

Význam aberantní metylace DNA pro diagnostiku a terapii nádorových onemocnění

Significance of aberrant DNA methylation for cancer diagnostics and therapy

Urban T.^{1,2}, Pokorná P.^{1,2}, Slabý O.¹⁻³

¹ Biologický ústav, LF MU Brno

² Středoevropský technologický institut, MU Brno

³ Ústav patologie, LF MU a FN Brno

Souhrn

Východiska: Epigenetika je vědní obor zabývající se změnami v genové expresi, které nejsou způsobeny alterací pořadí nukleotidů v řetězci DNA. Společně se sekvenčními změnami je tzv. epigenetické reprogramování jedním ze získaných znaků nádorové buňky, které řídí kancerogenezi. V rámci epigenetické regulace genové exprese se uplatňuje několik různorodých mechanismů, z nichž nejvíce zkoumaný je proces metylace DNA. Za fyziologických podmínek zajišťuje metylace DNA řízení tkáňově specifického umlčení exprese vybraných genů a napomáhá udržovat stabilitu genomu. V procesu maligní transformace dochází ke globální hypometylaci napříč genomem a lokus specifické hypermetylaci, zejména promotorů tumor supresorových genů. Během několika posledních desítek let se ukázalo, že aberantní metylace DNA může sloužit jako biomarker nádorových onemocnění a také jako terapeutický cíl, což podnítilo probíhající snahy o vylepšení stávajících diagnostických a terapeutických možností v onkologii. **Cíl:** Hlavním cílem této přehledové práce je představit biomarkery asociované s nádorem a specifické testy vyvinuté pro diagnostiku nádorových onemocnění, které jsou založeny na stanovení úrovně metylace DNA. Zahrnuty jsou jak rutinně používané testy, tak nově vyvinuté komerčně dostupné testy s certifikací pro *in vitro* diagnostiku. Dále jsou popsány terapeutické implikace, které aberantní metylace DNA přináší, přičemž jsou zmíněna léčiva schválená i léčiva procházející klinickým hodnocením.

Klíčová slova

methylace DNA – epigenetika – precizní medicína

Summary

Background: Epigenetics is a scientific field that covers changes in gene expression that are not caused by the alteration of the nucleotide sequence in the DNA strand. Together with sequential changes, epigenetic reprogramming is a recognized cancer hallmark driving carcinogenesis. The underlying mechanisms of epigenetically-driven gene expression changes are diverse. However, one of the most extensively studied mechanisms is a change in DNA methylation. Under physiological conditions, DNA methylation ensures tissue-specific gene silencing and helps to maintain genome stability. With malignant transformation, genomic DNA undergoes global hypomethylation as well as locus-specific hypermethylation in promoters of tumor suppressor genes. In the last few decades, specific aberrant DNA methylation changes have emerged as both cancer-associated biomarkers and therapeutic targets and prompted ongoing efforts to enhance both diagnostic and therapeutic means in oncology. **Purpose:** The main purpose of this review is to introduce both established and emerging DNA methylation-based biomarkers for cancer diagnostics with a focus on biomarkers that are either routinely used or have been developed as commercial tests with certification for their use within *in vitro* diagnostics. Furthermore, therapeutic options for targeting aberrant DNA methylation are described, including both approved compounds and newly developed agents undergoing clinical investigation.

Key words

DNA methylation – epigenetics – precision medicine

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare that they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



prof. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.
Biologický ústav, LF MU
Kamenice 5
625 00 Brno
e-mail: oslaby@med.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 1. 12. 2023

Přijato/Accepted: 13. 2. 2024

doi: 10.48095/ccko202488

Úvod

Nádorová onemocnění jsou velmi heterogenní a komplexní skupinou chorob, které se vyznačují souborem několika společných získaných charakteristik narušujících fyziologické fungování procesů, jako je buněčná proliferace či apoptóza, a poskytujících vlastnosti zcela nové, např. schopnost metastazovat [1]. V současné době je již známo, že získání těchto charakteristik je dáno nejen změnami nádorového genomu, které zahrnují široké spektrum alterací zasahující samotnou sekvenci, počet kopií či strukturní rearanže genetické informace, ale také rozsáhlou paletou tzv. epigenetických změn. Epigenetické změny lze souhrnně označit jako způsob regulace genové exprese, během kterého nedochází ke změnám v sekvenci DNA. Zahrnují modifikace DNA/RNA a histonů či působení nekódujících RNA [2].

