© Пилипонова В. В., Лях Ю. М.
УДК: 116.42–01.2
Пилипонова В.В., Лях Ю.М.
Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА МЕХАНІЗМ ЕПІГЕНОМНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗУ

Резюме. *В статті розкриті основні напрямки у розвитку вчення про механізми епігеномного канцерогенезу. Доведено, що активність генів може контролюватись зовнішнім впливом. Розкрито суть епігеномної регуляції генів, активації онкогенів, взаємозв'язок між рівнем метилювання та перебігом онкологічного процесу, а також приведена коротка характеристика основних методів пошуку метильних груп та епігенетичної терапії.*
Ключові слова: *епігенетика, канцерогенез, метилювання, посттрансляційна модифікація гістонів, ремоделювання хроматину.*

Вступ

Онкологічні захворювання складають другу за значенням причину смертності населення. За даними ВООЗ в світі більше 57,2 млн. хворих на онкологічні захворювання. Найбільш актуальна епігеномна гіпоте-

за про те, що активність генів регулюється зовнішнім впливом, наразі знаходить підтвердження в багатьох експериментах [Шикеєва та ін., 2013]. Аналізуючи результати цих досліджень стає очевидним, що живий організм не є цілковито залежним від геному. Дослідження епігеномної регуляції генів дозволяє більш широко впливати на механізми керування ними. Розкривши механізми активації онкогенів та пригнічення генів супресорів пухлинного росту, значно розширюється спектр діагностики та лікування онкозахворювань.

Термін "епігенетика" (грец. "???" - над, вище, зовнішній) був запропонований Карлом Ханн Уоддінгтоном ще в 1947 р. Наразі її розглядають, як науку про спадкові властивості організмів, які не пов'язані зі зміною нуклеотидної послідовності ДНК, і які не прямо, а опосередковано закодовані в геномі.

Молекулярні механізми онтогенезу є однаковими для трансформації, промоції та прогресії. Вони поділяються на мутаційні, які змінюють структуру геному, та епігеномні, які змінюють активність генів без зміни їх структури. Епігеномні механізми включають вплив вірусних онкогенів та їх онкобілків, гормонів, фенолів, жовчних кислот, імунодепресантів, тощо. Ці механізми можуть сприяти активізації поділу вже малігнізованих клітин.

Найбільш чітко епігенетична етіологія продемонстрована для злоякісних новоутворень, але варто зауважити, що до виникнення злоякісних новоутворень приводять генетичні та епігенетичні зміни в клітинах, а також взаємодія змінених клітин з оточуючими стромальними компонентами (мікрооточенням хазяїна). Багато речовин мають властивості епігенетичних канцерогенів: вони приводять до збільшення частоти виникнення пухлин, не проявляючи при цьому мутагенного ефекту (наприклад, диетилстилбестрола арсеніт, гексахлорбензол, сполуки нікелю).

Припускають, що епімутації виникають в 100 разів частіше, ніж генетичні мутації. Вони можуть виникати як випадково, так і специфічним чином у відповідь на зміни середовища. Відхилення від нормального епігенетичного профілю виявлені при злоякісних новоутвореннях різних локалізацій [Вайсерман, 2011].

Варто приділити увагу ролі екзо- та ендогенних факторів в розвитку онкопатологій. Досліди, проведені на мігрантах, показали, що розповсюдженість рака збільшується в результаті міграції, що передбачає вагомий вклад зміни оточуючих умов середовища в розвиток цього захворювання [Hemminki et al., 2006].

В основі епігенетичних змін виділяють три механізми, які взаємно підсилюють один одного, а саме зміни в метилюванні ДНК, посттрансляційні модифікації гістонів і ремоделювання хроматину, некодуюча білок експресія РНК (мікро-РНК і малі інтерферуючі РНК) [Елліс, 2010; Esteller, 2007; Vence, 2014; Taylor, 2014].

