

Received: 2016.07.18
Accepted: 2017.07.10
Published: 2017.12.22

Epigenetyczne uwarunkowania reumatoidalnego zapalenia stawów: wpływ metylacji DNA i modyfikacji białek histonowych

Epigenetic determinants in rheumatoid arthritis: the influence of DNA methylation and histone modifications

Bogdan Kolarz¹, Maria Majdan²

¹Institut Fizjoterapii, Wydział Medyczny, Uniwersytet Rzeszowski

²Katedra i Klinika Reumatologii i Układowych Chorób Tkanki Łącznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Streszczenie

Epigenetyka to dziedzina nauki opisująca mechanizmy modyfikacji ekspresji DNA bez zmiany samej sekwencji nukleotydów. W przeciwieństwie do zmian genetycznych, modyfikacje epigenetyczne dotyczące DNA czy białek histonowych są odwracalne. Zmiany epigenetyczne występujące w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne (np. dieta, stres) dokonują się przez metylację DNA, modyfikację białek histonowych (acetylację, metylację, ubikwitynację, fosforylację), a także posttranslacyjne modyfikacje ekspresji genów z udziałem niekodujących RNA. Proces metylacji DNA dokonuje się z udziałem metylotransferaz DNA oraz działających odwrotnie demetylaz. Modyfikacje histonów odbywają się z udziałem m.in. K-acetylotransferazy, deacetylazy histonowej, K-metylotransferazy i K-demetylazy. Liczne doniesienia potwierdzają, że aktywność tych enzymów może podlegać wpływom środowiskowym prowadząc do rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) oraz że ich modyfikacje wpływają na wykładniki aktywacji procesu zapalnego. W artykule omówiono epigenetyczne mechanizmy regulacyjne biorące udział w rozwoju RZS. Przedstawiono wyniki licznych doniesień wykazujące wpływ różnych preparatów na aktywność RZS. Oddziaływanie tych związków na szlaki epigenetyczne może mieć w przyszłości zastosowanie w leczeniu pacjentów ze schorzeniami autoimmunologicznymi.

Słowa kluczowe:

epigenetyka • inhibitory acetylacji histonów • reumatoidalne zapalenie stawów • posttranslacyjna modyfikacja histonów

Summary

Epigenetics is a field of science which describes external and environmental modifications to DNA without altering their primary sequences of nucleotides. Contrary to genetic changes, epigenetic modifications are reversible. The epigenetic changes appear as a result of the influence of external factors, such as diet or stress. Epigenetic mechanisms alter the accessibility of DNA by methylation of DNA or post-translational modifications of histones (acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitination). The extent of DNA methylation depends on the balance between DNA methyltransferases and demethylases. The main histone modifications are stimulated by K-acetyltransferases, histone deacetylases, K-methyltransferases and K-demethylases. There is proof that environmental modifications of this enzymes regulate

Key words:	immunological processes including autoimmunity in rheumatoid arthritis (RA). In this work we present epigenetic mechanisms involved in RA pathogenesis and a range of research presenting the possible impact of its modification in RA patients. epigenetics • histone acetylase inhibitors • rheumatoid arthritis • post-translational histone modifications
GICID:	01.3001.0010.7478
DOI:	10.5604/01.3001.0010.7478
Word count:	3204
Tables:	2
Figures:	–
References:	97

Adres autorki: prof. dr hab. n. med. Maria Majdan, Katedra i Klinika Reumatologii i Układowych Chorób Tkanki Łącznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Jaczewskiego 8, 20-954 Lublin; e-mail: maria.majdan@gmail.com

WSTĘP

Epigenetyka to dziedzina nauki opisująca mechanizmy modyfikacji ekspresji DNA bez zmiany samej sekwencji nukleotydów. Zgodnie z klasyczną definicją modyfikacje ekspresji DNA powinny być trwałe i podlegać dziedziczeniu. W nowszym, szerszym podejściu epigenetyka obejmuje liczne mechanizmy regulacji ekspresji genów, które mogą, ale nie muszą, być dziedziczne. Zalicza się do niej także oddziaływania przejściowe, niekiedy bardzo krótkotrwałe i dynamiczne [66]. W przeciwieństwie do zmian genetycznych, modyfikacje epigenetyczne, dotyczące DNA czy białek histonowych są odwracalne. Zwykle są zależne od równowagi, podlegających wpływom środowiska, przeciwnie działających grup enzymów. Biologiczne i kliniczne znaczenie tych oddziaływań jest ciągle słabo poznane i podlega intensywnym badaniom, także w kontekście ich użyteczności w terapii różnych chorób, zwłaszcza nowotworowych i autoimmunizacyjnych [76]. Według jeszcze innej definicji epigenetyka obejmuje wszystkie, poza sekwencją DNA, sposoby wpływania na rozwój organizmów [34].

Zaobserwowano liczne przesłanki sugerujące możliwość przenoszenia się wpływów środowiska między kolejnymi pokoleniami, mimo braku zmian w samej sekwencji DNA. Jedną z głośniejszych była obserwacja zachorowalności potomków osób z czasu głodu w Holandii, od listopada 1944 r. do maja 1945 r. Stwierdzono, że u dzieci i wnuków matek niedożywionych w I trymestrze ciąży, częściej występuje otyłość i nadciśnienie tętnicze. Gdy niedożywienie przypadało na II i III trymestr ciąży, obserwowano częstsze zachorowania na cukrzycę oraz pogorszenie się funkcji nerek [5,82]. Sugerowało to możliwość oddziaływania sposobu odżywiania na procesy regulacji ekspresji genów u rozwijających się płodów. Predyspozycje te przenosiły się jednak na kolejne poko-

lenia, co wskazuje, że odżywianie matki wpływa także na zawiązki komórek rozrodczych rozwijających się płodów. Następne pokolenie dzieci, które rozwinęło się z tych zawiązków, także było obciążone niekorzystnym wpływem głodu. Niedożywienie, jako czynnik środowiskowy, wywołuje następstwa w ekspresji genów, które mają przystosować następne pokolenia do czekających je niekorzystnych warunków środowiskowych. Oznacza to, że zmiany środowiska, zwłaszcza na wczesnych etapach ciąży, mogą się przenosić na kolejne pokolenia.

Innym przykładem wpływu środowiska były badania potomków szwedzkiej osady Överkalix. Zaobserwowano, że obfitość pożywienia w pokoleniu dziadków w okresie przed ich 10-11 r.ż. skutkowało znacznie krótszą długością życia ich wnuków. Wyniki obserwacji były podobne dla obu płci [8,40].

Lepszym dowodem jest eksperyment na ciężarnych myszach *Avy* z genem *agouti*. Myszy z tym genem mają żółte futro, są otyłe i chorują na cukrzycę. Jedna grupa myszy karmiona była dietą bogatą w kwas foliowy i witaminę B12 (donory grup metylowych), druga dietą standardową. Konsekwencją było brązowe ubarwienie i brak skłonności do otyłości i cukrzycy u potomstwa myszy z pierwszej grupy, zjawisko to utrzymywało się także w kolejnym pokoleniu. Wyjaśnieniem tego jest unieczynienie genu *aguti*, dokonujące się przez metylację DNA w obrębie promotora tego genu [67].

