

ROLA BIAŁEK POLYCOMB I TRITHORAX W ROZWOJU NOWOTWORÓW

THE ROLE OF POLYCOMB AND TRITHORAX PROTEINS IN CANCER PROGRESSION

Joanna Wawszczyk, Jan Pałyga

Zakład Biochemii i Genetyki, Instytut Biologii

Wydział Matematyczno-Przyrodniczy Uniwersytetu Humanistyczno-Przyrodniczego Jana Kochanowskiego w Kielcach

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. Jan Pałyga

STRESZCZENIE

Kluczową rolę w epigenetycznej kontroli różnicowania komórek i rozwoju organizmu odgrywają przeciwstawnie działające systemy regulatorowe: (i) represyjne kompleksy zawierające produkty genów Polycomb (PcG) oraz (ii) aktywatorowe kompleksy białkowe Trithorax (TrxG). Geny PcG zaangażowane są w wyciszenie i inaktywację specyficznych rejonów chromatyny. Białka Polycomb mogą remodelować strukturę chromatyny poprzez zablokowanie loci genów, natomiast geny Trithorax przeciwdziałają represji, powodując rozluźnienie chromatyny i w konsekwencji zwiększają dostęp czynników aktywatorowych. Produkty genów Polycomb i Trithorax kontrolują ekspresję genów homeotycznych (rozwojowych) u muszki owocowej *Drosophila melanogaster* i kręgowców, a także mogą, w pewnych okolicznościach, sprzyjać powstawaniu nowotworów, m.in. raka gruczołu krokowego, raka piersi, nowotworów ośrodkowego układu nerwowego i białaczek. Rozwój nowotworów może zachodzić wtedy, gdy kompleksy Polycomb (np. EZH2) podtrzymują milczenie nowotworowych genów supresorowych lub gdy kompleksy Trithorax (np. MLL, SWI/SNF bądź NuRD) podtrzymują aktywny lokalny stan chromatyny, np. w rejonie loci protoonkogenów i innych genów powiązanych z nowotworami. Białka Polycomb i Trithorax, utrzymujące pluripotencjalny stan nowotworowych komórek macierzystych, mogą w przypadku zaburzonego działania przyczyniać się do wielokierunkowego różnicowania i onkogenego rozrostu wskutek zdolności komórek potomnych do niekontrolowanej proliferacji.

Słowa kluczowe: epigenetyka, nowotwór, białka Polycomb, białka Trithorax.

SUMMARY

Oppositely acting regulatory systems are essential for the epigenetic regulation of differentiation and development: (i) repressive complexes containing products of Polycomb (PcG) genes and activator protein complexes Trithorax (TrxG). PcG genes are involved in silencing and inactivating specific domains of chromatin. PcG proteins could remodel chromatin structure rendering gene loci to be reversibly or permanently blocked, while TrxG genes counteract this repression causing chromatin relaxation and making it available for activator factors. The products of Polycomb and Trithorax genes are involved in a control of homeotic genes in *Drosophila melanogaster* and vertebrates, and collaborate with genetic mutations in the initiation and progression of prostate and breast cancer as well as leukaemia, medulloblastoma and other human neoplasms. A cancer development could be initiated when the Polycomb protein complexes (eg. EZH2) maintain silencing of tumour-suppressor genes or the Trithorax protein complexes (eg. MLL, SWI/SNF or NuRD) maintain an active local chromatin state across protooncogene and/or other tumour-related loci. When disrupted the PcG and TrxG proteins maintaining pluripotent state of cancer stem cells could promote their multilineage differentiation and oncogenic hyperplasia due to their ability for uncontrolled proliferation.

Key words: epigenetics, cancer, Polycomb proteins, Trithorax proteins.

Podział genomu na zgrupowania aktywnych i milczących genów i utrzymanie tego stanu przez kolejne podziały komórkowe stanowi podstawę procesu różnicowania komórkowego. Białka Polycomb (PcG, Polycomb group) i Trithorax (TrxG, Trithorax group), odkryte pierwotnie u *Drosophila*, a potem u kręgowców [1], należą do kluczowych regulatorowych czynników epigenetycznych odpowiedzialnych za utrzymanie stałego wzoru transkrypcji genów kontrolujących

rozwój, takich jak geny białek homeotycznych i czynników transkrypcji, białek szlaków sygnalizacyjnych oraz białek niezbędnych do utrzymania i proliferacji tkankowych komórek macierzystych [2]. Zadaniem białek PcG i TrxG jest utrzymanie stanu aktywności lub represji genów, np. Hox, ustalonego wcześniej przez wiążące się z DNA czynniki transkrypcji [1, 3]. Te regulatory epigenetyczne działają antagonistycznie, gdyż białka TrxG aktywują, a białka PcG hamują

proces transkrypcji poprzez specyficzną modyfikację ogonów histonowych rozpoznawaną następnie przez specyficzne białka efektorowe. Białka kodowane przez PcG działają jako czynniki wpływające na wyciszenie transkrypcyjnej chromatyny, natomiast produkty TrxG pozwalają utrzymać wysoki poziom ekspresji genów aktywnych w danym rejonie chromatyny [3, 4].

