DHAC najsilniejszy efekt wywarła inhibicja HDAC2. Ponadto poprzez nadekspresję acetylotransferazy histonów p300 w komórkach czerniaka potwierdzono, że wzrost poziomu acetylacji jest czynnikiem kluczowym dla wzrostu ekspresji Bax.

Również w innych badaniach udowodniono skuteczność inhibitorów HDAC (trichostatyny A, kwasu walproinowego – leku przeciwpadaczkowego, SAHA) w indukcji apoptozy i hamowaniu proliferacji komórek czerniaka w warunkach *in vitro* [43, 44]. Kabayashi i wsp. w badaniach *in vitro* i na modelu mysim udowodnili skuteczność kolejnego inhibitora z tej grupy: FK228 [45]. Natomiast Munshi i wsp. uzyskali wzrost wrażliwości komórek czerniaka na promieniowanie jonizujące z użyciem wspomnianego już maślanu sodu [46]. Hellebrekers i wsp. udowodnili na modelu mysim, że zaburzenia adhezji leukocytów do śródbłonka naczyń zapatrujących guzy czerniaka i przekraczanie przez nie bariery ściany naczyniowej wynika z obniżonej ekspresji cząsteczek adhezyjnych ICAM-1 (ang. *intercellular adhesion molecule-1*) na komórkach śródbłonka [47]. Anergia ta jest odwracalna pod wpływem trichostatyny A, co sugeruje, że zaburzenia ekspresji ICAM-1 wynikają z nadmiernej deacetylacji histonów. Poddając komórki śródbłonka wpływowi czynników wzrostu promujących angiogenezę (w warunkach *in vitro*), autorzy wykazali, że przyczyną zmniejszenia stężenia ICAM-1 na powierzchni śródbłonka jest deacetylacja histonów H3 oraz demetylacja lizyny 4 histonów H3 związanych z promotorem genu ICAM-1. Dane te są istotne, m.in. z powodu praktycznych możliwości przełamania

upośledzenia odpowiedzi immunologicznej przeciwko komórkom czerniaka, co stanowić może czynnik wspomagający immunoterapię tego nowotworu.

Klasyyczny model wpływu modyfikacji histonów na ekspresję genów jest modelem binarnym (dana modyfikacja odpowiada za represję lub aktywację ekspresji genów). Obecnie publikowane są dane, które komplikują przyjęty model. Wiadomo, że pewne modyfikacje histonów odpowiadają za jednoczesne wiązanie do chromatyny zarówno czynników aktywujących transkrypcję, jak i jej represorów [32]. Analizując dane na ten temat, należy mieć zatem na uwadze, że obecnie dysponuje się jedynie uproszczonym wytłumaczeniem tych zjawisk, które już wkrótce może ulec zdecydowanym modyfikacjom. Również rozdzielanie w rozważaniach obu zasadniczych mechanizmów epigenetycznych (metylacji DNA i modyfikacji histonów) może okazać się sztuczne. Badania dowodzą, że istnieją powiązania pomiędzy tymi procesami. MeCP2, jeden z czynników wiążących się z metylowanymi wyspami CpG, oddziałuje z deacetylazami histonów, kierując je prawdopodobnie w miejsca hipermetylowanego DNA [48]. Z kolei Wozniak i wsp. pokazali w swych badaniach, że czynniki hamujące metylotransferazy DNA wpływają na spadek ekspresji genu metylotransferazy histonów G9a. Badacze ci udowodnili także, że do wyciszenia genu supresorowego RASS1A (które dotyczy również komórek czerniaka) dochodzi na drodze dwóch współgrających mechanizmów – hipermetylacji DNA i trójmetylacji lizyny 9 histonu H3 [49]. Mimo fragmentarycznej wiedzy na temat epigenetyki czerniaka, już teraz otwierają się nowe perspektywy, wynikające z poznawania tych mechanizmów. Umożliwiają nam, a w przyszłości jeszcze bardziej pozwolą na pełniejsze zrozumienie etiopatogenezy tego nowotworu. Wszystko wskazuje również na to, że przyczynią się do rozwoju strategii terapeutycznych o nowych molekularnych punktach uchwytu.