Stres, jako oddziaływanie środowiskowe, może także wpływać na wystąpienie różnych nieprawidłowości u potomstwa, bezpośrednio nienarażonego na jego szkodliwe oddziaływanie. Dowodzi tego zwiększone występowanie skłonności depresyjnych i lękowych u dzieci ojców dotkniętych cierpieniami w czasie ludobójstwa dokonywanego przez Czerwonych Kmerów w Kambo-

dzy. Ponadto, u dzieci australijskich weteranów wojny w Wietnamie, stwierdzono zwiększony współczynnik samobójstw. Sugeruje to przenoszenie się na kolejne pokolenia pozagenetycznego oddziaływania stresu na męskie komórki rozrodcze. Proponowany mechanizm tego wpływu to modyfikacja niekodującego RNA w nasieniu narażonych na stres mężczyzn [24].

Zmiany epigenetyczne występujące w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne (np. dieta, stres, leki) dokonują się m.in. przez metylację DNA lub modyfikację białek histonowych (acetylację, metylację, ubikwitynację, fosforylację). Po przyłączeniu wspomnianych substancji regulujących do DNA lub histonów stwierdza się, że genom zostaje oznakowany. Choć kolejność nukleotydów nie ulega zmianie, to sposób ich odczytu jest zmieniony. Modyfikacje przenoszą się na komórki potomne podczas mitozy, a także przechodzą na następne pokolenia przez ich transfer w czasie podziału mejotycznego.

Znakowanie genomu może się odbywać w sposób bezpośredni, jak to się dzieje w procesie metylacji, gdzie grupy metylowe łączą się bezpośrednio z zasadą azotową nukleotydu. Jest to jedyny fizjologiczny proces, w którym dochodzi do zmiany budowy DNA. Proces znakowania może się także dokonywać pośrednio, przez acetylację lub inne modyfikacje histonów. Wtedy grupy acetylowe nie łączą się bezpośrednio z DNA, lecz z histonami i modyfikują strukturę chromatyny. Wysoki stopień acetylacji białek histonowych powoduje rozluźnienie chromatyny i powstanie euchromatyny o dużej podatności do transkrypcji genów. Odwrotnie, powstanie stabilnej heterochromatyny wiąże się z małą acetylacją histonów i wzmożoną ich metylacją, zwłaszcza w obrębie histonu 3. To uniemożliwia działanie polimerazy RNA i transkrypcję genów.

Materiał genetyczny – genom, w połączeniu ze związkami modyfikującymi to epigenom. W odróżnieniu od genomu, epigenom podlega stałym modyfikacjom w czasie rozwoju danego organizmu. Jest to proces naturalny i konieczny do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka.

ODDZIAŁYWANIE EPIGENETYCZNE PRZEZ METYLACJĘ DNA

Metylacja DNA jest procesem niezwykle dynamicznym i zależnym od czynników środowiskowych, przede wszystkim od ilości dostarczanych w diecie donorów grup metylowych [47].

Proces metylacji DNA dokonuje się z udziałem metylotransferaz DNA (DNA methyltransferases - DNMT) i polega na przyłączeniu grupy metylowej do pozycji C5 cytozyny z wytworzeniem 5-metylocytozyny [87,91]. Odbywa się to zwykle w obszarach DNA bogatych w dinukleotyd CG. Najwięcej takich regionów, nazywanych wyspami CpG, znajduje się w okolicach promotorowych genów. 70-80% genów ma bogate w CpG regiony promotorowe, zwykle są odmetylowane [17]. Przyłączenie

grupy metylowej do cytozyny obniża ekspresję określonego genu i zmniejsza ilość lub brak kodowanego przez niego białka. Metylacja więc wygasa geny, a demetylacja je aktywuje.

Zbadano trzy rodzaje DNMT: DNMT1 odpowiada za podtrzymanie już zmetylowanego DNA, zwłaszcza w okresach podziałów komórkowych. Umożliwia przeniesienie wzorca metylacji na nowo powstałe DNA. DNMT3a i DNMT3b odpowiadają za metylację *de novo*, a DNMT2 prawdopodobnie uczestniczy w odpowiedzi komórkowej na stres [12,18,47]. Stopień metylacji podlega także regulacjom z udziałem demetylaz, działających odwrotnie - stymulując odłączanie grup metylowych od DNA (np. ten-eleven translocation protein - TET czy apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like - APOBEC). Metylacja obniża zdolności chromatyny do wiązania się z czynnikami transkrypcyjnymi oraz napływ i przyłączanie białek wiążących metylowane CpG (methyl-CpG-binding proteins - MBPs) do obszaru promotorowego genu, upośledzając transkrypcję. Skutkiem tego jest wyciszenie aktywności danego genu [6].

Ze względu na możliwość deiminacji 5-metylocytozyny do tyminy, epigenetyczne zmiany mogą się przekształcić w trwałe mutacje [76].

Wzór metylacji jak już wspomniano może się zmieniać. Ważne w tym kontekście wydają się wyniki badania Ai i wsp. z 2015 r., w którym wykazano różnice wzorca metylacji w obrębie synowocytów błony maziowej we wczesnym reumatoidalnym zapaleniu stawów (RZS) vs. RZS o długim czasie trwania [1]. Powyższe wyniki wymagają dalszych badań i mogą wskazywać na potencjalny mechanizm zastosowania leków modyfikujących metylację na wczesnym etapie RZS.

POTRANSLACYJNA MODYFIKACJA BIAŁEK HISTONOWYCH

Inny mechanizm oddziaływań epigenetycznych odbywa się przez modyfikację histonów, dotyczy hipotezy tzw. „kodu histonowego”. Rdzeń z ośmiu białek histonowych (po dwa H2A, H2B, H3 i H4) połączony z 200 nukleotydami, z czego 146 owiniętych jest na oktamerze histonowym tworzy nukleosom. To umożliwia upakowanie materiału genetycznego do chromatyny. W tej postaci DNA jest niedostępne dla polimeraz RNA. Według tej hipotezy, różne potranslacyjne modyfikacje białek histonowych ułatwiają lub utrudniają dostęp do nici DNA, a tym samym do ich transkrypcji. Może się to dokonywać w wyniku acetylacji i metylacji histonów, które są procesami najlepiej zbadanymi. Ale także przez fosforylację, ubikwitynację, izomeryzację proliny, sumoylację lub deiminację białek histonowych. Zidentyfikowano ponad 100 różnych modyfikacji potranslacyjnych w obrębie histonów. Stwarza to wielkie możliwości regulacyjne zawarte w „kodzie histonowym”, a ich liczba stale rośnie [26].

Wszystkie te procesy zachodzą z udziałem różnego rodzaju białek działających jako substancje zapisujące,

Tabela 1. Zestawienie białek biorących udział w modyfikacjach epigenetycznych związanych z metylacją DNA i oddziaływaniem na białka histonowe

Sposób działania	Metylacja DNA		Modyfikacje białek histonowych	
Zapisywanie	DNMTs	przyłączenie grupy metylowej do cytozyny w łańcuchu DNA	KATs	przyłączenie grupy acetylowej do lizyny na histonach
			KMTs	przyłączenie grupy metylowej do lizyny
			PRMTs	przyłączenie grupy metylowej do argininy
Wymazywanie	Glikozylacja DNA	mechanizm kandydujący, słabo zbadany	HDACs	odłączanie grupy acetylowej od histonu
			KDMs	odłączanie grupy metylowej od histonu
			PADI	przekształcenie argininy w cytrulinę
Czytanie	MBD - methyl-CpG binding protein	rozpoznaje obszary metylowanej cytozyny w sekwencjach CpG DNA	Bromodomain	BET- łączy się z acetylowaną lizyną na histonach, I-BET, (np. JQ1) hamują BET
			Tudor domain	łączy się z etylowaną lizyną lub arginina histonów
			MBT domain	modyfikacja chromatyny i wyciszenie licznych genów

KATs – K-acetylotransferazy (K-acetyltransferases), HDACs – deacetylazy histonowe (histone deacetylases), c) KMTs – K-metylotransferazy (K-methyltransferases), KDMs – K-demetylazy (K-demethylases), DNMTs – metylotransferazy DNA (DNA methyltransferases), PRMTs – metylotransferazy argininowe (protein arginine Methyltransferases), BET – rodzina białek odczytujących miejsca acetylacji histonów (bromodomain and extra-terminal motif), MBT – białko złośliwego guza mózgu (malignant brain tumor), PADI – deiminaza peptydyloarginowa (peptidylarginine deiminase)

czytające lub wymazujące poszczególne zmiany epigenetyczne na histonach, tworząc swoisty, zależny od środowiska i zmienny kod odczytu DNA z chromatyny [32]. Zestawienie białek biorących udział w modyfikacjach epigenetycznych związanych z metylacją DNA i oddziaływaniem na białka histonowe zestawiono w tabeli 1.

