Epigenetički lijekovi u medicini

Rađan, Rosana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:517812

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Rosana Rađan

Epigenetički lijekovi u medicini

Diplomski rad



Zagreb, 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Rosana Rađan

Epigenetički lijekovi u medicini

Diplomski rad



Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu pod vodstvom doc.dr.sc. Ane Katušić-Bojanac. Predan je na ocjenu akademske godine 2018/2019.

Popis kratica

DNA - deokisiribonukleinska kiselina (engl. deoxyribonucleic acid)
ncRNA – nekodirajuća ribonukleinska kiselina (engl. non-coding ribonucleic acid)
SAM – S-adenozilmetionin
C5 – citozinski prsten, peti položaj
DNMT – DNA metiltransferaza
MDBP – metil DNA vezujući protein
HDAC – histonska deacetilaza
PCNA – nuklearni antigen proliferirajućih stanica (engl. proliferating cell nuclear antigen)
UHRF1 – (engl. ubiquitin like with PHD And Ring Finger Domains 1)
tRNA – transportna RNA
CpG – citozin-gvanin
SUMO – small ubiquitin-related modifier
ADP – adenozin difosfat
HAT – histonska acetiltransferaza
GCN5 – (engl. *general control non derepressible-5*)
Co-A – koenzim A
GNAT – (engl. GCn5 related N-acetyltransferase)
PCAF - P300/CBP-associated factor
Tip60 – Tat-interactive protein, 60kDa
MOF – males absent on the firstprotein
RNA polII – RNA polimeraza II
TSG – tumor supresor gen
Sirt - sirtuin
HDM – histonska demetilaza
PMKT – protein lizin metiltransferaza
PMRT – protein arginin metiltransferaza
SET - (engl. Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax)
DOT1 – (engl. disruptor of telomeric silencing 1-like)
EZH2 – (engl. enhancer of zeste homolog 2)
P53 – protein 53
STAT3 – (engl. signal transducer and activator of transcription 3)

mRNA – (engl. messenger RNA)

RBP – (engl. retinol-binding proteins)

53BP1 – (engl. tumor suppressor p53-binding protein 1)

PRC2 – (engl. polycomb complex 2)

LSD – (engl. lysine specific demethylase)

FAD – (engl. flavin adenine dinucleotide)

PK - fosfokinaza

PP - fosfataza

siRNA – mala interferirajaća RNA (engl. small interfering RNA)

XIST – (engl. X inactive specific transcript)

HOTAIR – (engl. HOX transcript antisense RNA)

lincRNA – duga nekodirajuća RNA (engl. long non-coding RNA)

HOXc – (engl. homeobox c cluster)

HOXD – (engl. homeobox d cluster)

N-rep – (engl.amino-terminus, NH 2-terminus, N-terminal end or amine-terminus)

3“UTR – (engl. 3' untranslated region)

5-aza – 5-azacitidin

BET – (engl. the bromodomain and extraterminal proteins)

NUT – (engl. nuclear protein of the testis)

HPV – humani papiloma virus

BRD – (engl. bromodomain-containing protein)

Jmj - jumonji

TSA - trihostatin A

SAHA - vorinostat

MLL – mijeloična limfoidna leukemija

JAK - janus kinaza

BRM – (engl. brahma protein)

ATP – adenozin trifosfat

SWI/SWF – (engl. switch/sucrose non-fermentable)

Mecp2 – (engl. methyl-CpG-binding protein 2)

CBP – (engl. CREB-binding protein)

ATRX – (engl. alpha-thalasemia X-linked intellectual disability)

SMA – spinalna mišćna atrofija

TNF-α - tumor-nekrotizirajući faktor (engl.tumor necrosis factor)

PAD12 – (engl. protein-arginine deiminase type-2)

LOI – gubitak genomskog utiska (engl. loss of imprinting)

ALS – amiotrofična lateralna skleroza

FUS – (engl. fused in sarcoma)

CREB – (engl. cAMP response element binding)

ICF – (engl. immunodeficiency, centromeric instability and facial dysmorphism)

SLE – sistemski lupus erimatozus

RA – reumatoidni artritis

CD – (engl. cluster of differentiation)

IL - interleukin

INF - interferon

DM – diabetes meiltus

FDA – agencija za hranu i lijekove (engl. The Food & Drug Administration)

HTS – (engl. high throughput screening)

Sadržaj

Sažetak

Summary

1. **Uvod** 1
2. **Mehanizam epigenetičkih modifikacija i glavni enzimi** 1
   a) Metilacija DNA 1
   b) Histonske modifikacije 3
   c) RNA interferencija 7
3. **Klase epigenetičkih lijekova** 8
   a) Inhibitori metilacije 8
   b) Inhibitori bromodomena 9
   c) HAT inhibitori 10
   d) Inhibitori metiltransferaza 10
   e) Inhibitori metilacije histona 11
   f) HDAC inhibitori 11
4. **Epigenetičke modifikacije u tumorigenezi** 12
5. **FDA odobreni epigenetički lijekovi** 15
   a) Pan-HDAC inhibitori: vorinostat, belinostat, romidepsin i panabinostat 15
   b) Azacitidin i decitabin 17
   c) Ruxolitinib 18
6. **Ne-epigenetički lijekovi s epigenetičkim učinkom i "repurposing"** 19
7. **Epigenetički lijekovi u kombinacijskom liječenju** 20
8. **Zaključak** 21
9. **Zahvale** 22
10. **Literatura** 22
11. **Životopis** 43

SAŽETAK

Rosana Rađan

Epigenetički lijekovi u medicini

Prefiks epi- na grčkom znači „iznad“. Doslovni prijevod je „iznad genoma“. Epigenetika obuhvaća sve procese koji reguliraju DNA bez promjene njene sekvence. Naime u ljudskom tijelu postoji preko 200 različitih vrsta diferenciranih stanica, a sve one dijele isti genom. Ono što povezuje stanični genotip i fenotip su epigenetski mehanizmi kojima se odlučuje koji su geni i u kolikoj mjeri izraženi ili utišani.

Cilj ovog diplomskog rada je obraditi osnovne mehanizme epigenetike. Navedeni su osnovni epigenetički mehanizmi regulacije genske ekspresije kao što su DNA metilacija, histonske modifikacije i RNA interferencija, ali bitno je napomenuti da nisu jedini. To je razlog što je epigenetika danas jedno od najbrže rastućih polja u biologiji. Njena široka uloga u biološkim procesima čini je izuzetno bitnom u patofiziologiji bolesti. Sukladno tome, epigenetički patofiziološki mehanizmi prisutni su u bolestima iz mnogih područja onkologije, neurologije, psihijatrije, imunologije, embriologije, itd. Za znanstvenike je posebno zanimljivo istraživati epigenetičke promjene u bolestima koje su klinički izazovne kao npr. bolesti multifaktorijalnog porijekla te bolesti čije je liječenje na bilo koji način ograničeno. Zapravo epigenetički važni proteini i molekularnih puteva istražuju se u svrhu pronalaska novih meta i metoda liječenja. FDA (engl. Food and Drug Administration) je zasad odobrila epigenetičke lijekove koji spadaju pod skupinu inhibitora enzima HDAC i DNMT. Ti se lijekovi nazivaju još i lijekovi „prve generacije“, no u skorijoj budućnosti se očekuje i porast novoodobrenih lijekova, posebno onih koji koriste mehanizam RNA interferencije.

Ključne riječi: epigenetika, metilacija DNA, histonske modifikacije, RNA interferencija, DNMTi, HDACi

SUMMARY

Rosana Rađan

Epigenetic drugs in medicine

The “epi” prefix means "above in Greek." The literal translation of this prefix is "above the genome". Epigenetics encompasses processes that regulate DNA without changing its sequence. Specifically, there are over 200 different types of differentiated cells in the human body, all of which share the same genome. What links the cell genotype and the phenotype are the epigenetic mechanisms that decide which genes are active and to which extent they are expressed or silenced. The aim of this thesis is to explain the basic mechanisms of epigenetics. Basic epigenetic mechanisms for gene expression regulation, such as DNA methylation, histone modifications, and RNA interference, are outlined in this thesis, but it is important to note that they are not the only ones. This is why epigenetics is one of the fastest growing fields in modern biology. Its broad role in biological processes makes it extremely important in the pathophysiology of the disease. Accordingly, epigenetic pathophysiological mechanisms are present in diseases of many areas of oncology, neurology, psychiatry, immunology, embryology, etc. It is particularly interesting for scientists to investigate epigenetic changes in clinically challenging diseases, such as those of multifactorial origin and diseases of which treatment is limited in any way. In fact, epigenetically important proteins and molecular pathways have been studied aiming to find new targets and methods of treatment. So far FDA (Food and Drug Administration) had approved epigenetic drugs that are HDAC and DNMT enzyme inhibitors. These drugs are also called "first generation" drugs, but an increase in newly approved drugs is expected in the near future, especially those with the RNA interference activity.

Key words: epigenetics, DNA methylation, histone modifications, RNA interference, DNMTi, HDACi

1. Uvod

Epigenetika je znanost o nasljednim, reverzibilnim promjenama genske regulacije koje nisu ovisne o slijedu nukleotida u DNA. (1) Tri skupine enzima su glavne epigenetičke efektorne molekule: pisači, čitači i brisači, djeluju na tri supstrata: DNA, histone i RNA. Navedene komponente su međusobno visoko povezane. Utjecaj epigenetičkih promjena na genom dolazi i iz širih dimenzija postojanja te iz okoliša: spol, prehrana, okoliš, kemijski faktori, socijalni i ekonomski status, starenje, stres. (2) Kontinuiranim istraživanjem nalazi se sve više dokaza o utjecaju epigenetike na bolest. Spektar bolesti u koje je epigenetika uključena je širok: rak, metaboličke bolesti, srčane, neurološke bolesti (3), upalne bolesti(4), psihijatrijske...(5) Otkrivajući uzroke bolesti na epigenetičkoj razini, otkrivaju se potencijalne ciljne molekule za razvoj lijekova. Za neke neurološke bolesti i rak, lijekovi su već odobreni.(6)

2. Mehanizam epigenetičkih modifikacija i glavni enzimi

a) **Metilacija DNA**

DNA metilacija je najbolje proučeni epigenetički mehanizam regulacije ekspresije gena. Hoće li ekspresija biti regulirana na gore ili na dolje, ovisi o dijelu genoma koji je metiliran. Ukoliko je metiliran promotorski dio gena, ekspresija tog gena i proizvodnja proteina kojeg kodira taj gen će biti suprimirana što se zove utišavanje gena (engl. *gene silencing*), a ako nije posljedica će biti pojačana ekspresija tog gena, tj. pojačanje ekspresije gena (engl. *gene enhancing*) (7). Odnos kompleksnosti i veličine DNA s odnosom metiliranosti iste te DNA i ekspresije gena čini epigenetiku validnim akterom u procesima kao što je razvoj embrija, razvoj određenih gena tijekom evolucije, (8) genomskom imprintingu, inaktivaciji X-kromosoma, inhibiranju razvoja tumora, supresiji transpozona. (9, 10)

Za sam proces DNA metilacije ključni su enzimi koji se nazivaju DNA metiltransferaze (DNMT). Njihova zadaća je da premještaju metilnu skupinu s donora SAM (S-adenozilmetionin) na C5 poziciju citozinskog prstena, koji postaje 5-metilcitozin, tj. metilirana DNA. (11, 12)
U ljudskom genomu nalazimo gene za 5 DNAmetiltransferaza: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L. (13). U smislu liječenja bolesti najbitniji je DNMT1. Od svih metiltransferaza, DNMT1 je najzastupljeniji. Npr. poremećena funkcija DNMT1 je toliko bitna u tumorigenezi da od svega nekoliko odobrenih FDA lijekova, dva su hipometilirajuća agensa (vidi poglavlje *Epigenetički lijekovi odobreni od strane FDA*).

DNMT1 se još zove i održavajuća metiltransferaza (engl. *maintenance methyltransferase*). Naime nakon mitoze, ovaj enzim metilira novonastalu DNA kćeri na temelju metilacije komplementarnog (roditeljskog) lanca. Na taj način se održava metilacija u svim somatskim stanicama uspostavljena rano u nastanku embrija. (14) Dva su načina na koji DNA metilacija dovodi do utišavanja gena, direktni i indirektni put. Direktnim putem metilirana DNA je takoreći maskirana i skrivena od transkripcijskih faktora. U indirektnom putu, nakon metilacije citozina aktiviraju se dva važna proteina: protein koji se veže za metilnu domenu (MBDP) i histon deacetilaza (HDACs). Ti proteini imaju represivnu funkciju na remodeliranje histona. (15, 16) Srž kromatina postane kompaktnija, čime je onemogućen pristup transkripcijskim faktorima na DNA.

Tijekom replikacije DNA, vrijedi spomenuti dva proteina bitna u navođenju DNMT1 na prikladno mjesto za metilaciju - PCNA - nuklearni antigen proliferirajućih stanica (engl. *proliferating cell nuclear antigen*) i UHRF1 (*ubiquitin-like plant homeodomain i RING finger domain-containing protein*). (17, 18)

DNMT3 A i B su zaduženi za *de novo* metilaciju koja se događa uglavnom u embrionalnom razvoju. Naime, nakon oplodnje, dolazi do gubitka metilacije na očevim i majčinim kromosomima. Očev pronukleus brzo izgubi metilacijske oznake na svojoj DNA, i to aktivnim procesom koji uključuje enzime. (20, 21) Majčin pronukleus pak gubi svoj obrazac metilacije DNA kroz duži period vremena i smatra se da je to pasivni proces. (22, 23) Nakon tog procesa prilikom nastanka blastociste i tijekom diferencijacije dolazi do *de novo* metilacije gdje se utišavaju matični geni u diferenciranim stanicama. (24). Također ovi enzimi sudjejuju u procesu *de novo* metilacije u spolnim stanicama kojom se uspostavlja genomski utisak (nadalje *engl. imprinting*), bitan za sposobnost gameta da svojim spajanjem daju zdrav zametak sposoban za razvoj. (25)

Poznata je važnost i ostalih enzima, ali zbog manje količine spoznaje o njima nisu mete liječenja. Npr. enzim DNMT2 nema katalitičku aktivnost te je njegova uloga dosta nejasna. Zanimljiva je činjenica da metilira tRNA, ali još uvijek nije jasna vrijednost te informacije. (19)

DNMT3L je enzim koji spada u obitelj DNMT3 enzima. Katalitički je inaktivan, a ima ulogu u nastanku majčinskog genomskog imprintinga. Poznato je da je aktivan tijekom gametogeneze te da stimulira aktivnost DNMT3A i DNMT3B. (26, 27, 28)

Zna se da unutar genoma postoje regije koje se razlikuju u količini metiliranih nukleotida. Npr., transpozoni su genetske regije koje imaju sposobnost transpozicije na drugo mjesto na kromosomu što uzrokuje povećanu pojavnost mutacija te veći potencijal tumorigeneze. Metilacija transpozonskih regija normalne ljudske DNA je jako izražena i stabilizira transpozone, tj. onemogućava da se sele. (29, 30, 31). Nadalje, repetitivna područja DNA su područja gdje se

nalaze CpG otoci, objašnjeni kasnije u radu. Repetitivna područja čuvaju integritet DNA sprječavajući endoparazitske sekvence, njihovu translokaciju i gensku disrupciju. (32)

U genomu dakle postoje regije bogate sekvencom CpG. To su područja genoma koja su vrlo značajne u kontekstu metilacije. CpG je skraćeno za 5“-C-fosfat-G-3“, tj. označava citozin i gvanin unutar DNA molekule spojene fosfatnom vezom. Da naglasim, to je nukleotidna sekvenca, ne par baza. Postoji nekoliko verzija tih područja: CpG sites, Cpg otoci te Cpg shore. Cpg sites ili regije s CpG dinukleotidima su područja unutar DNA gdje je povećana frekvencija citozina i gvanina. Njihova značajnost je u tome što ih DNMT prepoznaje i metilira. (33) Nakon metilacije slijedi spontana deaminacija pri kojoj nastaje timin. To je pogreška koja se ne popravlja i na taj način se gubi CpG mjesto, to jest potencijalno mjesto metilacije. (34) CpG otoci su područja DNA s do 10 puta višom frekvencijom navedenih nukleotida. (35) To su regije koje su smještene u promotorskim regijama u 50-60% gena, većinom gena nužnih za život stanice koji se konstitutivno eksprimiraju (eng. Housekeeping) (36, 37). Metilacija CpG otoka je princip regulacije genske ekspresije. Na tim područjima DNA rijetko dolazi do metilacije (38), a kada se metiliraju, dođe do spontane deaminacije citozina u uracil, a u ovom slučaju se prepoznaje i popravlja te je CpG mjesto nanovo restorirano. CpG otoci su također česti u promotorskim regijama za funkcijski nekodirajuću RNA (microRNA). (39) CpG obale (engl.*shore*) su područja koja se u DNA sekvenci nalaze u blizini CpG otoka, a imaju nešto manju zastupljenost C i G nukleotida te su važni u regulaciji transkripcije. Metiliranost tih područja pokazuje varijabilnost u različitim tkivima te u stanicama raka i zdravim stanicama. (40, 41)

Metilacija DNA nije izoliran proces. Zapravo sve epigenetske modifikacije su međusobno povezane, često putem proteinskih interakcija sa DNA. Tako proteini koji prepoznaju CpG metilirana mjesta imaju domenu na proteinu koja se zove MBD, a protein se zove protein koji veže CpG metilirana mjesta (MeCP) (42, 43). Njegova uloga je da prepoznaje metilirano mjesto te kao odgovor dovodi druge proteine koji utječu na remodeliranje kromatina (histona). Konačan ishod je inaktivacija transkripcije.

b) **Histonske modifikacije**

U medicini i farmaceutskoj industriji histonske modifikacije su jako istraživana tema, često i zbog toga jer su promjenjene histonske oznake skoro pa univerzalan dio etiopatogeneze tumora. Bitni su i za neke bolesti koje su izazovne za liječenje, npr. sistemski eritematozni lupus. U neurološkom kontekstu nude princip neuroprotekcija. Važno je reći da većina FDA odobrenih epigenetskih lijekova djeluju na histonske modifikacije, odnosno su inhibitori enzima koji acetiliraju histone.