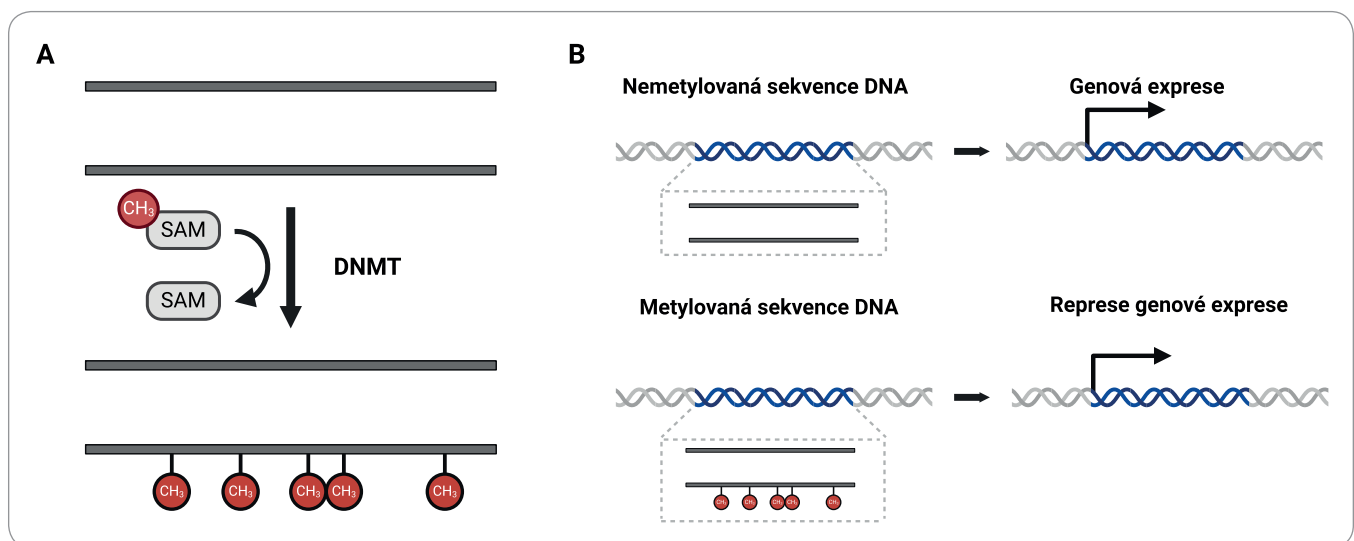
Mezi nejextenzivněji studované epigenetické změny bezesporu patří studium metylace DNA, jejíž podstatou je kovalentní vazba metylové skupiny na dusíkatou bázi cytosin. Tato modifikace se hojně uplatňuje v oblastech bohatých na CpG dinukleotidy, které se nachází zejména v promotorových oblastech protein kódujících genů, a má zásadní úlohu v řadě procesů souvisejících s vývojem organismu a v udržování stability genomu. Ve vztahu ke genové expresi má potom připojení metylové skupiny

represivní účinek (obr. 1) [3]. Při rozvoji nádorového onemocnění dochází v genomu nádorové buňky ke globální hypometylaci spojené s aktivací onkogenů a retrotranspozonů a s chromozomovou nestabilitou a k hypermetylaci CpG oblastí v promotorech tumor supresorových genů [4].

Metodické přístupy ke studiu metylace DNA

V rámci studia metylace DNA lze k odlišení metylovaných a nemetylovaných bazí využít tři základní přístupy, a to štěpení metylačně senzitivními restriktivními endonukleázami, využití protilátek vázících se na metylovaný cytosin či bisulfitovou konverzi [5]. Velmi recentně se pak objevuje metoda enzymatické konverze [6]. Tyto přístupy jsou následně kombinovány s různými molekulárně-biologickými metodami, jako je polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction – PCR), vysokorozlišovací analýza křivek tání (high resolution melting – HRM), sekvenování či DNA čipy (tzv. microarrays). Většina diagnostických aplikací popsaných v následující podkapitole využívá právě metodu bisulfitové konverze, což je proces, při kterém je působením hydrogensířičitanu sodného deaminován cytosin na uracil. U metylovaných cytosinů k této konverzi nedochází. Ke studiu konkrétních jednotlivých úseků DNA lze vyu-

žít PCR s metylačně specifickými primery a následnou vizualizací produktu pomocí gelové elektroforézy [7] či metylačně specifickou HRM analýzu, při které se stanovuje odlišnost teploty tání PCR produktů mezi metylovanou a nemetylovanou DNA [8]. Výhodou těchto metod je zejména rychlost a poměrně nízké finanční náklady. Rozsáhlou skupinu metod představují metody sekvenování. Platformy sekvenování nové generace jsou schopny paralelně analyzovat velké množství DNA fragmentů. Rozsah studované genetické informace může být od několika vybraných úseků vytyčených různými metodami cíleného obohacení až po celý genom analyzovaný prostřednictvím celogenomového bisulfitového sekvenování. V posledních letech se do popředí studia metylace DNA dostává také metoda sekvenování třetí generace. Jejím výhodou je skutečnost, že dokáže detekovat modifikace DNA bez nutnosti provedení bisulfitové (či jiné) konverze a amplifikace cílové oblasti, molekula DNA je tak analyzována ve svém nativním stavu. Dostupné technologie využívají k detekci přítomnosti modifikace např. změnu elektrické vodivosti při průchodu nanopórem (platforma Oxford Nanopore) [9] či změnu kinetiky DNA polymerázy při začleňování fluorescenčně značených nukleotidů (tzv. metoda single-molecule real-time (SMRT) využívaná plat-



Obr. 1. Schematické znázornění procesu metylace DNA prostřednictvím DNA metyltransferáz (A) a dopadu metylace DNA na genovou expresi (B).

DNMT – DNA metyltransferáza, SAM – S-adenosylmethionin

Tab. 1. Přehled komerčních testů využívajících stanovení úrovně metylace DNA.

Název testu	Onemocnění	Použití	Cílové geny	Reference
Epi proLung®	karcinom plic	neinvazivní diagnostika	<i>SHOX2, PTGER4</i>	[15]
Epi proColon®	kolorektální karcinom	neinvazivní diagnostika	<i>SEPT9</i>	[16]
Cologuard®	kolorektální karcinom	neinvazivní diagnostika	<i>NDRG4, BMP3</i>	[17]
Galleri®	50 typů nádorových onemocnění	neinvazivní diagnostika	> 100 000 specifických lokusů napříč genomem	[21]
Bladder EpiCheck®	svalovinu neinvadující karcinom močového měchýře	neinvazivní diagnostika	15 specifických lokusů napříč genomem	[22]
ZNF582 DNA Detection Kit	karcinom děložního čípku	neinvazivní diagnostika	<i>ZNF582</i>	[23]
PAX1 DNA detection kit	karcinom děložního čípku	neinvazivní diagnostika	<i>PAX1</i>	[24]
GynTect®	karcinom děložního čípku	neinvazivní diagnostika	<i>ASTN1, DLX1, ITGA4, RXFP3, SOX17, ZNF671</i>	[25]
EPICUP®	nádory neznámého origa	tkáňová diagnostika	450 000 specifických lokusů napříč genomem	[26]
therascreen® MGMT Pyro® Kit	glioblastom	prediktivní testování	<i>MGMT</i>	[33]
therascreen® PITX2 RGQ PCR Kit	karcinom prsu	prediktivní testování	<i>PITX2</i>	[38]

formou PacBio) [10]. Vysokokapacitní metylační profilování lze provést také s pomocí platform založených na principu microarrays, které využívají hybridizace cílové sekvence k imobilizované komplementární oligonukleotidu a následnou detekci fluorescenčního signálu [11].