Do białek tych zalicza się:

- acetylotransferazy lizynowe, inaczej K-acetylotransferazy (K-acetyltransferases - KATs),
- deacetylazy histonowe (histone deacetylases – HDACs),
- K-metylotransferazy (K-methyltransferases – KMTs),
- K-demetylazy (K-demethylases – KDMs).

Proces acetylacji białek histonowych przez KATs wcześniej nazywane HATs (histone acetyltransferases) prowadzi do przyłączenia reszty acetylowej do lizyny i rozluźnienia struktury chromatyny. To odsłania DNA i umożliwia transkrypcję genów. HDACs, natomiast chronią chromatynę przed nadmierną acetylacją [15,33]. Istnieją cztery klasy HDACs. Klasa I obejmuje HDAC 1-3 i 8, klasa II 4,7,9 i 10, klasa III obejmuje 7 enzymów zaliczonych do grupy grupy sitruin (SIRT 1-7), a klasa IV to HDAC 11 [48]. KATs działają jako zapisywacze, HDACs jako wymazywacze i odpowiednio KMT i KDMs podobnie. Swoistymi „czytnikami” acetylacji histonów są białka zawierające bromodomeny. Białka należące do tej grupy są zbudowane z około 110 aminokwasów i łącząc się w miejscach acetylowanej lizyny do histonów, reorganizują strukturę chromatyny i nasilają rekrutację białek transkrypcyjnych. Zwiększa to transkrypcję genów

z obszarów acetylowanej chromatyny. Zidentyfikowano dotychczas 61 bromodomen. Najlepiej poznano należące do rodziny BET (bromodomain and extra-terminal motif), w skład których wchodzi 4 białka – BRDT, BRD2, BRD3 i BRD4. Wykazano, że obecność niektórych BET nasila reakcje zapalne w stawach [22,81].

Zwiększona metylacja w obrębie histonów może prowadzić zarówno do wzmożonej, jak i do obniżonej ekspresji genów [51]. Metylacja zwykle zachodzi z udziałem KMTs lub metylotransferaz argininowych. Natomiast demetylacja argininy z udziałem deiminazy peptydyloargininowej (peptidylarginine deiminase 4 - PADI4) powoduje cytrulinację w obrębie histonu [96]. Obecność cytrulinowanych histonów jest rozważana jako wczesny czynnik wyzwalający wytwarzanie autooprzeciwciał i brany pod uwagę jako istotny element patogenezы RZS [32].

Ekspresja genów może być modyfikowana także przez proces fosforylacji histonów, dotyczy to zwłaszcza histonu 3. Proces odbywa się z udziałem kinaz serynowych i tyreooinowych zaliczanych do kinaz Aurora. Są one dość dobrze poznane w kontekście patogenezы nowotworów [25].

WPEŁYW MECHANIZMÓW EPIGENETYCZNYCH NA RZS

W chorobach autoimmunizacyjnych, w tym RZS, stwierdzono istotne znaczenie predyspozycji genetycznych. Jednak częstość wystąpienia tych samych chorób u bliźniąt jednojajowych jest mniejsza niż 50%. W skom-

plikowanej siatce patogenetycznej RZS opisano udział czynników środowiskowych (palenie papierosów, odżywanie, zanieczyszczenie środowiska, infekcje, leki), lecz patomechanizm ich wpływu pozostaje niejasny lub niejednoznaczny. Sposób ich oddziaływania próbuje się wyjaśniać istnieniem jeszcze niezmapowanych wariantów genów, ich rzadkich wersji lub interakcji międzygenowych. Możliwym wyjaśnieniem może być ich wpływ przez epigenetyczną modyfikację ekspresji genów odpowiedzialnych za indukcję i podtrzymanie procesów zapalnych w stawach. Epigenom z natury jest wrażliwy na wpływy środowiskowe i modyfikuje wszelkie predyspozycje genetyczne w różnych wariantach fenotypowych [2,21,80,97].

ROLA METYLACJI DNA W RZS

Pierwsze doniesienia dotyczące wpływu metylacji DNA w RZS pochodzą z pracy Richardsona i wsp. z 1990 r. W populacji pacjentów chorych na RZS wykazali obniżenie ogólnej metylacji DNA w obrębie komórek T i komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cells - PBMC) [71,83]. Inne badania potwierdziły ich spostrzeżenia oraz wskazywały na zwiększanie się metylacji w tych komórkach w czasie terapii metotreksatem (MTX) [14,44]. Ogólny poziom metylacji DNA w RZS, ale także w SLE jest obniżony [20,59]. Wykazano także wpływ palenia papierosów, najlepiej udokumentowanego czynnika środowiskowego w patogenezie RZS, w hipometylacji obszarów CpG w obrębie promotora genu IL-6, co predysponuje do nadmiernego wytwarzania tej cytokiny [36,74]. Zaobserwowano także hipometylację w genach IL-10 i IL1R2 wśród pacjentów z rozpoznaniem RZS [58]. Wykryto także dwa skupiska metylacji w obrębie MHC, charakterystyczne dla RZS [60]. Wykazano także zwiększoną aktywność DNMT1 w PBMC w RZS, jednak bez korelacji z aktywnością choroby [59].

Fibroblasty błony maziowej w RZS (rheumatoid arthritis synovial fibroblasts – RASFs), które można uznać za komórki efektorowe, niszczące tkankę chrzęstną i kostną w RZS, wykazują zwiększoną skłonność do rozrostu, naciekania oraz zwiększoną oporność na apoptozę. Zmiana ich właściwości na tak agresywne, może być związana ze zwiększoną metylacją wysp CpG w obrębie promotora genu receptora śmierci 3 (death receptor 3 – DR3) i spadkiem ekspresji tego białka, a także obniżoną metylacją w samych RASFs [41,78,88].

Badaniu został poddany także obszar promotorowy genu hemokiny CXCL12 związanej bezpośrednio ze wzrostem stężenia metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (matrix metalloproteinase – MMP) w błonie maziowej stawów, której stężenie jest zwiększone w synowocytach o fenotypie fibroblastów (fibroblast like synoviocytes – FLS) w zmienionych zapalnie stawach. Stwierdzono, że metylacja regionów promotorowych tego genu jest znacząco niższa w RZS niż w chorobie zwyrodnieniowej stawów [42].