Histoni čine proteinski dio nukleosoma. Nukleosom je oktamer s dva seta H2A, H2B, H3 i H4 histona te DNA omotane oko tih proteina. Između dva nukleosoma nalazi se otprilike 50 bp slobodne DNA. Proteini histona su uglavnom okruglaste strukture osim njihovih N repova koji ju nemaju i tu se događaju modifikacije. (51) Histoni reguliraju kompakciju, tj. zgušnjavanje kromatina i na taj način moduliraju gensku ekspresiju. (45) H1 je povezujući (engl. *linker*) histon, jer nije dio srži nukleosoma, već se veže na DNA gdje ona započinje i završava svoj slobodni dio (*linker DNA*). (46)

Histoni su podvrgnuti brzoj i izmjenjivoj posttranskripcijskoj modifikaciji. Nekoliko modifikacija se događa na histonskom repu: acetilacija, metilacija, fosforilacija, ubikvitinacija, SUMO-ilacija, i ADPribo-ilacija. (51, 48) Uloga ovih modifikacija je transkripcijska regulacija, DNA popravak, (49) DNA replikacija, alternativno prekrajanje (engl. *splicing*) (50) i kromosomska kondenzacija. (51)

Najučestalija histonska modifikacija, koja je dio patogeneze tumora je globalna redukcija monoacetiliranog H4K16. (185) Iz toga je jasno zašto je acetilacija histona najbolje upoznata modifikacija, te zašto je najzastupljenija modifikacija kao meta za liječenje. Acetilacija histona se najčešće događa na aminokiselinskim ostatcima lizina i arginina. Proces acetilacije kataliziraju enzimi HAT (histonska acetiltransferaza) i HDAC (histonska deacetilaza). HAT i HDAC imaju antagonistički učinak. (52) HAT uzima acetilnu skupinu s donora acetil Co-A (53) te je stavljaju, tj. „pišu“ na lizinske i argininske ostatke, a HDAC istu tu acetilnu skupinu skidaju tj. „brišu“ s aminokiselinskih ostataka. Acetilirani lizinski ostatci na repu histona smanjuju pozitivni naboj histona što nadalje smanjujuje afinitet histona za DNA. Drugim riječima, kromatin je manje kompaktan te je omogućeno vezanje transkripcijskih faktora. Deacetilirani histoni povećavaju pozitivni naboj, proteini i DNA su kompaktniji, a transkripcija je onemogućena. (52) Bitna acetilna oznaka koja je odgovorna za promjenu heterokromatina u eukromatin je acetilirani H4K16 (55), a acetilirani H3K56 (p300) (56, 57) je oznaka koja utječe na vezu histona i DNA. (58)

HAT enzimi su kategorizirani u tri obitelji GNAT, MYST i p300. Pod GNAT obitelj spada GCN5 i PCAF, pod MYST obitelj spada Tip60 i MOF. (59) Ove obitelji dalje djeluju na histonske i ne-histonske proteine te na taj način čine histonske modifikacije povezane s drugim biološkim funkcijama stanice. P300 se nalazi svuda u nukleusu, te acetilira i histonske (H2A, H2B, H3 i H4) (60) i ne-histonske proteine (komponente RNA polimeraza II kompleksa te transkripcijske faktore). (61) Esencijalan je za procese rasta, stanične proliferacije, diferencijacije, regulacije staničnog ciklusa, odgovora na oštećenje DNA, tumorigeneze i apoptoze. (62, 63) P300 je protein značajan za nastanak kastracija-rezistentnog karcinoma prostate.(44)

PCAF (p300/CBP- pridruženi faktor) je transkripcijski ko-aktivator s HAT aktivnošću koji acetilira histonske (slobodni H3, nuklesomalni H3K4 i H4K8) i ne-histonske proteine, među kojima je važniji p53. (64, 65) PCAF se veže uz pojačivače transkripcije, interagira s RNA polimerazom II da održi proces elongacije transkripcije. Bitan je za proliferaciju, diferencijaciju, apoptozu te progresiju staničnog ciklusa, koji su promađeni abnormalni u stanicama karcinoma želuca. (66, 47)

Tip60 je dio kompleksa koji se nalazi ubikvitarno u stanici. (67) Meta su mu H2AK5, H4K16 te ne-histonski proteini. Bitan je za staničnu signalizaciju, popravak oštećene DNA, transkripciju te stanični ciklus. Neadekvatna ekspresija promovira ili suprimira tumorigenezu kolona, dojki ili prostate. (68)

Iz svega navedenog jasno je da su HDAC enzimi skupina nositelja histonskih modifikacija koja je već odavno uspješna meta farmakološke industrije. Na tržištu postoji nekoliko poznatih FDA odobrenih epigenetičkih antineoplastičnih lijekova, kao što su vorinostat, panobinostat, belinostat. Ti lijekovi se koriste za liječenje multiplog mijeloma i perifernog T-staničnog limfoma. HDAC deacetiliraju, kao i HAT, i histonske i ne-histonske proteine, te su obično dio multiproteinskog kompleksa. (70) Četiri su klase HDAC koje su izražene u sisavaca. Pod klasu I spada HDAC 1-3 i 8, u klasi II su HDAC 4-7, 9 i 10, a u klasi IV je HDAC 11. Svi navedeni su ovisni o cinku. Klasa III su sirtuini Sirt 1-7. Sirtuini su NAD-ovisni. HDAC inhibitori remodeliraju kromatinsku strukturu te je DNA svojim velikim dijelom u kontaktu s tim proteinima. Inhibitori HDAC utječu na samo 2-10% ekspresijski aktivnog genoma. (71)

Od metilacije histona najbolje je upoznata metilacija H3 histona, premda ostali histoni također mogu biti zahvaćeni. (74) HMT, histonska metiltransferaza, metilira raznolika ciljna mjesta te o ciljnim mjestima ovisi efekt metilacije. Enzim suprotnog učinka je HDM, histonska demetilaza. (75, 76)

Histon/protein metiltransferaze koriste SAM kao donor metila (77). Metiltransferaze ne djeluju na kromatinsku strukturu mjenjajući naboj proteina, zapravo djeluju indirektno. (78, 79, 80, 81) Najčešće se metiliraju lizinski i argininski ostatci. Argininski ostatci mogu biti mono-, di-metilirani, a lizinski ostatci mogu biti mono-, di-, tri- metilirani. (77) Lizinska metilacija daje i aktivnu i represivnu oznaku, što ovisi o meti, npr. H3Kme3 je oznaka koja dopušta transksripciju. s druge strane represivna oznaka je H3K9me3 i H3K27me3. (82, 83) Metilirani arginin je oznaka na histonu koje signalira nuklearnim faktorima koji zatim sekundarno uzrokuju ekspresiju ili represiju gena. (84, 85)

Histonske metiltransferaze se dijele filogenetski na dvije velike obitelji, PMKT i PRMT (lizinske i argininske metiltransferaze). PMKT imaju svi zajedničko katalitičko mjesto SET. (86,

87) Na to mjesto se vežu kofaktori i supstrati, osim DOT1L. (88). PKMT metiliraju i nehistonske proteine, npr. p53, STAT3, DNMT1, KMT1c (89). PRMT Nehistonski proteini na koje djeluju su RBP, 53BP1 s biološkim funkcijama transkripcije, staničnog signaliranje, mRNA translacija, signaliranje oštećenja DNA, stabilnost proteina, pre-mRNA izrezivanje. (91)

EZH2 i DOT1L su dva enzima koji ovu skupinu trenutno čine vrlo važnim metama liječenja, posebice tumora. EZH2 je komponenta PRC2 (polycomb repressive complex 2) koji značajno sprječava transkripciju trimetilacijom H3K27. (93) Može biti i transkripcijski aktivator (npr. aktivira androgen receptor), i u nekim slučajevima njegova prekomjerna ekspresija dovodi do stanične proliferacije, tumorigeneze, metastaza, obnove i održavanja matičnih stanica. (94) Važan je transkripcijski aktivator u mnogim vrstama raka.(95)

DOT1L je bitan protein u nastanku leukemije miješanog porijekla s lošom prognozom. Kao posljedica kromosomske tranlokacije dolazi do fuzije onkogena. (194, 195)

Histonske demetilaze demetiliraju aminokiselinske ostatke oksidativnim procesima koje izvode dvije skupine enzima. Prva skupina ima Jumonji (Jmj) domenu koja koristi 2-oksoglutarat kao kofaktor. U drugu skupinu spadaju LSD 1 i 2 koji koriste FAD kao kofaktor. (96)

Iz dosad navedenog se može zaključiti da poznavajući stanje acetiliranosti i metiliranosti kromatina, odnosno histona možemo predvidjeti aktivnost gena. Kromatin ljudske stanice s obzirom na transkripcijsku sposobnost egzistira u dva stanja, kromatin i eukromatin. Eukromatin je stanje aktivne transkripcije, heterokromatin je stanje kada transkripcija nije moguća. Histonske oznake koje karakteriziraju otvoreni kromatin su acetilirani i trimetilirani H3K4, H3K36, H3K79, s druge strane niska globalna acetilacija sa specifičnim metilnim oznakama H3K9, H3K27, H4K20 je pokazatelj heterokromatina. (101, 102)

Fosforilacija histonskih repova se događa na serinu, treoninu, te tirozinskim ostatcima. Fosforilacija utječe na elektrostatsku vezu DNA i histona. Enzimi koji fosforiliraju histone su PK (fosfokinaza) i PP (protein fosfataza). (97) Ubikvitinilacija je proces kovalentne adicije ubikvitina na H2A i H2B histone. Smatra se da djeluje sinergistički s metilacijom u ciljnjoj regiji DNA ili u kombinaciji. (98, 99) SUMO-ilacija je proces čiji je medijator SUMO (small ubiquitin-related modifier). SUMO protein se veže za lizinski ostatak histona te sa drugim represivnim faktorima prevenira acetilaciju histona, a time i transkripciju. (100)

Dalje su navedeni primjeri kako RNA ima bitnu ulogu u histonskim modifikacijama. Naime pokazano je da heterokromatin ipak nije transkripcijski inaktivan, tj. ta teorija se dovela u pitanje kada se otkrilo da se heterokromatinskog lokusa prepisuje ncRNA (nekodirajuća RNA). (103)

siRNA (malu interferirajuću RNA, engl. *small interfering* RNA) je vrsta ncRNA koja se transkribira sa centromernog područja. Ta RNA se veže s nuklearnim proteinom čineći kompleks.

Nadalje, taj kompleks ima metiltransferaznu sposobnost koja je potrebna za metilaciju H3K9. S druge strane, taj kompleks ima sposobnost aktivirati enzim koji svojom metiltransferaznom aktivnošću djeluje na histon (Clr4), a koji je neophodan za širenje heterokromatinske domene. (104, 105)

XIST je također ncRNA koja kroz aktivnost s PRC (polycomb-represivnog kompleksa, engl. *polycomb repressive complex*) pokazuje metiltransferaznu i histon ubikvitinaznu aktivnost. Konkretno, XIST je bitna jer je uključena u utišavanje inaktivnog X kromosoma u žena.(106, 107) Još jedan primjer važan zbog uloge u mnogim bolestima je HOTAIR, lincRNA (engl. *duga nekodirajuća RNA*). Ova RNA se transkribira s HOXC klasterom koji represira gene u HOXD cluster aktivirajući histonsku metiltransferazu PRC2. (108)

Osim svih navedenih kovalentnih modifikacija nedavno je otkriven i drugi tip modifikacije histona, kao što je izrezivanje. Naime u S. Cerevisiae je nađeno da se u promotorskim regijama N-kraj histona H3 nakon alanina 21 izrezuje. To je zapravo rani događaj u indukciji ekspresije gena. (109)

Zaključno, histonske modifikacije su šire područje od klasične modifikacije proteina acetilacijom, metilacijom, fosfrorilacijom. Sve navedene modifikacije su međusobno isprepletene i dinamične jer se simultano događa više histonskih modifikacija i naravno te modifikacije su u međusobnoj interakciji u smislu regulacije nekog molekularnog procesa (npr. transkripcije). Mogu biti na istom mjestu, na istom repu, te na drugačijim histonskim repovima. Ono kako će se gen ekspresirati zapravo ovisi o kombinaciji modifikacija. (110, 111, 112, 113)

U odlomku o metilaciji DNA već je spomenuta veza DNA metilacije i histonske modifikacije. Ovdje je ta veza opisana iz perspektive histonske modifikacije., jer modifikacije histona utječu i na proces metilacije DNA. Jedna od bitnih uloga tu ima enzim DNMT3L. DNMT3L interagira s H3 repom, privlači DNMT3A koji pak vrši de novo metilaciju. Tu reakciju jako inhibira represivna oznaka na H3 histonu - H3K4me. (114) Također, zna se da nekoliko histonskih metiltransferaza upućuje DNMT na specifične regije DNA te se na taj način uspostavlja utišavanje genske ekspresije. (115, 16, 117, 118)

c) RNA interferencija

Sustav RNA intereferencije bazira se na tzv. nekodirajućoj RNA, (engl. *non-coding ncRNA)* koja se transkribira sa nekodirajućih regija genoma, preciznije sa regulatornih regija. Stoga su prepoznati danas kao velika obitelj regulatornih gena u eukariota. Jedan od važnih članova ove obitelji je mikro RNA (engl. *micro RNA*). ”Seed site“ je mjesto na ncRNA od 18-25

nukleotida kojom se vežu za 3“UTR regiju na mRNA, prevenirajući translaciju mRNA te u konačnici blokiraju produkciju proteina bez utjecaja strukturu kromatina. Osim što miRNA epigenetički regulira aktivnost DNA, dakle gensku ekspresiju, epigenetički mehanizmi reguliraju i ekspresiju miRNA. Disregulacija strukture miRNA i epigenetičkih mehanizama koji kontroliraju njenu ekspresiju dovodi do poremećaja funkcije stanice. (119). Tako postoje miRNA koje imaju onkogeni potencijal i zovu se Onco-miRNA. (120)

MicroRNA se može koristiti i u terapiji, i to na dva načina. Može se npr. nekim proteinom ili lijekom inhibirati funkcija RNA, a može se miRNA inducirati u malignu stanicu kako bi se spriječila aktivnost i ekspresija onkogena (121, 122) U modernoj medicini je izazov kako te molekule dostaviti ciljnoj stanici, kako ih zaštititi u krvi te dovesti do stanica. No unatoč takvim izazovima, lijekovi bazirani na RNA interferenciji kao mehanizmu su odnedavno već u kliničkoj uporabi. Tako je 2019. godine FDA odobrila Patisiran, lijek za liječenje nasljedne amiloidoze. (69)

3. Klase epigenetičkih lijekova

a) Inhibitori metilacije

Inhibitori metilacije su molekule koje interferiraju s metilacijom DNA. Ti lijekovi su bili među prvim epigenetskim lijekovima kojeg je odobrila FDA. Na današnjem tržištu dva su najpoznatija lijeka, a to su 5-azadeoksicitidin (5-azadC) te 5-azacitidin (5-azaC). Oboje su tvari slične nukleozidu, preciznije, to su citidinski analozi koji imaju dušik vezan na 5. ugljikov atom citozinskog prstena C-5.

