

REVISIÓN

Las terapias epigenéticas, más allá de los biológicos en el tratamiento de la artritis reumatoide

Olga Sánchez-Pernaute

Servicio de Reumatología, Fundación Jiménez Díaz, Departamento de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 28 de septiembre de 2009
 Aceptado el 11 de octubre de 2009

Palabras clave:

Metilación del Genoma
 Histona-deacetilasas
 Citoquinas
 Muerte Celular
 Reprogramación

Keywords:

Genome methylation
 Histone deacetylases
 Cytokines
 Cell death
 Reprogramming

RESUMEN

La artritis reumatoide ha experimentado en la última década una revolución terapéutica, derivada del conocimiento de los procesos patogénicos y favorecida por el desarrollo de la tecnología necesaria para distribuir tratamientos moleculares. Las nuevas terapias permiten diferenciar subtipos de pacientes según la respuesta clínica y además mejoran nuestra comprensión de la enfermedad. Ello hace vaticinar la llegada de nuevas generaciones de moléculas para un tratamiento individualizado. Uno de los campos hacia donde se dirigen las investigaciones es la epigenética. Los mecanismos de regulación epigenéticos son interruptores que deciden cuándo y cómo expresar determinados genes en cada célula. Actuando como vigilantes de una expresión génica inapropiada, protegen al organismo del desarrollo de tumores. La principal ventaja de los tratamientos epigenéticos podría ser su selectividad por las células que muestran patrones epigenéticos alterados, por lo que el reto es identificar estas alteraciones entre los pacientes con artritis reumatoide. Aunque debe establecerse su perfil de seguridad, parece probable el uso de terapias epigenéticas en las enfermedades autoinmunes.

© 2009 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Epigenetic therapies, a step beyond biologics for rheumatoid arthritis

ABSTRACT

Over the last decade, the management of rheumatoid arthritis has evolved as a result of both the understanding of disease-related processes and the availability of the necessary high-throughput technology to provide patients with molecule-based therapies. New therapies allow the classification of patients into subsets as regards clinical response, at the same time adding to our knowledge of rheumatoid arthritis pathogenesis. New generations of molecules will likely soon be ready for "a la carte" treatment of patients. A promising field of research is epigenetics. Epigenetic regulatory mechanisms switch on and off the transcription of specific genes in individual cells. Acting as observers on non-adequate gene expression, these mechanisms yield protection against the development of tumours. The major achievement of epigenetic therapies could be their selective action on cells with altered epigenetic programs, and it is our challenge to recognize these alterations among patients with rheumatoid arthritis. Although safety concerns may arise, epigenetic drugs will likely be used to treat autoimmune diseases.

© 2009 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

El fenotipo en las enfermedades complejas está perfilado por factores epigenéticos

Los avances recientes en el conocimiento de los mecanismos de regulación de la expresión génica han cambiado nuestra concepción de las enfermedades complejas, como el cáncer, el lupus o la artritis reumatoide (AR). Estos rasgos poligénicos se asocian a un conjunto de genes de baja penetrancia, los cuales confieren susceptibilidad o protección y se transmiten con un patrón de herencia no Mendeliano¹ En el caso de la AR, se

desconocen en gran medida los factores ambientales que puedan participar en su aparición, lo que incrementa la dificultad para predecir su desarrollo. Lo más probable es que los pacientes que buscan atención médica sean tan solo una pequeña parte de la población artrítica. Sin embargo, sería de gran interés estudiar también a los pacientes con enfermedad leve de curso remitente, para poder identificar los factores que determinan la progresión. En este sentido, las enfermedades complejas se caracterizan por un amplio espectro de gravedad, que refleja el efecto acumulativo de diferentes factores permisivos.