Доведено, що розвиток онкопатології може бути зупинено при зміні метилювання певних генетичних сайтів в ракових клітинах [Cadieux et al., 2009; Schulz et al., 2009; Ehrlich, 2010; Wilson et al., 2010].

Метилювання ДНК- це модифікація молекули ДНК без зміни її нуклеотидної послідовності, що є основним механізмом епігенетики. Воно полягає в приєднанні метильної групи до С-5 або N-4 позицій цитозину або N-6 позиції аденіну. Метилювання впливає на рівень транскрипції, і тому є частиною регулювання експресії генів. Інформація про метилювання може успадковуватися із поділом клітини, і таким чином може розглядатися як частина епігенетичної складової геному.

У людини за процес метилювання ДНК відповідають три ферменти - ДНК -метилтрансферази 1, 3а і 3b (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b). DNMT3a і DNMT3b - de novo метилтрансферази, що здійснюють формування картини метилювання ДНК на ранніх стадіях, DNMT1 - підтримує метилювання ДНК на пізніших стадіях і відповідає за приєднання метильної групи на комплементарному ланцюжку при реплікації ДНК дочірньої клітини [Вайсерман, 2011].

Особливістю епігенетичних процесів, що виникають в ракових клітинах, є те, що поряд з глобальним диметилюванням ДНК (яке зазвичай пов'язують з хромосомною нестабільністю) в них одночасно виникає гіперметилювання певних промоторів генів супресорів пухлинного росту [Esteller, 2007]. Крім цього, ці зміни в метилюванні ДНК асоційовані з модифікацією гістонів. Наприклад, рівень триметилювання лізинів Н4 гістона в положенні 20 (К20, Н4), що здійснюється в клітині в процесі диференціювання і збільшується як з віком, так і при різних патологіях, в ракових клітинах зазвичай знижений. Збільшення рівня метилювання генів супресорів пухлинного росту в ракових тканинах в співвідношенні з нераковими досягає 100 відсотків [Вайсерман, 2011].

Характерною ознакою пухлинних і трансформованих in vitro клітин є порушення балансу метилювання ДНК. Дисбаланс виражається в тому, що в одному типі пухлинних клітин спостерігається аберрантне гіперметилювання промоторних зон генів, включених в канцерогенез, і зниження рівня метилювання іншої частини геному [Заріджзе, 2004].

Науковці дійшли висновку, що порушення метилювання ДНК - вірний шлях до розвитку онкопатологій, а відомості про характер метилювання генів використовується як рання діагностична ознака розвитку пухлин. Підтвердженням цього є дослід Л. Пуар'є з Національного токсикологічного центру США. В своїх дослідах він виключив з раціону амінокислоту метіонін (джерело метильних груп) і виявив, що у всіх піддослідних щурів через два тижні незворотньо розвинувся рак печінки. Але пухлинний процес у печінці розвивається і в тому випадку, коли у трансгенних мишей активований ген людської ДНК - метилази, що призводить до суперметилювання геному [Ванюшин, 2004].

Метилювання ДНК відіграє важливу роль в модуляції структури хроматину, регуляції і стабільності геному, так

як воно захищає ДНК від деградації нуклеазами, що є дуже важливим для нормального розвитку і функціонування. В нормі метилювання ДНК промотує дуже конденсовану структуру хроматину шляхом збільшення ДНК-організуючих білків. Гіпометилювання може привести до активації онкогену. В пухлинних клітинах може викликати деконденсацію хроматина і хромосомні аберації.

Характерною ознакою злоякісно трансформованих клітин є дисбаланс метилювання ДНК, який виражається в тому, що в одному типі пухлинних клітин спостерігається аберрантне гіперметилювання промоторних зон генів-супресорів, залучених в канцерогенез, і зниження рівня метилювання іншої частини генома. Зміни в метилюванні ДНК можуть бути індикатором канцерогенного ризику, що є свідченням про несприятливий прогноз для хворого [Чехун, 2012].

