Rola metylacji DNA i RNA w nowotworach: Mechanizmy i potencjał terapeutyczny leków epigenetycznych i epitranskryptomicznych

Julia Pisarek[1],

dr hab. Marta Koblowska[1,2,✉]

[1] Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski,

[2] Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

https://doi.org/10.18388/pb.2021_637

✉Autor korespondencyjny:
mk.koblowsk@uw.edu.pl

Słowa kluczowe: 5-metylocytozyna, N6-metyloadenozyna, terapia przeciwnowotworowa, leki epigenetyczne, leki epitranskryptomiczne

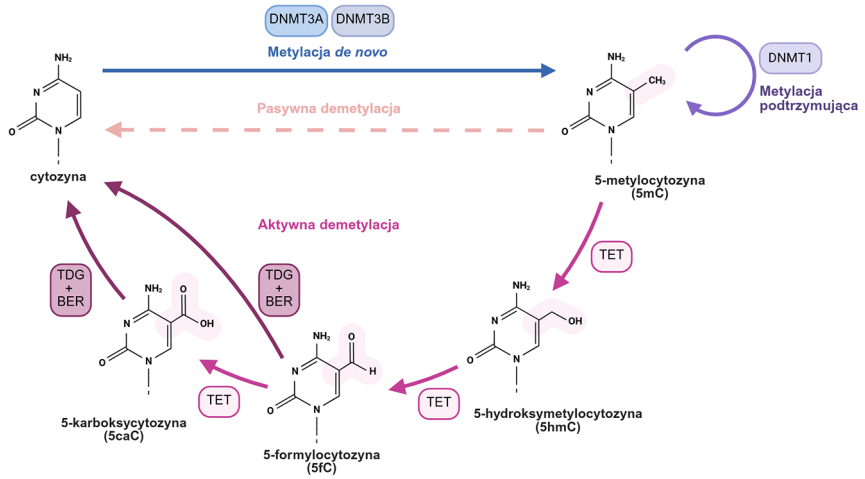
Wykaz skrótów: 5caC – 5-karboksycytozyna; 5fC – 5-formylocytozyna; 5hmC – 5-hydroksymetylocytozyna; 5mC – 5-metylocytozyna; CpG – dinukleotyd cytydyna fosforan guanina; m^6A – N6-metyloadenozyna; MBD – domena wiążąca 5 metylocytozynę dinukleotydu CpG DNA (ang. *methyl CpG binding domain*); MBP – białka wiążące się z 5 metylocytozyną dinukleotydu CpG DNA (ang. *methyl-CpG-binding proteins*); α-KG – α-ketoglutaran).

STRESZCZENIE

Chemiczne modyfikacje DNA i RNA odgrywają kluczową rolę w regulacji ekspresji genów, umożliwiając precyzyjną kontrolę funkcji i adaptację komórek do zmiennych warunków. Najczęstszą modyfikacją DNA jest 5-metylocytozyna (5mC), a w RNA – N6-metyladenozyna (m^6A), uznawana za główny znacznik epitranskryptomiczny. Ich kontrola zależy od współdziałania trzech grup białek: metylotransferaz, demetylaz oraz białek odczytujących, które rozpoznają modyfikowane zasady i rekrutują białkowe kompleksy efektorowe, przekładając w ten sposób wzór modyfikacji kwasów nukleinowych na odpowiedź biologiczną. Dysfunkcja tych regulatorów prowadzi do nieprawidłowych profili 5mC i m^6A, co zaburza ekspresję genów związanych z proliferacją, apoptozą, naprawą DNA i stabilnością genomu, przyczyniając się do rozwoju wielu chorób, zwłaszcza nowotworów. Przegląd omawia mechanizmy regulacji metylacji DNA i RNA, ich udział w patogenezie nowotworów, wzajemne zależności tych modyfikacji oraz ich potencjał diagnostyczny i terapeutyczny. W pracy podkreślamy znaczenie zrozumienia odwracalnych zmian epigenetycznych i epitranskryptomicznych dla rozwoju nowoczesnej onkologii i badań nad molekularnymi podstawami transformacji nowotworowej.

WPROWADZENIE

Według prognoz Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), do 2050 roku liczba nowych przypadków raka na świecie może przekroczyć 35 milionów, co oznacza wzrost o 77% w porównaniu z szacowanymi 20 milionami przypadków odnotowanymi w 2022 roku [1]. Przyczyny tak dynamicznego wzrostu są wieloczynnikowe i obejmują zarówno demograficzne zmiany populacji, takie jak jej przyrost oraz starzenie się, jak i modyfikowalne czynniki związane ze stylem życia, w tym dieta, aktywność fizyczna i nawyki zdrowotne. Dodatkowo, znaczącą rolę odgrywa rosnąca ekspozycja na szkodliwe czynniki środowiskowe, takie jak zanieczyszczenia powietrza, promieniowanie UV czy substancje chemiczne. Wymienione czynniki mogą istotnie wpływać na wyrażanie genów, a zaburzenia tego procesu często prowadzą do powstawania różnego rodzaju nowotworów.



Rycina 1. Schemat reakcji metylacji i demetylacji cytozyny. Metylotransferazy DNA (DNMT) katalizują reakcję metylacji cytozyny do 5-metylocytozyny (5mC). DNMT3A oraz DNMT3B odpowiadają za metylację *de novo*, czyli pierwotne ustalenie wzoru metylowanej cytozyny DNA. DNMT1 odpowiada za utrzymywanie wzoru metylowanej cytozyny na nowo powstałej podczas replikacji nici DNA. Pasywna demetylacja to stopniowa utrata 5mC podczas replikacji DNA, związana z zaburzeniami funkcjonowania DNMT1. W aktywnej demetylacji biorą udział białka rodziny Ten-Eleven Translocation (TET), które katalizują reakcje utleniania 5mC do 5-hydroksymetylocytozyny (5hmC), 5-formylocytozyny (5fC) i 5-karboksycytozyny (5caC). 5fC oraz 5caC mogą być zastąpione niezmodyfikowaną cytozyną na skutek działania glikozylazy tyminy DNA (TDG) oraz innych elementów systemu naprawy DNA przez wycinanie zasady azotowej (BER). Wykonano w programie BioRender na podstawie szablonu: „DNA methylation", autorstwa BioRender (2022) https://app.biorender.com/biorender-templates.

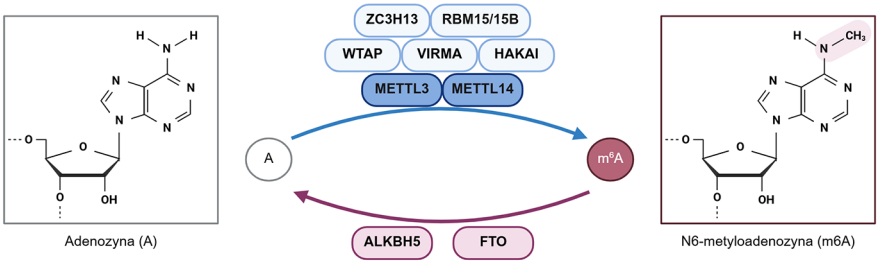
Od dawna wiadomo, że zaburzenia ekspresji kluczowych genów dla powstawania i progresji nowotworów, jak onkogeny i geny supresorowe, nie są jedynie wynikiem zmian w sekwencji genomu, ale ściśle zależą od mechanizmów regulacyjnych [2]. Pierwszym i podstawowym etapem ekspresji genów jest transkrypcja, która podlega ścisłej i wielopoziomowej kontroli. Kluczowa dla modulacji aktywności transkrypcyjnej jest dynamika i przestrzenna organizacja chromatyny, które kontrolują zmiany dostępności sekwencji regulatorowych DNA dla specyficznych czynników transkrypcyjnych, maszynerii transkrypcyjnej i innych białek regulatorowych [3]. Zmiany strukturalne chromatyny zależą od wielu elementów, jak aktywność kompleksów remodelujących chromatynę, obecność różnorodnych potranslacyjnych modyfikacji histonów czy długich niekodujących cząsteczek RNA (lncRNA, ang. *long non-coding RNA*) i mikro RNA (miRNA) [4]. A jednym z kluczowych i najlepiej poznanych elementów epigenetycznej regulacji genów jest metylacja cytozyn w DNA, która u eukariontów polega na przyłączeniu grupy metylowej (-CH_3) do atomu węgla C-5 pierścienia pirymidynowego cytozyny (Ryc.1). W ludzkim genomie ok. 4% cytozyn występuje w postaci 5-metylocytozyny (5mC) [5], a modyfikacja ta występuje przede wszystkim w obrębie dinukleotydów CpG, gdzie cytozyna poprzedza guaninę w sekwencji DNA. Badania pokazują, że u ssaków 70 do 80% dinukleotydów CpG występuje w formie zmetylowanej [6], a 5mC często nazywana jest „piątą zasadą azotową DNA" . Rola tej modyfikacji w regulacji transkrypcji silnie zależy od jej lokalizacji w chromatynie. Właściwe rozmieszczenie w genomie 5-metylocytozyny ma kluczowe znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórek i rozwoju organizmu [5, 7]. Badania prowadzone w ostatnich dekadach jednoznacznie wskazują, że czynniki środowiskowe i styl życia wpływają na mechanizmy epigenetyczne, w tym na metylację cytozyn w DNA [8].

Oprócz metylacji DNA na wyrażanie genów mają również wpływ modyfikacje chemiczne cząsteczek kwasu rybonukleinowego (RNA). Ostatnie lata przyniosły wiele ciekawych wyników dotyczących znaczenia tego typu znaczników dla regulacji genów. Dotychczas w RNA opisano ponad 170 typów modyfikacji chemicznych, z których wiele pełni kluczowe funkcje regulacyjne określane mianem modyfikacji epitranskryptomicznych [9]. Chemiczne modyfikacje nukleotydów RNA występują zarówno w kodującym jak i niekodującym RNA. Pełniona przez dany znacznik funkcja w regulacji procesów biologicznych jest w pełni uzależniona od typu modyfikowanego RNA, rodzaju i lokalizacji cząsteczkowej modyfikacji i szerszego kontekstu biologicznego.

Epitranskryptomiczne modyfikacje informacyjnego RNA (mRNA, ang. *messenger RNA*) wpływają na ekspresję genów poprzez modulację metabolizmu RNA, jego lokalizacji komórkowej, translacji czy degradacji. Jest to konsekwencją indukowanych przez chemiczne modyfikacje zmian w parowaniu zasad, ładunku cząsteczki, strukturach drugorzędowych RNA i interakcji RNA z białkami [10]. Wśród tych modyfikacji to metylacja atomu azotu w pozycji 6 adeniny (Ryc.2) jest najbardziej rozpowszechnioną u eukariontów modyfikacją wewnętrznych sekwencji RNA i stanowi ponad 80% wszystkich modyfikacji RNA [11]. W komórkach ssaków ok. 0,1% - 0,4% reszt adeniny RNA występuje w formie N6metyloadenozyny (m^6A) [12].

Z patogenezą i progresją nowotworów związane są zaburzenia modyfikacji epigenetycznych, w tym metylacji DNA, które mogą być indukowane przez czynniki genetyczne, metaboliczne lub środowiskowe. Zaburzenia te prowadzą do wzmożonej ekspresji onkogenów, wyciszenia ekspresji genów supresorowych lub zmian ekspresji genów determinujących los komórki [13]. Epitranskryptomika, choć wciąż znajduje się na wczesnym etapie rozwoju jako dziedzina naukowa, zyskuje coraz większe znaczenie badawcze a rosnąca liczba doniesień wskazuje na istotny związek między zaburzeniami aktywności białek uczestniczących w modyfikacjach RNA a inicjacją i progresją procesów nowotworowych. Zrozumienie tych zależności jest kluczowe, ponieważ wskazuje, że modyfikacje RNA – podobnie jak klasyczne zmiany epigenetyczne w DNA – mogą stanowić krytyczny element w mechanizmach transformacji nowotworowej. Stwierdzono w wielu rodzajach nowotworów, że na skutek mutacji lub zaburzeń epigenetycznych zachodzi deregulacja ekspresji genów kodujących białka odpowiadające właśnie za modyfikacje epitranskryptomiczne [14]. Co więcej, najnowsze badania pokazują funkcjonalną współzależność pomiędzy metylacją DNA (5mC) a metylacją mRNA (m^6A), której zaburzenia mogą w sposób synergistyczny modulować sieci regulacyjne ekspresji genów i sprzyjać progresji nowotworów. Podobnie jak w badaniach nad zmianami metylacji cytozyn w DNA, także wpływ czynników środowiskowych na modyfikację N6-metyloadenozyny (m^6A) w mRNA zyskuje coraz większą uwagę. Nowe analizy pokazują, że czynniki, takie jak ekspozycja na związki chemiczne lub promieniowanie, mogą indukować jednoczesne zmiany w metylacji DNA oraz w metylacji RNA m^6A, co z kolei może prowadzić do skoordynowanej deregulacji ekspresji genów i przyczyniać się do inicjacji i progresji nowotworowej.

Rosnące zainteresowanie ustaleniem interakcji między czynnikami środowiskowymi a metylacją kwasów nukleinowych podkreśla znaczenie epigenetyki i epitranskryptomiki w zrozumieniu jak bodźce zewnętrzne mogą wpływać



Rycina 2. Wieloskładnikowy kompleks metylotransferaz N6-metyloadenozyny mRNA. Kompleks składa się z heterodimeru METTL3-METTL14 i oddziałujących z nim białek WTAP, VIRMA, RBM15/15B, HAKAI i ZC3H13. Demetylacja m^6A mRNA katalizowana jest przez demetylazy ALKBH5 i FTO. Wykonano w programie BioRender.com.

na regulację ekspresji genów i przyczyniać się do rozwoju chorób [15]. Na podstawie licznych dostępnych badań można jednoznacznie stwierdzić, że wśród różnorodnych modyfikacji, metylacje cytozyny DNA oraz adenozyny RNA wyróżnia istotna rola w rozwoju nowotworów.

Aktualnie stosowane terapie przeciwnowotworowe charakteryzuje ograniczona skuteczność działania, związana m.in. z występowaniem poważnych skutków ubocznych czy rozwojem oporności na leczenie [16]. Dlatego też istnieje pilna potrzeba opracowania innowacyjnych strategii leczenia nowotworów. Obiecujący kierunek rozwoju stanowią leki modulujące aktywność białek zaangażowanych w regulację epigenetyczną i epitranskryptomiczną, ze względu na dynamiczny charakter i odwracalność tych modyfikacji [17].

METYLACJA CYTOZYNY DNA

Profil metylacji cytozyny charakteryzujący dany genom nazywany jest metylomem. Metylacja cytozyny w DNA odgrywa kluczową rolę w rozwoju zarodkowym człowieka, wpływa na wyciszanie kopii genu pochodzącej od jednego z rodziców, co leży u podstaw mechanizmu piętnowania genomowego. Ponadto metylacja cytozyny jest niezbędna dla inaktywacji jednego z chromosomów X u kobiet. Wraz z wiekiem dochodzi do istotnych zmian we wzorach metylacji DNA, obserwuje się wzrost globalnej hipometylacji oraz lokalnej hipermetylacji, co jest charakterystycznym zjawiskiem związanym z procesem starzenia [18].

Przyłączenie grupy metylowej, której donorem jest S-adenozylometionina (SAM), do węgla w pozycji 5' pierścienia cytozyny katalizowane jest przez enzymy z rodziny metylotransferaz DNA (DNMT, ang. *DNA methyltransferase*) [19]. Metylacja cytozyn jest istotna zarówno dla regulacji ekspresji genów jak i utrzymania stabilności genomu. Elementy powtarzające się, takie jak sekwencje LINE-1, SINE (głównie Alu) oraz satelitarny DNA, stanowią około 50% ludzkiego genomu i są potencjalnie mobilne, co może zagrażać stabilności genomowej. Ich metylacja odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu integralności genomu poprzez represję transpozycji oraz zapobieganie aberracjom transkrypcyjnym i rekombinacyjnym [20, 21].

Oprócz rozproszonych w genomie dinukleotydów CpG wyróżnia się też ich skupiska zwane wyspami CpG, charakteryzujące się niskim stopniem metylacji cytozyny. Wyspy CpG najczęściej obejmują obszary promotorowe i wzmacniacze [22]. Obecność 5mC w promotorach genów najczęściej prowadzi do wyciszenia ich ekspresji głównie na skutek uniemożliwienia wiązania czynników transkrypcyjnych, ale również poprzez interakcję z regulatorami odczytującymi informację o metylacji [23]. Natomiast 5mC znajdująca się w obszarze genu stanowi pozytywny regulator transkrypcji, jako że zapewnia poprawny przebieg alternatywnego splicingu oraz zapobiega błędnej transkrypcji poprzez uniemożliwienie wiązania polimerazy RNA II z kryptycznymi promotorami [24]. Niemniej jednak, istnieją przykłady genów (głównie związanych z rozwojem embrionalnym i nowotworzeniem), gdzie wysoki stopień metylacji promotora związany jest z ich zwiększoną aktywnością transkrypcyjną [25]. Przyczyna wzrostu ekspresji genów na skutek metylacji DNA jest nadal przedmiotem badań. Potencjalne wyjaśnienie stanowią zidentyfikowane czynniki transkrypcyjne wykazujące preferencję wobec wiązania z 5mC w dinukleotydach CpG [26].

METYLOTRANSFERAZY DNA

Metylotransferazy DNA: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B oraz DNMT3L odpowiadają za metylację cytozyn. W ich strukturze wyróżnia się N-końcową domenę regulatorową oraz C-końcową domenę katalityczną odpowiedzialną za wiązanie donora grup metylowych (SAM) i DNA. Mechanizm oddziaływania DNMT z cytozyną polega na przemieszczeniu docelowej cytozyny na zewnątrz podwójnej helisy DNA. Następnie cytozyna ta jest umieszczona w hydrofobowej kieszeni katalitycznej, która znajduje się w centrum aktywnym DNMT. Kolejnym etapem jest utworzenie kowalencyjnego wiązania enzym-substrat, co ostatecznie prowadzi do przeniesienia grupy metylowej z SAM na cytozynę [27].

DNMT1 jest metylotransferazą specyficzną wobec hemimetylowanych dinukleotydów CpG, której główną funkcją jest utrzymanie metylacji na obydwu niciach DNA, co nazywane jest metylacją podtrzymująca [28]. Wydajność tego procesu jest niezbędna dla zachowania jednakowej ekspresji genów i tożsamości komórek potomnych po podziale komórkowym. Już 20 minut po zakończeniu replikacji obserwowane jest odtworzenie metylacji cytozyny w kontekście większości dinukleotydów CpG na obydwu niciach [29]. W domenie katalitycznej DNMT1 wyróżnia się subdomenę odpowiedzialną za rozpoznanie hemimetylowanych cytozyn. W obrębie domeny regulatorowej DNMT1 obecne są m.in. subdomeny odpowiedzialne za wiązanie niemetylowanych dinukleotydów CpG, represorów transkrypcji oraz białek zaangażowanych w rekrutację DNMT1 do obszaru widełek replikacyjnych [30].

