

Protutumorski lijekovi - inhibitori histonske deacetilaze kao epigenetički regulatori u procesu razvoja tumora

Colar Zanjko, Laura

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:668382>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

LAURA COLAR ZANJKO
0058213067

**Protutumorski lijekovi - inhibitori histonske deacetilaze
kao epigenetički regulatori u procesu razvoja tumora**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 4

Mentor: prof. dr. sc. Blaženka Kos

ZAGREB, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehnološke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Protutumorski lijekovi - inhibitori histonske deacetilaze kao epigenetički regulatori u procesu razvoja tumora

Laura Colar Zanjko, 0058213067

Sažetak: Epigenetičke modifikacije, uključujući acetilaciju, metilaciju, fosforilaciju i ubikvitinaciju, igraju ključnu ulogu u regulaciji ekspresije gena. Među enzimima uključenim u epigenetičke modifikacije, histonska deacetilaza (HDAC) potiče relaksaciju kromatina te transkripciju gena. Nekoliko HDAC izoenzima je prekomjerno ekspimirano u različitim malignim bolestima i njihova inhibicija je pristup koji se koristi u razvoju novih protutumorskih lijekova. Na temelju toga provode se klinička istraživanja inhibitora HDAC te su do sada četiri lijeka odobrena od FDA (vorinostat, romidepsin, belinostat i panobinostat). Dokazano je da inhibitori HDAC izazivaju pogrešno savijanje i agregaciju proteina, no mehanizmi njihovog djelovanja nisu u potpunosti istraženi. Pretpostavlja se da mijenjaju način acetilacije citoplazmatskih proteina, što pridonosi njihovom protutumorskom potencijalu. Nedavna istraživanja su dokazala da su sustavi kontrole kvalitete proteina uključeni u prepoznavanje modificiranog načina acetilacije nakon liječenja s inhibitorima HDAC.

Ključne riječi : acetilacija, epigenetički regulatori, inhibitori histonske deacetilaze, protutumorsko djelovanje

Rad sadrži : 25 stranica, 3 slike, 2 tablice, 76 literaturna navoda

Jezik izvornika : hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor : prof. dr. sc. Blaženka Kos

Datum obrane: 16. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Antitumor drugs - histone deacetylase inhibitors as epigenetic regulators in the process of tumor development

Laura Colar Zanjko, 0058213067

Abstract : Epigenetic modifications, including acetylation, methylation, phosphorylation, and ubiquitination, play a key role in regulating gene expression. Among the enzymes involved in epigenetic modifications, histone deacetylase (HDAC) promotes chromatin relaxation and gene transcription. Several HDAC isoenzymes are overexpressed in various malignancies and their inhibition is an approach used in the development of new antitumor drugs. Based on this, clinical trials of HDAC inhibitors are being conducted and so far four drugs have been approved by the FDA (vorinostat, romidepsin, belinostat and panobinostat). HDAC inhibitors have been shown to cause protein misfolding and aggregation, but their mechanisms of action have not been fully investigated. They are thought to alter the way acetylation of cytoplasmic proteins occurs, contributing to their antitumor potential. Recent research has shown that protein quality control systems are involved in recognizing a modified mode of acetylation after treatment with HDAC inhibitors.

Keywords: acetylation, antitumor activity, epigenetic regulators, histone deacetylase inhibitors

Thesis contains: 25 pages, 3 figures, 2 tables, 76 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Blaženka Kos, Full professor having a tenure

Defence date: 16th September 2021

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Uloga enzima histonske deacetilaze u humanim stanicama	2
2.1. Acetilacija histona	3
2.2. Značaj telomera u razvoju tumora	4
2.3. Klasifikacija i karakterizacija histonskih deacetilaza (HDAC)	5
2.4. Uloga HDAC u epigenetici i stanicama tumora	6
3. Inhibitori histonske deacetilaze - epigenetički regulatori u procesu razvoja tumora	8
4. Mehanizam djelovanja biofarmaceutika - inhibitora histonske deacetilaze	11
4.1. Molekularni pratitelji	11
4.2. Autofagija	12
4.3. Sustav ubikvitin proteasoma	15
4.4. Apoptoza	16
4.5. Angiogeneza	16
4.6. Inhibitori histonske deacetilaze u kombinaciji s drugim lijekovima	17
4.6.1. Bromodomenski inhibitori	17
4.6.2. Proteasomski inhibitori	17
4.6.3. Modulatori autofagije	18
4.6.4. HSP90 inhibitori	18
4.7. Precizna medicina tretmanom inhibitorima histonske deacetilaze	19
5. Zaključak	20
6. Popis literature	21

1. Uvod

HDAC inhibitori izazivaju zaustavljanje staničnog ciklusa, diferencijaciju i smrt stanice raka te smanjuju angiogenezu i druge stanične događaje (Glozak and Seto, 2007; Dawson and Kouzarides, 2012). Li i sur. (2020) opisuju strukture histon deacetilaza i njihove temeljne biološke funkcije, biološke mehanizme histon deacetilaza te potencijalne inhibitore histon deacetilaza kao novih preciznih terapijskih pripravaka za liječenje tumora.

Perla i sur. (2020) su ustanovili da inhibitori HDAC pokazuju antitumorsko djelovanje u eksperimentalnim modelima specifičnih tipova dječjih moždanih tumora kao nove kliničke perspektive u upotrebi inhibitora HDAC za liječenje tih tumora. Na napredak kolorektalnog karcinoma utječu ujedno genetičke i epigenetičke regulacije. Yeh i sur. (2020) su koristili podatke iz baze podataka za procjenu protein-protein interakcija te gena koji kodiraju za molekule uključene u regulacijske mreže s ciljem konstrukcije lijekova koji će sadržavati više molekula za terapiju sprječavanja napretka razvoja kolorektalnog karcinoma. Freitas i sur. (2021) su istraživali ulogu inhibitora HDAC u terapiji raka grlića maternice izazvanog HPV-om, glavnim rizičnim faktorom ove vrste raka. Yeon i sur. (2020) opisali su ulogu inhibitora HDAC, samih ili u kombinaciji s drugim lijekovima u svladavanju rezistencije kod metastatskog melanoma. Hontecillas-Prieto i sur. (2020) opisuju mogućnosti i specifične učinke samostalne terapije upotrebom inhibitora HDAC, koji nisu uočeni u kombinacijskim terapijama tumora u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima.

Na temelju signalnih puteva stanične MAP (mitogen aktivirane protein)-kinaze, koji su povezani s rakom prostate, Corno i sur. (2020) potvrdili su učinkovitost lijekova HDAC6 inhibitora i MEK (MAP kinaza/ekstracelularna signal-regulirajuća kinaza) inhibitora u modelima raka prostate. Uzeli su u obzir da inhibitori HDAC mogu reaktivirati ekspresiju gena koji favoriziraju stanični odaziv na lijekove. Hu i sur. (2020) proučavali su mogući signalni put i molekularni mehanizam prema kojem su HDAC 1 i 3 epigenetički potisnuli ekspresiju specifičnog transkripcijskog faktora tijekom epitelno-mezenhinskog prijelaza (pretvorba epitelnih stanica u mezenhimske stanice) kod raka jetre. Chen i sur. (2020) opisali su *in vitro* i *in vivo* antitumorsko djelovanje 2-O-metilmagnolola na hepatocelularni karcinom, koje je povezano s inhibicijom HDAC.

Stoga je cilj ovog završnog rada dati pregled istraživanja epigenetičkih terapija upotrebom inhibitora HDAC za različite vrste tumora.

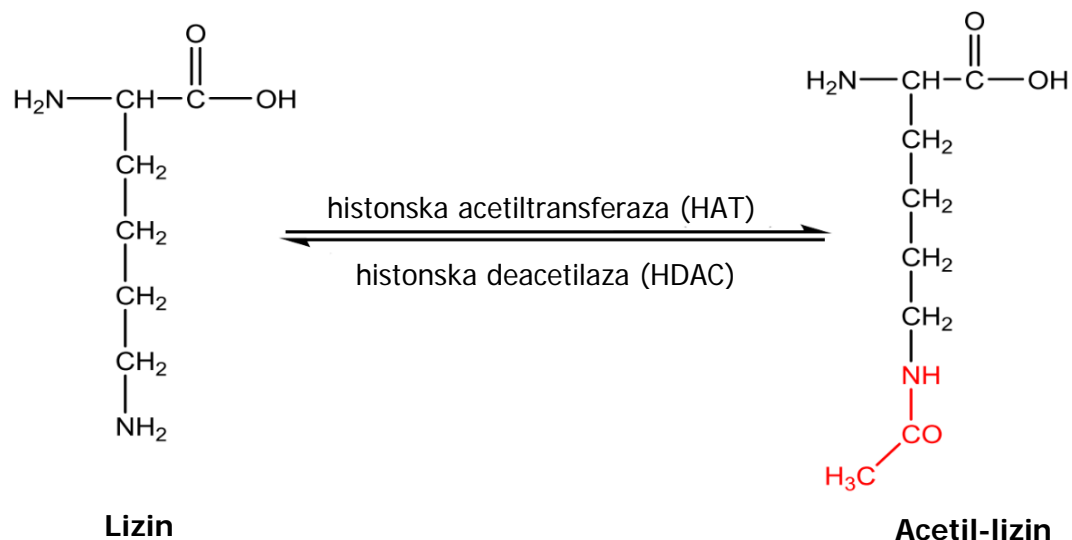
2. Uloga enzima histonske deacetilaze u humanim stanicama

Vincent Allfrey i suradnici su 1964. otkrili acetilaciju lizinskih ostataka histona te pretpostavili da bi mogla igrati ulogu u ekspresiji gena djelovanjem na metabolizam RNA u jezgri i transkripciju gena. Navedeno istraživanje je potaknulo buduća istraživanja koja su dovela do sadašnjih spoznaja o acetilaciji proteina. Danas je acetilacija lizina na ϵ -amino grupi dokazano jedna od najčešćih posttranslacijskih modifikacija u eukariotskim stanicama. Acetiliranjem dolazi do neutralizacije pozitivnih naboja na ostacima lizina pa acetilirani proteini mogu stupiti u kontakt s različitim molekulama i poprimati različite strukture nabora (Kulka i sur., 2020).