Посттрансляційні модифікації гістонів включають великий ряд варіацій в епігенетичній регуляції, охоплюють більше 50 відомих сайтів модифікації. Гістони підлягають декільком формам модифікації, включаючи ацетилювання, метилювання, фосфорилювання. При взаємодії комбінації цих модифікацій створюють "гістоновий код". Метилювання, ацетилювання чи фосфорилювання в незалежних сайтах можуть працювати в тандемі з іншими модифікаціями [Елліс, 2010].

Інгібітори діацетилази гістонів (HDAC) дуже важливі у розробці нових і менш токсичних протиракових препаратів. Вони блокують діацетилази, які відповідають за диацетилювання гістонів і, таким чином, можуть модулювати експресію гена [Чехун та ін., 2012].

При багатьох формах раку виникає дерегуляція модифікації хроматина. Деякі ензими, що модифікують гістони, наприклад, білок EZH2 групи PcG і білок MLL групи trxG - стають онкогенними і діють, порушуючи епігенетичну ідентичність клітини, в результаті виникає або транскрипційний сайленсинг, або активація "невідповідних генів" [Колесник та ін., 2013].

В ряді досліджень показано, що рівень експресії таких маркерів модифікації гістонів як моноацетильованого K16 H4 і ацетильованого K9 H3, асоційованих з гістоновою діацетилазою SIRT1, змінюється в процесі канцерогенезу. Спотворення регуляції SIRT1 продемонстровано при карциномі легень, лімфомі і саркомі м'яких тканин мишей, а також раку легень, простати і лейкемії людей. Продемонстровано, що зниження ацетилювання K9 H3 асоційовано зі збільшенням ризику рецидиву раку простати. Ракові клітини мають знижений рівень ацетилювання K16 H4 [Kapoor Vazirani et al., 2008]. Припускають, що зниження ацетилування K16 H5 при раку може бути регульовано K16 H4 специфічною гістонацетилтрансферазою hMOF [Pfister et al., 2008]. В наш час взаємозв'язок між підвищеною активністю SIRT1 при раку і її зниженою активністю при старінні вивчена недостатньо.

При дослідженні членів сімей з чітко встановленою сімейною схильністю до розвитку пухлинного процесу, в їх статевих клітинах були ідентифіковані епімутації в генах, що відповідають за репарацію помилково спарених нуклеотидів MLH1 и MSH2 [Chan et al., 2006]. Незалежно від того, відображають ці епімутації істинне трансгенераційне генетичне успадковування, вони можуть індукувати карциногенез тим же чином, що і генетичні мутації в аналогічних локусах. Було показано, що близько половина генів супресорів пухлин, які обумовлюють випадки сімейного рака, при спорадичних формах рака також демонструють епігенетичну репресію.

Мікро-РНК - це клас малих інтерферуюючих РНК, які не кодують білок. В посттрансляційній регуляції відіграють роль негативних регуляторів експресії. Мутації мікро-РНК можуть функціонувати і як пухлинні супресори, і як онкогени. Таким чином, дослідження мікро-РНК може бути практично корисним для діагностики та у виборі напрямку лікування онкопатології. Аналогічно з кодуючими генами мікро-РНК володіє також тканинною специфічністю, певним часом експресії в ході диференціації. Роль впливу некодуючих РНК на транскрипційну активність досліджено не достатньо [Чехун, 2013].

На щастя, клітини можуть регулювати цей епігенетичний сигнал. Метилювання у тварин контролюється гідрокортизоном та антиоксидантами. Високоочищені дексаметазон-рецепторні комплекси з печінки щурів специфічно зв'язуються з GC -збагаченими ділянками ДНК. Це підтверджує те, що в ДНК містяться особливі сайти зв'язування гормон - рецепторних комплексів [Ванюшин, 2004].