Jedina faza staničnog života kada se ovi lijekovi mogu ugraditi u DNA i djelovati hipometilirajuće je tijekom replikacije gdje potom DNMT1 kopira metilacijski obrazac sa roditeljskog lanca na DNA stanica kćeri. Nakon što se 5-azaC ili 5-azadC ugrade u DNA, DNMT1 prepoznaje analog nastojeći ga metilirati, a zbog dušika, analog i enzim se ireverzibilno vežu. Ireverzibilno vezanje dovodi do degradacije enzima. Na tom mjestu izostaje metilacija, pa 5-azaC i 5-azadC ima ju hipometilirajući učinak. (123, 124). To se uglavnom događa pri niskim dozama lijeka, a najveću primjenu imaju u liječenju tumora gdje svoj antineoplastični učinak ostvaruju hipometilacijom gena bitnih za supresiju staničnog ciklusa (npr. tumor supresori), diferencijaciju i proliferaciju.(124)

5-azadeoksicitidin se zbog svoje strukture ugrađuje samo u DNA, a 5-azacitidin se pri višim dozama inkorporira u RNA i DNA. Nakon ulaska u stanicu azacitidin se fosorilira u 5-azacitidin-monofosfat enzimom uridin-citidin kinazom, 5-azacitidin-difosfat postaje uz pomoć enzima

pirimidin monofosfat kinaza, a trifosfat postaje uz pomoć enzima difosfat kinaze. U tom obliku, trifosfatnom, inkorporira se u RNA, to dovodi do disrupcije metabolizma nuklearne i citoplazmatske RNA te inhibicije proteina.

Pri nižim dozama 5-azaC se ugrađuje u DNA. Naime, u stanici se 5-azacitidin-difosfat reducira u 5-aza-deoksicitidin difosfat enzimom ribonukleotid reduktaza. Rezultantni metabolit se fosforilira i nastaje 5–azadeoksicitin trifosfat preko nukleozid difosfat kinaze. 5 –azadeoksicitidin trifosfat se inkorporira u DNA, i na taj način sprječava DNA sintezu.

S obzirom da je ribonukleozid, više se inkorporira u RNA negoli u DNA gdje inhibicijom proteina djeluje izrazito citotoksično. Kod njegove ugradnje u RNA događa se rastavljanje poliribosoma, te defektna akceptorska funkcija transportne RNA (tRNA), inhibicija sinteze proteina, te zadnje stanična smrt.(125)

5-aza-deoksicitidin se ugrađuje samo u DNA pa ima samo hipometilirajući učinak.

Zebularine je također analog citozina s obzirom na mehanizam i strukturu. Osim što inhibira DNA metilaciju, potiče re-ekspresiju utišanih gena metilacijom. (125)

MG98 je po funkciji i strukturi antisense oligonukleotid. To je također inhibitor metilacije DNA koji tu funkciju obnaša interferirajući s dijelom genoma koji kodira DNMT1, odnosno veže se za netranslacijsku, regulatornu regiju genoma, koji kodira DNMT1. (126) Vezanje uzrokuje supresiju transkripcije, a smanjena razina enzima u stanici dovodi i do smanjenja metilacije. Kliničke studije su istraživale kombinaciju MG98 s poznatim kemoterapeutikom Roferon-A. Rezultati tog istraživanja su se pokazala obećavajućima te se daljnja istraživanja još provode. (127, 128)

RG108 je mala molekula koja se veže na aktivno mjesto DNMT1 enzima te inhibira funkciju enzima. Poželjna osobina lijeka je da je specifičan, a ovaj lijek pokazuje visoku razinu specifičnosti. Istraživanja također ukazuju da ima sposobnost povećati stabilnost kromatina. (129)

b) Inhibitori bromodomena

Bromodomene su domene na tzv. BET proteinima (proteini sa extra-terminalnim motivom i bromodomenom, engl. *Bromodomain and extra-terminal motif proteins*) koji modificiraju kromatin pa se još zovu epigenetički „čitači“. (130) Postoji 61 protein sa bromodomenom. Smatra se da jedino te strukture mogu prepoznati (čitati) acetilirane lizinske ostatke na histonu, što je važan korak u modifikaciji kromatina. (131) Osim što čitaju, BET proteini omogućuju elongaciju transkripcije vežući se na RNA polimerazu II. Preko te interakcije utječu na transkripciju acetiliranog kromatina. (132)

Npr., BRD4 je protein za kojeg je dokazano da ima veliku kliničku važnost u epitelnim karcinomima, leukemiji plazma stanica te, utječe na onkogenu ekspresiju HPV-a. (133, 134, 135, 136)

JQ1 je selektivni inhibitor bromodomena, a time i transkripcije onkogena c-Myc gena koji je bitan u nastanku multiplog mijeloma, a za njegovu sintezu su bitni BET proteini kao inicijatori njegove trankripcije. JQ1 inače uzrokuje disrupciju veze BET proteina i acetiliranog histona jer se kompetitivno veže za acetilirane lizinske ostatke, odvaja BET proteine od njih. Time je inhibirana Myc transkripcija i posljedično tomu i smanjena pozitivna regulacija ekspresije Myc ciljnih gena koji potiču diobu stanice. (137, 138)

BET726 je selektivni inhibitor BET proteina. Veže se na aktivno mjesto BRD2, BRD3, i BRD4. Važan je za regulaciju ekspresije BCL2 antiapoptotičnog gena koji je čest nalaz u tumorima. (139)

c) Inhibitori histonskih acetilaza (HAT inhibitori)

Prvi otkriveni HAT inhibitori su bili bisupstratni inhibitori koji selektivno blokiraju p300 i PCAF, garcinol, anakardična kiselina i kurkumin. (140, 141) Inhibitori u ciljnim stanicama smanjuju ekspresiju gena, dovode do slabljenja stanične proliferacije, te induciraju apoptozu. (142, 143, 144, 145, 146)

C646 je sintetski inhibitor koji se izdvaja potentnošću i selektivnošću. Mehanizam djelovanja sprovodi vežući se za p300 te djeluje kao kompetitivni kofaktor. U stanicama raka prostate ima proapoptotički učinak. (147, 148, 149) Čak ima dobar klinički učinak u androgen-ovisnom tumoru prostate. (150)

d) Inhibitori metiltransferaza

Proteinske metiltransferaze (PMT), odnosno histonske metiltranferaze (HMT) su enzimi koji metiliraju lizin i argininske ostatke na histonima i nehistonskim proteinima bitne za transkripciju gena. Patološka enzimatska aktivnost navedenih enzima dovodi do nastanka tumora, neurodegenerativnih bolesti i upalnih bolesti. (151) pa su sintetizirani inhibitori metiltranferaza koji svoju funkciju ostvaruju različitim mehanizmima.

BIX-01294 je prvi otkriveni selektivni inhibitor građen od dvije podjedinice. Ima jak učinak, ali je izrazito toksičan. (154, 155, 156) UNC0638 je inhibitor koji je sintetiziran da optimizira odnos učinkovitosti i toksičnosti. Taj inhibitor je jako potentan uz nisku razinu toksičnosti. (157) Trenutačno atraktivne mete u svijetu HAT inhibitora su enzimi EZH2 i DOT1L. Već je spomenuto da se EZH2 nalazi unutar PRC2 kompleksa. Jedino kao dio kompleksa EZH2

pokazuje metiltransferaznu aktivnost. Taj kompleks je jedini koji može trimetilirati H3 na lizinu 27, H3K27me3, što je potentna represija, a posljedica je utišavanje kromatina. Na mjesto gdje se veže EZH2 na neki drugi protein unutar kompleksa veže se SAH (S-adenozil-L-homocistein). SAH je produkt reakcije koju katalizira metiltransferaza, a nastaje od SAM. SAH ovdje ima ulogu inhibitora jer narušava strukturu kompleksa. (201)

EPZ004777 i pinomenostat su DOT1L inhibitori. Njihov mehanizam djelovanja je da mijenjaju konformacijsku strukturu proteina. Inače, ističe se visokom selektivnošću te dugotrajnom vezom u odnosu na prethodno navedene. (161)

e) Inhibitori metilacije histona

Inhibitori metilacije histona selektivno inhibiraju trimetilaciju histona, a studije pokazuju da reaktiviraju i razvojne gene koji nisu utišani DNA metilacijom. (162). Najviše su istraživani inhibitori aktivnosti LSD1, FAD i Jmj.

Tranilcipromil je ireverzibilni inhibitor LSD1,koji se kovalentno veže na FAD te MAO receptore te je njegova primarna indikacija već dugo vremena psihijatrijske bolesti (202). Lijek se pokazao uspješnim u liječenju AML kako sam tako u kombinaciji s retinoičnom kiselinom. Trenutačno se provode dva klinička istraživanja koja bi dovela do daljnjih spoznaja.(203)

Pirimidin tiourea je reverzibilni inhibitor FAD-a koji je u staničnim linijama pokazao inhibiciju rasta u stanicama raka želuca bez značajniih posljedica. (204)

Jmj inhibitori vežu se za željezo i nisu selektivni, novije generacije su bliže metalu i imaju bolju interakciju i veću selektivnost. (163) *N*-oxalylglycine (NOG) i *para* 2,4 dicarboxylic acid (2,4-PDCA) su dva supstrata koja inhibiraju Jmj domenu vežući se za željezo. (205, 206)
Tvar 3195 je derivat NOG (*N*-oxalylglycine) za kojeg se dokazala blaga aktivnost u sprječavanju rasta HeLa stanica. (207)

f) HDAC inhibitori

Aktivnost HDAC prisutna je samo u 2-10% kodirajućeg dijela genoma. (71) (175) Po kemijskoj strukturi inhibitori mogu biti hidroksamidne kiseline, kratki lanci masnih kiselina, benzamidi, ciklički tetrapeptidi, inhibitori sirtuina. (166). HDAC inhibitori se mogu podijeliti i s obzirom na metu djelovanja, sirtuinske i ne-sirtuinske inhibitore. Ovdje su prvo opisani ne-sirtuinski inhibitori. To su inhibitori koji inhibiraju I, II i IV klasu HDAC, te se zbog neselektivnosti zovu pan-HDACi. (168) Trihostatin A (TSA) i suberoilanilid hidroksiamična kiselina (SAHA) su prototipovi pan-HDACi. Daljnim istraživanjima otkriven je inhibitor Trapoksin (engl. *Trapoxin*). Njegova značajnost leži u činjenici da je skupina IIB bila pošteđena

učinka navedenog inhibitora. Zaključeno je da iako I, II i IV skupina imaju jako slično katalitičko mjesto, skupina IIB ima dovoljno različito aktivno mjesto da ta razlika bude upotrijebljena. S idejom da se na taj način poveća selektivnost HDACi razvijen je prvi selektivni HDAC inhibitor, Tubacin. (169, 170)

Što se tiče sirtuina, prirodni inhibitor sirtuina je nikotinamid, a prvi sintetski inhibitori su bili sirtinol i splitomicin. (171) Daljnjim razvojem inhibitora došlo je do podjele inhibitora sirtuina na dvije grupe. Prva grupa interagira s FAD veznim mjestom na deacetilazi, a druga s acetil lizinskim veznim mjestom. (172)

Inhibitori sirtuina imaju i biološke funkcije. Npr., sirtuinski inhibitor tenovin-6 u kombinaciji s Imatinibom (inhibitor protein kinaze) inducira acetilaciju p53, inhibira tumorski rast te eliminira tumorske stanice kronične mijelogene leukemije. (173) Kod sirtuinskih inhibitora valja spomenuti njihov neuroprotektivni učinak. Sirtuinski inhibitor AGK2 djeluje na HDAC Sirt2. Efekt te inhibicije je da se agregati sinukleina smanjuju u broju, a povećavaju u veličini, što djeluje neuroprotektivno. Ta sposobnost je dosta bitna u neurološkoj patologiji, npr. kod Parkinsonove bolesti. (174)

Prvi odobreni HDACi za primjenu u liječenju, koji je i pan-HDACi je Vorinostat. Inhibirajući histon deacetilaze, on podiže razinu acetiliranosti u stanici, što za posljedicu ima transkripcijske i netranskripcijske učinke. (208) Transkripcijski efekti su posljedica promijenjene ekspresije određenih gena koje Vorinostat postiže na dva načina. Direktno preko vezanja vorinostata za HDAC enzime te indirektno preko interakcije s transkripcijskim faktorima E2F-1, YY-1, Smad 7, p 53, Bcl 6 i GATA-1. (210) Netranskripcijski učinci vorinostata posljedica su pojačane aktivnosti proteina p21, inhibitora ciklin-ovisne kinaze, a time is staničnog ciklusa. (211) p21 uzrokuje apoptozu u hematološkim i solidnim tumorima aktivirajući intrinzični i ekstrinzični put apoptoze (212, 213), te inhibira angiogenezu uzrokovanu hipoksijom (215) i utišava imunosupresivne citokine. (216)

4. Epigenetičke modifikacije u tumorigenezi

Uz mutacije genoma, u stanicama raka narušen je i epigenetički profil jer su globalne promjene metilacije DNA, histonske modifikacije i te promjene u ekspresiji enzima koji modificiraju kromatin inicijatori nastanka i diobe tumorskih stanica u ljudskom tijelu. (32, 176)

Tako stanice raka pokazuju 20-60% gubitka metilacije po cijelom genomu, a s druge strane specifična područja pokazuju razne promjene metiliranosti. Time nastaje tumor-specifičan obrazac hipo- i hipermetiliranosti. (72) Nadalje, ukoliko su repetitivne sekvence hipometilirane, one postaju nestabilne. Genetička nestabilnost dovodi do translokacija, disrupcija gena, reaktivacije endoparazitskih sekvenci te stvaranja onkogena (177, 178) Hipometilirane repetitivne sekvence su npr. specifične za karcinom dojke i pluća. (73) Nadalje, hipometilacija u području promotora onkogena dovodi do pojačanja transkripcije onkogena.(179)

S druge strane, hipermetilacija je aberacija, koja je karakteristično nađena na CpG otocima. CpG otoci su često u promotorskoj regiji onih gena koji su regulatori i efektori važnih staničnih puteva: popravka DNA, apoptoze, vitaminskog odgovora, kontrole staničnog ciklusa, kao npr. retinoblastomski i p53 gen. (180) Hipermetilacija tih gena vodi u utišavanje istih gena što stanicu čini sklonijoj malignoj transformaciji. Zapravo u patogenezi raka to je toliko često da se hipermetilirani promotori predlažu da budu novi biomarkeri u dijagnostici i prognozi. (181) CpG obala je još jedno mjesto koje je značajno u kontekstu ovog poglavlja. Iako je fokus uglavnom na GpG otocima, nedavna istraživanja ukazuju na to da CpG obale imaju jednaku učestalost i važnost aberacije u stupnju metilacije kao što to imaju i otoci. (40, 41)

MiRNA promotori su također nađeni hipermetilirani u tumorima. To dovodi do smanjene regulatorne aktivnosti pogođenih miRNA. (182, 183) Osim zbog uloge regulacije u nastanku tumora, miRNA je značajna i u razvoju tumorskih metastaza. (184)