Aberantní metylace DNA jako biomarker nádorových onemocnění

Potenciální využití metylace DNA jako diagnostického, prognostického či prediktivního biomarkeru již bylo zkoumáno a publikováno u různých nádorových onemocnění. Řada z těchto objevů však zůstává předmětem výzkumu a zatím si nenašla cestu do rutinní diagnostické praxe.

V kontextu diagnostiky onemocnění je potenciál aberantní metylace DNA studován především ve smyslu časné neinvazivní diagnostiky nebo k odlišení jednotlivých skupin nádorových onemocnění. Pro účely časné neinvazivní diagnostiky se jako výchozí materiál používají tělní tekutiny, nejčastěji plazma či sérum, ve kterých je klíčovou cílovou molekulou tzv. cirkulující DNA. DNA se v tělních tekutinách nachází v důsledku toho, že buňka procházející buněčnou smrtí uvolňuje fragmenty genomové DNA do cirkulace. Jedná-li se o DNA fragmenty pocházející z nádorové buňky, hovoříme o tzv. cirkulující nádorové DNA [12]. Vzhledem k tomu, že je aberantní metylace specifických oblastí časnou událostí při rozvoji nádorového onemocnění, má pro časnou diagnostiku obrovský potenciál [4]. Tuto skutečnost potvrzuje celá řada publikovaných studií u různých typů malignit, přičemž největší důraz je kladen zejména na diagnózy s vysokou incidencí v populaci zahrnující karcinom plic, kolorekta, prsu, prostaty, ale i mnoho dalších. U některých z těchto diagnóz jsou již k dispozici komerční testy s různou úrovní schválení regulačními orgány (tab. 1).

Jedna z prvních diagnóz, kde byla navržena detekce metylačního statusu tumor supresorových genů (v tomto případě genů *APC* a *CDKN2A*) jako neinvazivní diagnostický biomarker, byl karcinom plic [13,14]. Ze všech genů, které byly pro účely diagnostiky karcinomu plic studovány, dosáhlo nejlepších analytických parametrů stanovení metylace genů *SHOX2* a *PTGER4*, které je součástí komerčního testu s certifikací pro zdravotnické prostředky *in vitro* (CE-IVD) zvaného Epi proLung® [15].

U pacientů s kolorektálním karcinomem byl v průběhu uplynulých let zkoumán metylační status desítek cílových genů. Některé z testů jsou k dispozici v podobě komerčních testů schválených Americkou lékovou agenturou (Food and Drug Administration – FDA), konkrétně test zaměřený na detekci metylace genu *SEPT9* ze vzorku krve (dostupný pod komerčním názvem Epi proColon®) [16] či kombinovaný test sestávající ze stanovení metylace *NDRG4* a *BMP3* spolu se stanovením hemoglobinu a přítomnosti mutace genu *KRAS* ve stolici pacientů (dostupný pod komerčním názvem Co-

tumor supresorových genů (v tomto případě genů *APC* a *CDKN2A*) jako neinvazivní diagnostický biomarker, byl karcinom plic [13,14]. Ze všech genů, které byly pro účely diagnostiky karcinomu plic studovány, dosáhlo nejlepších analytických parametrů stanovení metylace genů *SHOX2* a *PTGER4*, které je součástí komerčního testu s certifikací pro zdravotnické prostředky *in vitro* (CE-IVD) zvaného Epi proLung® [15].

U pacientů s kolorektálním karcinomem byl v průběhu uplynulých let zkoumán metylační status desítek cílových genů. Některé z testů jsou k dispozici v podobě komerčních testů schválených Americkou lékovou agenturou (Food and Drug Administration – FDA), konkrétně test zaměřený na detekci metylace genu *SEPT9* ze vzorku krve (dostupný pod komerčním názvem Epi proColon®) [16] či kombinovaný test sestávající ze stanovení metylace *NDRG4* a *BMP3* spolu se stanovením hemoglobinu a přítomnosti mutace genu *KRAS* ve stolici pacientů (dostupný pod komerčním názvem Co-

loguard®) [17]. Kromě těchto dvou nejsou žádné jiné testy využívající stanovení metylace DNA FDA schváleny [18]. Ve snaze zvýšit senzitivitu stávajících biomarkerů časné diagnostiky kolorektálního karcinomu se objevují také kombinované testy zaměřené až na čtyři cílové geny [19], dosud však nebyly prospektivně validované na rozsáhlejších kohortách pacientů.