Independientemente de la carga genética, la actividad transcripcional de los genes está exquisitamente regulada de forma específica en cada tejido, en función del estado evolutivo. Durante

Correo electrónico: osanchez@fjd.es

1699-258X/\$ - see front matter © 2009 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.
 doi:10.1016/j.reuma.2009.10.013

Cómo citar este artículo: Sánchez-Pernaute O. Las terapias epigenéticas, más allá de los biológicos en el tratamiento de la artritis reumatoide. Reumatol Clin. 2010. doi:10.1016/j.reuma.2009.10.013

el desarrollo embrionario se lleva a cabo una represión en la expresión de gran cantidad de genes, que va progresando a lo largo de las divisiones celulares y es responsable de la especificación². Esto se ejecuta mediante un programa de silenciamiento epigenético, un término acuñado para subrayar que se produce una supresión estable de la expresión génica, generando patrones transmisibles a las células hijas, pero sin que ello conlleve cambios en la línea germinal³. Aunque por el momento, el alcance de las modificaciones epigenéticas no se conoce en toda su extensión, es ya evidente que procesos fundamentales como el crecimiento celular, la secreción hormonal, la respuesta inflamatoria y la maduración de las células inmunes están gobernados por este tipo de regulación³. Del mismo modo, las enfermedades degenerativas, la inflamación o el cáncer, se caracterizan por la acumulación de marcas epigenéticas en las células enfermas. Ello ha llevado a postular que distintos factores ambientales pasados y recientes conducen a la alteración de los patrones de expresión génica por mecanismos epigenéticos, pudiendo éstos, en consecuencia, explicar en gran medida la contribución ambiental al desarrollo de las enfermedades complejas⁴.

Mecanismos epigenéticos de silenciamiento transcripcional

La inhibición de la transcripción génica se produce mediante la metilación del ADN y los cambios en la conformación de la cromatina. Ambos mecanismos actúan de forma coordinada y afectan a la accesibilidad de los genes para su lectura (fig. 1)^{4,5}. La cromatina está estabilizada por las uniones covalentes entre el ADN y las histonas y otras proteínas básicas del núcleo celular. Las modificaciones postraduccionales de las histonas dan lugar a cambios de afinidad en su unión con el ADN, generando una conformación cerrada o abierta de la cromatina (hetero o eucromatina, respectivamente). Tanto la metilación del ADN como las modificaciones de las histonas son procesos reversibles, catalizados por enzimas y cofactores específicos. Ello indica que las

células son capaces de cambiar sus patrones de expresión epigenéticos en respuesta a diferentes estímulos, permitiendo al mismo tiempo su manipulación con intención terapéutica. Sin embargo, muchas de estas marcas epigenéticas tendrán que esperar a la siguiente división mitótica para poder ser modificadas.

La metilación del ADN tiene lugar en determinadas regiones ricas en dinucleótidos citosinafosfoguanina por la acción de las ADN metiltransferasas (DNMT). Las histonas H3 y H4, por su parte, pueden sufrir numerosas transformaciones, como fosforilación, metilación, acetilación, ribosilación, sumoilación, ubiquitinación, así como las reacciones inversas y varias combinaciones. La mayoría de ellas se producen en los aminoácidos lisina (K) o arginina (D) cercanos al extremo amino-terminal de la proteína. Existe una larga lista de enzimas que participan en las modificaciones de las histonas, en la que destacan las familias de las histona-acetilinas (HAT) y las histona-deacetilasas (HDAC)⁶. La eliminación de grupos acetilo se relaciona estrechamente con el silencio transcripcional, mientras que la acetilación abre la conformación de la cromatina y se asocia a un incremento de la expresión génica (fig. 1)^{7,8}.

Los mecanismos epigenéticos de la artritis reumatoide

Las respuestas inflamatorias en la septicemia y en la AR en brote muestran una explosión inicial de citoquinas de características muy similares; sin embargo, en la septicemia, esta oleada deja paso a un descenso en los niveles de las citoquinas que no tiene lugar en la artritis⁹. Esto indica que existe un control defectuoso en la finalización del proceso en los pacientes con artritis. La principal ruta encaminada a la producción de las citoquinas proinflamatorias, tanto durante la sepsis como en la AR, es la vía de activación innata del factor de transcripción (NF)κB¹⁰. Esta ruta es un claro ejemplo de cómo los mecanismos epigenéticos intervienen en la regulación de las respuestas celulares. El NFκB se encuentra en estado latente en el citoplasma de las células, anclado a su inhibidor, IκB. A su vez, la disponibilidad del inhibidor está regulada mediante la metilación de su promotor, situación que puede determinar importantes diferencias en la producción de citoquinas. Por otra parte, la cromatina está plegada en una conformación cerrada en las regiones correspondientes a los promotores de las citoquinas pro-inflamatorias. En sincronización con la translocación al núcleo del NFκB, han de producirse cambios transitorios en esta conformación (una demetilación en K9 y una fosforilación en la serina (S)10 de la histona H3)^{11,12} para permitir la incorporación de la maquinaria transcripcional a sus sitios de unión en los promotores del factor de necrosis tumoral (TNF)α y la interleuquina (IL)1β¹³.

