

Received: 2004.10.20
Accepted: 2005.01.20
Published: 2005.03.11

Inhibitory deacetylaz histonów jako potencjalne cytostatyki nowej generacji

Histone deacetylase inhibitors as a new generation of anti-cancer agents

Andrzej Stepulak^{1,2}, Marta Stryjecka-Zimmer¹, Krzysztof Kupisz²,
Krzysztof Polberg³

¹ Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, Akademii Medycznej w Lublinie

² Oddział Otolaryngologii – Chirurgii Głowy i Szyi, Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. Kard. Stefana Wyszyńskiego w Lublinie

³ Oddział Otolaryngologii, Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. Papieża, Jana Pawła II w Zamościu

Streszczenie

Acetylacja i deacetylacja histonów z udziałem swoistych enzymów – acetylaz i deacetylaz wpływa na regulację replikacji i transkrypcji poprzez zwiększoną lub ograniczoną dostępność wiązania z DNA czynników transkrypcyjnych oraz enzymów biorących udział w tych procesach. Inhibitory deacetylaz histonów (HDI) powodują zahamowanie wzrostu, indukują różnicowanie i/lub apoptozę wielu komórek nowotworowych przez zmianę ekspresji niewielkiej liczby genów. Wybiórcze działanie na poszczególne typy nowotworów podkreśla potencjalną przydatność HDI jako nowej generacji cytostatyków. HDI hamują proliferację komórek nowotworowych w badaniach *in vitro* oraz *in vivo*, wykazując przy tym małą toksyczność i niewielkie działania niepożądane w badaniach przedklinicznych. Obecnie wiele z nich jest testowanych w leczeniu ludzi i znajdują się w I lub II fazie badań klinicznych.

Niniejsze opracowanie przedstawia dostępną wiedzę na temat molekularnego mechanizmu działania HDI, a także ich wstępne zastosowanie kliniczne w leczeniu chorych na nowotwory.

Słowa kluczowe:

acetylacja histonów • inhibitory deacetylaz histonów • nowotwory

Summary

The acetylation and deacetylation of histones mediated by histone acetylases and deacetylases influence DNA accessibility to factors regulating replication, repair, and transcription. Histone deacetylases inhibitors (HDI) are inducers of growth arrest, differentiation, and/or apoptosis of many tumor cells by altering the transcription of a small number of genes. The selective tumor specificity of these compounds underscores their potential as new agents for the treatment of cancer. Several HDI have shown anti-tumor activity *in vitro* and *in vivo* with remarkably low toxicity in preclinical studies and are currently in phase I and II clinical trials. This review summarizes the molecular mechanism of action of HDI and its clinical application in the treatment of cancer.

Key words:

histone acetylation • histone deacetylase inhibitors • cancer

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/7124.pdf**Word count:** 3006**Tables:** 1**Figures:** –**References:** 69**Adres autora:** dr n. med. Andrzej Stepulak, Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej AM, ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin, e-mail: andrzej.stepulak@am.lublin.pl; a12322@op.pl

WSTĘP

Prawie 40 lat temu zauważono związek między acetylacją histonów a regulacją transkrypcji [1]. Proces odwracalnej acetylacji histonów stał się obiektem intensywnych badań od 1996 roku, kiedy odkryto pierwszą jądrową acetylazę [7] i deacetylazę [59]. Stwierdzenie, że odwracalna acetylacja reszt lizyny N-końcowego fragmentu histonów odgrywa podstawową rolę w regulacji transkrypcji komórek eukariotycznych – hiperacetylacja jest związana z nasileniem transkrypcji, podczas gdy deacetylacja – z represją wielu genów, stało się podstawą do poszukiwania nowej strategii leczenia przeciwnowotworowego, wykorzystującej specyfikę działania tych enzymów. Szczególnie zainteresowanie dotyczy deacetylaz histonów (histone deacetylase – HDAC), ze względu na możliwość potencjalnego zastosowania ich inhibitorów jako nowej generacji cytostatyków. Wykryto kilkanaście substancji hamujących aktywność HDAC, mających jednocześnie działanie przeciwnowotworowe, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, wykazujących przy tym małą toksyczność. Kilka z nich jest już na etapie badań klinicznych [41,62].

ACETYLACJA HISTONÓW W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Podstawową jednostką organizacyjną eukariotycznego DNA w jądrze komórkowym jest nukleosom zbudowany z oktameru czterech par białek – histonów H2A, H2B, H3, H4, na którym owinięty jest łańcuch 140–150 par zasad DNA. Oktamery łączy fragment DNA o długości 54 par zasad z dołączonym histonem H1. Histony są białkami o silnie zasadowym charakterze, ze względu na bogate w lizynę N-końcowe fragmenty głównie H3, H4, w mniejszym zakresie H2A i H2B.

Acetylacja reszt lizyny histonów powoduje zmianę ładunku elektrycznego tych białek z dodatniego na obojętny, co w konsekwencji hamuje interakcje z ujemnie naładowaną resztą kwasu fosforowego DNA. Następstwem jest zmiana struktury nukleosomu, rozwinięcie nici DNA, zwiększona dostępność dla wiązania czynników transkrypcyjnych oraz enzymów biorących udział w transkrypcji, a w związku z tym aktywacja ekspresji swoistych genów [11,24].

Na podstawie podobieństw budowy strukturalnej – występowania wielu identycznych sekwencji aminokwasów, acetylazy histonów (histone acetyltransferase – HAT) podzielono na trzy główne grupy: GNAT (GCN5-related-N-acetyltransferases), MYST (nazwa złożona z pierwszych liter acetylaz wchodzących w skład grupy: MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 i Tip60) i p300/CBP (p300/cyclic-AMP-response-element binding protein). Poszczególne enzymy wykazują również preferencje do acetylowania konkretnych histonów [29,41].