Kromě vývoje testů zaměřených specificky na detekci jednotlivých nádorových onemocnění byl v posledních letech rapidně akcelerován vývoj tzv. Multi-Cancer Early Detection (MCED) testů sloužících k neinvazivní detekci časného asymptomatického stadia nádorového onemocnění. Díky své schopnosti zachytit přítomnost více typů nádorových onemocnění v jediném testu tak utváří zcela nové paradigma, které s sebou nese příslib snížení celkové mortality spojené s nádorovými onemocněními [20]. Jednou z alterací, které jsou v rámci MCED testů detekovány, je právě metylace DNA. Stanovení metylace DNA je podstatou jednoho z nejznámějších a nejrobustnějších MCED testů nazvaného Galleri®. Kromě záchytu pozitivního signálu svědčícího o přítomnosti nádorového onemocnění dle dosavadních výsledků tento test také dokázal s 88,7% přesností předpovědět, o jaký z 50 typů nádorových onemocnění, které je schopen rozlišit, se jedná. V klinické studii zahrnující 4 077 účastníků byla u tohoto testu demonstrována 99,5% specifická a 51,5% senzitivita [21].

Neinvazivní detekce přítomnosti onemocnění lze využít nejen pro záchyt primárního onemocnění, ale také pro monitorování rekurence po ukončení léčby. Příkladem onemocnění, u kterého je dlouhodobě kladen důraz na identifikaci k tomuto účelu sloužících neinvazivních biomarkerů, je karcinom močového měchýře. Vzhledem k vysokému riziku rekurence po ukončení léčby pacienti se svalovinu neinvadujícím karcinomem močového měchýře opakovaně podstupují cystoskopii, která představuje zátěž jak pro pacienta, tak pro zdravotnický systém. Jako alternativa k rutinní kombinaci cystoskopie a cytologie bylo navrženo stanovení úrovně metylace 15 genů (dostupných v podobě

komerční certifikované diagnostické soupravy Bladder EpiCheck®) ze vzorku moči. Výstupem tohoto kombinovaného testu je skóre s hodnotou 0–100, přičemž hodnoty > 60 značí přítomnost nádorového onemocnění [22].

Z dalších testů vyvinutých pro účely diagnostiky lze zmínit hned několik CE-IVD certifikovaných diagnostických souprav zaměřených na pacientky s karcinomem děložního čípku, kde však výchozím materiálem nejsou tělní tekutiny, ale buňky odebrané stěrem z děložního čípku při pravidelném screeningovém vyšetření. Jednotlivé testy se zaměřují na stanovení metylace genu *ZNF582* [23], *PAX1* [24] či kombinaci genů *ASTN1*, *DLX1*, *ITGA4*, *RXFP3*, *SOX17* a *ZNF671* [25].

Pro účely odlišení jednotlivých skupin nádorových onemocnění metodou metylačního profilování jsou výchozím biologickým materiálem vzorky nádorové tkáně. Tento přístup se opírá o skutečnost, že nádorový metylom je kombinací znaků odrážejících jak buněčný původ, tak charakteristické změny asociované s nádorem. Prvním příkladem takového aplikace byl klasifikátor umožňující identifikaci primární lokalizace u nádorů neznámého origa, který autoři nazvali EPI-CUP [26]. K natrénování klasifikátoru bylo použito 2 790 vzorků nádorové tkáně známého origa, které reprezentovaly 38 onkologických diagnóz, u nichž bylo provedeno metylační profilování na microarray platformě Infinium Human Methylation 450K BeadChip Array. Následná validace na kohortě 7 691 vzorků (vč. 534 metastáz) umožnila klasifikaci s 99,6% specifitou a 97,7% senzitivitou. U 188 (87 %) z 216 pacientů spadajících do kategorie tumoru neznámého origa byla úspěšně predikována primární lokalizace tumoru.

Využití vysokokapacitního metylačního profilování na platformě microarrays ke klasifikaci jednotlivých skupin nádorových onemocnění bylo dále demonstrováno u nádorů CNS [27] a sarkomů [28]. Obě tyto skupiny jsou biologicky a klinicky velmi heterogenní, což činí stanovení vybraných skupin diagnóz pouze na základě histopatologického zhodnocení obtížné a zároveň to poukazuje na existenci více podtypů v rámci jednotlivých diagnostických kategorií.

Pro tvorbu prvotní verze klasifikátoru CNS byla použita rozsáhlá kohorta několika tisíc vzorků odpovídajících 76 histopatologicky definovaným jednotkám. Všechny vzorky byly následně analyzovány metodou neřízeného shlukování, která vedla ke stanovení 82 charakteristických metylačních skupin nádorů CNS a 9 skupin kontrolní nenádorové tkáně. Pro samotnou tvorbu klasifikátoru byl použit tzv. random forrest algoritmus a jeho prospektivní validace byla učiněna na kohortě 1 155 nádorů CNS. S vysokou spolehlivostí bylo 88 % vzorků přiřazeno do klasifikátorem vytyčené metylační skupiny a u 76 % stanovená metylační skupina korelovala s histopatologickou diagnózou. U zbývajících 12 % byla provedena dodatečná molekulární vyšetření, jejichž výsledek vedl k reklasifikaci původní histopatologické diagnózy směrem k navržené metylační skupině [27]. Obdobným způsobem byl ustanoven také sarkomový klasifikátor, který byl oproti klasifikátoru nádorů CNS publikován o 3 roky později. Ten při prospektivní validaci s vysokou spolehlivostí přiřadil 75 % vzorků, přičemž 61 % z celkového počtu vzorků opět korelovalo s histopatologickou diagnózou. Téměř polovina vzorků, u kterých vyvstala diskrépance mezi výsledkem klasifikátoru a histopatologickým zhodnocením, byla na základě doplňkových molekulárních analýz překlasifikována na diagnózu odpovídající metylační skupině [28].

Poznatky získané s využitím metylačního profilování se již odrazily v nejnovější páté edici WHO klasifikace nádorů CNS z roku 2021. V tomto vydání je oproti verzi z roku 2016 kladen větší důraz na využití molekulárně-biologických metod jako doplňku k rutinním histologickým a imunohistochemickým přístupům a jsou představeny nové skupiny diagnóz a podskupiny diagnóz stávajících, přičemž přesné určení řady z nich vychází právě ze stanovení metylačního profilu [29].