Otro de los procesos estrechamente regulado por mecanismos epigenéticos es la diferenciación de las células inmunocompetentes¹⁴. La AR se caracteriza por la polarización hacia respuestas Th1 y Th17. La diferenciación de las células T doble-positivas hacia las Th1 se produce a través de la metilación progresiva del promotor de la IL4, que es la citoquina específica de las células Th2, hasta su supresión completa¹⁵. Por su parte, el factor de transcripción FoxP3, definitorio de las funciones T reguladoras, es susceptible de silenciamiento por metilación, un evento que inclina la balanza hacia la producción de células Th17 y favorece la autoinmunidad¹⁶. Estos cambios en el fenotipo de las células T son, en gran medida, reversibles y existe evidencia de que algunas citoquinas, como el factor de crecimiento transformante (TGF)β, la IL6 y el interferón (IFN)γ, participan de forma activa en el establecimiento de los patrones epigenéticos en las subpoblaciones de células T¹⁷.

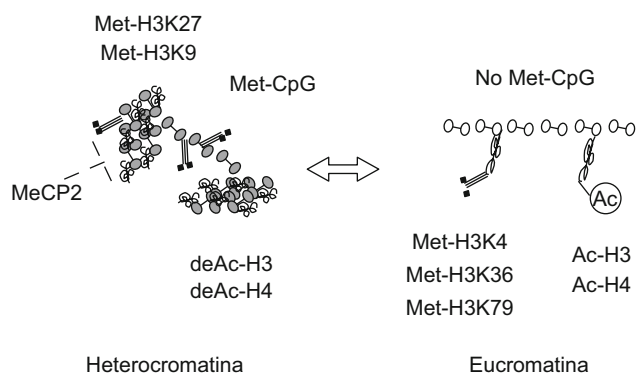


Figura 1. Marcas epigenéticas asociadas a las conformaciones cerrada y abierta de la cromatina. El silenciamiento génico se consigue con un alto nivel de metilación del ADN (Met-Dinucleótidos citosinafosfoguanina), en combinación con la deacetilación de las histonas H3 y H4 (deAc-H3, deAc-H4) y la metilación de la histona H3 en los residuos lisina 9 y 27 (Met-H3K9, Met-H3K27). Mediante estos cambios en su estructura, las interacciones entre las histonas y el ADN son más fuertes, determinando una conformación cerrada o heterocromatina. La presencia de moléculas capaces de estabilizar las uniones covalentes entre el ADN metilado y las histonas, como MeCP2, producen un empaquetamiento aún más denso del genoma. La activación de la expresión génica se caracteriza por la acetilación de las histonas H3 y H4 (Ac-H3, Ac-H4) y la metilación de las lisinas en posición 4, 36 y 79 de la histona H3 (Met-H3K4, Met-H3K36, Met-H3K79). Ello determina una configuración abierta, con uniones laxas con el ADN, clásicamente denominada eucromatina. Los cambios entre ambas configuraciones son, en gran medida, dinámicos.

El fenotipo invasivo

La primera información acerca de la implicación epigenética en patología humana provino de los tumores, donde se objetivó que la presencia de determinadas marcas epigenéticas promovía la invasividad y la supervivencia de las células afectadas. En particular, un evento típico de las fases iniciales en la tumorigénesis es la metilación de novo de genes reguladores o supresores tumorales¹⁸ En este sentido, aunque las DNMT son esenciales para adquirir los patrones normales de metilación génica, sus inhibidores se han revelado como una estrategia interesante para hacer a las células reexpresar los genes anormalmente hiper-metilados¹⁹ Los primeros agentes demetilantes empleados en el tratamiento de enfermedades humanas fueron la 5-aza citidina y la 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza CR y 5-aza CdR), seguidos por los menos tóxicos Zebularina y MG98. También se ha constatado el papel de las HDAC en el silenciamiento génico asociado a la des-diferenciación de algunos tumores y a su resistencia a la quimioterapia. La suberoil anilida del ácido hidroxámico (SAHA) es un inhibidor natural de la actividad de las HDAC que está aprobado para el tratamiento de la leucemia cutánea de células T, mientras que otros 2 antagonistas de estas enzimas, el ácido fenilbutírico y el ácido valproico, han demostrado su capacidad de corregir los patrones alterados de expresión génica en diferentes enfermedades²⁰.