Acetylazy modyfikują zaledwie kilka-kilkanaście reszt lizyny w N-końcowym fragmencie histonów [55], wymagają również określonej sekwencji otaczających lizynę aminokwasów, co świadczy o dość dużej swoistości tych enzymów [34,47]. W połączeniu z innymi białkami acetylazy mogą tworzyć wiele kompleksów enzymatycznych złożonych z licznych podjednostek. Kompleksy te mogą acetylować różne reszty lizyny poszczególnych histonów, a także łączyć się z czynnikami transkrypcyjnymi, powodując aktywację, bądź hamowanie transkrypcji swoistych genów [47].

Oprócz histonów, HAT mogą również acetylować niektóre czynniki transkrypcyjne, np. E2F (transcription factor required for repression of the adenovirus E2 promoter), p53, EKLF (erythroid Kruppel-like transcription factor), czy GATA1 (globin transcription factor 1), co zwiększa ich zdolność łączenia się z DNA i stymuluje transkrypcję [34].

Zaburzenia w acetylacji histonów mogą być związane z patogenezą różnego typu nowotworów, zarówno pochodzenia nabłonkowego, jak również wywodzących się z układu hematopoetycznego [29,42]. Stwierdzono translokacje, amplifikacje czy mutacje genów kodujących acetylotransferazy. Translokacje genów dla acetylotransferaz CBP i p300 wykryto m.in. w ostrej białaczce szpikowej [5,15]. Następuje wówczas połączenie genów kodujących białka typu MOZ (monocytic-leukaemia zinc-finger protein) lub MLL (mixed-lineage leukaemia DNA binding protein) z genem *CBP*, czy też białka MLL z genem acetylazy p300 [21,29]. Może to powodować wyłączenie funkcji poszczególnych HAT lub też zmiany w aktywacji transkrypcji wielu genów, w warunkach prawidłowych nieaktywnych [29]. Różnego typu mutacje genu acetylazy p300 wykazano w raku żołądka i jelita grubego [17,19,44] oraz nowotworach mózgu, np. gliomach blastycznych [48]. Mutacja genu *CBP* jest również odpowiedzialna za występowanie zespołu Rubinsteina-Taybiego, który oprócz deformacji kostnych, charakteryzuje się znacznie zwiększoną zapadalnością na nowotwory [45]. Wskazuje to na znaczenie zaburzonej acetylacji histonów w powstawaniu i progresji nowotworów.

TRZY RODZINY DEACETYLAZ HISTONÓW – KLASYFIKACJA I MECHANIZM DZIAŁANIA

Dotychczas u ludzi zidentyfikowano 17 genów kodujących HDAC. Enzymy te podzielono na trzy główne rodziny (klasy), biorąc pod uwagę podobieństwo w strukturze pierwszorzędowej białka – kolejność (sekwencję) aminokwasów [23]. HDAC tworzą złożone kompleksy z innymi białkami, niezbędnych do wiązania się z DNA, czy też do łączenia się pośrednio lub bezpośrednio z czynnika-

mi transkrypcyjnymi – m.in. z p53, Rb, NFkB. BRCA1, YY1 [12,29,32]. Stosunkowo najlepiej jest scharakteryzowana klasa I, w skład której wchodzi HDAC1, HDAC2, HDAC3 i HDAC8, występujące jedynie w jądrze komórkowym. W odróżnieniu od klasy I HDAC, klasa II zawiera enzymy, które mogą przemieszczać się między cytoplazmą a jądrem komórkowym. Do klasy II należą HDAC o numerach 4, 5, 6, 7, 9, 10, zdolne do łączenia się z czynnikiem transkrypcyjnym MEF2. Podobnie jak klasa I pośredniczą w hamowaniu transkrypcji [16,29]. Trzecią klasę HDAC zidentyfikowano na podstawie podobieństwa budowy (sekwencji aminokwasów) do deacetylaz występujących u drożdży. Zaliczono do niej enzymy nazwane SIRT (homologue of silent information regulator 2) o numerach 1 do 7. Ich funkcja jest słabo poznana, choć wykazano, że SIRT1 powoduje deacetylację p53, a przez to hamuje zależną od p53 apoptozę [39,60].

Obecność HDAC wykazano prawie we wszystkich badanych tkankach prawidłowych i narządach organizmu: mózgu, nerkach, jelicie grubym, trzustce, jajnikach, sercu, prostatie, a także w wywodzących się z nich nowotworach. Stwierdzono zwiększoną ekspresję HDAC8 i HDAC9 w komórkach nowotworowych w porównaniu z komórkami prawidłowymi. HDAC4 jest jedynym enzymem z tej grupy, którego obecność wykazano prawie wyłącznie w komórkach nowotworowych oraz w komórkach mięśni podczas embriogenezy. Ekspresja HDAC w nowotworach jest jedynie nieznacznie większa niż w tkankach somatycznych [12]. Wynika stąd, że rola HDAC w komórkach nowotworowych nie polega jedynie na zmienionej aktywności tych enzymów, lecz opiera się raczej na wybiórczej regulacji transkrypcji poszczególnych genów.

Deacetylazy histonów powodują ograniczoną przestrzennie zmianę w strukturze chromatyny. Poprzez zmniejszenie stopnia acetylacji histonów i kondensację chromatyny zaangażowane są głównie w hamowanie transkrypcji określonych genów [12,29,41,42]. Osłabiona represja genów związanych z różnicowaniem komórkowym wydaje się związana z występowaniem wielu nowotworów, szczególnie ostrych białaczek [35].