Z kolei DNMT3A i DNMT3B są szczególnie istotne podczas rozwoju embrionalnego. Główną funkcją tych enzymów jest metylacja *de novo*, czyli pierwotne ustalanie wzoru metylowanej cytozyny. W domenach regulatorowych DNMT3A i DNMT3B obecne są silnie konserwowane domeny PWW i ADD. Odpowiadają one za rozpoznawanie specyficznych modyfikacji histonowych i wybiórcze oddziaływanie z chromatyną. Umożliwia to tym enzymom efektywną katalizę metylacji DNA *de novo* w określonych regionach genomu. W obszarze C-końcowej domeny DNMT3A i DNMT3B obecne jest centrum katalityczne enzymów. Białko DNMT3L jest nieaktywne katalitycznie, nie posiada fragmentów domeny katalitycznej i regulatorowej obecnych u DNMT3A i DNMT3B. Jednakże, DNMT3L jest koregulatorem niezbędnym dla prawidłowego funkcjonowania pozostałych DNMT3 [27].

DEMETYLACJA 5-METYLOCYTOZYNY DNA

Równowaga między reakcjami metylacji a demetylacji DNA jest kluczowa dla utrzymania prawidłowej ekspresji genów. Grupa metylowa przyłączona do węgla w pozycji 5 pierścienia cytozyny może być usuwana pasywnie lub ak-

tywnie (Ryc. 1). Pasywna demetylacja uzależniona jest od replikacji DNA. Gdy wzór metylowanej cytozyny nie zostanie odtworzony na nowo powstałej nici DNA, z każdą kolejną rundą replikacji hemimetylowanego DNA stopniowo zmniejsza się poziom 5mC [31]. Pasywna demetylacja związana jest z zaburzeniami funkcjonowania elementów maszynerii odpowiedzialnej za metylację podtrzymującą [32]. Aktywną demetylacją określa się reakcje katalizowane przez białka rodziny TET (ang. *Ten-Eleven Translocation*), które należą do grupy dioksygenaz zależnych od jonów żelaza na II stopniu utlenienia oraz α-ketoglutaranu (α-KG). Aktywność enzymatyczna białek TET zależy również od dostępności tlenu. Reakcja demetylacji katalizowana przez TET odbywa się na drodze utlenienia 5mC do 5-hydroksymetylocytozyny (5hmC), zwanej „szóstą zasadą azotową DNA". 5hmC może być następnie utleniona do 5-formylocytozyny (5fC) i 5-karboksycytozyny (5caC) [33]. Wzrasta liczba badań potwierdzających, że utlenione pochodne 5mC nie są jedynie krótkotrwałymi i przejściowymi produktami reakcji demetylacji a pełnią bezpośrednią rolę w regulacji epigenetycznej. Przykładem jest identyfikacja czynników „odczytujących" modyfikacje 5hmC i 5fC. Ponadto, wykazano wpływ 5fC i 5caC na aktywność enzymatyczną polimerazy RNA II, objawiający się zmniejszeniem jej specyficzności substratowej oraz efektywności działania [34]. Usuwanie zmodyfikowanej cytozyny zachodzi również na skutek działania systemu naprawy DNA przez wycinanie zasad (BER, ang. *base excision repair*) z udziałem glikozylazy tyminy DNA (TDG, ang. *thymine-DNA glycosylase*). Szlak ten określany jest jako TET-TDG-BER. TDG katalizuje hydrolizę wiązania glikozydowego pomiędzy 5fC lub 5caC a resztą cukrową, co prowadzi do powstania miejsca apurynowego/apirymidynowego. Pozostałe elementy maszynerii systemu BER odpowiadają za wycięcie zasady azotowej, a następnie zastąpienie jej niezmodyfikowaną cytozyną. Usuwanie 5mC lub 5hmC zachodzi również na drodze reakcji deaminacji. Produktami tej reakcji są odpowiednio tymina oraz 5-hydroksymetylouracyl, które ostatecznie są zastępowane cytozyną [35]. Bezpośrednie usunięcie 5fC i 5caC jest możliwe odpowiednio poprzez deformylację i dekarboksylację, jednak enzymy katalizujące te reakcje nie zostały jak dotąd zidentyfikowane [36].

Cechą wspólną białek rodziny TET jest struktura domeny katalitycznej będącej miejscem wiązania kofaktorów. Enzymy TET1 i TET3 posiadają domenę odpowiadającą za bezpośrednie wiązanie z 5mC w dinukleotydach CpG, natomiast wiązanie TET2 z DNA uzależnione jest od białka partnerowego [37]. Białka TET oddziałują z szeregiem białek – czynnikami transkrypcyjnymi, enzymami biorącymi udział w modyfikacjach potranslacyjnych (m.in. histonów) czy elementami szlaków sygnałowych i systemów naprawy DNA. Interakcje te determinują funkcję białek TET w regulacji ekspresji genów pośrednio lub bezpośrednio, czyli np. poprzez ich rekrutację do określonych sekwencji, gdzie przeprowadzają demetylację DNA [38].

CZYNNIKI ODCZYTUJĄCE INFORMACJĘ O METYLACJI CYTOZYNY DNA

Za regulację ekspresji genów na skutek metylacji cytozyny odpowiadają między innymi białka MBP (ang. *methyl-CpG-binding proteins*) wiążące się z 5mC w dinukleotydach CpG, które nazywane są czynnikami odczytującymi informację o metylacji cytozyny (*readers*). Aktualnie zidentyfikowano trzy grupy białek MBP, których kryterium klasyfikacji była domena odpowiadająca za interakcję z 5mC. Największą grupą są białka zawierające silnie konserwowaną domenę wiążącą metylowaną cytozynę w obrębie dinukleotydu CpG (MBD, ang. *methyl-CpG-binding domain*) [39]. W obrębie tej grupy zidentyfikowano także białka wykazujące powinowactwo do wiązania z 5hmC oraz 5mC poza dinukleotydami CpG. Białka posiadające MBD to MeCP2 (ang. *methyl-CpG binding protein 2*), MBD1, MBD2 i MBD4. Białka te nie wykazują aktywności enzymatycznej, poza MBD4, które posiada domenę glikozylazy DNA. Wiązanie białek z domeną MBD z 5mC prowadzi do wyciszenia ekspresji genów, często na skutek rekrutacji represorowych czynników transkrypcyjnych czy kompleksów odpowiadających za formowanie heterochromatyny [40]. Inne białka odczytujące 5mC posiadają domenę palca cynkowego typu Cys2-His2 (C2H2-ZF), przez którą wiążą się z metylowaną cytozyną dinukleotydu CpG. Białka te mają różne funkcje, zarówno hamujące jak i aktywujące ekspresję genów. Przedstawicielami tej grupy są Kaiso, ZBTB4, ZFP57, KLF4 i WT1 [41]. Ostatnim przykładem są białka z domeną SRA (ang. *SET and RING-associated*), która stanowi miejsce oddziaływania białka z hemimetylowanymi dinukleotydami CpG. Do tej grupy należy UHRF1 (ang. *ubiquitin-like containing PHD and RING finger domains)*, które jest elementem maszynerii odpowiadającej za utrzymanie dwuniciowej metylacji DNA, oraz UHRF2 zaangażowane w procesy naprawy DNA [42].

Ramka 1. Metylacja cytozyny (5mC) – kluczowy mechanizm epigenetyczny. Metylacja cytozyny w DNA (5mC) jest kluczowym mechanizmem regulującym ekspresję genów, wpływając na rozwój zarodkowy, piętnowanie genomowe i inaktywację chromosomu X, a jej wzory zmieniają się wraz z wiekiem. Proces metylacji kontrolowany jest przez metylotransferazy DNA (DNMT), które katalizują przyłączenie grupy metylowej do cytozyny, natomiast białka TET i szlaki naprawy DNA umożliwiają jej aktywną lub pasywną demetylację, regulując dynamikę epigenetyczną. Informację o metylacji odczytują specyficzne białka MBP oraz zawierające domenę C2H2-ZF lub SRA, które modulują ekspresję genów poprzez rekrutację represorów transkrypcyjnych lub kompleksów determinujących powstawanie heterochromatyny, co zapewnia kontrolę nad stabilnością genomu i prawidłowym funkcjonowaniem komórek.

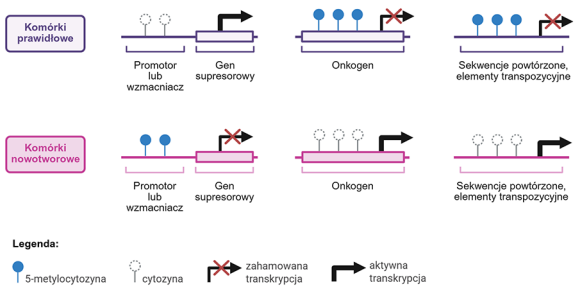
METYLACJA ADENINY RNA

Jak wspomniano wcześniej dotychczas zidentyfikowano już ponad 170 post-transkrypcyjnych chemicznych modyfikacji RNA w obrębie wszystkich domen życia [9]. Reakcja przeniesienia grupy metylowej z SAM na N6 adenozyny przebiega kotranskrypcyjnie w jądrze komórkowym i jest katalizowana przez wieloskładnikowy kompleks. Rdzeniem tego kompleksu jest heterodimer METTL3-METTL14 (ang. *methyltransferase-like*), a oddziałują z nim inne białka: WTAP (ang. *Wilms' tumor 1-associated protein*), VIRMA (ang. *Vir-like m^6A methyltransferase-associated protein*), RB-

M15/15B (ang. *RNA-binding motif protein 15/15B*), ZC3H13 (ang. *zinc-finger CCCH domain-containing protein 13*) oraz ligaza ubikwityny E3 Hakai [43]. METTL3 jest aktywną katalitycznie metylotransferazą RNA oraz posiada miejsce wiązania SAM. Natomiast METTL14 to nieaktywny katalitycznie, allosteryczny aktywator METTL3. Jest niezbędny do rozpoznania i wiązania mRNA oraz utrzymania funkcji katalitycznej heterodimeru. WTAP określany jest jako białko adaptorowe, jako że odpowiada za rekrutację METTL3--METTL14 do docelowego RNA oraz lokalizację kompleksu w cętkach jądrowych [44]. Modyfikacja m^{6}A występuje zarówno w rybosomalnym RNA, mRNA, jak i ncRNA, ale kompleks METTL3-METTL14 odpowiada głównie za metylację adeniny mRNA i lncRNA. Modyfikacja m^{6}A mRNA często znajduje się w obrębie motywu sekwencyjnego RRACH (gdzie R=A/G, H=A/C/U). Akumulacja m^{6}A obserwowana jest w regionie nieulegającym translacji na końcu 3' (UTR, ang. *untranslated region*), w pobliżu kodonów STOP, ale również w obrębie sekwencji kodujących (zwłaszcza w obszarach długich wewnętrznych eksonów). Aktualne badania wskazują na kluczową rolę architektury genu – czyli m.in. długości i lokalizacji eksonów i intronów – w regulacji wzoru m^{6}A RNA. [45]. W dalszej części pracy, o ile nie zaznaczono inaczej, omawiana jest metylacja adeniny w cząsteczkach mRNA.

DEMETYLACJA N6-METYLOADENOZYNY RNA

Zmiany poziomu i wzoru metylacji N6-adenozyny zachodzą głównie w jądrze komórkowym, gdzie oprócz kompleksu METTL3-METTL14 akumulowane są enzymy zapewniające odwracalność tej reakcji. Usuwanie grupy metylowej odbywa się poprzez jej utlenienie katalizowane przez demetylazy m^{6}A RNA, czyli ALKBH5 (ang. *AlkB homolog 5*) i FTO (ang. *fat mass and obesity-associated*) (Ryc.2), należące do rodziny AlkB dioksygenaz zależnych od Fe(II) i α-KG. ALKBH5 zlokalizowane jest w jądrze komórkowym i wykazuje specyficzność wobec m^{6}A [44]. FTO znajduje się w jądrze komórkowym i cytoplazmie oraz katalizuje demetylację nie tylko m^{6}A, ale też innych nukleozydów m.in. N6,2'O-dimetyloadenozyny i N1-metyloadenozyny. Mechanizmy substratowej selektywności FTO są częściowo poznane na poziomie strukturalnym, jednak ich znaczenie biologiczne i zależność od warunków komórkowych pozostają przedmiotem badań [46]. Głównym produktem demetylacji m^{6}A katalizowanej przez FTO jest N6-hydroksymetyloadenozyna, a przez ALKBH5 – adenozyna [47].



Rycina 3. Schemat porównujący wzór metylacji cytozyn w genomie komórek prawidłowych i nowotworowych. W komórkach prawidłowych obszary regulatorowe genów supresorowych są hipometylowane, przez co supresory ulegają ekspresji, natomiast w komórkach nowotworowych te regiony ulegają hipermetylacji a transkrypcja regulowanych przez nie genów zostaje zahamowana. W komórkach prawidłowych onkogeny, sekwencje powtórzone i elementy transpozycyjne są hipermetylowane, co prowadzi do wyciszenia ich ekspresji, natomiast w komórkach nowotworowych na skutek globalnej hipometylacji regiony te ulegają ekspresji, co przyczynia się do niestabilności genomu i procesów nowotworzenia. Wykonano w programie BioRender.com.

CZYNNIKI ODCZYTUJĄCE INFORMACJĘ O METYLACJI ADENINY RNA

Efekt obecności modyfikacji m^{6}A w określonej lokalizacji transkryptu jest determinowany przez oddziałujące z m^{6}A RNA białka. Pierwszymi zidentyfikowanymi białkami odczytującymi tę modyfikację były cząsteczki zawierające silnie konserwowaną ewolucyjnie domenę homologiczną do YT521-B (YTH, ang. *YT521-B homology domain*) odpowiadającą za rozpoznanie i wiązanie m^{6}A RNA i należą do nich: YTHDF1/2/3 (DF1/2/3, ang. *YTH domain-containing family protein*) oraz YTHDC1/2 (DC1/2, ang. *YTH domain-containing protein*) [44]. Według niedawno opracowanego modelu podstawową funkcją YTHDF jest promocja degradacji mRNA zawierających m^{6}A zależenie od interakcji z innymi białkami [48]. Rekrutowany przez YTHDF jest m.in. kompleks deadenylujący Ccr4-Not (ang. *carbon catabolite repression 4-negative on TATA-less*), który odpowiada za inicjację degradacji mRNA. YTHDF są białkami cytozolowymi, natomiast DC1 znajduje się w jądrze komórkowym, dlatego też częściej oddziałuje z ncRNA, który jest obecny w jądrze komórkowym dłużej niż mRNA [49]. Wiązanie białka DC1 z m^{6}A w lncRNA XIST (ang. *X-inactive specific transcript*) jest niezbędne do zależnego od tego transkryptu wyciszenia ekspresji genów jednego z chromosomów X u samic ssaków. Istotną rolę białko DC1 pełni również w regulacji metabolizmu RNA, wpływając na procesy takie jak składanie mRNA, eksport dojrzałych transkryptów do cytoplazmy oraz degradacja RNA znajdującego się w jądrze komórkowym. Ponadto, uczestniczy w reorganizacji struktury chromatyny, co skutkuje zmianami ekspresji genów – m.in. wyciszaniem retrotranspozonów i endogennych retrowirusów [49]. Białko DC2 zlokalizowane jest w cytoplazmie, a jego rola jako białka odczytującego m^{6}A nie jest w pełni poznana. Domena YTH DC2 charakteryzuje się najmniejszym powinowactwem do wiązania z m^{6}A RNA spośród powyższych białek zawierających tą domenę, a dodatkowo wykazuje aktywność helikazy RNA. DC2 ulega ekspresji głównie w komórkach linii płciowej oraz jest niezbędne dla utrzymania płodności ssaków [50]. Cechą charakterystyczną białek zawierających domenę YTH jest ich bezpośrednie oddziaływanie z m^{6}A RNA. Wśród białek wiążących RNA zidentyfikowano także białka pośrednio rozpoznające m^{6}A. Pośredni mechanizm wiązania z RNA zależny od obecności m^{6}A, nazwany jest „m^{6}A-przełącznikiem" (ang. *m^{6}A-switch*). Jest on wynikiem niższej stabilności par zasad azotowych m^{6}AU niż A-U, co indukuje powstanie miejscowej zmiany struktury RNA. Ostatecznym efektem działania mechanizmu m^{6}Aprzełącznika jest umożliwienie odziaływania białek z wcześniej niedostępnymi sekwencjami jednoniciowego RNA. Obecność m^{6}A-przełącznika odpowiada za regulację wiązania białek należących do rodziny heterogennych jądrowych rybonukleoprotein (HNRNP, ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) oraz białek wiążących mRNA zaliczanych do rodziny insulinopodobnych czynników wzrostu typu 2 (IGF2BP, ang. *insulin-like growth factor-2 mRNA*

Tabela 1. Przykłady genów o ekspresji zmienionej na skutek zaburzeń poziomu metylacji cytozyny promotora w różnych rodzajach nowotworów. Biologiczne funkcje tych genów w komórkach prawidłowych oraz proponowane zastosowanie kliniczne analizy wzoru metylowanej cytozyny i ekspresji danego genu.

Nowotwór	Zmiana ekspresji	Gen	Podstawowa funkcja białka	Znaczenie kliniczne	Źródło
AML	Wyciszenie na skutek hipermetylacji promotora	*C1R*	Składnik układu dopełniacza	Dodatnia korelacja między hipermetylacją a dłuższym całkowitym czasem przeżycia pacjenta	[133, 134]
		SOCS1	Regulator sygnalizacji cytokinowej		
	Aktywacja na skutek hipometylacji promotora	*CFD*	Składnik układu dopełniacza	Supresja odpowiedzi immunologicznej	[134, 135]
		PBX3	Czynnik transkrypcyjny	Dodatnia korelacja między hipometylacją a zwiększonym ryzykiem nawrotu choroby	
Nowotwór jelita grubego	Wyciszenie na skutek hipermetylacji promotora	*IGFBP3*	Regulacja proliferacji i różnicowania komórek	Dodatnia korelacja między hipermetylacją a gorszymi rokowaniami pacjenta	[136, 137]
		SEPT9	Regulacja cyklu komórkowego	Biomarker diagnostyczny zatwierdzony przez FDA	
	Aktywacja na skutek hipometylacji promotora	*MUC5AC*	Mucyna wydzielnicza	W guzach z niestabilnością mikrosatelitarną potencjalny biomarker prognostyczny.	[138, 139]
		TBRG4	Przetwarzanie RNA mitochondrialnego	Potencjalny biomarker oceny ryzyka przerzutowania	
Nowotwór piersi	Wyciszenie na skutek hipermetylacji promotora	*BRCA1*	Naprawa DNA	Dodatnia korelacja między hipermetylacją a krótszym całkowitym czasem przeżycia pacjenta	[140]
		RASSF1A	Regulacja cyklu komórkowego i apoptozy		
	Aktywacja na skutek hipometylacji promotora	*IL-10*	Cytokina przeciwzapalna i immunosupresyjna	Obserwowany wysoki poziomu ekspresji u pacjentów	[138]
		MMP7	Rozkład macierzy zewnątrzkomórkowej	Biomarker umożliwiający rozróżnienie podtypów potrójnie negatywnego nowotworu piersi	
Nowotwór płuca	Wyciszenie na skutek hipermetylacji promotora	*APC*	Regulacja szlaku sygnałowego	Potencjalny biomarker diagnostyczny	[141]
		MGMT	Naprawa DNA	Gorsze rokowania pacjentów z hipermetylacją promotora	
	Aktywacja na skutek hipometylacji promotora	*AHRR*	Element szlaku metabolizmu toksyn	Dodatnia korelacja między hipometylacją a ryzykiem zachorowania związanym z długotrwałym paleniem tytoniu	[138]
		F2RL3	Koagulacja płytek krwi		
		TMPRSS4	Transbłonowa proteaza serynowa	Potencjalny cel terapeutyczny, związany z gorszym rokowaniem pacjentów z płaskonabłonkowym nowotworem płuca	

binding proteins). HNRNP są zaangażowane w metabolizm RNA m.in. poprzez regulację alternatywnego splicingu. Dodatkowo IGF2BP mogą bezpośredniego wiązać się z m^{6}A mRNA w obrębie sekwencji konsensusowej GGAC stabilizując transkrypty, w przeciwieństwie do białek DF promujących ich degradację. Obrazuje to złożoność regulacyjnych funkcji m^{6}A mRNA w procesach komórkowych [51, 52].