Acetilacija proteina standardni je primjer reverzibilne posttranslacijske modifikacije, koja se prilagođava potrebama stanice i okolišnim promjenama. Reverzibilna acetilacija lizina igra ključnu ulogu u mnogim biološkim procesima uključujući ekspresiju gena, promjenu strukture kromatina, kontrolu staničnog ciklusa, signalizaciju u stanici i kontrolu kvalitete proteina. Enzimi koji kataliziraju acetilaciju ostataka lizina te ostavljaju takozvane acetilacijske oznake su histonske acetiltransferaze (HAT), a enzimi koji kataliziraju reverzibilnu reakciju i uklanjaju acetilacijske oznake su histonske deacetilaze (HDAC). Na slici 1 je prikazana acetilacija i reverzibilna reakcija acetilacije lizina (Singh i sur., 2018).

Naziv HDAC upućuje na činjenicu da su mnogi ostaci lizina u histonima acetilirani, što donekle objašnjava epigenetički aspekt HDAC –i time inhibitora HDAC (HADCi). No dokazano je kako tisuću drugih proteina u citoplazmi i jezgri mogu biti acetilirani i deacetilirani. Posljedično, većina HDAC inhibitora djeluju na proteine u citoplazmi i jezgri, što podrazumijeva da inhibitori HDAC ne djeluju samo na histone, nego i na druge proteine ovisno o specifičnosti djelovanja njihovog razreda (Kulka i sur., 2020).

Postoje regulatorni proteini, koji posjeduju specifičnu domenu koja prepoznaje acetilirani lizin nazvanu bromodomena. Bromodomena sadrži oko 110 aminokiselina formiranih u klupko od četiri uzvojnice s peptidnom vezom na jednom kraju (Bumba, 2019). Proteini s bromodomenom djeluju kao „čitači“ te prepoznaju oznake acetilacije. Oni prenose signale acetilacije nizvodnim signalnim kaskadama rezultirajući daljnjim modifikacijama histona ili promjenama strukture kromatina te krajnje oblikuju stanicu u različite fenotipove (Kulka i sur., 2020).



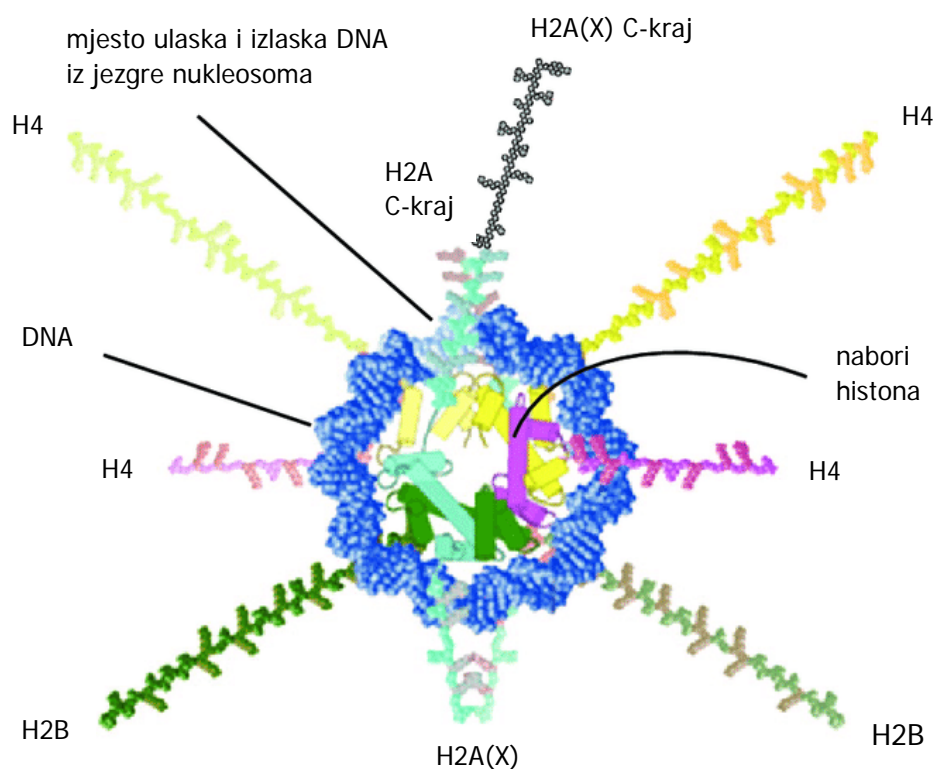
Slika 1. Acetilacija histona na N-terminalnom kraju lizina, ovisna o Acetil-CoA, pomoću histon acetiltransferaze (HAT) i reverzibilna reakcija pomoću histon deacetilaze (HDAC) (Singh i sur., 2018)

2.1. Acetilacija histona

Histoni su proteini, koji organiziraju DNA, tj. kromatin u kompaktnu formu zvanu nukleosom te čine proteinski kostur kromatina. Jačina veze između jedinica histona i DNA može se odrediti acetilacijom lizinskih ostataka histona. Acetilacija određenih lizinskih ostataka histona (H2A, H2AX, H2B, H3, H4) ima svoju funkciju (Kulka i sur., 2020). Na slici 2 je prikazana struktura nukleosoma (Kinner i sur., 2008).

Acetilacija histona utječe na transkripciju različitim mehanizmima. Acetilacijom se neutralizira pozitivni naboj lizinskih ostataka unutar histonskih repova, čime se opušta struktura kromatina. Uzrok tome je gubitak afiniteta histona prema negativno nabijenim fosfatnim skupinama DNA pa veza između DNA i histona slabi. Dovoljan broj acetiliranih ostataka stvara otvoreni oblik nukleosoma, koji omogućava transkripciju gena pomoću RNA polimeraze. Acetilirani histoni također služe kao mjesta vezanja aktivatora transkripcije poput prije spomenutih proteina s bromodomenom, koji očitavaju acetilacijsku oznaku na ostacima lizina unutar histona. Općenito se acetilacija histona povezuje s aktivacijom transkripcije. S druge strane se deacetilacija histona povezuje s represijom transkripcije. Deacetilacijom lizinski ostatci opet poprimaju pozitivan naboj pa se afinitet negativno nabijenih fosfatnih skupina DNA kostura prema amino krajevima histona povećava te dolazi do zbijanja kromatina (Haberland i sur., 2009).

Ostale funkcije acetilacije lizina su popravak DNA (H2AX na Lys5 i Lys36, H2A na Lys5, H3 na Lys9, 14, 18, 23, 27, 36, 56 i H4 na Lys5, 8, 12, 16, 91), taloženje histona (H3 na Lys9,14 i H4 on Lys5, 12), transkripcijska elongacija (H3 na Lys14 i H4 na Lys8), sklapanje kromatina (H3 na Lys56), utišavanje telomera (H4 na Lys12), dekondenzacija kromatina (H4 na Lys16) i replikacija DNA (H4 na Lys91). Acetilacija H2A i H2B većim dijelom sudjeluje u aktivaciji transkripcije dok acetilacija na H2AX, H3 i H4 ostatcima lizina može imati različite učinke. Zaključno, deacetilacija histona s inhibitorom HDAC je nužna za promjenu strukture kromatina, mnoge „downstream“ procese i regulatorne puteve (Kulka i sur., 2020).



Slika 2. Model čestice jezgre nukleosoma prikazuje interakcije DNA s histonima jezgre (Kinner i sur., 2008)

2.2. Značaj telomera u razvoju tumora

Telomere su nukleotidne i proteinske strukture na krajevima kromosoma eukariota. Značajne su u zaštiti linearne DNA od degradacije. Važnu ulogu u tome igra struktura kromatina. Dokazano je da su specifične posttranslacijske modifikacije histona poput metilacije, acetilacije i ubikvitinacije potrebne za održavanje okoliša kromatina, koji osigurava očuvanje telomera. Nepravilna regulacija telomera može rezultirati u genetičkoj nestabilnosti

te uzrokuje povećane stope starenja stanica i mnoge bolesti poput tumora (Jezek i Green, 2019).

Razvoj tumora rezultat je nakupljanja genetičkih mutacija u stanici. Vrste organizama dužeg životnog tijeka i veće veličine imaju veći rizik razvoja tumora zbog većeg broja staničnih dijeljenja i veće izloženosti mutagenima. Unatoč tome samo 25% starijih ljudi umire od tumora dok taj broj iznosi 90% kod starih miševa. Taj fenomen se objašnjava razvojem mehanizama protiv nastanka tumora u ljudi. Represija telomeraze zajedno s kraćim telomerama kroz dugi evolucijski period omogućila je sprječavanje nekontrolirane proliferacije, tj. povećanja broja stanica (Yuan i sur., 2019).

Telomere su zajedno s centromerama sastavnice kromosoma od izuzetne važnosti za preživljavanje i očuvanje stanica. Osim spomenutih mehanizama očuvanja, telomere su regulirane na mnogim razinama pomoću izrazito složenih epigenetičkih sustava. Uzrok tome je kombinacija epigenetičkih svojstava eukromatina i heterokromatina, što ih čini specifičnim regijama različitim od ostatka kromatina. Također su važne okolne regije subtelomera i pericentromera za sustave regulacije telomera i centromera. Poremećaji u njihovoj regulaciji dovode do nestabilnosti cjelokupnog genoma, što dovodi do starenja stanica te razvoja različitih bolesti. Provedena su brojna istraživanja sustava regulacije telomera i centromera, ali nisu postignuti jednoznačni rezultati pa su potrebna daljnja istraživanja za pravilno i potpuno razumijevanje tih mehanizama te njihovu moguću primjenu u prevenciji i liječenju tumora (Achrem i sur., 2020).

2.3. Klasifikacija i karakterizacija histonskih deacetilaza (HDAC)

HDAC su enzimi, koji kataliziraju reakciju deacetilacije histona. One uklanjaju acetilne funkcijske skupine s ϵ -amino kraja lizinskih ostataka unutar histona. Osim regulacije razine acetilacije histona u kromatinu, mogu katalizirati deacetilaciju različitih nehistskih supstrata poput proteina uključenih u angiogenezu, apoptozu, razvoj tumora i kontrolu staničnog ciklusa (New i sur., 2012). Na temelju toga HDAC reguliraju ekspresiju tumor-supresorskih gena te su značajne u mnogim ljudskim bolestima, što ih čini obećavajućima za ciljano liječenje tumora (Mottamal i sur., 2015).

Identificirano je 18 humanih HDAC te su opisane i klasificirane u dvije porodice i četiri razreda na temelju homologije s deacetilazama kvasca, veličine i lokalizacije u stanici. Prva porodica za deacetilaznu aktivnost zahtijeva cinkov ion (Zn^{2+}) kao kofaktor te uključuje HDAC 1-11 (Losson i sur., 2016).

