

# EPIGENETİK

***Hafta 11: Epigenetik ve İnsan Hastalıkları I***  
Kanser epigenetiđi,  
Histon deasetilaz inhibitörlerinin klinik uygulamaları

**Doç Dr Arzu ATALAY**

# Kanser Epigenetiđi

- Kanser hem genetik, hem de epigenetik bir hastalıktır.
- İnsan kanserlerini tanımlamada hem patolojik hem de klinik özellikleri dikkate alınmaktadır.
- Kanserlerin orijinleri için üç teori geliştirilmiştir
  - Birinci teori daha çok patolojik gözlemlere dayanmaktadır. Buna göre kanser anormal farklılaşmaya bağlı bir hastalıktır. Bu modelde malign hücrelerin gelişimleri farklılaşma sürecindeki uygunsuz epigenetik (mutasyonal olmayan) değişikliklere bağlıdır.
  - İkinci teori virologlar tarafından geliştirilmiştir. Buna göre insan kanserleri SV40 veya Rous sarkoma virüsü gibi virüsler tarafından geliştirilmişlerdir.
  - Üçüncü modele göre kanser mutasyonlar sonucu olmaktadır. Bu teori kimyasal ve fiziksel ajanların mutajenik ve tümörojenik etkileri ile olan güçlü ilişkiyle desteklenmektedir.

- Her ne kadar o dönemde teorileri destekleyecek yeterli analiz imkanı olmasa da onkojenik Rous sarkoma virüsündeki *v-src* geninin tespit edilmesi ve bir proto-onkogen olan *c-src*'nin insan hücrelerinde tespit edilmesi çalışmaları desteklemiştir.
- 1982 yılında öncü bir çalışma *H-ras* genindeki bir nokta mutasyonunun benign *H-ras* proto-onkogeninin malign *H-ras* onkogenine dönüşmesine neden olduğunu göstermiştir.
- Bir yıl sonra ise «Knudson's two-hit» hipotezi ile tümör baskılayıcı genlerin inaktive edildiği gösterilmiştir.
- Ancak, bir onkogenin aktivasyonu ve eş zamanlı tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu tüm pre-neoplastik dokularda veya metastatik kanserlerin hepsinde görülen bir durum değildir.

# Kanserde epigenetik kontrol mekanizması

- Epigenetik, gen ekspresyonunu düzenleyen ancak primer DNA baz sekansını etkilemeyen değişiklikleri ifade eder.
- Öncelikli olarak
  - Metilasyon ve histon modifikasyonları
  - Non-coding RNA'lar ve polycomb mekanizmaları
- Bu mekanizmaların her birisinin kanser gelişimi ve ilerleyişinde önemli rolü vardır, her ne kadar farklı tümör histolojilerinde hangi mekanizmanın etkin olduğu oldukça geniş farklılıklar gösterse de.

- DNA metilasyonu

- Hipermetilasyon genellikle gen aktivitesinin susturulmasına yol açar.
- DNA metilasyonu CpG dinükleotidlerindeki sitozin üzerinde yapılır.
- Memeli hücreleri üç farklı DNA metiltransferaz enzimi tarafından kontrol edilir.
  - DNMT1, DNA replikasyonu sonrası mevcut olan metilasyon paternlerinin idamesini sağlayan asıl enzimdir ve bunu hemimetile CpG bölgelerine metil grupları ekleyerek yapar.
  - DNMT3A ve 3B yeni CpG bölgelerini metile eder. Embriyogenez esnasında yüksek oranda mevcut olup, yetişkin dokularda çok az eksprese edilir.
  - DNMT3L

- DNA metilasyonu

- DNA metilasyonu geri dönüşümsüz bir basamak değildir. Bazen metile edilmiş DNA bölgesi demetilasyon ve remetilasyon arasında denge halindedir.
- DNA replikasyonunun olmadığı durumda gözlenen demetilasyon normalde zigot ve germ hücrelerinin gelişiminde gözlenir ancak aynı zamanda malign hücrelerde de gözlenir.
- DNA demetilasyonuna neden olan tedavi edici ilaçlar klinik olarak kullanılmaktadırlar.