ZNACZENIE METYLACJI DNA W PROCESIE NOWOTWORZENIA

Cechą charakterystyczną wielu nowotworów są zaburzenia wzoru metylowanej cytozyny DNA, które obejmują globalną hipometylację oraz hipermetylację wielu obszarów regulatorowych (Ryc.3). Hipometylacja genomowego DNA obserwowana jest najczęściej w obrębie elementów transpozycyjnych. Skutkiem ogólnej hipometylacji genomu są aberracje chromosomowe, destabilizacja genomu oraz aktywacja onkogenów. Z kolei hipermetylacja obszarów regulatorowych, m.in. wzmacniaczy i promotorów, szczegól-

Tabela 2. Przykłady zmian ekspresji genów kodujących enzymy rodziny TET i poziomu 5hmC występujące u pacjentów. Znaczenie w procesie nowotworzenia oraz możliwe zastosowanie kliniczne analizy ich ekspresji. Zmiany poziomu 5-hydroksymetylocytozyny w DNA/ekspresji genu: ↓ – spadek; ↑ – wzrost.

Nowotwór	Zmiany ekspresji TET	Skutek zmiany ekspresji TET	Znaczenie kliniczne	Źródło
AML	mutacje TET2 ↓5hmC	Zaburzenia różnicowania krwiotwórczych komórek macierzystych, aktywacja onkogennych ścieżek. Krótszy czas całkowitego przeżycia	Potencjalny biomarker prognostyczny i cel terapeutyczny	[142, 143]
Nowotwór jelita grubego	↓TET2 ↓5hmC	Krótszy czas całkowitego przeżycia	Potencjalny biomarker prognostyczny	[144, 145]
Nowotwór piersi	W leukocytach: ↑TET3 ↓5hmC	Hipometylacja promotorów → zwiększenie ekspresji genów kodujących białka punktów kontrolnych układu odpornościowego w leukocytach	Potencjalny biomarker diagnostyczny i prognostyczny	[146]
Potrójnie negatywny nowotwór piersi	↑TET1 ↑5hmC	Aktywacja onkogennych ścieżek. Krótszy czas całkowitego przeżycia niż u pacjentów niewykazujących zmian w ekspresji	Potencjalny cel terapeutyczny	[147]
Nowotwór płuca	↓TET1 ↓5hmC	Niejednoznaczny – obserwowano działanie przeciw- oraz pro-nowotworowe	Wymagane dalsze badania	[148, 149]

nie w obrębie wysp CpG genów kluczowych dla homeostazy komórkowej (w tym genów supresorowych), prowadzi do wyciszenia ich ekspresji (Tabela 1). Zjawisko to jest konsekwencją obserwowanej w komórkach nowotworowych nadekspresji metylotransferaz DNMT. Z tego powodu inhibitory tych enzymów, określane mianem leków hipometylujących, stanowią przedmiot intensywnych badań w kontekście terapii przeciwnowotworowej [53].

Jednak oprócz nadmiernej aktywności enzymatycznej DNMT, nieprawidłowości metylomu mogą dotyczyć również zaburzeń reakcji demetylacji (Tabela 2). Szacuje się, że wśród pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML, ang. *acute myleoid leukemia*) mutacje genu DNMT3A występują u ok. 20% osób [54], a mutacje utraty funkcji genu TET2 u 10-20% pacjentów [55]. W komórkach nowotworowych obserwowany jest globalny spadek poziomu 5hmC, szczególnie w warunkach niedotlenienia często występującego w guzach nowotworowych [56]. Modulacja aktywności białek TET oraz białek MBP, stanowi obiecującą strategię terapeutyczną w onkologii, choć wymaga dalszych, pogłębionych badań. W zależności od kontekstu biologicznego, białka te mogą odgrywać rolę zarówno w supresorów, jak i mogą promować nowotworzenie (Tabela 2, Tabela 3) [31]. Często rozważaną kwestią jest możliwość wykorzystania zmian genomowych w poziomie 5mC lub w ekspresji białek odpowiadających za tę modyfikację jako biomarkerów. Mogłyby one znaleźć zastosowanie w ocenie ryzyka zachorowania, diagnozie, prognozowaniu przebiegu choroby oraz w doborze odpowiednich podejść terapeutycznych (Tabela 1, 2, 3 – Znaczenie kliniczne).

Ramka 2. Metylacja adeniny w RNA (m^6A) – kluczowa modyfikacja epitranskryptomiczna. Metylacja adeniny w RNA (m^6A) jest więc najlepiej poznaną i kluczową, odwracalną modyfikacją post-transkrypcyjną, katalizowaną głównie przez heterodimer METTL3-METTL14 wraz z białkami wspomagającymi, takimi jak WTAP czy VIRMA, i zachodzącą głównie w mRNA oraz długich niekodujących RNA. Demetylację m^6A zapewniają dioksygenazy ALKBH5 i FTO, które modulują poziom i rozmieszczenie modyfikacji, wpływając na stabilność i los transkryptów. Metylację m^6A odczytują białka z domeną YTH, HNRNP oraz IGF2BP, które kontrolują degradację, transport, splicing i stabilizację RNA, a także pośrednio regulują strukturę chromatyny i ekspresję genów, ukazując złożony, wielopoziomowy wpływ m^6A na metabolizm i funkcjonowanie komórek.

MODULACJA AKTYWNOŚCI METYLOTRANSFERAZ DNMT I JEJ ZNACZENIE W TERAPII NOWOTWORÓW

NUKLEOZYDOWE INHIBITORY METYLOTRANSFERAZ DNMT

Już w latach 70. XX wieku w terapii przeciwnowotworowej zastosowano inhibitor metylotransferaz, **5-azacytydynę** (AZA), jako pierwszy lek hipometylujący. Obecnie, wraz z **5-aza-2'-deoksycytydyną** (DAC, decytabiną), stanowią one jedyne inhibitory DNMT zatwierdzone do leczenia ostrej białaczki szpikowej (AML) oraz przewlekłej białaczki mielomonocytowej (CMML, *chronic myelomonocytic leukemia*) przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) oraz Europejską Agencję Leków (EMA, *European Medicines Agency*). Obie cząsteczki należą do grupy nukleozydowych inhibitorów DNMT, które są chemicznymi analogami cytydyny, gdzie atom węgla w pozycji 5 pierścienia pirymidynowego zastąpiony jest atomem azotu. W komórce AZA i DAC ulegają fosforylacji. Następnie podczas replikacji są nieselektywnie wbudowywane w łańcuch RNA i DNA, gdzie mogą zastąpić każdą cytydynę i/lub deoksycytydynę [57]. AZA i DAC działają jako tzw. samobójcze substraty DNMT, ponieważ ich kowalencyjne wiązanie w centrum aktywnym enzymu jest nieodwracalne. Prowadzi to do zahamowania aktywności katalitycznej DNMT, a w konsekwencji degradacji białka przez proteasom. Wadą analogów cytydyny jest niska stabilność, a szczególnie podatność na inaktywację przez deaminazę cytydyny (CDA, ang. *cytidine deaminase*) [58]. Inkorporacja analogów nukleozydów do materiału genetycznego pro-

wadzi do uszkodzeń DNA oraz zaburzeń syntezy białek. Dlatego też AZA i DAC muszą być stosowane w niskich dawkach, co ogranicza ich skuteczność [59]. Leki te są podawane dożylnie, ale w celu zwiększenia komfortu pacjentów dopuszczono do użytku doustną formę DAC podawaną wraz z inhibitorem CDA – cedazurydyną. Zastosowanie inhibitora CDA jest istotne ze względu na wysoki poziomu deaminazy cytydyny w przewodzie pokarmowym i wątrobie [60]. Inną postacią decytabiny o zwiększonej stabilności jest **guadecytabina**, czyli dinukleotyd składający się z decytabiny połączonej wiązaniem fosfodiestrowym z deoksyguanozyną, która jest odporna na działanie CDA [61]. Związek ten obecnie jest w III fazie badań klinicznych w leczeniu AML oraz CMML [62].

NIENUKLEOZYDOWE INHIBITORY METYLOTRANSFERAZ DNMT

Biorąc pod uwagę ograniczenia związane z użyciem analogów nukleozydowych, dynamicznie rozwijającym się obszarem są badania inhibitorów nienukleozydowych o zróżnicowanych mechanizmach działania. Potencjalnymi inhibitorami specyficznymi wobec metylotransferazy DNMT1, są związki chemiczne zawierające motyw dicyjanopirydyny. Mechanizm ich działania opiera się na konkurowaniu z aktywnym miejscem DNMT1 o dostęp do hemimetylowanej cytozyny, wypierając tym samym substrat z centrum aktywnego enzymu. Interkalacja inhibitora pomiędzy dwoma parami zasad azotowych GC uniemożliwia wiązanie substratu z centrum aktywnym DNMT1 i trwale uniemożliwia metylację tego fragmentu DNA. Jednym z przykładów inhibitora zawierającego motyw dicyjanopirydyny jest **GSK3685032** (Ryc.4), który wykazał działanie hipometylujące i przeciwnowotworowe w komórkach linii różnych typów ludzkich białaczek oraz u myszy z ksenograftem ludzkich komórek linii AML. W badaniach na modelach zwierzęcych zaobserwowano lepszą tolerancję na GSK3685032 w porównaniu z DAC. Dzięki temu zastosowanie GSK3685032 umożliwia osiągnięcie wyższego stopnia demetylacji DNA niż podczas stosowania DAC, którego działanie jest ograniczone ze względu na jego toksyczność [63]. Przeprowadzone zostały badania, w których stwierdzono indukowaną degradację DNMT1, która nastąpiła na skutek użycia inhibitorów zawierających motyw dicyjanopirydyny [64].

Możliwe jest również zahamowanie aktywności enzymatycznej metylotransferaz DNMT poprzez konkurencję między inhibitorem a donorem grupy metylowej SAM o miejsce wiązania w centrum aktywnym enzymu. Strukturą wyjściową do syntezy analogów SAM był **RG108** (N-ftaloiloL-tryptofan), który wykazuje niską efektywność hamowania aktywności DNMT [58]. Opracowano inhibitory DNMT1 pochodne RG108 (Ryc.4) wykazujące powinowactwo do miejsca wiązania SAM. W badaniach z wykorzystaniem pochodnych RG108 na komórkach linii przewlekłej białaczki szpikowej wykazano ich działanie antyproliferacyjne. Zaobserwowano również wzrost ekspresji genów związanych z apoptozą i zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G0/G1 [65]. Jako że SAM jest kofaktorem wielu rodzajów metylotransferaz, istotną kwestią jest opracowanie specyficznych wobec DNMT inhibitorów SAM-kompetycyjnych [66] – dlatego zaproponowano syntezę **inhibitorów dwusubstratowych**. Połączone ze sobą pochodne chinazoliny i chinoliny (Ryc.4), będące odpowiednio analogami SAM i deoksycytydyny, w komórkach linii nowotworu jelita grubego wykazały działanie hipometylujące, a w efekcie, akty-

Tabela 3. Przykłady białek MBP (białka odczytujące informację o metylacji cytozyny), ich funkcja w procesie nowotworzenia i możliwe zastosowanie kliniczne.

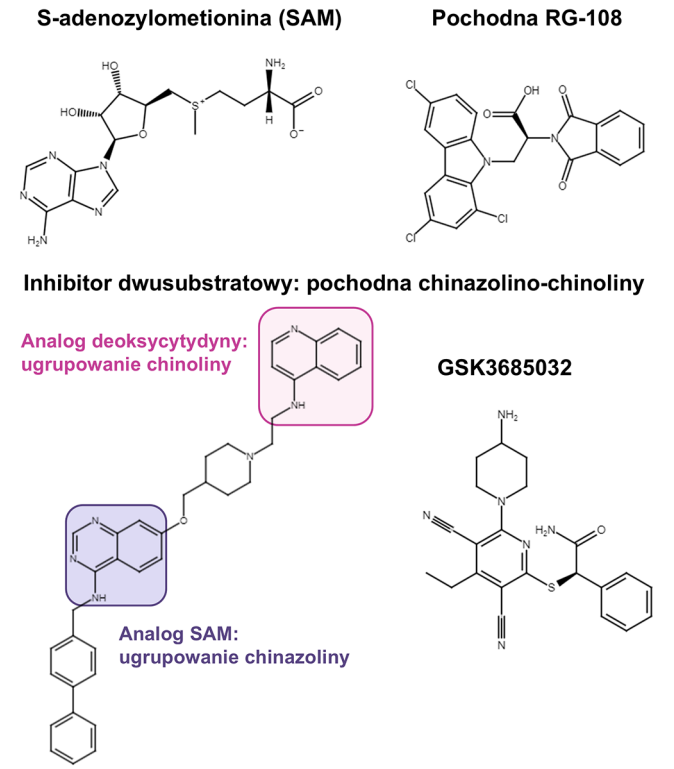
Nowotwór	MBP	Znaczenie w procesie nowotworzenia	Znaczenie kliniczne	Źródło
AML	MBD2	Wyciszenie ekspresji MBD2 w komórkach z mutacją utraty funkcji TET2 → przywrócenie prawidłowej hematopoezy	Potencjalny cel terapeutyczny	[150, 151]
	WT1	Niejednoznaczne – zarówno supresja jak i indukcja transformacji nowotworowej	Cel terapeutyczny, biomarker minimalnej choroby resztkowej, remisji lub nawrotu choroby	
Nowotwór jelita grubego	MeCP2	Regulacja ekspresji genów promujących rozwój przerzutów	Dodatnia korelacja między wysokim poziomem ekspresji a gorszymi rokowaniami pacjenta	[41, 94]
	UHRF1	Wyciszanie ekspresji genów supresorowych	Dodatnia korelacja między wysokim poziomem ekspresji a progresją nowotworu i rozwojem przerzutów	
Nowotwór piersi	UHRF1	Wyciszanie ekspresji genów supresorowych	Zwiększona ekspresja UHRF1 jako potencjalny biomarker diagnostyczny i prognostyczny (gorsze rokowania pacjenta)	[41, 152]
	WT1	Regulacja różnicowania i podziałów komórek zależna od podtypu WT1	Wykazana rola nadekspresji zarówno w supresji jak i indukcji nowotworzenia	
Nowotwór płuca	MBD2	Wyciszanie ekspresji genów hamujących rozwój przerzutów	Zwiększona ekspresja MBD2 u pacjentów z przerzutami	[86, 153]
	UHRF1	Wyciszanie ekspresji genów supresorowych	Dodatnia korelacja między nadekspresją a gorszymi rokowaniami i zwiększoną opornością na chemioterapię	

wujące ekspresję genu supresorowego *CDKN2A* (inhibitora kinaz zależnych od cyklin 2A) [67].

Zaproponowane zostały również allosteryczne inhibitory DNMT, których wiązanie poza centrum aktywnym enzymu prowadzi do zaburzeń interakcji metylotransferaz DNMT z innymi białkami regulującymi ich aktywność enzymatyczną. W taki sposób hamowana jest aktywność DNMT3A przez pochodne pirazalonu i pirydazyny, których zastosowanie w badaniach na komórkach różnych typów białaczek spowodowało zmniejszenie stopnia metylacji DNA oraz nasilenie apoptozy komórek [68]. Potencjalnym celem terapeutycznym są także regulatory potranslacyjnych modyfikacji DNMT. Przykładowo, S-nitrozylacja reszty cysteiny w centrum aktywnym DNMT3B prowadzi do zahamowania jej aktywności enzymatycznej. Opracowano specyficzny wobec DNMT3B inhibitor Snitrozylacji, którego zastosowanie w badaniu na liniach komórkowych nowotworu jelita grubego oraz na modelu mysim wykazało działanie hipometylujące oraz zahamowanie transformacji nowotworowej [69].

SYNTETYCZNE OLIGONUKLEOTYDY HAMUJĄCE AKTYWNOŚĆ METYLOTRANSFERAZ DNMT

Oligonukleotydy stanowią obiecującą strategię terapeutyczną ze względu na wysoką specyficzność działania i niską immunogenność, choć wyzwaniem pozostaje ograniczenie ich aktywności do wybranych tkanek. W terapii przeciwnowotworowej szczególne zainteresowanie budzą aptamery – krótkie, jednoniciowe fragmenty DNA lub RNA, które dzięki zdolności do fałdowania w struktury trzeciorzędowe charakteryzują się wysokim powinowactwem i swoistością wobec cząsteczek docelowych [70]. Opracowano aptamery DNA [71] oraz RNA wiążące się z domeną katalityczną DNMT1, wykazujące *in vitro* działanie hipometylujące w komórkach nowotworowych. Co ciekawe, DNMT1 wykazuje większe powinowactwo do RNA niż DNA, co sugeruje potencjalnie wyższą skuteczność aptamerów RNA [72]. Badane są również oligonukleotydy zawierające zmodyfikowane nukleozydy (2-amino-4-halopirydyno-C-nukleozydy) w obrębie dinukleotydu CpG, które wiążą się kowalencyjnie z centrum aktywnym DNMT. Wykazano ich oddziaływanie z ludzką DNMT1 oraz cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych, jednak do oceny ich skuteczności terapeutycznej konieczne są dalsze badania [73]. Kolejną strategią jest wykorzystanie antysensownych oligonukleotydów, które poprzez komplementarność z docelowym mRNA prowadzą do zahamowania jego translacji [74]. Przykładem jest MG98, skierowany przeciwko mRNA DNMT1, który mimo skutecznego obniżenia poziomu DNMT1 w warunkach *in vitro* nie wykazał zadowalającej efektywności w badaniach klinicznych [75].



Rycina 4. Struktury chemiczne S-adenozylometioniny oraz wybranych inhibitorów nienukleozydowych DNMT. Źródło: baza danych Reaxys.