El grado de metilación del genoma en la membrana sinovial reumatoide está siendo objeto de estudio, dada la similitud entre los fibroblastos locales y las células transformadas. Aunque desprovistos de mutaciones, los fibroblastos sinoviales (FS) de los pacientes muestran una supervivencia anormalmente elevada y ejecutan un programa invasivo, caracterizado por la secreción constitutiva de proteasas y citoquinas^{21,22}. En las articulaciones de los pacientes, las células que se hallan en áreas de invasión del hueso y el cartilago articular expresan protooncogenes y factores de crecimiento^{23,24}. Este patrón locorregional en la expresión génica sugiere que desde el entorno inflamatorio se podría desencadenar un determinado epigenoma que se propaga a la progenie de las células modificadas. Parte de estos mecanismos se está empezando a desentrañar. Por ejemplo, la longevidad que caracteriza a los FS en la AR se ha puesto en relación con un alto grado de metilación en el promotor de moléculas proapoptóticas, como el receptor letal DR^{3,25}. Del mismo modo, se ha demostrado que la Tricostatina A (TSA), un inhibidor de las HDAC, induce la reexpresión de otras moléculas proapoptóticas en estas células, incrementando consecuentemente su senescencia^{26,27}. Estos hallazgos sugieren que las células sinoviales en la AR muestran un programa de silenciamiento génico alterado, que podría estar en relación con su tendencia destructiva y que es susceptible de reprogramación.

Pros y contras de las terapias epigenéticas y su posible uso en la artritis reumatoide

Aún en espera de comprobar el perfil de seguridad que muestran los tratamientos epigenéticos en los pacientes con cáncer, podemos pronosticar que estos tratamientos se introducirán en enfermedades no neoplásicas, como la AR, en un futuro próximo²⁸. La meta principal de los abordajes epigenéticos en la AR será aumentar la expresión de genes reguladores que se encuentran anormalmente silenciados, con la pretensión de atenuar con ello la expresión clínica de la enfermedad. Esto puede conseguirse bien inhibiendo la metilación del ADN o cambiando la conformación de la cromatina en lugares determinados. Como principal contrapartida, el uso de estas estrategias conlleva el riesgo de eliminar marcas epigenéticas constitutivas,

como las que evitan la expresión de transgenes, en las células con alto índice replicativo¹⁹.

Agentes demetilantes

Estos son, con diferencia, los fármacos epigenéticos más prometedores para el tratamiento de la AR. Es probable que la metilación de novo de ciertos genes reguladores favorezca la progresión de la AR y su reexpresión dé lugar a un fenotipo más leve o mejore la respuesta a fármacos modificadores de evolución (fig. 2A). En realidad, algunos de los fármacos empleados actualmente en el tratamiento de la artritis podrían actuar como agentes demetilantes. Cuando comenzaron a estudiarse las modificaciones epigenéticas en el cáncer, se observó que la mayoría de los agentes antineoplásicos ejercían efectos epigenéticos al emplearse a dosis no citotóxicas^{4,29}. El Metotrexato, como antagonista de la dihidrofolato reductasa,