Razredu I pripadaju HDAC1, 2, 3 i 8 te su homolozi RPD3 proteina kvasca. Locirani su u jezgri i sudjeluju u preživljavanju i proliferaciji stanice. Razred II se dijeli na dva razreda te ga čine homolozi histon deacetilaze 1 (HDAC1) kvasca. Igraju ulogu specifičnu s obzirom na tkivo i mogu se nalaziti u jezgri i/ili citoplazmi. HDAC4, 5, 7 i 9 pripadaju razredu IIa i posjeduju jednu katalitičku domenu dok proteini razreda IIb (HDAC6 i 10) posjeduju dvije katalitičke domene te se mogu pronaći isključivo u citoplazmi (Seto i Yoshida, 2014). Razred IV čini samo jedan protein, HDAC11. Regije u katalitičkom centru slične su razredima I i II te se stoga također svrstava u Zn^{2+} ovisne HDAC. Djeluje kao imunomodulator te utječe na replikaciju DNA (Mottamal i sur., 2015).

Druga porodica zahtijeva NAD^+ kao kofaktor te ju čine sirtuini (SIRT) 1-7 povezani s regulatorom-2 tih informacija deacetilaze kvasca (Sir2). Nalaze se u jezgri, citoplazmi i mitohondrijima te vrše razne funkcije od regulacije metabolizma do preživljavanja i starenja stanica te apoptoze (Losson i sur., 2016). Klasifikacija HDAC i detaljan opis njihovih funkcija prikazani su u tablici 1 (Mottamal i sur., 2015).

Brojčanost i enzimaska aktivnost HDAC u stanicama se regulira na različitim razinama gotovo isključivo protein-protein interakcijama. Mnoge HDAC su regulirane posttranslacijskim modifikacijama i podstaničnom lokalizacijom. Slabije je istražena regulacija proteolitičkim procesiranjem, dostupnošću kofaktora i kontrolom ekspresije gena. Potpuno razumijevanje tih mehanizama regulacije će pridonijeti znanju o strukturi kromatina i kontroli gena te će pridonijeti razvoju terapijskih HDAC inhibitora poboljšane specifičnosti (Sengupta i Seto, 2004).

2.4. Uloga HDAC u epigenetici i stanicama tumora

Nedavna istraživanja ukazuju da stanice raka imaju povećane koncentracije HDAC. Prema kliničkim i pretkliničkim istraživanjima, HDAC razreda I stimuliraju proliferaciju stanica i njihovo preživljavanje. Pokazalo se da je HDAC1 prekomjerno eksprimirana u raku prostate, želuca, debelog crijeva i dojke. HDAC2 je odgovorna za gubitak ekspresije APC (adenomatozna polipoza koli) u kolorektalnom karcinomu (CRC). Također pokazuje povećanu ekspresiju kod raka želuca i raka vrata grlića maternice. HDAC3 i HDAC6 također pokazuju povećanu koncentraciju u stanicama karcinoma kolona i dojke. Jedan od problema kod tumora je heterogenost uzrokovana različitim epigenetičkim uzorcima, mutacijama ili kombinacijom oboje. Genetička varijabilnost je ponekad prisutna u stanicama sličnih fenotipova. Također je prisutna u stanicama, koje potječu od jedne tumorske populacije, ali imaju različite fenotipove. Ta zapažanja podupiru hipotezu da epigenetika igra važnu ulogu u razvoju raka. Epigenetičkim promjenama se onkogeni mogu aktivirati, a tumor-supresorski geni potisnuti bez utjecaja na

genotip. Pretpostavlja se da molekularni pratitelji poput proteina toplinskog šoka djeluju kao regulatori međusobnog djelovanja genotipa i fenotipa te pružaju evolucijski pufer za zaštitu stanica od malignih transformacija (Kulka i sur., 2020).

Tablica 1. Klasifikacija histonskih deacetilaza (HDAC) (Mottamal i sur., 2015)

Razred	Članovi	Lokalizacija u stanici	Fiziološka funkcija
Ovisni o Zn²⁺			
I	HDAC1	jezgra	preživljavanje i proliferacija stanica
	HDAC2	jezgra	proliferacija stanica, rezistencija na inzulin
	HDAC3	jezgra	preživljavanje i proliferacija stanica
	HDAC8	jezgra	proliferacija stanica
IIA	HDAC4	jezgra/citoplazma	regulacija skeletogeneze i glukoneogeneze
	HDAC5	jezgra/citoplazma	kardiovaskularni rast i funkcija, glukoneogeneza, srčani miociti i funkcija endotelnih stanica
	HDAC7	jezgra/citoplazma	diferencijacija timocita, endotelna funkcija, glukogeneza
	HDAC9	jezgra/citoplazma	homologna rekombinacija, diferencijacija timocita, kardiovaskularni rast i funkcija
IIB	HDAC6	citoplazma	stanična pokretljivost, kontrola dinamike citoskeleta
	HDAC10	citoplazma	homologna rekombinacija, preživljavanje stanica posredovano autofagijom
IV	HDAC11	jezgra	imunomodulatori i replikacija DNA
Ovisni o NAD⁺			
III	SIRT1	jezgra, citoplazma	starenje, redoks regulacija, preživljavanje stanica, regulacija autoimunog sustava
	SIRT2	jezgra	preživljavanje stanica-kretanje i invazija stanica
	SIRT3	mitohondriji	ciklus uree, redoks ravnoteža, regulacija ATP -a, metabolizam, apoptoza i signalizacija stanica
	SIRT4	mitohondriji	regulacija ATP-a, metabolizam, apoptoza i signalizacija stanica
	SIRT5	mitohondriji	ciklus uree, metabolizam energije, regulacija ATP -a, metabolizam, apoptoza i signalizacija stanica
	SIRT6	jezgra	regulacija metabolizma
	SIRT7	jezgra	apoptoza

3. Inhibitori histonske deacetilaze - epigenetički regulatori u procesu razvoja tumora

Inhibitori HDAC su enzimi, koji inhibiraju reakciju deacetilacije histona i drugih proteina. Posjeduju protutumorsko djelovanje s relativno slabim učinkom na normalno tkivo. Djeluju putem različitih mehanizama te su provedena i trenutno se provode brojna pretklinička i klinička istraživanja HDAC inhibitora u cilju njihovog odobrenja za liječenje određenih vrsta karcinoma (Stimson i sur., 2009). Inhibitori HDAC imaju snažan učinak na strukturu kromatina i time na aktivnost transkripcije regije kromatina pogođenog gena. Inhibitori HDAC mogu se smatrati potvrđenim epigenetičkim modulatorima jer utječu na očitavanje gena bez promjene sekvencije DNA (Olzscha i sur., 2015).

Prvi otkriveni inhibitor HDAC je prirodni antifungalni antibiotik trihostatin A. Njegov strukturni analog, Vorinostat (Zolinza®), odobren je u listopadu 2006. za liječenje uznapredovalog primarnog kožnog limfoma T-stanica kao prvi FDA odobren inhibitor HDAC. Romidepsin (Istodax®) je također odobren za njegovo liječenje u 2009. te u 2011. za liječenje perifernog limfoma T-stanica. Belinostat (Beleodaq®) je odobren od FDA u 2014. za liječenje perifernog limfoma T-stanica. Panobinostat (Farydak®) odobren je 2015. za liječenje multipli mijeloma (Kulka i sur., 2020).

HDAC inhibitori se mogu klasificirati na temelju kemijske strukture i specifičnosti za različite razrede HDAC. Također se u novije vrijeme koriste kvantitativna masena spektrometrija i hvatanje afiniteta za identifikaciju ciljanih HDAC kompleksa, kao i izoliranih HDAC. Prema supstratu se dijele na razredno selektivne inhibitore HDAC i pan-inhibitore HDAC, koji inhibiraju više od jednog razreda HDAC te većina HDAC inhibitora pripada toj skupini (New i sur. 2012). Prema kemijskoj strukturi razlikujemo šest razreda HDAC inhibitora: karboksilati male molekulske mase, hidroksamske kiseline, benzamidi, epoksiketoni, ciklički peptidi i hibridne molekule. Većinom djeluju na HDAC razreda I, II i IV vezanjem katalitičke domene s Zn^{2+} (Drummond i sur., 2005). U tablici 2 je prikazana podjela inhibitora HDAC s obzirom na strukturu, supstrat i vrstu tumora na koju djeluju (Singh i sur., 2018).

Tablica 2. Klasifikacija inhibitora histonske deacetilaze (HDACi) (Singh i sur., 2018)

Kemijski razred	HDACi	HDACi supstrat	Specifičnost tumora	Faza kliničkog ispitivanja
hidroksamske kiseline	vorinostat	razred I, II i IV	kožni limfom T-stanica	odobren 2006.
	belinostat	razred I, II i IV	periferni limfom T-stanica	odobren 2014.
	panobinostat	razred I, II i IV	multipli mijelom	odobren 2015.
	resminostat	razred I i II	kolorektalni i hepatocelularni karcinom, Hodgkinov limfom	faza II
	givinostat	razred I i II	kronična limfocitna leukemija, Hodgkinov limfom, multipli mijelom	faza II
	pracinostat	razred I, II i IV	akutna mijelogena leukemija	faza II
	abeksinostat	razred I i II	kolorektalni i hepatocelularni karcinom, ne-Hodgkinov limfom, čvrsti tumori	faza I
	kvisinostat	razred I i II	čvrsti tumori, kožni limfom T-stanica	faza I i II
	MPTOE028	HDAC1, 2 i 6	čvrsti tumori, limfom B-stanica	faza I
	CHR3996	razred I	čvrsti tumori	faza I
	CUDC101	razred I i II	čvrsti tumori	faza I
	CUDC907	razred I i II	multipli mijelom, limfom, čvrsti tumori	faza I
benzamidi	entinostat	razred I	čvrsti tumori	faza I i II
	kidamid	HDAC1, 2, 3 i 10	rak dojke	faza II i III

	rikolinostat	HDAC6	multipli mijelom, limfom	faza I i II
	tacedinalin	razred I	rak pluća i gušterače, multipli mijelom	faza II
	mocetinostat	razred I i IV	čvrsti tumori	faza II
ciklički peptidi	romidepsin	razred I	kožni i periferni limfom T-stanica	odobren 2009. i 2011.
masne kiseline	valproinska kiselina	razred I i II	čvrsti i hematološki tumori	faza II
	AR-42	razred I i IIb	akutna mijelogeni leukemija	faza II
	fenil butirat	razred I i II	čvrsti i hematološki tumori	faza II
	pivaneks	razred I i II	rak pluća nemalih stanica, mijelom i kronična limfocitna leukemija	faza II

Kulka i sur. (2020) dali su pregled učinaka inhibitora HDAC na sustave kontrole kakvoće proteina u organizmu i utjecaja na neke stanične događaje vezane uz maligne bolesti. Chen i sur. (2020) opisuju potencijalne terapijske učinke inhibitora HDAC na T-stanice i B-stanice limfoma primjenom različitih terapijskih pristupa. Peters i sur. (2020) su potvrdili sinergizam odobrenog sastojka inhibitora HDAC te lijekova koji blokiraju sintezu DNA i induciraju lomove lanaca DNA. Ta kombinacija je povećala protutumorsko djelovanje na stanične linije limfoma. Iannelli i sur. (2020) ocijenili su protutumorsko djelovanje kombinacije inhibitora HDAC i standardnih lijekova za kemoterapiju.