Для виявлення змін, які виникають в генах при їх метилюванні використовують бісульфітне секвенування. Бісульфітне секвенування - загальна назва групи методів, спрямованих на вивчення патерну метилювання ДНК за допомогою обробки її бісульфітом. Бісульфіт змінює послідовність ДНК в залежності від її патерну метилювання, і після його впливу можна встановити, які CpG-динуклеотид були метильовані, порівнявши змінену послідовність з вихідною. Після бісульфітної конверсії геномна ДНК ампліфікують за допомогою полімеразної ланцюгової реакції яка не розрізняє метильовані і неметильовані послідовності.

Надалі застосовують такі методи: 1) пряме секвенування; 2) піросеквенування; 3) чутливий до метилювання аналіз одноланцюгових конформацій; 4) методи високочутливого плавлення; 5) чутливий до метилювання метод однонуклеотидного розширення праймера; 6) розщеплення, специфічне до основи; 7) методи, засновані на мікрочіпах; 8) метильовано-специфічна ПЛР (MSP).

Одним з методів, заснованих на ПЛР в реальному часі є "MethyLight", де флуоресцентний зонд, який може зв'язуватися тільки з метильованою ДНК, використовується для виявлення патернів метилювання. Таким чином, аномальний патерн метилювання можна легко визначити. Даний підхід можна застосовувати до суміші

клітин, таких біологічних рідин як плазма крові, сеча, мокрота.

Суть так званої SMRT-технології (SMRT sequencing) в наступному: в ході визначення послідовності фермент ДНК-полімераза вибудовує копію досліджуваної ланцюга ДНК з нуклеотидів, що знаходяться в реакційній суміші. До них приєднані флуоресцентні маркери. Кожен з чотирьох нуклеотидів, що входять до складу ДНК (відомий усім "тетраграмматон" аденін-цитозин-гуанін-тимін), світиться власним унікальним кольором, тому для фахівців не складе особливих труднощів визначити за допомогою спеціального сканера послідовність новоствореної нитки ДНК.

Наявність метильованих нуклеотидів в SMRT-методі розпізнають по зміні часу наступного спалаху - це означає, що фермент включив у ланцюг черговий нуклеотид. Нова технологія дозволяє дуже швидко визначати місцезнаходження метильної групи. Але SMRT-технологія не дозволяє визначати наявність метилювання на відрізках ДНК великої довжини - найкраще вона працює для фрагментів довжиною в тисячу нуклеотидів або менше.

Спадкова інактивація генів, що має відношення до раку, за допомогою зміненого метилювання ДНК і модифікації хроматину привела до усвідомлення того, що сайленсований хроматин може представляти собою життєздатну мішень для терапії. Таким чином, був розроблений новий терапевтичний підхід під назвою "епігенетична терапія", при якому лікарські препарати, що здатні модифікувати хроматин чи патерни метилювання ДНК, що використовуються або самостійно, або в комбінації, щоб підвищити терапевтичний результат [Елліс та ін., 2010].

Більш нові сполуки, такі як субероіланілідгідроксамова кислота (SAHA) і депсипептид, є більш специфічними інгібіторами гістонових деацетилаз і показують хороші клінічні результати. Клінічні дослідження показують, що інгібітори деацетилаз гістонів можуть спровокувати регресію пухлини [Esteller, 2008].

Епігенетична комбінована терапія може відновити активність гена-супресора на пізній стадії раку легень. Центром Johns Hopkins Kimmel (США) було проведено клінічне дослідження, в якому лікування хворих проводилося за допомогою двох препаратів "Азацитидин"" та "Ентіностат". Механізм дії цих препаратів полягає в наступному: "Азацитидин" видаляє метильні групи з генів, а "Ентіностат" - гальмує дезацетилювання гістонів. Все це сприяє пригніченню активності гена, який сприяє зростанню ракових клітин. Епігенетична терапія посилила ефект лікування хіміотерапії і зробила пухлини більш чутливими до стандартних методів лікування [Ho AS, Turcan, 2013; Taylor, 2014].

Розробка мішеней для лікарських агентів з метою пригнічення функції ефекторних ензимів, модифікуючи хроматин, відкрила нові горизонти для лікування раку.