Białka Hox z domenami aktywacyjnymi i represyjnymi, ujawniającymi się po interakcji z odpowiednimi koregulatorami, działają poprzez specyficznym rozpoznawane sekwencje nukleotydowe w promotorach genów docelowych [5] i ustalają oś przednio-tylną i segmentację ciała na wczesnym etapie rozwoju embrionalnego. *Drosophila* zawiera pojedyncze zgrupowanie genów Hox, natomiast u człowieka oraz myszy obecne są cztery zgrupowania genów homeotycznych (HOX A-D u ludzi, Hox a-d u myszy). Ponieważ mutacje w genach Hox myszy prowadzą do powstawania charakterystycznych nieprawidłowości, należy sądzić, że mają one znaczenie kliniczne także u ludzi [6].

Białka PcG i TrxG, oprócz regulacji genów Hox, zaangażowane są w kontrolę innych procesów, takich jak regulacja cyklu komórkowego, polimeryzacja aktyny, proces starzenia komórek, inaktywacja chromosomu X, piętno genomowe i rozwój nowotworów (tabela 1) [3, 4]. Współdziałając z interferencyjnym RNA, białka PcG wpływają na formowanie heterochromatyny i w ten sposób pośredniczą w transkrypcyjnym wyciszaniu genów [2, 3].

Tabela 1. Udział białek PcG i TrxG w rozwoju nowotworów u ludzi [2, 7]

Białka:	Nowotwory:
EZH2	Nieziarniczy chłoniak komórek B Chłoniak Hodgkina Czerniak Rak pęcherza moczowego Rak piersi Rak jelita grubego Rak wątroby Rak gruczołu krokowego
SUZ12	Rak piersi Rak jelita grubego Rak wątroby
BMI-1	Nieziarniczy chłoniak komórek B Białaczki Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego z grupy glejaków Nowotwory obwodowego układu nerwowego Rak płuc
MLL	Ostra białaczka limfoblastyczna Ostra białaczka szpikowa Białaczka mieszana

Niektóre składniki kompleksów Trithorax i Polycomb posiadają aktywność metylotransferaz specyficznych dla reszt lizyny histonu H3, inne zaś wykazują zdolność rozpoznawania zmodyfikowanych

(zmetylowanych) ogonów histonowych. Na przykład metylotransferaza EZH2, składnik kompleksu PRC2, jest odpowiedzialna za metylację lizyny w pozycji 27 histonu H3 [8], podczas gdy kompleks PRC1 zawiera białka z chromodomeną, np. CBX (chromobox), wykazujące zdolność rozpoznawania H3K27me3 [9].

Poziom metylacji H3K27 podczas różnicowania komórek jest wypadkową aktywności metylacyjnej EZH2 oraz enzymu UTX, którego domena JmjC katalizuje demetylację di- oraz tri-metylowanych reszt H3K27 [10] w promotorowych rejonach genów homeotycznych [11]. Demetylaza UTX oraz JMJD3 [12] mają zdolność zmniejszania stopnia metylacji histonu H3 w promotorowych rejonach genów. Demetylacja H3K27me3 sprzyja aktywacyjnym zmianom epigenetycznym, takim jak trimetylacja lizyny 4 histonu H3 (H3K4me3) [10] i acetylacja histonów [13]. Białka UTX i JMJD3 łączą się z kompleksem MLL (mixed lineage leukemia), przejawiającym aktywność metylotransferazy metylującej H3K4. To oznacza, że usuwanie epigenetycznego znacznika nieaktywnych genów, tj. H3K27me3, bezpośrednio łączy się z formowaniem aktywnej transkrypcyjnie chromatyny [14].

Białka Polycomb zidentyfikowano po raz pierwszy u *Drosophila melanogaster* [1] jako składnik wielobiałkowych kompleksów wiążących się ze specyficznymi sekwencjami DNA o nazwie PRE/TRE (Polycomb/Tritorax response elements). Na poziomie molekularnym białka PcG są składnikami dwóch funkcjonalnie i biochemicznie odmiennych kompleksów represyjnych Polycomb (PRC, Polycomb repressive complex), o wielkości 2-5 MDa, zwanych PRC1 oraz PRC2 (tabela 2) [1, 3, 15].

Tabela 2. Białka kompleksów Polycomb [4]

PcG	<i>Drosophila melanogaster</i>	Człowiek	Mysz
Kompleks PRC1	dRING Pc Ph Psc Scm	RING1A HPC1-3 HPH1-3 BMI-1 SCML-1	RING1A M33, MPC2 MPH12 BMI-1 SCMH-1
Kompleks PRC2	E(z) Esc Su(z)12 Nurf 55	EZH2 EED SUZ12 RbAp46/48	EZH1, EZH2 EED SUZ12
Kompleks PhoRC	Sfmbt Pho	- -	- -

Genom ssaków koduje różnorodne ortologi białek PcG, odkrytych pierwotnie u *Drosophila melanogaster* [1], które mimo częściowej redundancji funkcjonalnej wykazują unikalne właściwości biochemiczne. Podobnie jak u *Drosophila* rdzeniowe komponenty PRC ssaków można zgrupować w odmienne podkompleksy różniące się funkcją [4]. Represyjny kompleks PRC1

zawiera białka Pc (Polycomb), Ph (Polyhomeotic), Psc (Posterior sex combs) oraz dRing, które u człowieka mają inne nazwy, często poprzedzone literą h (human): HPC 1-3, HPH 1-3, BMI-1 (B-lymphoma Mo-MLV insertion region 1), RING 1A (really interesting new gene 1A). Drugi represyjny kompleks, Polycomb 2 (PRC2), składa się z czterech zasadniczych białek: E(z) (Enhancer of zeste), Esc (Extra sex combs), Su(z)12 (Suppressor of zeste 12) i Nurf-55 (nucleosome remodeling factor 55 kDa). U człowieka kompleks PRC2 składa się z białek EZH2 (Enhancer of Zeste homologue 2), EED (embryonic ectoderm development), SUZ12, RbAp46/48 (retinoblastoma-associated protein 46/48a) (tabela 2).