Što se tiče histonskih modifikacija, najučestalija histonska modifikacija koja je dio patogeneze tumora je globalna redukcija monoacetiliranog H4K16. To je posljedica neuravnoteže funkcije HDAC i HAT enzima. Naime u slučaju tumora događa se da su geni za histonske deacetilaze ili previše ekspresirani ili mutirani. (185, 186, 187) Primjer tako pogođenih proteina su sirtuini (Sir). Ekspresija Sir1 te njegova aktivnost su povećani u mnogim tumorima što ima za posljedicu veću acetilaciju histona i posljedično time pojačanu transkripciju. (188) Sir1 također utječe na DNMT1 enzime koji su zaduženi za metilaciju DNA te dovode do pogrešaka u kopiranju metilacijskih obrazaca nakon diobe. (189) Sustav miRNA je također uključen u regulaciju ekspresije HDAC proteina, npr. odnos miRNA-HDAC je značajan za nastanak karcinoma prostate. (160)

Globalnoj histonskoj hipoacetilaciji mogu pridonijeti i mutacije u području genoma koji kodira HAT enzime. Primjer tumora koji je povezan s nenormalnom funkcijom HAT enzima zbog genske mutacije su karcinom kolona i maternice. (190, 191)

Kao što postoje tipične acetilne oznake tumora, tako postoje i metilne oznake karakteristične za bolest. U stanicama raka može se naći globalni gubitak H3K4me3 koji je aktivni znak (152) te represivni znak H4K20me3. (153) Tipična metilacijska oznaka na histonima je u

mnogim vrstama stanica raka posljedica deregulirane ekspresije histonskih metiltransferaza i metilaza. (192, 193) Značajan i vrlo dobro opisan primjer je leukemija miješanog porijekla. To je bolest vrlo loše prognoze, a nastaje kao posljedica aberantne metilacije histona. DOT1L je metiltransferaza koja metilira H3K79 te je aktivna oznaka, znači da je transkripcija omogućena. Vrlo često taj enzim se nalazi u kompleksu s drugim proteinima čija je funkcija navođenje na određeno gensko mjesto. (159) Druga bitna metiltransferaza za ovu bolest je MLL1. Ovaj enzim metilira H3K4, te je također aktivna oznaka. Translokacija kromosoma 11:23 je karakteristika ove bolesti, čak je dio dijagnostičkog algoritma. U toj translokaciji geni koji kodiraju proteine koji navode DOT1L i s kojima je taj protein često u kompleksu se nalaze u blizini MLL1 gena. Posljedično, u bolesti MLL1 protein čini kompleks s navedenim proteinima, a često tu je i DOT1L što znači da su DOT1L i MLL unutar istog kompleksa, pa oba mogu metilirati histone. Tako nastaje aktivna oznaka na histonu gdje bi trebala biti represivna oznaka. Aktivna oznaka znači da se transkripcija može odvijati, a karakteristično u ovom slučaju transkribiraju se pro-leukemijski HOX geni. (241) (194, 195)

Kako studije pokazuju i histonska fosforilacija igra bitnu ulogu u patogenezi tumora, što logično proizlazi iz činjenice da fosforilacija igra ulogu u popravku DNA, održavanju kromosomske stabilnosti i indukciji apoptoze. Za Janus kinazu 2 (JAK2) je poznato da ima ulogu u citoplazmatskim signalnim putevima, a nedavno je dokazana njena prisutnost čak i u nukleusu. U nukleusu fosforilira i histonske i nehistonske proteine. JAK2 je često aktiviran kromosomskim translokacijama ili točkastim mutacijama te se vrlo često nalazi u hematološkim malignitetima. (196) Ruxolitinib je FDA odobreni lijek koji je inhibitor JAK1 i 2 signalnog puta (vidi niže).

I druge obitelji proteina koje remodeliraju kromatin sudjeluju u tumorigenezi, iako se za mnoge ne zna točan mehanizam. Jedan od primjera su BRG1 i BRM. To su proteinske ATPazne podjedinice SWI/SNF kompleksa. Za njh se smatra da imaju tumor-supresorsku funkciju. Pronađeno je su im geni utišani u 15-20% pacijenata oboljelih od primarnog velikostaničnog tumora pluća. (197) BRG1 je predložen kao destabilizator p52 (NFkappaB2) onkogena koji sudjeluje u razvoju raznih tumora poput prostate, dojke itd. (198, 199) Područja gena koji kodiraju za komplekse navedenog enzima su također regulirani metilacijom i kod tumora su često hipermetilirani. Smanjena razina tih enzima dovodi do neadekvatnog modeliranja kromatina. (200)

5. FDA odobreni epigenetički lijekovi

a) pan-HDAC inhibitori: Vorinostat, Belinostat, Romidepsin, Panobinostat

Primjena pan-HDACi u in vitro kulturi transformiranih tumorskih stanica uzrokovala je akumulaciju acetiliranih histona i drugih proteina, te povećaala ekspresiju tumor supresorskih gena. Naposlijetku, došlo je do zastoja u staničnom ciklusu inhibicije angiogeneze i indukcije apoptoze transformiranih stanica. Temeljem navedenih istraživanja, FDA je u prethodnom desettljeću odobrila nekoliko Pan-HDAC inhibitora (pan-HDACi) za liječenje tumora: vorinostat, belinostat, romidepsin i panobinostat.

Vorinostat je epigenetički lijek kojeg je FDA odobrila 2006. godine za liječenje kutanog T-staničnog limfoma (engl. CTCL (engl. Cutaneous t-cell lymphoma), rijetke heterogene skupine non-Hodgkin limfoma (222). Vorinostat je inhibitor histonskih deacetilaza skupina I, II te strukturno pripada hidroksimatima, lijekovima s antineoplastičnim učinkom koji na epigenetičkoj razini imaju višestruki efekt na stanični rast, diferencijaciju, apoptozu. Koristi se kao mono-terapija ili u kombinaciji s drugim antineoplastičnim lijekovima. (217) Vorinostat je indiciran za liječenje navedenog tipa limfoma u slučaju kada bolest perzistira ili recidivira tijekom ili nakon dva sistemska tretmana (217) kad kod nekih pacijenata dođe do otpornosti na konvencionalne lijekove. (242)

Za odobrenje Vorinostata bile su ključne dvije studije. Prva studija je imala za cilj doznati učinkovitost lijeka u smislu odgovora bolesti na tretman. U studiju su uključeni pacijenti s dijagnozom CTCL koji su prethodno primili barem dvije sistemske terapije, od kojih je jedna morala biti Bexaroten, sveukupno 74 pacijenta. Na liječenje Vorinostatom odgovorilo je 29.7% pacijenata. Druga studija je imala za cilj odrediti najbolji način doziranja. 33 pacijenta su podijeljena u tri kohorte. Prva kohorta je svakodnevno dobivala 400 mg, druga kohorta je nudila doziranje od 300 mg, dva puta na dan, 3 dan u tjednu, a treća kohorta je nudila doziranje od 300 mg, dva puta na dan, 14 dana, praćeno tjednom pauze. Najbolji odgovor je pokazala treća kohorta, 33.3%, ali u odnosu na prvu kohortu imala je više nuspojava. Prva kohorta s odgovorom od 30.8% je uzeta kao smjernica. (217)

Vorinostat je odobren za oralnu administraciju, toksičnost se javlja pri dozama većim od 400 mg na dan, a najčešće nuspojave su slabost, dijareja i mučnina. Kod primjene na trudnicama, ovaj lijek pripada kategoriji D jer je pokazano da prelazi placentu i djeluje teratogeno, uzrokujući nisku porođajnu težinu, nekompletnu osifikaciju lubanje te drugih kostiju aksijalnog kostura. (217)

Razne kliničke studije su pokazale da se vorinostat može koristiti i za druge tipove tumora. Tako je difuzni veliki B-stanični limfom pokazao kompletnu remisiju nakon tretmana Vorinostatom, a dobri rezultati dobiveni su i kod liječenja mezotelioma, laringealnog i tiroidnog tumora. (243) Danas se istražuje njegova primjena u liječenju glioblastoma, a i dalje se provode studije koje bi dokazale učunkovitost vorinostata ili samog ili u kombinaciji s drugim lijekovima. (217)

Romidepsin je stekao FDA odobrenje 2009. godine u USA za liječenje CTCL. To je prirodni produkt gram negativne bakterije Chromobacterium violaceum. U izvornom obliku je prolijek, tj. aktivira se u stanici redukcijom koju provodi glutation. Mehanizam djelovanja ostvaruje slobodna tiolna skupina u strukturi lijeka koja reagira s cinkovim ionima na aktivnom mjestu HDAC I i II enzima (218)

Dvije studije su zaslužne za odobrenje Romidepsina za liječenje CTCL. Obje studije su imale slične ciljeve te su pokazale vrlo slične rezultate. U prvu studiju je uključeno 96 pacijenata koji su prethodno primili jednu sistemsku terapiju. U drugu studiju je bio uključen 71 pacijent koji su prethodno primili dvije terapije usmjerene na kožu i jednu ili više sistemskih terapija. Odgovor je pokazalo 34%, tj. 35% pacijenata (218)

Romidepsin je 2011. godine odobren i za liječenje perifernog T-staničnog limfoma (PTCL) na temelju studije koja je pokazala pozitivan odgovor u 26% pacijenta. Preporučena doza je 14 mg/m2. Od nuspojava najčešće se javljala mijelosupresija kao trombocitopenija, leukopenija ili anemija. Lijek je, kao i vorinostat, izrazito embriotoksičan. (218)

Belinostat, po strukturi sulfonamid-hidroksiamid je odobren od FDA 2014.godine za tretman relapsirajućeg i refraktornog perifernog T-staničnog limfoma (PTCL). (219) Periferni T-stanični limfom (PTCL) je rijetka i heterogena skupina agresivnih limfoidnih maligniteta koji čine 10% non-Hodgkin limfoma. Imaju slab odgovor na liječenje te nisko petogodišnje preživljenje. (244, 245, 246, 247, 248) Epigenetički markeri ovog tumora su promijenjen stupanj metilacije DNA, te prisutnost patoloških histonskih modifikacija, što ih čini dobrim kandidatima za epigenetičko liječenje, tim više što su druge opcije dale slabe rezultate. (250)

Studija koja je dovela do odobrenja belinostata je BELIEF studija sa uključenih 129 pacijenata koji su bolovali od PTCL. Na liječenje je odgovorilo 25.8% pacijenata, medijan trajanja odgovora je bio 8.4 mj., medijan do odgovora je bio 5,6 tjedana. (219)

Preporučena doza belinostata je 1000 mg/m^2. Neutropenija, trombocitopenija, anemija su moguće nuspojave, ali je nađeno da belinostat ima i hepatotoksičan i gastrotoksičan učinak. Kod primjene u trudnica, kao i ostali, pripada kategoriji D.(219)

Panobinostat je oralni pan-HDACi koji je 2015. godine odobren od strane FDA. Kao glavnu indikaciju ima multipli mijelom (251). Za liječenje se koristi u sinergističkoj kombinaciji s bortezomidom (proteasomalnim inhibitorom) i deksametazonom gdje djeluju citotoksično, a on sam ima djelovanje na represiju trankripcije i translacije (220)

Pozitivan učinak panabinostat je dokazan u kliničkoj studiji PANORAMA. U studiju su bilo uključeno 768 pacijenata koji su prethodno primili 1-3 terapije drugim lijekovima. Prva skupina pacijenata je primala panobinostat, bortezomid i deksametazon, druga skupina je primila bortezomid i deksametazon te placebo. Preživljenje bez napretka bolesti je u prvoj skupini zabilježeno s 12 mj, u drugoj s 8.1 mj. Od nuspojava najznačajnije su bile dijareja, umor, periferni edem, hipokalemija. od hematoloških trombocitopenija, leukopenija, neutropenija, anemija. (220)

b) 5-azacitidin i decitabin

Azacitidin je otkriven 1968. godine te je prvi hipometilirajući lijek odobren 2004. godine od strane FDA za liječenje mijelodisplastičnog sindroma (MDS) (221). MDS je skup heterogenih hematoloških poremećaja koji su karakterizirani abnormalnim funkcioniranjem i sazrijevanjem pluripotentne matične stanice, te disfunkcionalnom hematopoezom. (252, 253, 254, 255) Danas se smatra da Azacitidin ima antineoplastično svojstvo i to zahvaljujući dvojnom efektu. Lijek uzrokuje hipometilaciju, te izravnu citotoksičnost abnormalnih hematopoetskih stanica u koštanoj srži (vidi poglavlje: *Inhibitori metilacije*). Citotoksični efekt azacitidin poglavito pokazuje na stanicama koje se brzo dijele.

Kod pacijenata s MDS-om nađena je hipermetilacija gena $p15^{INK4b}$. Ovaj gen ima tumor-supresorsku funkciju jer je inhibitor ciklin-ovisne kinaze. Kao posljedica hipermetilacije $p15^{INK4b}$ u svojoj DNA, stanice koštane srži nenormalno proliferiraju te progrediraju u AML. (256) Stoga bi hipometilirajuće djelovanja azacitidina pojačalo sintezu i aktivnost $p15^{INK4b}$.

Azacitidin je odobren u studiji koja je uključivala 191 pacijenata sa MDS. 15.7% pacijenata je odgovorilo pozitivno na tretman azacitidinom za razliku od kontrolne skupine gdje nije bilo nikakvog poboljšanja. Primjena azacitidina u koštanoj srži je smanjila broj blasta, a u krvi je povećan broj trombocita, hemoglobina i leukocita.

Preporučena početna doza azacitidina je 75 mg/m2. Najčešće nuspojave primjene azacitidina su mučnina, anemija, trombocitopenija, povraćanje, pireksija, leukopenija, dijareja, slabost, eritem na mjestu administracije. Kod primjene na trudnicama također pripada kategoriji D. U muškaraca pak može doći do karcinogeneze, mutageneze, nepravilnosti začeća. (221)

Decitabin je 2006. odobren za liječenje MDS. To je citidinski analog koji se ugrađuje u DNA i RNA, te kao i oni ima hipometilirajući učinak, slično azacitidinu. Odobren je u kliničkoj

studiji koja je uključivala 170 pacijenata sa MDS. Prvu skupinu činilo je 89 pacijenata koji su primali decitabin i suportivnu terapiju, dok je druga skupina od 82 pacijenata je primala samo suportivnu terapiju. Odgovor je pokazalo 21% pacijenata u prvoj skupini u odnosu na 0% pacijenata u drugoj skupini. (257)

c) Ruxolitinib

Ruxolitinib je janus kinazni (JAK) inhibitor odobren 2011. godine od strane FDA za liječenje mijelofibroze, a 2014. za liječenje policitemije vere. Mijelofibroza je bolest abnormalne proliferacije pluripotentnih hematopoetskih matičnih stanica (261). Može biti primarna (de novo) ili sekundarna, nakon otprije poznate bolesti kao što je esencijalna trombocitemija ili policitemija vera. (259) Postoji više mutacija koje uzrokuju bolest (JAK2, kalretikulin (CALR) ili MPL gena), ali sve dovode do abnormalne aktivacije citokinskog receptora/JAK2 puta te aktivacije njihovih efektorskih molekula (260) Osim transplantacije koštane srži, liječenje mijelofibroze se svodi na simptomatsko liječenje.