Розроблено новий метод лікування раку, який регулюючи експресію генів допоміг кільком пацієнтам із злоякісними новоутвореннями крові за попередніх клінічних випробувань, фармацевтичною компанією Onco Ethix. В Американській асоціації з дослідження раку (AACR) на щорічній зустрічі в Сан-Дієго, штат Каліфорнія, Лозанна, швейцарська фірма представила неопубліковані дані з фази клінічних випробувань препарату "OTX015" малих інгібіторів молекули Bet-bromodomain білків BRD2, BRD3 і BRD4, які допомагають регулювати експресію генів. Сім з 38 пацієнтів отримали позитивну динаміку у лікуванні онкопатології [Dawson, 2012; Vence, 2014].

Хоча метод епігенетичної терапії має хорошу теоретичну базу, існує проблема відсутності в специфічності дії по відношенню до деяких агентів. Наприклад, аналоги нуклеозидів є неспецифічними інгібіторами ДНК-метилтрансфераз і інгібують метилювання ДНК в усьому геномі. Тому існує можливість надмірної реактивації генів в результаті такої терапії. Також, існує декілька додаткових модифікацій хроматину, крім деацетилювання, такі як метилювання ключових амінокислотних гістонів, які потенційно можуть бути мішенями для терапії.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Таким чином, епігенетика, на сучасному етапі її розвитку, є фундаментальною дисципліною у вивченні причин виникнення онкологічних захворювань. Її бурхливий розвиток в останні десятиріччя привів не тільки до кращого розуміння етіології та патогенезу раку, а й до появи нових неінвазивних методів діагностики, створення принципово нових методів лікування. Та тим не менш, не всі секрети епігенетики та її взаємодії власне з генетикою розкриті.

Список літератури

Вайсерман А. М. Эпигенетическая эпидемиология возрасттзависимых заболеваний / А. М. Вайсерман, В. П. Войтенко, Л. В. Мехова // Онтогенез. - 2011. - Т 42, № 1. - С. 2-7.

Ванюшин Б. Ф. Материализация эпигенетики, или небольшие изменения с большими последствиями / Б. Ф. Ванюшин // Химия и жизнь. - 2004. - № 2. - С. 34 - 36.

Заридзе Д. Г. Канцерогенез / Д. Г. Заридзе. - М.: Медицина, 2004. - 202 с.

Колесник А.П. Прогностическое значение онкомаркеров Cyfra 21?1 и РЭА у больных раком легкого / А.П. Колесник, Л.И. Аливапова, А.В. Каджоян // Онкология. - 2013. - Т. 15, № 2. - С. 158 - 160.

Чехун В. Ф. Эпигенетика рака / В. Ф. Чехун // Онкология. - 2008. - Т 10, № 3. - С. 301 - 302.

Чехун В.Ф. Гетерогенность опухоли - динамичное состояние / В.Ф. Чехун, С.Д. Шербан, З.Д. Савцова // Онкология. - 2012. - Т 14, № 1. - С. 6 - 9.

Чехун В.Ф. От системной биологии рака до методологии персонализированного лечения / В.Ф. Чехун // Онкология. - 2012. - Т 14, № 2. - С. 85-88.

Епігенетичні зміни при недрібноклітинному раку легені / А. А. Шикеєва, Т.