- **Histon modifikasyonları**

- DNA'nın direkt metilasyonu yanı sıra, çeşitli histon modifikasyonlarından etkilenen kromatin yapısı da kanserde gen ekspresyonunda etkin rol oynar
- Histon proteinleri transkripsiyona kapalı olan heterokromatin ve çeşitli transkripsiyon faktörlerinin bağlanması ve regulasyonuna izin veren ökromatin arasındaki değişikliği koordine ederler.
- Metilasyon ve asetilasyon, ubikütinasyon, biotinilasyon, poli-ADP ribozilasyon, SUMOilasyon gibi mekanizmalar histon modifikasyonlarında rol alırlar.

- **Histon modifikasyonları**

- Birçok HMT'lar tümör süpresör etkiye sahiptir ve dolayısıyla demetilazlar onkojeniktirler.
- Bu mekanizmaların koordine ettikleri yapısal değişiklikler DNA üzerindeki gen veya gen grubunun transkripsiyonuna izin verir veya engeller.
- Onkogeneizde de histon modifikasyonları bu şekilde etki ederek rol alırlar.



- **Genomik imprinting**

- Genomik imprinting DNA metilasyonu ile kontrol edilen ebeveyn spesifik bir şekilde genetik bölge ekspresyonunun yapıldığı bir fenomendir.
- Genlerin çok az bir kısmı imprint edilmiştir ve imprint genlerin çoğunluğu fetal ve plasental gelişim regulasyonunda bulunurlar.
- İlginç olarak imprinting kaybı (LOI) hemen tüm kanser türlerinde ortaya çıkmaktadır.
- Willm's tümörü LOI için tipik bir örnektir. Willm's tümöründe ilk gözlenen genetik veya epigenetik değişiklik LOI'dir.

- **Non-coding RNA**

- Fonksiyon olarak RNA splicing yanı sıra,
  - DNA metilasyon regulasyonu
  - Kromatin remodeling
  - Transkripsiyon regulasyonu
  - Translasyon regulasyonu (micro RNA)
- Her ne kadar microRNA'lar gelişme ve farklılaşmada rol alsalar da, kanserli ve normal hücreler arasında microRNA açısından farklılıklar vardır.
- Kanserde microRNA'ların rolü tam olarak bilinmese de miktarlarının malign transformasyon durumunda azaldığı bilinmektedir (farklılaşmanın idamesi fonksiyonu).
- Kanser gelişiminde incelenmesi gereken fonksiyonları mevcuttur.

# Epigenetik ve Onkogeneze

- Onkogeneze kalıtılabilir olaylar sonucunda ortaya çıkar.
- Başlangıçta iddia edilenin aksine onkogeneze oldukça karmaşıktır ve uzun bir süre birçok olayın olmasını gerektirir.
- Onkogeneze farklı histopatolojik alt gruplara ayrılır.
  - Morfolojik normal, genetik veya epigenetik anormal
  - Premalign (proliferatif ve atipik değişiklikler ve karsinoma in situ)
  - Malign
  - Metastatik
- Epigenetik olarak olan değişiklikler her evrede ve her kanser türünde aynı olmak zorunda değildir. (BRCA1 geni erken bulgudur.)

# Epigenetik ve Onkogenezi

- Tümör mikroçevresindeki normal stromal hücrelerde epigenetik değişiklikler
  - Rutin histopatoloji erken dönem onkogenezi tespit edemez
  - Birçok kanserde, tümör dokusunu çevreleyen stromal hücrelerde epigenetik değişiklikler mevcuttur (promotor metilasyonu)
  - Örnek
    - » Mesane kanserinde histopatolojik olarak normal görülen çevre stromal dokuda aslında LOH
    - » Kolon kanserinde normal görünen komşu mukozada MGMT promotor metilasyonu
    - » Meme kanserinde RASSF1A promotor metilasyonu
    - » Prostat kanserinde glutatyon S transferaz 1 metilasyonu

Bunlar da rekürrensi artırmaktadır. Ancak erken tanı ve tedavi açısından önemli olabilir.

