

Epigenetika i fiziologija gena

Epigenetics and gene physiology

Koraljka Gall Trošelj*, Renata Novak Kujundžić, Ivana Grbeša

SAŽETAK. Za razliku od genomike, koja se temelji na proučavanju građe – anatomije gena, epigenomika se temelji na izučavanju nasljednih varijacija u aktivnosti gena, dakle njihovoj fiziologiji. Osnovni epigenetički procesi, regulatori aktivnosti gena su metilacija molekule DNA i posttranslacijske modifikacije histona. Ova dva procesa međusobno se nadopunjuju pri čemu stvaraju epigenetičku mrežu događaja koja u konačnici regulira aktivnost pojedinih gena. Uspostava određenog tipa epigenetičke mreže ovisi o anatomiji gena i njegovog promotora te stalnom međudjelovanju egzogenih i endogenih čimbenika koji dovode do stvaranja karakterističnog epigenetičkog biljega. Sve se više uviđa važnost reverzibilnosti uspostave i uklanjanja epigenetičkih molekularnih biljega u svim, a naročito u zloćudnim bolestima. Istraživanja u području epigenomike, primjene novih, epigenomskih pristupa u liječenju, a posebno u području razvoja “pametnih”, epigenetičkih lijekova, u uzlaznoj su putanji koja još uvijek nije dosegla svoj zenit.

Ključne riječi: epigenetika, metilacija molekule DNA, modifikacije histona

ABSTRACT. Epigenetics is focused on gene physiology, analyzing inherited variations in gene expression, while genomics is focused on gene anatomy, analyzing gene structure. DNA methylation and histone post-translational modifications are the basic epigenetic mechanisms regulating gene activity. These two processes complement each other, creating an epigenetic network of events which regulates specific gene activity. Establishing a particular type of epigenetic network depends on the anatomy of both the gene and its promoter, as well as the permanent interaction of exogenic and endogenic factors, which result in a particular epigenetic mark. As a result of new data, the importance of epigenetic marks as a reversible process, is becoming increasingly relevant to disease development, especially for cancer. One looks forward to the promise, still to be fully realized, of research in epigenetics, including new approaches to therapy and the development of “smart” epigenetic drugs.

Key words: DNA methylation, epigenetics, histone modification

Zavod za molekularnu medicinu,
Laboratorij za epigenomiku,
Institut “Ruđer Bošković”

Primljeno: 30. 3. 2009.
Prihvaćeno: 28. 4. 2009.

Adresa za dopisivanje:
*Prof. dr. sc. Koraljka Gall Trošelj, dr. med.,
Zavod za molekularnu medicinu,
Laboratorij za epigenomiku,
Institut “Ruđer Bošković”,
Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb
e-mail: troselj@irb.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD

Još je donedavno većina nas bila uvjereni da sklonost nastanku bolesti ovisi isključivo o nasljednim informacijama pohranjenim u molekuli DNA. Sukladno tome, puno je učinjeno kako bi se uspostavile funkcionalne veze između promjena u strukturi molekule DNA (npr. mutacije, spajanje gena koje za posljedice ima nastanak kimeričnog proteina, amplifikacije gena koje dovode do promijenjene aktivnosti gena) i nastanka određenih bolesti. Ovaj je pristup ponudio odgovore na velik broj pitanja koja su, u konačnici, dovela do otkrića gena koji, ako su mutirani, dovode do nastanka bolesti kao što je to, na primjer, slučaj s cističnom fibrozom. No, usprkos očiglednom napretku još uvijek nemamo odgovore na dodatna, još uvijek neodgovorena pitanja koja si postavljamo svaki dan. Je li uistinu isključivo raspored baza (GATC) u molekuli DNA stvarni ključ koji će, s vremenom, otvoriti sve brave? Naše svakodnevne dvojbe nakon završenog projekta Genom čovjeka možda je najbolje opisao Manel Esteller, direktor Laboratorija za epigenetiku raka pri Nacionalnom institutu za rak, Španjolska, koji je rekao: "Vrijeme je da posložimo ovaj veliki telefonski imenik i napravimo nekoliko telefonskih poziva kako bismo bili sigurni da su imena i adrese vezani uz ispravne brojeve"¹. Na temelju ove izjave postaje vrlo jasno da znanstvenu radoznalost i višeslojevito znanje trebamo preusmjeriti u neka nova područja biologije.

Tek smo nedavno postali svjesni važnosti epigenomskih struktura u razvoju i pojavi bolesti. Sama riječ znači "izvan konvencionalne genetike", a njezin tvorac je razvojni biolog Conrad Waddington². Rođen u Eveshamu, Engleska, 1905., Waddington je već 1947. pokrenuo osnivanje Odjela za genetiku u Institutu Edinburgh. U samo deset godina genetička istraživanja u ovom Institutu postala su prepoznatljiva po iznimnoj kvaliteti, a sam Odjel bio je više nego uspješan i postao je jedan od najvećih odjela genetike u svijetu. Tijekom tih godina, Waddington je planirao stvaranje laboratorija za epigenetiku. U svojoj je namjeri uspio tek 1965., kada je i službeno osnovana Skupina za epigenetička istraživanja, s Waddingtonom kao počasnim direktorom na čelu. Nažalost, razvoj

ove skupine nije se odvijao u skladu s njegovom vizijom koja je primarno bila usmjerena u područje embriologije. Naime, materijalna je potpora bila preusmjerena u ona područja znanosti u kojima su se otkrića temeljila na hibridizacijskim tehnikama vezanim uz molekule DNA i RNA, koje se u to vrijeme u embriologiji nisu koristile. Waddington je, za razliku od mnogih embriologa svog vremena, u to vrijeme bio ne samo cijenjen embriolog, nego i jedna od rijetkih osoba koja je bila svjesna značaja genetike u razvoju, ili, još preciznije, značaja aktivnosti materijala jezgre (gena) za događanja u citoplazmi. Nepotrebno je govoriti da je imao dvojbe u vezi s tadašnjim biološkim disciplinama koje je, zbog izgrađenog vlastitog ugleda, mogao argumentirati i hrabro iznositi u javnosti.