Główną rolę w powstawaniu ostrej białaczki promielocytarnej przypisuje się obecnie translokacji chromosomalnej genu receptora kwasu retinowego (retinoid acid receptor α – RAR α) i jego fuzji z genami *PML* (promyelocytic leukemia protein), *PLZF* (promyelocytic zinc finger protein), *NPM* (nucleophosmin), *NuMA* (nuclear mitotic apparatus), co jest związane z hamowaniem dalszego różnicowania promielocytu. Onkogenne białka – produkty połączonych genów (RAR-PML, RAR-PLZF) wiążą się z HDAC za pomocą swoistych białek jądrowych NCoR (nuclear-receptor-corepressor) i SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors). W konsekwencji HDAC utrzymują skondensowaną postać chromatyny i hamują ekspresję genów, niezbędnych do różnicowania się promielocytu. Białaczki ze stwierdzoną fuzją genów *RAR-PLZF* są odporne na leczenie kwasem retinowym, który ma zdolność indukcji różnicowania promielocytów w granulocyty. Oporność ta jednak znika, gdy dodatkowo zastosowane zostaną inhibitory deacetylaz histonów (HDI) [42,43,50]. W 12–15% przypadków ostrych białaczek szpikowych (acute myeloid leukemia – AML) dochodzi do połączenia

genu *AML1* z genem *ETO* (eight-twenty-one translocation). Powstający produkt łączy się z kompleksem NCoR/HDAC1, stając się represorem (czynnikiem hamującym) transkrypcji genów zależnych od AML1, niezbędnych do prawidłowej hematopoezy [64]. Podobnie, powstanie kompleksu BCL6/SMRT/HDAC wydaje się wiązać z patogenezą niektórych typów chłoniaków (non-Hodgkin lymphoma) [14]. Niedawne doniesienia wskazują, że obniżenie ekspresji genów HDAC klasy II w raku płuca jest związane ze złym rokowaniem [49]. Wskazuje to na istotną rolę HDAC w patogenezie nowotworów.

INHIBITORY DEACETYLAZ HISTONÓW – MECHANIZM DZIAŁANIA

W ostatnich kilku latach scharakteryzowano wiele substancji hamujących aktywność deacetylaz histonów (histone deacetylase inhibitors – HDI), które mogą być użyte jako potencjalne cytostatyki. Nie ma jednocześnie dowodów na swoistość działania poszczególnych inhibitorów na określone typy HDAC [41]. Zwiększona acetylacja histonów pod wpływem stosowania inhibitorów HDAC jest obserwowana zarówno w komórkach prawidłowych, jak i nowotworowych [8,9,53]. Wydaje się jednak, że działanie antyproliferacyjne i proapoptotyczne inhibitorów HDAC dotyczy przede wszystkim komórek nowotworowych, ponieważ akumulacja acetylowanych histonów w prawidłowych komórkach nie hamowała ich wzrostu w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* [6,41,53].

HDI tworzą heterogenną, strukturalnie zróżnicowaną, stale powiększającą się grupę związków. Zależnie od budowy chemicznej wyróżniono kilka klas HDI [25,42] (tab. 1):

- krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe,
- kwasy hydroksyaminowe,
- cykliczne tetrapeptydy zawierające resztę epoksyketonu,
- cykliczne tetrapeptydy niezawierające reszty epoksyketonu,
- benzoamidy,
- epoksydy.

Najwcześniej zidentyfikowanym inhibitorem deacetylaz histonów był kwas masłowy [4], a jego pochodna – kwas fenylomasłowy został jako pierwszy HDI zastosowany eksperymentalnie w terapii ostrej białaczki promielocytarnej [65]. Wykazano jednak, że kwas masłowy oprócz hamowania aktywności HDAC, wywiera również inne działania – wpływa na metylację DNA oraz fosforylację i metylację białek [2]. Inhibitory z innych klas działają bardziej swoiście, były izolowane z drobnoustrojów (depsipeptide, apicidin), bądź powstały w wyniku syntezy chemicznej [25,35,42].

Inhibitory deacetylaz histonów wiążą się z HDAC, hamują ich aktywność, a przez to powodują zwiększoną acetylację histonów, co w konsekwencji może hamować proliferację, indukować różnicowanie lub apoptozę komórek nowotworowych [11,42]. Wykazano, że HDI wywierają antyproliferacyjne działanie na wiele linii komórek nowotworowych *in vitro*: raka piersi, jajnika, płuc, prostaty, jelita grubego, choć działanie to może przybierać różny kierunek w zależności od rodzaju komórek nowotworowych. SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) indukuje końcowe różnicowanie komórek linii raka pęcherza moczowego T24 oraz linii raka piersi MCF7, a także powoduje apoptozę komór-

Tabela 1. Najczęściej używane inhibitory deacetylaz histonów (HDI), zakresy efektywnych stężeń terapeutycznych – rząd wielkości (nM, μ M, mM) – osiągniętych w surowicy, zastosowanie w badaniach klinicznych.

Rodzaje HDI	Zakres stężeń terapeutycznych w surowicy krwi	Badania kliniczne
Krótko łańcuchowe kwasy tłuszczowe		
kwas masłowy i fenylomasłowy	mM	tak
kwas walproinowy	mM	tak
Kwasy hydroksyaminowe		
TSA (trichostatin A)	nM	nie
SAHA i jego pochodne	μ M	tak
Oxamflatin	μ M	nie
CBHA	μ M	nie
Scriptaid	μ M	nie
Pyroxamide	μ M	tak
Cykliczne czteropeptydy zawierające epoksyketon		
Trapoxin	nM	nie
Chlamydocin	nM	nie
Diheteropeptin	μ M	nie
Cykliczne czteropeptydy nie zawierające epoksyketonu		
Depsipeptide (FK228/FR901228)	μ M	tak
Apicidin	nM	nie
CHAPs	nM	nie
Benzamidy		
MS275 (MS-27-275)	μ M	tak
CI-994	μ M	tak
Epoksydy – Depudicin	μ M	nie