Do rejonów bogatych w CpG po ich metylacji przyłączają się MBPs. Pierwszą i najlepiej poznaną wśród nich jest MeCP2. Po jej przyłączeniu dochodzi do blokady transkrypcji różnych genów. W FLS i błonie maziowej stawów w modelu RZS u szczurów aktywność MeCP2 jest zwiększona, a stężenie białka sekrecyjnego podobnego do Frizzled (secreted Frizzled-related protein 4 - SFRP4) jest obniżone. Jedną z hipotez zakłada, że obniżone SFRP4 stwierdzone w błonie maziowej w RZS wiąże się ze wzrostem metylacji DNA. Zastosowanie natomiast 5-aza-2-deoksytydine (5-azadC, Azacitidine) obniża metylację powodując wzrost stężenia SFRP4 i zahamowanie różnicowania komórek w błonie maziowej na modelu zwierzęcym. Według tej hipotezy MeCP2 i metylacja DNA są ważnymi elementami patogenetycznymi w pobudzeniu kanonicznego szlaku WNT i mogą wraz z 5-azadC stanowić w przyszłości interesujący szlak w leczeniu RZS [50,52,65].

W przypadku stymulowanego *in vitro* przez IL-1 β wzrostu aktywności zapalnej FLS pochodzących od chorych na RZS, stwierdzono gwałtowne obniżenie się aktywności metylotransferaz DNA, DNMT1 i DNMT3a. Proces ten dokonuje się już w 2 do 8 godzin po stymulacji i prowadzi do obniżenia metylacji licznych genów i ich wzmożonej transkrypcji. Następstwem jest wzrost stężenia cytokin prozapalnych. Eliminacja IL-1 β zwiększa powoli aktywność DNMT1 i 3a i przywraca ich stężenia do normy dopiero po 14 dniach [68].

W badaniu limfocytów T CD4+ chorych na młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów wykazano 146 różnic w metylacji obszarów promotorowych różnych genów w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej. Po zastosowaniu MTX liczba spadła do 11. Jednym z obszarów o niskiej metylacji utrzymującej się mimo leczenia MTX był obszar genu IL-32 [20].

Wykazano hipometylację CpG w regionach regulujących ekspresję IL-6 pozostające w korelacji ze zwiększonym stężeniem IL-6 w surowicy [36,74]. Podobną zależność wykazano także dla TNF- α , gdzie stwierdzono związek hipometylacji w regionie promotorowym genu dla TNF- α ze zwiększonym wytwarzaniem TNF- α [62,85].

W innym badaniu stwierdzono wzmożoną ekspresję ligandu CD40 (CD40L) pozostającą w związku z demetylacją regionu promotorowego CD40L [56].

Porównanie metylacji FLS w RZS i chorobie zwyrodnieniowej stawów wykazało 1859 różnic w metylacji *loci* na 1209 genach [69]. Wskazuje to na znaczny wpływ regulacyjny procesu metylacji DNA.

ROLA MODYFIKACJI BIAŁEK HISTONOWYCH W RZS

Istnieją liczne dowody wskazujące na możliwość redukcji aktywności zapalnej przez inhibitory HDAC (HDAC inhibitor – HDI) [31]. Zastosowanie HDI obniża stężenie IL-6 i aktywność FLS w błonie maziowej stawów [29].

Tabela 2. Substancje modyfikujące mechanizmy epigenetyczne o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów

Proces podlegający wpływom	Miejsce uchwytu/enzymy poddane działaniu	Sposób działania/grupa związków	Substancje aktywne	Wpływ na procesy w RZS	Piśmiennictwo
Metylacja DNA	metylacja DNA/DNMTs	hamowanie metylacji DNA/DNMTi	5-azaC (Vidaza)	↓ różnicowania komórek w błonie maziowej i ↑ SFRP4	[50]
			FK-228		
			SAHA (Varinostat, Zolinaza)	↓ TNF-α i IL-1β	[13]
	acetylacja histonów/KATs	hamowanie deacetylacji histonów/HDI	MS-275 (Entinostat)		[13]
			Trichostatyna A (TSA)	↓ MMP-3, MMP-13, IL-6	[29,89]
			ITF2357 (Givinostat)	↓ liczba stawów bolesnych i obrzękniętych, ↓IL-6	[89]
EX-527		↓ IL-6	[73]		
Przekształcenia białek histonowych	odczyt miejsc acetylacji histonów/BET	hamowanie odczytywania miejsc acetylowanej lizyny/I-BET	I-BET151	↓ IL-1β, IL-6, IL-12α, MMP, chemokin	[46]
	fosforylacja histonów/kinazy Aurora	inhibitory kinaz Aurora	Tozasertib (VX-680)	↓ zapalenie stawów u myszy	[28]
	cytrulinacja argininy/PADI4	hamowanie cytrulinacji argininy w histonach/inhibitory PADI4	Thr-Asp-F-Amidina - TDFA		
Streptonigrina			redukcja cytrulinacji białek, konieczne pogłębione badania wpływu na RZS	[86]	
F4-amidina					
C14-amidina					
YW3-56					
metylacja i demetylacja histonów/DNMT	Inhibitory demetylaz DNA	GSK-J1	↓ wytwarzanie cytokin prozapalnych przez makrofagi	[10]	

DNMTs – DNA metylotransferazy (DNA methyltransferases), KATs – K-acetylotransferazy (K-acetyltransferases), 5-azadC – 5-aza-2-deoksyctydina, BET – białka zawierające bromodomeny (bromodomain and extra-terminal motif), PADI4 – deiminaza peptydyloargininowa 4 (Peptidylarginine Deiminase 4), I-BET – inhibitory BET (BET inhibitors), SFRP4 – białko sekrecyjne podobne do Frizzled (Frizzled-related protein 4).

Zastosowanie FK-228 – związku zaliczanego do HDI na zwierzęcym modelu zapalenia stawów bardzo szybko wygaszało objawy zapalne i obniżało stężenie TNF-α i IL-1β w błonie maziowej [93]. Podobne wyniki otrzymano po zastosowaniu innych HDI, SAHA i MS-275 [57]. Inny HDI to trichostatyna A (TSA), której zastosowanie w zapaleniu błony maziowej u myszy także obniżyło aktywność zapalną w stawach [70,89]. TSA, a także givinostat (ITF2357) wykazały znaczną skuteczność w obniżaniu wydzielania IL-6 w RASF [55].

KMT6 zwiększa metylację histonu 3, a jej zwiększona aktywność została wykazana w RASFs. Natomiast inna

KMT, SETD6 jest obniżona w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej chorych na RZS i młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów [54,90].

Inhibitory demetylaz, takie jak GSK-J1, hamujące demetylację lizyny 27 w obrębie histonu 3 (H3K27), redukują wytwarzanie cytokin prozapalnych przez makrofagi pacjentów chorych na RZS [53]. Proces ten jest regulowany w ramach szlaku NF-κβ przez przeciwnie działające enzymy z grupy Polycomb i Trithorax [16]. Także oddziaływanie na metylotransferazę H3K4 może stanowić potencjalny szlak hamujący procesy zapalne [3].

W RZS podwyższona jest także ekspresja metylotransferazy histonowej EZH2 w FLS odpowiedzialnej za aktywację RASFs w tej chorobie [90].