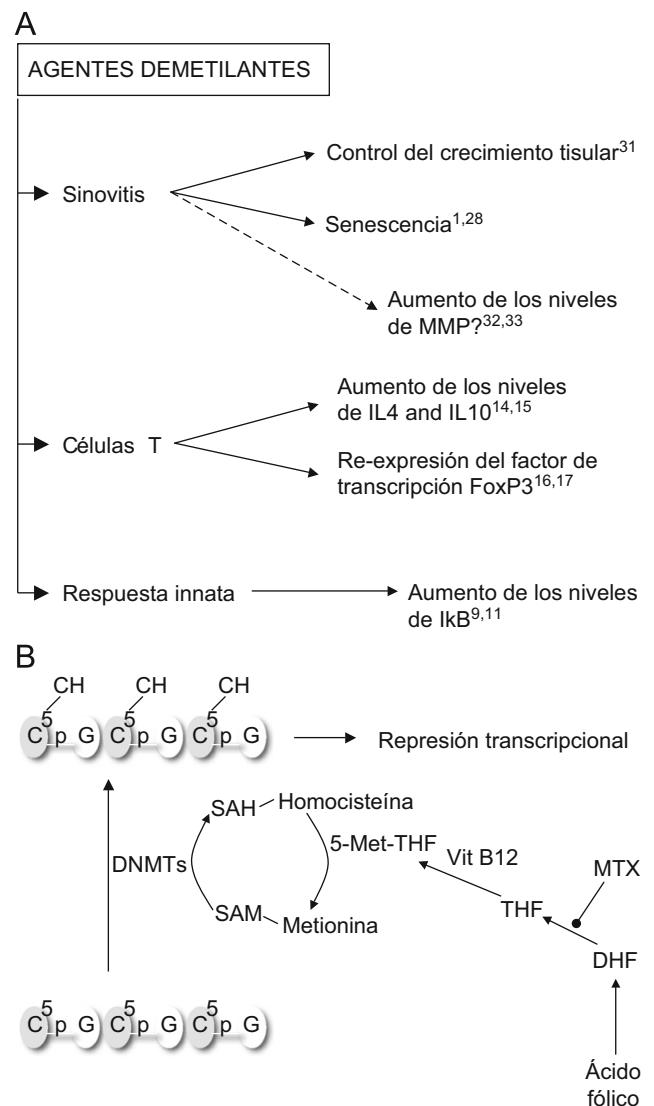


Figura 2. Acciones de los inhibidores de las ADN metiltransferasas. A) Predicción de los efectos del tratamiento con agentes demetilantes en la artritis reumatoide. Según indican los estudios disponibles, el uso de estos tratamientos redundaría en beneficios en los procesos patogénicos principales de la artritis reumatoide: la sinovitis, la polarización de las células T y la inmunidad innata. B) Efecto del Metotrexato (MTX) sobre la acción de las ADN metiltransferasas (DNMTs). DHF: ácido dihidrofolico; THF: ácido tetrahidrofolico; SAM: sulfoadenosil metionina; SAH: sulfoadenosil homocisteína.

limita la acción de las DNMT (fig. 2B). El ácido fólico actúa como aceptor de grupos metionina de la homocisteína, en presencia de vitamina B12. A su vez, la metionina es el donante de los grupos metilo que las DNMT utilizan para llevar a cabo la metilación de los residuos citosina del ADN³⁰. Esto sugiere que el Metotrexato impide las reacciones de metilación de novo (fig. 2B), una acción que podría explicar parte de su beneficio en la AR. Por otra parte, dada la participación de la IL6 en los procesos de metilación del genoma y en las interacciones con las HDAC³¹ es probable que su inhibición terapéutica con el uso del Tocilizumab redunde en cambios en los patrones epigenéticos asociados a la enfermedad y en el futuro se puedan asociar estos cambios a grupos de respuesta clínica. Existe la preocupación de que el uso de agentes demetilantes pueda conducir a un aumento en los niveles de las metaloproteinasas 3 y 13, moléculas implicadas en la destrucción articular. Estas moléculas tienen dinucleótidos citosinafosfoguanina en su promotor, susceptibles de metilación. En FS en cultivo, la producción de la metaloproteinasas 3 aumenta tras la exposición a 5-aza CdR, mientras que la expresión incrementada de ambas proteasas en el cartílago artrósico se ha puesto en relación con el bajo grado de metilación de su promotor en los condrocitos enfermos respecto a los sanos^{32,33}. No obstante, todo parece indicar que el umbral necesario para eliminar las marcas epigenéticas constitutivas es mayor que el que se precisa para impedir la metilación de novo.

Inhibidores de las histona-deacetilasas

Aunque existe una alta expectación con respecto al uso de los inhibidores de las HDAC en el tratamiento de la AR, estos compuestos todavía necesitan demostrar que son candidatos válidos. El FK228 ha demostrado eficacia en varios modelos experimentales similares a la AR, donde fue capaz de reducir la inflamación articular y la tendencia destructiva³⁴. Este beneficio se ha atribuido a un efecto antiangiogénico y a la inducción de moléculas proapoptóticas en el tejido sinovial³⁵. También se han observado efectos beneficiosos con los inhibidores de las HDAC, SAHA y MS-275, en ratones con artritis inducida por colágeno^{36,37}. Sin embargo, es difícil traducir estos efectos a la enfermedad humana, ya que diferentes estudios han sido incapaces de demostrar una actividad elevada de las HDAC en los tejidos sinoviales reumatoideos. Por el contrario, parece existir un ratio HAT/HDAC aumentado, relacionado a su vez con la producción de moléculas proinflamatorias, lo que nos hace contemplar el abordaje de la enfermedad con inhibidores de las HDAC con cautela³⁸.