Białka SUZ12 i EED wpływają na stabilność całego kompleksu PRC2 oraz aktywność metylotransferazy EZH2 z katalityczną domeną SET przeprowadzającą represyjną metylację H3K27me₃, dzięki czemu kompleks PRC potrafi hamować proces transkrypcji. Kompleks PRC1 zawiera białko RING z aktywnością ligazy ubikwitynowej E3, której celem jest lizyna 119 histonu H2A [16]. Modyfikacja H2AK119ub związana jest z wyciszeniem lokalnych genów. Kompleks PRC2 *in vitro*, oprócz aktywności metylotransferazowej w stosunku do H3K27, wykazuje także dodatkową aktywność metylotransferazową wobec lizyny 26-łącznikowego histonu H1 [17]. Zmetylowany H1K26 poprzez oddziaływanie z białkiem heterochromatynowym HP1 [18] może wpływać na tworzenie struktur wyższego rzędu chromatyny. Ostatnio zidentyfikowano obecność trzeciego kompleksu zaangażowanego w wyciszenie genów homeotycznych, mianowicie PhoRC (pleiohomeotic (PHO) repressive complex) [2], który zawiera białko z domeną MBT (malignant brain tumor) o nazwie SFMBT (Scm (Sex combs on midleg)-related gene containing four MBT domains) [19], wiążące się specyficznie z mono- oraz dimetylowanymi resztami H3K9 i H4K20 [4].

Różnorodność kompleksów PRC jest wynikiem obecności dodatkowych białek, np. TAF (TBP (TATA box-binding)-associated factor) czy enzymów z rodziny HDAC (histone deacetylase). Kompleksy te podlegają regulacji podczas rozwoju i często są heterogeniczne, gdyż niektóre białka mogą występować w postaci licznych izoform. Na przykład EZH2 może oddziaływać z jedną spośród przynajmniej czterech izoform Eed. Największa izoforma, Eed1, zaangażowana jest w tworzenie kompleksu PRC2, podczas gdy dwie mniejsze izoformy Eed3 i Eed4 związane są z kompleksem PRC3. Obecność Eed2 stwierdzono w nieodróżnionych embrionalnych komórkach macierzystych (ES, embryonal stem cell), jak również w komórkach nowotworowych jako część kompleksu PRC4. Akumulacja PRC4 [17] związana jest z nadekspresją EZH2 podczas ostatniego stadium rozwoju raka prostaty [20].

Specyficzność metylacyjna EZH2 wobec H3K27 czy H1K26 zależy od tego, która izoforma Eed oddziałuje z tym enzymem. Metylacja H3K27, jak odbywa się za pośrednictwem PRC3, podczas gdy metylacja zarówno H3K27 i H1K26 jest możliwa w obecności PRC2. Tak więc, skład kompleksów PRC i specyficzność wobec substratu histonowego oraz interakcja z chromatyną mogą być odmienne w różnych typach komórek i różnych fazach cyklu komórkowego [3].

Białka Polycomb wpływają na pluripotencjalność komórek macierzystych poprzez utrzymywanie stanu represji genów niezbędnych do różnicowania w rozmaite typy tkanek [2]. Oprócz represji nowotworowych genów supresorowych, białka PcG mogą wpływać na rozwój nowotworu poprzez ustanowienie nieprawidłowego stanu transkrypcyjnego genów kontrolujących podziały i wzrost komórki, przypominającego komórki macierzyste. Hipoteza „nowotworowych komórek macierzystych” [2, 8] zakłada, że komórki o cechach komórek macierzystych stanowią główną przyczynę rozwoju i nawrotu nowotworów. Koncepcja ta racjonalnie uzasadnia zdolność komórek nowotworowych do proliferacji, przypominającej samoodnawianie komórek macierzystych. Rakowe komórki macierzyste mogą pełnić istotną funkcję w rozwoju nowotworu, ponieważ ich długi okres życia pozwala na akumulację mutacji i innych zmian genetycznych i/lub zmian epigenetycznych niezbędnych do powstania i wieloetapowej ewolucji nowotworów złośliwych. Obecnie nie jest jasne, czy nowotworowe komórki macierzyste pochodzą z somatycznych (tkankowych) komórek macierzystych lub ich komórek potomnych skierowanych na patologiczny tor różnicowania, czy też pojawiają się wskutek odróżnicowania terminalnie zróżnicowanych komórek, które powtórnie nabywają pewne cechy komórek macierzystych, takie jak zdolność do samoodnawiania i wielokierunkowego różnicowania [2, 8]. Stąd potencjał transformacyjny białek PcG może być częściowo związany z ich zdolnością do utrzymywania stanu macierzystości komórki. Prawidłowe somatyczne komórki macierzyste tworzą prawidłowe tkanki, a nowotworowe komórki macierzyste wytwarzają nieprawidłowe tkanki nowotworowe [21].