Waddington je postavio hipotezu o mogućoj nadopunivosti epigeneze (stari naziv za embriološki rast i diferencijaciju) i preformacije, tvrdeći da "...su sve osobitosti odraslog organizma prisutne u oplođenoj jajnoj stanici, ali se trebaju "odmotati" i razviti ...". Na temelju toga je razvoj smatrao epigenetičkim događajem: "...moglo bi se reći da epigenetsku građu ili epigenotip čini niz događaja kroz koje određeno tkivo prolazi tijekom razvoja; znači – određeni organ nastaje zbog osobitih međudjelovanja genotipa, epigenotipa i vanjskih čimbenika". Waddington je preminuo 1975³. Njegove su ideje, ponekad nepotpuno razrađene, ostale "uskладиštene" tijekom velikog broja godina, neprepoznate kao skriveno blago koje ponovo otkrivamo u epigenomici novog doba. Njegov je način razmišljanja bio nevjerojatan u svojoj otvorenosti prema nepoznatome. Njegove su hipoteze nastajale u vrijeme kada ih tehnički nije mogao potvrditi – bez protutijela, bez rekombinantne tehnologije DNA, bez ikakvih saznanja o tome kako su geni građeni i na koji bi način njihova aktivnost uopće mogla biti regulirana. Utoliko više njegovo vizionarsko prepoznavanje "nečega" što je tada nazvao "epigenetika" zaslužuje naše najdublje poštovanje.

Danas epigenetiku definiramo kao "nasljednu i reverzibilnu promjenu funkcije gena", neovisno o slijedu baza u molekuli DNA^{4,5}. Za razliku od epigenomike, koja proučava globalnu sliku epigenetike u određenom genomu, epigenetika ima su-

žen fokus i proučava specifične epi-promjene vezane uz točno određene gene. Svjesni smo nasljeđivanja epigenetičkih biljega na razini stanice i na razini organizma. Postali smo svjesni važnosti ovih biljega u razvoju, u diferencijaciji stanice i u zaštiti od ugradnje genoma virusa. Ovi su biljezi, regulatori aktivnosti gena, kritični u obilježavanju molekularnih signala koji nastaju zbog djelovanja egzogenih ili endogenih čimbenika. Pojednostavljeno, biljeg od gena "zahtijeva" da svoju aktivnost prilagodi novonastalom stanju.

U fiziološkim uvjetima stanica mora modelirati svoj epigenom trenutno, ponekad u sekundi. To joj omogućuje prilagodba na signale zbog kojih neki geni trebaju biti utišani, a drugi potaknuti. Ovo se događa kroz ciljano uklanjanje ili dodavanje biljega metilacije na molekulu DNA, odnosno mijenjanjem strukture oktamera histona. Ova su dva događaja baza epigenomskog odgovora. Suprotno tome, nemogućnost modeliranja ovih dvaju molekularnih događaja dovodi do nastanka bolesti. Prvi uradak koji je ukazao na važnost epigenomskih promjena u nastanku raka tiskan je 1983. godine, no tada važnost tog otkrića nije bila prepoznata⁶.

NAJVAŽNIJI EPIGENETSKI MEHANIZMI

Najvažniji epigenetski mehanizmi su metilacija molekule DNA, uspostavljanje kovalentnih, posttranslacijskih promjena histona (metilacija, acetilacija, fosforilacija, sumoilacija) i utišavanje gena ovisno o malim molekulama RNA. Ova tri najvažnija epigenetska mehanizma usko su povezana u uspostavljanju vlastite (epigenomske) mreže signala unutar koje se međusobno nadopunjuju i upravljaju važnim procesima u stanici. Vrlo su važni i u odgovoru stanice na djelovanje mutagena (u ovom kontekstu "epimutagena") iz okoline. Shodno važnosti ovih mehanizama, svaki od njih će biti objašnjen odvojeno, u radovima koji slijede. Ovim ćemo radom objasniti osnovne spoznaje vezane uz prva dva mehanizma.