rek szpiczaka mnogiego linii ARP1, raka prostaty LCNAP czy białaczkowych komórek U937 [42]. Wydaje się, że HDI działają wybiórczo na aktywację genów zaangażowanych w pobudzanie różnicowania, bądź hamowania proliferacji komórek nowotworowych. Stwierdzono, że jedynie około 2% genów komórek nowotworowych wykazuje zmiany w ekspresji po zastosowaniu HDI w stosunku do komórek kontrolnych [35,42]. Komórki prawidłowe okazały się też mało wrażliwe na działanie HDI. Może to też tłumaczyć, dlaczego HDI wykazują swoje działanie głównie w stosunku do komórek nowotworowych i są stosunkowo mało toksyczne w badaniach *in vivo* [35]. Wykryto wiele genów, których ekspresja znacząco się zmienia po zastosowaniu HDI [20,26,27,29,31,33,35,37,40,41,51,54,58,69].

Wykazano, że inhibitory HDAC indukując hiperacetylację histonów, reaktywują geny supresorowe, a przez to hamują rozwój nowotworu. Prawie wszystkie poznane dotąd HDI (z wyjątkiem kwasu walproinowego) aktywują transkrypcję genu *CDKN1A*, kodującego białko p21^{WAF1}, inhibitora CDK2 – kinazy zależnej od cyklin, jednego z podstawowych enzymów w przebiegu cyklu komórkowego. Jednocześnie większość HDI hamuje ekspresję poszczególnych cyklin – D1, A, E, co tłumaczy hamowanie przebiegu cyklu komórkowego w fazie G1 oraz G2/M po zastosowa-

niu HDI w komórkach nowotworowych [26,29,40,41,54,58]. Niektóre typy komórek nowotworowych, zdolne do ukończenia fazy G1 i replikacji DNA po zastosowaniu HDI, gromadzą DNA i acetylowane histony, co prowadzi do apoptozy. Pewną funkcję w indukcji apoptozy przez HDI może pełnić produkt genu *p53*, którego zwiększoną ekspresję obserwowano po zastosowaniu SAHA i TSA (trichostatin A), choć obserwowano również apoptozę indukowaną przez HDI w komórkach ze zmutowanym genem *p53* [25,35]. Wydaje się, że mechanizm apoptozy wywołanej przez poszczególne HDI jest swoisty dla różnych typów komórek nowotworowych, co może być związane z odmienną ekspresją genów pro- i anty-apoptotycznych w poszczególnych nowotworach. Wykazano, że niektóre HDI (apicidin i M-carboxy-cinnamic amid bishydroxamide – CBHA) zwiększają ekspresję receptora Fas/CD95 oraz jego ligandu w komórkach nerwiaka blastycznego [20], mięsaka kości [27] i ostrej białaczki promielocytarnej [37], czego nie obserwowano jednak w innych nowotworach [25]. Zwiększoną ekspresję receptora Trail/DR5 pod wpływem SAHA, TSA i pochodnych kwasu masłowego stwierdzono w wielu nowotworowych liniach komórkowych: białaczkowych HL60, K562, U937, Jurkat, raka jelita grubego SW460 oraz raka piersi MCF7 [46]. Należący do rodziny TNF (tumor necrosis factor) receptor Trail/DR5 występuje głównie w komórkach nowotworowych [3,52]. HDI powodowały – zależny od czasu i dawki – wzrost ekspresji DR5, a także wzrost aktywności promotora genu DR5. Jednocześnie TSA nie indukował ekspresji DR5 w komórkach prawidłowych [46].

Aktywacja receptorów Fas/CD95 oraz Trail/DR5 uruchamia szlak apoptozy prowadzący do aktywacji kaspazy 8 i 3, a w konsekwencji do proteolizy wielu białek i śmierci komórki nowotworowej [3]. Aktywacja kaspazy 9 przez TSA i SAHA jest związana z tzw. mitochondrialnym szlakiem apoptozy i jest konsekwencją zmian w ekspresji i aktywacji białek z rodziny Bcl2, zwiększenia ekspresji białek pro-apoptotycznych: Bax, Bak i Bad oraz zmniejszenia ekspresji białek antyapoptotycznych Bcl2 oraz Bcl-xl [25,29,31,51]. Tego typu zmiany wykazano w liniach raka żołądka, jelita grubego, raka wątroby, szpiczaku mnogim i przewlekłej białaczce limfocytarnej. Obserwowaną w niektórych liniach komórek nowotworowych znacznie zwiększoną ekspresję białka Bcl2 wiązano natomiast z opornością na podawane inhibitory deacetylaz histonów [25].

Dość swoisty mechanizm działania SAHA i MS-275 zaobserwowano w liniach białaczek. SAHA indukował niezależną od aktywacji kaspaz apoptozę poprzez proteolizę i aktywację białka BID, uszkodzenie błony mitochondrium i zwiększoną syntezę wolnych rodników tlenu. Podanie antyoksydantów powodowało natomiast zmniejszenie wytwarzania wolnych rodników i hamowanie apoptozy [38,56].

Pojawiły się również doniesienia sugerujące możliwość hamowania angiogenezy przez HDI. TSA redukował indukowaną niedotlenieniem ekspresję VEGF (vascular endothelial growth factor – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego) zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo* [33]. Kwas walproinowy wydatnie zmniejszał ekspresję mRNA i białka VEGF w linii raka jelita grubego Caco2 w badaniach *in vitro* [69]. Podobne działanie wykazywał FK228 (depsipeptide) w linii raka prostaty PC3, zmniejszając dodatkowo wytwa-

rzanie innego mediatora angiogenezy – zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów – bFGF (basic fibroblast growth factor) [58]. W innych badaniach FK228 blokował proliferację, migrację oraz adhezję komórek śródbłonna, a także formowanie przez nie tzw. tuby naczyńnicowej [36].