Funkcjonalna charakterystyka białka Bmi-1 myszy [2], które jest ortologiem białka Psc *Drosophila melanogaster*, ujawnia związek pomiędzy rodziną genów Polycomb a rozwojem nowotworu. Bmi-1 jest protoonkogenem [21, 22], którego nadekspresja [3, 23] oraz współdziałanie z protoonkogenem c-Myc [24] przyczynia się do rozwoju chłoniaków z komórek B oraz T [2]. Delecja białka Bmi-1 u myszy prowadzi do powstawania defektów szkieletu osiowego, zaburzenia hematopoezy i funkcji neurologicznych, jak również stopniowego zahamowania wzrostu postnatalnego. Myszy pozbawione białka Bmi-1 dożywają wieku dojrzałego,

ostatecznie jednak giną w wyniku powstałych zmian neurologicznych i hematopoetycznych [21]. Bmi-1 ma wpływ na proliferację limfocytów oraz ogólny wzrost myszy poprzez bezpośrednie lub pośrednie hamowanie ekspresji locus INK4a/ARF (CDKN2A, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), kodującego dwa strukturalnie odmienne białka supresorowe nowotworów, p16^{INK4a} i p19^{ARF} [2, 21, 22]. Białko INK4a (inhibitor of cyclin-dependent kinase 4A) jest inhibitorem kinaz CDK4 i CDK6 zależnych od cykliny D, które aktywują szlak pRb [25], natomiast ARF (alternating reading framer) stabilizuje p53, zapobiegając degradacji p53, poprzez wiązanie się z jego negatywnym regulatorem MDM2 [2], przejawiającym aktywność ligazy ubikwitynowej E3 [26], w następstwie czego dochodzi do zatrzymania cyklu komórkowego i apoptozy [24, 26]. Nieobecność Bmi-1 prowadzi do ekspresji p16^{INK4a} i hipofosforylacji pRb, zatrzymania cyklu komórkowego oraz starzenia komórki lub apoptozy. Natomiast w obecności Bmi-1, który jest negatywnym regulatorem locus INK4a/ARF [27], zmniejsza się ekspresję p16^{INK4a} prowadzącą do hiperfosforylacji pRb i przebiegu cyklu komórkowego [28]. Te dwa białka odgrywają istotną rolę w rozwoju raka, gdyż locus INK4a/ARF często ulega różnym zmianom, takim jak, mutacje, delecje oraz zmiany epigenetyczne w różnych nowotworach [2]. Onkogeny potencjał Bmi-1 i innych białek Polycomb przejawia się m.in. represją locus INK4a/ARF (CDKN2A) [2] i proliferacją komórek.

Aktywacja ekspresji genu telomerazy człowieka (hTERT, human telomerase reverse transcriptase) przez białko Bmi-1 wpływa na replikacyjną długość życia oraz nieśmiertelność komórek epitelialnych gruczołu młecznego [29], co sugeruje, że aktywacja telomerazy wskutek nadekspresji Bmi-1 może mieć znaczenie w rozwoju raka piersi. Okazało się [21], że białko Bmi-1 reguluje samoodnawianie zarówno krwiotwórczych jak również białaczkowych komórek macierzystych. Stwierdzono, że krwiotwórcze komórki macierzyste są obecne w prawidłowej ilości w embrionalnej wątrobie znokautowanej myszy o genotypie Bmi-1⁺, lecz ich liczba spada w szpiku kostnym w okresie postnatalnym. Zatem, krwiotwórcze komórki macierzyste osobników Bmi-1⁺ mają ograniczoną zdolność samoodnawiania. Myszy Bmi-1⁺ giną, ponieważ ich somatyczne krwiotwórcze komórki macierzyste o niedostatecznej zdolności samoodnawiania nie zapewniają przetrwania aż do okresu dojrzałości.

Proliferacja białaczkowych komórek macierzystych w mysim modelu AML (acute myeloid leukemia) jest również regulowana za pośrednictwem Bmi-1 [2]. Po transplantacji do napromieniowanych myszy, normalne komórki białaczkowe ekspresjonujące Bmi-1 są zdolne do indukowania białaczki, natomiast białaczkowe komórki Bmi-1⁺ mają zredukowaną zdolność do

prolifracji i nie są zdolne do indukowania białaczki. A zatem, ekspresja białka Bmi-1 jest konieczna dla procesu samoodnawiania zarówno krwiotwórczych, jak i białaczkowych komórek macierzystych [21].