# Epigenetik ve Onkogenez

- Premalign epigenetik değişiklikler
  - Patolojik tanımlamalara göre birçok malign olmayan histolojik görünümeler vardır (displazi, atipi, proliferatif değişiklikler gibi)
  - Son yıllarda bu durumlarda gözlenen epigenetik değişiklikler onkogenezin anlaşılmasına ışık tutmaktadır. Çünkü histolojik olarak normal görünen bu hücrelerde epigenetik bazı değişiklikler gözlenmektedir.
  - Ayrıca premalign histolojik özellik sergileyen hücrelerde de epigenetik değişiklikler olduğu birçok organ kanserinde tanımlanmıştır
    - » Promotor bölge metilasyonunun yanı sıra histon modifikasyonları ve microRNA ekspresyonu değişiklikleri gibi.
  - Bazı kanser hücreleri belli ortamdan çıksa da (field-effect), malign hücreler de kendi buldukları ortamı etkileyebilmektedirler.
    - » Önceden metastatik melanom hücrelerinin bulunduęu ortama normal insan melanositlerinin konulması

# Epigenetik ve Onkogenez

- Malign transformasyon
  - Malign dönüşüme uğramış hücre fenotipik olarak
    - » Devamlı büyüme uyarısı (onkogen aktivasyonu)
    - » Kontrol bölgelerinin kaybı (tumor baskılayıcı kaybı)
    - » Sınırsız çoğalma (telomer korunması)
  - Genotipik olarak çoğu onkogen gen amplifikasyonu veya mutasyon sonucu aktive edilirler. Ancak bu her zaman geçerli değildir..
    - » Bcl2, B h lösemide metilasyon kaybı
    - » Pax2 geni normal dokularda sessiz, endometriumda östrojen ile uyarılır

# Epigenetik ve Onkogenezi

- Malign transformasyon
  - Epigenetik değişiklikler tumor supresor inaktivasyonu yapabilirler
    - » Tm sup olan RIZ1 geninin hipermetilasyonu tiroid, hepatoseluler ve özefageal kanserlerde görülebilir.
    - » Hepatoseluler kanserlerde Hint1 tm sup geninin hipermetilasyonu
    - » BRCA1, meme kanserinde
    - » Bazı tm sup etki gösteren microRNA'lar tumor hücrelerinde hipermetilasyon ile down-regule edilirler
  - İnvaziv kanserlerde telomer uzunluğunun idamesini sağlayan telomeraz (hTERT) aktivitesi vardır.
    - » hTERT normal hücrelerde deasetile vaziyette sessiz olarak mevcuttur.
    - » Kanser hücrelerinde hTERT promotor bölgesi hipo ve hipermetilasyon ve değişik histon modifikasyonları ile reaktive edilir.

# Epigenetik ve Onkogenez

- Metastatik fenotiple ilişkili epigenetik değişiklikler
  - Metastatik fenotip oluşumu epigenetik mekanizmalarla oluşmaktadır
  - Bu değişiklikler daha çok CpG adalarındaki hipermetilasyonla ilişkilidir
    - » Meme kanseri ve metastatik lenf nodu karşılaştırması
  - Metastazda etkin olan genler/proteinlerden
    - » Urokinaz tipi plazminojen aktivatörü geni hipometilasyonu meme ve prostat kanserlerinde kötü prognoz ile ilişkilidir.
  - Metastaz için anjiyogenez önemlidir
    - » TIMP3, VEGF ile bağlanarak anjiyogenezi inhibe eder
    - » TIMP3 hipermetilasyonu anjiyogeneze neden olur



- Metastatik kanser hücreleri ve hatta invaziv kanser hücreleri epigenetik olarak erken embriyonik dönem hücreleri ile benzer yapısal özellikler taşımaktadırlar.
  - Embriyogenez esnasında hareketsiz epitelial hücrelerin, invazyon yeteneğine sahip olan mezankimal hücrelere dönüşmesi (EMT)
  - Aniyogenez ve EMT'nin hem normal hem de kanserli hücrelerde microRNA'lar tarafından düzenlenmektedir
    - İleride tedavi stratejileri ile metastazın önlenmesi umulmaktadır