Inhibitory HDAC wydają się indukować różnicowanie lub apoptozę w różnego typu komórkach nowotworowych, co w połączeniu z indukowaniem ekspresji „wyciszonych” genów supresorowych może być potencjalnym celem chemioterapii [11].

INHIBITORY HDAC JAKO POTENCJALNE LEKI PRZECIWNOWOTWOROWE

Inhibitory HDAC hamują proliferację komórek nowotworowych w badaniach *in vitro*, a aktywność przeciwnowotworową niektórych z nich wykazano również w modelach zwierzęcych. Wiele z nich jest na etapie I lub II fazy badań klinicznych.

Niektóre z leków tej grupy – np. pochodne fenylomaślanu, choć wykazują potencjalne działanie przeciwnowotworowe, mają ograniczone zastosowanie w terapii ze względu na słabą biodostępność *in vivo*, szybką degradację w organizmie po dożylniej iniekcji, czy też toksyczne działanie. Leczenie za pomocą pochodnych fenylomaślanu wymaga również stosowania dużych dawek terapeutycznych (stężenia milimolarne) [29,41]. Tym niemniej obserwowano pewne sukcesy terapeutyczne. Przy stosunkowo niewielkich działaniach niepożądanych obserwowano zahamowanie postępu choroby w niektórych typach białaczek, nie uzyskując jednak całkowitej lub częściowej remisji choroby [18]. Wyjątkiem był przypadek ostrej białaczki promielocytarnej odpornej na leczenie kwasem retinowym, gdzie podawanie fenylomaślanu i kwasu retinowego spowodowało całkowitą kliniczną i cytogenetyczną remisję choroby przez okres 6 miesięcy [65].

Jednym z nowo odkrytych inhibitorów HDAC z grupy pochodnych kwasu masłowego jest stosunkowo długo już używany lek przeciwpadaczkowy – kwas walproinowy (valproic acid – VPA). VPA stosowany w dawkach terapeutycznych (podobnie jak w przypadku padaczki) powodował różnicowanie komórek raka piersi *in vitro* oraz zmniejszał wzrost guza pierwotnego i hamował powstawanie przerzutów *in vivo* [22]. Ostatnio opisano przypadek 10-letniego chłopca z bardzo złośliwym guzem mózgu typu *glioblastoma multiforme* wielkości 5 cm, który nie reagował na standardową dla tej choroby połączonej radio- i chemioterapię. Doustne podanie kwasu walproinowego we wzrastającej dawce umożliwiło uzyskanie trzykrotnie większego stężenia leku we krwi (ponad 1 mM) niż w leczeniu padaczki, powodując stopniową redukcję masy guza. Po 10 miesiącach terapii VPA zanotowano całkowitą remisję choroby w obrazie rezonansu magnetycznego. Następcza redukcja dawki VPA przyczyniła się jednak do nawrotu choroby po dalszych 16 miesiącach [66].

Wiele substancji hamujących aktywność HDAC działa terapeutycznie w wielokrotnie niższych stężeniach (mikro- lub nanomolarnych), a jednocześnie jest pozbawionych w znacznym stopniu oddziaływań toksycznych, co wykazano w eksperymentach przeprowadzonych na zwierzę-

tach [8,29,42,67]. W chemicznie indukowanym raku piersi u szczurów, SAHA powodował znaczącą redukcję masy guza, lub zmniejszał do 40% możliwość jego wystąpienia, gdy był podawany przed indukującym raka kancerogenem, nie wywołując przy tym działań niepożądanych [10]. Podobne działania SAHA obserwowano w przypadku chemicznie indukowanego raka płuca [13], czy też wszczepionego myszom raka prostaty zależnego od androgenów [8]. Obecnie SAHA jest testowany w II fazie badań klinicznych w leczeniu chłoniaków oraz nawracających lub przerzutowych nowotworów regionu głowy i szyi [25,41].

Do badań klinicznych zakwalifikowany został również inhibitor HDAC z innej grupy – depsipeptide (FR901228/FK228). Choć wykazywał wiele działań niepożądanych (wymioty, leukopenia i trombocytopenia, obniżenie stężenia wapnia, zmiany w EKG), został użyty w terapii przewlekłej białaczki limfocytarnej, ostrej białaczki szpikowej i limfoblastycznej, drobnokomórkowego raka płuca oraz niektórych typów chłoniaków [25,41,57,61]. Z innych inhibitorów HDAC, w fazie I badań klinicznych w zaawansowanych guzach litych i chłoniakach testowany jest SAHA [30] oraz MS 275, a CI-994 w terapii różnego typu białaczek [41].

Istotną cechą niektórych HDI jest możliwość zastosowania ich w nowotworach opornych na leczenie cytostatykami. Zaobserwowano, że traktowanie SAHA opornych na tamoksyfen komórek raka piersi powoduje wzrost ekspresji receptorów estrogenowych, co w konsekwencji ponownie uwrażliwia te komórki na podawany lek [28]. Podobnie, w niewrażliwych na leczenie preparatem Gleevec komórkach białaczki szpikowej ze zwiększoną ekspresją nieprawidłowej kinazy tyrozynowej Bcr/Abl, po dodatkowym zastosowaniu SAHA uzyskano korzystne działanie terapeutyczne [68]. Zaletą stosowania HDI w połączeniu z innymi cytostatykami jest zmniejszenie dawki leków podawanych razem w stosunku do dawki każdego z leków podawanych osobno [63].

Jest prawdopodobne, że HDI zmieniając ekspresję niektórych genów przyczyniają się do powstania nowego genotypu, co umożliwia skuteczne działanie cytostatyków na oporne na nie poprzednio komórki nowotworowe. Sugeruje to potencjalne zastosowanie HDI jako jednego z elementów złożonej terapii przeciwnowotworowej.