Oprócz Bmi-1, kompleks PRC1 zawiera homologiczne białko Mel-18. Białka te wykazują 65% podobieństwo sekwencji aminokwasowych i zawierają domenę palca RING w części N-terminalnej, jak również sekwencje bogate w prolinę oraz domenę helisa-skręt-helisa i domenę NLS (nuclear localization signal) w C-terminalnym ogonie [22, 30]. Myszy o genotypach Bmi-1⁺ oraz Mel-18⁺ wykazują podobne cechy fenotypowe, takie jak ciężki niedobór odporności, zahamowanie wzrostu i deformacje szkieletu, natomiast podwójnie nulizygotyczne mutanty Bmi-1/Mel-18 giną już w łonie matki [30]. Przy wykorzystaniu techniki TAP (tandem affinity purification) wyizolowano odpowiednie kompleksy białek Bmi-1 i Mel-18 z ludzkich komórek nowotworowych. Z zastosowaniem techniki Western blotting wykazano [30], że nadekspresja tych białek w fibroblastach Rat1 powoduje stymulację wzrostu (powstaje większa liczba kolonii, w porównaniu do komórek bez ekspresji wektora), natomiast zniesienie ekspresji Bmi-1 i Mel-18 za pośrednictwem antysensowego shRNA (short hairpin RNA) skutkuje istotnym zahamowaniem ich wzrostu i zdolności przeżycia *in vitro*. Białko Mel-18 zmniejsza transkrypcję Bmi-1, skraca replikacyjną długość życia komórek i przyspiesza ich starzenie [22]. Nadekspresję białka Bmi-1 zaobserwowano w komórkach guzów nabłonniaka rdzeniowego (medulloblastoma), rakach płuc i piersi, natomiast amplifikację genu Bmi-1 zidentyfikowano w podgrupie chłoniaków z komórek B człowieka [3, 30]. Ponadto ekspresja Bmi-1 stanowi silny czynnik prognozujący możliwość przerzutów nowotworów i niepomyślne rokowanie u ludzi [31].

Bmi-1 jest białkiem Polycomb silnie skorelowanym z rozwojem choroby nowotworowej, niemniej jednak inne białka PcG są również związane z procesem onkogenezy [2]. Na przykład stwierdzono, że SUZ12 – białko kompleksu PRC2 – ulega nadekspresji w liniach komórek nowotworowych jelita grubego i piersi [2, 32]. Ponadto transkrypcja genu EZH2, którego produkt jest składnikiem kompleksu PRC2, jest wzmocniona w nowotworach człowieka, w tym w raku prostaty [33]. Nadekspresja EZH2, dzięki zwiększonej transkrypcji bądź amplifikacji genu [34], występuje m.in. w nowotworach piersi, gruczołu krokowego oraz różnych odmianach chłoniaków [2, 3]. Proliferacja komórek zależna jest od domeny SET białka enzymatycznego EZH2, stąd obniżenie poziomu EZH2 za pomocą techniki RNAi prowadzi do zahamowania wzrostu komórkowego oraz zatrzymania podziału komórki w fazie G2/M [34]. Kombinacja wzmocnionej ekspresji EZH2 z niskim poziomem E-kadheryny

jest dobrym markerem rozwoju nowotworu gruczołu krokowego [34].

Przy zastosowaniu techniki mikromacierzy DNA przeanalizowano [33] ekstrakty tkankowe (n=1023) w celu określenia stopnia ekspresji EZH2 *in situ*. Wśród tych próbek 400 pochodziło od 23 osób, które zmarły w wyniku opornego na hormony nowotworu gruczołu krokowego. Obserwowano wzrost poziomu ekspresji EZH2, w kierunku od niezłośliwych do złośliwych form raka prostaty (wskaźniki w granicach 1,5 do 2,6). Najsilniejszą ekspresję (o wskaźniku 3,1) stwierdzono w przerzutach nowotworu. Te obserwacje sugerują, że istnieje korelacja pomiędzy rozwojem nowotworu gruczołu krokowego i wzrostem poziomu ekspresji EZH2. Ponadto poziom EZH2 może wskazywać na agresywny charakter raka prostaty [33] i innych nowotworów [35].

Poziom ekspresji Bmi-1 i EZH2 analizowano także w rozmaitych chłoniakach niezmierniczych pochodzących z komórek B (B-NHL, B-cell non-Hodgkin lymphoma), takich jak chłoniaki limfocytowe, grudkowe, Burkitta i inne [36]. Nowotworowe komórki B-NHL o średnim i wysokim stopniu złośliwości wykazywały silną koekspresję Bmi-1 i EZH2, skorelowaną z ekspresją markera proliferacji. Nowotworowe komórki B-NHL o niskim stopniu złośliwości miały fenotyp Bmi-1^{low}/EZH2⁺ lub Bmi-1^{low}/EZH2⁻. Te obserwacje pokazują, że średni i wysoki stopień złośliwości B-NHL jest związany ze wzrostem poziomu ekspresji Bmi-1 i EZH2. O ile w prawidłowych komórkach ekspresja Bmi-1 jest wyłączona, dzielące się komórki nowotworowe prawdopodobnie nie są zdolne do zmniejszenia transkrypcji Bmi-1. Nieprawidłowa ekspresja PcG jest istotnym czynnikiem w rozwoju chłoniaków u ludzi [36].