Protutumorsko djelovanje pokazano je također u *in vivo* modelima karcinoma pločastih stanica glave i vrata. Xu i sur. (2020) potvrdili su da novi inhibitor HDAC - hibrid poboljšava protutumorsko djelovanje proučavanjem *in vivo* i *in vitro* testova za potencijalnu terapiju raka dojke. Mamdani i Jalal (2020) su proučavali dostupne pretkliničke i kliničke dokaze za upotrebu inhibitora HDAC u terapiji karcinoma pluća ne-malih stanica (nemikrocelularni) i učinkovitost inhibitora HDAC u kombinaciji s terapijom karcinoma pluća ne-malih stanica usmjerenom na inhibitore imunološke kontrolne točke i inhibitore tirozin kinaze. Primjenom nanomedicine

postiže se poboljšanje učinkovitosti terapije inhibitorima HDAC zahvaljujući mjesno-specifičnom otpuštanju lijeka (Tu i sur. 2020).

4. Mehanizam djelovanja biofarmaceutika - inhibitora histonske deacetilaze

Inhibitori HDAC induciraju zaustavljanje staničnog ciklusa, diferencijaciju stanica i apoptozu te inhibiraju angiogenezu. Mehanizam protutumorskog učinka ovisi o vrsti tumora, stadiju tumora, dozi lijeka te o oboljelom pojedincu (Singh i sur., 2018). Inhibitori HDAC utječu na stanični sustav kontrole kvalitete proteina, koji obuhvaća molekularne pratitelje, autofagiju i sustav ubikvitin proteasoma (Kulka i sur., 2020).

4.1. Molekularni pratitelji

Molekularni pratitelji također poznati kao „chaperone“ proteini pomažu u pravilnom savijanju proteina te sprječavaju agregaciju sintetiziranih polipeptidnih lanaca u nefunkcionalne strukture. Zbog toga su većina njih proteini toplinskog šoka. Savijanje proteina je regulirano posttranslacijskim modifikacijama te one također reguliraju molekularne pratitelje. Klasificiraju se prema homologiji sekvenci prema specifičnim proteinima toplinskog šoka i njihovoj molekularnoj masi: porodica HSP100/Clp, porodica HSP90, porodica HSP70, porodica HSP60/GroEL i mali proteini toplinskog šoka (sHSP) (Jeng i sur., 2015).

HSP90 utječe na mnoge stanične procese te igra ključnu ulogu u nastanku tumora. Potvrđeno je različitim istraživanjima da je tijekom stresnih uvjeta, koji su posebno izraženi u stanicama tumora, razina HSP90 u stanicama visoka. Povišena razina HSP90 pronađena je u stanicama melanoma, raka dojke i jajnika, karcinoma želuca, gušterače i endometrija. HSP90 također može uzrokovati metaboličke promjene u stanicama tumora i utjecati na transkripciju specifičnih onkogenih gena. Na sebe veže kromatin ili regulira faktore transkripcije tih gena poput NF- κ B, STAT, p53 i Bcl-6 (Khurana i Bhattacharyya, 2015). Smanjenje aktivnosti HSP90 se može inducirati inaktivacijom HDAC6, čiji je supstrat HSP90, što je postignuto terapijom panobinostatom protiv multiplog mijeloma (Kovacs i sur., 2005). HSP90 je zajedno s p300 ključan supstrat u sustavu kontrole kvalitete proteina (Cosenza i Pozzi, 2018). Oba sudjeluju u tumorigenezi, što ukazuje na važnost razvoja HDAC6 specifičnih inhibitora. Tubastatin A je primjer standardnog HDAC6 inhibitora (Wang i sur., 2016), ali je 2018. objavljen specifičniji HDAC6 inhibitor pod imenom marbostat-100, čija K_i vrijednost iznosi 0,7, što je deset puta manje nego K_i vrijednost tubastatina A. Marbostat-100 dovodi do hiperacetilacije supstrata HDAC6, α -tubulina. Specifičnost se procijenila na temelju usporedbe povećanja koncentracije acetiliranog H3 histona s HDAC1 i HDAC3 specifičnim inhibitorom entinostatom. To povećanje

koncentracije se također uočava kod panobinostata. Marbostat-100 je znatno specifičniji od panobinostata jer je uspješniji u hiperacetilaciji α -tubulina. TubastatinA također dovodi do hiperacetilacije α -tubulina, ali aktivira transkripcijski faktor toplinskog šoka, što dovodi do induciranja ekspresije HSP70 i HSP25 te povećanog preživljavanja stanica (Kulka i sur., 2020).

HSP70 pomaže u savijanju te ponovnom savijanju proteina i savijanju već agregiranih proteina. Dokazano je da je promotor HSP70 hipermetiliran u stanicama tumora te se ekspresija HSP70 poboljšava metilacijom histona. U primjeru stanične linije tumora humanih pločastih stanica je metilacija histona H3 na lizinskim ostatcima Lys4 i Lys9 pojačala ekspresiju HSP70 (Ban i sur., 2019). Romidepsin stabilizira acetilaciju HSP70, što vodi do pojačanog vezanja onkogenih proteina (Cloutier i Coulombe, 2013). HSP70 također prepoznaje proteine s motivima nalik na KFERQ te može inducirati autofagiju posredovanu molekularnim pratiteljima (CAM). Posljedično tome postoje inhibitori, koji djeluju ujedno na molekularne pratitelje te autofagiju poput trihostatina A i natrij butirata, koji mogu utjecati na strukturu kromatina na lokaciji, gdje se nalazi HSP70 (Chen i sur., 2002). Inhibitor HDAC AR42 (OSU-HDAC42) u kombinaciji s inhibitorom kinaze pazopanibom u stanicama melanoma inhibira aktivnost ATPaze molekularnih pratitelja HSP90 i HSP70 (Booth i sur., 2017).

4.2. Autofagija

Autofagija je važan fiziološki proces odumiranja stanice te je dio staničnog sustava kontrole kvalitete proteina. Karakterizirana je masovnom razgradnjom staničnih sastavnica, uključujući organele poput mitohondrija, te nepravilno savijenih i agregiranih proteina u stresnim uvjetima. Ako je količina nepravilno savijenih proteina prevelika te ju sustav ubikvitin proteasoma ili molekularni pratitelji ne mogu podnijeti, oni će biti razgrađeni autofagijom. Autofagija je uočena kod mnogih neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove bolesti (AD) ili amiotrofične lateralne skleroze (ALS). Autofagija je također povezana s apoptozom te su mnogi proteini uključeni u oba procesa regulirani zajedno. Oba procesa igraju ulogu u tumorigenezi te je pronađeno da je autofagija inhibirana u malignim tumorima (Shao i sur., 2004).

Liječenje stanice karcinoma kolona HCT116 s vorinostatom rezultira autofagijom te starenjem fenotipa stanice (Zhang i sur., 2015). Romidepsin inducira autofagiju u HeLa stanicama (Oh i sur., 2008) te na njih također djeluju vorinostat i butirata. U slučaju povećane ekspresije Bcl-XL ili „knockout“-a gena (delecija ili mutacija, koja dovodi do inaktivacije gena) Apaf-1 u HeLa stanicama vorinostat ili butirata će inducirati autofagiju formirajući autofagosom unutar citoplazme (Shao i sur., 2004).

Razlikujemo tri vrste autofagije: makroautofagija, mikroautofagija i autofagija posredovana molekularnim pratiteljima (CAM). Makroautofagija uključuje izgradnju autofagosoma, okrugle strukture dvostrukih membrana, koji okružuje protein i „proguta“ ga. Autofagosom se približava lizosomu te se fuzioniraju u autolizosom u kojem se proteini hidroliziraju lizosomalnim hidrolazama u kiseloj sredini (Feng i sur., 2014). Mikroautofagija se odvija sličnim procesom, ali ne dolazi do formiranja autofagosoma, nego se proteini okružuju strukturama lizosoma i hidroliziraju lizosomalnim hidrolazama (Li i sur., 2012). Na slici 3 su prikazana oba procesa (Feng i sur., 2014).