Metylační klasifikátor nádorů CNS a sarkomů zůstává otevřeným systémem, který podléhá dalšímu vývoji a je neustále vylepšován díky přibývajícím množství analyzovaných vzorků. Kromě tohoto vylepšení však souběžně dochází k vývoji usilujícímu o přenesení tohoto

přístupu na odlišné platformy, a to zejména platformu sekvenování třetí generace Oxford Nanopore. Čas do dodání výsledků se u standardně využívané platformy Infinium pohybuje v řádu několika dní až týdnů, což je ovlivněno nutností nashromáždit potřebné množství pacientů (zpravidla osm) pro zaplnění arraye a také časovou náročností analytické části procesu [30]. V reakci na tyto limitace byl ustanoven metylační klasifikátor pro platformu Oxford Nanopore nazvaný nanoDx, u kterého činil medián času od obdržení biologického materiálu do dodání výsledku při prospektivní validaci 21 hodin [31]. Vylepšeným recentně publikovaným přístupem je využití klasifikátoru založeného na neuronových sítích s názvem Sturgeon, který byl autory navržen jako nástroj pro intraoperativní diagnostiku informující neurochirurga o tom, zda charakter tumoru vyžaduje provedení radikální resekce, či zda se jedná o diagnózu, u které nemá rozdíl mezi radikální a subtotální resekci na prognózu vliv. V rámci této práce byl nástroj použit u 25 prospektivních pacientů, u kterých byl výsledek stanoven za < 90 minut. U 18 z 25 pacientů byla stanovena správná diagnóza s dostatečnou mírou spolehlivosti [32].

V kategorii biomarkerů prediktivních a prognostických je velmi významným biomarkerem a zároveň jedním z nejznámějších příkladů využití metylačního profilování v klinické praxi stanovení metylačního statusu promotoru genu *MGMT* ve vzorku nádorové tkáně u pacientů s glioblastomem [33]. Metylace promotoru je přítomna u 40–50 % pacientů a je spojována s delším přežitím [34]. Zároveň je spojován s predikcí léčebné odpovědi u pacientů léčených temozolomidem (TMZ) [35,36]. TMZ patří do skupiny alkylačních chemoterapeutik a jeho působení navozuje poškození DNA, které vede k aktivaci apoptózy, není-li opraveno buněčnými reparačními mechanismy. Jedním z těchto reparačních mechanismů je také působení enzymu *MGMT*. Je však nutné zmínit, že jistou limitací stanovení metylace promotoru *MGMT* je velká variabilita ve volbě metodického přístupu a vymezení přesné cut-off hodnoty pro metylovaný promotor [37]. Obdobným způsobem

byla hypermetylace tumor supresorových genů spojena s chemosenzitivitou také v případě dalších onkologických diagnóz. U pacientek s karcinomem prsu s postižením uzlin je např. nízká úroveň metylace genu *PITX2* (dostupná v podobě certifikovaného komerčního testu *therascreen® PITX2 RGQ PCR Kit*) spojená s benefitem adjuvantní léčby antracyklinovými chemoterapeutiky [38].

Využití v terapii nádorových onemocnění

Na rozdíl od jiných typů alterací, jako jsou bodové mutace, změny počtu kopií či fúzní geny, představuje aberantní metylace DNA modifikaci reverzibilní, což z ní činí potenciální cíl protinádorové terapie. V současné době jsou k dispozici léčiva schválená evropskou lékovou agenturou EMA i americkou FDA a také několik desítek léčiv nacházejících se v preklinické či časné klinické fázi testování.

Adice metylové skupiny je katalyzována enzymy označovanými jako DNA metyltransferázy (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*), přičemž většina dostupných léčiv cílí na modulaci jejich aktivity. Na základě mechanismu působení je lze rozdělit na dvě skupiny, a to na analogy nukleosidů a non-nukleosidová agens, která zahrnují zejména inhibitory přímo interagující s DNA metyltransferázami.

Analogy nukleosidů jsou deriváty odvozené nejčastěji od deoxycytidinu, které se inkorporují do struktury DNA či RNA. Inkorporace do struktury DNA vede k vytvoření kovalentní ireverzibilní vazby a postupné depleci DNA metyltransferáz. Dochází-li k inkorporaci do struktury RNA, nastává inhibice proteosyntézy. Mezi nejznámější analogy nukleosidů patří azacytidin a decitabin, které jsou schváleny pro léčbu pacientů s diagnózou myelodysplastického syndromu či akutní myeloidní leukemie s kontraindikací k provedení transplantace kostní dřeně [39]. Oba léky mají velmi podobnou chemickou strukturu, odlišnost spočívá v tom, že azacytidin je ribonukleosid a decitabin je deoxyribonukleosid. Decitabin se tak na rozdíl od azacytidinu neváže na RNA. Prvotně byly používány ve vysokých dávkách jako cytostatika, podání nižší dávky však navozuje pokles

úrovně metylace u původně hypermetylovaných oblastí v genomu, zpravidla kódujících tumor supresorové geny [40]. Častý problém u obou léků představuje rozvoj rezistence, který je pozorován až u poloviny pacientů [41]. Recentní studie poukázala na to, že podstata rezistence tkví v adaptivní odpovědi sítě enzymů zapojených do metabolismu pyrimidinu [42].