Białka z grupy Polycomb pełnią w chromatynie funkcję represorów transkrypcyjnych, a rola aktywatorów przypada kompleksom białek z grupy Trithorax [37]. Białka TrxG, podobnie jak białka PcG, posiadają zdolność utrzymywania stanu ekspresyjnego genów wyznaczonego przez specyficzne czynniki transkrypcji działające przez krótki okres podczas wczesnego rozwoju. Geny TrxG mogą przeciwstawiać się represyjnej aktywności genów PcG. Mutacje TrxG prowadzą do ektopowej represji genów Hox [37]. Prototypowy gen z tej grupy, Trx, zidentyfikowano dzięki naturalnej mutacji u muszki owocowej powodującej utratę funkcji genów homeotycznych, która przejawiała się transformacją przemieszczeniem w częściowo wykształcone skrzydła, transformacją pierwszej pary nóg w nogi drugiej pary i pojawieniem się jasnego zabarwienia na piątym segmencie odwłokowym [38, 39]. Analizy molekularne i biochemiczne wykazały, że białka TrxG, podobnie jak białka PcG, są zdolne do tworzenia złożonych kompleksów białkowych. W ostatnich latach

zidentyfikowano u *Drosophila* sześć kompleksów zawierających białka z grupy TrxG: BRM, ASH1, ASH2, TAC1, NURF i ACF [37]. Główne składniki tych kompleksów, z wyjątkiem ACF (ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor), który zawiera tylko dwa komponenty, białko Acf1 i ATPazę ISWI (imitation of Swi) [40], przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Białka kompleksu Trithorax [4]

TrxG	<i>Drosophila melanogaster</i>	Człowiek
SWI/SNF	Brm Osa Moir Snr1	BRM BAF250 BAF170 BAF47
NURF	Iswi Nurf-38 Nurf-301 Nurf-55	SNF2L - BPTF RbAp46/48
TAC1	Trx dCBP Sbfl	
Ash1	Ash1 dCBP	
MLL1-3		MLL1-3 ASH2L WDR5 CFP1

Dobrze znany kompleks SWI/SNF (switch/sucrose non-fermenting), zwany kompleksem BRM u *Drosophila*, o wielkości ok. 2 MDa, zawiera białka BRM (Brahma), MOR (Moir), Osa i SNR1 (Snf5-related 1) (tabela 3). BRM jest homologiem drożdżowego białka SWI2/SNF2, które jest ATPazą wykorzystującą energię hydrolizy ATP do przebudowy chromatyny poprzez zmianę rozmieszczenia nukleosomów lub zmianę ich struktury. Kompleks NURF (nucleosome remodeling factor), składający się z ATPazy ISWI i białek Nurf, jest kompleksem remodelującym, zmieniającym lokalną strukturę chromatynę i jej aktywność transkrypcyjną poprzez przemieszczanie położenia nukleosomów.

Odkrycie, że mutacje ash1 wzmagają fenotyp mutantów brm, sugeruje, że białko ASH1 (absent, small or homeotic 1) może być składnikiem kompleksu BRM [37]. W rzeczywistości ASH1, białko z domeną SET, stanowi składnik kompleksu o wielkości 2 MDa z aktywnością histonowej metylotransferazy metylującej H3K4 [15] oraz H3K36 [41]. Dodatkowo ASH1 zarówno genetycznie, jak i fizycznie oddziałuje z histonową acetylotransferazą CBP (CREB binding protein), która jest odpowiedzialna za tworzenia aktywnych miejsc w chromatynie [37]. Ponadto ASH1 zidentyfikowano jako czynnik modyfikujący aktywność protoonkogenu c-Myc [42].

TRX, inne białko zawierające domenę SET, zdolne do metylacji H3K4 [15], jest składnikiem czwartego

kompleksu o wielkości 1 MDa, zwanego TAC1 (Trithorax acetyltransferase complex 1), który zawiera białka TRX, dCBP i Sbf1 (SET binding factor 1) [37, 43]. Ponieważ CBP jest składnikiem kompleksu ASH1 i TAC1, można przypuszczać, że oba kompleksy mają zdolność do acetylacji histonów przez CBP oraz metylacji H3K4 przez TRX lub ASH1. Ponieważ TRX dodaje co najwyżej dwie grupy metylowe do H3K4 *in vitro*, ASH1 może okazać się niezbędny do dodawania trzeciej grupy metylowej do H3K4me2 z utworzeniem H3K4me3 [15].

Piąty kompleks, MLL (mixed-lineage leukemia) o wielkości ok. 1 MDa, który zawiera między innymi białka MLL1-3 oraz ASH2L [4, 44], spokrewniony jest z drożdżowym kompleksem COMPASS, zawierającym białko SET1 wiążące się z polimerazą RNA II podczas procesu elongacji transkrypcji. ASH2L jest niezbędny do przemiany dimetylowanej lizyny K4 histonu H3 w postać trimetylowaną [15]. MLL jest protoonkogenem kręgowców spokrewnionym z TRX *Drosophila melanogaster*. Białko MLL, które jest histonową metylotransferazą katalizującą metylację lizyny K4 histonu H3, podtrzymuje ekspresję genów Hox [44]. Multidomenowe białko MLL z wysoce konserwatywną domeną SET zlokalizowaną w C-terminalnej części cząsteczki ulega ekspresji w komórkach hematopoetycznych [7]. Osobniki myszy, którym usunięto domenę SET na drodze homologicznej rekombinacji w komórkach ES, przejawiały defekty rozwoju szkieletu oraz zmieniony wzór transkrypcji poszczególnych genów Hox podczas rozwoju [45]. Immunoprecypitacja chromatyny wykazała, że te zmiany w ekspresji genów są związane z dramatyczną redukcją monometylacji H3K4 oraz zmienionym wzorem metylacji DNA w loci genów Hox, które składają się na nieprawidłowy stan chromatyny.