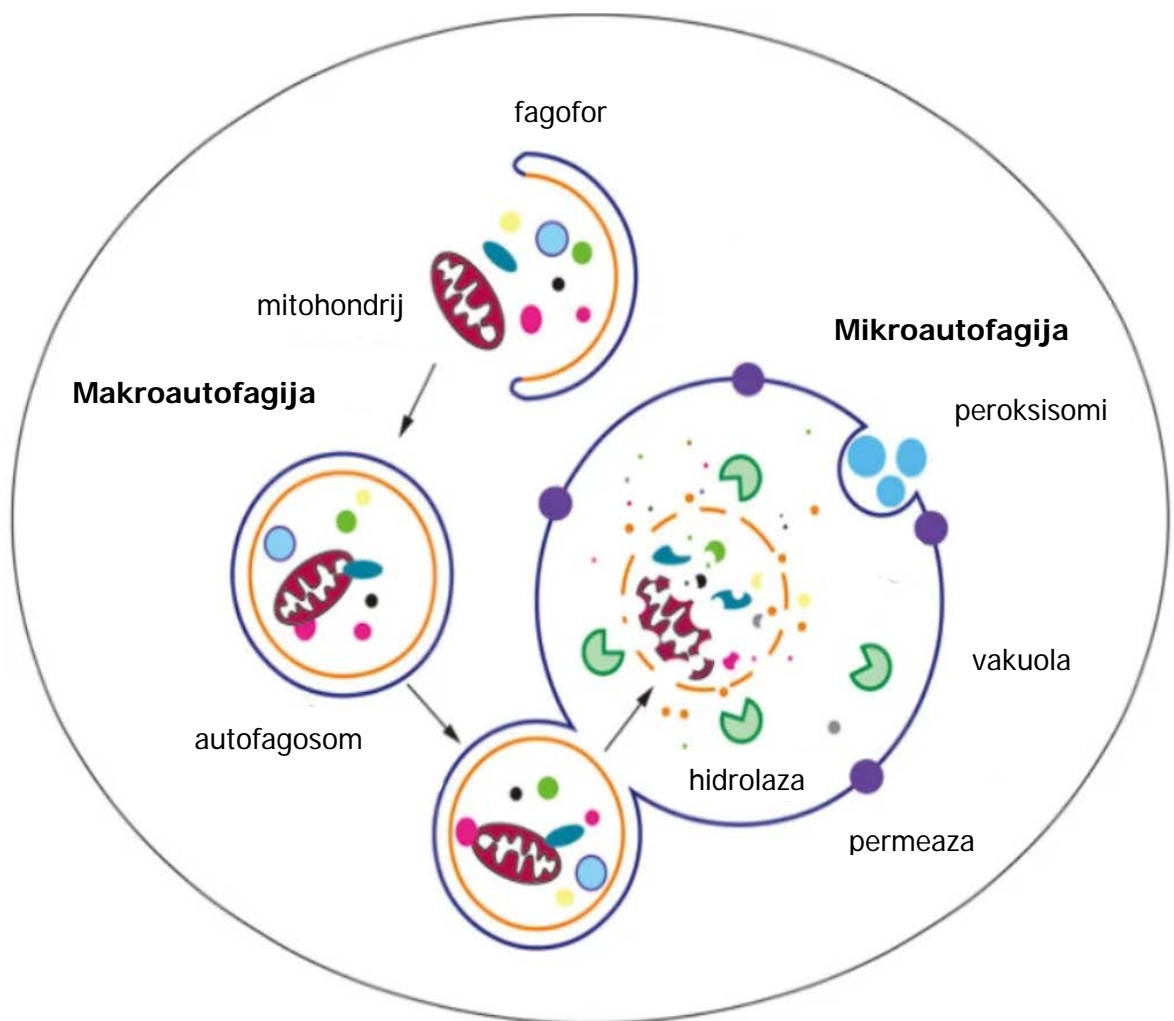
Molekularni pratitelji također mogu sudjelovati u procesu autofagije. Molekularni pratitelj HSP70 prepoznaje proteine s motivima nalik na KFERQ. Dolazi do formiranja CMA-supstrat/molekularni pratitelj kompleksa na lizosomalnom akceptoru LAMP-2A (membranski protein asociran s lizosomom). Protein se razmota i translocira preko lizosomske membrane, gdje se razgrađuje (Cuervo i Wong, 2014).

Autofagija ima protutumorsko djelovanje u zdravim stanicama te može biti poremećena u tumorskim stanicama. Protein regulator mikroautofagije, beclin A, u heterozigotnim stanicama miševa može uzrokovati veću vjerojatnost nastanka tumora. Njegova pojačana ekspresija inhibira razvoj tumora, ali stanice tumora mogu koristiti autofagiju za preživljavanje (Boutouja i sur., 2017). Autofagija reciklira ATP, koji je stanicama tumora potreban u izrazito velikim količinama te se smatra da inhibicija gena za autofagiju s 3-metiladenozinom ili „knockout“ gena Atg-7 inducira apoptozu u različitim staničnim linijama tumora poput stanica raka prostate i kolona (Li i sur., 2018). Na temelju tih podataka se razvijaju dvije strategije liječenja tumora. Jedna uključuje inhibiciju autofagije i indukciju apoptoze dok druga inducira autofagiju, što dovodi do poboljšane supresije tumorskih stanica (Kulka i sur., 2020).

Histonska deacetilaza HDAC6 se smatra induktorom autofagije te postoje inhibitori HDAC6, koji djeluju ujedno na molekularne pratitelje HSP70 i HSP90 te autofagiju. Već prije navedeni primjer je inhibitor histonske deacetilaze AR42 (OSU-HDAC42) u kombinaciji s inhibitorom kinaze, pazopanibom, u stanicama melanoma inhibira aktivnost ATPaze molekularnih pratitelja HSP90 i HSP70. Tijekom primjene inhibitora AR42 (OSU-HDAC42) dolazi do smanjenja razine svih histonskih deacetilaza, posebno HDAC6, zbog indukcije autofagije (Booth i sur., 2017). Drugi inhibitori, koji djeluju ujedno na autofagiju i molekularne pratitelje, su trihostatin A i natrij butirrat. Djelovanjem na molekularne pratitelje oni posljedično djeluju i na autofagiju posredovanu molekularnim pratiteljima (Chen i sur., 2002).

U p53 stanicama tumora vorinostat inducira autofagiju te mnogim drugim mehanizmima utječe na autofagiju. Postoji nekoliko signalnih puteva u autofagiji reguliranoj

pomoću inhibitora HDAC. Jedan od njih je preko rapamicina (mTOR), koji je glavni supresor autofagije pomoću fosforilacije i inaktivacije kompleksa kinaze 1, koja aktivira autofagiju (ULK1 kompleks). Vorinostat inhibira aktivnost rapamicina i ponovno uspostavlja aktivnost kompleksa ULK1 (Liu i sur., 2010). Također regulira ekspresiju proteina povezanih autofagijom stimulacijom aktivnosti NF- κ B (Shulak i sur., 2014). Vorinostat autofagijom inducira sintezu reaktivnih metabolita kisika (ROS) u stanicama leukemije i hepatocelularnog karcinoma (Oh i sur., 2008). Indukcijom autofagije nizvodnom regulacijom AKT-mTOR signalizacije u ksenograftu stanica glioblastoma kod „golihi miševa“ (s inaktiviranom prsnom žlijezdom), vorinostat uzrokuje inhibiciju rasta stanica (Chiao i sur., 2013).



Slika 3. Prikaz procesa makrofagije i mikrofagije (Feng i sur., 2014)

4.3. Sustav ubikvitin proteasoma

Sustav ubikvitin proteasoma razgrađuje proteine u oligopeptide. Na ostatke lizina se veže ubikvitin te je općenito moguće konkuriranje acetilaciji lizina. Proteasom prepoznaje lanac poliubikvitina, razmoti ciljani protein i razgradi ga. Ciljani proteini mogu biti transkripcijski faktori, metabolički enzimi i regulatori staničnog ciklusa, uključujući cikline i inhibitore kinaza ovisnih o ciklinu. Poznato je kako su te ciljane molekule ključne u stanicama tumora. Metabolički enzimi osiguravaju dostupnost hranjivih tvari i održavaju mikrookoliš tumorskih stanica (Schrader i sur., 2009).

Tumorske stanice imaju visoku razinu proliferacije te trebaju velike količine ATP-a i hranjivih tvari poput lipida, aminokiselina i nukleotida. Visoka razina proliferacije mijenja stanični ciklus i utječe na regulatorne proteine poput ciklina i inhibitora kinaza ovisnih o ciklinu. Jedan od najvažnijih mehanizama općenito u prekidu staničnog ciklusa je povećana ekspresija inhibitora kinaza ovisnih o ciklinu, CDKN1A (p21, WAF1/CIP1). Povećana ekspresija p21 posredovana HDAC je neovisna o p53 (Vrana i sur., 1999).

HDAC u malim koncentracijama induciraju zaustavljanje G1 faze, ali u velikim koncentracijama induciraju zaustavljanje G1 i G2/M faze staničnog ciklusa (Xu i sur., 2007). p21 inhibira aktivnost kinaza ovisnih o ciklinu te također djeluje na zaustavljanje G1 i G2/M faze staničnog ciklusa. Djeluje na prijelaz G1/S faze za koji je odgovoran CDK2 i prijelaz G2/M faze za koji je odgovoran cdc2/CDK1 (Singh i sur., 2018). Istraživanje humanih stanica kolona s mutiranim p21 stanicama dokazalo je da tumor-specifični antigeni uzrokuju zaustavljanje G1 faze. Induciranjem p15 se inhibiraju kinaze ovisne o ciklinu te posljedično nije sintetizirana CDK2. Protein p53 stupa u interakciju s promotorom p21 i mijenja ekspresiju gena p21. Histonska deacetilaza HDAC1 je represor gena p21, ali se liječenjem inhibitorima histonske deacetilaze HDAC1 odvaja od promotor-specifičnog RNA transkripcijskog faktora Sp1. To rezultira povećanom ekspresijom p21, što dovodi do prekida staničnog ciklusa i apoptoze. Inhibitori HDAC također produžuju poluživot proteina p53 pa poboljšavaju interakciju s p21 (Hitomi i sur., 2003; Suzuki i sur., 2000).

Protein p53 je tumor-supresor, koji je inaktiviran u mnogim vrstama tumora te se njegova koncentracija regulira poliubikvitinacijom i proteasomalnom razgradnjom. Inhibicija proteasoma može spriječiti razgradnju p53, ali p53 u tumorskim stanicama često sadrži mutacije pa je intervencija na razini transkripcije prikladnija. Unatoč tome su testirani inhibitori proteasoma u kombinaciji s inhibitorima HDAC. Dokazano je sinergističko djelovanje pan-inhibitora HDAC vorinostatata i FDA odobrenog inhibitora bortezomiba (Johnson, 2015).

Sljedeći inhibitor, koji djeluje na sustav ubikvitinacije proteasoma je MC1568. MC1568 je inhibitor HDAC selektivan na razred IIa te povećava razinu sumoilacije HDAC HDAC4. Sumoilacija je posttranslacijska modifikacija pomoću malog, s ubikvitinom povezanog, modifikatora (SUMO). Povećana sumoilacija HDAC4 ima za posljedicu aktivaciju proteasomalne razgradnje. Time mijenja uzorak posttranslacijskih modifikacija te aktivira razgradnju supstrata, ali mijenja i epigenetičke puteve na koje HDAC4 utječe (Scognamiglio i sur., 2008).

U prethodnim poglavljima spomenuti trihostatin A i natrij butirat utječu, osim na autofagiju i molekularne pratitelje, i na ubikvitinaciju histon acetil-transferaze HAT300, što rezultira njezinom proteasomalnom razgradnjom. HAT300 je koaktivator ekspresije NADPH oksidaze 4 (Nox4), važnog faktora u angiogenezi. Smanjenom ekspresijom Nox4 stanice tumora doživljavaju nedostatak kisika i hranjivih tvari (Hikami i sur., 2016).