Kromě podávání výše zmíněných léků v monoterapii jsou v klinických hodnoceních testovány jejich kombinace s dalšími léčivy, a to jak s tradičními cytostatiky, tak s cílenými inhibitory [43]. Jedním z hlavních důvodů pro testování lékových kombinací s cytostatiky je skutečnost, že navození sekundární rezistence vůči vybraným cytostatikům je spjato se změnami úrovně metylace specifických oblastí nádorového genomu, zejména pak hypermetylací promotoru tumor supresorových genů [44]. Nasazení nukleosidových analogů s cílem inhibovat aktivitu metyltransferáz tak umožňuje hypermetylacii předcházet. Z dalších příkladů o snahu modulace léčebné odpovědi prostřednictvím nukleosidových analogů lze zmínit souběžné podávání s PD-1 inhibitory [45].

Většina dalších léčiv spadajících do skupiny nukleosidových analogů se nachází v raných fázích klinických hodnocení. Jedním z příkladů těchto analogů je guadecitabin. Jedná se o dinukleotid tvořený decitabinem spojeným fosfodiesterovou vazbou s deoxyguanosinovým analogem, což zaručuje delší poločas rozpadu v organismu [46]. Ve studii fáze III zaměřené na pacienty s akutní myeloidní leukemií nevedlo jeho podávání v porovnání se standardními léčebnými postupy ke zlepšení celkového přežití [47], lék je však dále testován v odlišných indikacích. Z dalších analogů lze zmínit 5-fluoro-2'-deoxycytidin (*FdCyd*) testovaný v kombinaci s tetrahydrouridinem [48] ve studii fáze II, kde však nebylo dosaženo vytyčených cílů stran přežití bez progresu a léčebné odpovědi, či 5-aza-4'-thio-2'-deoxycytidin (*Aza-TdC*), který je testován ve fázi I zaměřené na pacienty s pokročilými solidními nádory [49].

Pro inhibitory přímo interagující s metyltransferázami byla demonstrována

celá řada mechanismů účinku, které zahrnují vazbu do aktivního místa enzymu, alosterické působení či působení tzv. antisense oligonukleotidů. Inhibitory vážící se do aktivního místa enzymu přímo zabráňují jeho interakci se substrátem. Tato skupina zahrnuje jak syntetické sloučeniny, jako je molekula RG108 či antihypertenzivum hydralazin [50], tak přírodní sloučeniny jako epigallocatechin-3-gallát obsažený v listech zeleného čaje [51]. Alosterické inhibitory po navázání mění prostorovou konformaci proteinu, a tím znemožňují jeho další aktivitu. Jako příklady lze zmínit pyrazolon a pyrizadin. Tyto dvě sloučeniny byly identifikovány na základě screeningu knihoven chemických sloučenin a demonstrovaly selektivitu pro metyltransferázu DNMT3A. Díky této skutečnosti představují kandidátní léčiva pro další vývoj v této oblasti [52]. Agens fungující na principu antisense oligonukleotidů, mezi které patří sloučenina MG98, interferují s translací mRNA genů kódujících DNA metyltransferázy, a zabráňují tak jejich proteosyntéze [53].

Závěr

Studium aberantní metylace DNA, stejně tak jako ostatních typů epigenetických změn, vedlo ke zvýšení komplexnosti, s jakou na problematiku vzniku a rozvoje nádorových onemocnění nahlížíme, a přineslo zcela nové možnosti pro jejich diagnostiku a terapii. Co se týče role aberantní metylace DNA jakožto biomarkeru, tak velké množství publikovaných prací demonstruje, že její stanovení může nést značné implikace pro diagnostiku primárního onemocnění, detekci jeho rekurence, odhad prognózy či predikci léčebného efektu. V rámci této přehledové práce bylo představeno několik příkladů testů využívajících stanovení úrovně metylace vybraných genů, a to zejména těch, které disponují certifikací pro využití v laboratorní diagnostice. Počet publikovaných kandidátních biomarkerů toto množství mnohonásobně převyšuje, avšak pro málokteré z nich je vyvinut laboratorní test, jenž by byl následně validován na rozsáhlejší prospektivní kohortě. Dalším důležitým aspektem je poté implementace vyvinutých testů do rutinní klinické praxe. V tomto

ohledu se testy založené na stanovení metylace nejvíce uplatňují v oblasti diagnostiky nádorů CNS, zejména se to týká stanovení metylace promotoru *MGMT*, které je součástí metodického portfolia mnoha laboratoří molekulární patologie, a recentně pak také profilování s pomocí microarray platformy Infinium od společnosti Illumina používané ke klasifikaci nádorů CNS, jehož dostupnost se díky diagnostickým kritériím představeným v poslední edici příslušné WHO klasifikace napříč laboratořemi zvyšuje. Nejnovější metodické přístupy, jako je sekvenování třetí generace, pak díky svojí rychlosti poukazují na přenositelnost tohoto inovativního konceptu do peroperativní diagnostiky, kde může zásadně pomoci při rozhodování o nutnosti radikality resekce, jejíž větší rozsah s sebou často nese rizika neurologického poškození.

Role aberantní metylace DNA jako biomarkeru je bezesporu na vzestupu, pro její využití jakožto léčebného cíle však nedochází v posledních letech k výraznému pokroku a slibné výsledky preklinických studií jsou pouze minimálně reflektovány ve výsledcích navazujících klinických hodnocení. Od schválení nukleosidových analogů azacytidinu a decitabinu hojně využívaných zejména v hematologii nebyly žádné další sloučeniny do klinické praxe zavedeny. Obě léčiva se navíc potýkají s vysokým podílem pacientů, u kterých se vyvine sekundární rezistence, a mimo hematologické malignity je jejich efektivita u solidních tumorů minimální. Je však k dispozici narůstající evidence o jejich možném synergistickém efektu s dalšími protinádorovými léčivy, přičemž některé kombinace jsou již předmětem probíhajících klinických hodnocení.