UWAGI KOŃCOWE

Inhibitory HDAC wydają się bardzo interesującą grupą nowych cytostatyków. Po zastosowaniu pochodnych kwasu masłowego oraz SAHA i depsipeptide w zwalczaniu nowotworów u ludzi, wprowadzenie do powszechnej praktyki klinicznej inhibitorów HDAC wydaje się tylko kwestią czasu. Jednak, po obiecujących wynikach badań na zwierzętach i fazach I i II badań klinicznych, wiele problemów pozostaje nadal nierozstrzygniętych.

Nie wiadomo, dlaczego HDI działają przede wszystkim na komórki nowotworowe, mimo że zwiększona acetylacja histonów obserwowana jest również w komórkach prawidłowych.

Nie do końca poznano funkcję poszczególnych HDAC oraz nie w pełni wyjaśniono selektywność i swoistość działania HDI na poszczególne typy nowotworów, co wymaga wielu

dalszych badań. Wyбіrcze działanie na ekspresję genów związanych z kancerogenezą, apoptozą, czy różnicowaniem komórek niesie także pewne niebezpieczeństwa. Reaktywacja epigenetycznie wyciszonych genów pod wpływem inhibitorów HDAC może teoretycznie prowadzić do unieśmiertnienia prawidłowych dotąd komórek i rozwoju nowego ogniska pierwotnego nowotworu o innym umiejscowieniu.

Nie do końca również określona jest toksyczność poszczególnych HDI w stosunku do komórek prawidłowych. Choć niektóre HDI – jak na przykład SAHA – nie wywierają wła-

ściwie działań niepożądanych podczas prób klinicznych, to odległe efekty ich stosowania pozostają w chwili obecnej nieznanne. Jednak obecnie używane cytostatyki powodują znacznie bardziej nasilone działania niepożądane już podczas ich stosowania.