Apoptozę RASFs można modyfikować wpływając na acetylację histonów. Podanie TSA nasila apoptozę w tych komórkach [39]. Zaobserwowano także wzrost HDAC1 mRNA w RASFs i komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej u chorych na RZS [27,35]. Wykazano także wyższe stężenie HDACs i ich aktywność w RASFs w porównaniu do błony maziowej stawu w chorobie zwyrodnieniowej [43]. Stężenie klasy III HDACs, tzn. sirtuinu jest zwiększone w monocytach i makrofagach w RZS. Zastosowanie inhibitorów SIRT obniża stężenie TNF- α w monocytach w przebiegu RZS [73]. HDAC4 zwiększa wytwarzanie MMP i prostaglandyny E u chorych na RZS [9].

Także proces sumoylacji histonów odgrywa rolę w regulacji aktywności HDACs. Polega on na przyłączaniu do histonów białek modyfikujących podobnych do ubikwityny (small ubiquitin-like modifiers - SUMO). Stwierdzono występowanie takiego oddziaływania w sposób bezpośredni, a także pośrednio przez sumoylację innych białek powiązanych z aktywnością HDACs [45,94]. W RASFs wykazano zwiększoną aktywność SUMO1, a obniżoną proteazy SUMO. Obniżenie aktywności wspomnianej proteazy SUMO nasila acetylację w regionie promotorowym MMP-1 i zwiększa ekspresję genu tego białka. Przywrócenie aktywności proteazy SUMO nasilało aktywność HDAC4 i obniżało acetylację histonów, korygując aktywność promotora genu MMP1 [61,63].

Zaliczany także do mechanizmów epigenetycznych proces ubikwitynacji białek histonowych ma znaczenie regulacyjne w procesach zapalnych. Dotyczy to przede wszystkim szlaku NF- κ B. Ubikwitynacja reguluje poziom i aktywność NF- κ B na co najmniej trzech etapach: wytwarzania jego prekursora, degradacji inhibitora NF- κ B i aktywacji kinazy inhibitorów NF- κ B [11,77].

Inhibitory wspomnianych enzymów z grupy BET (BET inhibitor - I-BET) hamują wytwarzanie cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 β , IL-6, IL-12 α , MMP, chemokin oraz przeciwdziałają zmianom zapalnym w stawach [4,23,64]. Potwierdzono to w badaniu na stymulowanych FLS, stwierdzając obniżenie stężenia IL-6 i IL-8 przez I-BET151 [46]. Wykazano, że hamowanie BET powoduje spadek stężenia MMP, które jest wynikiem wzmożonej aktywności genu tkankowego inhibitora metaloproteinaz (tissue inhibitor of metalloproteinase - TIMP-1), a to obniża inwazyjność RASF [46,72]. W kolejnym badaniu wykazano, że I-BET151 zmniejsza liczbę osteoklastów w okolicy przynasadowej kości poprzez jego bezpośrednią zdolność do hamowania różnicowania osteoklastów [79].

PRÓBY ZASTOSOWANIA LEKÓW EPIGENETYCZNYCH W RZS

W dotychczasowej praktyce klinicznej nie wdrożono jeszcze żadnej substancji z grupy wpływających na

mechanizmy epigenetyczne do leczenia RZS. W badaniach wykazano, że liczna grupa związków chemicznych, wpływających na szlaki epigenetyczne, działa korzystnie na hamowanie procesów zapalnych w błonie maziowej i istnieją potencjalne możliwości ich zastosowania w RZS. Wymaga to jednak długotrwałych badań i znajduje się ciągle na bardzo wstępnym etapie. Zestawienie substancji o potencjalnych możliwościach wykorzystania do leczenia RZS przedstawiono w tabeli 2.

W kontekście wspomnianej wcześniej roli PADI4 w cytrulinacji histonów, potencjalnym celem leczenia może się stać PADI4. Wyodrębniono liczną grupę substancji o aktywności blokowania PADI4. Należą do nich Thr-Asp-F-Amidina - TDFA, streptonigrina, F4-amidina, Cl4-amidina czy YW3-56 [7,19,37,49,84,86,95]. Mogą się one stać obiektami do badań oceniających ich skuteczności w leczeniu RZS.

Wyszczególniono bardzo liczną grupę inhibitorów kinaz Aurora, są w trakcie intensywnych badań klinicznych w chorobach nowotworowych. Jedną z nich, nieselektywnie hamującą aktywność kinaz serynowych, tozasertib (VX-680) w modelu RZS na myszach, obniża stopień fosorylacji histonu 3 i indukuje bardzo silne pobudzenie limfocytów B do wchodzenia w proces apoptozy, co znacząco ogranicza objawy zapalne w stawach [28].

Pewne nadzieje związane są z grupą HDI. Substancje o aktywności hamowania deacetylaz histonowych w badaniach *in vitro* oraz na zwierzęcych modelach RZS wykazywały silny potencjał hamowania IL-6, TNF- α , makrofagów błony maziowej, proliferacji FLS, a także uczulenie FLS na działanie substancji stymulujących apoptozę [30,39,75]. Na modelu zwierzęcym stwierdzono korzystne działanie givinostat (ITF2357) - nieswoistego HDI klasy I/II na wytwarzanie czynników prozapalnych w modelu RZS [38]. Wyniki te znalazły potwierdzenie w badaniu II fazy u 17 chorych z młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów, u których stosowano givinostat przez 12 tygodni. Stwierdzono znaczące korzyści terapeutyczne, zmniejszenie liczby stawów bolesnych i obrzękniętych, przy doskonałym profilu bezpieczeństwa. Obserwowano tylko osłabienie, łagodne nudności i wymioty [92]. Zastosowanie wybiórczego inhibitora HDAC3 - MI192 obniża wytwarzanie IL-6 u chorych na RZS, nie wpływając na jego wytwarzanie w grupie kontrolnej u osób zdrowych [27]. Może to stwarzać potencjalne możliwości jego zastosowania w leczeniu RZS. Inne HDI, takie jak vorinostat czy entinostat (MS-275) także hamują aktywność FLS [13]. Korzyści w leczeniu RZS może przynosić także blokada demetylaz DNA, hamując wytwarzanie cytokin prozapalnych [10].

PODSUMOWANIE

Badania nad klinicznym zastosowaniem leków epigenetycznych w RZS znajdują się na bardzo wczesnym etapie.

Dużo większy rozmach można zaobserwować w badaniach nad ich zastosowaniem w leczeniu chorób rozrostowych. Ze względu jednak na liczne mechanizmy działania korzystne w RZS, jest to obiecująca grupa leków i podejmowane są próby ich zastosowania w chorobach reumatycznych. Poja-

wiają się ponadto nowe substancje, które wymagają określenia profilu działania, a przede wszystkim wpływu na komórki błony maziowej. Następne lata wykażą, jakie miejsce wśród leków przeciwreumatycznych znajdują preparaty o epigenetycznym mechanizmie działania.