В. Кекеєва, Л. Е. Завалишина [та ін.] // Онкологія. Журнал ім. П. А. Герцена. - 2013. - № 5. - С. 20 -21, 24.
Шикеєва А. А. Молекулярно - генетичні зміни при недрібноклітинному раку легені: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 03.02.07 "Генетика", 14.01.12 "Онкологія" / А. А. Шикеєва. - Москва, 2014. - 24 с.
Эллис С. Д. Эпигенетика / С. Д. Эллис, Т. Дженювейн, Д. Рейнберг - М.: Техносфера, 2010. - 496 с.
Dawson M. Targeting Epigenetic Readers in Cancer / M. Dawson, T. Kouzarides, B. Huntly. N // Engl J Med. - 2012. - Vol. 367. - P. 647-657.
Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone modification maps / Esteller M // Nat. Rev. Genet. - 2007. - Vol. 8. - P. 286-298.
Genomewide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation / Cadieux B., Ching T.T., VandenBerg S.R. [et al.] // Cancer Res. - 2006. - Vol. 66. - P. 8469-8476.
Hemminki K. The balance between heritable and environmental aetiology of human disease / K. Hemminki, J. Lorenzo Bermejo, A. Forsti // Nat. Rev. Genet. - 2006. - Vol. 7. - P. 958-965.
Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer / Chan T.L., Yuen S.T., Kong C.K. [et al.] // Nat. Genet. - 2006. - Vol. 38. - P. 1178-1183.
Ho A.S. Epigenetic therapy: use of agents targeting deacetylation and methylation in cancer management / A.S. Ho, S. Turcan, T.A. Chan // OncoTargets and Therapy. 2013. - Vol. 6. - P. 223-232
Role of hMOF dependent histone H4 lysine 16 acetylation in the maintenance of TMS1/ASC gene activity / [Kapoor Vazirani P., Kagey J.D., Powell D.R., Vertino P.M.] // Cancer Res. - 2008. - Vol. 68. - P. 6810-6821.
Schulz W.A. Methylation of endogenous human retroelements in health and disease / W.A. Schulz, C. Steinhoff, A.R. Florl // Curr. Top Microbiol. Immunol. - 2006. - Vol. 310. - P. 211-250.
Stefansson O. CARM1 and BAF155: an example of how chromatin remodeling factors can be relocalized and contribute to cancer / O. Stefansson, M. Esteller / / Breast Cancer Research. - 2014. - Vol. 16. - p. 307.
Taylor P. Epigenetic Changes Can Cause Cancer / P. Taylor // Journal of Clinical Investigation. - 2014. - P. 34-37.
The histone acetyltransferase hMOF is frequently downregulated in primary breast carcinoma and medulloblastoma and constitutes a biomarker for clinical outcome in medulloblastoma / Rea S., Taipale M. [et al.] // Int. J. Cancer. - 2008. - Vol. 122. - P. 1207-1213.

Пилипонова В.В., Лях Ю.М.

СОВРЕМЕННЫЕ ВЗГЛЯДЫ НА МЕХАНИЗМ ЭПИГЕНОМНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Резюме. *В статье раскрыты основные направления в развитии учения о механизмах эпигеномного канцерогенеза. Доказано, что активность генов может контролироваться внешним воздействием. Раскрыта суть эпигеномной регуляции генов, активации онкогенов, взаимосвязь между уровнем метилирования и ходом онкологического процесса, а также приведена краткая характеристика основных методов поиска метильных групп и эпигенетической терапии.*

Ключевые слова: *эпигенетика, канцерогенез, метилирование, посттрансляционная модификация гистонов, ремоделирование хроматина.*

Pylyponova V.V., Lyah Yu.M.

CURRENT CONCEPTS OF MECHANISM OF EPIGENOMIC CARCINOGENESIS

Summary. *The article revealed the main directions in the development of the doctrine of the mechanisms of epigenetic carcinogenesis. It is proved that the activity of genes may be controlled by an external influence. The essence epigenetic gene regulation, activation of oncogenes, the relationship between the level of methylation and course of cancer and shows a brief description of the main methods of search methyl groups and epigenetic therapy.*

Key words: *epigenetics, carcinogenesis, methylation, histone post-translational modification, chromatin remodeling.*

Стаття надійшла до редакції 02.02.2015 р.

Пилипонова Вікторія Володимирівна - к.мед.н., доцент кафедри патологічної фізіології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; +38 097 351-72-52
Лях Юлія Михайлівна - студентка III курсу медичного факультету Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; +38 050 837-96-39