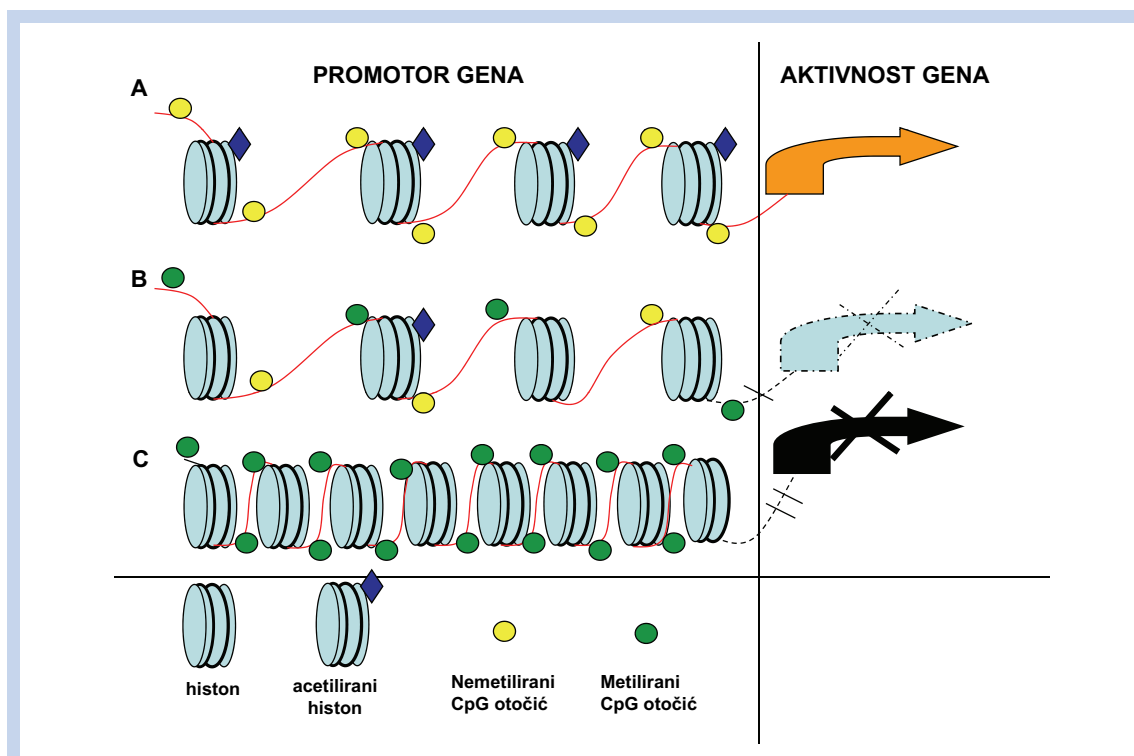
METILACIJA MOLEKULE DNA I TRANSKRIPCIIJA GENA

Približno 56% gena čovjeka u području promotora posjeduje područja bogata citozinima i gvanimima⁷. Ova područja zauzimaju točno određena

mjesta u genomu i pritom čine njegovih 1 – 2%. Nazivamo ih "otočići CpG" koji su definirani kao područja dulja od 500 parova baza koja posjeduju više od 55% nukleotida s bazama G + C. Ova su područja uglavnom nemetilirana u normalnoj, zdravoj stanici. Iznimke čine promotori upisanih gena, područja kromosoma X – vezano uz njegovu nasumičnu inaktivaciju i područja transpozona⁸. U funkcionalnom se smislu metilacija molekule DNA, kao iznimno važan biološki fenomen, izučava primarno na razini transkripcije gena pri čemu se

Odgovori na pitanja koja su strukturu gena, njihovu anatomiju, povezala sa sklonošću nastanku određenih bolesti predstavljaju vrh ledenog brijega. Multidisciplinarna istraživanja čiji je zadatak otkriti mehanizme regulacije aktivnosti pojedinih gena, dakle istražiti funkciju, fiziologiju gena, objedinjena su pod nazivom "epigenetika". Za razliku od "epigenomike" koja objedinjuje globalne analize epigenetičkih promjena cijelog genoma, "epigenetika" analizira promjene točno određenih gena i/ili skupina gena u zadanom vremenskom i prostornom kontekstu.

najpojednostavniji scenarij može odvijati na dvije razine: metilirani promotor – gen je utišan, nemetilirani promotor – gen je aktivan (slike 1A i 1C). Vrlo osjetljiv i precizan proces tijekom kojeg citozin postaje metiliran predstavlja osnovni mehanizam normalnog razvoja u svih vrsta, a pritom i dodatno pojašnjava "vremensku i tkivno specifičnu ekspresiju". Jednostavno; svi posjedujemo 46 kromosoma koji na sebi imaju sve naše gene, ali nisu svi naši geni stalno aktivni u svim tkivima. Metilacija molekule DNA u biokemijskom smislu predstavlja kovalentno vezanje metilne skupine na 5. atom ugljika, u otočiću CpG. Ovaj biološki proces nije, kao što smo već spomenuli, iznimno važan samo u razvojnoj biologiji. Važan je i za patofiziologiju bolesti, s posebnim naglaskom na zloćudnu bolest. Značaj ovog procesa je pokazan u pokusnim modelima u kojima različito aktivni transgeni (aktivni ili utišani, ovisno o stupnju metilacije) zadržavaju obrazac aktivnosti tijekom stotinjak dioba⁹. Umreženi signali koji su odgovorni za točno kopiranje obrasca metilacije iz generacije u generaciju ovise o dva tipa DNA metiltransfe-



Slika 1. Shematski prikaz epigenetičkih promjena u genu čiji je promotor bogatom CpG otočićima. A. Histoni su acetilirani, CpG otočići su nemetilirani, gen je aktivan. B. Dio histona je izgubio acetilne skupine, dio CpG otočića je metiliran, gen nije aktivan, ali je promjena reverzibilna. C. Histoni u hipoacetilirani, a CpG otočići metilirani. Gen je utišan, promjena je ireverzibilna.

Figure 1. Epigenetic changes in a CpG rich promoter.

A) Histones are acetylated, CpG islands are unmethylated, the gene is active. B. Some acetyl groups are missing, proportion of the CpG islands is methylated, the gene is not active, but the change is still reversible. C. Histones are hypoacetylated, CpG islands are methylated. The gene is irreversibly silenced.

raza (DNMT): DNMT3A i DNMT3B. Ova dva enzima posjeduju metilacijsku aktivnost *de novo*, što znači da su neophodni za uspostavljanje obrasca metilacije tijekom ranog razvoja jedinke¹⁰. Nakon njegove uspostave aktivira se DNA metiltransferaza DNMT1 koja je odgovorna za točno kopiranje uspostavljenog obrasca u sljedeću generaciju stanica¹¹. Bez ovih bi enzima život bio nemoguć, što je i pokazano na primjeru miševa. Životinje u kojih su ovi enzimi bili utišani ugibale su tijekom ili nakon završenog embrionalnog razvitka, a u cjelokupnoj je "slici" prevladavala globalna hipometilacija molekule DNA^{12,13}.