MODYFIKACJE AKTYWNOŚCI ENZYMÓW Z RODZINY TET JAKO STRATEGIA TERAPEUTYCZNA W ONKOLOGII

HAMOWANIE AKTYWNOŚCI ENZYMÓW Z RODZINY TET ZWIĄZANE Z OBECNOŚCIĄ MUTACJI GENÓW KODUJĄCYCH ENZYMY CYKLU KREBSA

Alternatywną strategią wobec inhibitorów DNMT jest oddziaływanie na proces aktywnej demetylacji. Zważywszy na wcześniej opisaną charakterystykę działania białek TET, o wiązanie w ich centrum aktywnym mogą konkurować związki chemiczne o strukturze podobnej do α-KG. Są to m.in. bursztynian i fumaran, będące - tak jak α-KG - produktami pośrednimi cyklu Krebsa. Mutacje w genach kodujących enzymy zaangażowane w syntezę tych metabolitów często występują u pacjentów nowotworowych i prowadzą do akumulacji analogów α-KG, a tym samym hamują aktywność enzymatyczną TET [76]. W regulacji aktywności enzymatycznej białek TET istotną rolę odgrywają mutacje typu nabycia funkcji w genach kodujących dehydrogenazę izocytrynianową 1 i 2 (IDH1/2, *isocitrate dehydrogenase 1/2*), obecne u ok. 20% pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML). Enzymy IDH uczestniczą w syntezie α-KG, a ich zmutowane formy katalizują konwersję α-KG do onkometabolitu D-2-hydroksyglutaranu (D2HG). Ze względu na strukturalne podobieństwo do α-KG, D2HG wiąże się z wszelkimi α-KG-zależnymi dioksygenazami, w tym białkami TET, prowadząc do zahamowania ich aktywności. Skutkiem jest globalna hipermetylacja DNA i zaburzenie różnicowania komórek progenitorowych, co sprzyja inicjacji i progresji AML. W leczeniu pacjentów z mutacjami IDH1 stosuje się **iwosidenib** – inhibitor zmutowanej IDH1, zatwierdzony przez FDA i EMA, który obniża stężenie D2HG i przywraca aktywność TET. Dla mutacji IDH2 dostępny jest **enasidenib**, zatwierdzony przez FDA. Liczba inhibitorów zmutowanych białek IDH systematycznie rośnie i są one intensywnie badane klinicznie [77].

INHIBITORY ENZYMÓW Z RODZINY TET

Substraty białek rodziny TET – 5mC, 5hmC, 5fC, 5caC – stanowią obiecujący punkt wyjścia do opracowania specyficznych inhibitorów TET. Takim przykładem miała być cząsteczka o nazwie Bobcat339, czyli 5'-chlorocytozyna z grupą bifenylową, będąca analogiem cytozyny. Początkowo obserwowano efekt hamowania TET1 i TET2 przy jednoczesnym braku wpływu na aktywność DNMT3A. [78]. Jednak dalsze badania Bobcat339 pokazały, że obserwowany efekt działania inhibitora był jedynie wynikiem kontaminacji Cu-(II), co prawdopodobnie skutkowało wyparciem jonów Fe-(II) z centrum aktywnego enzymu, a nie z samej cząsteczki inhibitora [79].

Aktywność białek TET może być również hamowana przez inhibitory konkurujące z α-KG w miejscu wiązania substratu. Przykładem jest opracowana cząsteczka TETi76 – analog α-KG, który wiąże się z domeną katalityczną białek TET i hamuje proliferację komórek nowotworowych. Komórki z niedoborem TET2, których przeżycie zależy od aktywności TET1 i TET3, wykazują szczególną wrażliwość na działanie **TETi76** w porównaniu z komórkami o prawidłowej aktywności dioksygenaz z rodziny TET. Zaburzenia metylacji cytozyn wynikające z mutacji utraty funkcji TET2, prowadzą do blokady różnicowania hematopoetycznych komórek progenitorowych. W związku z tym, selektywne usuwanie komórek z tą mutacją stanowi obiecującą strategię terapeutyczną. W badaniach na liniach komórkowych białaczek z mutacją TET2 zastosowanie TETi76 powodowało obniżenie poziomu 5hmC i zahamowanie proliferacji, bez istotnego wpływu na żywotność komórek z zachowaną funkcją TET. Działanie przeciwnowotworowe TETi76 potwierdzono również w modelu mysiego ksenograftu AML z wyciszoną ekspresją genu TET2 [80]. Długotrwałe stosowanie inhibitorów TET nie jest jednak możliwe, gdyż aktywność TET3 jest niezbędna do prawidłowej hematopoezy, co wymaga przerwania terapii po eliminacji komórek z mutacją w genie kodującym TET2.

STYMULACJA AKTYWNOŚCI ENZYMÓW Z RODZINY TET

W procesie nowotworzenia nie zawsze występuje nadmierna aktywność enzymatyczna enzymów z rodziny TET, często obserwowany jest również jej spadek. Takie obniżenie aktywności TET zachodzi nie tylko u pacjentów z mutacją genów IDH. Przykładem związku chemicznego stymulującego aktywność enzymatyczną TET jest witamina C, która poprzez redukcję Fe(III) do Fe(II) zwiększa dostępność tego kofaktora białek TET [81]. Aktualnie niemożliwe jest wnioskowanie o przeciwnowotworowym działaniu witaminy C i wymagane jest przeprowadzenie szczegółowych badań. Jednak proponowane jest stosowanie witaminy C jako uzupełnienie terapii przeciwnowotworowej [82]. Ponadto, okazało się, że potencjalnymi związkami stymulującymi aktywność enzymatyczną TET są antybiotyki antracyklinowe: idarubicyna i mitoksantron, które są inhibitorami topoizomerazy II i są już powszechnie stosowane w terapii przeciwnowotworowej. W badaniach *in vitro* na liniach komórek nowotworowych zaobserwowano zwiększenie globalnego poziomu 5hmC na skutek działania tych antybiotyków [83].

Równoczesna regulacja aktywności metylotransferaz DNMT i enzymów z rodziny TET, stanowi obiecującą strategię zwiększenia skuteczności terapii epigenetycznych. W tym celu opracowano złożoną cząsteczkę **EpC** (*epigenetic control*), której rdzeń tworzy inhibitor DNMT – decytabina – sprzężony z biodegradowalnym polimerem wykorzystanym jako nośnik tego leku. Na lipidowej powierzchni cząsteczki umieszczono plazmid kodujący TET1. Rozwiązanie to może znaleźć zastosowanie u pacjentów z obniżoną ekspresją TET1. W komórkach raka jelita grubego zastosowanie EpC podnosiło poziom białka p53, supresora nowotworowego, którego ekspresja jest zwykle wyciszona wskutek hipermetylacji promotora. Stwierdzono także zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, choć bez wyraźnych różnic w indukcji apoptozy względem kontroli. Mimo obiecujących wyników, do wykorzystania EpC w praktyce klinicznej konieczne są dalsze optymalizacje, zwłaszcza w zakresie zwiększenia efektywności ich dostarczania do komórek nowotworowych [84].

MODULACJA AKTYWNOŚCI BIAŁEK ODCZYTUJĄCYCH INFORMACJĘ O METYLACJI CYTOZYNY DNA JAKO NOWOCZESNA STRATEGIA W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

SZCZEPIONKI PEPTYDOWE SKIEROWANE PRZECIWKO BIAŁKU WT1 W TERAPII NOWOTWORÓW

Dotychczas nie zatwierdzono żadnych leków przeciwnowotworowych ukierunkowanych na modulację aktywności białek z rodziny MBP, a badania kliniczne w tym obszarze właściwie nie są obecnie prowadzone. Wyjątek stanowią szczepionki peptydowe skierowane przeciwko białku WT1 (Wilms' Tumor 1), zawierającemu domenę typu C2H2-ZF, umożliwiającą wiązanie z 5-metylocytozyną (5-mC) w obrębie dinukleotydów CpG. Białko WT1 odgrywa kluczową rolę w regulacji różnicowania i proliferacji komórek, a jego nadekspresja została udokumentowana w wielu typach nowotworów, m.in. w białaczkach, rakach płuca i piersi. Jednym z istotnych czynników przemawiających za wyborem WT1 jako antygenu szczepionkowego jest jego względnie ograniczona ekspresja fizjologiczna, występująca głównie w gonadach (jajnikach i jądrach), macicy, mezotelium oraz w hematopoetycznych komórkach progenitorowych. Taka dystrybucja sprzyja ograniczeniu potencjalnych działań niepożądanych, co czyni WT1 atrakcyjnym celem immunoterapii. Mechanizm działania szczepionek peptydowych opiera się na wykorzystaniu antygenów związanych z nowotworami (TAA, *tumor-associated antigens*), takich jak WT1, które poddaje się przetworzeniu do krótkich, kilkunasto-aminokwasowych fragmentów. Powstałe epitopy są następnie modyfikowane w celu zwiększenia ich immunogenności. W badaniach klinicznych z zastosowaniem szczepionek peptydowych anty-WT1 wykazano indukcję swoistej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko WT1 oraz uzyskano obiecujące wyniki kliniczne – m.in. zmniejszenie rozmiarów guzów lub obniżenie poziomu markerów nowotworowych u pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML), a także z nowotworami płuca i piersi [85].

UHRF1 JAKO POTENCJALNY CEL EPIGENETYCZNEJ TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Kolejnym białkiem specyficznie rozpoznającym 5-metylocytozynę (5mC) w DNA jest UHRF1 (ang. *Ubiquitin-like, containing PHD and RING Finger domains 1*). Podwyższony poziom UHRF1, typowy dla komórek nowotworowych, przyczynia się do globalnej hipermetylacji genomu [86]. Białko to wiąże się z hemimetylowanym DNA w fazie S cyklu komórkowego. Kluczową rolę w rozpoznawaniu 5mC przez UHRF1 odgrywa domena SRA (ang. *SET and RING-associated*), która umożliwia „przemieszczenie" metylowanej cytozyny na zewnątrz podwójnej helisy DNA. Jest to niezbędny etap rekrutacji DNMT1 do hemimetylowanych dinukleotydów CpG w obrębie widełek replikacyjnych. Ekspresja UHRF1 jest istotnie niższa w komórkach prawidłowych, co sprzyja selektywności działania inhibitorów tego białka wobec komórek nowotworowych [87].

Obecnie opracowywane są małocząsteczkowe inhibitory UHRF1 wiążące się z domeną SRA, a konkretnie z miejscem rozpoznawania 5mC. Początkowo jako związki wiodące wykorzystywano analogi zasad azotowych, których wadą była zdolność do interkalacji z DNA. Obecnie obiecujące właściwości wykazują m.in. **AMSA2** (pochodna hydroksyantracenu) oraz **MPB7** (pochodna imidazochinoliny), które blokują „przerzucenie" 5mC, uniemożliwiając w ten sposób rekrutację DNMT1. W badaniach na liniach komórkowych wykazano, że AMSA2 i MPB7 prowadzą do obniżenia globalnego poziomu 5mC oraz zmniejszenia żywotności komórek nowotworowych, przy czym komórki o niskiej ekspresji UHRF1 wykazują mniejszą wrażliwość na ich działanie [88]. Dotychczas inhibitory UHRF1 badano jedynie w modelach *in vitro* i *in silico*, dlatego ocena ich skuteczności klinicznej wymaga dalszych, pogłębionych analiz [86].

BIAŁKA Z DOMENĄ MBD JAKO CELE TERAPII EPIGENETYCZNYCH

W kontekście nowotworzenia szczególną uwagę wśród białek zawierających domenę MBD zwraca białko MBD2, uczestniczące w epigenetycznym wyciszaniu genów supresorowych. Białko to rekrutuje kompleks remodelujący chromatynę NuRD (*nucleosome remodeling and deacetylase complex*) do metylowanych rejonów DNA, co prowadzi do kondensacji chromatyny i zahamowania transkrypcji. Wysokie powinowactwo MBD2 do 5-metylocytozyny – największe spośród białek z rodziny MBD – oraz brak istotnych zaburzeń rozwojowych u myszy pozbawionych genu *Mbd2* czynią je atrakcyjnym celem strategii terapeutycznych [89]. Jedynym jak dotąd małocząsteczkowym inhibitorem MBD2 o potwierdzonej aktywności *in vitro* i *in vivo* (w modelu ksenograftu ludzkiego rdzeniaka zarodkowego) jest **KCC07**, który blokuje interakcję MBD2 z 5mC [90]. Większość projektowanych inhibitorów MBD2 działa poprzez zaburzenie wiązania domeny MBD z 5mC w dinukleotydach CpG, co ma prowadzić do reaktywacji epigenetycznie wyciszonych genów. Wśród kandydatów znajdują się pochodne 5mC oraz cząsteczki o zbliżonej strukturze, jednak ich rozwój znajduje się we wczesnych fazach badań [91]. Alternatywną strategią jest blokowanie interakcji MBD2 z kompleksem NuRD poprzez uniemożliwienie wiązania z białkiem p66α. Kluczową rolę odgrywa tu inherentnie nieuporządkowany region (IDR, *intrinsically disordered region*) MBD2, odpowiedzialny za liczne interakcje białko–białko. Zidentyfikowano inhibitory **ABA** i **APC**, których wiązanie z MBD2 indukuje zmiany konformacyjne w obrębie IDR, uniemożliwiając tworzenie kompleksu z p66α. W badaniach na liniach nowotworowych piersi i jelita grubego wykazano, że związki te ograniczają migrację komórek oraz hamują rozwój przerzutów w modelu mysiego ksenograftu raka płuca [92].

Drugim istotnym przedstawicielem rodziny MBD jest MeCP2 (*methyl-CpG binding protein 2*). Badania nad tym białkiem skupiały się pierwotnie na mutacjach prowadzących do zaburzeń neurologicznych, jednak pełni ono także rolę onkogenu w nowotworzeniu. Jego nadekspresję obserwuje się w wielu nowotworach, a inaktywacja genu skutkuje zahamowaniem proliferacji komórek [93, 94]. Jedną z najbardziej obiecujących strategii terapeutycznych jest zastosowanie technologii PROTAC (ang. *proteolysis-targeting chimera*), wykorzystującej dwuczęściowe cząsteczki zbudowane z liganda rozpoznającego białko docelowe oraz liganda wiążącego ligazę ubikwitynową E3. Rekrutacja E3 prowadzi do ubikwitynacji i proteasomalnej degradacji białka MeCP2 (Ryc. 5) [95]. W badaniach *in vitro* zastosowanie cząsteczek PROTAC zawierających oligodeoksynukleotydy z 5mC jako ligandy rozpoznawane przez MeCP2 umożliwiło skuteczną degradację tego białka. Jednocześnie, obserwowano aktywację proapoptotycznych szlaków sygnałowych w komórkach nowotworowych, z zachowaniem selektywności względem komórek wykazujących nadekspresję MeCP2 [96]. Technologia PROTAC cechuje się wysoką precyzją działania, a jej zastosowanie w terapii nowotworów piersi znajduje się obecnie w fazie badań klinicznych [62], co podkreśla jej potencjał jako nowej strategii leczenia ukierunkowanego.

ZNACZENIE METYLACJI RNA W PROCESIE NOWOTWORZENIA

Metylacja RNA, a w szczególności modyfikacja N^6-metyloadenozynowa (m^6A), odgrywa kluczową, choć złożoną rolę w procesie nowotworzenia. W zależności od typu nowotworu, kontekstu biologicznego oraz ekspresji poszcze-

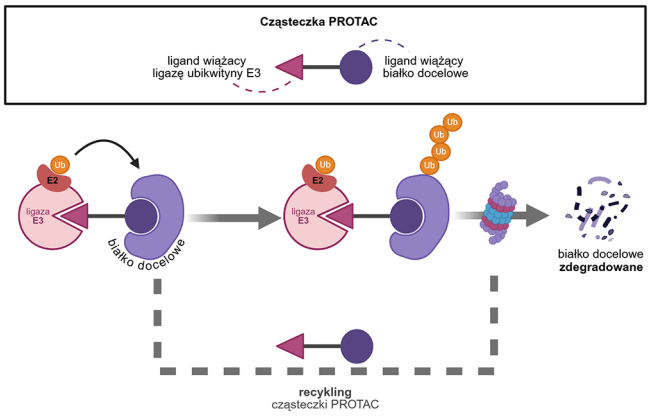
Ramka 3. Nieprawidłowa metylacja DNA promuje proces nowotworzenia. Nieprawidłowa metylacja DNA, obejmująca globalną hipometylację i lokalną hipermetylację regulatorów genów, jest kluczowym mechanizmem nowotworzenia, prowadząc do niestabilności genomu, aktywacji onkogenów oraz wyciszenia genów supresorowych. Zaburzenia te wynikają zarówno z nadaktywności metylotransferaz DNMT, jak i defektów enzymów demetylujących TET, co obserwuje się m.in. w AML. Terapie epigenetyczne koncentrują się na modulacji DNMT (nukleozydowe i nienukleozydowe inhibitory, oligonukleotydy, aptamery) oraz TET (inhibitory i stymulatory), a połączenie tych strategii może zwiększyć skuteczność leczenia. Dodatkowo, białka odczytujące metylację DNA, takie jak WT1, UHRF1, MBD2 i MeCP2, stanowią obiecujące cele terapeutyczne, m.in. poprzez szczepionki peptydowe, inhibitory małocząsteczkowe oraz technologię PROTAC, co otwiera nowe możliwości precyzyjnych terapii przeciwnowotworowych.

gólnych składników tzw. „maszynerii m^{6}A", jej działanie może mieć zarówno charakter pro-, jak i przeciwnowotworowy. Zaburzenia funkcjonowania białek odpowiedzialnych za instalację, usuwanie i rozpoznawanie m^{6}A prowadzą do deregulacji ekspresji licznych genów związanych z transformacją nowotworową, w tym oczywiście onkogenów i genów supresorowych. Ponadto wpływają również na szereg innych kluczowych genów, zaangażowanych m.in. w naprawę DNA, kontrolę cyklu komórkowego, modulację odpowiedzi immunologicznej czy samoodnowę i różnicowanie komórek macierzystych – zarówno embrionalnych, jak i nowotworowych (Tabela 4) [97]. Modyfikacja m^{6}A uczestniczy również w kształtowaniu mikrośrodowiska nowotworowego, wpływając na procesy immunosupresji, angiogenezy oraz reprogramowania metabolicznego komórek guza [98]. Białka maszynerii m^{6}A modulują odpowiedź immunologiczną poprzez regulację proliferacji i różnicowania limfocytów T, wczesnych etapów dojrzewania limfocytów B, a także aktywacji komórek dendrytycznych [99]. Co istotne, prawidłowy poziom i rozkład ekspresji tych białek są kluczowe dla fizjologicznego przebiegu hematopoezy, a ich zaburzenia wiążą się z rozwojem nowotworów układu krwiotwórczego, zwłaszcza białaczek. Przykładowo, nadekspresję METTL3, METTL14, FTO, ALKBH5 oraz YTHDF2 stwierdzano u pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML) [100].

Spośród elementów układu regulującego metylację m^{6}A szczególną uwagę zwrócono na białko FTO. Jeszcze przed odkryciem jego funkcji jako demetylazy m^{6}A wykazano, że polimorfizmy genu *FTO* stanowią czynnik ryzyka rozwoju otyłości oraz cukrzycy typu 2. Obecnie wiadomo, że FTO

Tabela 4. Obserwowane w różnych rodzajach nowotworów zmiany poziomu białek odpowiedzialnych za m^{6}A RNA oraz związane z nimi zmiany ekspresji genów. Znaczenie zmian ekspresji w procesie nowotworzenia i przebiegu choroby. Zmiany poziomu białka/ekspresji genu: ↓ – spadek; ↑ – wzrost.