Ruxolitinib je selektivni kinazni inhibitorje inhibira JAK 1 i 2. Navedene kinaze su odgovorne za povezivanje aktivnosti citokina i signalizacije faktora rasta što utječe na funkciju imunosnog sustava i hematopoeze. (258) Na molekularnoj razini inhibicija JAK dovodi do nemogućnosti aktivacije STAT trankripcijskih faktora putem njihova povezivanja sa citokinskim receptorima, čime se negativno modulira ekspresija gena. (258)

Ruxolitinib je odobren na temelju dvije randomizirane kliničke studije COMFORT-I I COMFORT-II. (engl. Controlled Myelofibrosis Study with Oral JAK Inhibitor Treatment). U tim studijama dokazala se učinkovitost ruxolitiniba u odnosu na placebo ili najbolju dostupnu terapiju. Rezultat studije COMFORT-I je pokazao da ruxolitinib dovodi do smanjenja splenomegalije za 35% ili više kroz 24 tjedna terapije u 41.9% pacijenata. COMFORT-II studija je dokazala smanjenje splenomegalije za 35% ili više kroz 48 tjedana terapije u 28% pacijenata. (258)

2014. godine ruxolitinib je dobio još jednu indikaciju – kao prvi FDA lijek odobren je za liječenje policitemije vera (PV), za pacijente koji imaju neadekvatan odgovor ili su intolerantni na hidroksiureju. (262) Policitemija vera je inače bolest koja nastaje kao posljedica proliferacije krvnih stanica. (263), češće u muškaraca te u starijih ljudi. Uobičajeno je za ovu bolest da otkrije slučajno jer je dugo vremena asimptomatska, a simptomi su uglavnom posljedica tromba koji nastaju zbog hiperviskoznosti krvi. (264, 265)

Ruxolitinib je odobren u RESPONSE studiji. (258) Rezultati studije su istaknuli učinkovitost Ruxolitiniba u smislu smanjenja simptoma i povećanja preživljenja. Najčešće

nuspojave ovog lijeka su hematološke (anemija), a od nehematoloških izdvajaju se glavobolja i abdominalna bol, dok kod primjene u trudnoći pripada također kategoriji D (258)

6. Ne-epigenetički FDA odobreni lijekovi s epigenetičkim učinkom i "repurposing"

Epigenetički učinak lijekova kojima prvenstvena zadaća nije epigenetički učinak je nuspojava koja može biti korisna ili štetna za pacijenta. Poznavanje epigenetičkog učinka farmakoloških pripravaka (lijekova) je važno jer rasvjetljava i nepoznate činjenice o mnogim bolestima. činjenice. Pogotovo je značajno znati sve učinke lijekova koji se koriste kao dugoročna terapija. (222) Najpoznatiji primjer lijeka koji je odobren kao neepigenetički lijek, ali kasnije je otkriven njegov epigenetički učinak je valproična kiselina, odnosno valproat (VPA). Valproična kiselina je poznata kao stabilizator raspoloženja i antiepileptik, no međutim pokazalo se da ima potentan epigenetički učinak. Kasnija istraživanja su pokazala da valproat svojim djelovanjem utječe na ekspresiju čak 461 gena. (222) Epigenetički učinak postiže tako da djeluje kao inhibitor HDAC. Svojim djelovanjem blokira deacetilaciju histona H3 i H4 zbog čega se pojačava trankripcija i translacija dopamina, norepinefrina i epinefrina i time djeluje neuropretektivno. (223, 224)

Drugo iznenađenje, odnosno neepigenetički lijekovi s epigenetičkim učinkom bili su Statini. Statini su inicijalno odobreni kao inhibitori enzima 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktaza. Za statine je poslije utvrđeno da imaju epigenetički učinak koji postižu djelujući dvojako, na HDAC te kao modulatori miRNA aktivnosti. Statini su tako u humanim endotelnim stanicama restorirali aktivnost HDAC te deacetilaciju H3 te H4 čime je smanjeno stvaranje proinflamatornog citokina IL-8 koji je povezan s aterosklerozom. (225)

Za identifikaciju novih indikacija već poznatih lijekova predlaže se proces koji se zove "drug repositioning or repurposing". Naime, FDA odobreni lijekovi koji se nalaze u FDA bazama podataka već su prošli toksično ocjenjivanje te su poznate njhove farmakodinamske i kinetičke karakteristike. (226) Stoga FDA odobreni lijekovi mogu proći kroz HTS koji omogućava screening raznih molekularnih kombinacija u liječenju neke bolesti. Znači lijekovi s epigenetičkim učinkom se, osim nalaženja novih indikacija, testiraju i u kombinacijama s drugim lijekovima. U takvim istraživanjima se pokazalo da 45 FDA odobrenih lijekova ima epigenetički učinak, tj. pojačava učinak DNMT1 i HDACi. Ti lijekovi uglavnom pripadaju antiaritmijskim lijekovima i antikanceroznim lijekovima.. Najpotentniji učinak ima kombinacija proscilaridina A

(antiaritmijski lijek) i decitabina (DNMTi), gdje je ta kombinacija reprogramirala gensku ekspresiju 153 epigenetička regulatora, od kojih su dva onkogeni. S druge strane, 85 FDA odobrenih lijekova je sada poznato da imaju antagonizirajući učinak (citotoksičnost) na djelovanje epigenetičkih lijekova. (227)

7. Epigenetički lijekovi u kombinacijskom liječenju

Već je poznato da epigenetički lijekovi imaju sinergistički učinak s drugim epigenetičkim lijekovima, kemoterapijom, imunoterapijom i ciljanim lijekovima. Do sinergije dolazi zato što epigenetički lijekovi smanjuju prag apoptoze, smanjuju rezistenciju na lijekove, i induciraju imunološki odgovor. (54, 90, 92, 164) Dokazane su sinergističke kombinacije s kemoterapeuticima kao što su rinoična kiselina, cisplatina, karboplatin, klofarabine, s ciljanim lijekovima erlotinib, imunoterapijom IL-2. (165, 167, 214, 228, 229, 239)

Citotoksični lijekovi koji zaustavljaju stanični ciklus i uzrokuju apoptozu su se pokazali ponekad kao antagonisti epigenetičkim učincima. Mehanizam koji bi mogao biti je taj da citotoksični lijekovi smanjuju stabilnost tumor supresorskog gena te povećavaju staničnu toksičnost, a epigenetički lijekovi stabiliziraju tumor supresore. S druge strane moguće je da epigenetički lijekovi smanjuju rezistenciju stanica na lijekove, te se prag za indukciju apoptoze smanjuje pogotovo u stanicama koje ekspresiraju tumor supresor gene. (230, 240)

Kombinirana terapija je ipak već dugi niz godina u upotrebi i pokazala se uspješnom u većini slučajeva. Razlog tome je taj što jedna bolest često ima nekoliko prisutnih nepovezanih molekularnih poremećaja. Takvu bolest je poželjnije tretirati kao višeciljnu, a kako se ciljevi (molekularne farmakološke mete) razlikuju od pojedinca do pojedinca, to liječnike stručnjake navodi na razmišljanje o personaliziranoj medicini. (231)

Osim što je kombinirana terapija korisna u svrhu liječenja, može biti korisna i na indirektan način. Točnije, citotoksični lijekovi nerijetko dovode do rezistencije, a to se smatra posljedicom promjene epigenetičkog profila pacijenta. Uvođenjem lijeka koji bi reprogramirao epigenetički profil, pacijent ne bi razvio rezistenciju na citotoksični lijek. (232) Ovakav pristup se pokazao dobrim u određenom postotku u liječenju mnogih vrsta tumora. (233)

8. Zaključak

Projekt sekvencioniranja DNA i RNA tumora je doprinio mnoštvom informacija o sinergiji genetičkih mutacija i regulacije ekspresije gena (epigenetičkih promjena). Ujedinjujući te informacije biti će moguće odrediti epigenetički profil tumora ili neke druge bolesti te značaj svake epigenetičke promjene za progresiju iste. U budućnosti to vodi personaliziranoj medicini jer će svaki pacijent imati mogućnost da mu se odredi epigenetski profil bolesnog tkiva nakon čega će dobiti ciljanu terapiju. Nadalje, epigenetički biomarkeri bolesti su stabilni i ta se činjenica koristi za dijagnostičku i prognostičku svrhu, pa su se razvile tehnologije koje kao neinvazivni biološki uzorak mogu koristiti tjelesne tekućine (plazma, urin, likvor its.) te se i u njima mogu odražavati epigenetičke promjene čija analiza doprinosi izboru liječenja.

Epigenetska terapija, bazirana na interferenciji sa patološkim epigenetičkim mehanizmima se pokazala učinkovitom u mnogim bolestima od otkrića epigenetičkih lijekova prije više od 50 godina do danas, a vjerojatno je da će i budućnosti doći do ekspanzije istraživanja i uporabe ovakvih lijekova u medicini.

9. Zahvale

Zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Ani Katušić-Bojanac. Zahvaljujem se svima i svemu što je bilo i veselim se nepoznatom.

10. Literatura

1. Ptak C, Petronis A. Epigenetics and complex disease: from etiology to new therapeutics. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2008;48:257–276.

2. Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. Semin Reprod Med. 2009;27(5):351–357.

3. Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R, Pazdur RFDA. Approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. Oncologist. 2007;12:1247–1252.

4. Mikaelsson MA, Miller CA. The path to epigenetic treatment of memory disorders. Neurobiol Learn Mem. 2011;96:13–18.

5. Huber LC, Stanczyk J, Jungel A, Gay S. Epigenetics in inflammatory rheumatic diseases. Arthritis Rheum. 2007;56:3523–3531.

6. Petronis A, Gottesman II, Kan P, Kennedy JL, Basile VS, Paterson AD , Popendikyte V. Monozygotic twins exhibit numerous epigenetic differences: clues to twin discordance? Schizophr Bull. 2003;29(1):169–178.

7. Watt F, PL. MolloyCytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. Gene Dev. 1988;2(9):1136-1143.

8. Robertson KD. DNA methylation and human disease. Nat Rev Genet. 2005;6(8):597-610.

9. Bhutani N, Burns DM, Blau HM. DNA demethylation dynamics. Cell.2011;146(6):866–872.

10. Davey CA, Sargent DF, Luger K, Maeder AW, Richmond TJ. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution. J Mol Biol. 2002;319(5):1097–1113.

11. Franchini DM, Schmitz KM, Petersen-Mahrt SK. 5-Methylcytosine DNA demethylation: more than losing a methyl group. Annu Rev Genet. 2012;46:419–441.

12. Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. Genes Dev. 2014;28(8):812–828.

13. Cheng X, Roberts RJ. AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. Nucleic Acids Res. 2001;29(18):3784–3795.

14. Hermann A, Goyal R, Jeltsch A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. The Journal of Biological Chemistry. 2004;279(46):48350–9.

15. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev. 2002;16:6–21.

16. Graff J, Kim D, Dobbin M.M, Tsai LH. Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. Physiol. Rev. 2011;91:603–649.

17. Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BFL. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. Science. 1997;277(5334):1996–2000.

18. Bostick M, Kim JK, Estève PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. Science. 2007;317(5845):1760–1764.

19. Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE, Bestor TH. Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. Science. 2006;311(5759):395–398.

20. Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, Walter J, Surani MA. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. Mech. Dev. 2002;117(1-2):15-23.

21. Barton SC, Arney KL, Shi W, Niveleau A, Fundele R, Surani MA, Haaf T. Genome-wide methylation patterns in normal and uniparental early mouse embryos. Hum Mol Genet. 2001;15;10(26):2983-7.

22. Ratnam S, Mertineit C, Ding F, Howell CY, Clarke HJ, Bestor TH, Chaillet JR, Trasler JM. Dynamics of Dnmt1 methyltransferase expression and intracellular localization during oogenesis and preimplantation development. Dev Biol. 2002;15;245(2):304-14.

23. Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. Hum Mol Genet. 2005;15;14(1):47-58.

24. Ding F, Chaillet JR. In vivo stabilization of the Dnmt1 (cytosine-5)- methyltransferase protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;12;99(23):14861-6.

25. Seisenberger S, Peat JR, Hore TA, Santos F, Dean W, Reik W. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. 2013;368(1609):20110330.

26. Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. Science. 2001;294:2536–2539.

27. Chen ZX, Mann JR, Hsieh CL, Riggs AD, Chedin F. Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. J. Cell. Biochem. 2005;95:902–917.

28. Holz-Schietinger C, Reich NO. The inherent processivity of the human de novo DNA methyltransferase 3A (DNMT3A) is enhanced by DNMT3L. J Biol Chem. 2010;285:29091–29100.

29. SanMiguel P, Tikhonov A, Jin YK, Motchoulskaia N, Zakharov D, Melake-Berhan A, Springer PS, Edwards KJ, Lee M, Avramova Z, Bennetzen JL. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. Science. 1996;274(5288):765–8.

30. Fellinger K, Rothbauer U, Felle M, Längst G, Leonhardt H. Dimerization of DNA methyltransferase 1 is mediated by its regulatory domain. J Cell Biochem. 2009;106(4):521–528.

31. Rai K, Chidester S, Zavala CV, Manos EJ, James SR, Karpf AR, Jones DA, Cairns BR. Dnmt2 functions in the cytoplasm to promote liver, brain, and retina development in zebrafish. Genes Dev. 2007;21(3):261–266.

32. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. Nat. Rev. Genet. 2007;8:286–298.

33. Shiota K. DNA methylation profiles of CpG islands for cellular differentiation and development in mammals. Cytogenet Genome Res. 2004;105(2-4):325-34.

34. Mazin AL, Vaniushin BF. The loss of CpG dinucleotides from DNA. I. Methylated and non-methylated genome compartments in eukaryotes with different levels of 5-methylcytosine in DNA. Mol Biol (Mosk). 1987;21(2):543-51.

35. Kremenskoy M, Kremenska Y, Ohgane J, Hattori N, Tanaka S, Hashizume K, Shiota K. Genome-wide analysis of DNA methylation status of CpG islands in embryoid bodies, teratomas, and fetuses. Biochem Biophys Res Commun. 2003;28;311(4):884-90.

36. Cross SH, Bird AP. CpG islands and genes. Curr Opin Genet Dev. 1995;5(3):309-14.

37. Zardo G, Caiafa P. The unmethylated state of CpG islands in mouse fibroblasts depends on the poly(ADP-ribosyl)ation process. J Biol Chem. 1998;26;273(26):16517-20.

38. Serman A, Vlahović M, Serman L, Bulić-Jakus F. DNA methylation as a regulatory mechanism for gene expression in mammals. Coll Antropol. 2006;30(3):665-71.

39. Kaur S, Lotsari-Salomaa JE, Seppänen-Kaijansinkko R, Peltomäki P. MicroRNA Methylation in Colorectal Cancer. Adv. Exp. Med. Biol. Advances in Experimental Medicine and Biology. 2016;937:109–22.

40. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash J, Sabunciyan S, Feinberg AP. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. Nat Genet. 2009;41(2):178-186.

41. Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, Herb B, Ladd-Acosta C, Rho J, Loewer S, Miller J, Schlaeger T, Daley GQ, Feinberg AP. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. Nat. Genet. 2009;41:1350–1353.

42. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev. 20021;16(1):6-21.

43. Ballestar E, Wolffe AP. Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. Eur J Biochem. 2001;268(1);1-6.

44. Jin L, Garcia J, Chan E, de la Cruz C, Segal E, Merchant M, Kharbanda S, Raisner R, Haverty PM, Modrusan Z, Ly J, Choo E, Kaufman S, Beresini MH, Romero FA, Magnuson S, Gascoigne KE. Therapeutic Targeting of the CBP/p300 Bromodomain Blocks the Growth of Castration-Resistant Prostate Cancer. Cancer Res. 2017;15;77(20):5564-5575.

45. Lawrence M, Daujat S, Schneider R. Lateral thinking: How histone modifications regulate gene expression. Trends Genet. 2016;32(1):42–56.

46. Daujat S, Zeissler U, Waldmann T, Happel N, Schneider R. HP1 binds specifically to Lys26-methylated histone H1.4, whereas simultaneous Ser27 phosphorylation blocks HP1 binding. J Biol Chem. 2005;280:38090–38095.

47. Fei HJ, Zu LD, Wu J, Jiang XS, Wang JL, Chin YE, Fu GH. PCAF acts as a gastric cancer suppressor through a novel PCAF-p16-CDK4 axis. Am J Cancer Res. 2016;6(12):2772–2786.

48. Rando OJ, Chang HY. Genome-wide views of chromatin structure. Annu Rev Biochem. 2009;78:245–271.

49. Huertas D, Sendra R, Munoz P. Chromatin dynamics coupled to DNA repair. Epigenetics. 2009;4:31–42.

50. Luco RF, Pan Q, Tominaga K, Blencowe BJ, Pereira-Smith OM, Misteli T. Regulation of alternative splicing by histone modifications. Science. 2010;327:996–1000.

51. Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. Cell. 2007;128:693–705.

52. Verdin E. Ott, M. 50 years of protein acetylation: From gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. Nat Rev Mol Cell Biol. 2015;16:258–264.

53. Finazzi G, Caruso V, Marchioli R, Capnist G, Chisesi T, Finelli C, Gugliotta L, Landolfi R, Kutti J, Gisslinger H, Marilus R, Patrono C, Pogliani EM, Randi ML, Villegas A, Tognoni G, Barbui T for the ECLAP Investigators. Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. Blood. 2005;105(7):2664–2670.

54. Owonikoko TK, Ramalingam SS, Kanterewicz B, Balius TE, Belani CP, Hershberger PA. Vorinostat increases carboplatin and paclitaxel activity in non-small-cell lung cancer cells. Int J Cancer. 2010;126:743-55.

55. Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. Annu Rev Biochem. 2007;76:75–100.

56. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. Cell. 2004;119(7):941–953.

57. Trojer P, Li G, Sims RJ 3rd, Vaquero A, Kalakonda N, Boccuni P, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Nimer SD, Wang YH, Reinberg D. L3MBTL1, a histone-methylation-dependent chromatin lock. Cell. 2007;129(5):915–928.

58. Das C, Lucia MS, Hansen KC, Tyler JK. CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. Nature. 2009;459(7243):113–117.

59. Yuan H, Marmorstein R. Histone acetyltransferases: Rising ancient counterparts to protein kinases. Biopolymers. 2013;99(2):98–111.

60. Valor LM, Viosca J, Lopez-Atalaya JP, Barco A. Lysine acetyltransferases CBP and p300 as therapeutic targets in cognitive and neurodegenerative disorders. Curr. Pharm. Des. 2013;19(28):5051–5064.

61. Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. Cell. 1996;87(5):953–959.

62. Goodman RH, Smolik S. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. Genes Dev. 2000;14(13):1553–1577.

63. Iyer NG, Ozdag H, Caldas C. P300/CBP and cancer. Oncogene. 2004;23(24);4225–4231.

64. Schiltz RL, Nakatani Y. The PCAF acetylase complex as a potential tumor suppressor. Biochim Biophys Acta. 2000;1470(2):M37–M53.

65. Blanco JC, Minucci S, Lu J, Yang XJ, Walker KK, Chen H, Evans RM, Nakatani Y, Ozato K. The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. Genes Dev. 1998;12(11):1638–1651.

66. Jin Y, Zeng SX, Lee H, Lu H. MDM2 mediates p300/CREB-binding protein-associated factor ubiquitination and degradation. J. Biol. Chem. 2004;279(19):20035–20043.

67. Judes G, Rifai K, Ngollo M, Daures M, Bignon YJ, Penault-Llorca F, Bernard-Gallon D. A bivalent role of TIP60 histone acetyl transferase in human cancer. Epigenomics. 2015;7(8):1351–1363.

68. Achour M, Fuhrmann G, Alhosin M, Ronde P, Chataigneau T, Mousli M, Schini-Kerth VB, Bronner C. UHRF1 recruits the histone acetyltransferase Tip60 and controls its expression and activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009;390(3):523–528.

69. Wood H. FDA approves patisiran to treat hereditary transthyretin amyloidosis. Nature Reviews. Neurology 2018 Oct;14(10):570.

70. Tikhanovich I, Kuravi S, Artigues A, Villar MT, Dorko K, Nawabi A, Roberts B, Weinman SA. Dynamic arginine methylation of tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 6 regulates toll-like receptor signaling. J Biol Chem. 2015;290(36):22236–22249.

71. Belvedere S, Witter DJ, Yan J, Secrist JP, Richon V, Miller TA. Aminosuberoyl hydroxamic acids (ASHAs): a potent new class of HDAC inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 2007;17(14):3969–3971.

72. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. Hum. Mol. Genet. 2007;16(1):R50–R59.

73. Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. Biochim Biophys Acta. 2007;1775(1):138–162.

74. Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, Buchou T, Cheng Z, Rousseaux S, Rajagopal N, Lu Z, Ye Z, Zhu Q, Wysocka J, Ye Y, Khochbin S, Ren B, Zhao Y. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. Cell. 2011;146(6):1016–1028.

75. Graff J, Kim D, Dobbin MM, Tsai LH. Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. Physiol Rev. 2011;91(2):603–649.

76. Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. Cell. 2007;128(4):707–719.

77. Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. Nature 2006;439(7078):811–816.

78. Trojer P, Li G, Sims RJ 3rd, Vaquero A, Kalakonda N, Boccuni P, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Nimer SD, Wang YH, Reinberg D. L3MBTL1, a histone-methylation-dependent chromatin lock. Cell. 2007;129(5):915–928.

79. Nielsen AL, Oulad-Abdelghani M, Ortiz JA, Remboutsika E, Chambon P, Losson R. Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. Mol. Cell. 2001;7(4):729–739.

80. Lee MG, Villa R, Trojer P, Norman J, Yan KP, Reinberg D, Di Croce L, Shiekhattar R. Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. Science. 2007;318(5849):447–450.

81. Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. Genes Dev. 2002;16(22):2893–2905.

82. Bannister A J, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Res. 2011;21(3):381–395.

83. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. Cell 2007;128(4):693–705.

84. Kirmizis A, Santos-Rosa H, Penkett CJ, Singer MA, Vermeulen M, Mann M, Bähler J, Green RD, Kouzarides T. Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. Nature. 2007;449(7164):928–932.

85. Guccione E, Bassi C, Casadio F, Martinato F, Cesaroni M, Schuchlautz H, Lüscher B, Amati B. Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. Nature. 2007;449(7164):933–937.

86. Boriack-Sjodin PA, Swinger KK. Protein methyltransferases: a distinct, diverse, and dynamic family of enzymes. Biochemistry. 2016;55(11):1557–1569.

87. Schapira M, Arrowsmith CH. Methyltransferase inhibitors for mod-ulation of the epigenome and beyond. Curr Opin Chem Biol. 2016;33:81–87.

88. Copeland RA, Moyer MP, Richon VM. Targeting genetic alterations in protein methyltransferases for personalized cancer therapeutics. Oncogene. 2013;32(8):939–946.

89. Moore KE, Gozani O An unexpected journey: lysine methylation across the proteome. Biochim Biophys Acta. 2014;1839(12):1395–1403.

90. Bachmann PS, Piazza RG, Janes ME, Wong NC, Davies C, Mogavero A, Bhadri VA, Szymanska B, Geninson G, Magistroni V, Cazzaniga G, Biondi A, Miranda-Saavedra D, Göttgens B, Saffery R, Craig JM, Marshall GM, Gambacorti-Passerini C, Pimanda JE, Lock RB. Epigenetic silencing of BIM in glucocorticoid poor-responsive pediatric acute lymphoblastic leukemia, and its reversal by histone deacetylase inhibition. Blood. 2010;116(16):3013–22.

91. Wei H, Mundade R, Lange KC, Lu T. Protein arginine methylation of non-histone proteins and its role in diseases. Cell Cycle. 2014;13(1):32–41.

92. Wrangle J, Wang W, Koch A, Easwaran H, Mohammad HP, Vendetti F, Vancriekinge W, Demeyer T, Du Z, Parsana P, Rodgers K, Yen RW, Zahnow CA, Taube JM, Brahmer JR, Tykodi SS, Easton K, Carvajal RD, Jones PA, Laird PW, Weisenberger DJ, Tsai S, Juergens RA, Topalian SL, Rudin CM, Brock MV, Pardoll D, Baylin SB. Alterations of immune response of non-small cell lung cancer with azacytidine. Oncotarget. 2013;4(11):2067–79.

93. Muller J, Hart CM, Francis NJ, Vargas ML, Sengupta A, Wild B, Miller EL, O'Connor MB, Kingston RE, Simon JA. Histone methyltransferase activity of a drosophila polycomb group repressor complex. Cell. 2002;111(2):197–208.

94. Yan KS, Lin CY, Liao TW, Peng CM, Lee SC, Liu YJ, Chan WP, Chou RH. EZH2 in cancer progression and potential application in cancer therapy: A friend or foe? Int J Mol. Sci. 2017;18(6):1172.

95. Jones BA, Varambally S, Arend RC. Histone methyltransferase EZH2: A therapeutic target for ovarian cancer. Mol. Cancer Ther. 2018;17(3):591–602.

96. Walport LJ, Hopkinson RJ, Chowdhury R, Schiller R, Ge W, Kawamura A, Schofield CJ. Arginine demethylation is catalysed by a subset of JmjC histone lysine demethylases. Nat Commun. 2016;7:11974.

97. Grant PA. A tale of histone modifications. Genome Biol. 2001;2(4):3.

98. Shilatifard A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: Implications in the regulation of gene expression. Annu Rev Biochem. 2006;75:243–269.

99. Weake VM, Workman JL. Histone ubiquitination: Triggering gene activity. Mol Cell. 2008;29(6):653–663.

100. Liu HW, Zhang J, Heine GF, Arora M, Gulcin Ozer H, Onti-Srinivasan R, Huang K, Parvin JD. Chromatin modification by sumo1 stimulates the promoters of translation machinery genes. Nucleic Acids Res. 2012;40(20):10172–10186.

101. Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. Cell. 2007;128(4):707–719.

102. Karlic R, Chung HR, Lasserre J, Vlahovicek K, Vingron M. Histone modification levels are predictive for gene expression. Proc Natl Acad Sci. USA 2010;107(7):2926–2931.

103. Zaratiegui M, Irvine DV, Martienssen RA. Noncoding RNAs and gene silencing. Cell 2007;128(4):763–776.

104. Moazed D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. Nature 2009;457(7228):413–420.

105. Grewal SI, Jia S. Heterochromatin revisited. Nat Rev Genet. 2007;8(1):35–46.

106. Chow J, Heard E. X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome. Curr Opin Cell Biol. 2009;21(3):359–366.

107. Agrelo R, WutZ A. X inactivation and disease. Semin Cell Dev Biol. 2010;21(2):194–200.

108. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, Chang HY. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. Cell. 2007;129(7):1311–1323.

109. Santos-Rosa H, Kirmizis A, Nelson C, Bartke T, Saksouk N, Cote J, Kouzarides T. Histone H3 tail clipping regulates gene expression. Nat Struct Mol Biol. 2009;16(1):17–22.

110. Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, Schones DE, Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Peng W, Zhang MQ, Zhao K. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. Nat. Genet. 2008;40(7):897–903.

111. Duan Q, Chen H, Costa M, Dai W. Phosphorylation of H3S10 blocks the access of H3K9 by specific antibodies and histone methyltransferase. Implication in regulating chromatin dynamics and epigenetic inheritance during mitosis. J Biol Chem. 2008;283(48):33585–33590.

112. Nakanishi S, Lee JS, Gardner KE, Gardner JM, Takahashi YH, Chandrasekharan MB, Sun ZW, Osley MA, Strahl BD, Jaspersen SL, Shilatifard A. Histone H2BK123 monoubiquitination is the critical determinant for H3K4 and H3K79 trimethylation by COMPASS and Dot1. J Cell Biol. 2009;186(3):371-7.

113. Ernst J, Kellis M. Discovery and characterization of chromatin states for systematic annotation of the human genome. Nat Biotechnol. 2010;28(8):817–825.

114. Ooi SK, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lin SP, Allis CD, Cheng X, Bestor TH. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. Nature. 2007;448(7154):714–717.

115. Tachibana M, Matsumura Y, Fukuda M, Kimura H, Shinkai Y. G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. EMBO J. 2008;27(20):2681–2690.

116. Zhao Q, Rank G, Tan YT, Li H, Moritz RL, Simpson RJ, Cerruti L, Curtis DJ, Patel DJ, Allis CD, Cunningham JM, Jane SM. PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. Nat Struct Mol Biol. 2009;16(3):304–311.

117. Estève PO, Chin HG, Benner J, Feehery GR, Samaranayake M, Horwitz GA, Jacobsen SE, Pradhan S. Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci. USA 2009;106(13):5076–5081.

118. Wang J, Hevi S, Kurash JK, Lei H, Gay F, Bajko J, Su H, Sun W, Chang H, Xu G, Gaudet F, Li E, Chen T. The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. Nat. Genet. 2009;41(1):125–129.

119. Nam S, Li M, Choi K, Balch C, Kim S, Nephew KP. MicroRNA and mRNA integrated analysis (MMIA): a web tool for examining biological functions of microRNA expression. Nucleic Acids Res. 2009;37(2):356-362.

120. Hammond SM. RNAi, microRNAs, and human disease. Cancer Chemother Pharmacol. 2006;58(1):63–8.

121. Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B, Laxman B, Cao X, Jing X, Ramnarayanan K, Brenner JC, Yu J, Kim JH, Han B, Tan P, Kumar-Sinha C, Lonigro RJ, Palanisamy N, Maher CA, Chinnaiyan AM. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. Science. 2008;322(5908):1695-1699.

122. Friedman JM, Liang G, Liu CC, Wolff EM, Tsai YC, Ye W, Zhou X, Jones PA. The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. Cancer Res. 2009;69(6):2623-2629.

123. Momparler RL. Pharmacology of 5-Aza-2′-deoxycytidine (decitabine) Semin Hematol. 2005;42(2):9–16.

124. Santi DV, Norment A, Garrett CE. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984;81(22):6993–6997.

125. Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, Ye W, Greer S, Marquez VE, Jones PA, Selker EU. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. J Natl Cancer Inst. 2003;95(5):399–409.

126. Amato RJ. Inhibition of DNA methylation by antisense oligonucleotide MG98 as cancer therapy. Clin Genitourin Cancer. 2007;5(7):422–426.

127. Davis AJ, Gelmon KA, Siu LL, Moore MJ, Britten CD, Mistry N, Klamut H, D'Aloisio S, MacLean M, Wainman N, Ayers D, Firby P, Besterman JM, Reid GK, Eisenhauer EA. 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.

128. Winquist E, Knox J, Ayoub JP, Wood L, Wainman N, Reid GK, Pearce L, Shah A, Eisenhauer E. Phase II trial of DNA methyltransferase 1 inhibition with the antisense oligonucleotide MG98 in patients with metastatic renal carcinoma: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group investigational new drug study. Invest New Drugs. 2006;24(2):159–167.

129. Brueckner B, Garcia Boy R, Siedlecki P, Musch T, Kliem HC, Zielenkiewicz P, Suhai S, Wiessler M, Lyko F. Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. Cancer Res. 2005;65(14):6305–6311.

130. Zeng L, Zhou MM. Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. FEBS Lett. 2002;513(1):124–128.

131. Dawson MA, Kouzarides T, Huntly BJP. Targeting epigenetic readers in cancer. N Engl J Med. 2012;367(7):647–657.

132. Jang MK, Mochizuki K, Zhou M, Jeong H-S, Brady JN, Ozato K. The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. Mol Cell. 2005;19(4):523–534.

133. Zuber J, Shi J, Wang E, Rappaport AR, Herrmann H, Sison EA, Magoon D, Qi J, Blatt K, Wunderlich M, Taylor MJ, Johns C, Chicas A, Mulloy JC, Kogan SC, Brown P, Valent P, Bradner JE, Lowe SW, Vakoc CR. RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. Nature. 2011;478(7370):524–528.

134. Smith JA, White EA, Sowa ME, Powell ML, Ottinger M, Harper JW, Howley PM. Genome-wide siRNA screen identifies SMCX, EP400, and Brd4 as E2-dependent regulators of human papillomavirus oncogene expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(8):3752–3757.

135. Maruyama T, Farina A, Dey A, Cheong J, Bermudez VP, Tamura T, Sciortino S, Shuman J, Hurwitz J, Ozato K. Mammalian bromodomain protein, Brd4, interacts with replication factor C and inhibits progression to S phase. Mol Cell Biol. 2002;22(18):6509–6520.

136. French CA, Kutok JL, Faquin WC, Toretsky JA, Antonescu CR, Griffin CA, Nose V, Vargas SO, Moschovi M, Tzortzatou-Stathopoulou F, Miyoshi I, Perez-Atayde AR, Aster JC, Fletcher JA. Midline carcinoma of children and young adults with NUT rearrangement. J Clin Oncol. 2004;22(20):4135–4139.

137. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, Kastritis E, Gilpatrick T, Paranal RM, Qi J, Chesi M, Schinzel AC, McKeown MR, Heffernan TP, Vakoc CR, Bergsagel PL, Ghobrial IM, Richardson PG, Young RA, Hahn WC, Anderson KC, Kung AL, Bradner JE, Mitsiades CS. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. Cell. 2011;146(6):904–917.

138. Mertz JA, Conery AR, Bryant BM, Sandy P, Balasubramanian S, Mele DA, Bergeron L, Sims RJ 3rd. Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(40):16669–16674.

139. Wyce A, Ganji G, Smitheman KN, Chung CW, Korenchuk S, Bai Y, Barbash O, Le B, Craggs PD, McCabe MT, Kennedy-Wilson KM, Sanchez LV, Gosmini RL, Parr N, McHugh CF, Dhanak D, Prinjha RK, Auger KR, Tummino PJ. BET inhibition silences expression of MYCN and BCL2 and induces cytotoxicity in neuroblastoma tumor models. PLoS One. 2013;8(8):72967.