Tijekom zloćudne preobrazbe otočići CpG koji se nalaze u područjima promotora gena koji su neophodni za njezin nastanak postaju hipermetilirani. Posljedica ovog događaja je utišavanje tumorsupresorskih i drugih gena koji su odgovorni za nastanak raka. Dva modela objašnjavaju pretjera-

nu metilaciju promotora i utišavanje gena¹⁴. Prvi se temelji na činjenici da se metilirani citozin "istegne" u veliki zavoj molekule DNA i pritom izazove promjenu konformacije. To za posljedicu ima nemogućnost vezanja čimbenika transkripcije na ciljno CpG - vezno mjesto. Drugi nas model ponovo približava Waddingtonovoj "mreži" i temelji se na funkciji proteina MeCP2 (engl. *methyl cytosine binding proteins*). Kao što i samo ime govori, ovi se proteini vežu za metilirane otočiće CpG i pritom stvaraju prepreku zbog koje se čimbenici transkripcije ne mogu vezati. Ova je objašnjenja lako razumjeti, no u stvarnosti je ovaj proces vrlo složen i ovisi o puno molekula, o čemu će biti riječi u sljedećem poglavlju.

MODIFIKACIJE HISTONA

Deacilaze histona su proteini – enzimi, uključeni u proces uklanjanja acetilne skupine iz repa hi-

stona. Ovaj je događaj ključan u utišavanju gena. U "pojednostavljenom" biološkom scenariju, deacetilacija histona za posljedicu ima "zgušnjavanje" kompleksa DNA-histon (slika 1C). Ova promjena konformacije također stvara fizičku zapreku zbog koje se čimbenici transkripcije ne mogu vezati za ciljno mjesto na promotoru gena koji se zbog toga utiša. No, "pravi" scenarij koji se odvija na razini epigenomske komunikacije puno je složeniji: deacetilacija histona je praćena aktivacijom DNA-metilaza koje dovode do lokalne hipermetilacije molekule DNA, u području promotora (slika 1C). Sve je veći broj podataka koji upućuju na vrlo živahnu molekularnu epigenetičku komunikaciju koja posreduje "izmjeni informacija" na razini "acetilacija histona" – "metilacija DNA". Ovo se dešava u strogo određenoj kaskadi događaja. Vrlo često se osjećamo nemoćnima u razumijevanju ovih zakonitosti jer nismo u mogućnosti razaznati razliku između uzroka i posljedice. Konkretno, koji bi epigenetički proces ili koja bi molekula trebala biti "napadnuta" kao primarna epigenomska meta u liječenju raka? Ako ciljamo u određenu molekulu pa onda, posljedično, utječemo na signalne puteve za koje trenutno ne znamo da su uključeni u "komunikacijsku mrežu", koliko štetu ćemo izazvati? Bi li se pristup trebao razlikovati od osobe do osobe, od tkiva do tkiva? Odgovore na ova pitanja još nemamo, a potraga za njima čini ovaj tip istraživanja iznimno zahtjevnim i zanimljivim.

Ono što sigurno znamo temelji se na nekoliko izvanrednih istraživanja od kojih ćemo spomenuti samo jedno, prvo kojim je pokazano da acetilacija histona sprječava metilaciju molekule DNA i to tako da: a) "priječi" pristup DNA-metilazama, a u isto vrijeme b) pozitivno djeluje na vezanje čimbenika transkripcije, prvenstveno zahvaljujući prekomjernoj acetilaciji histona H3 i H4. Znači, na razini "globalnog", acetilacija histona ima suprotni učinak u odnosu na metilaciju molekule DNA i dobro korelira s globalnom transkripcijskom aktivnošću¹⁵. Prema tome, primjena inhibitora deacetilaza histona (HDAC; engl. *histone deacetylase*) podržavat će acetilaciju histona i, posljedično, utjecati na stupanj metilacije promotora gena. Ovo je kristalno jasno pokazano u modelu karcinoma prostate čovjeka, na 131 uzorku tkiva tu-

mora i 65 uzoraka dobroćudnog, ali hipertrofiranog tkiva prostate. U pokusima je praćeno ponašanje tumor-supresorskog gena RASSF1 (engl. *ras association domain family protein 1*) za koji je prijašnjim istraživanjima bilo pokazano da je utišan u zloćudnim tumorima prostate, ali i drugim vrstama zloćudnih tumora. Spomenutim je istraživanjem pokazano sljedeće: a) utišavanje gena RASSF1 zbog pojačane metilacije promotora bilo je prisutno u 74% uzoraka zloćudnog tumora i samo 18,5% dobroćudnog, hipertrofiranog tkiva prostate; b) razina metilacije dobro je korelirala s Gleason-zbrojem i uznapredovanom bolešću; c) na nemetilirane promotore bili su vezani acetylirani histoni i dimetilirani lizin na histonu 3 (H3K4m2 – dimetilacija histona 3 na aminokiselini lizin, četvrtoj u slijedu); d) primjenom inhibitora metilacije molekule DNA (ali ne i inhibitora deacetilaza histona) došlo je do promjene u modifikaciji histona vezanih uz promotor. Konačna informacija koja je značajno mijenjala sliku epigenetičkog mozaika bila je iznimno zanimljiva: smanjena acetilacija histona, ili dimetilacija H3K4, udružena s povišenom dimetilacijom lizina, devedog u slijedu aminokiselina histona H3 (H3K9m2), ima ključnu ulogu u utišavanju gena RASSF1¹⁶.