Dedikace

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NV19-03-00562 a projektu Národního ústavu pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) – financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

Literatura

- Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov* 2022; 12(1): 31–46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- Shen H, Laird PW. Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell* 2013; 153(1): 38–55. doi: 10.1016/j.cell.2013.03.008.

- Lu Y, Chan Y-T, Tan H-Y et al. Epigenetic regulation in human cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy. *Mol Cancer* 2020; 19(1): 79. doi: 10.1186/s12943-020-01197-3.
- Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22(22): 4632–4642. doi: 10.1200/JCO.2004.07.151.
- Martisoava A, Holcakova J, Izadi N et al. DNA methylation in solid tumors: functions and methods of detection. *Int J Mol Sci* 2021; 22(8): 4247. doi: 10.3390/ijms22084247.
- Vaisvila R, Ponnaluri VKC, Sun Z et al. Enzymatic methyl sequencing detects DNA methylation at single-base resolution from picograms of DNA. *Genome Res* 2021; 31(7): 1280–1289. doi: 10.1101/gr.266551.120.
- Herman JG, Graff JR, Myöhänen S et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(18): 9821–9826. doi: 10.1073/pnas.93.18.9821.
- Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(6): e41. doi: 10.1093/nar/gkm013.
- Schatz MC. Nanopore sequencing meets epigenetics. *Nat Methods* 2017; 14(4): 347–348. doi: 10.1038/nmeth.4240.
- Clark TA, Spittle KE, Turner SW et al. Direct detection and sequencing of damaged DNA bases. *Genome Integr* 2011; 2: 10. doi: 10.1186/2041-9414-2-10.
- Chen D-P, Lin Y-C, Fann CSJ. Methods for identifying differentially methylated regions for sequence- and array-based data. *Brief Funct Genomics* 2016; 15(6): 485–490. doi: 10.1093/bfpg/ewl018.
- Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(6): 426–437. doi: 10.1038/nrc3066.
- Usadel H, Brabender J, Danenberg KD et al. Quantitative adenomatous polyposis coli promoter methylation analysis in tumor tissue, serum, and plasma DNA of patients with lung cancer. *Cancer Res* 2002; 62(2): 371–375.
- Bearzatto A, Conte D, Frattini M et al. p16^{INK4A} hypermethylation detected by fluorescent methylation-specific PCR in plasmas from non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8(12): 3782–3787.
- Weiss G, Schlegel A, Kottwitz D et al. Validation of the SHOX2/PTGER4 DNA methylation marker panel for plasma-based discrimination between patients with malignant and nonmalignant lung disease. *J Thorac Oncol* 2017; 12(1): 77–84. doi: 10.1016/j.jtho.2016.08.123.
- Lin KW. mSEPT9 (Epi proColon) blood test for colorectal cancer screening. *Am Fam Physician* 2019; 100(1): 10–11.
- Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH et al. Multi-target stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med* 2014; 370(14): 1287–1297. doi: 10.1056/NEJMoa1311194.
- FDA. List of cleared or approved companion diagnostic devices (in vitro and imaging tools). [online]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/medical-devices/in-vitro-diagnostics/list-cleared-or-approved-companion-diagnostic-devices-in-vitro-and-imaging-tools>.
- Barták BK, Kalmár A, Péterfia B et al. Colorectal adenoma and cancer detection based on altered methylation pattern of SFRP1, SFRP2, SDC2, and PRIMA1 in plasma samples. *Epigenetics* 2017; 12(9): 751–763. doi: 10.1080/15592294.2017.1356957.
- Clarke CA, Hubbell E, Ofman JJ. Multi-cancer early detection: a new paradigm for reducing cancer-specific and all-cause mortality. *Cancer Cell* 2021; 39(4): 447–448. doi: 10.1016/j.ccell.2021.02.004.
- Klein EA, Richards D, Cohn A et al. Clinical validation of a targeted methylation-based multi-cancer early detection test using an independent validation set. *Ann Oncol* 2021; 32(9): 1167–1177. doi: 10.1016/j.annonc.2021.05.806.