Nowotwór	Zmiana poziomu białka w komórkach nowotworowych	Zmiana ekspresji genu	Znaczenie w procesie nowotworzenia i przebiegu choroby	Źródło
AML	↑ METTL14	↑ MYB, MYC	Wzmożona samoodnowa i/lub proliferacja białaczkowych komórek macierzystych i/lub progenitorowych, - ↓METTL14 podczas prawidłowego różnicowania komórek linii mieloidalnej	[154]
	↑ FTO	↓ ASB2, RARA	Zaburzenia hematopoezy - ↑ASB2, RARA podczas prawidłowej hematopoezy	[155]
	↑ **YTHDF1**	↑ CCNE2	Utrzymywanie funkcjonowania białaczkowych komórek macierzystych i stymulacja proliferacji komórek nowotworowych	[124]
Nowotwór jelita grubego	↑ METTL3	↑ MYC, STAG3 ↓ SOCS2	Dodatnia korelacja między ↑METTL3 a gorszymi rokowaniami pacjenta. Wzmożona proliferacja komórek na skutek zmian ekspresji regulatorów cyklu komórkowego	[156]
	↓ METTL14	↓ SOX4	Dodatnia korelacja między ↓METTL14 a gorszymi rokowaniami pacjenta. ↓SOX4 skutkuje zmniejszeniem potencjału migracyjnego i inwazyjności komórek	[157]
	↑ IGF2BP3	↑ EGFR	Dodatnia korelacja między ↑IGF2BP3 a gorszymi rokowaniami pacjenta. ↑EGFR prowadzi do wzmożonej proliferacji komórek nowotworowych i indukcji angiogenezy.	[158]
Nowotwór piersi	↑ METTTL3	↑ HBXIP	↑METTL3 ↔ ↑HBXIP (wzajemna pozytywna regulacja ekspresji) prowadzi do wzmożonej proliferacji komórek nowotworowych	[159]
	↓ METTL14	↓ APC	Dodatnia korelacja między ↓METTL14, ↓ZC3H13, ↓APC a indukcją immunosupresji i gorszymi rokowaniami pacjenta	[160]
	↑ FTO	↓ BNIP3	Dodatnia korelacja między ↑FTO a gorszymi rokowaniami pacjenta. ↓BNIP3 skutkuje wzmożoną proliferacją komórek nowotworowych	[161]
Gruczolakorak płuca	↓ METTL3	↓ FBXW7	Dodatnia korelacja między ↓METTL3 i ↓FBXW7 a gorszymi rokowaniami pacjenta. ↑FBXW7 zależny od ↑m^{6}A - działanie proapoptotyczne wobec komórek nowotworowych	[162]
	↑ ALKBH5	↑ FOXM1	Dodatnia korelacja między ↑ALKBH5 a gorszymi rokowaniami pacjenta. W warunkach przerywanej hipoksji ↑ALKBH5 wzmacnia ekspresję FOXM1 → wzmożona proliferacja i inwazyjność komórek nowotworowych	[163, 164]
	↑ IGF2BP1	↑ KRAS	Dodatnia korelacja między ↑IGF2BP1 a gorszymi rokowaniami pacjenta, zwłaszcza gdy obecna jest mutacja genu KRAS. Wzmożona aktywacja szlaków sygnałowych na skutek ↑KRAS → stymulacja nowotworzenia i migracji komórek	[165]



Rycina 5. Mechanizm działania cząsteczki typu PROTAC (ang. proteolysis targeting chimera). Cząsteczka PROTAC, wiążąc się jednocześnie z ligazą ubikwityny E3 i docelowym białkiem, prowadzi do utworzenia trójskładnikowego kompleksu. Bliska odległość między docelowym białkiem a ligazą E3 umożliwia przeniesienie ubikwityny z enzymu koniugującego E2 na docelowe białko. Tak poliubikwitynowane białko ulega proteasomalnej degradacji, a cząsteczka PROTAC zostaje uwolniona, co pozwala na indukcję degradacji kolejnych białek. Wykonano w programie BioRender.com.

uczestniczy również w regulacji ekspresji genów związanych z mechanizmami oporności na leki stosowane w terapii przeciwnowotworowej [101, 102].

Zrozumienie znaczenia m^{6}A w patogenezie i progresji nowotworów wymaga prowadzenia wielkoskalowych analiz wzorów metylacji RNA oraz ekspresji białek zaangażowanych w jej regulację u różnych grup pacjentów onkologicznych. Umożliwi to dalszy rozwój metod leczenia skoncentrowanych na m^{6}A, ale również identyfikację biomarkerów wykorzystywanych w diagnostyce i terapii przeciwnowotworowej.

MODULACJA AKTYWNOŚCI KOMPLEKSU METYLOTRANSFERAZ METTL3-METTL14 – POTENCJALNE ZASTOSOWANIE W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

HAMOWANIE AKTYWNOŚCI KOMPLEKSU METYLOTRANSFERAZ METTL3-METTL14 PRZEZ UNIEMOŻLIWIENIE WIĄZANIA S-ADENOZYLOMETIONINY

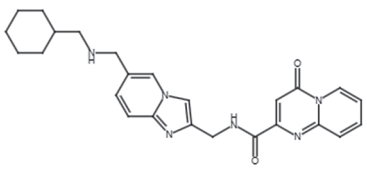
Nadekspresja metylotransferaz METTL3 i METTL14 w niektórych nowotworach często wiąże się z gorszym rokowaniem pacjentów (Tabela 4). W związku z tym racjonalnym podejściem terapeutycznym może być farmakologiczne zahamowanie aktywności enzymatycznej tego kompleksu. Przykładem takiego podejścia jest zastosowanie cząsteczki **STM2457** (Ryc. 6). Jest to efektywny i selektywny inhibitor, którego mechanizm działania opiera się na konkurencji o miejsce wiązania SAM w białku METTL3. Zastosowanie STM2457 w komórkach linii AML doprowadziło do zahamowania wzrostu komórek. Z kolei u myszy z ksenograftem pobranym od pacjentów z AML zaobserwowano ograniczenie samoodnowy białaczkowych komórek macierzystych i wydłużenie czasu przeżycia myszy. Wykazano również zmniejszenie poziomu m^{6}A w poli(A) RNA oraz spadek ekspresji protoonkogenu *MYC*, którego wzmożona ekspresja przyczynia się do niekontrolowanej proliferacji komórek nowotworowych. Jednocześnie STM2457 zarówno *in vitro* jak i *in vivo* nie wpływa na funkcjonowanie prawidłowych krwiotwórczych komórek macierzystych i progenitorowych [103]. Aktywność przeciwnowotworowa tej cząsteczki była również analizowana w komórkach linii nowotworów piersi, gdzie po traktowaniu STM2457 zaobserwowano spadek żywotności komórek [104]. Pochodna STM2457 – związek **STC-15**, jest pierwszym i jak dotąd jedynym inhibitorem kompleksu metylotransferaz METTL3-METTL14, który osiągnął etap badań klinicznych. Struktura STC-15 nie została upubliczniona, ale przedstawiono wyniki badań, w których wykazano, że lek jest dobrze tolerowany przez pacjentów nowotworowych. Co więcej, odnotowano spadek poziomu m^{6}A mRNA w krwi obwodowej pacjentów średnio o 63%, a analiza ekspresji genów pacjentów umożliwiła stwierdzenie aktywacji mechanizmów odporności nieswoistej [105].

Opracowano również cząsteczki **UZH1a** oraz **UZH2** – aktywne wewnątrzkomórkowo, selektywne inhibitory METTL3, niewykazujące aktywności wobec innych metylotransferaz RNA. UZH1a wiąże się w miejscu przyłączania reszty adenozyny SAM, a dokładny mechanizm interakcji UZH2-METTL3 nie został dotychczas scharakteryzowany. W komórkach linii ostrej białaczki szpikowej (AML) zastosowanie UZH1a i UZH2 prowadziło do obniżenia globalnego poziomu m^{6}A w mRNA. Efekt ten nie był związany ze zmianą ilości białka METTL3 w komórkach [158,159]. Selektywność działania UZH1a oraz STM2457 wynika z tego, że ich związanie z METTL3 indukuje zmiany konformacji reszty aminokwasowej uczestniczącej w wiązaniu SAM [106].

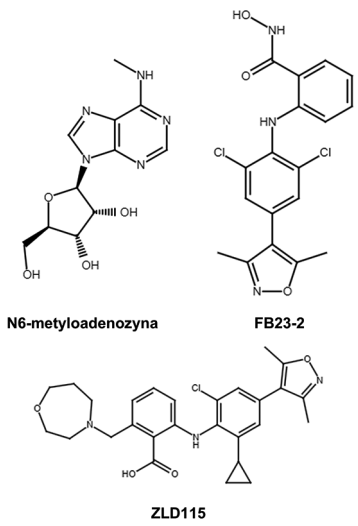
Struktura cząsteczki UZH2 wykorzystana została w syntezie cząsteczek typu PROTAC, stanowiąc ligand którego wiązanie z METTL3 indukuje degradację heterodimeru METTL3-METTL14. Obserwowane na skutek działania cząsteczek typu PROTAC zmniejszenie poziomu zarówno METTL3, jak i METTL14 może być wynikiem skierowania całego kompleksu na ścieżkę proteasomalnej degradacji albo uzależnieniem utrzymania stabilności METTL14 od obecności METTL3 [107, 108]. Wykazana w komórkach linii AML aktywność UZH2-PROTAC prowadzi do zmniejszenia poziomu m^{6}A mRNA i zahamowania proliferacji komórek z większą efektywnością niż samodzielne działanie UZH2 [107].

ALLOSTERYCZNE INHIBITORY KOMPLEKSU METYLOTRANSFERAZ METTL3-METTL14

Zidentyfikowano również allosteryczne inhibitory kompleksu METTL3-METTL14 - eltrombopag i pochodne CDI-BA. Związki te wiążą się z hetero-dimerem poza domeną katalityczną, jednak ich dokładne miejsce wiązania nie



Rycina 6. Struktura chemiczna STM2457 - inhibitora metylotransferaz METTL3-METTL14. Źródło: baza danych Reaxys.



Rycina 7. Struktura chemiczna N6-metyloadenozyny i wybranych inhibitorów demetylazy FTO. Źródło: baza danych Reaxys.

zostało jeszcze opisane. Eltrombopag jest lekiem stosowanym w leczeniu przewlekłej pierwotnej małopłytkowości immunologicznej i niedokrwistości aplastycznej. Natomiast CDIBA badano w kontekście terapii chorób zapalnych. W komórkach linii AML obydwa wymienione inhibitory allosteryczne wykazały działanie hamujące proliferację oraz zmniejszające poziom m^{6}A w mRNA [109, 110].

MODULACJA AKTYWNOŚCI DEMETYLAZY FTO – POTENCJALNE ZASTOSOWANIE W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

HAMOWANIE AKTYWNOŚCI DEMETYLAZY FTO PRZEZ UNIEMOŻLIWIENIE WIĄZANIA Z N6-METYLOADENOZYNĄ

Analogicznie do strategii terapeutycznych ukierunkowanych na metylację i demetylację DNA, również w przypadku RNA kluczowe jest poszukiwanie sposobów modulacji aktywności enzymów odpowiedzialnych za dynamiczną regulację poziomu m^{6}A. Obok inhibitorów kompleksu METTL3–METTL14 intensywnie badane są związki hamujące aktywność demetylaz RNA, w tym enzymu FTO. Przełomem w tych badaniach było zidentyfikowanie kwasu meklofenamowego jako pierwszego selektywnego inhibitora FTO. **Kwas meklofenamowy** (MA, ang. *meclofenamic acid*) jest niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym. Mechanizm działania MA polega na jego konkurencji z m^{6}A o wiązanie z FTO, tym samym uniemożliwiając oddziaływanie tego enzymu z substratem. Lokalizacja interakcji między FTO a MA częściowo obejmuje region odpowiedzialny za rozpoznawanie nukleotydu, a różnice w strukturze tego regionu między FTO a ALKBH5 odpowiadają za selektywność MA. W komórkach linii nowotworowej HeLa na skutek działania estru etylowego MA zaobserwowano ogólny wzrost poziomu m^{6}A RNA [111]. Poprzez modyfikację struktury MA opracowano małocząsteczkowy inhibitor **FB23**, wykazujący znacznie (140 razy) wyższą niż MA efektywność hamowania aktywności enzymatycznej FTO. Interakcja między FB23 a FTO obejmuje całą powierzchnię miejsca wiązania nukleotydu. Zsyntetyzowano również kolejną cząsteczkę FB23-2 (Ryc. 7), tym razem o mniejszej efektywności hamowania demetylacji katalizowanej przez FTO, ale zwiększonym wychwycie komórkowym. Potwierdzono antyproliferacyjne działanie **FB23-2** w komórkach linii AML. Zastosowanie tego inhibitora doprowadziło do wzrostu poziomu m^{6}A mRNA. Konsekwencją tego było zwiększenie poziomu ekspresji genów związanych z procesem hematopoezy – *ASB2* (pośredniczy w degradacji białek wiążących aktynę) i *RARA* (receptor α kwasu retinowego). Wzrost poziomu ekspresji *ASB2* i *RARA* obserwowany jest podczas prawidłowego przebiegu hematopoezy, natomiast obniżenie ekspresji tych genów związane jest z rozwojem AML. W badaniach FB23-2 w mysim modelu po ksenotransplantacji ludzkich komórek AML pochodzących zarówno z linii nowotworowej z hodowli *in vitro*, jak i pobranych od pacjentów, zaobserwowano m.in. indukcję różnicowania komórek AML oraz zmniejszenie liczebności białaczkowych komórek macierzystych [112].

Przeprowadzając dalszą optymalizację struktury FB23 uzyskano małocząsteczkowy inhibitor FTO będący tricyklicznym kwasem benzoesowym – **13a**, który w badaniach na liniach komórkowych AML wykazał większe niż FB23 działanie hamujące proliferację komórek nowotworowych. [113]. Stosując cząsteczkę 13a, nazywaną również **Dac85** [114], opracowano pierwszy inhibitor chimeryczny ukierunkowany na proteolizę tej demetylazy RNA PROTAC – **QP73** – który inicjuje proces zależnej od ubikwityny degradacji FTO w proteasomach. Indukowana przez QP73 degradacja FTO w komórkach linii AML doprowadziła do zwiększenia poziomu m^{6}A mRNA, zmniejszenia ekspresji protoonkogenu *MYC* oraz zwiększenia poziomu ekspresji *ASB2* i *RARA*. Aktywność przeciwnowotworowa QP73 została udowodniona w komórkach linii AML oraz *in vivo* na myszach z ksenograftem komórek AML, wykazując również większą efektywność działania niż 13a/Dac85 [115].

Najnowszy analog FB23 charakteryzujący się korzystniejszymi właściwościami fizykochemicznymi w porównaniu do wcześniej wymienionych inhibitorów to ZLD115 (Ryc. 7), który zawiera zasadowy łańcuch boczny benzoesanu. Analiza oddziaływania pochodnej **ZLD115** z FTO sugeruje, że mechanizm działania tego związku opiera się na konkurencji o miejsce wiązania nukleotydu. Efektem zastosowania ZLD115 w komórkach linii AML jest zahamowanie proliferacji komórek, wzrost ekspresji regulatorów prawidłowego przebiegu hematopoezy *ASB2* i *RARA*, oraz działanie przeciwnowotworowe u myszy z ksenograftem komórek białaczki mielomonocytowej. W porównaniu do pozostałych analogów FB23, ZLD115 charakteryzuje wysoka przenikalność przez błony komórkowe, stabilność metaboliczna i korzystniejsze parametry farmakokinetyczne [114].

Ze względu na wysoką ekspresję FTO w ostrej białaczce szpikowej AML szereg inhibitorów FTO badanych jest w kontekście leczenia tego typu nowotworu. Jednak wiele innych typów nowotworów również wykazuje nadprodukcję białka FTO, która jest kluczowa dla ich progresji. Niedawno opracowano inhibitor **18097** wykazujący działanie przeciwnowotworowe *in vitro* i *in vivo* w komórkach linii nowotworu piersi o wysokim potencjale przerzutowym. Tak samo jak wcześniej wymienione inhibitory, 18097 wiąże się

w miejscu wiązania substratu, a wraz z jego użyciem w komórkach nowotworowych obserwowane jest zmniejszenie poziomu m^{6}A mRNA, zahamowanie proliferacji komórek oraz spadek ich potencjału migracyjnego i inwazyjności. Co więcej, u myszy z ksenograftem komórek tej linii nowotworu piersi na skutek podania 18097 stwierdzono ograniczenie rozwoju przerzutów. Działanie przeciwnowotworowe 18097 związane jest ze wzrostem poziomu ekspresji genów supresorowych. Dodatkowo w komórkach nowotworu piersi wykryto również spadek ekspresji genów związanych z angiogenezą i metabolizmem komórkowym [116].

HAMOWANIE AKTYWNOŚCI DEMETYLAZY FTO PRZEZ UNIEMOŻLIWIENIE WIĄZANIA Z N6METYLOADENOZYNĄ I A-KETOGLUTARANEM

Jedną ze strategii zwiększania selektywności inhibitorów FTO jest projektowanie cząsteczek, które jednocześnie oddziałują z miejscami wiązania α-KG i nukleotydu. Pierwszy taki inhibitor FTO uzyskano poprzez połączenie 4-benzylopirydyny, która wiąże się z miejscem wiązania nukleotydu z hydrazydem kwasu fumarowego – analogiem α-KG, jednocześnie chelatującym jony metali. Do dalszych analiz wykorzystano ester etylowy tego inhibitora. Obserwowanym efektem jego działania w komórkach linii nowotworowej HeLa był globalny wzrost poziomu m^{6}A w mRNA [117]. Przedstawiony został również selektywny inhibitor FTO otrzymany poprzez chemiczne połączenie pochodnej hydrazydu fumaranu z MA (**Hz-MA**). Efektywność działania Hz-MA jest wyższa niż wykazywana przez jego elementy składowe analizowane indywidualnie. Zdolność Hz-MA do przenikania przez błony, zwiększono poprzez syntezę estru etylowego tego związku. Formę proleku Hz-MA zastosowano w komórkach linii AML, co doprowadziło do zmniejszenia żywotności komórek nowotworowych i związanej z akumulacją m^{6}A mRNA indukcją ekspresji RARA oraz zmniejszonym poziomem ekspresji protoonkogenu MYC [118].

HAMOWANE AKTYWNOŚCI DEMETYLAZY FTO ZWIĄZANE Z OBECNOŚCIĄ MUTACJI GENÓW KODUJĄCYCH DEHYDROGENAZĘ IZOCYTRYNIANOWĄ

Jak wspomniano wcześniej, u pacjentów nowotworowych z mutacją genów kodujących IDH zidentyfikowano onkometabolit D-2-hydroksyglutaran (D2HG) o strukturalnym podobieństwie do α-KG, który hamuje aktywność białek TET. Prowadzi to do zaburzeń wzoru metylacji cytozyn DNA i ma znaczenie pronowotworowe we wczesnych etapach nowotworzenia. Co ciekawe, w badaniach na liniach komórkowych oraz mysich ksenograftach ludzkiego AML u myszy, z użyciem egzogennego oraz endogennego D2HG wykazano jego działanie przeciwnowotworowe w dalszych etapach rozwoju AML. Okazało się, że w komórkach AML wrażliwych na D2HG, metabolit ten hamuje aktywność enzymatyczną demetylazy m^{6}A RNA – FTO, co prowadzi do zwiększenia globalnego poziomu m^{6}A mRNA i zmniejszenia stabilności mRNA dla MYC i CEBPA. Supresja ścieżek sygnałowych związanych z MYC i CEBPA skutkuje zahamowaniem cyklu komórkowego i proliferacji komórek nowotworowych. Ponownie problemem jest brak selektywności D2HG wobec FTO, ale badania te przedstawiają istotne informacje umożliwiające optymalizację leczenia pacjentów nowotworowych stosujących inhibitory zmutowanej formy IDH [119].