Na temelju ovog rada postalo je očito da ispravno komuniciranje na razini: acetilacija histona – metilacija molekule DNA predstavlja iznimno važnu sponu za funkcioniranje stanice. Događaje koji prethode njezinom stvaranju tek trebamo otkriti. Netko bi se, odmah u početku, mogao zapitati: "Zašto su modifikacije histona toliko važne?" Dobro je poznato da je molekula DNA u stanicama eukariota organizirana u obliku kromatina. Građevne jedinice kromatina su nukleosomi koji sadrže 147 parova baza DNA omotanih oko osmodijelnog kompleksa sastavljenog od po dvije molekule histona H2A, H2B, H3 i H4. Upravo posttranslacijske promjene u amino-terminalnim dijelovima histona određuju dostupnost kromatina transkripcijskoj mašineriji, a time i aktivnost gena. No, niti u ovom slučaju ne znamo točne mehanizme uspostavljanja ove kaskade događaja¹⁷. To se naročito odnosi na razumijevanje mehanizama koji su nužni za uspostavljanje, održavanje i, najvažnije, mijenjanje obrazaca metilacije otočića CpG i acetilacije histona. Jasno nam je, međutim, da se

poremećaj ovih obrazaca koji je tako znakovit za zloćudno oboljenje relativno dobro prepoznaje na razini opisne fenomenologije. No, koliko god dobri i detaljni bili u ovom dijelu epigenomske priče, teško da smo, na ovoj razini istraživanja, uistinu “zagrebli” ispod površine. Pravi je izazov tek pred nama; naime, na pitanja koja počinju s “kako” puno je lakše odgovoriti nego na pitanja koja počinju sa “zašto”. Nužno je, dakle, da nakon povezivanja “kako” s postojećom fenomenologijom, krenemo u otkrivanje puno osebujnijih epigenomskih krajolika koji bi trebali biti prava poveznica između naših pitanja koja počinju s “kako” i “zašto”. Pod “zašto”, naravno, podrazumijevamo otkrivanje mehanizama koji dovode do uspostave određenog epigenotipa.

Što više znamo to smo svjesniji koliko zapravo ne znamo. U tom je kontekstu jako dobro biti osviješten i kritičan u odnosu na sadašnje spoznaje u ovom području jer ako ne razumijemo što se događa u mreži epigenoma, ne možemo niti početi razmišljati o pametnoj intervenciji na ovoj razini. Konkretno, u ovom slučaju, ako ne razumijemo uzročno-posljedične veze koje su prisutne o određenom sustavu, ako ne razumijemo ulogu ključnih “igrača” i njihovu povezanost, onda ne možemo niti sanjati o ciljanom (engl. *tailored*; “krojen”) epigenetskom liječenju. Pa ipak, sve je više odobrenih epigenomskih lijekova, a mnogi se spojevi, potencijalni epigenomski lijekovi, testiraju u kontroliranim kliničkim ispitivanjima diljem svijeta. Nabrojiti ćemo samo neke, prvenstveno one koje je u SAD-u odobrila FDA (*Food and Drug Administration*).

EPIGENOMSKI LIJEKOVI

Sama činjenica, da su epigenomske promjene reverzibilne, otvara mogućnost novom, epigenomskom liječenju. Nadalje, s obzirom na to da je reverzibilnost procesa temelj kemoprevencije, epigenomski bi pristup vrlo brzo mogao u potpunosti promijeniti naše sadašnje shvaćanje kemoprevencije. Dakle, za razliku od dobro znanog konvencionalnog liječenja raka citostaticima kojima se manje - više neselektivno ubijaju sve stanice koje se dijele, epigenomskim bi se pristupom, u idealnim uvjetima, naravno, pokušalo proces “vratiti nazad”. Ovaj se pristup uistinu nameće kao metoda izbora u sadašnjem trenutku.

Pritom bi se mogle pratiti i pojave u bolesnika s prekanceroznim lezijama (nedovoljno istraženo do sada) te ciljano, uravnoteženjem mreže epigenetskih signala, liječiti ovu skupinu ljudi (slika 1B). Nadalje, možda bi se otkrivanjem ranih epigenomskih/epigenetskih promjena u naizgled zdravom tkivu mogla predvidjeti sklonost nastanku bolesti, upravo na tom analiziranom anatomsom mjestu. Znači, u pravilnim bi se indikacijskim granicama epigenetske analize mogle primijeniti i u dijagnostičke svrhe i to ne samo, kako se u početku činilo, u području onkologije. U svakom slučaju, kako je u zloćudnim bolestima promjena epigenoma najbolje opisana, a polako se okrećemo i istraživanju mehanizama, ne čudi da su i prvi epigenomski lijekovi odobreni upravo za liječenje raka.