4.4. Apoptoza

Apoptoza se može nazvati „programirana“ smrt stanice. Inhibitori HDAC induciraju apoptozu regulacijom gena, koji aktiviraju ili sprječavaju apoptozu. To podrazumijeva aktivaciju vanjskih i unutarnjih puteva inicijacije apoptoze. Vanjski put inicijacije apoptoze je vezanih „smrtnih“ receptora poput Fas, receptora faktora tumorske nekroze 1 (TNFR1), receptora liganda za inicijaciju apoptoze povezanu s TNF, koji su vezani za svoje ligande te aktiviraju kaspaze 8 i 10. Mnoga istraživanja ukazuju da inhibitori HDAC povećavaju ekspresiju tih „smrtnih“ receptora i njihovih liganda, što se ne događa u zdravim stanicama (Nakata i sur., 2004).

Aktivacija unutarnjih puteva inicijacije apoptoze se obuhvaća otpuštanje proteina unutrašnje membrane mitohondrija poput citokroma c, Smac, i faktora koji inicira apoptozu (AIF) te posljedičnu aktivaciju kaspaze 9. Mehanizmi unutrašnjih puteva inicijacije apoptoze nisu u potpunosti razjašnjeni (Zhao i sur., 2005).

4.5. Angiogeneza

Inhibicijom angiogeneze inhibitori HDAC poremećuju metastazu. Inhibitori HDAC smanjuju ekspresiju gena, koji induciraju angiogenezu. Inhibicijom aktivnosti faktora induciranog hipoksijom moguće je blokirati angiogenezu. Hipoksija je česta kod tumorskih stanica te dovodi do povećane ekspresije HDAC razreda I, osim HDAC8, što dovodi do aktivacije HIF 1 α te indukcije angiogeneze (Zupkovitz i sur., 2006; Liang i sur., 2006). Lijekovi, koji inhibiraju faktore angiogeneze HIF 1 α i VEGF, su vorinostat, tumor-supresorski antigeni, butirat, FK228 i LAQ824 (Jeong i sur., 2002; Qian i sur., 2006). Vorinostat i tumor-supresorski antigeni smanjuju ekspresiju faktora VEGF (Cinatl i sur., 2002). Faktor HIF 1 α se razgrađuje

acetilacijom, koja vodi do ubikvitinacije te se HDAC razreda II vežu za HIF 1 α i uzrokuju razgradnju HIF 1 α pomoću siRNA (Jeong i sur., 2002; Qian i sur., 2006).

4.6. Inhibitori histonske deacetilaze u kombinaciji s drugim lijekovima

4.6.1. Bromodomenski inhibitori

U mnogim istraživanjima je uočeno kako liječenje inhibitorima HDAC može dovesti do agregacije proteina. Hiperacetilacija proteina dovodi do amiloidne agregacije proteina te smanjenja proteolitičkog kapaciteta sustava ubikvitin proteasoma, smanjenje razine translacije i povećane razine autofagije (Olzscha i sur., 2017). Tubastatin A i trihostatin A povećavaju razinu acetilacije tau proteina, što je temeljni uzroka Alzheimerove bolesti, te tubastatin A mijenja morfologiju liječenih stanica (Cohen i sur., 2011; Noack i sur., 2014).

Postavilo se pitanje, kako izbjeći nuspojave i agregaciju proteina te je dokazano da proteini s bromodomenom CBP i p300 sudjeluju u agregaciji proteina te njihovom represijom možemo smanjiti agregaciju proteina (Olzscha i sur., 2017). Provedena su istraživanja s dva specifična p300/CBP inhibitora. I-CBP112 je liječio leukemiju i rak prostate te on aktivira histonske acetil-transferaze CBP i p300 rezultirajući u represiji proliferacije tumorskih stanica (Zucconi i sur., 2016). SGC-CBP30 se koristio za liječenje multiplog mijeloma te suprimira IRF4 (Conery i sur., 2016).

Prvi istraživani bromodomenski inhibitor, (+)-JQ1, se veže na mjesto vezanja acetil-lizina. Bio je preklinički testiran u mnogim vrstama tumora od glioblastoma, multiplog mijeloma, raka pluća do karcinoma kolona i Burkitt limfoma, ali nije nikad bio dovoljno uspješan za klinička istraživanja. Postoje mnogi hibridni inhibitori HDAC, koji sadrže dodatne funkcionalne skupine poboljšavajući njihov farmakokinetički učinak. Primjer je fimepinostat, koji je inhibitor HDAC i ujedno fosfatidilinozitol-3-kinaza, testiran na pacijentima s limfomom (Kulka i sur., 2020).

4.6.2. Proteasomski inhibitori

Tumorske stanice imaju visok stupanj proliferacije te stoga jače ovise o sustavu kontrole kvalitete proteina, nego normalne stanice. Zaključilo se da inhibicijom proteasoma dolazi do nakupljanja proteinskog materijala unutar tumorske stanice, a time i smrti stanice.

Nekoliko prekliničkih i kliničkih istraživanja prvog proteasomskog inhibitora pokazala su se uspješnim u liječenju relapsiranog i refraktiranog multiplog mijeloma te su dovela do njegovog odobrenja od FDA 2003. godine za pacijente, koji ne odgovaraju na prijašnja liječenja drugim lijekovima. Mehanizam sinergističkog djelovanja se temelji na inhibiciji proteasoma i agresoma.

Djelovanje bortezomiba inhibira djelovanje proteasoma, što rezultira nakupljanjem ubikvitiniranih proteina i smrti stanice, ali tumorske stanice su našle mehanizam, koji ih štiti. Formiraju agosome, koji obuhvataju ubikvitinirane proteine i transportiraju ih pomoću HDAC6 preko mikrotubula. Zbog toga je neizbježno liječenje u kombinaciji s inhibitorima HDAC, koji će inhibirati agosome. U nekoliko istraživanja se bortezomib kombinirao s panobinostatom i vorinostatom, ali rezultati nisu izrazito uspješni. Čak su uočene jake nuspojave poput citotoksičnosti, dijareje i drugih.

Karfilzomib je proteasomski inhibitor korišten u kombinaciji s panobinostatom te je odobren za liječenje pacijenata s relapsiranim ili refraktiranim multiplim mijelomom. Uočilo se kako panobinostat i inhibitor HDAC uzrokuju teže nuspojave te se krenulo u istraživanje selektivnih inhibitora HDAC. Inhibitor HDAC razreda I, mocetinostat, je pokazao antiproliferativno djelovanje u liječenju Hodgkinovog limfoma. Također se panobinostat u kombinaciji s bortezomibom testirao na pacijentima s periferalnim limfomom T-stanica. Mnogi inhibitori HDAC i bromodomenski inhibitori su testirani na hematološkim malignim bolestima, ali ne na čvrstim tumorima. Prva istraživanja na čvrstim tumorima su provedena s kombinacijom vorinostata i bortezomiba na pacijentima s rakom pluća ne-malih stanica te multifornim glioblastomom. Rezultati su bili izrazito slabi te su potrebna daljnja istraživanja na čvrstim tumorima (Kulka i sur., 2020).

4.6.3. Modulatori autofagije

Autofagija unatoč protutumorskom djelovanju u normalnim stanicama, može služiti tumorskim stanicama za njihovu obranu. Represijom autofagije u tumorskim stanicama podržao bi se apoptotički i citostatički efekti inhibitora HDAC. Provedena su istraživanja na pacijentima oboljelih od raka kolona i mijeloidne leukemije te je potvrđena ta hipoteza (Carew i sur., 2007). Vorinostat se u kombinaciji s inhibitorom autofagije hidroksiklorokvinom (HCQ) testirao za liječenje uznapredovalih čvrstih tumora, ali nije uočeno znatno poboljšanje osim kod pacijenata s karcinomom bubrežnih stanica (Mahalingam i sur., 2014). Također su se vorinostat i HCQ testirali na pacijentima s metastaznim kolorektalnim karcinomom, ali nije uočeno bolje djelovanje od oralnog lijeka regorafeniba. Trenutno se provode istraživanja u fazi II za metastazni kolorektalni karcinom otporan na kemoterapiju i refraktirani kolorektalni karcinom (Kulka i sur., 2020).

4.6.4. HSP90 inhibitori

Molekularni pratitelj HSP90 se može naći u velikim koncentracijama u stanicama mnogih vrsta tumora te pokazuje povoljne učinke na onkogene proteine. Pretpostavlja se da inhibicija

HSP90 onemogućava mnoge onkogene signalne puteve, što bi spriječilo tumorske stanice da stječu rezistenciju na terapijske puteve. HSP90 inhibitori poput 17-AAG nisu u fazi kliničkih istraživanja dalje od faze III zbog slabog djelovanja te toksičnosti, posebno za jetru. Kombinacija s drugim lijekovima se smatra obećavajućom te je temelj tome interakcija HDAC6 i HSP90. HDAC6 deacetilira HSP90, a HSP90 je prisutan u hiperacetiliranom obliku dok inhibira HDAC6 te gubi vezu sa molekularnim pratiteljem p23 i time svoju aktivnost kao molekularni pratitelj. Rak pluća je posebice osjetljiv na inhibiciju HSP90 jer je induciran povećanom ekspresijom ili mutacijom ERB-B2 ili BRAF, koje HSP90 može razgraditi. Trenutno se odvija kliničko istraživanje na temelju postavljene hipoteze (Kulka i sur., 2020).

4.7. Precizna medicina tretmanom inhibitorima histonske deacetilaze

Genetičke metode i precizna medicina su uvelike promijenili temeljni pristup liječenju tumora. Jednaki pristup za svakog pacijenta se promijenio u individualni pristup svakome pacijentu. Dokazano je da za uspješno liječenje treba uzeti u obzir genetičke i epigenetičke faktore. Fokusiranjem na epigenom pacijenta je napredovala precizna medicina u razvoju biomarkera. Biomarkeri su prema definiciji američkih National Institutes of Health (NIH) „definirani parametri mjeren kao indikatori normalnih bioloških procesa, patogenih procesa ili odgovora na izlaganje ili intervenciju, uključujući terapijsku intervenciju“.

Proteasom „shuttling“ faktor HR23B se smatra potencijalnim biomarkerom jer igra ključnu ulogu u apoptozu induciranoj inhibitorima HDAC te bi mogao prepoznati vrste tumora s povoljnim odgovorom na terapiju s određenim inhibitorom HDAC. Provedeno je istraživanje pacijenata s kožnim limfomom T-stanica te je uočena korelacija učinkovitosti liječenja s inhibitorom HDAC te razine ekspresije HR23B. Razina HR23B se povezala s dva procesa: autofagijom i apoptozom. Visoka razina HR23B uzrokuje apoptozu u stanicama tretiranim s inhibitorima HDAC, dok niska razina HR23B uzrokuje autofagiju.