Piśmiennictwo

- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6-21.
- Fischle W, Wang Y, Allis CD. Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 172-83.
- Górska I, Kempisty B, Jagodziński PP. Epigenetyczne modyfikacje w komórkach rozrodczych. *Ginekol Prakt* 2006; 3: 2-5.
- Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 1148-59.
- Russo VE, Martienssen RA, Riggs AD. *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1996.
- Nan X, Campoy FJ, Bird A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 1997; 88: 471-81.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6-21.
- Meehan RR, Lewis JD, Bird AP. Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 5085-92.
- Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Mauer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A. Purification, sequence and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 1992; 69: 905-14.
- Kass SU, Landsberger N, Wolffe AP. DNA methylation directs a time dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol* 1997; 7: 157-65.
- Nan X, Tate P, Li E, Bird A. DNA Methylation Specifies Chromosomal Localization of MeCP2. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 414-21.

12. McArthur M, Thomas JO. A preference of histone H1 for methylated DNA. *EMBO J* 1996; 15: 1705-14.
13. van der Velden PA, Zuidervaart W, Hurks MH et al. Expression profiling reveals that methylation of TIMP3 is involved in uveal melanoma development. *Int J Cancer* 2003; 106: 472-9.
14. van der Velden PA, Metzelaar-Blok JA, Bergman W, Monique H, Hurks H, Frants RR, Gruis NA, Jager M J. Promoter hypermethylation: a common cause of reduced p16 (INK4a) expression in uveal melanoma. *Cancer Res* 2001; 61: 5303-6.
15. Soengas MS, Capodici, P, Polsky D, et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 2001; 409: 207-11.
16. Tsutsumida A, Hamada J, Tada M, Aoyama T, Furuuchi K, Kawai Y, Yamamoto Y, Sugihara T, Moriuchi T. Epigenetic silencing of E- and P-cadherin gene expression in human melanoma cell lines. *Int J Oncol* 2004; 25: 1415-21.
17. Radosevich M, Jager M, Ono SJ. Inhibition of MHC class II gene expression in uveal melanoma cells is due to methylation of the CIITA gene or an upstream activator. *Experimental and Molecular Pathology* 2007; 82: 68-76.
18. Straume O, Smeds J, Kumar R, Hemminki K, Akslen LA. Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C>T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. *Am J Pathol* 2002; 161: 229-37.
19. Gmyrek G, Kwiatkowska E, Lamperska K, Mackiewicz A. Analiza metylacji wysp CpG w odcinkach promotorowych genów p16 i p15 w czerniaku złośliwym skóry i gątki ocznej. *Współcz Onkol* 2001; 5: 10-2.
20. Merbs LS, Sindransky D. Analysis of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) alterations in primary sporadic uveal melanoma. *IOVS* 1999; 40: 779-83.
21. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99: 247-57.
22. Goffin J, Eisenhauer E. DNA methyltransferase inhibitors-state of the art. *Ann. Oncol* 2002; 13: 1699-716.
23. Furuta J, Nobeyama Y, Umebayashi Y, Otsuka F, Kikuchi K, Ushijima T. Silencing of Peroxiredoxin 2 and aberrant methylation of 33 CpG islands in putative promoter regions in human malignant melanomas. *Cancer Res* 2006; 66: 6080-6.
24. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983; 301: 89-92.
25. Smith SS, Crocitto L. DNA methylation in eukaryotic chromosome stability revisited: DNA methyltransferase in the management of DNA conformation space. *Mol Carcinog* 1999; 26: 1-9.
26. Qu GZ, Grundy PE, Narayan A, Ehrlich M. Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 109: 34-9.
27. De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7149-53.