MLL jest genem zlokalizowanym na chromosomie 11q23, który często podlega translokacji w ostrych typach białaczek u ludzi, takich jak ostra białaczka limfoblastyczna (ALL, acute lymphoblastic leukemia), ostra białaczka szpikowa (AML, acute myeloid leukemia) czy też białaczka mieszana (MLL, mixed lineage leukemia) [7]. Translokacje MLL występują często w białaczkach niemowląt (ponad 70%), rzadziej u starszych dzieci, a bardzo rzadko u osób dorosłych (10%) dotkniętych białaczką AML lub białaczką będącą skutkiem terapii innych nowotworów złośliwych inhibitorami topoizomerazy II. Białka fuzyjne powstają wskutek translokacji MLL do rozmaitych genów, najczęściej do genów kodujących białka jądrowe, które wiążą się z DNA, takich jak AF4, AF9, AF10 i ENL, które są zlokalizowane, odpowiednio, na chromosomach 4, 9, 10 i 19 [7]. Białka fuzyjne zachowują N-terminalną część MLL z charakterystycznymi motywami ATH (AT-hook), dzięki którym mogą wiązać się z DNA oraz z domenami represyjnymi rekrutującymi białka

HPC2 i BMI-1 z grupy PcG, transkrypcyjny korepresor CtBP (carboxy-terminus binding protein) i deacetyazy histonowe HDAC1 i HDAC2. C-terminalna część białka fuzyjnego zawiera fragment sekwencji aminokwasowej odpowiedniego partnera translokacji i dlatego takie białko pozbawione jest domeny MLL aktywującej transkrypcję, rekrutującej koaktywator CBP z aktywnością acetylazy histonowej oraz domeny SET, katalizującej aktywacyjną metylację H3K4, które stanowią integralną część prawidłowo funkcjonującego białka MLL. Fuzyjni partnerzy białka MLL wprowadzają C-terminalne domeny aktywujące transkrypcję (np. AF9 i ENL) albo są czynnikami transkrypcji (np. AFX i FKHL1), które rekrutują koaktywator CBP, lub jak np. AF10 mają zdolność przebudowy chromatyny poprzez oddziaływanie z aktywującą transkrypcję metylotransferazą histonową DOT1L (DOT1 (disruptor of telomeric silencing 1)-like), która metyluje lizynę 79 histonu H3 (H3K79). Fuzyjne białka MLL przejawiają nieprawidłowe działanie i aktywują program ekspresji genów prowadzący do leukemogenezy, reaktywują zdolność samoodnawiania w różnicujących się komórkach szpiku oraz sprzyjają ich transformacji w białaczkowe komórki macierzyste [7].

Badania nad białkami Polycomb i Trithorax ułatwiają poznanie mechanizmów molekularnych operujących we wczesnych okresach rozwoju nowotworu i w perspektywie pozwolą na opracowanie prognostycznych biomarkerów nowotworowych [46] oraz nowych strategii leczenia farmakologicznego lekami wpływającymi na procesy epigenetyczne, takimi jak np. decitabina [47] i vorinostat [48, 49].

PIŚMIENNICTWO

- [1] Ringrose L, Paro R. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu Rev Genet* 2004; 38: 413-443.
- [2] Sparmann A, van Lohuizen M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 846-856.
- [3] Rajasekhar VK, Begemann M. Concise review: roles of Polycomb group proteins in development and disease: a stem cell perspective. *Stem Cells* 2007; 25: 2498-2510.
- [4] Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M i wsp. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* 2007; 128: 735-745.
- [5] Featherstone M. HOX proteins and their co-factors in transcriptional regulation. In: *Adv Dev Biol Biochem*, Elsevier 2003, vol 13: 1-42.
- [6] Passarge E. Genetyka - Ilustrowany przewodnik. Wydawnictwo PZWL, Warszawa 2004.