PIŚMIENICTWO

- [1] Ai R., Whitaker J.W., Boyle D.L., Tak P.P., Gerlag D.M., Wang W., Firestein G.S.: DNA methylome signature in synoviocytes from patients with early rheumatoid arthritis compared to synoviocytes from patients with longstanding rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.*, 2015; 67: 1978-1980
- [2] Anway M.D., Cupp A.S., Uzumcu M., Skinner M.K.: Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, 2005; 308: 1466-1469
- [3] Austenaa L., Barozzi I., Chronowska A., Termanini A., Ostuni R., Prosperini E., Stewart A.F., Testa G., Natoli G.: The histone methyltransferase Wbp7 controls macrophage function through GPI glycolipid anchor synthesis. *Immunity*, 2012; 36: 572-585
- [4] Bandukwala H.S., Gagnon J., Togher S., Greenbaum J.A., Lamperti E.D., Parr N.J., Molesworth A.M., Smithers N., Lee K., Witherington J., Tough D.F., Prinjha R.K., Peters B., Rao A.: Selective inhibition of CD4⁺ T-cell cytokine production and autoimmunity by BET protein and c-Myc inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012; 109: 14532-14537
- [5] Barker D.J., Osmond C., Golding J., Kuh D., Wadsworth M.E.: Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *Br. Med. J.*, 1989; 298: 564-567
- [6] Bird A.P., Wolffe A.P.: Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin. *Cell*, 1999; 99: 451-454
- [7] Bozdogan M., Dreker T., Henry C., Tosco P., Vallaro M., Fruttero R., Scozzafava A., Carta F., Supuran C.T.: Novel small molecule protein arginine deiminase 4 (PAD4) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013; 23: 715-719
- [8] Bygren L.O., Kaati G., Edvinsson S.: Longevity determined by paternal ancestors' nutrition during their slow growth period. *Acta Biotheor.*, 2001; 49: 53-59
- [9] Chabane N., Li X., Fahmi H.: HDAC4 contributes to IL-1-induced mPGES-1 expression in human synovial fibroblasts through up-regulation of Egr-1 transcriptional activity. *J. Cell. Biochem.*, 2009; 106: 453-463
- [10] Che K.H.: Development of biochemical tools to characterise human H3K27 histone demethylase Jmjd3. University of Oxford; 2013
- [11] Chen Z.J.: Ubiquitin signalling in the NF-κB pathway. *Nat. Cell Biol.*, 2005; 7: 758-765
- [12] Chiang P.K., Gordon R.K., Tal J., Zeng G.C., Doctor B.P., Pardhasaradhi K., McCann P.P.: S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.*, 1996; 10: 471-480
- [13] Choo Q.Y., Ho P.C., Tanaka Y., Lin H.S.: Histone deacetylase inhibitors MS-275 and SAHA induced growth arrest and suppressed lipopolysaccharide-stimulated NF-κB p65 nuclear accumulation in human rheumatoid arthritis synovial fibroblastic E11 cells. *Rheumatology*, 2010; 49: 1447-1460
- [14] Corvetta A., Della Bitta R., Luchetti M.M., Pomponio G.: 5-Methylcytosine content of DNA in blood, synovial mononuclear cells and synovial tissue from patients affected by autoimmune rheumatic diseases. *J. Chromatogr.*, 1991; 566: 481-491
- [15] de Ruijter A.J., van Gennip A.H., Caron H.N., Kemp S., van Kullenburg A.B.: Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.*, 2003; 370: 737-749
- [16] De Santa F., Totaro M.G., Prosperini E., Notarbartolo S., Testa G., Natoli G.: The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell*, 2007; 130: 1083-1094
- [17] Deaton A.M., Bird A.: CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.*, 2011; 25: 1010-1022
- [18] Denis H., Ndlovu M.N., Fuks F.: Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Rep.*, 2011; 12: 647-656
- [19] Dreyton C.J., Jones J.E., Knuckley B.A., Subramanian V., Anderson E.D., Brown S.J., Fernandez-Vega V., Eberhart C., Spicer T., Zuhl A.M., Ferguson J., Speers A.E., Wang C., Boger D.L., Thompson P., Cravatt B.F., Hodder P., Rosen H.: Optimization and characterization of a pan protein arginine deiminase (PAD) inhibitor. Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program, Bethesda (MD) 2010
- [20] Ellis J.A., Munro J.E., Chavez R.A.: Genome-scale case-control analysis of CD4⁺ T-cell DNA methylation in juvenile idiopathic arthritis reveals potential targets involved in disease. *Clin. Epigenetics*, 2012; 4: 20
- [21] Feinberg A.P.: Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*, 2007; 447: 433-440
- [22] Filippakopoulos P., Knapp S.: The bromodomain interaction module. *FEBS Lett.*, 2012; 586: 2692-2704
- [23] Filippakopoulos P., Qi J., Picaud S., Shen Y., Smith W.B., Fedorov O., Morse E.M., Keates T., Hickman T.T., Felletar I., Philpott M., Munro S., McKeown M.R., Wang Y., Christie A.L. i wsp.: Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*, 2010; 468: 1067-1073
- [24] Gapp K., Jawaid A., Sarkies P., Bohacek J., Pelczar P., Prados J., Farinelli L., Miska E., Mansuy I.M.: Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat. Neurosci.*, 2014; 17: 667-669
- [25] Gautschi O., Heighway J., Mack P.C., Purnell P.R., Lara P.N.Jr., Gandara D.R.: Aurora kinases as anticancer drug targets. *Clin. Cancer Res.*, 2008; 14: 1639-1648
- [26] Gay S., Wilson A.G.: The emerging role of epigenetics in rheumatic diseases. *Rheumatology*, 2014; 53: 406-414
- [27] Gillespie J., Savic S., Wong C., Hempshall A., Inman M., Emery P., Grigg R., McDermott M.F.: Histone deacetylases are dysregulated in rheumatoid arthritis and a novel histone deacetylase 3-selective inhibitor reduces interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.*, 2012; 64: 418-422
- [28] Glant T.T., Besenyei T., Kádár A., Kurkó J., Tryniszewska B., Gál J., Soós G., Szekanez Z., Hoffmann G., Block J.A., Katz R.S., Mikecz K., Rauch T.A.: Differentially expressed epigenome modifiers, including aurora kinases A and B, in immune cells in rheumatoid arthritis in humans and mouse models. *Arthritis Rheum.*, 2013; 65: 1725-1735
- [29] Grabiec A.M., Korchynskyi O., Tak P.P., Reedquist K.A.: Histone deacetylase inhibitors suppress rheumatoid arthritis fibroblast-like

synoviocyte and macrophage IL-6 production by accelerating mRNA decay. *Ann. Rheum. Dis.*, 2012; 71: 424-431

[30] Grabiec A.M., Krausz S., de Jager W., Burakowski T., Groot D., Sanders M.E., Prakken B.J., Maslinski W., Eldering E., Tak P.P., Reedquist K.A.: Histone deacetylase inhibitors suppress inflammatory activation of rheumatoid arthritis patient synovial macrophages and tissue. *J. Immunol.*, 2010; 184: 2718-2728

[31] Grabiec A.M., Reedquist K.A.: The ascent of acetylation in the epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2013; 9: 311-318

[32] Gray S.G.: Epigenetic-based immune intervention for rheumatic diseases. *Epigenomics*, 2014; 6: 253-271

[33] Haberland M., Montgomery R.L., Olson E.N.: The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.*, 2009; 10: 32-42

[34] Holliday R.: DNA methylation and epigenetic inheritance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.*, 1990; 326: 329-338

[35] Horiuchi M., Morinobu A., Chin T., Sakai Y., Kurosaka M., Kumagai S.: Expression and function of histone deacetylases in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J. Rheumatol.*, 2009; 36: 1580-1589

[36] Ishida K., Kobayashi T., Ito S., Komatsu Y., Yokoyama T., Okada M., Abe A., Murasawa A., Yoshie H.: Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *J. Periodontol.*, 2012; 83: 917-925

[37] Jones J.E., Slack J.L., Fang P., Zhang X., Subramanian V., Causey C.P., Coonrod S.A., Guo M., Thompson P.R.: Synthesis and screening of a haloacetamide containing library to identify PAD4 selective inhibitors. *ACS Chem. Biol.*, 2012; 7: 160-165