140. Dekker FJ, Haisma HJ. Histone acetyl transferases as emerging drug targets. Drug Discov Today. 2009;14(19-20):942–948.

141. Zheng Y, Thompson PR, Cebrat M, Wang L, Devlin MK, Alani RM, Cole PA. Selective HAT inhibitors as mechanistic tools for protein acetylation. Methods Enzymol. 2003;376:188–199.

142. Balasubramanyam K, Varier RA, Altaf M, Swaminathan V, Siddappa NB, Ranga U, Kundu TK. Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. J Biol Chem. 2004;279(49):51163–51171.

143. Bachmeier B, Nerlich AG, Iancu CM, Cilli M, Schleicher E, Vené R, Dell'Eva R, Jochum M, Albini A, Pfeffer U. The chemopreventive polyphenol curcumin prevents hematogenous breast cancer metastases in immunodeficient mice. Cell Physiol Biochem. 2007;19(1-4):137–152.

144. Morimoto T, Sunagawa Y, Kawamura T, Takaya T, Wada H, Nagasawa A, Komeda M, Fujita M, Shimatsu A, Kita T, Hasegawa K. The dietary compound curcumin inhibits p300 histone acetyltransferase activity and prevents heart failure in rats. J Clin Invest. 2008;118(3):868–878.

145. Balasubramanyam K, Altaf M, Varier RA, Swaminathan V, Ravindran A, Sadhale PP, Kundu TK. Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression. J Biol Chem. 2004;279(32):33716–33726.

146. Hemshekhar M, Sebastin Santhosh M, Kemparaju K, Girish KS. Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: a pharmacological overview. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2012;110(2):122–132.

147. Bowers EM, Yan G, Mukherjee C, Orry A, Wang L, Holbert MA, Crump NT, Hazzalin CA, Liszczak G, Yuan H, Larocca C, Saldanha SA, Abagyan R, Sun Y, Meyers DJ, Marmorstein R, Mahadevan LC, Alani RM, Cole PA. Virtual ligand screening of the p300/CBP histone acetyltransferase: identification of a selective small molecule inhibitor. Chem Biol. 2010;17(5):471–482.

148. Balasubramanyam K, Swaminathan V, Ranganathan A, Kundu TK. Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. J Biol Chem. 2003;278(21):19134–19140.

149. Santer FR, Höschele PP, Oh SJ, Erb HH, Bouchal J, Cavarretta IT, Parson W, Meyers DJ, Cole PA, Culig Z. Inhibition of the acetyltransferases p300 and CBP reveals a targetable function

for p300 in the survival and invasion pathways of prostate cancer cell lines. Mol Cancer Ther. 2011;10(9):1644–1655.

150. Zhong J, Ding L, Bohrer LR, Pan Y, Liu P, Zhang J, Sebo TJ, Karnes RJ, Tindall DJ, van Deursen J, Huang H. p300 acetyltransferase regulates androgen receptor degradation and PTEN-deficient prostate tumorigenesis. Cancer research. 2014; 74(6):1870–1880.

151. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. Nature. 2002;417(6887)4:55–458.

152. Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, Yagyu R, Nakamura Y. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. Nat Cell Biol. 2004;6(8): 731–740.

153. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Pérez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. Nat Genet. 2005;37(4):391–400.

154. Chang Y, Ganesh T, Horton JR, Spannhoff A, Liu J, Sun A, Zhang X, Bedford MT, Shinkai Y, Snyder JP, Cheng X. Adding a lysine mimic in the design of potent inhibitors of histone lysine methyltransferases. J Mol Biol. 2010;400(1):1–7.

155. Liu F, Chen X, Allali-Hassani A, Quinn AM, Wigle TJ, Wasney GA, Dong A, Senisterra G, Chau I, Siarheyeva A, Norris JL, Kireev DB, Jadhav A, Herold JM, Janzen WP, Arrowsmith CH, Frye SV, Brown PJ, Simeonov A, Vedadi M, Jin J. Protein lysine methyltransferase G9a inhibitors: design, synthesis, and structure activity relationships of 2,4-diamino-7-aminoalkoxy-quinazolines. J Med Chem. 2010;53(15):5844–5857.

156. Kubicek S, O'Sullivan RJ, August EM, Hickey ER, Zhang Q, Teodoro ML, Rea S, Mechtler K, Kowalski JA, Homon CA, Kelly TA, Jenuwein T. Reversal of H3K9me2 by a small-molecule inhibitor for the G9a histone methyltransferase. Mol Cell. 2007;25(3):473-81.

157. Fu L, Yan F-X, An X-R, Hou J. Effects of the histone methyltransferase inhibitor UNC0638 on histone H3K9 dimethylation of cultured ovine somatic cells and development of resulting early cloned embryos. Reprod Domest Anim. 2014;49(2):21–25.

158. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash J, Sabunciyan S, Feinberg AP. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. Nat Genet. 2009;41(2):178-186.

159. van der Burg M, Poulsen TS, Hunger SP, Beverloo HB, Smit EME, Vang-Nielsen K, Langerak AW, van Dongen JJM. Split-signal FISH for detection of chromosome aberrations in acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2004;18(5); 895–908.

160. Caraglia M, Alaia C, Grimaldi A, Boccellino M, Quagliuolo L. MiRNA as prognostic and therapeutic targets in tumor of male urogenital tract. Mol Targets Strat Cancer Prev. 2016;7(5):151–171.

161. Daigle SR, Olhava EJ, Therkelsen CA, Basavapathruni A, Jin L, Boriack-Sjodin PA, Allain CJ, Klaus CR, Raimondi A, Scott MP, Waters NJ, Chesworth R, Moyer MP, Copeland RA, Richon VM, Pollock RM. Potent inhibition of DOT1 L as a treatment for MLL-fusion leukemia. Blood 2013;122(6):1017–1025.

162. Miranda TB, Cortez CC, Yoo CB, Liang G, Abe M, Kelly TK, Marquez VE, Jones PA. DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. Mol Cancer Ther. 2009;8(6):1579–1588.

163. Rose NR, Ng SS, Mecinović J, Liénard BM, Bello SH, Sun Z, McDonough MA, Oppermann U, Schofield CJ. Inhibitor scaffolds for 2-oxoglutarate-dependent histone lysine demethylases. J. Med. Chem. 2008;51(22):7053–7056.

164. Li H, Chiappinelli KB, Guzzetta AA, Easwaran H, Yen RW, Vatapalli R, Topper MJ, Luo J, Connolly RM, Azad NS, Stearns V, Pardoll DM, Davidson N, Jones PA, Slamon DJ, Baylin SB, Zahnow CA, Ahuja N. Immune regulation by low doses of the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacitidine in common human epithelial cancers. Oncotarget. 2014;5(3):587–98.

165. Qin T, Si J, Raynal NJ, Wang X, Gharibyan V, Ahmed S, Hu X, Jin C, Lu Y, Shu J, Estecio MR, Jelinek J, Issa JJ. Epigenetic synergy between decitabine and platinum derivatives. Clin Epigenetics. 2015;7:97.

166. Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. Int J Mol Sci. 2017;18(7):1–25.

167. Lainey E, Wolfromm A, Marie N, Enot D, Scoazec M, Bouteloup C, Leroy C, Micol JB, De Botton S, Galluzzi L, Fenaux P, Kroemer G. Azacytidine and erlotinib exert synergistic effects against acute myeloid leukemia. Oncogene. 2013;32(37):4331–42.

168. Bradner JE, West N, Grachan ML, Greenberg EF, Haggarty SJ, Warnow T, Mazitschek R. Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010;6(3):238–243.

169. Matsuyama A, Shimazu T, Sumida Y, Saito A, Yoshimatsu Y, Seigneurin-Berny D, Osada H, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Horinouchi S, Yoshida M. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. EMBO J. 2002;21(24):6820–683.

170. Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. Proc Natl Acad Sci. 2003;100(8):4389–4394.

171. Bedalov A, Gatbonton T, Irvine WP, Gottschling DE, Simon JA. Identification of a small molecule inhibitor of Sir2p. Proc Natl Acad Sci. 2001;98(26):15113–15118.

172. Schuetz A, Min J, Antoshenko T, Wang CL, Allali-Hassani A, Dong A, Loppnau P, Vedadi M, Bochkarev A, Sternglanz R, Plotnikov AN. Structural basis of inhibition of the human NAD+-dependent deacetylase SIRT5 by suramin. Structure. 2007;15(3):377–389.

173. Li L, Wang L, Li L, Wang Z, Ho Y, McDonald T, Holyoake TL, Chen W, Bhatia R. Activation of p53 by SIRT1 inhibition enhances elimination of CML leukemia stem cells in combination with imatinib. Cancer Cell. 2012;21(2):266–281.

174. Chen X, Wales P, Quinti L, Zuo F, Moniot S, Herisson F, Rauf NA, Wang H, Silverman RB, Ayata C, Maxwell MM, Steegborn C, Schwarzschild MA, Outeiro TF, Kazantsev AG. The sirtuin-2 inhibitor AK7 is neuroprotective in models of Parkinson's disease but not amyotrophic lateral sclerosis and cerebral ischemia. PLoS One. 2015;10(1):0116919.

175. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. Nat Rev Drug Discov. 2006;5(9):769–784.

176. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. Carcinogenesis. 2009;31(1):27–36.

177. Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. Science. 1985;228(4696):187–190.

178. Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H, Jaenisch R. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. Science. 2003;300(5618):489–492.

179. Futscher BW, O'Meara MM, Kim CJ, Rennels MA, Lu D, Gruman LM, Seftor RE, Hendrix MJ, Domann FE. Aberrant methylation of the maspin promoter is an early event in human breast cancer. Neoplasia. 2004;6(4):380–389.

180. Esteller, M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. Hum. Mol. Genet. 2007;16(1):50–59.

181. Li M, Chen WD, Papadopoulos N, Goodman SN, Bjerregaard NC, Laurberg S, Levin B, Juhl H, Arber N, Moinova H, Durkee K, Schmidt K, He Y, Diehl F, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW, Markowitz SD, Vogelstein B. Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples. Nat. Biotechnol. 2009;27(9):858–863.

182. Melo SA, Ropero S, Moutinho C, Aaltonen LA, Yamamoto H, Calin GA, Rossi S, Fernandez AF, Carneiro F, Oliveira C, Ferreira B, Liu CG, Villanueva A, Capella G, Schwartz S Jr, Shiekhattar R, Esteller M. A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. Nat. Genet. 2009;41(3):365–370.

183. Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. Cancer Cell. 2006;9(6):435–443.

184. Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sánchez-Céspedes M, Blanco D, Montuenga LM, Rossi S, Nicoloso MS, Faller WJ, Gallagher WM, Eccles SA, Croce CM, Esteller M. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105(36):13556–13561.

185. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Pérez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M. Loss of acetylation

at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. Nat. Genet. 2005;37(4):391–400.

186. Zhu P, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen KP, Göttlicher M. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. Cancer Cell. 2004;5(5):455–463.

187. Ropero S, Fraga MF, Ballestar E, Hamelin R, Yamamoto H, Boix-Chornet M, Caballero R, Alaminos M, Setien F, Paz MF, Herranz M, Palacios J, Arango D, Orntoft TF, Aaltonen LA, Schwartz S Jr, Esteller M. A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition. Nat Genet. 2006;38(5):566–569.

188. Vaquero A, Sternglanz R, Reinberg D. NAD+-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. Oncogene. 2007;26(37):5505–5520.

189. Espada J, Ballestar E, Santoro R, Fraga MF, Villar-Garea A, Németh A, Lopez-Serra L, Ropero S, Aranda A, Orozco H, Moreno V, Juarranz A, Stockert JC, Längst G, Grummt I, Bickmore W, Esteller M. Epigenetic disruption of ribosomal RNA genes and nucleolar architecture in DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) deficient cells. Nucleic Acids Res. 2007;35(7):2191–2198.

190. Moore SD, Herrick SR, Ince TA, Kleinman MS, Dal Cin P, Morton CC, Quade BJ. Uterine leiomyomata with t(10;17) disrupt the histone acetyltransferase MORF. Cancer Res. 2004;64(16):5570–5577.

191. Bryan EJ, Jokubaitis VJ, Chamberlain NL, Baxter SW, Dawson E, Choong DY, Campbell IG. Mutation analysis of EP300 in colon, breast and ovarian carcinomas. Int J Cancer. 2002;102(2):137–141.

192. Dalgliesh GL, Furge K, Greenman C, Chen L, Bignell G, Butler A, Davies H, Edkins S, Hardy C, Latimer C, Teague J, Andrews J, Barthorpe S, Beare D, Buck G, Campbell PJ, Forbes S, Jia M, Jones D, Knott H, Kok CY, Lau KW, Leroy C, Lin ML, McBride DJ, Maddison M, Maguire S, McLay K, Menzies A, Mironenko T, Mulderrig L, Mudie L, O'Meara S, Pleasance E, Rajasingham A, Shepherd R, Smith R, Stebbings L, Stephens P, Tang G, Tarpey PS, Turrell K, Dykema KJ, Khoo SK, Petillo D, Wondergem B, Anema J, Kahnoski RJ, Teh BT, Stratton MR, Futreal PA. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. Nature. 2010;463(7279):360–363.

193. Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, Tsai MC, Hung T, Argani P, Rinn JL, Wang Y, Brzoska P, Kong B, Li R, West RB, van de Vijver MJ, Sukumar S, Chang HY. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. Nature. 2010;464(7291):1071–1076.

194. Krivtsov AV, Feng Z, Lemieux ME, Faber J, Vempati S, Sinha AU, Xia X, Jesneck J, Bracken AP, Silverman LB, Kutok JL, Kung AL, Armstrong SA. H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. Cancer Cell. 2008;14(5):355–368.

195. Wang P, Lin C, Smith ER, Guo H, Sanderson BW, Wu M, Gogol M, Alexander T, Seidel C, Wiedemann LM, Ge K, Krumlauf R, Shilatifard A. Global analysis of H3K4 methylation defines MLL family member targets and points to a role for MLL1-mediated H3K4 methylation

in the regulation of transcriptional initiation by RNA polymerase II. Mol Cell Biol. 2009;29(22):6074–6085.

196. Dawson MA, Bannister AJ, Göttgens B, Foster SD, Bartke T, Green AR, Kouzarides T. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. Nature. 2009;461(7265):819–822.

197. van Steensel B, Dekker J. Genomics tools for unraveling chromosome architecture. Nat. Biotechnol. 2010;28(10);1089–1095.

198. Naidu SR, Love IM, Imbalzano AN, Grossman SR, Androphy EJ. The SWI/SNF chromatin remodeling subunit BRG1 is a critical regulator of p53 necessary for proliferation of malignant cells. Oncogene. 2009;28(27):2492–2501.

199. Lin JC, Jeong S, Liang G, Takai D, Fatemi M, Tsai YC, Egger G, Gal-Yam EN, Jones PA. Role of nucleosomal occupancy in the epigenetic silencing of the MLH1 CpG island. Cancer Cell. 2007;12(5):432–444.

200. Mulero-Navarro S, Esteller M. Chromatin remodeling factor CHD5 is silenced by promoter CpG island hypermethylation in human cancer. Epigenetics. 2008;3(4):210–215.

201. Kim W, Bird GH, Neff T, Guo G, Kerenyi MA, Walensky LD, Orkin SH. Targeted disruption of the EZH2-EED complex inhibits EZH2-dependent cancer. Nat Chem Biol. 2013;9(10);643–650.

202. Agin HV. Tranylcypromine in depression: A clinical report. Am J Psychiatry 1960;117:150–151.

203. Schenk T, Chen WC, Gollner S, Howell L, Jin L, Hebestreit K, Klein HU, Popescu AC, Burnett A, Mills K, Casero RA Jr, Marton L, Woster P, Minden MD, Dugas M, Wang JC, Dick JE, Müller-Tidow C, Petrie K, Zelent A. Inhibition of the LSD1 (KDM1A) demethylase reactivates the all-trans-retinoic acid differentiation pathway in acute myeloid leukemia. Nat Med. 2012;18(4):605–611.