Metiltransferasas de las histonas

El potencial terapéutico de las metiltransferasas de las histonas está aún poco explorado, si bien la participación de las lisina demetilinas LSD1 y Jumonji en la progresión de distintos tumores está bien establecida³⁹. Se trata éste de un campo muy amplio, en el que cada enzima muestra bastante selectividad por modificar residuos concretos⁴⁰. La familia de lisina demetilinas Jumonji aumenta su expresión en situaciones de hipoxia, por lo que se les supone involucradas en las respuestas inflamatorias derivadas de estrés celular⁴¹. En particular, el estado de metilación de los residuos H3K4, H3K9 y H3K27 regula la actividad transcripcional del NFκB, lo que puede ser clave en el diseño de tratamientos⁴².

Terapias combinadas

Dado que los sucesos en el núcleo celular tienen lugar en coordinación, y que las modificaciones postraduccion no solo afectan a las histonas sino también a los cofactores y los

activadores de la transcripción, parece razonable emplear tratamientos epigenéticos en cócteles⁴³. Esta estrategia ha demostrado un sinergismo beneficioso para el abordaje de los tumores, mejorando además el perfil de seguridad, dado que permiten una reducción en las dosis terapéuticas²⁰. El ácido valproico es un ácido graso de cadena corta que actúa como inhibidor de diversas HDAC. Por su parte, el ácido retinoico es capaz de secuestrar y liberar factores de transcripción en el núcleo celular, desplazando a los complejos integrados por las HDAC. La combinación de ambas drogas con la 5-aza-CdR logró la reexpresión de genes reguladores silenciados en células tumorales⁴⁴ y ha sido ya empleada en pacientes con leucemia aguda mieloide y síndrome mielodisplásico de alto riesgo⁴⁵. Otro ejemplo de sinergismo es la combinación del inhibidor no selectivo de las HDAC, TSA, con la 5-aza CdR, que dio lugar a la reexpresión de receptores estrogénicos en una línea de cáncer de mama, lo que las sensibilizó a la acción del Tamoxifeno⁴⁶. Es evidente que se requiere un alto nivel de seguridad para exportar estos tratamientos a patologías no neoplásicas, como la AR, pero parece probable que se puedan preparar combinaciones parecidas a las mencionadas, tras seleccionar los procesos alterados de forma individualizada en los pacientes con AR.

Epílogo: los retos del tratamiento de la artritis reumatoide

La principal lección que nos proporcionan los denominados tratamientos biológicos es que la AR es una entidad heterogénea que requiere un abordaje terapéutico individualizado⁴⁷. El reto para aplicar el mejor tratamiento a cada caso consiste en clasificar a los pacientes en función de su riesgo de progresión y de su probabilidad de respuesta⁴⁸. Del mismo modo que empleamos las herramientas genéticas, como los haplotipos HLA, DR y el estudio a gran escala de polimorfismos (HapMap), en el futuro inmediato debemos transformar nuestros conocimientos sobre la epigenética de la AR en herramientas con valor predictivo o pronóstico, e integrarlas a las ya disponibles. De forma simplificada, algunas de las medidas podrían ser la determinación del ratio HAT/HDAC y el grado de metilación del ADN en las muestras relevantes de los pacientes. En la actualidad ya se está trabajando en obtener estos patrones a gran escala, además de en el mapeo del sistema de microRNA (MirMap), no mencionado en esta revisión, pero de igual trascendencia para comprender la patogenia de las enfermedades autoinmunes⁴⁹. El conocimiento de los mecanismos epigenéticos nos está proporcionando los medios para conocer mejor y utilizar mejor los tratamientos ya existentes para la artritis reumatoide. Asimismo, algunos circuitos patogénicos aparecen como candidatos ideales a ser reprogramados en los fibroblastos sinoviales y en las células mononucleares de los pacientes. De momento, para el uso de los agentes epigenéticos en la AR deberá optimizarse su selectividad y su captación por el tejido diana, con objeto de evitar la aparición de efectos indeseables. No obstante, en analogía con lo observado con los tratamientos biológicos, el éxito de las terapias epigenéticas se basará en la correcta selección de los pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

A la Fundación Conchita Rábago y a la Fundación de la Sociedad Española de Reumatología, por las ayudas recibidas para ampliación de formación durante 2006–2007.