HDAC važne su u tumorigenezi te se smatra da bi određene izoforme HDAC mogle biti potencijalni biomarker. Istraživao se utjecaj razaranja HDAC1, 2 i 3 izoformi na humane stanične linije tumora tretirane s dva nepovezana inhibitora HDAC (belinostat i valproična kiselina). Liječenje valproičnom kiselinom nije dao rezultate dok je liječenje belinostatom dalo rezultat samo razaranjem izoforme HDAC1. To dokazuje da razaranjem HDAC, tj. niskom razinom HDAC se smanjuje osjetljivost stanica na belinostat, a visoka razina HDAC povećava osjetljivost stanice na belinostat i pospješuje liječenje tumora. Pretpostavlja se kako različite vrste tumora imaju različite razine HDAC u stanicama. Analizom ekspresijskih profila HDAC bi se postigla bolja analiza tumorskih stanica te bolje razumijevanje osjetljivosti na specifične inhibitore HDAC.

Budućnost precizne medicine u liječenju tumora je obećavajuća, ali postoje mnoge prepreke za svladavanje. Biomarkeri pružaju mogućnost raslojavanja pacijenata i tumora u podskupine na temelju osjetljivost na određene inhibitore HDAC te pružaju mogućnost nadgledanja ciljane modulacije (Kulka i sur., 2020).

5. Zaključak

Tijekom prošlog stoljeća je napredak epigenetike i posebice inhibicije histonskim deacetilazama unaprijedio liječenje pacijenata oboljelih od tumora. Inhibitori HDAC inhibiraju acetilaciju, koja je najčešća posttranslacijska modifikacija sa značajnim utjecajem na ekspresiju gena. Postoji mnogo mehanizama djelovanja inhibitora HDAC. Induciraju apoptozu, autofagiju, prekid staničnog ciklusa, diferencijaciju te inhibiraju angiogenezu. Pokazuju relativnu uspješnost u samostalnoj primjeni, no mogu izazvati agregaciju proteina te porast citotoksičnosti u stanici pa se javila potreba za sprječavanjem tih nuspojava liječenjem u kombinaciji s drugim lijekovima.

Kombinacijom inhibitora HDAC s inhibitorima autofagije, bromodomenskim, HSP90 i proteasomalnim inhibitorima se eliminiraju nuspojave i toksičnost, ali su potrebna daljnja istraživanja za pronalaženje najboljih rješenja te novih kombinacija za uspješno liječenje mnogih vrsta tumora. Epigenetička terapija s inhibitorima HDAC je pružila dokaz konceptu o njihovoj kliničkoj učinkovitosti. Međutim, uočeno je da su ih inhibitori HDAC i drugi epigenetički modifikatori klinički učinkoviti kao pojedinačni agensi u hematološkim tumorima, ali ne i u čvrstim tumorima, unatoč njihovoj uspješnoj samostalnoj primjeni ili primjeni u kombinaciji s drugim lijekovima, što je potvrđeno u mnogim kliničkim istraživanjima.

Najnovija istraživanja ukazuju na potencijalnu upotrebu biomarkera te individualnog pristupa svakom pacijentu prilagođenog njihovom jedinstvenom genetičkom i epigenetičkom profilu. Analizom profila ekspresije pojedinih inhibitora HDAC u stanicama tumora, može se odrediti osjetljivost na pojedini lijek, a time i učinkovitost liječenja određenim inhibitorom HDAC.

6. Popis literature

1. Achrem M., Szućko I., Kalinka A. (2020) The epigenetic regulation of centromeres and telomeres in plants and animals. *CompCytogen* **14(2)**: 265–311.
2. Ban H. S., Han T. S., Hur K., Cho H. S. (2019) Epigenetic Alterations of Heat Shock Proteins (HSPs) in Cancer. *Intern. J. Mol. Sci.* **20**:758.
3. Biomarkers Definitions Working Group, Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework, 2001, *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **69(3)**: 89-95.
4. Booth L., Roberts J. L., Sander C., Lee J., Kirkwood J. M., Poklepovic A., Dent P. (2017) The HDAC inhibitor AR42 interacts with pazopanib to kill trametinib/dabrafenib-resistant melanoma cells in vitro and in vivo. *Oncotarget* **8**: 16367–16386.
5. Boutouja F., Brinkmeier R., Mastalski T., El Magraoui F., Platta H. W. (2017) Regulation of the Tumor-Suppressor BECLIN 1 by Distinct Ubiquitination Cascades. *Intern. J. Mol. Sci.* **18**:541.
6. Bumba V. (2019) Mehanizmi modifikacije histona, <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:402718>
7. Carew J. S., Nawrocki S. T., Kahue C. N., Zhuang H., Yang C., Chung L., Houghton J. A., Huang P., Hiles F. J., Cleveland J. L. (2007) Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl-mediated drug resistance. *Blood* **110**: 313–322.
8. Chen C. Y., Fang J. Y., Chen C. C., Chuang W. Y., Leu Y. L., Ueng S. H., Wei L. S., Cheng S. F., Hsueh C., Wang T. H. (2020) 2-O-Methylmagnolol, a Magnolol Derivative, Suppresses Hepatocellular Carcinoma Progression via Inhibiting Class I Histone Deacetylase Expression. *Front. Oncol.* **10**:1319.
9. Chen I. C., Sethy B., Liou J. P. (2020) Recent Update of HDAC Inhibitors in Lymphoma. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**:576391.
10. Chen T., Sun H., Lu J., Zhao Y., Tao D., Li X., Huang B. (2002) Histone acetylation is involved in hsp70 gene transcription regulation in *Drosophila melanogaster*. *Archiv. Biochem. Biophys.* **408**: 171–176.
11. Chiao M.T., Cheng W.Y., Yang Y.C., Shen C.C., Ko J.L. (2013) Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) causes tumor growth slowdown and triggers autophagy in glioblastoma stem cells. *Autophagy* **9**: 1509–1526.
12. Cinatl J. Jr, Ktchetov R., Blaheta R., Driever P. H., Vogel J. U., Cinatl J. (2002) Induction of differentiation and suppression of malignant phenotype of human neuroblastoma BE(2)-C cells by valproic acid: enhancement by combination with interferon α . *Int. J. Oncol.* **20**: 97–106.
13. Cloutier P., Coulombe B. (2013) Regulation of molecular chaperones through post-translational modifications: Decrypting the chaperone code. *Biochim. Biophys. Acta* **1829**: 443–454.
14. Cohen J., Guo J. L., Hurtado D. E., Kwong L. K., Mills I. P., Trojanowski J. Q., Lee V. M. Y. (2011) The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. *Nat. Commun.* **2**:252.
15. Conery A. R., Centore R.C., neiss A., Keller P. J., Joshi S., Spillane K. L., Sandy P., Hatton C., Pardo E, Zawadzke L, Bommi-Reddy A., Gascoigne K. E., Bryant B. M., Mertz J. A., Sims R. J. (2016) Bromodomain inhibition of the transcriptional coactivators CBP/EP300 as a therapeutic strategy to target the IRF4 network in multiple myeloma. *eLife* **5**:483.

16. Corno C., Arrighetti N., Ciusani E., Corna E., Carenini N., Zaffaroni N., Gatti L., Perego P. (2020) Synergistic Interaction of Histone Deacetylase 6- and MEK-Inhibitors in Castration-Resistant Prostate Cancer Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**:610.
17. Cosenza M., Pozzi S. (2018) The Therapeutic Strategy of HDAC6 Inhibitors in Lymphoproliferative Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **19**:337.
18. Cuervo A. M., Wong E. (2014) Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.* **24**: 92–104.
19. Dawson M. A., Kouzarides T. (2012) Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell* **150**: 12–27.
20. Drummond D. C., Noble C. O., Kirpotin D. B., Guo Z., Scott G. K., Benz C. C. (2005) Clinical Development of Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Agents. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**: 495–528.
21. Feng Y., He D., Yao Z., Klionsky D. J. (2014) The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* **24**: 24–41
22. Glozak M. A., Seto E. (1997) Histone deacetylases and cancer. *Oncogene* **26**: 5420–5432.
23. Haberland M., Montgomery R.L., Olson E. N. (2009) The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.* **10**: 32–42.
24. Hakami N. Y., Disting G. J., Peshavariya H. M. (2016) Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor suppresses NADPH Oxidase 4-Derived Redox Signalling and Angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* **20**: 1932–1944.
25. Hitomi T., Matsuzaki Y., Yokota T., Takaoka Y., Sakai T. (2003) p15 (INK4b) in HDAC inhibitor-induced growth arrest. *FEBS Lett* **554**: 347–350.
26. Hontecillas-Prieto L., Flores-Campos R., Silver A., de Álava E., Hajji N., García-Domínguez D. J. (2020) Synergistic Enhancement of Cancer Therapy Using HDAC Inhibitors: Opportunity for Clinical Trials. *Front. Genet.* **11**: 578011.
27. Hu Y., Nie Q., Dai M., Chen F., Wu H. (2020) Histone Deacetylases Inhibit the Snail2-Mediated EMT During Metastasis of Hepatocellular Carcinoma Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**:752.
28. Iannelli F., Zotti A. I., Roca M. S., Grumetti L., Lombardi R., Moccia T., Vitagliano C., Milone M.R., Ciardiello C., Bruzzese F., Leone A., Cavalcanti E., De Cecio R., Iachetta G., Valiante S., Ionna F., Caponigro F., Di Gennaro E., Budillon A. (2020) Valproic Acid Synergizes With Cisplatin and Cetuximab in vitro and in vivo in Head and Neck Cancer by Targeting the Mechanisms of Resistance. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**:732.
29. Jeng W., Lee S., Sung N., Lee J., Tsail F. T. F. (2015) Molecular chaperones: guardians of the proteome in normal and disease states. *F1000Research* **4**:214.
30. Jeong J. W., Bae M. K., Ahn M. Y., Kim S. H., Sohn T. K., Bae M. H., Yoo M. A., Song E. J., Lee K. J., Kim K. W. (2002) Regulation and Destabilization of HIF-1 α by ARD1-Mediated Acetylation. *Cell* **111**: 709–720.
31. Jezek M., Green E. M. (2019) Histone Modifications and the Maintenance of Telomere Integrity. *Cells* **8**: 199.
32. Johnson D. E. (2015) The ubiquitin–proteasome system: opportunities for therapeutic intervention in solid tumors in Endocrine-Related Cancer. *Endocrine Relat. Cancer* **22**: T1–T17.
33. Kaliszczak M., van Hechanova E., Li Y., Alsadah H., Parzych K., Auner H. W., Aboagye E. O. (2018) The HDAC6 inhibitor C1A modulates autophagy substrates in diverse cancer cells and induces cell death. *Br. J. Cancer* **119**: 1278–1287.