204. Ma LY, Zheng YC, Wang SQ, Wang B, Wang ZR, Pang LP, Zhang M, Wang JW, Ding L, Li J, Wang C, Hu B, Liu Y, Zhang XD, Wang JJ, Wang ZJ, Zhao W, Liu HM. Design, synthesis, and structure–activity relationship of novel LSD1 inhibitors based on pyrimidine-thiourea hybrids as potent, orally active antitumor agents. J Med Chem. 2015;58(4):1705–1716.

205. Baader E, Tschank G, Baringhaus KH, Burghard H, Gunzler V. Inhibition of prolyl 4-hydroxylase by oxalyl amino acid derivatives in vitro, in isolated microsomes and in embryonic chicken tissues. Biochem J. 1994;300(2):525–530.

206. Tschank G, Raghunath M, Gunzler V, Hanauske-Abel HM. Pyridinedicarboxylates, the first mechanism-derived inhibitors for prolyl 4-hydroxylase, selectively suppress cellular hydroxyprolyl biosynthesis. Decrease in interstitial collagen and Clq secretion in cell culture. Biochem J. 1987;248(3):625–633.

207. Mannironi C, Proietto M, Bufalieri F, Cundari E, Alagia A, Danovska S, Rinaldi T, Famiglini V, Coluccia A, La Regina G, Silvestri R, Negri R. An high-throughput in vivo screening system to select H3K4-specific histone demethylase inhibitors. PLoS ONE. 2014;9(1):86002.

208. Johnstone RW, Licht JD. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: Is transcription the primary target? Cancer Cell. 2003;4(1):13–8.

209. Kumar C, Purandare AV, Lee FY, Lorenzi MV. Kinase drug discovery approaches in chronic myeloproliferative disorders. Oncogene. 2009;28(24):2305–2313.

210. Bereshchenko OR, Gu W, Dalla-Favera R. Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. Nat Genet. 2002;32(4):606–13.

211. Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(18):10014–9.

212. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. Nat Rev Cancer. 2006;6(1):38–51.

213. Srivastava RK, Kurzrock R, Shankar S. MS-275 sensitizes TRAIL-resistant breast cancer cells, inhibits angiogenesis and metastasis, and reverses epithelial-mesenchymal transistion in vivo. Mol Cancer Ther. 2010;9(12):3254–66.

214. Gollob JA, Sciambi CJ, Peterson BL, Richmond T, Thoreson M, Moran K, Dressman HK, Jelinek J, Issa JP. Phase I trial of sequential low-dose 5-aza-2′-deoxycytidine plus high-dose intravenous bolus interleukin-2 in patients with melanoma or renal cell carcinoma. Clin Cancer Res 2006;12(15):4619–27.

215. Zhang Y, Adachi M, Kawamura R, Imai K. Bmf is a possible mediator in histone deacetylase inhibitors FK228 and CBHA-induced apoptosis. Cell Death Differ. 2006;13(1):129–40.

216. Tiffon C, Adams J, van der Fits L, Wen S, Townsend P, Ganesan A, Hodges E, Vermeer M, Packham G. The histone deacetylase inhibitors vorinostat and romidespin downmodulate IL-10 expression in cutaneous T-cell lymphoma cells. Br J Pharmacol. 2011;162(7):1590–602.

217. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, Sajed T, Johnson D, Li C, Sayeeda Z, Assempour N, Iynkkaran I, Liu Y, Maciejewski A, Gale N, Wilson A, Chin L, Cummings R, Le D, Pon A, Knox C, Wilson M. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. Nucleic Acids Res. 2017 Nov 8. doi: 10.1093/nar/gkx1037. https://www.drugbank.ca/drugs/DB02546 posjećeno 1.rujna 2019.

218. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, Sajed T, Johnson D, Li C, Sayeeda Z, Assempour N, Iynkkaran I, Liu Y, Maciejewski A, Gale N, Wilson A, Chin L, Cummings R, Le D, Pon A, Knox C, Wilson M. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. Nucleic Acids Res. 2017 Nov 8. doi: 10.1093/nar/gkx1037. https://www.drugbank.ca/drugs/DB06176 posjećeno 1.rujna 2019.

219. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, Sajed T, Johnson D, Li C, Sayeeda Z, Assempour N, Iynkkaran I, Liu Y, Maciejewski A, Gale N, Wilson A, Chin L, Cummings R, Le D, Pon A, Knox C, Wilson M. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. Nucleic Acids Res. 2017 Nov 8. doi: 10.1093/nar/gkx1037. https://www.drugbank.ca/drugs/DB00928 posjećeno 1.rujna 2019.

220. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, Sajed T, Johnson D, Li C, Sayeeda Z, Assempour N, Iynkkaran I, Liu Y, Maciejewski A, Gale N, Wilson A, Chin L, Cummings R, Le D, Pon A, Knox C, Wilson M. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. Nucleic Acids Res. 2017 Nov 8. doi: 10.1093/nar/gkx1037. https://www.drugbank.ca/drugs/DB08877 posjećeno 1.rujna 2019.

221. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, Sajed T, Johnson D, Li C, Sayeeda Z, Assempour N, Iynkkaran I, Liu Y, Maciejewski A, Gale N, Wilson A, Chin L, Cummings R, Le D, Pon A, Knox C, Wilson M. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. Nucleic Acids Res. 2017 Nov 8. doi: 10.1093/nar/gkx1037. https://www.drugbank.ca/drugs/DB05015 posjećeno 1.rujna 2019.

222. Duarte JD. Epigenetics primer: Why the clinician should care about epigenetics. Pharmacotherapy. 2013;33(12):1362-1368.

223. D'Souza A, Onem E, Patel P, La Gamma E, Nankova B. Valproic acid regulates catecholaminergic pathways by concentration-dependent threshold effects on TH mRNA synthesis and degradation. Brain Res. 2009;1247:1-10.

224. Fukuchi M, Nii N, Ishimaru N, Minamino A, Hara DD, Takasaki I, Tabuchi A, Tsuda M. Valproic acid induces up- or down-regulation of gene expression responsible for the neuronal excitation and inhibition in rat cortical neurons through its epigenetic actions. Neurosci Res. 2009;65(1):35-43.

225. Dje N'Guessan P, Riediger F, Vardarova K, Scharf S, Eitel J, Opitz B, Slevogt H, Weichert W, Hocke AC, Schmeck B, Suttorp N, Hippenstiel S. Statins control oxidized LDL-mediated histone modifications and gene expression in cultured human endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29(3):380-386.

226. Blatt J, Corey SJ. Drug repurposing in pediatrics and pediatric hematology oncology. Drug Discov Today. 2013;18(1-2):4–1.

227. Raynal NJ, Da Costa EM, Lee JT, Gharibyan V, Ahmed S, Zhang H, Sato T, Malouf GG, Issa JJ. Repositioning FDA-Approved Drugs in Combination with Epigenetic Drugs to Reprogram Colon Cancer Epigenome. Mol Cancer Ther. 2017;16(2):397-407.

228. Schwartsmann G, Schunemann H, Gorini CN, Filho AF, Garbino C, Sabini G, Muse I, DiLeone L, Mans DR. Phase I trial of cisplatin plus decitabine, a new DNA-hypomethylating agent, in patients with advanced solid tumors and a follow-up early phase II evaluation in patients with inoperable non-small cell lung cancer. Invest New Drugs. 2000;18(1):83–91.

229. Glasspool RM, Brown R, Gore ME, Rustin GJ, McNeish IA, Wilson RH, Pledge S7, Paul J1, Mackean M8, Hall GD9, Gabra H2, Halford SE10, Walker J11, Appleton K11, Ullah R11,

Kaye S3; Scottish Gynaecological Trials Group. A randomised, phase II trial of the DNA-hypomethylating agent 5-aza-2′-deoxycytidine (decitabine) in combination with carboplatin vs carboplatin alone in patients with recurrent, partially platinum-sensitive ovarian cancer. Br J Cancer. 2014;110(8):1923–9.

230. Taby R, Issa JP. Cancer epigenetics. CA Cancer J Clin. 2010;60(6):376–92.

231. Friedman JM, Liang G, Liu CC, Wolff EM, Tsai YC, Ye W, Zhou X, Jones PA. The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. Cancer Res. 2009;69(6):2623-2629.

232. Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. Nat Genet. 1999;21(1):103-107.

233. Kaminskas E, Farrell A, Abraham S, Baird A, Hsieh LS, Lee SL, Leighton JK, Patel H, Rahman A, Sridhara R, Wang YC, Pazdur R; FDA. Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes. Clin Cancer Res. 2005;11(10):3604-3608.

234. Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, Erpelinck-Verschueren C, Deng X, Christos PJ, Schifano E, Booth J, van Putten W, Skrabanek L, Campagne F, Mazumdar M, Greally JM, Valk PJ, Löwenberg B, Delwel R, Melnick A. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. Cancer Cell. 2010;17(1):13-27.

235. Ellinger J, Kahl P, von der Gathen J, Rogenhofer S, Heukamp LC, Gütgemann I, Walter B, Hofstädter F, Büttner R, Müller SC, Bastian PJ, von Ruecker A. Global levels of histone modifications predict prostate cancer recurrence. Prostate. 2010;70(1):61-69.

236. Kondo T, Oka T, Sato H, Shinnou Y, Washio K, Takano M, Morito T, Takata K, Ohara N, Ouchida M, Shimizu K, Yoshino T. Accumulation of aberrant CpG hypermethylation by Helicobacter pylori infection promotes development and progression of gastric MALT lymphoma. Int J Oncol. 2009;35(3):547-557.

237. Martens JW, Margossian AL, Schmitt M, Foekens J, Harbeck N. DNA methylation as a biomarker in breast cancer. Future Oncol (London, England). 2009;5(8):1245-1256.

238. Kadia TM, Faderl S, Ravandi F, Jabbour E, Garcia-Manero G, Borthakur G, Ferrajoli A, Konopleva M, Burger J, Huang X, Wang X, Pierce S. Final results of a phase II trial of clofarabine and low-dose cytarabine alternating with decitabine in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. Cancer. 2015;121(14):2375–82.

239. Momparler RL, Dore BT, Momparler LF. Effect of 5-aza-2′-deoxycytidine and retinoic acid on differentiation and c-myc expression in HL-60 myeloid leukemic cells. Cancer Lett. 1990;54(1-2):21–8.

240. Mastrangelo D, Pelosi E, Castelli G, Lo-Coco F, Testa U. Mechanisms of anti-cancer effects of ascorbate: Cytotoxic activity and epigenetic modulation. Blood Cells Mol Dis. 2018;69:57-64.

241. Chen CW, Armstrong SA. Targeting DOT1L and HOX gene expression in MLL-rearranged leukemia and beyond. Exp Hematol. 2015;43(8):673-84.

242. Lansigan F, Choi J and Foss FM. Cutaneous T-cell lymphoma. Hematol Oncol Clin North Am. 2008;22(5):979–96.

243. Crawford N, Stasik I, Holohan C, Majkut J, McGrath M, Johnston PG, Chessari G, Ward GA, Waugh DJ, Fennell DA, Longley DB. SAHA overcomes FLIP-mediated inhibition of SMAC mimetic-induced apoptosis in mesothelioma. Cell Death Dis. 2013;18;4(7):733.

244. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press; 2001.

245. Savage KJ, Chhanabhai M, Gascoyne RD, Connors JM. Characterization of peripheral T-cell lymphomas in a single North American institution by the WHO classification. Ann Oncol. 2004;15(10):1467-1475.

246. Vose JM. International Peripheral T-Cell Lymphoma (PTCL) Clinical and Pathologic Review Project: poor outcome by prognostic indices and lack of efficacy with anthracyclines. Blood 2005;106: 811.

247. Went P, Agostinelli C, Gallamini A, Piccaluga PP, Ascani S, Sabattini E, Bacci F, Falini B, Motta T, Paulli M, Artusi T, Piccioli M, Zinzani PL, Pileri SA. Marker expression in peripheral T-cell lymphoma: a proposed clinical-pathologic prognostic score. J Clin Oncol. 2006;24(16):2472-2479.

248. Corradini P, Dodero A, Zallio F, Caracciolo D, Casini M, Bregni M, Narni F, Patriarca F, Boccadoro M, Benedetti F, Rambaldi A, Gianni AM, Tarella C. Graft-versus-lymphoma effect in relapsed peripheral T-cell non-Hodgkin's lymphomas after reduced-intensity conditioning followed by allogeneic transplantation of hematopoietic cells. J Clin Oncol. 2004;22(11):2172-2176.

249. Feyler S, Prince HM, Pearce R, Towlson K, Nivison-Smith I, Schey S, Gibson J, Patton N, Bradstock K, Marks DI, Cook G. The role of high-dose therapy and stem cell rescue in the management of T-cell malignant lymphomas: a BSBMT and ABMTRR study. Bone Marrow Transplant. 2007;40(5):443-450.

250. Escalon MP, Liu NS, Yang Y, Hess M, Walker PL, Smith TL, Dang NH. Prognostic factors and treatment of patients with T-cell non-Hodgkin lymphoma: the M. D. Anderson Cancer Center experience. Cancer. 2005;103(10):2091-2098.

251. Colson K. Treatment related symptom management in patients with multiple myeloma: a review. Support Care Cancer. 2015;23(5):1431–1445.

252. Silverman L, Holland JF, Frei E et al. The myelodysplastic syndrome. In: Holland JF, Frei E, eds. Cancer medicine, 5th ed. B. C. Decker Inc, Hamilton; Ontario; 2000:1931-46.

253. Koeffler HP, Golde DW. Human preleukemia. Ann Intern Med. 1980; 93(2):347-53.

254. National Comprehensive Cancer Network. Practice guidelines in oncology: myelodysplastic syndromes. 2004. Version.1.2005. www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/mds.pdf (posjećeno 08.09.2019).

255. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. Blood. 1997;89(6):2079-88.

256. Silverman LR. Targeting hypomethylation of DNA to achieve cellular differentiation in myelodysplastic syndromes (MDS). Oncologist. 2001;6(5):8-14.

257. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, Sajed T, Johnson D, Li C, Sayeeda Z, Assempour N, Iynkkaran I, Liu Y, Maciejewski A, Gale N, Wilson A, Chin L, Cummings R, Le D, Pon A, Knox C, Wilson M. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. Nucleic Acids Res. 2017 Nov 8. doi: 10.1093/nar/gkx1037. https://www.drugbank.ca/drugs/DB01262 posjećeno 1.rujna 2019.

258. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, Sajed T, Johnson D, Li C, Sayeeda Z, Assempour N, Iynkkaran I, Liu Y, Maciejewski A, Gale N, Wilson A, Chin L, Cummings R, Le D, Pon A, Knox C, Wilson M. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. Nucleic Acids Res. 2017 Nov 8. doi: https://www.drugbank.ca/drugs/DB08877 posjećeno 1.rujna 2019.

259. Mesa RA, Verstovsek S, Cervantes F, Barosi G, Reilly JT, Dupriez B, Levine R, Le Bousse-Kerdiles MC, Wadleigh M, Campbell PJ, Silver RT, Vannucchi AM, Deeg HJ, Gisslinger H, Thomas D, Odenike O, Solberg LA, Gotlib J, Hexner E, Nimer SD, Kantarjian H, Orazi A, Vardiman JW, Thiele J, Tefferi A; International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT). Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). Leuk Res. 2007;31(6):737-740.

260. Milosevic JD, Kralovics R. Genetic and epigenetic alterations of myeloproliferative disorders. Int J Hematol. 2013;97(2):183-197.

261. Cervantes F. How I treat myelofibrosis. Blood. 2014;124(17):2635-2642.

262. US Food and Drug Administration. FDA approves Jakafi to treat patients with a chronic type of bone marrow disease: first FDA-approved drug for polycythemia vera. Press release: December 4, 2014.

263. Leukemia & Lymphoma Society. Polycythemia vera facts. No. 13. Revised June 2012. www.lls.org/content/nationalcontent/resourcecenter/freeeducationmaterials/mpd/pdf/polycythemiavera.pdf. Posjećeno 01.rujna 2019.

12. Životopis

Rođena sam 14.7.1992. u Splitu. Do dolaska na fakultet živjela sam u Sinju. Tu sam pohađala Franjevačku klasičnu gimnaziju s pravom javnosti. Po završetku srednje škole upisala sam Medicinski fakultet u Zagrebu.