Biorąc pod uwagę obiecujące wyniki stosowania inhibitorów deacetylaz histonów w onkologii, należy mieć nadzieję, że rosnąca z każdym rokiem lawina badań i publikacji dotyczących HDI oraz ich działania przeciwnowotworowego pozwoli w niedługiej przyszłości rozwiązać te problemy.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Allfrey V.G., Faulkner R., Mirsky A.E.: Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1964; 51: 786–794
- [2] Archer S.Y., Hodin R.A.: Histone acetylation and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1999; 9: 171–174
- [3] Ashkenazi A., Dixit V.M.: Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1999; 11: 255–260
- [4] Boffa L.C., Vidal G., Mann R.S., Allfrey V.G.: Suppression of histone deacetylation *in vivo* and *in vitro* by sodium butyrate. *J. Biol. Chem.*, 1978; 253: 3364–3366
- [5] Borrow J., Stanton V.P., Jr., Andresen J.M., Becher R., Behm F.G., Chaganti R.S., Civin C.I., Distche C., Dube I., Frischauf A.M., Horsman D., Mitelman F., Volinia S., Watsmore A.E., Housman D.E.: The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat. Genet.*, 1996; 14: 33–41
- [6] Brinkmann H., Dahler A.L., Popa C., Serewko M.M., Parsons P.G., Gabrielli B.G., Burgess A.J., Saunders N.A.: Histone hyperacetylation induced by histone deacetylase inhibitors is not sufficient to cause growth inhibition in human dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 22491–22499
- [7] Brownell J.E., Allis C.D.: Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1996; 6: 176–184
- [8] Butler L.M., Agus D.B., Scher H.I., Higgins B., Rose A., Cordon-Cardo C., Thaler H.T., Rifkind R.A., Marks P.A., Richon V.M.: Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.*, 2000; 60: 5165–5170
- [9] Butler L.M., Webb Y., Agus D.B., Higgins B., Tolentino T.R., Kutko M.C., LaQuaglia M.P., Drobniak M., Cordon-Cardo C., Scher H.I., Breslow R., Richon V.M., Rifkind R.A., Marks P.A.: Inhibition of transformed cell growth and induction of cellular differentiation by pyroxamide, an inhibitor of histone deacetylase. *Clin. Cancer Res.*, 2001; 7: 962–970
- [10] Cohen L.A., Amin S., Marks P.A., Rifkind R.A., Desai D., Richon V.M.: Chemoprevention of carcinogen-induced mammary tumorigenesis by the hybrid polar cytodifferentiation agent, suberoylanilohydroxamic acid (SAHA). *Anticancer Res.*, 1999; 19: 4999–5005
- [11] Cress W.D., Seto E.: Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J. Cell. Physiol.*, 2000; 184: 1–16
- [12] de Ruijter A.J., van Gennip A.H., Caron H.N., Kemp S., van Kuilenburg A.B.: Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.*, 2003; 370: 737–749
- [13] Desai D., Das A., Cohen L., el-Bayoumy K., Amin S.: Chemopreventive efficacy of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) against 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *Anticancer Res.*, 2003; 23: 499–503
- [14] Dhordain P., Lin R.J., Quief S., Lantoin D., Kerckaert J.P., Evans R.M., Albagli O.: The LAZ3(BCL-6) oncoprotein recruits a SMRT/mSIN3A/histone deacetylase containing complex to mediate transcriptional repression. *Nucleic Acids Res.*, 1998; 26: 4645–4651
- [15] Fenrick R., Hiebert S.W.: Role of histone deacetylases in acute leukemia. *J. Cell. Biochem., Suppl.* 1998; 30–31: 194–202
- [16] Fischle W., Kiermer V., Dequiedt F., Verdini E.: The emerging role of class II histone deacetylases. *Biochem. Cell. Biol.*, 2001; 79: 337–348
- [17] Gayther S.A., Batley S.J., Linger L., Bannister A., Thorpe K., Chin S.F., Daigo Y., Russell P., Wilson A., Sowter H.M., Delhanty J.D., Ponder B.A., Kouzarides T., Caldas C.: Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nat. Genet.*, 2000; 24: 300–303
- [18] Gilbert J., Baker S.D., Bowling M.K., Grochow L., Figg W.D., Zabelina Y., Donehower R.C., Carducci M.A.: A phase I dose escalation and bioavailability study of oral sodium phenylbutyrate in patients with refractory solid tumor malignancies. *Clin. Cancer Res.*, 2001; 7: 2292–2300
- [19] Giles R.H., Peters D.J., Breuning M.H.: Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease. *Trends Genet.*, 1998; 14: 178–183
- [20] Glick R.D., Swendeman S.L., Coffey D.C., Rifkind R.A., Marks P.A., Richon V.M., La Quaglia M.P.: Hybrid polar histone deacetylase inhibitor induces apoptosis and CD95/CD95 ligand expression in human neuroblastoma. *Cancer Res.*, 1999; 59: 4392–4399
- [21] Goodman R.H., Smolik S.: CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.*, 2000; 14: 1553–1577
- [22] Gottlicher M., Minucci S., Zhu P., Kramer O.H., Schimpf A., Giavara S., Sleeman J.P., Lo Coco F., Nervi C., Pelicci P.G., Heinzel T.: Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.*, 2001; 20: 6969–6978
- [23] Gray S.G., Ekstrom T.J.: The human histone deacetylase family. *Exp. Cell Res.*, 2001; 262: 75–83
- [24] Grozinger C.M., Schreiber S.L.: Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem. Biol.*, 2002; 9: 3–16
- [25] Henderson C., Brancolini C.: Apoptotic pathways activated by histone deacetylase inhibitors: implications for the drug-resistant phenotype. *Drug Resist. Updat.*, 2003; 6: 247–256
- [26] Hirsch C.L., Bonham K.: Histone deacetylase inhibitors regulate p21WAF1 gene expression at the post-transcriptional level in HepG2 cells. *FEBS Lett.*, 2004; 570: 37–40
- [27] Imai T., Adachi S., Nishijo K., Ohgushi M., Okada M., Yasumi T., Watanabe K., Nishikomori R., Nakayama T., Yonehara S., Toguchida J., Nakahata T.: FR901228 induces tumor regression associated with induction of Fas ligand and activation of Fas signaling in human osteosarcoma cells. *Oncogene*, 2003; 22: 9231–9242
- [28] Jang E.R., Lim S.J., Lee E.S., Jeong G., Kim T.Y., Bang Y.J., Lee J.S.: The histone deacetylase inhibitor trichostatin A sensitizes estrogen receptor alpha-negative breast cancer cells to tamoxifen. *Oncogene*, 2004; 23: 1724–1736
- [29] Johnstone R.W.: Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2002; 1: 287–299
- [30] Kelly W.K., Richon V.M., O'Connor O., Curley T., MacGregor-Curtelli B., Tong W., Klang M., Schwartz L., Richardson S., Rosa E., Drobniak M., Cordon-Cardo C., Chiao J.H., Rifkind R., Marks P.A., Scher H.: Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously. *Clin. Cancer Res.*, 2003; 9: 3578–3588
- [31] Khan S.B., Maududi T., Barton K., Ayers J., Alkan S.: Analysis of histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228), effect on multiple myeloma. *Br. J. Haematol.*, 2004; 125: 156–161
- [32] Khochbin S., Verdell A., Lemerrier C., Seignurin-Berny D.: Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2001; 11: 162–166
- [33] Kim M.S., Kwon H.J., Lee Y.M., Baek J.H., Jang J.E., Lee S.W., Moon E.J., Kim H.S., Lee S.K., Chung H.Y., Kim C.W., Kim K.W.: Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat. Med.*, 2001; 7: 437–443