28. Sigalotti L, Coral S, Nardi G, et al. Promoter methylation controls the expression of MAGE2, 3 and 4 genes in human cutaneous melanoma. *J Immunother* 2002; 25: 16-26.
29. Fontijn D, Adema AD, Bhakat KK, Pinedo HM, Peters GJ, Boven E. O6-Methylguanine-DNA-methyltransferase promoter demethylation is involved in basic fibroblast growth factor – induced resistance against temozolomide in human melanoma cells. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 2807-15.
30. Santos-Rosa H, Caldas C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2381-402.
31. Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 2000; 15: 2343-60.
32. Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 2007; 447: 407-12.
33. Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickard CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 2000; 19: 94-102.
34. Zeng L, Zhou MM. Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* 2002; 513: 124-8.
35. Dong Z, Bode AM. The role of histone H3 phosphorylation (Ser10 and Ser 28) in cell growth and cell transformation. *Mol Carcinog* 2006; 45: 416-21.
36. Bergink S, Salomons FA, Hoogstraten D, et al. DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A. *Genes Dev* 2006; 20: 1343-1352.
37. Warters RL, Adamson PJ, Pond CD, Leachman SA. Melanoma cells express elevated levels of phosphorylated histone H2AX foci. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 807-17.
38. Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM, Allis CD. Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell* 2000; 5: 905-15.
39. Winter S, Simboeck E, Fischle W, Zupkovitz G, Dohnal I, Mechtler K, Ammerer G, Seiser C. 14-3-3 proteins recognize a histone code at histone H3 and are required for transcriptional activation. *EMBO J* 2008; 27: 88-99.
40. Wang H, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Borchers C, Tempst P, Zhang Y. Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol Cell* 2001; 8: 1207-17.
41. Sun ZW, Allis CD. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 2002; 418: 104-8.
42. Bandyopadhyay D, Mishra A, Medrano EE. Overexpression of Histone Deacetylase 1 Confers Resistance to Sodium Butyrate-Mediated Apoptosis in Melanoma Cells through a p53-Mediated Pathway. *Cancer Res* 2004; 64: 7706-10.
43. Facchetti F, Previdi S, Ballarini M, Minucci S, Perego P, La Porta CA. Modulation of pro- and anti-apoptotic factors in human melanoma cells exposed to histone deacetylase inhibitors. *Apoptosis* 2004; 9: 573-82.
44. Peltonen K, Kiviharju TM, Jarvinen PM, Ra R, Laiho M. melanoma cell lines are susceptible to histone deacetylase inhibitor TSA provoked cell cycle arrest and apoptosis. *Pigment Cell Res* 2005; 18: 196-202.
45. Kobayashi Y, Ohtsuki M, Murakami T, et al. Histone deacetylase inhibitor FK228 suppresses the Ras-MAP kinase signaling pathway by upregulating Rap1 and induces apoptosis in malignant melanoma. *Oncogene* 2006; 25: 512-24.
46. Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T, et al. Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4912-22.
47. Hellebrekers DMEI, Castermans K, Vire E, et al. Epigenetic Regulation of Tumor Endothelial Cell Anergy: Silencing of Intercellular Adhesion Molecule-1 by Histone Modifications. *Cancer Res* 2006; 66: 10770-7.
48. Huang C, Sloan EA, Boerkoel CF. Chromatin remodeling and human disease. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13: 246-52.
49. Wozniak RJ, Klimecki WT, Lau SS, Feinstein Y, Futscher BW. 5-Aza-2'-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3 K9 di-methylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation. *Oncogene* 2007; 26: 77-90.

Adres do korespondencji

mgr biotech. **Łukasz Kwinta**
Zakład Immunologii Nowotworów
Wielkopolskie Centrum Onkologii
ul. Garbary 15
61-866 Poznań
e-mail: lukasz.kwinta@wp.pl