Trenutno postoje dvije vrste epigenomskih lijekova: inhibitori DNA metiltransferaza i inhibitori deacetilaza histona. Prva skupina lijekova poznata je i pod nazivom “demetilatori” koji svoje djelovanje ostvaruju ugradnjom u molekulu DNA, tijekom njezine replikacije. Ovo im omogućuje njihova kemijska struktura po kojoj su vrlo slični nukleozidu citidin. Posljedica njihove ugradnje u novonastajući lanac molekule DNA je “zarobljavanje” DNA-metiltransferaze, zbog čega dolazi do gubitka njezine aktivnosti, a cijeli sustav postaje hipometiliran. Trenutno se na tržištu u SAD-u nalaze dva lijeka – derivata citidina hipometilatora, koje je odobrila FDA. Prvi, Vidaza™ (5-azacytidine), odobren je u svibnju 2004., dok je Dacogen™ (5-aza-2'-deoxycytidine), koji je deoskiriboza - analog 5-azacytidina, odobren u svibnju 2006. Prva indikacija za primjenu ovih dvaju lijekova je mijelodisplastični sindrom (MDS, engl. *myelodysplastic syndrome*). Dok se 5-aza-2'-deoxycytidine veže samo za molekulu DNA, 5-azacytidine se veže i za molekulu RNA, pa negativno utječe na translaciju u citoplazmi. Oba lijeka svoj terapijski učinak prvenstveno ostvaruju hipometilacijom promotora gena koji su neophodni za diferencijaciju, ali i izravnim citotoksičnim učinkom na hematopoetske stanice u koštanoj srži koje su u potpunosti izgubile regulatorne mehanizme uključene u kontrolu staničnog ciklusa i zbog toga postale u potpunosti neosjetljive na podražaje fiziološkim signalima rasta. Neproliferirajuće stanice su relativno neosjetljive na Vidazu™. Potreba za odobravanjem inhibitora deacetilaza histona bila je logična, s obzirom na velik broj

znanstvenih dokaza o prekomjernoj aktivnosti deacetilaza histona u stanicama raka. Prema tome, osnovna ideja jest uvođenje ove skupine lijekova u kliniku kako bi se, inhibiranjem deacetilaza, podržalo postojanje histona u njihovom acetiliranom obliku. Ovo bi, u skladu s prikazom na slici 1, spriječilo "umatanje" molekule DNA u zgušnjutu strukturu koja za posljedicu ima utišavanje gena. Znači, terapijski bi se učinak trebao temeljiti na reaktiviranju utišanih tumor - supresorskih gena. Najveći problem s kojim se ovdje srećemo je neselektivnost. Naime, acetilacija je temeljni biološki proces i primjena ovakvog lijeka sigurno ima utjecaj na sve signalne puteve koji su regulirani (između ostalog) acetilacijom. Prema tome, ako i postoji pozitivan terapijski učinak (a postoji, u protivnom lijek ne bi niti bio odobren na tržištu), mreža signala na koju utječe je toliko široka da na kraju ne znamo koji je signalni put bio kritičan u liječenju. Drugim riječima, pravi mehanizam molekularnog djelovanja u ovom slučaju ostaje sakriven (radi li se "samo" o inhibiranju deacetilaza histona, ili je konačan terapijski učinak nastao zbog slučajnih "nuspojama" širokospektralnog djelovanja lijeka). Ne smijemo zaboraviti da trenutno poznajemo 11 enzima, članova obitelji HDAC. Ono što je dobro jest da smo svjesni nesavršenosti terapijskog pristupa korištenjem ove skupine lijekova: na primjer vorinostat (Zolinza™), koji je FDA odobrila u listopadu 2006. prvenstveno za liječenje kožnih manifestacija T-staničnog limfoma (CTCL, engl. *cutaneous T-cell lymphoma*) u oboljelih od progresivne, stalne ili rekurentne bolesti, prepoznat je kao paninhibitor, bez toliko potrebne selektivnosti.

Jasno je, dakle, da je jedan od najvažnijih ciljeva koji bi trebao biti postignut u području epigenomskih lijekova upravo selektivnost. Na ovoj problematici trenutno radi jako puno vrhunskih znanstvenika; i u akademskim ustanovama, i u velikim farmaceutskim kompanijama, ali i u malim, privatnim biokompanijama. MethylGene je jedna od njih. Direktor ove kompanije, Donald Corcoran, nedavno je izjavio (njegova je izjava, naravno, bila temeljena na rezultatima iznimno kvalitetnog istraživanja) da je njihov kemijski spoj "MGCD0103" koji se trenutno ispituje u klinici "racionalno dizajniran, moćan i selektivan HDAC-

inhibitor pojedinih, specifičnih HDAC-izoforni. Uistinu, djelovanje ovog antitumorskog lijeka u uvjetima *in vivo* i *in vitro* nedavno je i objavljeno¹⁸.

Osim ovog, postoji nekoliko studija čiji rezultati upućuju na to da bi neki HDAC-inhibitori mogli biti uspješno primijenjeni i u liječenju Hodgkinova limfoma, akutne mijeloične leukemije i samog mijelodisplastičnog sindroma. Na primjer, kemijski spoj proizveden u Novartisu, koji se ispituje pod imenom "LBH589", pokazao se iznimno

5-azacitidin i 5-aza-2'-deoksicitidin se u organizmu brzo razgrađuju. Zebularin, novi analog, stabilniji je i može se primijeniti oralno, pa se očekuje da će on biti baza razvoja nove generacije hipometilatora. Velik je interes i za razvoj nenukleozidnih inhibitora DNMT, kako bi se izbjegli toksični učinci koji se nužno javljaju nakon ugradnje nenukleozidnog analoga u molekulu DNA. Listu nenukleozidnih inhibitora čiji se učinak intenzivno istražuje trenutno čine: prokainamid, prokain, RG-109 i MG-98.

uspješnim u poticanju aktivnosti gena odgovornih za popravak oštećenja molekule DNA i apoptozu, u stanicama oboljelih od Ph⁻ akutne limfoblastične leukemije¹⁹.