MODULACJA AKTYWNOŚCI DEMETYLAZY ALKBH5 – POTENCJALNE ZASTOSOWANIE W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

HAMOWANIE AKTYWNOŚCI DEMETYLAZY ALKBH5 POPRZEZ UNIEMOŻLIWIENIE WIĄZANIA Z N6-METYLOADENOZYNĄ

Mając na uwadze, że FTO nie jest jedyną demetylazą m^{6}A, istotnym kierunkiem badań pozostaje również poszukiwanie inhibitorów celujących w drugie kluczowe białko z tej grupy – ALKBH5. Jednakże, z uwagi na szereg podobieństw między strukturą tych enzymów, liczba selektywnych inhibitorów ALKBH5 o potwierdzonym działaniu przeciwnowotworowym jest niewielka. Jednym z nich jest pochodna pirazolopirymidyny – **DDO-2728**, wiążąca się z konkretnymi resztami aminokwasowymi ALKBH5 odpowiedzialnymi za rozpoznanie i wiązanie m^{6}A, które nie są silnie konserwowane wśród białek rodziny AlkB. Inhibitory ALKBH5 badane są w kontekście leczenia pacjentów z AML, jako że występująca u pacjentów nadekspresja ALKBH5 jest dodatnio skorelowana z ich gorszymi rokowaniami. Wraz z zastosowaniem DDO-2728 w komórkach linii AML zaobserwowano wzrost ogólnego poziomu m^{6}A mRNA, spadek ekspresji MYC oraz zahamowanie proliferacji komórek. Natomiast u myszy, z ksenograftem komórek AML, na skutek podania DDO-2728 ograniczony został rozwój nowotworu [120, 121].

Inhibitorem uniemożliwiającym wiązanie ALKBH5 z m^{6}A-RNA jest **TD19**, którego mechanizm działania polega na kowalencyjnej i nieodwracalnej modyfikacji reszt aminokwasowych (C100 i C267) zlokalizowanych w pobliżu centrum katalitycznego białka, a szczególnie konkretnej reszty cysteiny zaangażowanej w rozpoznawanie substratu ALKBH5. Oddziałujące z TD19 reszty aminokwasowe nie są konserwowane wśród innych białek rodziny AlkB, dlatego też inhibitor ten wykazuje selektywność wobec ALKBH5. W badaniach na liniach komórkowych AML po zastosowaniu TD19 doszło do zmniejszenia stopnia proliferacji komórek oraz wzrostu poziomu m^{6}A mRNA, tym samym kompensacji efektów nadekspresji ALKBH5 [122]. Zbliżony mechanizm działania, lecz poprzez modyfikację reszty aminokwasowej (C200) poza centrum aktywnym ALKBH5, prowadzącą do zakłóceń wiązanie enzymu z substratem, charakteryzuje inhibitor **18l**. Został on zidentyfikowany po przeszukaniu biblioteki małych cząsteczek. Badania z wykorzystaniem komórek linii AML wskazały na potencjalne działanie przeciwbiałaczkowe 18l, który indukował apoptozę, różnicowania komórek oraz zatrzymanie cyklu komórkowego. Wraz ze zwiększonym poziomem m^{6}A mRNA stwierdzono również zmniejszenie poziomu onkogennych białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego, takich jak MYC i TACC3. Może to świadczyć o zaburzeniach ścieżek sygnałowych związanych z procesem nowotworzenia. Zahamowanie rozwoju nowotworu przy jednoczesnym braku występowania efektów ubocznych potwierdzono również *in vivo*, w badaniach u myszy z kseno-

graftem ludzkich komórek ostrej białaczki promielocytowej [123].

MODULACJA AKTYWNOŚCI BIAŁEK ODCZYTUJĄCYCH INFORMACJĘ O METYLACJI ADENINY mRNA – POTENCJALNE ZASTOSOWANIE W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

REGULACJA AKTYWNOŚCI BIAŁEK ZAWIERAJĄCYCH DOMENĘ YTH

Pomimo ograniczonej wiedzy na temat mechanizmów działania białek odczytujących m^{6}A mRNA, szerokie spektrum pełnionych przez nie funkcji wskazuje na wysoki potencjał wykorzystania małych cząsteczek regulujących ich aktywność w terapii przeciwnowotworowej. Synteza inhibitorów ukierunkowanych na białka zawierające domenę YTH jest nadal we wczesnej fazie badań, przy czym większość prac dotyczy białek YTHDF. Zważywszy na fakt, iż DF1 stanowi jeden z czynników progresji AML, a jednocześnie nie jest kluczowym dla prawidłowego przebiegu hematopoezy białkiem, inhibitory DF1 są obiecującym kierunkiem rozwoju leczenia AML. Stosowany w leczeniu zespołu jelita nadwrażliwego **tegaserod** wykazał aktywność inhibitora DF1, aczkolwiek wymagane jest przeprowadzenie dalszych analiz strukturalnych interakcji tego leku z DF1. Zaproponowano mechanizm działania polegający na bezpośredniej interakcji cząsteczki tegaserodu z domeną YTH białka DF1 i uniemożliwienie wiązania DF1 z m^{6}A-mRNA. Prowadzi to do zahamowania translacji zmodyfikowanych transkryptów, co zostało zaobserwowane na przykładzie obniżonego poziomu translacji transkryptów kodujących cykliny E2. Cyklina E2 zaangażowana jest w regulację przejścia cyklu komórkowego z fazy G1 do S. Wzrost poziomu ekspresji genu kodującego cyklinę E2 obserwowany jest u pacjentów z AML, a zahamowanie ekspresji tego genu w komórkach AML prowadzi do zahamowania proliferacji komórek oraz ich przejścia w fazę S cyklu komórkowego. W komórkach linii AML skutkiem działania tegaserodu było zatrzymanie ich proliferacji oraz zmniejszenie populacji białaczkowych komórek macierzystych. Z kolei efektem podania tegaserodu myszom z ksenograftem pobranych od pacjentów komórek AML było wydłużenie czasu ich przeżycia [124]. W kwestii regulacji aktywności białek YTHDC przykładów inhibitorów jest znacznie mniej, szczegółowo scharakteryzowane zostały ligandy selektywnie wiążące się z DC1, jednak wymagają one dalszych analiz pod kątem aktywności przeciwnowotworowej [125].

REGULACJA AKTYWNOŚCI BIAŁEK IGF2BP

Odnośnie celowania w drugą grupę białek rozpoznających m^{6}A – IGF2BP – zaprojektowano inhibitor **AVJ16**. Ten specyficzny wobec białka IGF2BP1 inhibitor, uniemożliwia wiązanie tego białka z mRNA dla protoonkogenu *KRAS*. Prowadzi to do zmniejszenia poziomu mRNA dla *KRAS* i produktu jego ekspresji. W konsekwencji, zahamowaniu ulegają ścieżki sygnalizacyjne związane z ekspresją *KRAS*, zaangażowane w regulację procesów komórkowych, w tym proliferację i potencjał migracyjny komórek. W komórkach linii gruczolakoraka płuc i nowotworu jelita grubego z nadekspresją IGF2BP1 na skutek zastosowania AVJ16 obserwowano zmniejszenie stopnia proliferacji i migracji komórek. Efekt ten nie był obecny w komórkach o niskim poziomie lub całkowitym braku ekspresji IGF2BP1, co świadczy o specyficzności cząsteczki AVJ16. Ze względu na charakterystykę wiązania AVJ16-IGF2BP1 wnioskuje się, że interakcja ta jest zależna od modyfikacji m^{6}A [126, 127].

Opracowane zostały również inne inhibitory białek z grupy IGF2BP o udowodnionym *in vitro* i/lub *in vivo* działaniu przeciwnowotworowym [128–130], jednakże dostępne dane nie są wystarczające, aby móc wnioskować o jednoznacznej zależności między aktywnością tych inhibitorów a modyfikacją m^{6}A mRNA. Wciąż rozwijane są badania nad mechanizmami leżącymi u podstaw interakcji IGF2BP z m^{6}A mRNA, co idzie w parze ze stałym doskonaleniem metod ich identyfikacji [131].

Pomimo szerokiej już wiedzy na temat modyfikacji RNA istnieją jednak luki w obecnym stanie badań nad epitranskryptomiką m^{6}A, które obejmują kilka kluczowych aspektów. Po pierwsze, brakuje w pełni selektywnych i klinicznie zweryfikowanych inhibitorów enzymów odpowiedzialnych za wprowadzanie, usuwanie oraz „odczyt" m^{6}A. Po drugie, rutynowe metody mapowania m^{6}A na poziomie pojedynczych cząsteczek i izoform transkryptów wciąż charakteryzują się ograniczoną czułością i rozdzielczością. Wreszcie, pozostaje nierozstrzygnięta kwestia funkcji białek YTHDF1/2/3 – czy działają głównie jako redundantni promotorzy degradacji mRNA, czy też pełnią odrębne, kontekstowo zależne role [132]. Wynika to m.in. z braku systematycznych badań przy kontrolowanej ekspresji poszczególnych paralogów i precyzyjnego określenia ich substratów wśród mRNA.

Ramka 4. Dysregulacja m^{6}A RNA w onkogenezie. Metylacja m^{6}A RNA odgrywa kluczową rolę w nowotworzeniu, regulując ekspresję onkogenów, genów supresorowych, cykl komórkowy, naprawę DNA oraz mikrośrodowisko guza. Dysfunkcja enzymów METTL3/METTL14, FTO, ALKBH5 i białek odczytujących m^{6}A prowadzi do proliferacji i samoodnowy komórek nowotworowych, szczególnie w AML. Inhibitory tych enzymów i białek (np. STM2457, FB23-2, DDO-2728, tegaserod, AVJ16) wykazują obiecujące działanie przeciwnowotworowe poprzez przywrócenie prawidłowego poziomu m^{6}A i zahamowanie ekspresji onkogenów.

PODSUMOWANIE

Metylacja DNA oraz RNA to dwa ściśle powiązane, kluczowe systemy regulacji ekspresji genów, których zaburzenia odgrywają fundamentalną rolę w inicjacji i progresji nowotworów. Rosnąca globalna zachorowalność na raka, potęgowana przez czynniki środowiskowe, styl życia i starzenie się populacji, podkreśla konieczność szczegółowego zrozumienia mechanizmów wykraczających poza mutacje w sekwencji DNA. Metylacja cytozyny DNA (5mC) wpływa na strukturę chromatyny, dostępność sekwencji regulatorowych oraz stabilność genomu, a jej deregulacja może prowadzić do wyciszenia i tym samym utraty funkcji genów

supresorowych oraz aktywacji onkogenów. Równolegle epitranskryptomiczne modyfikacje RNA, w szczególności metylacja adeniny mRNA (m^6A), regulują stabilność, los transkryptów i proces translacji oraz kształtują mikrośrodowisko guza, a ich zaburzenia są coraz częściej identyfikowane w różnych typach nowotworów.

Oba systemy regulacji, zarówno epigenetyczny jak i epitranskryptomiczny, charakteryzują się odwracalnością, co czyni je atrakcyjnymi celami terapeutycznymi. Leki epigenetyczne są już intensywnie badane i stosowane, natomiast rozwój terapii ukierunkowanych na modyfikacje RNA stanowi nowy i bardzo obiecujący kierunek. Modulacja aktywności białek odpowiedzialnych za metylację 5mC i m^6A może prowadzić do reaktywacji genów supresorowych, wyciszenia onkogenów oraz przywrócenia równowagi szlaków regulujących wzrost i przeżywalność komórek nowotworowych. Jednocześnie należy pamiętać, że terapia tego typu niesie ryzyko globalnych zmian epigenomu i epitranskryptomu, co podkreśla konieczność opracowania wysoce specyficznych cząsteczek o precyzyjnym działaniu.

Indywidualne różnice w profilu genetycznym, epigenetycznym i epitranskryptomicznym guzów zaliczanych do tego samego typu nowotworu, wskazują na rosnące znaczenie medycyny spersonalizowanej. Efektywne wykorzystanie leków ukierunkowanych na modyfikacje nukleotydów wymaga dokładnej analizy profilu molekularnego nowotworu i dostosowania terapii do specyficznych zaburzeń danego pacjenta. Współzależność pomiędzy metylacją DNA a m^6A sugeruje ponadto możliwość synergistycznego działania terapii modulujących oba typy modyfikacji.

Aby w pełni wykorzystać potencjał leków epigenetycznych i epitranskryptomicznych, zarówno jako monoterapii, jak i terapii skojarzonych, konieczne są dalsze badania przedkliniczne i kliniczne, a także rozwój narzędzi identyfikujących precyzyjne zaburzenia regulacji genów w poszczególnych nowotworach. Zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw tych modyfikacji otwiera drogę do nowoczesnych, celowanych terapii przeciwnowotworowych o dużej skuteczności i lepszym profilu bezpieczeństwa.

BIBLIOGRAFIA

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A (2024) Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 74:229–263
2. Dawson MA, Kouzarides T (2012) Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. Cell 150:12–27
3. Sacharowski SP, Sarnowski TJ (2019) Mechanizmy kontrolujące strukturę chromatyny. Postępy Biochem 65:9–20
4. Allis CD, Jenuwein T (2016) The molecular hallmarks of epigenetic control. Nat Rev Genet 17:487–500
5. Breiling A, Lyko F (2015) Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. Epigenetics Chromatin 8:24
6. Jabbari K, Bernardi G (2004) Cytosine methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA frequencies. Gene 333:143–149
7. Greenberg MVC, Bourc'his D (2019) The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. Nat Rev Mol Cell Biol 20:590–607
8. Alegría-Torres JA, Baccarelli A, Bollati V (2011) Epigenetics and lifestyle. Epigenomics 3:267–277
9. Cappannini A, Ray A, Purta E, Mukherjee S, Boccaletto P, Moafinejad SN, Lechner A, Barchet C, Klaholz BP, Stefaniak F, Bujnicki JM (2023) MODOMICS: a database of RNA modifications and related information. 2023 update. Nucleic Acids Res 52:D239–D244
10. Zhao L-Y, Song J, Liu Y, Song C-X, Yi C (2020) Mapping the epigenetic modifications of DNA and RNA. Protein Cell 11:792–808
11. Niu Y, Zhao X, Wu Y-S, Li M-M, Wang X-J, Yang Y-G (2013) N6-Methyl-Adenosine (m6A) in RNA: An Old Modification with A Novel Epigenetic Function. Genomics Proteomics Bioinformatics 11:8–17
12. Fu Y, He C (2012) Nucleic acid modifications with epigenetic significance. Curr Opin Chem Biol 16:516–524
13. Flavahan WA, Gaskell E, Bernstein BE (2017) Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. Science 357:eaal2380
14. Orsolic I, Carrier A, Esteller M (2023) Genetic and epigenetic defects of the RNA modification machinery in cancer. Trends Genet 39:74–88
15. Cayir A, Barrow TM, Guo L, Byun H-M (2019) Exposure to environmental toxicants reduces global N6-methyladenosine RNA methylation and alters expression of RNA methylation modulator genes. Environ Res 175:228–234
16. Khan SU, Fatima K, Aisha S, Malik F (2024) Unveiling the mechanisms and challenges of cancer drug resistance. Cell Commun Signal 22:109
17. Yu X, Zhao H, Wang R, Chen Y, Ouyang X, Li W, Sun Y, Peng A (2024) Cancer epigenetics: from laboratory studies and clinical trials to precision medicine. Cell Death Discov 10:1–12
18. Bielak-Żmijewska A (2023) Zegar epigenetyczny i jego cofanie - nadzieja na wydłużenie zdrowego życia. Kosmos 72:451–468
19. Lyko F (2018) The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. Nat Rev Genet 19:81–92
20. Bourc'his D, Bestor TH (2004) Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. Nature 431:96–99
21. Slotkin RK, Martienssen R (2007) Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. Nat Rev Genet 8:272–285
22. Jeziorska DM, Murray RJS, De Gobbi M, Gaentzsch R, Garrick D, Ayyub H, Chen T, Li E, Telenius J, Lynch M, Graham B, Smith AJH, Lund JN, Hughes JR, Higgs DR, Tufarelli C (2017) DNA methylation of intragenic CpG islands depends on their transcriptional activity during differentiation and disease. Proc Natl Acad Sci U S A 114:E7526–E7535
23. Kaluscha S, Domcke S, Wirbelauer C, Stadler MB, Durdu S, Burger L, Schübeler D (2022) Evidence that direct inhibition of transcription factor binding is the prevailing mode of gene and repeat repression by DNA methylation. Nat Genet 54:1895–1906
24. Wang Q, Xiong F, Wu G, Liu W, Chen J, Wang B, Chen Y (2022) Gene body methylation in cancer: molecular mechanisms and clinical applications. Clin Epigenetics 14:154
25. Smith J, Sen S, Weeks RJ, Eccles MR, Chatterjee A (2020) Promoter DNA Hypermethylation and Paradoxical Gene Activation. Trends Cancer 6:392–406
26. Yin Y, Morgunova E, Jolma A, Kaasinen E, Sahu B, Khund-Sayeed S, Das PK, Kivioja T, Dave K, Zhong F, Nitta KR, Taipale M, Popov A, Ginno PA, Domcke S, Yan J, Schübeler D, Vinson C, Taipale J (2017) Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors. Science 356:eaaj2239
27. Jeltsch A, Jurkowska RZ (2016) Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases - a new regulatory paradigm. Nucleic Acids Res 44:8556–8575.
28. Loaeza-Loaeza J, Beltran AS, Hernández-Sotelo D (2020) DNMTs and Impact of CpG Content, Transcription Factors, Consensus Motifs, lncRNAs, and Histone Marks on DNA Methylation. Genes 11:1336
29. Xu C, Corces VG (2018) Nascent DNA methylome mapping reveals inheritance of hemimethylation at CTCF/cohesin sites. Science 359:1166–1170