Bibliografía

1. Wordsworth P, Bell J. Polygenic susceptibility in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1991;50:343–6.
2. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell.* 2007;128:669–81.
3. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science.* 2001;293:1089–93.
4. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 2004;429:457–63.
5. Fischle W, Wang Y, Allis CD. Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature.* 2003;425:475–9.
6. Ito K, Adcock IM. Histone acetylation and histone deacetylation. *Mol Biotechnol.* 2002;20:99–106.
7. Grunstein M. Nucleosomes: regulators of transcription. *Trends Genet.* 1990;6:395–400.
8. Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* 1998;12:599–606.
9. McCall CE, Yoza BK. Gene Silencing in Severe Systemic Inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175:763–7.
10. Li X, Makarov SS. An essential role of NF-kappaB in the “tumor-like” phenotype of arthritic synoviocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:17432–17437.
11. Vanden Berghe W, Ndlovu MN, Hoya-Arias R, Dijsselbloem N, Gerlo S, Haegeman G. Keeping up NF-kappaB appearances: Epigenetic control of immunity or inflammation-triggered epigenetics. *Biochem Pharmacol.* 2006;72:1114–31.
12. Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell.* 2000;103:263–71.
13. Saccani S, Natoli G. Dynamic changes in histone H3 Lys 9 methylation occurring at tightly regulated inducible inflammatory genes. *Genes Dev.* 2002;16:2219–24.
14. Reiner S. Epigenetic control in the immune response. *Hum Mol Genet.* 2005;14(Spec No 1):R41–6.
15. Djuretic IM, Levanon D, Negreanu V, Groner Y, Rao A, Ansel KM. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate IFN γ and silence IL4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol.* 2007;8:145–53.
16. Lal G, Bromberg JS. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood.* 2009. [Epub ahead of print].
17. Ziegler SF, Buckner JH. FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. *Microbes Infect.* 2009;11:594–8.
18. Ehrlich M, Turner J, Gibbs P, Lipton L, Giovannetti M, Cantor C, et al. Cytosine methylation profiling of cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:4844–4849.
19. Karpf AR, Matsui S. Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65:8635–9.
20. Carew JS, Giles FJ, Nawrocki ST. Histone deacetylase inhibitors: Mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer Lett.* 2008;269:7–17.
21. Rutkauskaite E, Zacharias W, Schedel J, Müller-Ladner U, Mawrin C, Seemayer CA, et al. Ribozymes that inhibit the production of matrix metalloproteinase 1 reduce the invasiveness of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2004;50:1448–56.
22. Pap T, Nawrath M, Heinrich J, Bosse M, Baier A, Hummel KM, et al. Cooperation of Ras- and c-Myc-dependent pathways in regulating the growth and invasiveness of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50:2794–802.
23. Pap T, Meinecke I, Müller-Ladner U, Gay S. Are fibroblasts involved in joint destruction? *Ann Rheum Dis.* 2005;64(Suppl 4):iv52–4.
24. Müller-Ladner U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2005;1:102–10.
25. Takami N, Osawa K, Miura Y, Komai K, Taniguchi M, Shiraishi M, et al. Hypermethylated promoter region of DR3, the death receptor 3 gene, in rheumatoid arthritis synovial cells. *Arthritis Rheum.* 2006;54:779–87.
26. Morinobu A, Wang B, Liu J, Yoshiya S, Kurosaka M, Kumagai S. Trichostatin A cooperates with Fas-mediated signal to induce apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Rheumatol.* 2006;33:1052–60.
27. Jungel A, Baresova V, Ospelt C, Simmen BR, Michel BA, Gay RE, et al. Trichostatin A sensitises rheumatoid arthritis synovial fibroblasts for TRAIL-induced apoptosis. *Ann Rheum Dis.* 2006;65:910–2.
28. Javierre BM, Esteller M, Ballestar E. Epigenetic connections between auto-immune disorders and haematological malignancies. *Trends Immunol.* 2008;29:616–23.
29. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008;358:1148–59.
30. Nijhout HF, Reed MC, Ulrich CM. Mathematical models of folate-mediated one-carbon metabolism. *Vitam Horm.* 2008;79:45–82.
31. Wehbe H, Henson R, Meng F, Mize-Berge J, Patel T. Interleukin-6 contributes to growth in cholangiocarcinoma cells by aberrant promoter methylation and gene expression. *Cancer Res.* 2006;66:10517–24.
32. Couillard J, Demers M, Lavoie G, St-Pierre Y. The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;342:1233–9.
33. Roach HI, Yamada N, Cheung KS, Tilley S, Clarke NM, Oreffo RO, et al. Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum.* 2005;52:3110–24.
34. Nishida K, Komiyama T, Miyazawa S, Shen ZN, Furumatsu T, Doi H, et al. Histone deacetylase inhibitor suppression of autoantibody-mediated arthritis in mice via regulation of p16INK4a and p21(WAF1/Cip1) expression. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3365–76.
35. Manabe H, Nasu Y, Komiyama T, Furumatsu T, Kitamura A, Miyazawa S, et al. Inhibition of histone deacetylase down-regulates the expression of hypoxia-induced vascular endothelial growth factor by rheumatoid synovial fibroblasts. *Inflamm Res.* 2008;57:4–10.
36. Lin HS, Hu CY, Chan HY, Liew YY, Huang HP, Lepescheux L, et al. Anti-rheumatic activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in vivo in collagen-induced arthritis in rodents. *Br J Pharmacol.* 2007;150:862–72.
37. Leoni F, Fossati G, Lewis EC, Lee JK, Porro G, Pagani P, et al. The histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces production of pro-inflammatory cytokines in vitro and systemic inflammation in vivo. *Mol Med.* 2005;11:1–15.
38. Huber LC, Brock M, Hemmatazad H, Giger OT, Moritz F, Trenkmann M, et al. Histone deacetylase/acetylase activity in total synovial tissue derived from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2007;56:1087–1093.
39. Kondo Y, Shen L, Cheng AS, Ahmed S, Bumber Y, Charo C, et al. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet.* 2008;40:741–50.
40. Wissmann M, Yin N, Müller JM, Greschik H, Fodor BD, Jenuwein T, et al. Cooperative demethylation by JMJD2C and LSD1 promotes androgen receptor-dependent gene expression. *Nat Cell Biol.* 2007;9:347–53.
41. Pollard PJ, Loenarz C, Mole DR, McDonough MA, Gleadly J, Schofield CJ, et al. Regulation of Jumonji-domain containing histone demethylases by hypoxia inducible factor (HIF) 1- α . *Biochem J.* 2008;416:387–94.
42. Li Y, Reddy MA, Miao F, Shanmugam N, Yee JK, Hawkins D, et al. Role of histone H3 lysine 4 methyltransferase, SET7/9, in the regulation of NF-kappaB dependent inflammatory genes. Relevance to diabetes and inflammation. *J Biol Chem.* 2008;283:26771–81.
43. Heo K, Kim B, Kim K, Choi J, Kim H, Zhan Y, et al. Isolation and characterization of proteins associated with histone H3 tails in vivo. *J Biol Chem.* 2007;282:15476–15483.
44. Mongan NP, Gudas LJ. Valproic acid, in combination with all-trans retinoic acid and 5-aza-2'-deoxycytidine, restores expression of silenced RARbeta2 in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2005;4:477–86.
45. Soriano AO, Yang H, Faderl S, Estrov Z, Giles F, Ravandi F, et al. Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all trans retinoic acid in acute myeloid leucemia and myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2007;110:2302–8.
46. Fan J, Yin WJ, Lu JS, Wang L, Wu J, Wu FY, et al. ER alpha negative breast cancer cells restore response to endocrine therapy by combination treatment with both HDAC inhibitor and DNMT inhibitor. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008;134:883–890.
47. Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2:473–88.
48. Ospelt C, Neidhart M, E GR, Gay S. Gene analysis for exploring the effects of drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005;52:2248–56.
49. Guil S, Esteller M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41:87–95.