Postoje i drugi HDAC-inhibitori, no detaljan opis njihove strukture i mehanizma djelovanja primjeren je visokospecijaliziranim časopisima iz ovog područja. Ono što je važno napomenuti jest da je kombinirana primjena demetilatora i inhibitora HDAC već u kliničkim ispitivanjima i rezultati su, barem za sada, obećavajući²⁰. U svakom slučaju, kako broj optimističnih izvješća postaje sve veći, ostaje nam da se nadamo, zasluženo i optimistično, da će epigenomski pristup uistinu obilježiti novu, usudujemo se reći, bolju budućnost u području liječenja raka, a poglavito kemoprevencije. Sada kada smo počeli prepoznati početne mehanizme odgovorne za promijenjenu aktivnost gena, u "prozoru vremena" koje nam još uvijek omogućuje vožnju unatrag – što je, izgleda, moguće sve dok ne dođe do promjena u strukturi molekule DNA (mutacije), realno je očekivati da ćemo ovo znanje usmjeriti u pravom smjeru.

PROJEKT EPIGENOM ČOVJEKA

Istraživanje u području epigenomike prepoznato je kao prioritet u cijelom svijetu. Naročito se ističu programi koje financira Europska unija, ali do izražaja sve više dolaze i nacionalne inicijative. U samoj Uniji je za epigenomska istraživanja do sada investirano 50 milijuna eura. Novac se usmjerava u nekoliko područja: istraživanje metilacije molekule DNA (HEP – *Human Epigenome Project*); određivanje strukture kromatina (HEROIC – *High-Throughput Epigenetic Regulatory Organization in Chromatin*); i konačno, liječenje zloćudne bolesti (EPITRON, *Epigenetic Treatment of Neoplastic Disease*). U listopadu 2000. osnovan je Konzorcij humanog epigenoma (engl. *Human Epigenome Consortium*), na inicijativu Sanger Instituta, *Epigenomics AG* i *Centre National de Genotypage* (Evry, Francuska) koji je svoju aktivnost ostvarivao kroz trogodišnji pilot-projekt (u potpunosti ga je financirala EU) sa zadatkom da mapiranja svih točaka metilacije u genima MHC (engl. *Major Histocompatibility Complex*) u 32 osobe i u sedam različitih tkiva: masno tkivo, mozak, dojka, pluća, jetra, prostata i mišić. Rezultat istraživanja je bio grom iz vedra neba: jedinstveni genom, genom čovjeka, doslovno se rasplinjava u različitim epigenomima. Ovo je istraživanje pokazalo da je razdioba metiliranih otočića molekule DNA jedinstvena za svakog pojedinca, jedinstvena za svako tkivo, jedinstvena za svaki od analiziranih MHC-lokusa²¹.

Već 2004. godine Europska komisija je pokrenula osnivanje Epigenomske mreže izvrsnosti (engl. *The Epigenome Network of Excellence (NoE)*), koju su idejno, a potom i djelom ostvarili Thomas Jenuwein (*Research Institute of Molecular Pathology of Vienna*), Phil Avner (*Pasteur Institute, Pariz*) i Genevive Almouzni (*Curie Institute, Pariz*). Primarni je cilj bio stvaranje umreženog epigenomskog istraživanja u Europi. Danas, samo pet godina kasnije, jezgri Epigenomske mreže izvrsnosti čini 25 redovnih članova, 35 pridruženih članova i 23 novoosnovane skupine, u 83 laboratorija u 12 europskih zemalja. Pridružilo im se i dodatnih 350 laboratorija, dobro poznatih po impresivnim istraživanjima i vrlo kvalitetnim publikacijama. Samo u 2007. godini članovi "mreže" su objavili više od 300 znanstvenih publikacija u najprestižnijim znanstvenim časopisima.

Otprilike u isto vrijeme aktivnosti su otpočele i u Sjedinjenim Američkim Državama. U lipnju 2005. organizirana je prva radionica Epigenom čovjeka, na poticaj i u organizaciji Američke udruge za istraživanje raka (AACR, *The American Association of Cancer Research*). Toj su radionici prisustvovali vodeći ljudi Nacionalnih instituta za zdravstvo (NIH, *National Institutes of Health*) koji su, očito, prepoznali važnost ove inicijative. Zaključak kojim je radionica završila s radom bio je zapravo i odluka. Odlučeno je, naime, da se otpočne s projektom Epigenom čovjeka, s primarnim ciljem: "... da se identificiraju sve kemijske promjene i međusobni odnosi između svih konstitutivnih dijelova kromatina koji utječu na "funkciju koda DNA" (aktivnost gena, op. K. G. T.) kako bi se bolje razumio razvoj, starenje, gubitak kontrole aktivnosti gena u stanicama raka i drugim bolestima, kao i utjecaj okoliša na zdravlje čovjeka"²². Glavna zadaća projekta bila je mapiranje otočića metilacije u molekuli DNA. Vrlo važan događaj koji je prethodio ovoj odluci bio je povezivanje *Wellcome Trust and Epigenomics AG* koji su odlučili zajednički financirati prvu fazu projekta. Na taj se način izbjegla "utakmica" u kojoj bi, da nije bilo razuma, ponovo došlo do sukoba privatne, komercijalne tvrtke i javnog dobra, dobro poznat scenarij iz projekta Genom čovjeka. Sljedeća radionica, u srpnju 2006., bila je usmjerena na razradu aktivnosti međunarodnog projekta kako bi se mapirale metilacijske mape određenog broja epigenoma čovjeka. Ona je ujedno bila i baza za osnivanje Alijanse humanog epigenoma i bolesti (AHEAD, engl. *Alliance for the Humane Epigenome and Disease*) sastavljene od interdisciplinarnih i multidisciplinarnih skupina istraživača iz cijelog svijeta. Ovi ljudi su bili pokretači strategija i razvoja za HEP, koji se "odrađuje" u cijelom svijetu. Primarni cilj im je definiranje epigenomskih biljega u određenim tkivima čovjeka na različitim stupnjevima razvoja. Od ove se skupine očekuje i razvijanje bioinformatičke strukture koja će pohranjivati dobivene rezultate ("epigenomic database"). Nije, međutim, tajna da su očekivanja nakon dobivenih prvih rezultata još puno veća: a) odrediti strukture epigenoma u različitim stanicama, u različitim fazama staničnog ciklusa, u čovjeka i u miša; b) upotpuniti – dovršiti epigenomske mape u kvasaca; c) "isporučiti" metilacijske mape javnosti; d) definirati nekodirajuće i male molekule RNA²³.