30. Gujar H, Weisenberger DJ, Liang G (2019) The Roles of Human DNA Methyltransferases and Their Isoforms in Shaping the Epigenome. Genes 10:172.
31. Turpin M, Salbert G (2022) 5-methylcytosine turnover: Mechanisms and therapeutic implications in cancer. Front Mol Biosci 9:976862
32. Wu H, Zhang Y (2014) Reversing DNA Methylation: Mechanisms, Genomics, and Biological Functions. Cell 156:45–68
33. Kriukienė E, Tomkuvienė M, Klimašauskas S (2024) 5-Hydroxymethylcytosine: the many faces of the sixth base of mammalian DNA. Chem Soc Rev 53:2264–2283.
34. Belle R, Kawamura A, Arimondo PB (2020) Chemical Compounds Targeting DNA Methylation and Hydroxymethylation. W: Mai A (red) Chem. Epigenetics. Springer International Publishing, Cham, str. 255–28
35. Alagia A, Gullerova M (2022) The Methylation Game: Epigenetic and Epitranscriptomic Dynamics of 5-Methylcytosine. Front Cell Dev Biol 10:915685
36. Feng Y, Chen S-J, Yuan B-F (2024) Recent Advances in Deciphering the Mechanisms and Biological Functions of DNA Demethylation. Chin J Chem 42:645–651
37. Zhang X, Zhang Y, Wang C, Wang X (2023) TET (Ten-eleven translocation) family proteins: structure, biological functions and applications. Signal Transduct Target Ther 8:1–20
38. Joshi K, Liu S, Breslin S.J. P, Zhang J (2022) Mechanisms that regulate the activities of TET proteins. Cell Mol Life Sci 79:363
39. Liu R, Zhao E, Yu H, Yuan C, Abbas MN, Cui H (2023) Methylation across the central dogma in health and diseases: new therapeutic strategies. Signal Transduct Target Ther 8:1–46
40. Jeltsch A, Broche J, Lungu C, Bashtrykov P (2020) Biotechnological Applications of MBD Domain Proteins for DNA Methylation Analysis. J Mol Biol 432:1816–1823
41. Mahmood N, Rabbani SA (2019) DNA Methylation Readers and Cancer: Mechanistic and Therapeutic Applications. Front Oncol 9:489
42. Unoki M, Sasaki H (2022) The UHRF protein family in epigenetics, development, and carcinogenesis. Proc Jpn Acad Ser B 98:401–415
43. Zaccara S, Ries RJ, Jaffrey SR (2019) Reading, writing and erasing mRNA methylation. Nat Rev Mol Cell Biol 20:608–624
44. Breger K, Kunkler CN, O'Leary NJ, Hulewicz JP, Brown JA (2024) Ghost authors revealed: The structure and function of human -methyladenosine RNA methyltransferases. WIREs RNA 15:e1810
45. Yang X, Triboulet R, Liu Q, Sendinc E, Gregory RI (2022) Exon junction complex shapes the m6A epitranscriptome. Nat Commun 13:7904
46. Zhang X, Wei L-H, Wang Y, Xiao Y, Liu J, Zhang W, Yan N, Amu G, Tang X, Zhang L, Jia G (2019) Structural insights into FTO's catalytic mechanism for the demethylation of multiple RNA substrates. Proc Natl Acad Sci 116:2919–2924
47. Toh JDW, Crossley SWM, Bruemmer KJ, Ge EJ, He D, Iovan DA, Chang CJ (2020) Distinct RNA N-demethylation pathways catalyzed by nonheme iron ALKBH5 and FTO enzymes enable regulation of formaldehyde release rates. Proc Natl Acad Sci 117:25284–25292
48. Zaccara S, Jaffrey SR (2020) A Unified Model for the Function of YTHDF Proteins in Regulating m6A-Modified mRNA. Cell 181:1582-1595.e18
49. Murakami S, Jaffrey SR (2022) Hidden codes in mRNA: Control of gene expression by m6A. Mol Cell 82:2236–2251
50. Li L, Krasnykov K, Homolka D, Gos P, Mendel M, Fish RJ, Pandey RR, Pillai RS (2022) The XRN1-regulated RNA helicase activity of YTHDC2 ensures mouse fertility independently of m6A recognition. Mol Cell 82:1678-1690.e12
51. Wu B, Su S, Patil DP, Liu H, Gan J, Jaffrey SR, Ma J (2018) Molecular basis for the specific and multivariant recognitions of RNA substrates by human hnRNP A2/B1. Nat Commun 9:420
52. Sun L, Fazal FM, Li P, Broughton JP, Lee B, Tang L, Huang W, Kool ET, Chang HY, Zhang QC (2019) RNA structure maps across mammalian cellular compartments. Nat Struct Mol Biol 26:322–330
53. Zhang J, Yang C, Wu C, Cui W, Wang L (2020) DNA Methyltransferases in Cancer: Biology, Paradox, Aberrations, and Targeted Therapy. Cancers 12:2123
54. Park DJ, Kwon A, Cho B-S, Kim H-J, Hwang K-A, Kim M, Kim Y (2020) Characteristics of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. Blood Res 55:17–26
55. Kunimoto H, Nakajima H (2021) TET2: A cornerstone in normal and malignant hematopoiesis. Cancer Sci 112:31–40
56. Matuleviciute R, Cunha PP, Johnson RS, Foskolou IP (2021) Oxygen regulation of TET enzymes. FEBS J 288:7143–7161
57. Martinet N, Michel BY, Bertrand P, Benhida R (2012) Small molecules DNAmethyltransferasesinhibitors. MedChemComm 3:263–273
58. Lopez M, Gilbert J, Contreras J, Halby L, Arimondo PB (2022) Inhibitors of DNA Methylation. W: Jeltsch A, Jurkowska RZ (red) DNA Methyltransferases - Role Funct. Springer International Publishing, Cham, str. 471–513
59. Duchmann M, Itzykson R (2019) Clinical update on hypomethylating agents. Int J Hematol 110:161–169
60. Savona MR, Odenike O, Amrein PC, Steensma DP, DeZern AE, Michaelis LC, Faderl S, Harb W, Kantarjian H, Lowder J, Oganesian A, Azab M, Garcia-Manero G (2019) An oral fixed-dose combination of decitabine and cedazuridine in myelodysplastic syndromes: a multicentre, open-label, dose-escalation, phase 1 study. Lancet Haematol 6:e194–e203
61. Roboz GJ, Kantarjian HM, Yee KWL, Kropf PL, O'Connell CL, Griffiths EA, Stock W, Daver NG, Jabbour E, Ritchie EK, Walsh KJ, Rizzieri D, Lunin SD, Curio T, Chung W, Hao Y, Lowder JN, Azab M, Issa JJ (2018) Dose, schedule, safety, and efficacy of guadecitabine in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. Cancer 124:325–334
62. https://clinicaltrials.gov/
63. Pappalardi MB, Keenan K, Cockerill M, Kellner WA, Stowell A, Sherk C, Wong K, Pathuri S, Briand J, Steidel M, Chapman P, Groy A, Wiseman AK, McHugh CF, Campobasso N, Graves AP, Fairweather E, Werner T, Raoof A, Butlin RJ, Rueda L, Horton JR, Fosbenner DT, Zhang C, Handler JL, Muliaditan M, Mebrahtu M, Jaworski J-P, McNulty DE, Burt C, Eberl HC, Taylor AN, Ho T, Merrihew S, Foley SW, Rutkowska A, Li M, Romeril SP, Goldberg K, Zhang X, Kershaw CS, Bantscheff M, Jurewicz AJ, Minthorn E, Grandi P, Patel M, Benowitz AB, Mohammad HP, Gilmartin AG, Prinjha RK, Ogilvie D, Carpenter C, Heerding D, Baylin SB, Jones PA, Cheng X, King BW, Luengo JI, Jordan AM, Waddell I, Kruger RG, McCabe MT (2021) Discovery of a first-in-class reversible DNMT1-selective inhibitor with improved tolerability and efficacy in acute myeloid leukemia. Nat Cancer 2:1002–1017
64. Chen Q, Liu B, Zeng Y, Hwang JW, Dai N, Corrêa IR, Estecio MR, Zhang X, Santos MA, Chen T, Cheng X (2023) GSK-3484862 targets DNMT1 for degradation in cells. NAR Cancer 5:zcad022
65. Liu J, Ruan M, Liu Y, Hong X, Zhang L, Zhang Q (2024) Identification of 3-(9*H*-carbazol-9-yl)-2-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)propanoic acids as promising DNMT1 inhibitors. Eur J Med Chem 274:116538
66. Loenen W a. M (2006) S-adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything? Biochem Soc Trans 34:330–333
67. Halby L, Menon Y, Rilova E, Pechalrieu D, Masson V, Faux C, Bouhlel MA, David-Cordonnier M-H, Novosad N, Aussagues Y, Samson A, Lacroix L, Ausseil F, Fleury L, Guianvarc'h D, Ferroud C, Arimondo PB (2017) Rational Design of Bisubstrate-Type Analogues as Inhibitors of DNA Methyltransferases in Cancer Cells. J Med Chem 60:4665–4679
68. Sandoval JE, Ramabadran R, Stillson N, Sarah L, Fujimori DG, Goodell MA, Reich N (2022) First-in-Class Allosteric Inhibitors of DNMT3A Disrupt Protein–Protein Interactions and Induce Acute Myeloid Leukemia Cell Differentiation. J Med Chem 65:10554–10566
69. Okuda K, Nakahara K, Ito A, Iijima Y, Nomura R, Kumar A, Fujikawa K, Adachi K, Shimada Y, Fujio S, Yamamoto R, Takasugi N, Onuma K, Osaki M, Okada F, Ukegawa T, Takeuchi Y, Yasui N, Yamashita A, Marusawa H, Matsushita Y, Katagiri T, Shibata T, Uchida K, Niu S-Y, Lang NB, Nakamura T, Zhang KYJ, Lipton SA, Uehara

T (2023) Pivotal role for S-nitrosylation of DNA methyltransferase 3B in epigenetic regulation of tumorigenesis. Nat Commun 14:621

70. Zhang Y, Lai BS, Juhas M (2019) Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications. Molecules 24:941
71. Wang L, Lee JY, Gao L, Yin J, Duan Y, Jimenez LA, Adkins GB, Ren W, Li L, Fang J, Wang Y, Song J, Zhong W (2019) A DNA aptamer for binding and inhibition of DNA methyltransferase 1. Nucleic Acids Res 47:11527–11537
72. Esposito CL, Autiero I, Sandomenico A, Li H, Bassal MA, Ibba ML, Wang D, Rinaldi L, Ummarino S, Gaggi G, Borchiellini M, Swiderski P, Ruvo M, Catuogno S, Ebralidze AK, Kortylewski M, Franciscis V de, Ruscio AD (2023) Targeted systematic evolution of an RNA platform neutralizing DNMT1 function and controlling DNA methylation. Nat Commun 14:99
73. Sato K, Kunitomo Y, Kasai Y, Utsumi S, Suetake I, Tajima S, Ichikawa S, Matsuda A (2018) Mechanism-Based Inhibitor of DNA Cytosine-5 Methyltransferase by a S_NAr Reaction with an Oligodeoxyribonucleotide Containing a 2-Amino-4-Halopyridine- *C* -Nucleoside. ChemBioChem 19:865–872
74. Bajan S, Hutvagner G (2020) RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. Cells 9:137
75. Uddin MG, Fandy TE (2021) DNA methylation inhibitors: Retrospective and perspective view. Adv Cancer Res 152:205–223
76. Kaplánek R, Kejík Z, Hajduch J, Veselá K, Kučnirová K, Skaličková M, Venhauerová A, Hosnedlová B, Hromádka R, Dytrych P, Novotný P, Abramenko N, Antonyová V, Hoskovec D, Babula P, Masařík M, Martásek P, Jakubek M (2023) TET protein inhibitors: Potential and limitations. Biomed Pharmacother 166:115324
77. Testa U, Castelli G, Pelosi E (2020) Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Myelodysplastic Syndromes and in Acute Myeloid Leukemias. Cancers 12:2427
78. Chua GNL, Wassarman KL, Sun H, Alp JA, Jarczyk EI, Kuzio NJ, Bennett MJ, Malachowsky BG, Kruse M, Kennedy AJ (2019) Cytosine-Based TET Enzyme Inhibitors. ACS Med Chem Lett 10:180–185
79. Weirath NA, Hurben AK, Chao C, Pujari SS, Cheng T, Liu S, Tretyakova NY (2022) Small Molecule Inhibitors of TET Dioxygenases: Bobcat339 Activity Is Mediated by Contaminating Copper(II). ACS Med Chem Lett 13:792–798
80. Guan Y, Tiwari AD, Phillips JG, Hasipek M, Grabowski DR, Pagliuca S, Gopal P, Kerr CM, Adema V, Radivoyevitch T, Parker Y, Lindner DJ, Meggendorfer M, Abazeed M, Sekeres MA, Mian OY, Haferlach T, Maciejewski JP, Jha BK (2021) A Therapeutic Strategy for Preferential Targeting of TET2-Mutant and TET Dioxygenase–Deficient Cells in Myeloid Neoplasms. Blood Cancer Discov 2:146–161
81. Mikkelsen SU, Gillberg L, Lykkesfeldt J, Grønbæk K (2021) The role of vitamin C in epigenetic cancer therapy. Free Radic Biol Med 170:179–193
82. Regulska K, Litwiniuk M (2020) Use of vitamin C in anticancer therapy? – preclinical and clinical data overview. Farm. Pol. pp 222–236
83. Kim H, Jung I, Lee CH, An J, Ko M (2023) Development of Novel Epigenetic Anti-Cancer Therapy Targeting TET Proteins. Int J Mol Sci 24:16375
84. Mitsuhashi R, Sato K, Kawakami H (2025) Novel Epigenetics Control (EpC) Nanocarrier for Cancer Therapy Through Dual-Targeting Approach to DNA Methyltransferase and Ten-Eleven Translocation Enzymes. Epigenomes 9:6
85. Ogasawara M (2024) Wilms' tumor 1 -targeting cancer vaccine: Recent advancements and future perspectives. Hum Vaccines Immunother 20:2296735
86. Kim A, Benavente CA (2024) Oncogenic Roles of UHRF1 in Cancer. Epigenomes 8:26.
87. Ashraf W, Ahmad T, Reynoird N, Hamiche A, Mély Y, Bronner C, Mousli M (2023) Natural and Synthetic Anticancer Epidrugs Targeting the Epigenetic Integrator UHRF1. Molecules 28:5997
88. Ciaco S, Mazzoleni V, Javed A, Eiler S, Ruff M, Mousli M, Mori M, Mély Y (2023) Inhibitors of UHRF1 base flipping activity showing cytotoxicity against cancer cells. Bioorganic Chem 137:106616
89. Ginder GD, Williams DC (2018) Readers of DNA methylation, the MBD family as potential therapeutic targets. Pharmacol Ther 184:98–111
90. Zhu D, Osuka S, Zhang Z, Reichert ZR, Yang L, Kanemura Y, Jiang Y, You S, Zhang H, Devi NS, Bhattacharya D, Takano S, Gillespie GY, Macdonald T, Tan C, Nishikawa R, Nelson WG, Olson JJ, Meir EGV (2018) BAI1 Suppresses Medulloblastoma Formation by Protecting p53 from Mdm2-Mediated Degradation. Cancer Cell 33:1004-1016.e5
91. Erdmann D, Contreras J, Le Meur RA, Vitorge B, Saverat V, Tafit A, Jallet C, Cadet-Daniel V, Bon C, Phansavath P, Ratovelomanana-Vidal V, Jeltsch A, Vichier-Guerre S, Guijarro JI, Arimondo PB (2022) Identification of Chemical Probes Targeting MBD2. ACS Chem Biol 17:1415–1426
92. Kim MY, Na I, Kim JS, Son SH, Choi S, Lee SE, Kim J-H, Jang K, Alterovitz G, Chen Y, van der Vaart A, Won H-S, Uversky VN, Kim CG (2019) Rational discovery of antimetastatic agents targeting the intrinsically disordered region of MBD2. Sci Adv 5:eaav9810
93. Lee H-M, Kuijer MB, Ruiz Blanes N, Clark EP, Aita M, Galiano Arjona L, Kokot A, Sciaky N, Simon JM, Bhatnagar S, Philpot BD, Cerase A (2020) A small-molecule screen reveals novel modulators of MeCP2 and X-chromosome inactivation maintenance. J Neurodev Disord 12:29
94. Nejati-Koshki K, Roberts C-T, Babaei G, Rastegar M (2023) The Epigenetic Reader Methyl-CpG-Binding Protein 2 (MeCP2) Is an Emerging Oncogene in Cancer Biology. Cancers 15:2683
95. Paiva S-L, Crews CM (2019) Targeted protein degradation: elements of PROTAC design. Curr Opin Chem Biol 50:111–119
96. Wang Z, Liu J, Qiu X, Zhang D, Inuzuka H, Chen L, Chen H, Xie L, Kaniskan HÜ, Chen X, Jin J, Wei W (2023) Methylated Nucleotide-Based Proteolysis-Targeting Chimera Enables Targeted Degradation of Methyl-CpG-Binding Protein 2. J Am Chem Soc 145:21871–21878
97. Nombela P, Miguel-López B, Blanco S (2021) The role of m6A, m5C and Ψ RNA modifications in cancer: Novel therapeutic opportunities. Mol Cancer 20:18
98. Han X, Zhu Y, Ke J, Zhai Y, Huang M, Zhang X, He H, Zhang X, Zhao X, Guo K, Li X, Han Z, Zhang Y (2024) Progression of m6A in the tumor microenvironment: hypoxia, immune and metabolic reprogramming. Cell Death Discov 10:1–18
99. Liu C, Yang Z, Li R, Wu Y, Chi M, Gao S, Sun X, Meng X, Wang B (2021) Potential roles of N6-methyladenosine (m6A) in immune cells. J Transl Med 19:251
100. Vasic R, Gao Y, Liu C, Halene S (2020) The Role of RNA Epigenetic Modification in Normal and Malignant Hematopoiesis. Curr Stem Cell Rep 6:144–155
101. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JRB, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch A-M, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin M-R, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJF, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CNA, Doney ASF, Morris AD, Smith GD, Hattersley AT, McCarthy MI (2007) A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. Science 316:889–894
102. Li B, Jiang J, Assaraf YG, Xiao H, Chen Z-S, Huang C (2020) Surmounting cancer drug resistance: New insights from the perspective of N6-methyladenosine RNA modification. Drug Resist Updat 53:100720
103. Yankova E, Blackaby W, Albertella M, Rak J, De Braekeleer E, Tsagkogeorga G, Pilka ES, Aspris D, Leggate D, Hendrick AG, Webster NA, Andrews B, Fosbeary R, Guest P, Irigoyen N, Eleftheriou M, Gozdecka M, Dias JML, Bannister AJ, Vick B, Jeremias I, Vassiliou GS, Rausch O, Tzelepis K, Kouzarides T (2021) Small-molecule inhibition of METTL3 as a strategy against myeloid leukaemia. Nature 593:597–601
104. Shrestha P, Kang H, Song A, Jo S, Bhattarai PY, Choi HS (2023) STM2457 Inhibits Breast Cancer Tumorigenesis via the Inhibition of METTL3. Drug Targets Ther 2:80–87

105. Papadopoulos KP, Ahnert JR, Ofir-Rosenfeld Y, Holz J-B, Team S-22101 S (2024) Phase 1 dose escalation and cohort expansion study evaluating safety, PK, PD and clinical activity of STC-15, a METTL-3 inhibitor, in patients with advanced malignancies. J Clin Oncol 42:2586

106. Li J, Gregory RI (2021) Mining for METTL3 inhibitors to suppress cancer. Nat Struct Mol Biol 28:460–462

107. Du W, Huang Y, Chen X, Deng Y, Sun Y, Yang H, Shi Q, Wu F, Liu G, Huang H, Ding J, Huang X, Xu S (2024) Discovery of a PROTAC degrader for METTL3-METTL14 complex. Cell Chem Biol 31:177-183.e17

108. Errani F, Invernizzi A, Herok M, Bochenkova E, Stamm F, Corbeski I, Romanucci V, Di Fabio G, Zálešák F, Caflisch A (2024) Proteolysis Targeting Chimera Degraders of the METTL3–14 m6A-RNA Methyltransferase. JACS Au 4:713–729

109. Lee J-H, Choi N, Kim S, Jin MS, Shen H, Kim Y-C (2022) Eltrombopag as an Allosteric Inhibitor of the METTL3-14 Complex Affecting the m6A Methylation of RNA in Acute Myeloid Leukemia Cells. Pharmaceuticals 15:440

110. Lee J-H, Kim S, Jin MS, Kim Y-C (2022) Discovery of substituted indole derivatives as allosteric inhibitors of mA-RNA methyltransferase, METTL3-14 complex. Drug Dev Res 83:783–799

111. Huang Y, Yan J, Li Q, Li J, Gong S, Zhou H, Gan J, Jiang H, Jia G-F, Luo C, Yang C-G (2015) Meclofenamic acid selectively inhibits FTO demethylation of m6A over ALKBH5. Nucleic Acids Res 43:373–384

112. Huang Y, Su R, Sheng Y, Dong L, Dong Z, Xu H, Ni T, Zhang ZS, Zhang T, Li C, Han L, Zhu Z, Lian F, Wei J, Deng Q, Wang Y, Wunderlich M, Gao Z, Pan G, Zhong D, Zhou H, Zhang N, Gan J, Jiang H, Mulloy JC, Qian Z, Chen J, Yang C-G (2019) Small-Molecule Targeting of Oncogenic FTO Demethylase in Acute Myeloid Leukemia. Cancer Cell 35:677-691.e10

113. Liu Z, Duan Z, Zhang D, Xiao P, Zhang T, Xu H, Wang C-H, Rao G-W, Gan J, Huang Y, Yang C-G, Dong Z (2022) Structure–Activity Relationships and Antileukemia Effects of the Tricyclic Benzoic Acid FTO Inhibitors. J Med Chem 65:10638–10654.