[38] Joosten L.A., Leoni F., Meghji S., Mascagni P.: Inhibition of HDAC activity by ITF2357 ameliorates joint inflammation and prevents cartilage and bone destruction in experimental arthritis. *Mol. Med.*, 2011; 17: 391-396

[39] Jüngel A., Baresova V., Ospelt C., Simmen B.R., Michel B.A., Gay R.E., Gay S., Seemayer C.A., Neidhart M.: Trichostatin A sensitises rheumatoid arthritis synovial fibroblasts for TRAIL-induced apoptosis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2006; 65: 910-912

[40] Kaati G., Bygren L.O., Edvinsson S.: Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2002; 10: 682-688

[41] Karouzakis E., Gay R.E., Gay S., Neidhart M.: Epigenetic control in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2009; 5: 266-272

[42] Karouzakis E., Rengel Y., Jüngel A., Kolling C., Gay R.E., Michel B.A., Tak P.P., Gay S., Neidhart M., Ospelt C.: DNA methylation regulates the expression of CXCL12 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Genes Immun.*, 2011; 12: 643-652

[43] Kawabata T., Nishida K., Takasugi K., Ogawa H., Sada K., Kadota Y., Inagaki J., Hirohata S., Ninomiya Y., Makino H.: Increased activity and expression of histone deacetylase 1 in relation to tumor necrosis factor- α in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2010; 12: R133

[44] Kim Y.I., Logan J.W., Mason J.B., Roubenoff R.: DNA hypomethylation in inflammatory arthritis: reversal with methotrexate. *J. Lab. Clin. Med.*, 1996; 128: 165-172

[45] Kirsh O., Seeler J.S., Pichler A., Gast A., Müller S., Miska E., Mathieu M., Harel-Bellan A., Kouzarides T., Melchior F., Dejean A.: The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *EMBO J.*, 2002; 21: 2682-2691

[46] Klein K., Kabala P.A., Grabiec A.M., Gay R.E., Kolling C., Lin L.L., Gay S., Tak P.P., Prinjha R.K., Ospelt C., Reedquist K.A.: The bromodomain protein inhibitor I-BET151 suppresses expression of inflammatory genes and matrix degrading enzymes in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Ann. Rheum. Dis.*, 2016; 75: 422-429

[47] Klose R.J., Bird A.P.: Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.*, 2006; 31: 89-97

[48] Kloster M.M., Naderi E.H., Haaland I., Gjertsen B.T., Blomhoff H.K., Naderi S.: cAMP signalling inhibits p53 acetylation and apoptosis via HDAC and SIRT deacetylases. *Int. J. Oncol.*, 2013; 42: 1815-1821

[49] Knuckley B., Causey C.P., Jones J.E., Bhatia M., Dreyton C.J., Osborne T.C., Takahara H., Thompson P.R.: Substrate specificity and kinetic studies of PADs 1, 3, and 4 identify potent and selective inhibitors of protein arginine deiminase 3. *Biochemistry*, 2010; 49: 4852-4863

[50] Kooistra S.M., Helin K.: Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2012; 13: 297-311

[51] Kouzarides T.: Chromatin modifications and their function. *Cell*, 2007; 128: 693-705

[52] Koziński K., Dobrzyń A.: Wnt signaling pathway - its role in regulation of cell metabolism. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 1098-1108

[53] Kruidenier L., Chung C.W., Cheng Z., Liddle J., Che K., Joberty G., Bantscheff M., Bountra C., Bridges A., Diallo H., Eberhard D., Hutchinson S., Jones E., Katsos R., Leveridge M. i wsp.: A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature*, 2012; 488: 404-408

[54] Levy D., Kuo A.J., Chang Y., Schaefer U., Kitson C., Cheung P., Espejo A., Zee B.M., Liu C.L., Tangsombatvisit S., Tennen R.I., Kuo A.Y., Tanjing S., Cheung R., Chua K.F. i wsp.: Lysine methylation of the NF- κ B subunit RelA by SETD6 couples activity of the histone methyltransferase GLP at chromatin to tonic repression of NF- κ B signaling. *Nat. Immunol.*, 2011; 12: 29-36

[55] Liang J., Lei T., Song Y., Yanes N., Qi Y., Fu M.: RNA-destabilizing factor tristetraprolin negatively regulates NF- κ B signaling. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 29383-29390

[56] Liao J., Liang G., Xie S., Zhao H., Zuo X., Li F., Chen J., Zhao M., Chan T.M., Lu Q.: CD40L demethylation in CD4⁺ T cells from women with rheumatoid arthritis. *Clin. Immunol.*, 2012; 145: 13-18

[57] Lin H.S., Hu C.Y., Chan H.Y., Liew Y.Y., Huang H.P., Lepescheux L., Bastianelli E., Baron R., Rawadi G., Clément-Lacroix P.: Anti-rheumatic activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors *in vivo* in collagen-induced arthritis in rodents. *Br. J. Pharmacol.*, 2007; 150: 862-872

[58] Lin S.Y., Hsieh S.C., Lin Y.C., Lee C.N., Tsai M.H., Lai L.C., Chuang E.Y., Chen P.C., Hung C.C., Chen L.Y., Hsieh W.S., Niu D.M., Su Y.N., Ho H.N.: A whole genome methylation analysis of systemic lupus erythematosus: hypomethylation of the IL10 and IL1R2 promoters is associated with disease activity. *Genes Immun.*, 2012; 13: 214-220

[59] Liu C.C., Fang T.J., Ou T.T., Wu C.C., Li R.N., Lin Y.C., Lin C.H., Tsai W.C., Liu H.W., Yen J.H.: Global DNA methylation, DNMT1, and MBD2 in patients with rheumatoid arthritis. *Immunol. Lett.*, 2011; 135: 96-99

[60] Liu Y., Aryee M.J., Padyukov L., Fallin M.D., Hesselberg E., Runarsson A., Reinius L., Acevedo N., Taub M., Ronninger M., Shchetynsky K., Scheynius A., Kere J., Alfredsson L., Klareskog L. i wsp.: Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. *Nat. Biotechnol.*, 2013; 31: 142-147

[61] Maciejewska-Rodrigues H., Karouzakis E., Strietholt S., Hemmatzad H., Neidhart M., Ospelt C., Gay R.E., Michel B.A., Pap T., Gay S., Jüngel A.: Epigenetics and rheumatoid arthritis: the role of SENP1 in the regulation of MMP-1 expression. *J. Autoimmun.*, 2010; 35: 15-22

[62] McInnes I.B., Schett G.: Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007; 7: 429-442

[63] Meinecke I., Cinski A., Baier A., Peters M.A., Dankbar B., Wille A., Drynda A., Mendoza H., Gay R.E., Hay R.T., Ink B., Gay S., Pap T.: Modification of nuclear PML protein by SUMO-1 regulates Fas-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 5073-5078