34. Khurana N., Bhattacharyya S. (2015) Hsp90, the concertmaster: tuning transcription. *Front. Oncol.* **5**:100.
35. Kinner A., Wu W., Staudt C., Iliakis G. (2008) Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research* **36**: 5678–5694.
36. Kovacs J. J., Murphy P. J. M., Gaillard S., Zhao X., Wu J.T., Nicchitta C. V., Yoshida N., Toft D. O., Pratt, Yao T. P. (2005) W. B.HDAC6 Regulates Hsp90 Acetylation and Chaperone-Dependent Activation of Glucocorticoid Receptor. *Mol. Cell* **18**: 601–607.
37. Kulka L. A. M., Fangmann P. V., Panfilova D., Olzscha H. (2020) Impact of HDAC Inhibitors on Protein Quality Control Systems: Consequences for Precision Medicine in Malignant Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**:425.
38. Li G., Tian Y., Zhu W. G. (2020) The Roles of Histone Deacetylases and Their Inhibitors in Cancer Therapy
39. Li W. W., Li J., Bao J. K. (2012) Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci* **69(7)**: 1125-1136.
40. Liang D., Kong X., Sang N. (2006) Effects of histone deacetylase inhibitors on HIF-1. *Cell Cycle* **5**: 2430–2435.
41. Liu Y.L., Yang, P.M., Shun, C.T., Wu, M.S., Weng, J.R., Chen, C.C. (2010) Autophagy potentiates the anti-cancer effects of the histone deacetylase inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Autophagy* **6**: 1057–1065.
42. Losson H., Schnekenburger M., Dicato M., Diederich M. (2016) Natural Compound Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi): Synergy with Inflammatory Signaling Pathway Modulators and Clinical Applications in Cancer. *Molecules* **21**: 1608.
43. Lourenço de Freitas N., Deberaldini M. G., Pavan A. R., Sousa A., Dos Santos J. L., Soares C. P. (2021) Histone Deacetylase Inhibitors as Therapeutic Interventions on Cervical Cancer Induced by Human Papillomavirus. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**: 592868.
44. Mahalingam D., Mita M., Sarantopoulos J., Wood L., Amaravadi R. K., Davis L. E., Mita A. C., Curiel T. J., Espitia C. M., Nawrocki S. T., Giles F. J., Carew J. S. (2014) Combined autophagy and HDAC inhibition, A phase I safety, tolerability, pharmacokinetic, and pharmacodynamic analysis of hydroxychloroquine in combination with the HDAC inhibitor vorinostat in patients with advanced solid tumors. *Autophagy* **10**: 1403–1414.
45. Mamdani H., Jalal S.I. (2020) Histone Deacetylase Inhibition in Non-small Cell Lung Cancer: Hype or Hope. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**: 582370.
46. Mottamal, M.; Zheng, S.; Huang, T.L.; Wang, G.(2015) Histone Deacetylase Inhibitors in Clinical Studies as Templates for New Anticancer Agents. *Molecules* **20**: 3898–3941.
47. Nakata S., Yoshida T., Horinaka M., Shiraishi T., Wakada M., Sakai T. (2004) (Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells. *Oncogene* **23**: 6261–6271.
48. New M., Olzscha H., La Thangue N. (2012) HDAC inhibitor-based therapies: Can we interpret the code?. *Mol. Oncol.* **6**: 637–656.
49. Noack M., Leyk J., Richter-Landsberg C. (2014) HDAC6 inhibition results in tau acetylation and modulates tau phosphorylation and degradation in oligodendrocytes. *Glia* **62**: 535–547
50. Oh M., Choi I. K., Kwon H. J. (2008) Inhibition of histone deacetylase1 induces autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**: 1179–1183.
51. Olzscha H., Fedorov O.,Kessler B. M., Knapp S., La Thangue N. B. (2017) BP/p300 Bromodomains Regulate Amyloid-like Protein Aggregation upon Aberrant Lysine Acetylation. *Cell Chem. Biol.* **24**: 9–23.

52. Olzscha H., Sheik S., La Thangue N. B. (2015) Deacetylation of Chromatin and Gene Expression Regulation: A New Target for Epigenetic Therapy. *Cancer* **125**: 99–108.
53. Perla A., Fratini L., Cardoso P. S., Nör C., Brunetto A. T., Brunetto A. L., Brunetto de Farias C., Jaeger M., Roesler R. (2020) Histone Deacetylase Inhibitors in Pediatric Brain Cancers: Biological Activities and Therapeutic Potential. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**: 546.
54. Peters G, J., van Gemert F. P. A., Kathman I., Reddy G., Cillessen S. A. G. M., Jansen G. (2020) Schedule-Dependent Synergy Between the Histone Deacetylase Inhibitor Belinostat and the Dihydrofolate Reductase Inhibitor Pralatrexate in T-and B-cell Lymphoma Cells in vitro. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**: 577215.
55. Qian D. Z., Kachkap S. K., Collis S. J., Verheul H. M. W., Carducci M. A., Atadja P., Pili R. (2006) Class II histone deacetylases are associated with VHL-independent regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Cancer Res.* **6**: 8814–8821.
56. Schrader E. K., Harstad K. G., Matouschek A. (2009) Targeting proteins for degradation. *Nat. Chem. Biol.* **5**: 815–822.
57. Scognamiglio A., Nebbiosoa A., manzoac F., Valente S., Mai A., Altucci L. (2008) HDAC-class II specific inhibition involves HDAC proteasome-dependent degradation mediated by RANBP2. *Biochim Biophys Acta* **1783(10)**: 2030-2038.
58. Sengupta N., Seto E. (2004) Regulation of histone deacetylase activities. *J. Cell. Biochem.* **93**: 57–67.
59. Seto E., Yoshida M. (2014) Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**: a018713.
60. Shao Y., Gao Z., Marks P. A., Jiang X. (2004) Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors, Yufang Shao 1, Zhonghua Gao, Paul A Marks, Xuejun Jiang, 2004. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 18030–18035.
61. Shulak, L., Beljanski V., Chiang C., Dutta M., Van Grevenynghe J., Belgnaoui S.M., Nguyen L., Di Lenardo T., Semmes O.J.; Lin R. (2014) Histone deacetylase inhibitors potentiate vesicular stomatitis virus oncolysis in prostate cancer cells by modulating NF- κ B-dependent autophagy. *J. Virol.* **88**: 2927–2940.
62. Singh A. M., Bishayee A., Pandey A.K. (2018) Targeting Histone Deacetylases with Natural and Synthetic Agents: An Emerging Anticancer Strategy. *Nutrients* **10**: 731.
63. Stimson L., Wood V., Khan O., Fotheringham S., La Thangue N. B. (2009) HDAC inhibitor-based therapies and haematological malignancy. *Ann Oncol* **20(8)**: 1293-302.
64. Suzuki T., Yokozaki H., Kuniyasu H., Hayashi K., Naka K., Ono S., Ishikawa T., Tahara E., Yasui W. (2000) Effect of trichostatin A on cell growth and expression of cell cycle- and apoptosis-related molecules in humangastric and oral carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer* **88**: 992–997.
65. Vrana J.A., Decker R. H., Johnson C. R., Wang Z., Jarvis W. D., Richon V. M., Ehinger M., Fisher P. B., Grant S. (1999) Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-XL, c-Jun, and p21CIP1, but independent of p53. *Oncogene* **18**: 7016–7025.
66. Wang Z., Leng Z., Leng Y., Wang J., Liao H. M., Bergman J., Leeds P., Kozikowski A., Chuang D. M. (2016) Tubastatin A, an HDAC6 inhibitor, alleviates stroke-induced brain infarction and functional deficits: potential roles of α -tubulin acetylation and FGF-21 up-regulation. *Sci Rep* **6**: 19626.
67. Xu Q., Liu C., Zang J., Gao S., Chou C. J., Zhang Y. (2020) Discovery of a Novel Hybrid of Vorinostat and Riluzole as a Potent Antitumor Agent. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**: 454.
68. Xu W. S., Parmigiani R. B., Marks P. A. (2007) Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* **26(37)**: 5541-5552.

69. Yeh S. J., Chen S. W., Chen B. S. (2020) Investigation of the Genome-Wide Genetic and Epigenetic Networks for Drug Discovery Based on Systems Biology Approaches in Colorectal Cancer. *Front. Genet.* **11**: 117.
70. Yeon M., Kim Y., Jung H. S., Jeoung D. (2020) Histone Deacetylase Inhibitors to Overcome Resistance to Targeted and Immuno Therapy in Metastatic Melanoma. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**: 486.
71. Yuan X., Larsson C., Xu D. (2019) Mechanisms underlying the activation of TERT transcription and telomerase activity in human cancer: old actors and new players. *Oncogene* **38**: 6172–6183.
72. Zhang J., Ng S., Wang J., Zhou J., Tan S. H., Yang N., Lin Q., Xia D., Shen H. M. (2015) Histone deacetylase inhibitors induce autophagy through FOXO1-dependent pathways. *Autophagy* **11**: 629–642.
73. Tu B., Zhang M., Liu T., Huang Y. (2020) Nanotechnology-Based Histone Deacetylase Inhibitors for Cancer Therapy. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**: 400
74. Zhao Y., Tan J., Zhuang L., Jiang X., Liu E. T., Yu Q. (2005) Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 16090–16095.
75. Zucconi B. E., Luef B., Xu W., Henry R. A., Nodelman I. M., Bowman G. D., Andrews A. J., Cole P. A. (2016) Modulation of p300/CBP Acetylation of Nucleosomes by Bromodomain Ligand I-CBP112. *Biochemistry* **55**: 3727–3734.
76. Zupkovitz G., Tischler J., Posch M., Sadzak I., Ramsauer K., Egger G., Grausenburger R., Schweifer N., Chiocca S., Decker T., Seiser C. (2006) Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1. *Mol. Cell Biol.* **26**: 7913–7928.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Laura Colar Zamiko

ime i prezime studenta