114. Xiao P, Duan Z, Liu Z, Chen L, Zhang D, Liu L, Zhou C, Gan J, Dong Z, Yang C-G (2023) Rational Design of RNA Demethylase FTO Inhibitors with Enhanced Antileukemia Drug-Like Properties. J Med Chem 66:9731–9752

115. Liu L, Qiu Y, Suo Y, Tong S, Wang Y, Zhang X, Chen L, Huang Y, Zhou H, Zhou H, Dong Z, Yang C-G (2024) Discovery of a potent PROTAC degrader for RNA demethylase FTO as antileukemic therapy. Acta Pharm Sin B 14:5382–5392

116. Xie G, Wu X-N, Ling Y, Rui Y, Wu D, Zhou J, Li J, Lin S, Peng Q, Li Z, Wang H, Luo H-B (2022) A novel inhibitor of *N*6-methyladenosine demethylase FTO induces mRNA methylation and shows anti-cancer activities. Acta Pharm Sin B 12:853–866

117. Toh JDW, Sun L, Lau LZM, Tan J, Low JJA, Tang CWQ, Cheong EJY, Tan MJH, Chen Y, Hong W, Gao Y-G, Woon ECY (2014) A strategy based on nucleotide specificity leads to a subfamily-selective and cell-active inhibitor of N6-methyladenosine demethylase FTO. Chem Sci 6:112–122

118. Prakash M, Itoh Y, Fujiwara Y, Takahashi Y, Takada Y, Mellini P, Elboray EE, Terao M, Yamashita Y, Yamamoto C, Yamaguchi T, Kotoku M, Kitao Y, Singh R, Roy R, Obika S, Oba M, Wang DO, Suzuki T (2021) Identification of Potent and Selective Inhibitors of Fat Mass Obesity-Associated Protein Using a Fragment-Merging Approach. J Med Chem 64:15810–15824

119. Su R, Dong L, Li C, Nachtergaele S, Wunderlich M, Qing Y, Deng X, Wang Y, Weng X, Hu C, Yu M, Skibbe J, Dai Q, Zou D, Wu T, Yu K, Weng H, Huang H, Ferchen K, Qin X, Zhang B, Qi J, Sasaki AT, Plas DR, Bradner JE, Wei M, Marcucci G, Jiang X, Mulloy JC, Jin J, He C, Chen J (2018) R-2HG Exhibits Anti-tumor Activity by Targeting FTO/m6A/MYC/CEBPA Signaling. Cell 172:90-105.e23

120. Shen C, Sheng Y, Zhu AC, Robinson S, Jiang X, Dong L, Chen H, Su R, Yin Z, Li W, Deng X, Chen Y, Hu Y-C, Weng H, Huang H, Prince E, Cogle CR, Sun M, Zhang B, Chen C-W, Marcucci G, He C, Qian Z, Chen J (2020) RNA Demethylase ALKBH5 Selectively Promotes Tumorigenesis and Cancer Stem Cell Self-Renewal in Acute Myeloid Leukemia. Cell Stem Cell 27:64-80.e9

121. Wang Y-Z, Li H-Y, Zhang Y, Jiang R-X, Xu J, Gu J, Jiang Z, Jiang Z-Y, You Q-D, Guo X-K (2023) Discovery of Pyrazolo[1,5-a]pyrimidine Derivative as a Novel and Selective ALKBH5 Inhibitor for the Treatment of AML. J Med Chem 66:15944–15959

122. Lai G-Q, Li Y, Zhu H, Zhang T, Gao J, Zhou H, Yang C-G (2024) A covalent compound selectively inhibits RNA demethylase ALKBH5 rather than FTO. RSC Chem Biol 5:335–343

123. Wu H, Lai G-Q, Cheng R, Huang H, Wang J, Liu Z, Gao J, Zhou H, Li C, Yang C-G, Liu H (2025) Discovery of Covalent and Cell-Active ALKBH5 Inhibitors with Potent Antileukemia Effects In Vivo. Angew Chem Int Ed 64:e202424928

124. Hong Y-G, Yang Z, Chen Y, Liu T, Zheng Y, Zhou C, Wu G-C, Chen Y, Xia J, Wen R, Liu W, Zhao Y, Chen J, Gao X, Chen Z (2023) The RNA m6A Reader YTHDF1 Is Required for Acute Myeloid Leukemia Progression. Cancer Res 83:845–860

125. Zálešák F, Nai F, Herok M, Bochenkova E, Bedi RK, Li Y, Errani F, Caflisch A (2024) Structure-Based Design of a Potent and Selective YTHDC1 Ligand. J Med Chem 67:9516–9535

126. Wallis N, Oberman F, Shurrush K, Germain N, Greenwald G, Gershon T, Pearl T, Abis G, Singh V, Singh A, Sharma AK, Barr HM, Ramos A, Spiegelman VS, Yisraeli JK (2022) Small molecule inhibitor of Igf2bp1 represses Kras and a pro-oncogenic phenotype in cancer cells. RNA Biol 19:26–43

127. Singh A, Singh V, Wallis N, Abis G, Oberman F, Wood T, Dhamdhere M, Gershon T, Ramos A, Yisraeli J, Spiegelman VS, Sharma AK (2024) Development of a specific and potent IGF2BP1 inhibitor: A promising therapeutic agent for IGF2BP1-expressing cancers. Eur J Med Chem 263:115940

128. Dahlem C, Abuhaliema A, Kessler SM, Kröhler T, Zoller BGE, Chanda S, Wu Y, Both S, Müller F, Lepikhov K, Kirsch SH, Laggai S, Müller R, Empting M, Kiemer AK (2022) First Small-Molecule Inhibitors Targeting the RNA-Binding Protein IGF2BP2/IMP2 for Cancer Therapy. ACS Chem Biol 17:361–375

129. Feng P, Chen D, Wang X, Li Y, Li Z, Li B, Zhang Y, Li W, Zhang J, Ye J, Zhao B, Li J, Ji C (2022) Inhibition of the m6A reader IGF2BP2 as a strategy against T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 36:2180–2188

130. Weng H, Huang F, Yu Z, Chen Z, Prince E, Kang Y, Zhou K, Li W, Hu J, Fu C, Aziz T, Li H, Li J, Yang Y, Han L, Zhang S, Ma Y, Sun M, Wu H, Zhang Z, Wunderlich M, Robinson S, Braas D, Hoeve J ten, Zhang B, Marcucci G, Mulloy JC, Zhou K, Tao H-F, Deng X, Horne D, Wei M, Huang H, Chen J (2022) The m6A reader IGF2BP2 regulates glutamine metabolism and represents a therapeutic target in acute myeloid leukemia. Cancer Cell 40:1566-1582.e10

131. Harrahill NJ, Hadden MK (2024) Small molecules that regulate the *N*6-methyladenosine RNA modification as potential anti-cancer agents. Eur J Med Chem 274:116526

132. Deng N, Sun Q, Wang S, Jia S, Zheng C, Wang F, Ma S, Zhou H, Liu W (2025) Mechanisms and therapeutic potential of YTHDF readers: linking epitranscriptomics to cancer. J Pharm Anal 101371

133. Zhou F, Chen B (2021) Prognostic significance of ferroptosis-related genes and their methylation in AML. Hematology 26:919–930

134. Šestáková Š, Cerovská E, Šálek C, Kundrát D, Ježíšková I, Folta A, Mayer J, Ráčil Z, Cetkovský P, Remešová H (2022) A validation study of potential prognostic DNA methylation biomarkers in patients with acute myeloid leukemia using a custom DNA methylation sequencing panel. Clin Epigenetics 14:22

135. Cecotka A, Polanska J (2018) Region-Specific Methylation Profiling in Acute Myeloid Leukemia. Interdiscip Sci Comput Life Sci 10:33–42

136. Müller D, Győrffy B (2022) DNA methylation-based diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in colorectal cancer. Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer 1877:188722

137. Fatemi N, Tierling S, Es HA, Varkiani M, Mojarad EN, Aghdaei HA, Walter J, Totonchi M (2022) DNA methylation biomarkers in colorectal cancer: Clinical applications for precision medicine. Int J Cancer 151:2068–2081

138. Romero-Garcia S, Prado-Garcia H, Carlos-Reyes A (2020) Role of DNA Methylation in the Resistance to Therapy in Solid Tumors. Front Oncol 10:1152

139. Gutierrez A, Demond H, Brebi P, Ili CG (2021) Novel Methylation Biomarkers for Colorectal Cancer Prognosis. Biomolecules 11:1722

140. Vietri M, D'elia G, Benincasa G, Ferraro G, Caliendo G, Nicoletti G, Napoli C (2021) DNA methylation and breast cancer: A way forward (Review). Int J Oncol 59:98.

141. Ramazi S, Dadzadi M, Sahafnejad Z, Allahverdi A (2023) Epigenetic regulation in lung cancer. MedComm 4:e401

142. Shekhawat J, Gauba K, Gupta S, Choudhury B, Purohit P, Sharma P, Banerjee M (2021) Ten–eleven translocase: key regulator of the methylation landscape in cancer. J Cancer Res Clin Oncol 147:1869–1879

143. Pan X, Chang Y, Ruan G, Zhou S, Jiang H, Jiang Q, Huang X, Zhao X-S (2024) TET2 mutations contribute to adverse prognosis in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive analysis of 502 AML cases and the Beat AML public database. Clin Exp Med 24:35

144. Rawłuszko-Wieczorek AA, Siera A, Horbacka K, Horst N, Krokowicz P, Jagodziński PP (2015) Clinical significance of DNA methylation mRNA levels of TET family members in colorectal cancer. J Cancer Res Clin Oncol 141:1379–1392

145. Yan X-X, Guo N, Ru S-W, Wang Z-Y, Sui H-J, Xu Y-S, Yao Z-D (2023) The deficiency of 5-methylcytosine (5mC) and its ramification in the occurrence and prognosis of colon cancer. Medicine (Baltimore) 102:e34860

146. Linowiecka K, Guz J, Dziaman T, Urbanowska–Domańska O, Zarakowska E, Szpila A, Szpotan J, Skalska-Bugała A, Mijewski P, Siomek-Górecka A, Różalski R, Gackowski D, Oliński R, Foksiński M (2024) The level of active DNA demethylation compounds in leukocytes and urine samples as potential epigenetic biomarkers in breast cancer patients. Sci Rep 14:6481

147. Salmerón-Bárcenas EG, Zacapala-Gómez AE, Torres-Rojas FI, Antonio-Véjar V, Ávila-López PA, Baños-Hernández CJ, Núñez-Martínez HN, Dircio-Maldonado R, Martínez-Carrillo DN, Ortiz-Ortiz J, Jiménez-Wences H (2024) TET Enzymes and 5hmC Levels in Carcinogenesis and Progression of Breast Cancer: Potential Therapeutic Targets. Int J Mol Sci 25:272

148. Chen H, Chen D, Li Y, Yuan W, Fan J, Zhang Z, Han F, Jiang X, Chen J, Wang D, Cao J, Liu J, Liu W (2021) Epigenetic silencing of TET1 mediated hydroxymethylation of base excision repair pathway during lung carcinogenesis. Environ Pollut 268:115860

149. Alrehaili AA, Gharib AF, Alghamdi SA, Alhazmi A, Al-Shehri SS, Hagag HM, Alsaeedi FA, Alhuthali HM, Raafat N, Etewa RL, Elsawy WH (2023) Evaluation of TET Family Gene Expression and 5-Hydroxymethylcytosine as Potential Epigenetic Markers in Non-small Cell Lung Cancer. In Vivo 37:445–453

150. Jiang D, Guan Y, Ganguly S, Balyimez A, Muskara A, Singh DJ, Pagliuca S, Vail D, Zhang Y, Durkin J, Kawashima N, Gu X, Gurnari C, Maciejewski JP, Mian O, Jha BK (2023) Methyl-CpG Binding Domain Protein MBD2 Is a Targetable Vulnerability in TET2 Mutant Myeloid Neoplasia. Blood 142:2766

151. Niktoreh N, Weber L, Walter C, Karimifard M, Hoffmeister LM, Breiter H, Thivakaran A, Soldierer M, Drexler HG, Schaal H, Sendker S, Reinhardt D, Schneider M, Hanenberg H (2023) Understanding WT1 Alterations and Expression Profiles in Hematological Malignancies. Cancers 15:3491

152. Zhang Y, Yan W-T, Yang Z-Y, Li Y-L, Tan X-N, Jiang J, Zhang Y, Qi X-W (2020) The role of WT1 in breast cancer: clinical implications, biological effects and molecular mechanism. Int J Biol Sci 16:1474–1480

153. Zhang L, Wang S, Wu G-R, Yue H, Dong R, Zhang S, Yu Q, Yang P, Zhao J, Zhang H, Yu J, Yuan X, Xiong W, Yang X, Yong T, Wang C-Y (2023) MBD2 facilitates tumor metastasis by mitigating DDB2 expression. Cell Death Dis 14:1–11

154. Weng H, Huang H, Wu H, Qin X, Zhao BS, Dong L, Shi H, Skibbe J, Shen C, Hu C, Sheng Y, Wang Y, Wunderlich M, Zhang B, Dore LC, Su R, Deng X, Ferchen K, Li C, Sun M, Lu Z, Jiang X, Marcucci G, Mulloy JC, Yang J, Qian Z, Wei M, He C, Chen J (2018) METTL14 Inhibits Hematopoietic Stem/Progenitor Differentiation and Promotes Leukemogenesis via mRNA m6A Modification. Cell Stem Cell 22:191-205.e9

155. Li Z, Weng H, Su R, Weng X, Zuo Z, Li C, Huang H, Nachtergaele S, Dong L, Hu C, Qin X, Tang L, Wang Y, Hong G-M, Huang H, Wang X, Chen P, Gurbuxani S, Arnovitz S, Li Y, Li S, Strong J, Neilly MB, Larson RA, Jiang X, Zhang P, Jin J, He C, Chen J (2017) FTO Plays an Oncogenic Role in Acute Myeloid Leukemia as a N6-Methyladenosine RNA Demethylase. Cancer Cell 31:127–141

156. Zhang L, Mao Z, Yin K, Wang S (2024) Review of METTL3 in colorectal cancer: From mechanisms to the therapeutic potential. Int J Biol Macromol 277:134212

157. Chen X, Xu M, Xu X, Zeng K, Liu X, Pan B, Li C, Sun L, Qin J, Xu T, He B, Pan Y, Sun H, Wang S (2020) METTL14-mediated N6-methyladenosine modification of SOX4 mRNA inhibits tumor metastasis in colorectal cancer. Mol Cancer 19:106

158. Chen L-J, Liu H-Y, Xiao Z-Y, Qiu T, Zhang D, Zhang L-J, Han F-Y, Chen G-J, Xu X-M, Zhu J-H, Ding Y-Q, Wang S-Y, Ye Y-P, Jiao H-L (2023) IGF2BP3 promotes the progression of colorectal cancer and mediates cetuximab resistance by stabilizing EGFR mRNA in an m6A-dependent manner. Cell Death Dis 14:1–13

159. Cai X, Wang X, Cao C, Gao Y, Zhang S, Yang Z, Liu Y, Zhang X, Zhang W, Ye L (2018) HBXIP-elevated methyltransferase METTL3 promotes the progression of breast cancer *via* inhibiting tumor suppressor let-7g. Cancer Lett 415:11–19

160. Gong P-J, Shao Y-C, Yang Y, Song W-J, He X, Zeng Y-F, Huang S-R, Wei L, Zhang J-W (2020) Analysis of N6-Methyladenosine Methyltransferase Reveals METTL14 and ZC3H13 as Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer. Front Oncol 10:578963

161. Niu Y, Lin Z, Wan A, Chen H, Liang H, Sun L, Wang Y, Li X, Xiong X, Wei B, Wu X, Wan G (2019) RNA N6-methyladenosine demethylase FTO promotes breast tumor progression through inhibiting BNIP3. Mol Cancer 18:46

162. Wu Y, Chang N, Zhang Y, Zhang X, Xu L, Che Y, Qiao T, Wu B, Zhou Y, Jiang J, Xiong J, Zhang J, Zhang J (2021) METTL3-mediated m6A mRNA modification of FBXW7 suppresses lung adenocarcinoma. J Exp Clin Cancer Res 40:90

163. Jiang L, Lan L, Qiu Y, Lu W, Wang W, Huang Y (2023) Target genes of N6-methyladenosine regulatory protein ALKBH5 are associated with prognosis of patients with lung adenocarcinoma. J Thorac Dis 15:3228–3236

164. Chao Y, Shang J, Ji W (2020) ALKBH5-m6A-FOXM1 signaling axis promotes proliferation and invasion of lung adenocarcinoma cells under intermittent hypoxia. Biochem Biophys Res Commun 521:499–506

165. Wu H, Xu H, Huang S, Tang Y, Tang J, Zhou H, Xie L, Qiao G (2022) m6A-binding protein IGF2BP1 promotes the malignant phenotypes of lung adenocarcinoma. Front Oncol 12:989817

The role of DNA and RNA methylation in cancer: mechanisms and therapeutic potential of epigenetic and epitranscriptomic drugs

Julia Pisarek[1], Marta Koblowska[1,2,✉]

[1]Faculty of Biology, University of Warsaw
[2]Institute of Biochemistry and Biophysics PAS, Warsaw, Poland

✉corresponding author: mk.koblowsk@uw.edu.pl

Keywords: 5-methylcytosine, N6-methyladenosine, anticancer therapy, epigenetic drugs, epitranscriptomic drugs

Chemical modifications of DNA and RNA play a pivotal role in the regulation of gene expression, enabling precise control of cellular functions and adaptation to changing environmental conditions. The most common modification in human DNA is cytosine methylation at the 5th position (5mC), while in RNA it is adenosine methylation at the N6 position (m6A), recognized as the predominant epitranscriptomic modification. Regulation of these modifications relies on the coordinated action of three groups of proteins: methyltransferases, demethylases, and reader proteins, which recognize modified nucleobases and recruit effector protein complexes, thereby translating the pattern of nucleic acid modifications into a specific biological response. Dysfunction of these protein groups leads to aberrant 5mC and m6A patterns, which play a crucial role in the pathogenesis and progression of many human diseases, including cancer. Deregulation of DNA and RNA methylation affects, among others, the control of genes involved in proliferation, apoptosis, and genome stability, which may promote tumor progression; moreover, the dynamic and reversible nature of these modifications makes them attractive diagnostic and therapeutic targets in cancer treatment.