- [7] Krivtsov AV, Armstrong SA. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 823-833.
- [8] Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128: 683-692.
- [9] Bernstein E, Duncan EM, Masui O i wsp. Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 2560-2569.
- [10] Lee MG, Villa R, Trojer P i wsp. Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. *Science* 2007; 318: 447-450.
- [11] Agger K, Cloos PA, Christensen J i wsp. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* 2007; 449: 731-734.
- [12] Xiang Y, Zhu Z, Han G i wsp. JMJD3 is a histone H3K27 demethylase. *Cell Res* 2007; 17: 850-857.
- [13] Shukla V, Vaissiere T, Herceg Z. Histone acetylation and chromatin signature in stem cell identity and cancer. *Mutat Res* 2008; 637: 1-15.
- [14] Rivenbark AG, Strahl BD. Unlocking cell fate. *Science* 2007; 318: 403-404.
- [15] Schwartz YB, Pirrotta V. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 9-22.
- [16] Cao R, Tsukada Y, Zhang Y. Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell* 2005; 20: 845-854.
- [17] Kuzmichev A, Margueron R, Vaquero A i wsp. Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 1859-1864.
- [18] Daujat S, Zeissler U, Waldmann T i wsp. HP1 binds specifically to Lys26-methylated histone H1.4, whereas simultaneous Ser27 phosphorylation blocks HP1 binding. *J Biol Chem* 2005; 280: 38090-380905.
- [19] Klymenko T, Papp B, Fischle W i wsp. A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes Dev* 2006; 20: 1110-1122.
- [20] van Leenders GJ, Dukers D, Hessels D i wsp. Polycomb-group oncogenes EZH2, BMI1, and RING1 are overexpressed in prostate cancer with adverse pathologic and clinical features. *Eur Urol* 2007; 52: 455-463.
- [21] Pandal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 895-902.
- [22] Guo WJ, Datta S, Band V i wsp. Mel-18, a polycomb group protein, regulates cell proliferation and senescence via transcriptional repression of Bmi-1 and c-Myc oncoproteins. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 536-546.
- [23] van Galen JC, Muris JJ, Oudejans JJ i wsp. Expression of the polycomb-group gene BMI1 is related to an unfavourable prognosis in primary nodal DLBCL. *J Clin Pathol* 2007; 60: 167-172.
- [24] Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S i wsp. The oncogene and Polycomb-group gene Bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* 1999; 397: 164-168.
- [25] Bruggeman SW, van Lohuizen M. Controlling stem cell proliferation: CKIs at work. *Cell Cycle* 2006; 5: 1281-1285.
- [26] Sherr CJ. Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 663-673.
- [27] Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, van Lohuizen M. Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* 2004; 118: 409-4018.
- [28] Silva J, Garcia V, Garcia JM i wsp. Circulating Bmi-1 mRNA as a possible prognostic factor for advanced breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2007; 9: R55.
- [29] Dimri GP, Martinez JL, Jacobs JJ i wsp. The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2002; 62: 4736-4745.
- [30] Wiederschain D, Chen L, Johnson B i wsp. Contribution of polycomb homologues Bmi-1 and Mel-18 to medulloblastoma pathogenesis. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 4968-4979.
- [31] Glinsky GV, Berezovska O, Glinskii AB. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J Clin Invest* 2005; 115: 1503-1521.
- [32] Widschwendter M, Fiegl H, Egle D i wsp. Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet* 2007; 39: 157-158.
- [33] Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M i wsp. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002; 419: 624-629.
- [34] Moss TJ, Wallrath LL. Connections between epigenetic gene silencing and human disease. *Mutat Res* 2007; 618: 163-174.
- [35] Breuer RH, Snijders PJ, Smit EF i wsp. Increased expression of the EZH2 polycomb group gene in BMI-1-positive neoplastic cells during bronchial carcinogenesis. *Neoplasia* 2004; 6: 736-743.
- [36] van Kemenade FJ, Raaphorst FM, Blokzijl T i wsp. Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb-group proteins is associated with cycling cells and degree of malignancy in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2001; 97: 3896-3901.
- [37] Grimaud C, Negre N, Cavalli G. From genetics to epigenetics: the tale of Polycomb group and trithorax group genes. *Chromosome Res* 2006; 14: 363-375.

- [38] Ingham PW. *Trithorax* and the regulation of homeotic gene expression in *Drosophila*: a historical perspective. *Int J Dev Biol* 1998; 42: 423-429.
- [39] Kingston RE, Tamkun JW. Transcriptional regulation by Trithorax group proteins. In: Epigenetics, Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros M-L, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York 2007; 231-248.
- [40] Fyodorov DV, Blower MD, Karpen GH i wsp. Acf1 confers unique activities to ACF/CHRAC and promotes the formation rather than disruption of chromatin in vivo. *Genes Dev* 2004; 18: 170-183.
- [41] Tanaka Y, Katagiri Z, Kawahashi K i wsp. Trithorax-group protein ASH1 methylates histone H3 lysine 36. *Gene* 2007; 397: 161-168.
- [42] Goodliffe JM, Cole MD, Wieschaus E. Coordinated regulation of Myc trans-activation targets by Polycomb and the Trithorax group protein Ash1. *BMC Mol Biol* 2007; 8: 40.
- [43] Petruk S, Sedkov Y, Smith S i wsp. Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene. *Science* 2001; 294: 1331-1334.
- [44] Yokoyama A, Wang Z, Wysocka J i wsp. Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 5639-5649.
- [45] Terranova R, Agherbi H, Boned A i wsp. Histone and DNA methylation defects at Hox genes in mice expressing a SET domain-truncated form of Mll. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 6629-6634.
- [46] Yu J, Rhodes DR, Tomlins SA i wsp. A polycomb repression signature in metastatic prostate cancer predicts cancer outcome. *Cancer Res* 2007; 67: 10657-10663.
- [47] Issa JP. DNA methylation as a therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1634-1637.
- [48] Grant S, Easley C, Kirkpatrick P. Vorinostat. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 21-22.
- [49] Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 2007; 26: 5541-5552.

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. Jan Pałyga
Zakład Biochemii i Genetyki
Wydział Matematyczno-Przyrodniczy UJK w Kielcach
25-406 Kielce, ul. Świętokrzyska 15
e-mail: jan.palyga@pu.kielce.pl