22. Witjes JA, Morote J, Cornel EB et al. Performance of the bladder EpiCheck™ methylation test for patients under surveillance for non-muscle-invasive bladder cancer: results of a multicenter, prospective, blinded clinical trial. *Eur Urol Oncol* 2018; 1(4): 307–313. doi: 10.1016/j.euo.2018.06.011.
23. Lin H, Chen T-C, Chang T-C et al. Methylated ZNF582 gene as a marker for triage of women with Pap smear reporting low-grade squamous intraepithelial lesions – a Taiwanese Gynecologic Oncology Group (TGOG) study. *Gynecol Oncol* 2014; 135(1): 64–68. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.08.012.
24. Kan Y-Y, Liou Y-L, Wang H-J et al. PAX1 methylation as a potential biomarker for cervical cancer screening. *Int J Gynecol Cancer* 2014; 24(5): 928–934. doi: 10.1097/IGC.0000000000001155.
25. Schmitz M, Eichelkraut K, Schmidt D et al. Performance of a DNA methylation marker panel using liquid-based cervical scrapes to detect cervical cancer and its precancerous stages. *BMC Cancer* 2018; 18(1): 1197. doi: 10.1186/s12885-018-5125-8.
26. Moran S, Martínez-Cardús A, Sayols S et al. Epigenetic profiling to classify cancer of unknown primary: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2016; 17(10): 1386–1395. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30297-2.
27. Capper D, Jones DTW, Sill M et al. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature* 2018; 555(7697): 469–474. doi: 10.1038/nature26000.
28. Koelsche C, Schimpf D, Stichel D et al. Sarcoma classification by DNA methylation profiling. *Nat Commun* 2021; 12(1): 498. doi: 10.1038/s41467-020-20603-4.
29. Louis DN, Perry A, Wesseling P et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro Oncol* 2021; 23(8): 1231–1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106.
30. Jaunmuktane Z, Capper D, Jones DTW et al. Methylation array profiling of adult brain tumours: diagnostic outcomes in a large, single centre. *Acta Neuropathol Commun* 2019; 7(1): 24. doi: 10.1186/s40478-019-0668-8.
31. Kuschel LP, Hench J, Frank S et al. Robust methylation-based classification of brain tumours using nanopore sequencing. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2023; 49(1): e12856. doi: 10.1111/nan.12856.
32. Vermeulen C, Pagès-Gallego M, Kester L et al. Ultra-fast deep-learned CNS tumour classification during surgery. *Nature* 2023; 622(7984): 842–849. doi: 10.1038/s41586-023-06615-2.
33. Quillien V, Lavenu A, Ducray F et al. Clinical validation of the CE-IVD marked Therascreen MGMT kit in a cohort of glioblastoma patients. *Cancer Biomark* 2017; 20(4): 435–441. doi: 10.3233/CBM-170191.
34. Weller M, Felsberg J, Hartmann C et al. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German glioma network. *J Clin Oncol* 2009; 27(34): 5743–5750. doi: 10.1200/JCO.2009.23.0805.
35. Wick W, Platten M, Meisner C et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(7): 707–715. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70164-X.
36. Malmström A, Grønberg BH, Marosi C et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(9): 916–926. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70265-6.
37. Mansouri A, Hachem LD, Mansouri S et al. MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro Oncol* 2019; 21(2): 167–178. doi: 10.1093/neuonc/noy132.
38. Schmitt M, Wilhelm OG, Noske A et al. Clinical validation of PITX2 DNA methylation to predict outcome in high-risk breast cancer patients treated with anthracycline-based chemotherapy. *Breast Care (Basel)* 2018; 13(6): 425–433. doi: 10.1159/000493016.
39. Scott LJ. Azacitidine: a review in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Drugs* 2016; 76(8): 889–900. doi: 10.1007/s40265-016-0585-0.
40. Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 1980; 20(1): 85–93. doi: 10.1016/0092-8674(80)90237-8.
41. Garcia JS, Jain N, Godley LA. An update on the safety and efficacy of decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Onco Targets Ther* 2010; 3: 1–13. doi: 10.2147/ott.s7222.
42. Gu X, Tohme R, Tomlinson B et al. Decitabine- and 5-azacytidine resistance emerges from adaptive responses of the pyrimidine metabolism network. *Leukemia* 2021; 35(4): 1023–1036. doi: 10.1038/s41375-020-1003-x.
43. Stomper J, Rotondo JC, Greve G et al. Hypomethylating agents (HMA) for the treatment of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: mechanisms of resistance and novel HMA-based therapies. *Leukemia* 2021; 35(7): 1873–1889. doi: 10.1038/s41375-021-01218-0.
44. Romero-Garcia S, Prado-Garcia H, Carlos-Reyes A. Role of DNA methylation in the resistance to therapy in solid tumors. *Front Oncol* 2020; 10: 1152. doi: 10.3389/fonc.2020.01152.
45. Dai M, Liu M, Yang H et al. New insights into epigenetic regulation of resistance to PD-1/PD-L1 blockade cancer immunotherapy: mechanisms and therapeutic opportunities. *Exp Hematol Oncol* 2022; 11(1): 101. doi: 10.1186/s40164-022-00356-0.
46. Daher-Reyes GS, Merchan BM, Yee KWL. Guadecitabine (SGL-110): an investigational drug for the treatment of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Expert Opin Investig Drugs* 2019; 28(10): 835–849. doi: 10.1080/13543784.2019.1667331.
47. Roboz GJ, Sanz G, Griffiths EA et al. Results from a global randomized phase 3 study of guadecitabine (G) vs treatment choice (TC) in 302 patients with relapsed or refractory (r/r) acute myeloid leukemia after intensive chemotherapy (ASTRAL-2 study). *Blood* 2021; 138(Suppl 1): 2344. doi: 10.1182/blood-2021-147769.
48. O'Sullivan Coyne G, Wang L, Zlott J et al. Intravenous 5-fluoro-2'-deoxycytidine administered with tetrahydro-ridine increases the proportion of p16-expressing circulating tumor cells in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2020; 85(5): 979–993. doi: 10.1007/s00280-020-04073-5.
49. Nguyen J, O'Sullivan Coyne G, Takebe N et al. Phase I trial of 5-aza-4'-thio-2'-deoxycytidine (Aza-TdC) in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2021; 39(Suppl 15): 3088. doi: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.3088.
50. Arce C, Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E et al. Hydralazine target: from blood vessels to the epigenome. *J Transl Med* 2006; 4: 10. doi: 10.1186/1479-5876-4-10.
51. Fang MZ, Wang Y, Ai N et al. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res* 2003; 63(22): 7563–7570.
52. Huang S, Stillson NJ, Sandoval JE et al. A novel class of selective non-nucleoside inhibitors of human DNA methyltransferase 3A. *Bioorg Med Chem Lett* 2021; 40: 127908. doi: 10.1016/j.bmcl.2021.127908.
53. Davis AJ, Gelmon KA, Siu LL et al. Phase I and pharmacologic study of the human DNA methyltransferase antisense oligodeoxynucleotide MG98 given as a 21-day continuous infusion every 4 weeks. *Invest New Drugs* 2003; 21(1): 85–97. doi: 10.1023/a:1022976528441.