- [34] Kouzarides T.: Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.*, 2000; 19: 1176–1179
- [35] Kramer O.H., Gottlicher M., Heinzel T.: Histone deacetylase as a therapeutic target. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2001; 12: 294–300
- [36] Kwon H.J., Kim M.S., Kim M.J., Nakajima H., Kim K.W.: Histone deacetylase inhibitor FK228 inhibits tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer*, 2002; 97: 290–296
- [37] Kwon S.H., Ahn S.H., Kim Y.K., Bae G.U., Yoon J.W., Hong S., Lee H.Y., Lee Y.W., Lee H.W., Han J.W.: Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis and Fas/Fas ligand expression in human acute promyelocytic leukemia cells. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 2073–2080
- [38] Lucas D.M., Davis M.E., Parthun M.R., Mone A.P., Kitada S., Cunningham K.D., Flax E.L., Wickham J., Reed J.C., Byrd J.C., Grever M.R.: The histone deacetylase inhibitor MS-275 induces caspase-dependent apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 2004; 18: 1207–1214
- [39] Luo J., Nikolaev A.Y., Imai S., Chen D., Su F., Shiloh A., Guarente L., Gu W.: Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*, 2001; 107: 137–148
- [40] Maggio S.C., Rosato R.R., Kramer L.B., Dai Y., Rahmani M., Paik D.S., Czarnik A.C., Payne S.G., Spiegel S., Grant S.: The histone deacetylase inhibitor MS-275 interacts synergistically with fludarabine to induce apoptosis in human leukemia cells. *Cancer Res.*, 2004; 64: 2590–2600
- [41] Marks P., Rifkind R.A., Richon V.M., Breslow R., Miller T., Kelly W.K.: Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat. Rev. Cancer*, 2001; 1: 194–202
- [42] Marks P.A., Richon V.M., Rifkind R.A.: Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000; 92: 1210–1216
- [43] Minucci S., Nervi C., Lo Coco F., Pelicci P.G.: Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias? *Oncogene*, 2001; 20: 3110–3115
- [44] Muraoka M., Konishi M., Kikuchi-Yanoshita R., Tanaka K., Shitara N., Chong J.M., Iwama T., Miyaki M.: p300 gene alterations in colorectal and gastric carcinomas. *Oncogene*, 1996; 12: 1565–1569
- [45] Murata T., Kurokawa R., Krones A., Tatsumi K., Ishii M., Taki T., Masuno M., Ohashi H., Yanagisawa M., Rosenfeld M.G., Glass C.K., Hayashi Y.: Defect of histone acetyltransferase activity of the nuclear transcriptional coactivator CBP in Rubinstein-Taybi syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, 2001; 10: 1071–1076
- [46] Nakata S., Yoshida T., Horinaka M., Shiraishi T., Wakada M., Sakai T.: Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells. *Oncogene*, 2004; 23: 6261–6271
- [47] Narlikar G.J., Fan H.Y., Kingston R.E.: Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, 2002; 108: 475–487
- [48] Nishimori H., Nishikawa R., Fujimaki T., Nakagomi T., Matsutani M., Huang H.J., Cavenee W.K.: Analysis of the p300/CBP-Associated Factor (PCAF) gene in astrocytic tumors. *J. Neurooncol.*, 2000; 46: 17–22
- [49] Osada H., Tatematsu Y., Saito H., Yatabe Y., Mitsudomi T., Takahashi T.: Reduced expression of class II histone deacetylase genes is associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Int. J. Cancer*, 2004; 112: 26–32
- [50] Pandolfi P.P.: Histone deacetylases and transcriptional therapy with their inhibitors. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2001; 48 Suppl. 1: S17–19
- [51] Peart M.J., Tainton K.M., Ruefli A.A., Dear A.E., Sedelies K.A., O'Reilly L.A., Waterhouse N.J., Trapani J.A., Johnstone R.W.: Novel mechanisms of apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res.*, 2003; 63: 4460–4471
- [52] Pitti R.M., Marsters S.A., Ruppert S., Donahue C.J., Moore A., Ashkenazi A.: Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 12687–12690
- [53] Richon V.M., Emiliani S., Verdin E., Webb Y., Breslow R., Rifkind R.A., Marks P.A.: A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1998; 95: 3003–3007
- [54] Rosato R.R., Almenara J.A., Yu C., Grant S.: Evidence of a functional role for p21WAF1/CIP1 down-regulation in synergistic antileukemic interactions between the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate and flavopiridol. *Mol. Pharmacol.*, 2004; 65: 571–581
- [55] Roth S.Y., Denu J.M., Allis C.D.: Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.*, 2001; 70: 81–120
- [56] Ruefli A.A., Bernhard D., Tainton K.M., Kofler R., Smyth M.J., Johnstone R.W.: Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) overcomes multidrug resistance and induces cell death in P-glycoprotein-expressing cells. *Int. J. Cancer*, 2002; 99: 292–298
- [57] Sandor V., Bakke S., Robey R.W., Kang M.H., Blagosklonny M.V., Bender J., Brooks R., Piekarz R.L., Tucker E., Figg W.D., Chan K.K., Goldspiel B., Fojo A.T., Balcerzak S.P., Bates S.E.: Phase I trial of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228, NSC 630176), in patients with refractory neoplasms. *Clin. Cancer Res.*, 2002; 8: 718–728
- [58] Sasakawa Y., Naoe Y., Noto T., Inoue T., Sasakawa T., Matsuo M., Manda T., Mutoh S.: Antitumor efficacy of FK228, a novel histone deacetylase inhibitor, depends on the effect on expression of angiogenesis factors. *Biochem. Pharmacol.*, 2003; 66: 897–906
- [59] Taunton J., Hassig C.A., Schreiber S.L.: A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*, 1996; 272: 408–411
- [60] Vaziri H., Dessain S.K., Ng Eaton E., Imai S.I., Frye R.A., Pandita T.K., Guarente L., Weinberg R.A.: hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, 2001; 107: 149–159
- [61] Vigushin D.M.: FR-901228 Fujisawa/National Cancer Institute. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2002; 3: 1396–1402
- [62] Vigushin D.M., Coombes R.C.: Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. *Anticancer Drugs*, 2002; 13: 1–13
- [63] Villar-Garea A., Esteller M.: Histone deacetylase inhibitors: Understanding a new wave of anticancer agents. *Int. J. Cancer*, 2004; 112: 171–178
- [64] Wang J., Hoshino T., Redner R.L., Kajigaya S., Liu J.M.: ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1998; 95: 10860–10865
- [65] Warrell R.P. Jr., He L.Z., Richon V., Calleja E., Pandolfi P.P.: Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998; 90: 1621–1625
- [66] Witt O., Schweigerer L., Driever P.H., Wolff J., Pekrun A.: Valproic acid treatment of glioblastoma multiforme in a child. *Pediatr. Blood Cancer*, 2004; 43: 181
- [67] Yoshida M., Kijima M., Akita M., Beppu T.: Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. *J. Biol. Chem.*, 1990; 265: 17174–17179
- [68] Yu C., Rahmani M., Almenara J., Subler M., Krystal G., Conrad D., Varticovski L., Dent P., Grant S.: Histone deacetylase inhibitors promote ST1571-mediated apoptosis in ST1571-sensitive and -resistant Bcr/Abl+ human myeloid leukemia cells. *Cancer Res.*, 2003; 63: 2118–2126
- [69] Zgouras D., Becker U., Loitsch S., Stein J.: Modulation of angiogenesis-related protein synthesis by valproic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 316: 693–697