U drugim je djelovima svijeta epigenomika također prepoznata kao prioritet. Umreženja različitih skupina znanstvenika na vrhu su biomedicinskih prioriteta u Aziji, gdje je, na primjer, u prosincu 2006. osnovano Japansko društvo za epigenetiku. U Australiji je Australaska alijansa za epigenetiku otpočela s radom krajem 2008. godine.

U Hrvatskoj je ovaj tip istraživanja prepoznalo Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa financirajući projekt Epigenomske i imunomodulatorne promjene u zloćudnim tumorima glave i vrata čovjeka. Ovaj se projekt, u suradnji s Kliničkom bolnicom "Sestre milosrdnice", u potpunosti realizira na Institutu "Ruđer Bošković", u novoosnovanom Laboratoriju za epigenomiku Zavoda za molekularnu medicinu. U nastojanju da i sami postanemo dio međunarodne mreže, prepoznati i cijenjeni u području koje tek postaje znanstveni interes mnogih, neophodno je pojačati bazu kroz što veći broj prijavljenih epigenomskih projekata u domovini, a onda i šire. S obzirom na iznimnu intelektualnu zahtjevnost slagalice koja se zove "epigenomika", neizostavno imajući u vidu i iznimno visoku cijenu ovakvih istraživanja koja se, očito, plaćaju u vrijeme koje je neizvjesno više nego lagano, bilo bi dobro usmjeriti dio intelektualnih potencijala u ovo područje, udružiti snage, povezati se i stvoriti, za početak, nacionalnu mrežu, i to ne samo u području istraživanja raka.

ZAHVALA

Autori zahvaljuju prof. dr. sc. Jasminki Pavelić, znanstvenoj savjetnici Instituta "Ruđer Bošković" na kritičnom čitanju članka i dobronamjernim primjedbama.

LITERATURA

1. Esteller M. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis* 2006;27:1121-5.
2. Waddington C. The epigenotype. *Endeavour* 1942;1:18-20.
3. Van Speybroeck L. From epigenesis to epigenetics. *Ann NY Acad Sci* 2002;981:61-81.
4. Rakayan VK, Blewitt ME, Druker R, Preis JJ, Whitlaw E. Metastable epialleles in mammals. *Trends Genet* 2002;18:348-51.
5. Rakayan VK, Chong S, Champ ME, Cuthbert PC, Morgan HD, Luu KV et al. Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine Axin(Fu) allele occurs after maternal and paternal transmissions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2538-43.
6. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983;301:89-92.
7. Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:11995-9.
8. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003;33(Suppl):245-54.
9. Schubeler D, Lorincz MC, Cimbora DM, Telling A, Feng YQ, Bouhassira EE et al. Genomic targeting of methylated DNA: influence of methylation on transcription, replication, chromatin structure, and histone acetylation. *Mol Cell Biol* 2000;20:9103-12.
10. Reik W, Kelsey G, Walter J. Dissecting de novo methylation. *Nat Genet* 1999;23:380-2.
11. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16:6-21.
12. Lei H, Oh SP, Okano M, Juttermann R, Goss KA, Jaenisch R et al. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* 1996;122:3195-205.
13. Li E, Bestor R, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992;69:915-26.
14. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood*. 1999;93:4059-70.
15. Gottesfeld JM, Forbes DJ. Mitotic repression of the transcriptional machinery. *Trends Biochem Sci* 1997;22:197-202.
16. Kawamoto K, Okino ST, Place RF, Urakami S, Hirata H, Kikuno N et al. Epigenetic modifications of RASSF1A gene through chromatin remodeling in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:2541-8.
17. Jain N, Rossi A, Garcia-Manero G. Epigenetic therapy of leukemia: an update. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; in press.
18. Fournel M, Bonfils C, Hou Y, Yan PT, Trachy-Bourget MC, Kalita A et al. MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor, has broad spectrum antitumor activity in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2008;7:759-68.
19. Scuto A, Kirschbaum M, Kowolik C, Kretzner L, Juhasz A, Atadja P et al. The novel histone deacetylase inhibitor, LBH589, induces expression of DNA damage response genes and apoptosis in Ph - acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 2008;111:5093-100.
20. Jain N, Rossi A, Garcia-Manero G. Epigenetic therapy of leukemia: an update. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; in press.
21. Rakyan VK, Hildmann T, Novik KL, Lewin J, Tost J, Cox AV et al. DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: a pilot study for the human epigenome project. *PLoS Biol* 2004 D; 2(12): e405 (doi: 10.1371/journal.pbio.0020405)
22. The American Association for Cancer Research Human Epigenome Task Force and the European Union, Network of Excellence, Scientific Advisory Board. Moving AHEAD with an international human epigenome project. *Science* 2008;457:711-5.
23. Jones PA, Martiensses R. A blueprint for a human epigenome project: The AACR human epigenome workshop. *Cancer Res* 2005;65:11241-6.