# Epigenetik tanı ve Prognoz

- Her ne kadar epigenetik değişiklikler kullanılarak insan kanserlerine tanı konması rutin klinik kullanımı olan bir yaklaşım olmasa da
- Yeni yayınlarda umut verici sonuçlar mevcut
  - DNA metilasyon profili
  - microRNA ekspresyon profili
  - Histon modifikasyonları incelenmekte
- microRNA PCA3 idrarda tespit edilmesi prostat ca için PSA'dan daha spesifik
- Kanser tiplerinin tespit edilmesi ve tanı konmasında epigenetik değişiklikler henüz yeterli seviyede kullanılmamakta
  - Meme kanserinde epigenetik değişikliklerin chip tabanlı hibridizasyon teknikleri ile tespit edilmesi ve histolojik tip ve grade'lemede kullanılması ile ilgili çalışmalara devam edilmekte

# Epigenetik tanı ve Prognoz

- Epigenetik testler içerisinde en sık kullanılanı sessiz konumda duran tümör baskılayıcı genlerin (TSG) promotor bölgelerindeki CpG adalarının hedef seçilerek incelendiği DNA metilasyonudur
- Metilasyon duyarlı PCR yöntemiyle akciğer, servikal, tiroid ve meme kanserlerinin etkin bir şekilde tespit edilmesi sağlanabilmektedir.
- microRNA ekspresyon profilleri de kullanılabilmektedir
  - miR127; BCL6 (anti-apoptotik) inhibitörü (lenfoma, lösemi)
  - Primeri tespit edilemeyen tm'lerde 42 microRNA taraması

# Epigenetik tanı ve Prognoz

- Histon modifikasyonlarının CHIP yöntemiyle ve MS ile tespit edilmesi klinik uygulamada kullanım için aday yöntemlerdir
- Prognoz için global epigenetik anormalliklerin araştırılması son zamanlarda uygulanan bir yaklaşım
  - Global hipometilasyon
  - Global histon modifikasyonları
- İnvaziv kanserlerde global histon dimetilasyon, trimetilasyon ve asetilasyon incelenmesinin prognostik potansiyele sahip olduğu düşünülmekte
- Aksine histon trimetilasyon kaybının preneoplastik dokularda gözleendiği, hatta akciğer yassı hücreli ca'da kötü prognostik gösterge olduğu gösterilmiştir

# Kanserde epigenetik tedavi

- Normal hücrelere göre kanser hücrelerinde asetilasyon gibi histon modifikasyonları daha az ve CpG bölgelerinde hipometilasyon mevcuttur.
- Farmakolojik olarak bu geri dönüştürülebilir değişiklikleri düzeltmek, bu tedavinin asıl mantığını oluşturmaktadır.
- Spesifik DNMT'ler ve HDAC'ler metile edilmiş veya asetile edilmiş tm baskılayıcı genleri tekrar aktifleyebilir.
  - p15-INK4B metilasyonu MDS ve AML'de kötü prognostik. DNMT inhibitörü olan 5-azacytidine ve 5-aza-2'deoxyctidine FDA onayı almıştır.
  - Bazı kanserlerde hücre siklusu kontrol eden genler susturulmuş durumda. HDAi olarak vorinostat kullanılmakta.

# Kanserde epigenetik tedavi

- microRNA'ların anti-kanser tedaviler içinde rolü mevcuttur.
- microRNA'lar farklılaşma, proliferasyon ve apoptoz gibi biyolojik olayları kontrol etmenin dışında tumor supresor veya onkogen gibi fonksiyon görebilirler.
  - Kanser gelişimi ve metastazı artıran microRNA inhibisyonu
    - Meme kanserinde microRNA-155 inhibisyonu ile CXCR4 azaltımı
  - Eksik olan microRNA'nın yerine konması
    - Hücre döngüsünü D2 ve E2 hedef alarak durduran microRNA26a

# Sonuç

- Epigenetik, onkogenezin anlaşılmasında ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde faydalı olmuştur. Korunmada, tanıda ve tedavide yeni metodların geliştirilmesinde faydalı olacaktır.
- Epigenetik ile onkogenez ve tümör baskılayıcı genlerin bir arada değerlendirilmesi normalden maligniteye geçişte gözlenen patolojik geçişin anlaşılmasını kolaylaştırmıştır.
- Metilasyon, asetilasyon ve microRNA'lar tedavi yaklaşımları için yeni hedeflerdirler.
- Ayrıca, maligniteye geçiş öncesinde bu değişikliklerin zaten mevcut olması, araştırmacıların yeni ilaçlar veya tanı için ajanlar üretmelerini hatta erken dönemde kanserden korumalarını sağlayabilecektir.