[64] Mele D.A., Salmeron A., Ghosh S., Huang H.R., Bryant B.M., Lora

- J.M.: BET bromodomain inhibition suppresses TH17-mediated pathology. *J. Exp. Med.*, 2013; 210: 2181-2190
- [65] Miao C.G., Huang C., Huang Y., Yang Y.Y., He X., Zhang L., Lv X.W., Jin Y., Li J.: MeCP2 modulates the canonical Wnt pathway activation by targeting SFRP4 in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes in rats. *Cell. Signal.*, 2013; 25: 598-608
- [66] Moore D.S. *The developing genome: an introduction to behavioral epigenetics*: Oxford University Press, 2015
- [67] Morgan H.D., Sutherland H.G., Martin D.I., Whitelaw E.: Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat. Genet.*, 1999; 23: 314-318
- [68] Nakano K., Boyle D.L., Firestein G.S.: Regulation of DNA methylation in rheumatoid arthritis synoviocytes. *J. Immunol.*, 2013; 190: 1297-1303
- [69] Nakano K., Whitaker J.W., Boyle D.L., Wang W., Firestein G.S.: DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2013; 72: 110-117
- [70] Nasu Y., Nishida K., Miyazawa S., Komiyama T., Kadota Y., Abe N., Yoshida A., Hirohata S., Ohtsuka A., Ozaki T.: Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses synovial inflammation and subsequent cartilage destruction in a collagen antibody-induced arthritis mouse model. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008; 16: 723-732
- [71] Neidhart M., Rethage J., Kuchen S., Künzler P., Crowl R.M., Billingham M.E., Gay R.E., Gay S.: Retrotransposable L1 elements expressed in rheumatoid arthritis synovial tissue: Association with genomic DNA hypomethylation and influence on gene expression. *Arthritis Rheum.*, 2000; 43: 2634-2647
- [72] Nicodeme E., Jeffrey K.L., Schaefer U., Beinke S., Dewell S., Chung C.W., Chandwani R., Marazzi I., Wilson P., Coste H., White J., Kirilovsky J., Rice C.M., Lora J.M., Prinjha R.K. i wsp.: Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature*, 2010; 468: 1119-1123
- [73] Niederer F., Ospelt C., Brentano F., Hottiger M.O., Gay R.E., Gay S., Detmar M., Kyburz D.: SIRT1 overexpression in the rheumatoid arthritis synovium contributes to proinflammatory cytokine production and apoptosis resistance. *Ann. Rheum. Dis.*, 2011; 70: 1866-1873
- [74] Nile C.J., Read R.C., Akil M., Duff G.W., Wilson A.G.: Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2008; 58: 2686-2693
- [75] Nishida K., Komiyama T., Miyazawa S., Shen Z.N., Furumatsu T., Doi H., Yoshida A., Yamana J., Yamamura M., Ninomiya Y., Inoue H., Asahara H.: Histone deacetylase inhibitor suppression of autoantibody-mediated arthritis in mice via regulation of p16^{INK4a} and p21^{WAF1/CIP1} expression. *Arthritis Rheum.*, 2004; 50: 3365-3376
- [76] Oppermann U.: Why is epigenetics important in understanding the pathogenesis of inflammatory musculoskeletal diseases? *Arthritis Res. Ther.*, 2013; 15: 209
- [77] Osley M.A., Fleming A.B., Kao C.F. Histone ubiquitylation and the regulation of transcription. *Results Probl. Cell Differ.*, 2006; 41: 47-75
- [78] Ospelt C., Gay S.: The role of resident synovial cells in destructive arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2008; 22: 239-252
- [79] Park-Min K.H., Lim E., Lee M.J., Park S.H., Giannopoulos E., Yarinina A., van der Meulen M., Zhao B., Smithers N., Witherington J., Lee K., Tak P.P., Prinjha R.K., Ivashkiv L.B.: Inhibition of osteoclastogenesis and inflammatory bone resorption by targeting BET proteins and epigenetic regulation. *Nat. Commun.*, 2014; 5: 5418
- [80] Petronis A.: Epigenetics as a unifying principle in the aetiology of complex traits and diseases. *Nature*, 2010; 465: 721-727
- [81] Prinjha R.K., Witherington J., Lee K.: Place your BETs: the therapeutic potential of bromodomains. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2012; 33: 146-153
- [82] Ravelli A.C., van der Meulen J.H., Michels R.P., Osmond C., Barker D.J., Hales C.N., Bleker O.P.: Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet*, 1998; 351: 173-177
- [83] Richardson B., Scheinbart L., Strahler J., Gross L., Hanash S., Johnson M.: Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1990; 33: 1665-1673
- [84] Slack J.L., Causey C.P., Thompson P.R.: Protein arginine deiminase 4: a target for an epigenetic cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2011; 68: 709-720
- [85] Sullivan K.E., Reddy A.B., Dietzmann K., Suriano A.R., Kocieda V.P., Stewart M., Bhatia M.: Epigenetic regulation of tumor necrosis factor alpha. *Mol. Cell. Biol.*, 2007; 27: 5147-5160
- [86] Suzuki A., Kochi Y., Shoda H., Seri Y., Fujio K., Sawada T., Yamada R., Yamamoto K.: Decreased severity of experimental autoimmune arthritis in peptidylarginine deiminase type 4 knockout mice. *BMC Musculoskelet. Disord.*, 2016; 17: 205
- [87] Suzuki M.M., Bird A.: DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Genet.*, 2008; 9: 465-476
- [88] Takami N., Osawa K., Miura Y., Komai K., Taniguchi M., Shiraishi M., Sato K., Iguchi T., Shiozawa K., Hashiramoto A., Shiozawa S.: Hypermethylated promoter region of DR3, the death receptor 3 gene, in rheumatoid arthritis synovial cells. *Arthritis Rheum.*, 2006; 54: 779-787
- [89] Tough D.F., Prinjha R.K., Tak P.P.: Epigenetic mechanisms and drug discovery in rheumatology. *Clin. Med.*, 2015; 15 (Suppl. 6): s64-s71
- [90] Trenkmann M., Brock M., Gay R.E., Kolling C., Speich R., Michel B.A., Gay S., Huber L.C.: Expression and function of EZH2 in synovial fibroblasts: epigenetic repression of the Wnt inhibitor SFRP1 in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2011; 70: 1482-1488
- [91] Trenkmann M., Brock M., Ospelt C., Gay S.: Epigenetics in rheumatoid arthritis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2010; 39: 10-19
- [92] Vojinovic J., Damjanov N., D'Urzo C., Furlan A., Susic G., Pasic S., Jagaru N., Stefan M., Dinarello C.A.: Safety and efficacy of an oral histone deacetylase inhibitor in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2011; 63: 1452-1458
- [93] Vossenaar E.R., Radstake T.R., van der Heijden A., van Mansum M.A., Dieteren C., de Rooij D.J., Barrera P., Zendman A.J., van Venrooij W.J.: Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann. Rheum. Dis.*, 2004; 63: 373-381
- [94] Wang W.L., Lee Y.C., Yang W.M., Chang W.C., Wang J.M.: Sumoylation of LAP1 is involved in the HDAC4-mediated repression of COX-2 transcription. *Nucleic Acids Res.*, 2008; 36: 6066-6079
- [95] Wang Y., Li P., Wang S., Hu J., Chen X.A., Wu J., Fisher M., Oshaben K., Zhao N., Gu Y., Wang D., Chen G., Wang Y.: Anticancer peptidylarginine deiminase (PAD) inhibitors regulate the autophagy flux and the mammalian target of rapamycin complex 1 activity. *J. Biol. Chem.*, 2012; 287: 25941-25953
- [96] Wang Y., Wysocka J., Sayegh J., Lee Y.H., Perlin J.R., Leonelli L., Sonbuchner L.S., McDonald C.H., Cook R.G., Dou Y., Roeder R.G., Clarke S., Stallcup M.R., Allis C.D., Coonrod S.A.: Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation. *Science*, 2004; 306: 279-283
- [97] Weaver I.C., Cervoni N., Champagne F.A., D'Alessio A.C., Sharma S., Seckl J.R., Dymov S., Szyf M., Meaney M.J.: Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.*, 2004; 7: 847-854

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.